

米诺环素后处理对大鼠缺血再灌注损伤的影响及其机制

张利群¹, 齐国先²

(1. 沈阳医学院护理学院人文教研室, 辽宁省沈阳市 110034; 2. 中国医科大学第一附属医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 米诺环素; 缺血后处理; 心肌缺血再灌注损伤

[摘要] **目的** 探讨米诺环素后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其可能机制。**方法** 96 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组、低剂量米诺环素组(3 mg/kg)和高剂量米诺环素组(10 mg/kg)。通过结扎大鼠左冠状动脉前降支 45 min, 再灌注 2 h 及 24 h。再灌注 2 h, 检测各组心肌缺血危险区、梗死范围; 血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 含量及心肌组织 MPO 活性; 心肌凋亡指数(AI)以及心肌组织形态学改变。再灌注 24 h, 检测大鼠心脏血流动力学、心肌缺血危险区、梗死范围。**结果** 与缺血再灌注组比较, 低剂量、高剂量米诺环素均能降低左心室舒张末压、心肌梗死范围、AI 以及血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 含量及心肌组织 MPO 活性, 同时升高心率、左心室收缩压、 $\pm dp/dt_{\max}$ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 米诺环素后处理能够显著抑制心肌缺血再灌注损伤诱导的大鼠心肌细胞凋亡, 减少梗死范围, 明显改善心功能, 其机制与减少局部与系统的炎症反应有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effects of Minocycline Postconditioning of Myocardial Ischemia /Reperfusion Injury in Rats and Its Mechanisms

ZHANG Li-Qun¹, and QI Guo-Xian²

(1. Department of Humanity, School of Nursing of Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110034, China; 2. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Minocycline; Ischemia Postconditioning; Myocardial Ischemia-reperfusion Injury

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of minocycline postconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and its possible mechanism. **Methods** Ninety-six male Wistar rats were randomly divided into four groups: sham-operation group, ischemia-reperfusion (IR) group, low-dose minocycline (3 mg/kg) group and high-dose minocycline (10 mg/kg) group. The rat model of myocardial IR was established by occlusion of the left anterior descending coronary artery for 45 min and reperfusion for 2 hours or 24 hours. After 2 h reperfusion, myocardial area at risk and infarct size were evaluated; the amount of TNF- α , IL-1 β in serum and myocardium and cardiac MPO activity were assayed; myocardial apoptosis index(AI) and the myocardial tissue morphology were detected. The parameters of haemodynamics and myocardial area at risk and infarct size were evaluated 24 h after reperfusion. **Results** Compared with IR group, both low-dose and high-dose minocycline reduced LVEDP, enhanced HR, LVSP and $\pm dp/dt_{\max}$, lowered the amount of TNF- α , IL-1 β in serum and myocardium, cardiac MPO activity, and AI ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Minocycline postconditioning may ameliorate heart functions and decrease the infarct size and myocardial apoptosis induced by myocardial IR injury in vivo rats, and the protective effect may be related to interfering with the local and systemic inflammatory reactions.

再灌注治疗是限制急性缺血性心肌坏死最有效的方法, 而伴随再灌注出现的氧自由基爆发、钙超载、白细胞积聚以及炎症激活, 将介导缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤, 从而削弱再灌注

治疗的净效益^[1]。目前如何预防或改善 IR 损伤, 仍无有效方法。米诺环素是一种第二代四环素衍生物, 除抗菌作用外还具有抗炎、抗凋亡、基质金属蛋白酶抑制剂以及氧自由基清除等多效性^[2], 作为

[收稿日期] 2014-12-26

[修回日期] 2015-02-20

[基金项目] 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2013399); 沈阳医学院博士科研启动基金项目(20133050)

[作者简介] 张利群, 博士, 副教授, 主要从事冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 sunflowerzq@163.com。齐国先, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事心血管内科基础与临床研究, E-mail 为 qigx2002@medmail.com.cn。

第一个被用作神经变性疾病临床实验的抑制凋亡药物,其心肌保护作用已引起关注,研究中米诺环素多采用预处理与腹腔注射,应用剂量是临床用于抗感染、抗炎常规剂量的 30 倍^[3-4]。目前尚不清楚相当于人类安全应用的较低剂量米诺环素静脉注射是否仍具有心肌保护作用。本研究首次采用低剂量米诺环素 3 mg/kg,相当于临床应用标准剂量 200 mg 的给药剂量^[2],观察其后处理对 IR 心肌的作用,并探讨其对炎症的影响,为米诺环素防治心肌再灌注损伤的可行性和临床转化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

