· 基础研究 ·

粉防己碱调控炎症因子减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤

王裕勤[1], 曹雪滨[1*], 朱元州[2], 冯义柏[2]

([1]解放军第252医院心内科, 保定 071000; [2]华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科, 武汉 430022)

【摘 要】 目的 研究粉防己碱通过对心肌缺血/再灌注（I/R）过程中炎症因子肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素（IL）- 1β、IL-6 的影响减轻 I/R 损伤。方法 80 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: I/R 组、假手术组（Sham）、粉防己碱治疗组（Tet）, 辛伐他汀治疗组（Sim）。I/R 组结扎大鼠冠状动脉左前降支造成心肌缺血 30 min/再灌注 24 h 后处死大鼠; Sham组只穿针不结扎, 余步骤同I/R组; Tet组在缺血前20min腹腔注射Tet, Sim组结扎手术前予辛伐他汀（2mg/kg）连续灌胃 14d, 余步骤同 I/R 组。抽血检测血清中肌酸激酶（CK）, 乳酸脱氢酶（LDH）。二维（2D）超声评价心脏功能: 检测左心室舒张末期内径（LVDd）、左心室收缩末期内径（LVDs）、左心室短轴缩短率（FS）和射血分数（EF）, 每个指标连续测量三个心动周期, 取其平均值。24h 后取心肌标本, 用酶联免疫吸附法（ELISA）检测血清和心肌组织中 IL-1β, IL-6, TNF-α 表达水平。髓过氧化物酶（MPO）测定心肌组织中性粒细胞的浸润程度。伊文蓝/氯化四唑（EB/TTC）双染色法测量心肌梗死面积（MIS）。结果 （1）各组血清心肌酶水平比较: I/R 组、Tet 组、Sim 组水平显著高于 Sham 组（$P<0.01$）。与 I/R 组相比, Tet 组和 Sim 组均显著降低（$P<0.01$）, Tet 组与 Sim 组比较无显著性差异（$P>0.05$）。（2）各组心肌梗死面积比较: 心肌梗死面积、梗死面积/左室面积%、梗死面积/缺血面积% 3 项指标, Tet 组与 Sim 组显著低于 I/R 组, 而 Tet 组与 Sim 组之间无显著性差异（$P>0.05$）。（3）各组再灌注 24h 后超声检测心功能比较: 以 Sham 组术前心功能数据为对照, I/R 组、Tet 组、Sim 组 FS、EF 值均显著降低（$P<0.01$）, Tet 组和 Sim 组显著高于 I/R 组（$P<0.01$）。I/R 组、Tet 组、Sim 组 E/A 比值均显著降低（$P<0.01$）, Tet 组和 Sim 组显著高于 I/R 组（$P<0.01$）。（4）各组缺血心肌局部 MPO 活性比较: I/R 组、Tet 组、Sim 组均显著高于 Sham 组（$P<0.01$）。Tet 组与 Sim 组无显著性差异（$P>0.05$）。（5）各组大鼠血清及心肌组织局部炎症因子 TNF-α, IL-1β, IL-6 表达水平比较: I/R 组、Tet 组、Sim 组均显著高于 Sham 组（$P<0.01$）, Tet 组与 Sim 组显著高于 I/R 组（$P<0.01$）。Tet 组与 Sim 组无显著性差异（$P>0.05$）。结论 炎症因子参与了 I/R 损伤。粉防己碱可减轻 I/R 损伤时心肌酶的释放, 保护膜结构, 减少局部中性粒细胞浸润, 改善心功能。

【关键词】粉防己碱; 心肌再灌注损伤; 肿瘤坏死因子-α; 白细胞介素类

【中图分类号】 R322.1 【文献标识码】 A 【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00064

Tetrandrine control pro-inflammatory factor to reduce rat myocardial ischemia/reperfusion injury

WANG Yuqin[1], CAO Xuebin[1*], ZHU Yuanzhou[2], FENG Yibai[2]

([1]Department of Cardiology, Chinese PLA 252nd Hospital, Baoding 071000, China; [2]Department of Cardiology, WuHan Union Hospital, WuHan 430022, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of tetrandrine(Tet) on expression of pro-inflammatory factors, including TNF-α, IL-1β and IL-6, in rat suffering from cardiac ischemia/reperfusion(I/R) injury, and the mechanism through which Tet attenuates cardiac I/R injury. **Methods** Totally 80 male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into 4 groups: sham group, I/R group, Tet group and simvastatin(Sim) group. The SD rats in I/R group were subjected to 30-min left anterior descending (LAD) coronary occlusion and 24-h reperfusion to make I/R injury model *in vivo*. The rats in sham group were not subjected to similar procedures except artery occlusion. The rats in Tet group received abdominal injection of Tet at 20min before I/R injury. The rats in Sim group received intragastric administration of Sim (2 mg/kg) for 14 days before I/R injury. Cardiac function was assessed using two-dimensional(2-D) ultrasound, including left ventricular end-diastolic dimension(LVDd), left ventricular end-systolic dimension(LVDs), fractional shortening(FS), and left ventricular ejection fraction(LVEF). The serum levels of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected. The expression levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 in serum and myocardial tissue were detected by ELISA. The neutrophil infiltration degree in myocardium was determined by measuring the activity of

