

## 基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000071

TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 在心肌无复流中的表达与调节机制

曾 敏,魏 欣,吴智勇,李 伟,郑 茵,何扬利,王 萍,翟文婷

(海南省人民医院医疗保健中心三病区,海口 570311)

**【摘要】目的:**研究肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子-1(intracellular adhesion molecules-1, ICAM-1)在家兔心肌无复流模型血浆中的表达水平及调节机制。**方法:**30 只新西兰大白兔,随机分为假手术组、心肌缺血再灌注组和四氢吡咯二硫代氨基甲酯(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)组(缺血前 30 min 经耳缘静脉注射 PDTC 20 mg/kg)。心肌缺血再灌注组和 PDTC 组采用开胸冠状动脉结扎回旋支 90 min 再松解 60 min 的方法建立家兔心肌无复流模型。通过酶联免疫吸附试验测定各组家兔缺血再灌注过程中炎症因子 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 在血浆的表达水平、测定心肌不同区域心肌髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性、光镜及电镜下观察心肌细胞受损情况。**结果:**家兔心肌缺血再灌注组炎症因子 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的表达水平在缺血后 150 min 时达高峰,明显高于 PDTC 组( $P<0.05$ )。心肌缺血再灌注组无复流区及缺血区心肌 MPO 活性较假手术组和 PDTC 组均明显升高( $P<0.05$ )。PDTC 组无复流区心肌细胞损伤程度轻于缺血再灌注组。**结论:**家兔心肌缺血再灌注诱导炎症因子的表达;抑制核因子- $\kappa$ B 激活可减少无复流区的中性粒细胞浸润和激活,减少炎症因子的表达,减轻无复流区心肌再灌注损伤程度。

**【关键词】**促炎因子;缺血再灌注;髓过氧化物酶**【中图分类号】**R541.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-06-09Expressions of TNF- $\alpha$  and ICAM-1 during myocardial ischemia/reperfusion and related regulatory mechanism

Zeng Min, Wei Xin, Wu Zhiyong, Li Wei, Zheng Ying, He Yangli, Wang Ping, Zhai Wenting

(Ward 3 Department of Medical Care Center, the People's Hospital of Hainan Province)

**【Abstract】Objective:** To investigate the release of pro-inflammatory mediators: tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) and intracellular adhesion molecules-1(ICAM-1) during myocardial ischemia/reperfusion and related regulatory mechanism. **Methods:** Totally 30 New

Zealand white rabbits were divided into 3 groups: sham group,

cardiac ischemia/reperfusion group (the left circumflex coronary

arteries of the rabbits were ligated for 90 min then untied for

60 min) and PDTC group (20 mg/kg pyrrolidine dithiocarbamate

was injected intravenously 30 min before cardiac ischemia).

macol, 2008, 75(2): 346-359.

[13] Kajanne R, Miettinen P, Mehlem A, et al. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways[J]. J Cell Physiol, 2007, 212(2): 489-497.

[14] Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, et al. Involvement of MAPK pathway in TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells [J]. Mol Hum Reprod, 2006, 12(4): 225-232.

[15] Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma [J]. Curr Opin Oncol, 2008, 20(2): 183-189.

[16] Chung TW, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERKs and PI-3K/AKT pathways; involvement of invasive potential [J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1123-1125.

(责任编辑:关蕴良)

[7] Kruger A, Sanchez-Sweetman OH, Martin DC, et al. Host TIMP-1 overexpression confers resistance to experimental brain metastasis of a breast carcinoma cell line [J]. Oncogene, 1998, 16(18): 2419-2423.

[8] Migita K, Maeda Y, Miyashita T, et al. The serum levels of resistin in rheumatoid arthritis patients [J]. Clin Exp Rheumatol, 2006, 24(6): 698-701.

[9] Larochelle J, Freiler J, Dice J, et al. Plasma resistin levels in asthmatics as a marker of disease state [J]. J Asthma, 2007, 44(7): 509-513.

[10] Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling; the role of matrix metalloproteinases [J]. J Pathol, 2003, 200(4): 448-464.

[11] Lau AC, Duong TT, Ito S, et al. Matrix metalloproteinase-9 activity leads to elastin breakdown in an animal model of Kawasaki disease [J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(3): 854-863.