盐酸米诺环素(美国 Sigma 公司);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)(美国 Sigma 公司);伊文氏兰(瑞士 Fluka 公司);髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)试剂盒(南京建成科技有限公司);大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成科技有限公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(transferase-mediated dUTP nick end-labeling box, TUNEL box, 南京凯基生物科技发展有限公司);小动物呼吸机(HX-300, 成都泰盟科技有限公司);八导生理记录仪(日本 RM6000);石蜡切片机(德国 LEICA 公司);光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司);酶标仪(MpliskanMK3 芬兰 ThermoLabSystem);全自动生化分析仪(Co-base501 德国 Roehe)。

1.2 动物模型建立

雄性 Wistar 大鼠 96 只,体重 250~280 g,由中国医科大学实验动物中心提供。大鼠用 10% 水合氯醛 0.4 mL/100 g 腹腔注射麻醉,气管切开插管行小动物呼吸机辅助呼吸,潮气量 10 mL/kg,吸呼比 1:1.5,呼吸频率 75 次/min。在第四肋间行左胸廓切开术,暴露心脏,打开心包,挤出大部分心脏,暴露肺动脉圆锥与左心耳根部间的左冠状静脉。以左冠状静脉为标志,用 5-0 缝线在左冠状静脉下穿线,连同左冠状静脉一起在距冠状动脉前降支根部 1-2 mm 形成一个直径约 5 mm 的活结,将穿有 27G 针管长度约 5 mm 的硅胶管置于活结中,结扎后,见左室游离壁立即变白(或发绀)及心电图 ST 段抬高或 QRS 波宽高畸形并持续存在为结扎成功。45 min 后拔出硅胶管,使冠状动脉血流再通,再灌注时

局部组织充血及心电图 ST 段回落或 QRS 变窄。在整个缺血和再灌注过程中,一直监测大鼠肛温,通过热垫和台灯维持大鼠体温在 37°C~38°C。每组再灌注 2 h/24 h。假手术组动物手术全过程与其他组相同,但只穿线不结扎冠状动脉。

1.3 实验分组与处理

雄性 Wistar 大鼠 96 只随机分为缺血 45 min 再灌注 2 h 组(72 只)和再灌注 24 h 组(24 只),各组再分为假手术组、缺血再灌注组、低剂量米诺环素组、高剂量米诺环素组。(1)假手术组:冠状动脉左前降支只穿线,不结扎,穿线后 35 min 由股静脉缓慢注入生理盐水(1 mL 生理盐水/100 g);(2)缺血再灌注组:结扎冠状动脉左前降支 45 min,再灌注前 10 min 由股静脉缓慢注入生理盐水(1 mL 生理盐水/100 g);(3)低剂量米诺环素组:再灌注前 10 min 由股静脉缓慢注入盐酸米诺环素 3 mg/kg(0.3 g/L 生理盐水,1 mL 米诺环素溶液/100 g);(4)高剂量米诺环素组:再灌注前 10 min 由股静脉注入盐酸米诺环素 10 mg/kg(1 g/L 生理盐水,1 mL 米诺环素溶液/100 g);再灌注 2 h 组每 2 h 给药一次,共给药 2 次。每组随机取 6 只进行组织病理形态学检测及心肌凋亡细胞原位测定,6 只大鼠行心肌缺血危险区、梗死范围测定,另外 6 只大鼠颈动脉取血进行细胞因子 ELISA 检测,之后处死大鼠收集心脏标本,进行心肌组织 MPO 活性及组织细胞因子检测。再灌注 24 h 组每 2 h 给药一次,至再灌注 6 h,共给药 4 次,每组取 6 只大鼠行血流动力学指标检测,后行心肌缺血危险区、梗死范围测定。

1.4 血流动力学指标测定

再灌注 24 h 后,经右侧颈总动脉插管至左心室,连接至八导生理记录仪,记录心率(heart rate, HR)、左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张期末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左心室变化速率最大值($\pm dp/dt_{max}$)。