收稿日期：2009-12-07; 修回日期：2011-07-06

通讯作者：曹雪滨, Tel: 0312-2058549, E-mail: cxb252@yahoo.com.cn

myeloperoxidase (MPO) method. Azovan Blue/2,3,5-Tripheny-2H-Tetrazoliam Chloride (EB/TTC) dyeing method was used to measure the infraction size. **Results** The LDH and CK levels were significantly higher in I/R, Tet and Sim groups than in sham group ($P<0.01$), and were much lower in Tet and Sim groups than in I/R group ($P<0.01$); there was no difference between Tet and Sim groups ($P>0.05$). Myocardial infarction size, ratio of infarction size to left ventricular myocardial size, and ratio of infarction size to ischemia size were lower in Tet and Sim groups than in I/R group ($P<0.01$); there was no difference between Tet and Sim groups ($P>0.05$). Compared with sham group, FS, LVEF and E/A were decreased significantly in I/R, Tet and Sim groups($P<0.01$), which was higher in Tet and Sim groups than in I/R group($P<0.01$). The activity of MPO was significantly higher in I/R, Tet and Sim groups than in sham group ($P<0.01$), and in Tet group than in Sim group ($P>0.05$); there was no difference between Tet and Sim groups ($P>0.05$). The levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 were significantly higher in in I/R, Tet and Sim groups than in sham group ($P<0.01$), and in Tet and Sim groups than in I/R group ($P<0.01$); there was no difference between Tet and Sim groups ($P>0.05$). **Conclusion** Tet can attenuate myocardial I/R injury. It achieves this pharmacologic action through reducing the levels of harmful cytokines including TNF-α, IL-6 and IL-1β.

【**Key words**】 tetrandrine; reperfusion injury, myocardial; tumor necrosis factor-α; interleukins

白细胞介素（interleukin,IL）-1β、IL-6 和肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α,TNF-α）是心肌缺血/再灌注（ischemia/reperfution, I/R）过程中，由激活的巨噬细胞或单核细胞产生的细胞因子，它们不仅可以诱导其他炎性介质的释放，还可以促进中性粒细胞聚集和内皮细胞的黏附加重 I/R 损伤[1-4]。粉防己碱（tetrandrine, Tet）是从中药防己科植物粉防己根中提取的生物碱，为双苄基异喹啉衍生物。实验证明[5,6]Tet 有减少缺血区炎症细胞浸润，抑制炎症介质的产生，从而起到减轻 I/R 损伤的药理作用。本实验采用大鼠 I/R 模型，观察心肌酶、髓过氧化物酶（myeloperoxidase, MPO）活性、心功能以及心肌梗死面积的变化，测定血清、心肌组织内炎症因子 IL-1β，IL-6 和 TNF-α 表达水平和相互关系，观察 Tet 对炎症因子的影响，探索减轻 I/R 损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

粉防己碱由华中科技大学同济医学院药理教研室提供（纯度＞98%）；辛伐他汀（理舒达）；戊巴比妥钠（Sigma 公司）；邻联茴香胺（O-Dianisidine, Sigma 公司）；氯化三苯基四氮唑（2,3,5-tripheny-2H-tetrazoliam chloride, TTC, Sigma 公司）；TNF-α、IL-1β 和 ELISA 试剂盒（武汉晶美公司）；IL-6 ELISA 试剂盒（博士德公司）；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）、肌酸激酶（creatine kinase, CK）检测试剂盒（四川迈克私技有限责任公司）；其他试剂均为国产分析纯；ML866 PowerLab 4/30 多道数据采集系统（ADINSTRUMENTS 公司）；Vivid 7 Pro 彩色超声诊断仪（美国 GE 公司）。