[12] Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease [J]. Biochem Phar-

Plasma levels of ICAM-1 and TNF- $\alpha$  at different time points during ischemia/reperfusion were detected by ELISA. Myocardial myeloperoxidase activities in different regions were determined and myocardial cell injury was observed under the light microscope and electron microscope. **Results:** Serum concentration of TNF- $\alpha$  and ICAM-1 in cardiac ischemia/reperfusion group reached the peak 150 min after myocardial ischemia, which was significantly higher than that of sham group and PDTC group ( $P < 0.05$ ). Myeloperoxidase in no-reflow area and ischemic area was significantly higher in ischemia/reperfusion group than in sham group and PDTC group ( $P < 0.05$ ). Histological results showed that myocardial injury in no-reflow area was less severe in PDTC group than in ischemic/reperfusion group. **Conclusions:** Cardiac ischemic/reperfusion can promote the release of pro-inflammatory mediators. Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B can decrease the infiltration and activation of neutrophil granulocyte, attenuate the release of pro-inflammatory factors and decrease myocardial injury in no-reflow area.

【Key words】pro-inflammatory factor; ischemic/reperfusion; myeloperoxidase

随着经皮冠状动脉介入术、溶栓术、冠脉搭桥术等治疗手段的发展,急性心肌梗死患者的死亡率已明显下降。但冠脉再通后心肌无复流现象却常常导致心律失常、心功能不全等恶性并发症,严重影响心肌梗死患者的预后。炎症反应作为心肌缺血再灌注损伤的重要机制可能参与了无复流的发生发展。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子-1 (intracellular adhesion molecules-1, ICAM-1) 是介导炎症反应的重要促炎因子,本研究旨在探讨炎症因子 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 在家兔心肌无复流模型中的血浆表达水平及其调节机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和试剂

新西兰大白兔,雄性,体质量约 2.5 kg,购自北京海淀兴旺动物养殖公司。四氢吡咯二硫代氨基甲酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 购自 Sigma 公司。TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 酶联免疫吸附测定试剂盒均购自美国 R&D 公司。心肌髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。硫黄素 S 购自 Sigma 公司,伊文斯蓝购自 Alfa Aesar 公司。

### 1.2 家兔心肌缺血再灌注后无复流模型制备及染色介定心肌不同区域

新西兰大白兔 30 只,随机分为假手术组、心肌缺血再灌注组和 PDTC 处理组 (每组 10 只)。PDTC 组于缺血前 30 min 经耳缘静脉注射 20 mg/kg PDTC,假手术组和心肌缺血再灌注损伤组给予相同剂量的生理盐水。采用 3%戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 耳缘静脉注射麻醉动物,气管插管后接小动物呼吸机 (呼吸频率 32 次/min,吸呼比 1:2,潮气量 15 ml/kg) 进行机械通气,于胸骨正中打开胸腔,纵行切开心包膜,暴露心脏,于冠状动脉左回旋支近段 1/5 处穿入 3/0 缝合线,再将缝合线穿入阻断管,结扎冠脉,心肌缺血依据心电图 ST 段抬高

且有节段性运动不良确认。结扎 1.5 h 后松解缝合线,再灌注 1 h 后,从左房注入 1.5 ml/kg 6% 的硫磺素 S (一种特异性内皮荧光染色剂),再于原位重新结扎回旋支,从左房再注入 2 ml 4% 伊文斯蓝处死实验动物,心肌切片,紫外灯下无复流区无荧光着色,家兔心肌无复流模型制备成功;非蓝染区域为缺血区。按染色结果对各个区域分别取材,液氮保存。假手术组只穿线不结扎。

### 1.3 MPO 含量测定

取各组家兔室间隔、缺血区和无复流区心肌组织剪成约 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm 的小块,加入匀浆介质,配成心肌组织匀浆,按 MPO 试剂盒说明进行操作,用紫外分光光度计 (上海分析仪器总厂) 测定心肌 MPO 活性。