1.5 心肌缺血危险区、梗死范围测定

再灌注 2 h 及 24 h 后,再次原位结扎冠状动脉,从左心室腔注入 2% 伊文氏兰 3 mL,未缺血心肌组织染成蓝色,缺血心肌不染色,即为缺血危险区。剪去右心室和心房,冻存后切厚度为 2 mm 的横断面切片 4~5 个,缺血左室部分置于 37°C 下 1% 的 TTC 溶液中孵育 20 分钟,染色后将心脏切片以 10% 甲醛溶液固定 6 h。三种颜色(白、红和蓝)分别代表梗死区、非梗死的缺血区和非缺血区,非梗死的缺血区和梗死区一起作为缺血危险区。缺血

危险区用缺血危险区心肌重量与左心室重量之比(AAR/LV%)表示,而梗死范围用梗死区心肌重量与缺血危险区心肌重量之比(IS/AAR%)表示。

1.6 心肌组织病理形态学及心肌凋亡细胞原位测定

再灌注 2 h 后,迅速留取左心室前壁心肌组织,于 4% 的多聚甲醛固定 12 h,石蜡包埋,HE 染色观察再灌注心肌组织的病理变化。用 TUNEL 法检测细胞凋亡,具体操作按试剂盒说明书进行。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色,棕色为 TUNEL 染色凋亡细胞,每张切片随机选取 10 个视野($\times 400$ 倍),计数凋亡阳性细胞,以凋亡细胞数/细胞总数作为凋亡指数(apoptotic index, AI),反映各组心肌细胞凋亡的情况。

1.7 心肌组织 MPO 活性测定

再灌注 2 h,快速取出心脏,冰浴条件下,取再灌注区心肌组织 0.2 g,冰盐水冲洗,低温下研磨、加入 2 mL 生理盐水,匀浆机打成 10% 组织匀浆,15000 r/min 低温离心 30 min、取上清液,按试剂盒说明书操作。

1.8 血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 测定

再灌注 2 h,颈动脉取血 2 mL,静置后 4 $^{\circ}$ C 下 3000 r/min 离心 10 min,分离血清;取大鼠左室结扎

线以下心尖部危险区心肌组织,每 20 mg 组织加入 150 μ L 裂解液,与生理盐水混合后研磨匀浆,4 $^{\circ}$ C 15000 r/min 离心 5 min,取上清液即得组织蛋白提取液,用夹心 ELISA 法检测血清、心肌组织中 TNF- α 和 IL-1 β ,检测方法按照检测试剂盒使用说明进行。用考马斯亮蓝蛋白测定法检测每个组织标本的蛋白含量,得出数值后,将匀浆液中的细胞因子含量(/mL)换算成蛋白中的细胞因子含量(/mg)。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,两组间两两比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 米诺环素后处理对大鼠心脏血流动力学的影响

与假手术组比较,缺血再灌注组、低、高剂量米诺环素组 HR、LVSP、 $\pm dp/dt_{max}$ 指标均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),LVEDP 明显升高($P < 0.01$);与缺血再灌注组比较,低、高剂量米诺环素组均能显著增加 HR、升高 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),降低 LVEDP($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;表 1)。

表 1. 米诺环素对 IR 大鼠心功能参数的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 1. The effects of minocycline on cardiac function parameters in rats($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分 组	HR(次/分)	LVSP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)
假手术组	412.2 \pm 30.3	143.5 \pm 13.1	9.8 \pm 1.5	5258.7 \pm 538.7	3731.9 \pm 405.0
缺血再灌注组	351.3 \pm 26.4 ^a	95.7 \pm 12.8 ^b	17.9 \pm 2.6 ^b	3640.3 \pm 389.4 ^b	2061.1 \pm 293.5 ^b
低剂量米诺环素组	377.8 \pm 30.8	121.8 \pm 15.3 ^c	13.8 \pm 2.4 ^{ac}	4456.6 \pm 427.7 ^{ac}	2683.3 \pm 369.1 ^{bc}
高剂量米诺环素组	386.1 \pm 31.0	134.3 \pm 10.6 ^d	12.6 \pm 1.8 ^d	4952.6 \pm 439.1 ^d	3146.1 \pm 306.5 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较。