1.2 动物模型的制备

大鼠 I/R 模型制备：使用 250～300g SD 大鼠（华中科技大学同济医学院医学实验动物中心提供）。1%戊巴比妥钠（30mg/kg）腹腔内注射麻醉，行气管插管，连接小型动物呼吸机（ModelDH-140，浙江大学医疗器械公司），按 15 ml/kg 潮气量，频率 60 次/min，呼吸比为 2:1。在左侧 3～4 肋间暴露心脏，于左心耳与肺动脉圆锥间穿 6/0 号丝线，用硅胶管套扎形成心肌缺血。当肉眼观察到结扎点远端心前壁变紫、心电图显示 ST 段抬高、T 波高耸为模型成功，抬高的 ST 段回落 1/2 以上为再灌注的标志。实施 30min 缺血，再灌注 24h，建立 I/R 模型。整个实验过程中，用多道生理记录仪连续记录标准肢体 II 导心电图。

1.3 实验方案及分组

共 80 只雄性 SD 大鼠。按随机化原则将大鼠分为以下 4 组：I/R 损伤组（I/R）：手术前 30 min，腹腔注入生理盐水 1.2ml，实施缺血 30 min，再灌注 24h；假手术组（Sham）：于 I/R 前 30 min，腹腔注入生理盐水 1.2ml，只行假手术，即在肺动脉圆锥与左心耳间穿线，不结扎，30min 关胸，24h 后处死大鼠；粉防己碱治疗组（Tet）：手术前 20min 腹腔内注射粉防己碱 3mg/kg（约 1.2ml）；辛伐他汀治疗组（Sim）：结扎手术前予以辛伐他汀药物（2mg/kg）连续灌胃 14d，余同 I/R 组。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 测定血清中乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）、肌酸激酶（creatine kinase, CK） 实验结束后腹主动脉抽血5～6ml，离心2500 r/min，10 min，分离血清,动脉血血清标本－20℃保存。采用LDH、CK检测试剂盒测定LDH、CK活性。

1.4.2 测定血清中炎症因子TNF-α，IL-1β，IL-6表达水平 实验结束后腹主动脉抽血5～6ml，离心2500 r/min，10 min，分离血清，－20℃保存待测。采用武汉晶美公司和武汉博士德公司TNF-α，IL-1β，IL-6 ELISA试剂盒。相关操作按照试剂盒说

明书进行。

1.4.3 心肌梗死面积检测标本采集 每组各取6只新鲜心脏行伊文蓝（EB）/TTC染色检测心肌梗死面积[7]。未发生心肌缺血的部分被TTC染为红色，但因被伊文蓝掩盖而呈现蓝色；发生心肌缺血的部分因无伊文蓝掩盖而被TTC染色，呈现红色；而梗死的心肌则不能被TTC和伊文蓝染色，呈现苍白色。待色差明显后，将上述心肌组织浸入甲醛溶液中，固定1～2h，用数码相机拍照，再用计算机图像分析系统进行分析（图1）。砖红色为正常心肌，蓝色为梗死危险区心肌，灰白色为梗死心肌。数码相机摄取各切片上下两面图像，在计算机彩色图像分析系统计算心肌梗死缺血区面积和心肌梗死区面积，心肌梗死程度以梗死面积百分比表示[8]。梗死面积百分比（%）＝梗死区面积/缺血区面积×100%。

图1 EB/TTC双染心肌切片的缺血区域与梗死区域（Scion Imagine 4.0软件分析）

1.4.4 测定心肌MPO活性 在病变处沿冠状面切开，组织匀浆后测定MPO活性。参照罗武生的方法[9]，测定MPO的活性。

1.4.5 测定心肌组织中炎症因子TNF-α，IL-1β，IL-6表达水平 精确称取各组缺血部位心肌组织300mg，加入冷PBS（4℃），匀浆器迅速制备心肌匀浆，离心3000r/min，5min，取上清液–70℃保存。采用武汉晶美公司和武汉博士德公司TNF-α，IL-1β，IL-6 ELISA试剂盒，按照试剂盒说明书进行相关操作。

1.4.6 心脏功能测定 采用VIVID7彩色超声仪，专用小动物心脏探头。二维超声在心脏的乳头肌水平短轴切面上观察测量心功能以及心脏腔室内径，以M超模式在心脏长轴切面上测量与计算短轴缩短率（fractional shortening, FS）和射血分数（ejection fraction, EF）值（图2～图7）。每个径线连续测量3个心动周期，最后取其平均值。

1.5 统计学处理

所有实验数据采用SPSS13.0进行统计学分析。计数资料以均数士标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用随机区组设计的单因素方差分析，组间多重比较采用最小显著差法。若样本方差不齐则采用Dunnett T3方法进