### 1.4 炎症因子 TNF- $\alpha$ 和 ICAM-1 的测定

(1) 标本的采集和处理:家兔心肌缺血前后不同时间点 (0、45、100 min 及 150 min) 分别自耳缘静脉采血 5 ml,用乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝管收集动物全血,立即以 1 000 r/min 离心 15 min,取血浆于 -80  $^{\circ}$ C 低温冻存。所有样品在全部标本采集完成后一次性成批检测。(2) 测定用酶联免疫定量分析的方法。应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 水平,与其它相关蛋白无交叉反应。经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (absorbance, A) 值,计算样品浓度。

### 1.5 病理检查

光镜:心肌组织取出后于 10% 的中性甲醛中固定 3 d,石蜡包埋、切片 (5  $\mu$ m),常规苏木精-伊红染色法观察白细胞浸润及心肌组织损伤情况。电镜:心肌组织取出后于电镜固定液中固定 7 d,经脱水、包埋、切片后观察心肌组织病理变化。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,主要指标均进行正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。每个实验步骤至少重复 3 次。统计分析采用单因素方差分析,然后选择 LSD- $t$  法行两两比较。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

表 1 不同时间点家兔血浆 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平 ( ng/ml,  $\bar{x} \pm s, n=10$  )  
Tab.1 Plasma level of TNF- $\alpha$  at different time points ( ng/ml,  $\bar{x} \pm s, n=10$  )

| 组别                  | 缺血后时间 ( min )   |                 |                 |                   |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
|                     | 0               | 45              | 100             | 150               |
| 假手术组                | 5.09 $\pm$ 0.04 | 5.22 $\pm$ 0.07 | 4.51 $\pm$ 0.12 | 5.69 $\pm$ 0.14   |
| 缺血再灌注组 <sup>a</sup> | 5.55 $\pm$ 0.81 | 6.23 $\pm$ 0.47 | 7.98 $\pm$ 0.04 | 12.76 $\pm$ 0.003 |
| PDTC 组              | 5.61 $\pm$ 0.77 | 6.01 $\pm$ 0.21 | 6.32 $\pm$ 0.36 | 7.37 $\pm$ 0.12   |

注: a, 与 PDTC 组比较,  $P=0.049$

表 2 不同时间点家兔血浆 ICAM-1 蛋白表达水平 ( ng/ml,  $\bar{x} \pm s, n=10$  )  
Tab.2 Plasma level of ICAM-1 at different time points ( ng/ml,  $\bar{x} \pm s, n=10$  )

| 组别                  | 缺血后时间 ( min )     |                   |                    |                    |
|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                     | 0                 | 45                | 100                | 150                |
| 假手术组                | 119.22 $\pm$ 6.76 | 121.69 $\pm$ 8.09 | 122.98 $\pm$ 5.56  | 117.93 $\pm$ 9.94  |
| 缺血再灌注组 <sup>a</sup> | 120.57 $\pm$ 7.48 | 134.61 $\pm$ 3.35 | 163.91 $\pm$ 12.69 | 202.01 $\pm$ 23.82 |
| PDTC 组              | 120.51 $\pm$ 1.11 | 123.94 $\pm$ 9.01 | 106.76 $\pm$ 7.25  | 124.65 $\pm$ 12.51 |

注: a, 与 PDTC 组比较,  $P=0.027$

## 2 结 果

### 2.1 各组家兔缺血后不同时间点的血浆 TNF- $\alpha$ 水平测定

采用 ELISA 法检测家兔心肌缺血后不同时间点 (0、45、100 min 及 150 min) 血浆 TNF- $\alpha$  水平。结果显示, 缺血再灌注组家兔血浆中 TNF- $\alpha$  水平自缺血开始后就逐渐上升, 到 150 min 时到达高峰。相反, PDTC 组各时间点 TNF- $\alpha$  蛋白水平无明显变化, 于 100 min 和 150 min 点较缺血再灌注组显著低下。采用单因素方差分析,  $F=6.617, P=0.03$ , 提示组间均数的差异有统计学意义。进一步行两两比较, PDTC 组与缺血再灌注组的均值差异有统计学意义,  $P=0.049$ , 见表 1。