2.2 米诺环素后处理对大鼠心肌缺血危险区、梗死范围的影响

在缺血再灌注 2 h 及 24 h 组,各组大鼠心肌缺血危险区均无统计学差异($P > 0.05$);与假手术组比较,缺血再灌注组梗死范围明显增大($P < 0.01$);与缺血再灌注组比较,低、高剂量米诺环素组均能显著减小梗死范围($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与低剂量米诺环素组比较,高剂量米诺环素组减小梗死范围更显著($P < 0.05$;表 2 和图 1)。

2.3 米诺环素后处理对大鼠心肌组织病理形态学的影响

光镜下观察,假手术组:心肌细胞排列整齐,着色均匀,肌纤维横纹清晰,无细胞肿胀,未见变性坏死和炎性细胞浸润;缺血再灌注组:心肌肌纤维排列紊乱,着色不均匀,细胞肿胀明显,心肌细胞间隙水肿严重,肌纤维部分断裂,横纹模糊或消失,可见心肌细胞呈片状坏死,坏死区细胞核碎裂或崩解,周围有炎性细胞浸润,红细胞漏出明显;低、高剂量米诺环素组:心

肌细胞排列基本规整,部分心肌细胞水肿变性,肌纤维间隙水肿,偶尔可见散在的红细胞,但明显少于缺血再灌注组,少见炎性细胞浸润;与缺血再灌注组相比,心肌组织结构明显改善(图 2)。

2.4 米诺环素后处理对大鼠心肌细胞凋亡的影响

TUNNEL 染色后正常细胞核染蓝色,凋亡细胞核呈棕色。假手术组大鼠心肌中极少量 TUNEL 染色阳性细胞,与假手术组比较,缺血再灌注组大鼠染色阳性细胞明显增多,AI 明显增高($P < 0.01$),与缺血再灌注组比较,低、高剂量米诺环素组染色阳性细胞明显减少,AI 明显降低($P < 0.05$ 或 $P <$

0.01;表 3 和图 3)。

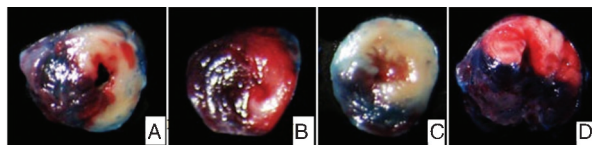


图 1. 米诺环素对大鼠心肌缺血危险区、梗死面积的影响 A 为缺血再灌注 2 h 组, B 为缺血再灌注 2 h 低剂量米诺环素组, C 为缺血再灌注 24 h 组, D 为缺血再灌注 24 h 低剂量米诺环素组。

Figure 1. The effects of minocycline on myocardial area at risk and infarct size in rats

表 2. 米诺环素对大鼠心肌缺血危险区、梗死面积的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Table 2. The effects of minocycline on myocardial area at risk and infarct size in rats($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分 组	缺血再灌注 2 h		缺血再灌注 24 h	
	缺血危险区	梗死范围	缺血危险区	梗死范围
缺血再灌注组	50.47% ± 6.87%	56.83% ± 6.25%	51.27% ± 4.52%	67.28% ± 4.27%
低剂量米诺环素组	49.61% ± 5.42%	39.19% ± 4.56% ^a	50.89% ± 6.18%	44.23% ± 4.26% ^a
高剂量米诺环素组	49.89% ± 4.89%	31.83% ± 3.08% ^a	49.73% ± 5.67%	35.18% ± 5.13% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; b 为 $P < 0.05$, 与低剂量米诺环素组比较。

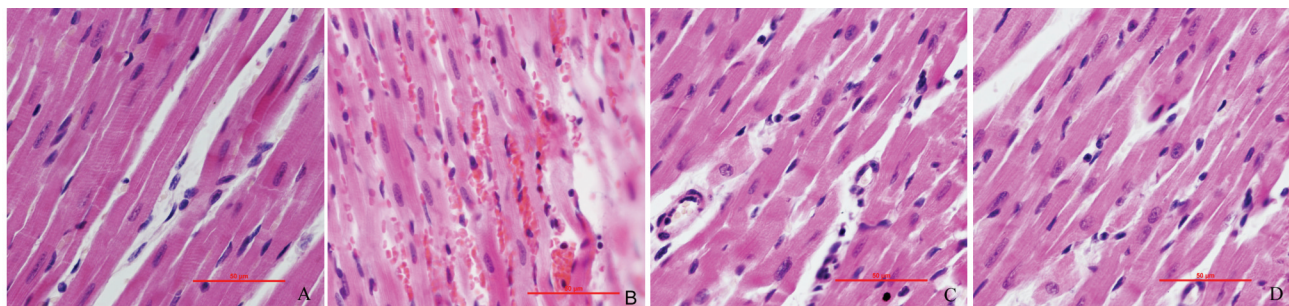


图 2. 米诺环素对大鼠心肌组织损伤的影响($400 \times, n = 6$) A 为假手术组, B 为缺血再灌注组, C 为低剂量米诺环素组, D 为高剂量米诺环素组。