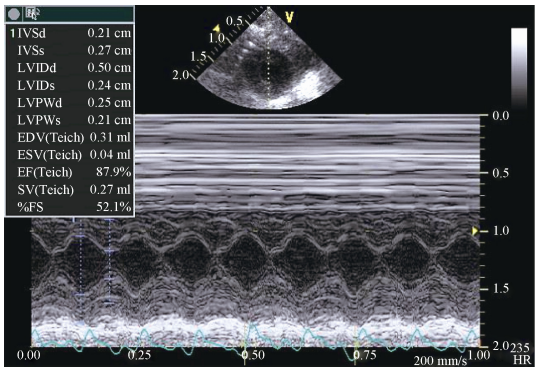


图2 Tet组大鼠再灌注24h后心脏左室长轴切面M型超声测定

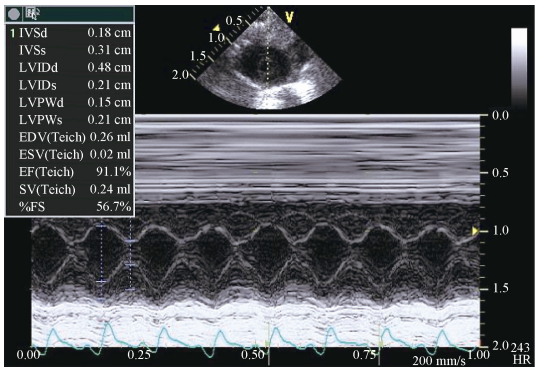


图3 Sim组大鼠再灌注24h后心脏左室长轴切面M型超声测定

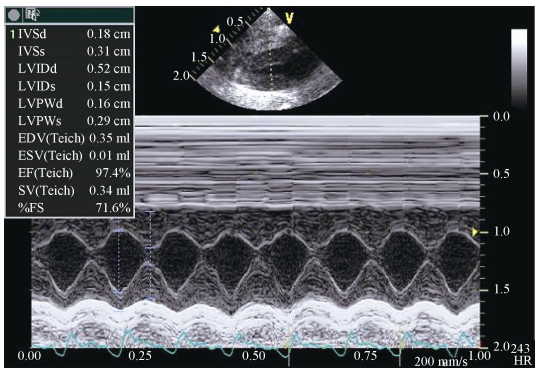


图4 Sham组大鼠24h后心脏左室长轴切面M型超声测定

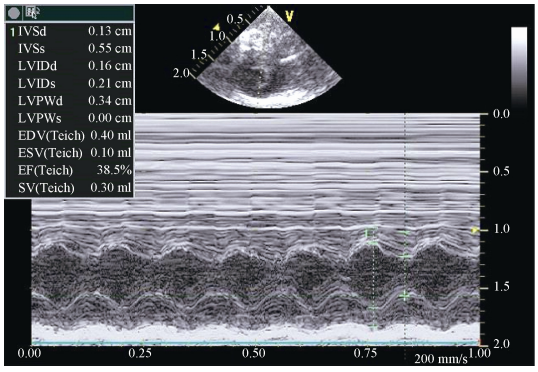


图5 I/R组再灌注24h后心脏左室长轴切面M型超声测定

图6 正常大鼠二尖瓣口频谱血流图

图7 I/R组再灌注24h后大鼠二尖瓣口频谱血流图

行两两比较。两变量线性相关分析, 用 person 分析, $0.8<r<1.0$ 认为两变量密切相关。检验显著性水平为 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 粉防己碱对大鼠 I/R 损伤血清心肌酶释放的影响

表 1 结果表明, I/R 组 LDH、CK 显著高于 Sham 组（$P<0.01$）。与 I/R 组比较, Tet 组、Sim 组的 LDH、CPK 显著降低（$P<0.01$）。Tet 组、Sim 组 LDH、CK 虽也显著高于 Sham 组（$P<0.01$）, 但两组之间在心肌酶的释放量上无显著性差异（$P>0.05$）。提示粉防己碱可以减少大鼠 I/R 损伤时心肌酶的释放, 对损伤心肌细胞有膜稳定作用。

表 1 各组 **LDH**、**CK** 的释放量 (n=6, $\bar{x}\pm s$, U/L)

组别	LDH	CK
Sham	322±28	433±27
I/R	844±29*	1091±74*
Tet	576±21*#	658±30*#
Sim	597±17*#	675±41*#

注: LDH: 乳酸脱氢酶; CK: 肌酸激酶; Sham: 假手术组; I/R: I/R 损伤组; Tet: 粉防己碱治疗组; Sim: 辛伐他汀治疗组。与 Sham 组比较, *$P<0.01$; 与 I/R 组比较, #$P<0.01$