### 2.2 各组家兔缺血后不同时间点的血浆 ICAM-1 水平测定

同样, 采用 ELISA 法检测家兔心肌缺血后不同时间点 (0、45、100 min 及 150 min) 血浆 ICAM-1 水平, 结果发现缺血再灌注组动物血浆中 ICAM-1 水平自缺血开始后就逐渐上升, 到 150 min 时到达高峰。相反, PDTC 组各时间点 ICAM-1 蛋白水平无明显变化, 于 100 min 和 150 min 时较缺血再灌注组显著低下。采用单因素方差分析,  $F=5.347, P=0.046$ , 提示组间均数的差异有统计学意义。进一步行两两比较, PDTC 组与缺血再灌注组的均值差异有统计学意义,  $P=0.027$ , 见表 2。

### 2.3 各组家兔心肌不同区域 MPO 比较

根据伊文斯蓝和硫磺素 S 染色法对心肌进行染色, 并按染色结果分区取材进行实验。伊文斯蓝染色心肌非蓝染区域为缺血区, 硫磺素 S 荧光染色心肌切片紫外光下不显色区域为无复流区。结果显示, 家兔心肌缺血再灌注组无复流区心肌白细胞浸润明显, MPO 明显高于 PDTC 组 ( $P<0.05$ ), PDTC 组与假手术组间无统计学差异。缺血再灌注组缺血区心肌 MPO 也高于 PDTC 组 ( $P<0.05$ ), 见表 3。

表 3 各组家兔心肌不同区域 MPO 比较 (  $\bar{x} \pm s, n=10$  )

Tab.3 Comparison of MPO in different areas in each group (  $\bar{x} \pm s, n=10$  )

| 组别     | 室间隔区 ( % )      | 缺血区 ( % )                    | 无复流区 ( % )                    |
|--------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| 假手术组   | 2.79 $\pm$ 0.63 | 2.23 $\pm$ 0.36              | 2.87 $\pm$ 0.52               |
| 缺血再灌注组 | 3.74 $\pm$ 0.92 | 7.01 $\pm$ 1.75 <sup>a</sup> | 18.14 $\pm$ 2.96 <sup>b</sup> |
| PDTC 组 | 3.46 $\pm$ 1.21 | 4.16 $\pm$ 1.15              | 3.86 $\pm$ 1.08               |

注: 与 PDTC 组比较, a,  $P=0.0076$ ; b,  $P<0.0001$

### 2.4 心肌组织病理检查结果

HE 染色及光镜观察结果: 假手术组心肌细胞形态正常, 无肿胀、变性、坏死及炎性细胞浸润。缺血再灌注组的缺血区心肌细胞肿胀, 部分肌丝溶解、断裂; 无复流区心肌细胞排列紊乱, 明显变性、坏死。PDTC 组无复流区心肌细胞变性、坏死及炎性反应较缺血再灌注组无复流区轻。

电镜观察结果: 假手术组心肌细胞内细胞器形态大小正常。缺血再灌注组缺血区心肌细胞胞浆内线粒体轻度肿胀, 部分线粒体嵴分离、断裂, 肌原纤维排列方向紊乱; 无复流区心肌细胞破坏严重, 线粒体肿胀明显, 大小不一, 呈囊泡样改变, 嵴断裂、消失, 肌原纤维溶解、断裂。PDTC 组各区心肌细胞内细胞器肿胀、破坏程度较缺血再灌注组无复流区轻。

## 3 讨 论

冠状动脉无复流是指闭塞的冠状动脉完全开通后, 在没有栓塞、痉挛及夹层等机械性梗阻存在的情况下, 血流不能充分灌注冠脉远端血管的一种现象。临床上冠脉无复流的存在不仅是心肌损伤、梗死延展的标志, 也是心室重构、心功能障碍的预测指标。因此, 探讨其发生发展机制已经成为冠心

病研究的热点。本研究中无复流模型采用经典的 Kloner 等方法<sup>[1]</sup>,予以适当改良即通过结扎雄性新西兰大白兔的左回旋支冠状动脉 1.5 h 再解除结扎 1 h 后,进行硫磺素 S 染色构建心肌缺血再灌注后无复流模型。