Figure 2. The effects of minocycline on myocardial injury in rats($400 \times, n = 6$)

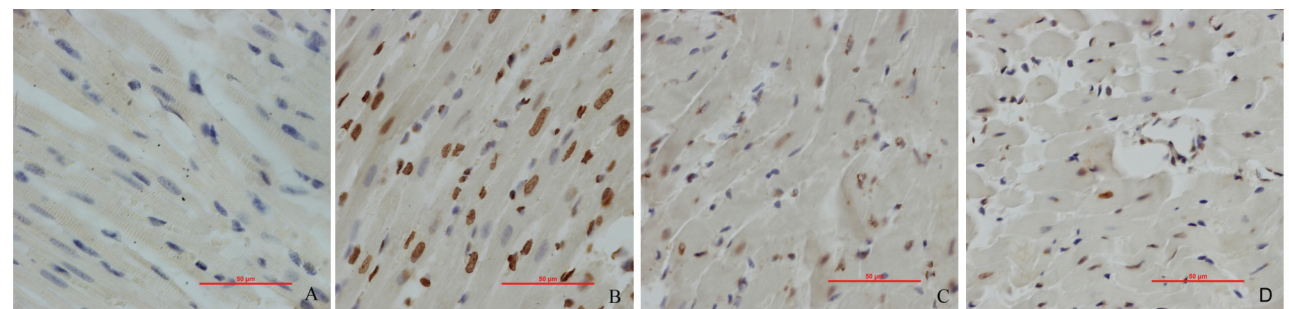


图 3. 米诺环素对大鼠心肌细胞凋亡的影响($400 \times, n = 6$) A 为假手术组, B 为缺血再灌注组, C 为低剂量米诺环素组, D 为高剂量米诺环素组。

Figure 3. The effects of minocycline on apoptosis of cardiocytes in rats($400 \times, n = 6$)

表 3. 米诺环素对大鼠心肌细胞凋亡的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)Table 3. The effects of minocycline on apoptotic index of cardiocytes in rats($n=6, \bar{x} \pm s$)

分 组	凋亡指数
假手术组	5.10% \pm 1.78%
缺血再灌注组	36.89% \pm 8.33% ^a
低剂量米诺环素组	24.63% \pm 5.79% ^{ab}
高剂量米诺环素组	20.83% \pm 5.62% ^{ac}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较。

表 4. 米诺环素对大鼠血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 含量和心肌 MPO 活性的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)Table 4. The effects of minocycline on serum and cardiac TNF- α , IL-1 β and MPO activity in rats($n=6, \bar{x} \pm s$)

分 组	血清 TNF- α (ng/L)	血清 IL-1 β (ng/L)	心肌 TNF- α (ng/g pro)	心肌 IL-1 β (ng/g pro)	心肌 MPO (U/g pro)
假手术组	52.34 \pm 10.27	44.38 \pm 8.18	15.11 \pm 2.21	8.14 \pm 3.08	1.06 \pm 0.29
缺血再灌注组	234.34 \pm 24.79 ^b	153.13 \pm 11.98 ^b	38.65 \pm 3.68 ^b	23.23 \pm 4.92 ^b	5.19 \pm 1.01 ^b
低剂量米诺环素组	163.59 \pm 12.87 ^{bd}	91.74 \pm 9.23 ^{bd}	22.03 \pm 5.04 ^{ad}	16.22 \pm 2.76 ^{ac}	3.48 \pm 0.99 ^{bd}
高剂量米诺环素组	129.18 \pm 7.56 ^{bde}	73.05 \pm 9.05 ^{bde}	15.51 \pm 3.87 ^{de}	10.19 \pm 2.84 ^{de}	2.29 \pm 0.53 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; e 为 $P < 0.05$, 与低剂量米诺环素组比较。