2.2 粉防己碱对大鼠 I/R 损伤心肌梗死面积的影响

Tet 组、Sim 组的心肌梗死面积、梗死面积/缺血面积（%）和梗死面积/左室面积（%）均显著低于 I/R 组（$P<0.01$）, 但 Tet 组、Sim 组两组之间却无显著性差异（$P>0.05$）。结果提示, 粉防己碱可降低大鼠心肌梗死面积, 对缺血心肌有保护作用。

表 2 各组心肌梗死的面积 (n=6, $\bar{x}\pm s$)

组别	LVA(cm^2)	IA(cm^2)	Inf(cm^2)	Inf/LVA(%)	Inf/IA(%)
Sham	0.58±0.04	—	—	—	—
I/R	0.58±0.03	0.24±0.04	0.104±0.103	18.1±1.8	43.1±4.2
Tet	0.58±0.05	0.24±0.07	0.051±0.022*	8.9±0.4*	21.2±1.2*
Sim	0.58±0.04	0.23±0.09	0.053±0.034*	9.2±0.5*	22.9±1.5*

注: LVA: 左室面积; IA: 缺血面积; Inf: 心肌梗死区面积; Sham: 假手术组; I/R: I/R 损伤组; Tet: 粉防己碱治疗组; Sim: 辛伐他汀治疗组。与 I/R 组比较, *$P<0.01$

2.3 粉防己碱对大鼠 I/R 损伤后心脏功能的影响

Sham 组缺血前心功能为共用对照组。各实验组 I/R 后的心功能均较缺血前下降（$P<0.01$）, Tet 组、Sim 组心功能较 Sham 组明显降低（$P<0.01$）, 但显著高于 I/R 组（$P<0.01$）, 再灌注后 Tet 组和 Sim 组在 EF 值和 E/A 比值均无显著性差异（$P>0.05$, 表 3, 表 4）。

2.4 粉防己碱对大鼠 I/R 损伤中性粒细胞浸润的影响

中性粒细胞浸润以 MPO 活性来表示。Sham 组 MPO 活性显著低于各实验组（$P<0.01$）。Tet 组、Sim 组 MPO 活性较 I/R 组比较显著降低（$P<0.01$）。Tet 组和 Sim 组之间 MPO 活性无显著差别（$P>0.05$）。各组 MPO 活性与心肌组织 TNF-α 表达水平呈密切正相关关系（$r>0.8$, $P<0.05$）。

表 3 各组缺血前与再灌注 **24h** 后的 **FS**、**EF** 值 （n=6, $\bar{x}\pm s$,%）

组别	FS		EF	
	Pre-I	Post-R	Pre-I	Post-R
Sham	72.0±0.8	68.1±1.4△	97.6±0.7	96.4±1.2
I/R	72.0±0.8	38.3±1.2*	97.6±0.7	75.7±2.4*
Tet	72.0±0.8	51.7±1.5*#	97.6±0.7	85.6±1.5*#
Sim	72.0±0.8	57.0±0.9*#	97.6±0.7	89.1±1.0*#

注: FS: 短轴缩短率; EF: 射血分数; Pre-I: 缺血前; Post-R: 再灌注 24h 后; Sham: 假手术组; I/R: I/R 损伤组; Tet: 粉防己碱治疗组; Sim: 辛伐他汀治疗组。与 Sham 组再灌注 24h 后比较, *$P<0.01$; 与 I/R 组再灌注 24h 后比较, #$P<0.01$; 与 Sham 组缺血前比较, △$P<0.01$

表 4 各组再灌注 24h 后的心脏舒张功能（以 E/A 比值表示）（n=6, $\bar{x}\pm s$）

组别	E-peak(m/sec)	A-peak(m/sec)	E/A
Sham	0.94±0.05	0.66±0.03	1.42±0.10
I/R	0.27±0.03	0.67±0.03	0.41±0.05*
Tet	0.44±0.06	0.67±0.03	0.66±0.11*#
Sim	0.41±0.07	0.65±0.04	0.63±0.07*#

注: Sham: 假手术组; I/R: I/R 损伤组; Tet: 粉防己碱治疗组; Sim: 辛伐他汀治疗组。与 Sham 组比较,*P<0.01; 与 I/R 组比较,# P<0.01

2.5 粉防己碱对大鼠 I/R 损伤血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达水平的影响

表 5 结果表明, 各实验组的炎症因子的表达水平显著高于 Sham 组（P<0.01）, Tet 组和 Sim 组的炎症因子水平比 I/R 组显著降低（P<0.01）, 在 Tet 组和 Sim 组之间炎症因子表达无显著性差异（P>0.05）。