炎症反应作为缺血再灌注的主要病理生理机制<sup>[2-3]</sup>,可能参与了无复流的发生发展。TNF- $\alpha$  是一种具备多种生物活性的促炎症因子,与再灌注损伤引起的炎症反应有密切关系<sup>[4]</sup>。Hernandez-Alejandro 等<sup>[5]</sup>的研究显示通过发夹 RNA 的方式沉默 TNF- $\alpha$  基因能减少肝脏的缺血再灌注损伤。Jia 等<sup>[6]</sup>报道了 TNF- $\alpha$  能通过上调 fgl2 的表达加重大鼠心肌缺血再灌注损伤。与此一致,本研究结果显示缺血再灌注可促进 TNF- $\alpha$  的表达,并随再灌注时间的延长而增加。PDTC 是一种核因子- $\kappa$ B 特异性抑制剂。本研究中 TNF- $\alpha$  在 PDTC 组与缺血再灌注组的均值差异有统计学意义 ( $P=0.049$ ),它的生理学意义在于说明了通过 PDTC 抑制核因子- $\kappa$ B 可降低缺血再灌注诱导的 TNF- $\alpha$  表达水平,核因子- $\kappa$ B 参与了心肌缺血再灌注对 TNF- $\alpha$  水平变化的调节。在应激情况下,核因子- $\kappa$ B 从与其抑制蛋白 I $\kappa$ B 的复合体中解离并转运至胞核,启动下游靶基因转录并调控 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-1、白细胞介素-6、ICAM-1 等分子的表达。ICAM-1 是受核因子- $\kappa$ B 调节的下游因子,也是介导再灌注损伤炎症反应的重要促炎因子。Jin 等<sup>[7]</sup>研究显示隐丹参酮可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 ICAM-1 在人脐静脉内皮细胞和大鼠心肌缺血再灌注后的表达,从而减轻再灌注损伤。本研究结果显示,心肌缺血再灌注所诱导的 ICAM-1 表达可被 PDTC 所抑制。因而推测,ICAM-1 作为促炎因子参与了家兔缺血再灌注后无复流的发生,而核因子- $\kappa$ B 介导了对 ICAM-1 水平变化的调节机制。MPO 是中性粒细胞浆中的一种特异性酶,是中性粒细胞活化和聚集的标志,心肌组织中 MPO 活性的变化可反映再灌注后中性粒细胞在心肌组织的聚集程度。MPO 在无复流区的高度表达也反映了此区缺血再灌注后急剧的炎症反应。与此一致,心肌病理切片的光镜和

电镜下观察也显示缺血再灌注后无复流区心肌细胞损伤破坏严重,PDTC 处理可明显减轻无复流区心肌细胞损害程度,进一步证实核因子- $\kappa$ B 介导了无复流区的炎症反应,而这一炎症反应可能正是通过 TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 等下游炎症因子来促进完成。

无复流现象对冠脉血管再通后的临床预后产生严重的不良影响,减少无复流的发生将成为冠心病再灌注治疗患者的福音。本研究结果提示促炎因子 TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 可能在核因子- $\kappa$ B 的调控下促进无复流区的白细胞聚集、炎症反应,加剧心肌损伤。无复流的发生机制十分复杂,尚需更多的基础和临床研究来进一步阐述。

## 参 考 文 献

- [1] Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog[J]. J Clin Invest, 1974, 54(6): 1496-1508.
- [2] Kamo N, Ke B, Ghaffari AA, et al. ASC/caspase-1/IL-1 $\beta$  signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury[J]. Hepatology, 2013, 58(1): 351-362.
- [3] Zhang ZG, Sun X, Zhang QZ, et al. Neuroprotective effects of ultra-low-molecular-weight heparin on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: involvement of apoptosis, inflammatory reaction and energy metabolism[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(1): 1932-1939.
- [4] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure[J]. Pharmacol Ther, 2010, 127(3): 295-314.
- [5] Hernandez-Alejandro R, Zhang X, Croome KP, et al. Reduction of liver ischemia reperfusion injury by silencing of TNF- $\alpha$  gene with shRNA[J]. J Surg Res, 2012, 176(2): 614-620.
- [6] Jia P, Wang J, Wang L, et al. TNF- $\alpha$  upregulates fgl2 expression in rat myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Microcirculation, 2013, 20(6): 524-533.
- [7] Jin YC, Kim CW, Kim YM, et al. Cryptotanshinone, a lipophilic compound of Salvia miltiorrhiza root, inhibits TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in HUVEC and attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 614(1-3): 91-97.

(责任编辑:关蕴良)