3 讨 论

米诺环素在临床上主要用于治疗关节炎及其它感染性疾病,近年发现它对多种神经系统疾病具有显著的保护作用^[5-6]。动物试验亦证实米诺环素预处理能改善肾脏^[7]及心肌缺血再灌注损伤,因此,本研究选择与米诺环素临床应用标准剂量 200 mg 相当的剂量 3 mg/kg^[2],再灌注前 10 min 经静脉注射给药,通过检测心肌细胞凋亡及心肌梗死范围评价心肌组织损伤程度,同时监测心脏血流动力学参数 - dp/dt_{max} 和 LVEDP 评价心脏舒张功能, + dp/dt_{max} 和 LVSP 评价心脏收缩功能。研究结果显示,心肌细胞凋亡及心肌梗死范围在 IR 组与米诺环素组均显著高于假手术组,提示 IR 导致明显的心肌损伤,降低心脏舒张功能同时损害了心肌收缩能力,低、高剂量米诺环素后处理均明显减少心肌坏死和凋亡,同时改善了受损心肌的舒张、收缩功能。

大量证据表明,再灌注损伤是缺血后炎症反应的结果,再灌注损伤可能存在时间的依赖性,因此,缺血和再灌注的各自持续时间可以影响再灌注损伤的程度,同时也能影响药物干预的有效性。应用麻醉的犬对血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)受体拮抗剂的研究证明了再灌注的时间对药物干预效能的影响,两个研究均选择缺血时间

2.5 米诺环素后处理对大鼠血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 和心肌 MPO 活性的影响

与假手术组比较,缺血再灌注组血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 含量及心肌 MPO 活性均明显增高($P < 0.01$);与缺血再灌注组比较,低、高剂量米诺环素组血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 含量及心肌 MPO 活性明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与低剂量米诺环素组比较,高剂量米诺环素组更能显著减小血清、心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 含量($P < 0.05$; 表 4)。

为 90 min,而再灌注时间分别为 3 h 和 6 h。在 3 h 再灌注研究中,PAF 受体拮抗剂(BN-52021 或 CV3988)减少梗死范围^[8]。而当再灌注 6 h 时,PAF 受体拮抗剂(WEB2086)未能减轻犬心肌梗死范围^[9]。假设两个研究使用的 PAF 受体拮抗剂同样有效,二者研究的主要不同是再灌注时间,因此,PAF 受体拮抗剂可能只是延迟,却不能最终减少犬的梗死范围。然而如果没有再灌注 6 h 的研究,PAF 受体拮抗剂对再灌注损伤的作用可能被夸大。本研究中,我们分别检测再灌注 2 h 和 24 h 后米诺环素对麻醉大鼠的梗死范围的影响,结果证实米诺环素具有心肌保护作用,并且其作用可持续至再灌注后 24 h。

严重缺血缺氧可即刻引起心肌细胞坏死,同时再灌注过程中氧化应激、细胞内钙超载、炎症细胞聚积至缺血区心肌组织并释放炎症细胞因子等均可直接损伤心肌细胞,促进心肌细胞进行性凋亡和坏死^[10-11],最终影响心功能。心肌缺血再灌注损伤实质上是一个炎症反应过程,中性粒细胞激活是缺血再灌注损伤发生发展的始动环节^[12-14],MPO 是存在于中性粒细胞、单核细胞中的溶酶体酶,是中性粒细胞的活化标志物,心肌 MPO 活性可反映心肌中性粒细胞的浸润水平^[15]。炎症细胞因子是机体炎症反应的标志,IR 后缺血区心肌组织通过自分泌

或旁分泌的方式生成 TNF- α 、IL-1 β 等前炎症细胞因子,这些炎症因子通过各自受体及细胞内信号转导途径进一步引起中性粒细胞与血管内皮细胞的粘附、迁移以及最终在心肌组织的积聚,释放溶酶体酶,造成缺血再灌注区域内的心肌细胞的凋亡或坏死。