表 5 各组大鼠再灌注 24h 后血清 TNF-α, IL-1β, IL-6 的表达水平（n=6, $\bar{x}\pm s$, ng/L）

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
Sham	1.35±0.26	35.2±3.1	59.8±2.2
I/R	22.31±1.79*	207.4±11.0*	169.2±3.9*
Tet	6.36±0.27*#	51.7±2.6*#	116.2±3.9*#
Sim	5.88±0.27*#	47.8±2.9*#	109.7±3.9*#

注: TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; IL-1β: 白细胞介素-1β; IL-6: 白细胞介素-6; Sham: 假手术组; I/R: I/R 损伤组; Tet: 粉防己碱治疗组; Sim: 辛伐他汀治疗组。与 Sham 组比较,*P<0.01; 与 I/R 组比较, # P<0.01

2.6 粉防己碱对大鼠 I/R 损伤心肌组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达水平的影响

表 6 结果表明, 各实验组的炎症因子的表达水平显著高于 Sham 组（P<0.01）。Tet 组和 Sim 组的炎症因子水平比 I/R 组显著降低（P<0.01）。Tet 组和 Sim 组之间炎症因子表达无显著性差异（P>0.05）。各组心肌组织 TNF-α 表达与 IL-1β、IL-6 表达均呈密切正相关（r>0.8, P<0.05）。

表 6 各组大鼠再灌注 24h 后心肌组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达水平（n=6, $\bar{x}\pm s$, ng/L）

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
Sham	62±9	122.5±5.9	229±90
I/R	307±18*	428.2±2.0*	1004±138*
Tet	208±25*#	251.1±16.6*#	587±137*#
Sim	187±23*#	236.4±15.2*#	566±20*#

注: TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; IL-1β: 白细胞介素-1β; IL-6: 白细胞介素-6; Sham: 假手术组; I/R: I/R 损伤组; Tet: 粉防己碱治疗组; Sim: 辛伐他汀治疗组。与 Sham 组比较,*P<0.01; 与 I/R 组比较,# P<0.01

3 讨 论

再灌注后往往伴随着心肌组织一系列的损伤, 表现在细胞结构完整性的破坏、心肌梗死及心肌组织局部的生化改变, 粉防己碱的干预可以显著地减轻再灌注损伤, 有保护膜结构, 减少局部中性粒细胞浸润, 改善心功能的作用。

本研究发现, 心脏冠状动脉结扎30 min, 再灌注24h后I/R组CK、LDH的释放量比Sham组明显增加, 分别为Sham组的14.68倍和2.62倍, 证实了I/R后心肌细胞结构的破坏, 引起细胞内酶的泄漏。与I/R组相比, Tet组、Sim组均可显著减少CK、LDH的释放。表明粉防己碱对I/R损伤的心肌细胞有一定的保护作用, 减轻了心肌细胞膜的损伤, 降低了心肌酶的释放, 从而改善能量代谢障碍。

本实验采用EB/TTC双染色对心肌梗死面积进行了评价。采用平面切片的面积求积法比通常用的称重法更准确。应用扫描仪进行图像采集, 可清楚地显示整片面积、梗死面积。本研究结果显示, I/R组心肌梗死面积较Sham组和药物预处理组显著增加。Tet组、Sim组可显著缩小大鼠心肌梗死面积, Tet组和Sim组之间对于心肌梗死面积的影响无显著性差异。在对心肌酶水平和心肌梗死面积进行相关分析时, 证明二者呈显著正相关, 表明再灌注会加重心肌细胞的损伤, 梗死面积随心肌细胞损伤加重而扩大。粉防己碱和辛伐他汀均有减小梗死面积, 减轻再灌注损伤的作用。

一般认为心肌梗死面积大于8%左心室面积时, 左室顺应性开始降低, 这是由于再灌注损伤引起心肌细胞内超微结构破坏: 线粒体损伤致ATP减少、肌浆网损伤、钙泵受损, 在缺乏能量物质的条件下, 钙离子的释放和再摄取均产生障碍,导致收缩和舒张功能降低。同时再灌注组织局部生成的炎症因子如TNF-α也具有负性肌力作用, 以上因素共同作用导致心肌功能的下降。而再灌注损伤时, 产生当心肌工作单位（心肌细胞）减少到一定程度, 梗死面积超过左心室面积10%时, EF出现明显降低。临床多用EF值和FS来评价收缩功能; 用E/A来评价舒张功能。本实验结果证明, I/R组、Tet组、Sim组与Sham组相比, EF值、FS、E/A均显著降低, 说明30 min缺血可造成大鼠心肌的不可逆损伤, 即使及时恢复完全的血流灌注或缺血前用药物预处理仍然会造成心功能（收缩、舒张功能）下降。但药物预处理组的心功能却显著好于I/R组（P<0.01）。说明粉防己碱、辛伐他汀均可以改善心功能, 减轻I/R损伤作用。粉防己碱可能是通过阻断钙通道和非特异性抗炎等多种心血管药理作用稳定细胞膜, 减轻再灌注损伤, 改善心功能。

缺血心肌的再灌注是挽救濒死心肌的必要手段，即使是经过短时间的缺血后再次恢复灌注也会伴随着两种不同类型的改变，一种是继续加重缺血开始时的损伤，另一种是在灌注后发生了新的病理生理变化。再灌注损伤具有许多炎症的特点，是机体的一种类炎症状态。中性粒细胞的激活是I/R损伤发生发展的始动环节[10,11]。中性粒细胞浸润的程度可通过检测MPO的活性来推算。中性粒细胞中存在有MPO，每个细胞所含酶的量是一定的，约占细胞干重的5%[12]，该酶具有使H_2O_2还原的能力，利用这一特点可以分析酶的活力，从而了解中性粒细胞的浸润程度。本研究参照罗武生[9]的方法施行，结果表明，I/R时MPO活性显著升高，提示中性粒细胞浸润明显，存在炎症损害。有证据表明抑制中性粒细胞浸润能显著减轻I/R损伤，使用不含粒细胞的血浆再灌注，可显著降低再灌注损伤的程度，因而抗中性粒细胞治疗有可能成为预防和治疗I/R损伤的有效措施。结果显示再灌注24h后I/R组、Tet组、Sim组MPO活性较Sham组明显升高。经粉防己碱、辛伐他汀药物预处理后，心肌MPO活性较I/R组明显下降，Tet组与经典抗炎药物Sim组的MPO活性没有显著性差别。提示粉防己碱也具有同辛伐他汀相似的抗炎作用，可通过抑制缺血心肌内中性粒细胞浸润、减轻炎症反应来拮抗I/R损伤，起到心肌保护作用。

I/R损伤过程实质上就是一个炎症反应过程。炎症反应与I/R损伤之间密切相关已达成共识[13]。经I/R后缺血局部的心肌组织通过自分泌或旁分泌的方式生成TNF-α、IL-1β、IL-6前等炎症因子，就此引发了炎症因子的级联反应，这些炎症因子通过各自的受体及细胞内信号转导途径进一步加重了再灌注损伤，造成I/R区域内的心肌细胞的凋亡或坏死。其中来自于肥大细胞的TNF-α是启动炎症因子级联反应的关键因素。

TNF是一种自分泌的促炎症细胞因子，以TNF-α和TNF-β两种形式存在，有着相似的炎症活性，在心血管疾病中起作用的主要是TNF-α。TNF-α在I/R损伤中的作用主要体现在两方面：（1）TNF-α具有抑制心肌收缩力的作用。TNF-α与心肌细胞膜表面受体结合后，短时间（数分钟）通过抑制L型钙通道降低心肌收缩力，此过程不依赖NO；较长时间（数小时），通过NO的介导，使肌丝对钙脱敏，从而长期降低心肌收缩力。（2）TNF-α可诱导心肌细胞凋亡。TNF-α通过其膜表面TNFR1受体和Fas受体，通过受体间相互作用蛋白诱导心肌细胞的凋亡[14]。细胞因子IL-1β是一种主要是由单核巨噬细胞合成、分泌的急性炎症因子。IL-1β为主要分泌形式，广泛参与了感染、应激及I/R等过程和调控，是一种十分重要的化学介质。在静息状态下，IL-1β的表达水平很低，但在I/R时表达水平可以增高[15]。I/R早期即可产生IL-1β，通过多种机制参与了I/R损伤过程，L-1β可被TNF-α诱导产生，并与TNF-α有协同作用，对心肌有负性肌力作用，抑制心肌的收缩功能[16]。IL-6为白细胞和内皮细胞产生的重要炎症介质，被称为白细胞家族的核心成员。在I/R损伤中，IL-6是诱导产生细胞间黏附分子-1的主要细胞因子。

本研究发现I/R组、Tet组、Sim组炎症因子的表达水平明显高于Sham组。经过药物粉防己碱、辛伐他汀预处理后炎症因子的表达水平明显较I/R组显著降低。两药物预处理组之间未见显著差别。同时还发现代表中性粒细胞浸润程度的MPO活性与TNF-α水平呈密切正相关性。而且IL-1β、IL-6水平与TNF-α水平呈密切正相关性，通过实验说明心肌的再灌注损伤会导致中性粒细胞迁移、浸润，表现为局部组织MPO活性升高，随着中性粒细胞浸润，局部炎症因子产物TNF-α增加，启动了炎症因子的级联反应，IL-1β、IL-6生成增多，随着这些炎症因子的增多促进了中性粒细胞浸润，直接或间接导致心肌损伤加重，心肌细胞的凋亡甚至坏死，心肌功能降低，形成恶性循环。但若经粉防己碱或辛伐他汀预处理后，再次经历I/R过程，则炎症因子表达水平较I/R组显著降低，而在两药物处理组之间则未见有显著差异。说明经粉防己碱药物预处理后可以显著抑制炎症因子的生成，阻断恶性循环，粉防己碱与抗炎药物辛伐他汀具有相类似的抗炎症因子的作用。