心肌 IR 早期由肥大细胞产生的 TNF- α 是启动前炎症因子级联反应的关键,TNF- α 的心脏毒性主要表现为急性负性肌力作用^[16]以及诱导心肌细胞的凋亡与坏死^[17]。IL-1 β 是心肌 IR 早期由单核巨噬细胞合成分泌的急性炎症因子,IL-1 β 能刺激血管内皮细胞表达细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1),而 ICAM-1 诱导多形核白细胞 (polymorphonuclear leukocytes, PMN) 黏附在内皮细胞和内皮下基质并穿过内皮迁移进入缺血区,通过阻塞微血管、释放氧自由基导致心肌细胞损伤。IL-1 β 可被 TNF- α 诱导产生,并与 TNF- α 协同产生负性肌力作用,抑制心肌的收缩功能^[16]。本研究结果表明,心肌的再灌注损伤导致 PMN 迁徙、浸润,表现为局部组织 MPO 活性升高,随着 PMN 浸润局部前炎症因子产物 TNF- α 显著增加,启动前炎症因子级联反应,IL-1 β 生成增多,增多的前炎症因子与 PMN 浸润相互促进诱发强烈的心肌局部和全身炎症反应,直接或间接启动凋亡甚至坏死,最终导致心功能降低,并形成恶性循环。而低剂量米诺环素后处理通过显著降低 MPO 活性,即有效抑制了中性粒细胞在心肌组织的浸润,降低心肌局部和血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平,进而减轻心肌细胞凋亡程度和心肌梗死的范围,改善心功能,其心肌保护作用呈剂量依赖性,高剂量米诺环素组效果更好。

本研究首次证实低剂量米诺环素后处理能减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤,静脉注射在大鼠急性心肌损伤模型中应用安全、可行,其心肌保护机制涉及对心肌组织 PMN 浸润的抑制及对循环和心肌炎症细胞因子的调整,以上结果对米诺环素的急性心肌保护的临床转化具有指导意义。

[参考文献]

[1] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species[J]. *World J Cardiol*, 2011, 3(6): 186-200.

[2] Bahrami F, Morris DL, Pourgholami MH. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2012, 12(1): 44-52.

[3] Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, et al. Minocycline inhibits caspase activation and reactivation, increases the ratio of XIAP to smac/DIABLO, and reduces the mitochondrial leakage of cytochrome C and smac/DIABLO. [J]. *Am Coll Cardiol*, 2004, 43(5): 865-874.

[4] Tao R, Kim SH, Honbo N, et al. Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia-reperfusion injury by inhibiting poly (ADP-ribose) polymerase-1[J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(6): 659-668.

[5] Fagan SC, Cronin LE, Hess DC. Minocycline development for acute ischemic stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2011, 2(2): 202-208.

[6] Li C, Yuan K, Schluesener H. Impact of minocycline on neurodegenerative diseases in rodents: a meta-analysis[J]. *Rev Neurosci*, 2013, 24(5): 553-562.

[7] Xia D, Shen K, Zhong W, et al. Administration of minocycline ameliorates damage in a renal ischemia/reperfusion injury model[J]. *Clin Invest Med*, 2011, 34(2): E55-63.

[8] Maruyama M, Farber NE, Vercellotti GM, et al. Evidence for a role of platelet-activating factor in the pathogenesis of irreversible but not reversible myocardial injury after reperfusion in dogs[J]. *Am Heart J*, 1990, 120: 510-520.

[9] Black SC, Driscoll EM, Lucchesia BR. Inhibition of platelet-activating factor fails to limit ischemia and reperfusion-induced myocardial damage[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, 20: 997-1005.

[10] Guo J, Wang SB, Yuan TY, et al. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 231(2): 384-391.

[11] 吕磊, 孟庆欣, 徐军, 等. 川芎嗪减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤炎症反应及机制^[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20(6): 514-518.

[12] Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on[J]. *Basic Res Cardiol*, 2002, 97(4): 268-275.

[13] Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 481-497.

[14] Schofield ZV1, Woodruff TM, Halai R, et al. Neutrophils--a key component of ischemia-reperfusion injury [J]. *Shock*, 2013, 40(6): 463-470.

[15] Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium[J]. *J Pharmacol Methods*, 1985, 14(3): 157-167.

[16] Büyükakilli B, Atici A, Özkan A, et al. The effect of tumor necrosis factor- α inhibitor soon after hypoxia-ischemia on heart in neonatal rats[J]. *Life Sci*, 2012, 90(21-22): 838-845.

[17] McQuade T1, Cho Y, Chan FK. Positive and negative phosphorylation regulates RIP1- and RIP3-induced programmed necrosis[J]. *Biochem J*, 2013, 456(3): 409-415.

(此文编辑 李小红)