总之，粉防己碱预处理具有保护细胞膜结构，改善心脏功能，缩小梗死面积，减轻中性粒细胞浸润，抑制炎症因子生成的多靶点的药物作用，最终起到抗 I/R 损伤的保护作用。但其保护作用的内在机制以及细胞内的信号转导途径尚未完全清楚，还需进一步研究。

【参考文献】

[1] Ivery CL, Willams FM, Collind PD, *et al*. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for C5a and interleukin-8[J]. J Clin Invest, 1995, 95(6): 2720-2728.

[2] Meldrum DR, Partrick DA, Cleveland JC Jr, *et al*. On-pump

coronary artery bypass surgery activates human myocardial NF-κB and increases TNF-α in the heart[J]. J Surg Res, 2003, 112(2): 175-179.

[3] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation[J]. N Engl J Med, 1999, 340(6): 448-454.

[4] Cheng F, Li Y, Feng L, *et al*. Effects of tetrandrine on ischemia/reperfusion injury in mouse liver[J]. Transplat Proc, 2008, 40(7): 2163-2166.

[5] Pinelli A, Trivulzios S, Brenna S, *et al*. Pretreatment with tetrandrine has protective effects against isoproterenol-induced myocardial infarction in rabbits[J]. In Vivo, 2010, 24(3): 265-270.

[6] Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, *et al*. *In vivo* antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation [J]. Immunology, 1996; 157(4): 1630-1637.

[7] 汪 谦. 现代医学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 106-108.

[8] Gu mina RJ, el Schultz J, Yao Z, *et al*. Antibody to platelet/endothelial cell adhension molecule-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 1996, 94(12): 3327-3333.

[9] 罗武生, 郭兆贵. 用髓过氧化物酶法定量测定心肌组织中中性白细胞[J]. 中国药理学通报, 1990, 5(4): 264-266.

[10] Nagashima M, Shin'oka T, Nollert G, *et al*. Effects of a monoclonal antibody to P-selectin on recovery of neonatal lamb hearts after cold cardioplegic ischemia[J]. Circulation, 1998, 98(19 Suppl): II391- II397.

[11] Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury[J], Cardiovasc Res, 1999, 43(4): 860-878.

[12] Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury[J]. Cardiovasc Res, 1998, 38(2): 291-300.

[13] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflame-matory response in myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(1): 31-47.

[14] Feldman AM, Combes A, Wagner D, *et al*. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(3): 537-544.

[15] Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, *et al*. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium[J]. Am J Pathol, 1995, 146(2): 419-428.

[16] Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(10): 1075-1079.

（编辑：周宇红）

·启 事·

《第三军医大学学报》征稿、征订启事

《第三军医大学学报》为国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊，创刊于 1979 年，现为半月刊。其复合影响因子 0.800、复合总被引频次 6419（2010 年《中国学术期刊影响因子年报》），来稿 2708 篇（2010 年），刊稿 877 篇（2010 年），平均刊稿时间（从来稿到刊出）164 天（2010 年），稿件录用率 35%左右。

《第三军医大学报》被国内外各大检索系统收录，两度被评为国家期刊奖百种重点期刊，为中国科技论文统计源期刊、中国自然科学类核心期刊和中国科学引文数据库（CSCD）核心库收录期刊。2008～2010 年连续 3 年评为“中国百种杰出学术期刊”。

主要栏目有：专家述评、专题报道、论著（军事医学、基础医学、临床医学、药学、预防医学、检验医学、生物医学工程等）、技术方法、研究快报、短篇论著、经验交流、疑难病例、个案与短篇和学术之窗等。

投稿、查询、阅读本刊请登陆 http://aammt.tmmu.com.cn/。 国内邮发代号：78-91，国外邮发代号：M6529。可在当地邮局订阅，也可来函或致电我刊编辑部办理邮购，免收邮寄费。联系地址：重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号《第三军医大学学报》编辑部，邮编：400038，电话：(023)68752187, E-mail: aammt@mail.tmmu.com.cn,

联系人：唐素芳、王勇。