·基础研究·

曲美他嗪后处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡的保护性作用

周大亮[1]，于丽芳[2]，魏 林[1*]，阮圣斐[3]，赵学忠[3]，睢大员[4]，于小凤[4]，曲绍春[4]，江一川[4]

（[1]哈尔滨市第一医院心内一科，哈尔滨 150001；[2]黑龙江中医药大学附属第一医院药剂科，哈尔滨 150040；[3]吉林大学第一医院心内科，长春 130021；[4]吉林大学药学院药理学教研室，长春 130021）

【摘 要】目的 研究曲美他嗪后处理对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响。**方法** 实验大鼠40只，随机分为5组：假手术组（$n=8$）、再灌注损伤模型组（$n=8$）、曲美他嗪低剂量组（10mg/kg，$n=8$）、曲美他嗪高剂量组（20mg/kg，$n=8$），后处理组（$n=8$）。制作再灌注损伤模型后，观察各组大鼠心肌梗死面积、Bcl2/bax蛋白表达以及电子显微镜下心肌组织切片观察。**结果** （1）各组大鼠心肌梗死面积测定：假手术组未见梗死，其余各组大鼠心肌组织不同程度梗死，以后处理组及曲美他嗪高剂量组最轻，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。（2）各组大鼠Bcl2/Bax蛋白表达比较：在模型组中Bax蛋白强阳性表达，表现为软件分析结果灰度值最低。而曲美他嗪高剂量组及后处理组灰度值较模型组比较灰度值明显增大（$P<0.01$）。Bcl2蛋白在模型组中表达较少，在曲美他嗪高剂量组中及后处理组中明显表达，且差异具有统计学意义（$P<0.01$）。（3）电子显微镜下观察：除假手术组大鼠外，各组大鼠均有不同程度损伤及细胞凋亡，后处理组及曲美他嗪高剂量组损伤较轻。**结论** 高剂量曲美他嗪（20mg/kg）对大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡有抑制作用。

【关键词】曲美他嗪；再灌注损伤；缺血后处理；细胞凋亡；大鼠

【中图分类号】 R364.1^{+}7 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2013.00180

Trimetazidine post-conditioning protects rats from cardiocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion injury

ZHOU Da-Liang[1], YU Li-Fang[2], WEI Lin[1*], RUAN Sheng-Fei[3], ZHAO Xue-Zhong[3], SUI Da-Yuan[4], YU Xiao-Feng[4], QU Shao-Chun[4], JIANG Yi-Chuan[4]

([1]First Department of Cardiology, First Hospital of Harbin, Harbin 150001, China; [2]Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; [3]Department of Cardiology, First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China; [4]Department of Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

【Abstract】 Objective To determine the protective effect of trimetazidine post-conditioning on cell apoptosis in rats induced by myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI). **Methods** Forty healthy adult Wistar rats were randomly assigned to sham-operation group, MIRI group, ischemic post-conditioning group and two trimetazidinee treatment groups (10 and 20mg/kg), with 8 rats in each group. MIRI model was established by ligation of coronary artery for 30min followed by 120min reperfusion. The rats in ischemic post-conditioning group were given another three times of ischemia/reperfusion for 30s at the interval of 30min ischemia and 120min reperfusion. Trimetazidinee or normal saline at same volume was given intragastrically to corresponding rats during the 30min ischemia. After MIRI, myocardial infarct area was measured, the expression of Bcl2 and bax was detected by immunohistochemical assays, and the myocardiocyte ultrastructure was observed with transmission electron microscopy. **Results** (1) Myocardial infarct area. No infarct was seen in the sham-operation group, but infarcts with different severities were found in the other groups, with those in the ischemic post-conditioning group and 20mg/kg trimetazidinee treatment group mildest ($P<0.01$). (2) The expression of Bcl2/bax protein. The expression of Bax was very strong, while that of Bcl2 was very weak in the MIRI group, when compared with 20mg/kg trimetazidine group and ischemic post-conditioning group (both $P<0.01$). (3) Morphology of cardiac muscle. Besides sham-operation group, ischemia/reperfusion injury and cardiocyte apoptosis were observed in other groups, with those in the ischemic post-conditioning group and 20mg/kg trimetazidinee treatment group most mildly. **Conclusion** Trimetazidine of 20mg/kg inhibits cardiocyte apoptosis in rats after MIRI.

【Key words】 trimetazidine; ischemia/reperfusion injury; ischemic post-conditioning; apoptosis; rats

收稿日期：2013−03−14；**修回日期：**2013−07−19

基金项目：哈尔滨市科技局科技创新人才研究专项基金（2011RFQYS106）

通信作者：魏 林，E-mail: weilin1964@163.com

This work was supported by the Special Foundation for Innovative Talents of Harbin Bureau of Science and Technology (2011RFQYS106).

Corresponding author: WEI Lin, E-mail: weilin1964@163.com

随着心脏介入技术的不断发展,众多的心肌梗死患者得以存活,但人们发现在开通梗死相关动脉后将出现心肌损伤加重,这称之为缺血再灌注损伤,而近些年研究细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤的一个重要环节[1,2]。通过药物来控制心肌缺血再灌注损伤一直是人们研究的主要方向,曲美他嗪是目前欧洲心脏学会专家组建议中惟一提到具有潜在的抗心绞痛的代谢药物,具有抗缺血、抗氧自由基作用[3,4]。本实验通过再灌注后给予再灌注大鼠不同剂量的曲美他嗪,来探讨曲美他嗪后处理对心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用Wistar成年健康大鼠，体质量180～220g，雌雄各半。由吉林大学基础医学院动物实验中心提供。制作缺血再灌注损伤模型后，将Wistar大鼠随机分为再灌注损伤组，缺血后处理组，曲美他嗪高剂量组（20mg/kg），曲美他嗪低剂量组（10mg/kg），每组8只。另取Wistar成年健康大鼠8只为假手术组。此前所有动物已在实验室适应环境1周。

1.2 实验方法

1.2.1 缺血再灌注模型制备 将Wistar大鼠乙醚吸入麻醉后，仰卧固定于手术台，剪去胸前鼠毛，先用缝线在开胸部位做一荷包，自左侧3～4肋间开胸，暴露心脏，于肺动脉圆锥及左心房间找到冠状动脉左前降支，于左心耳下2～3mm处用0号缝线结扎冠状动脉系一活结。（1）再灌注损伤组：缺血30min后，恢复冠状动脉血流120min；（2）缺血后处理组：缺血30min，再灌30s、缺血30s反复3次，再灌120min；（3）曲美他嗪高剂量组（20mg/kg）：缺血30min同时给予曲美他嗪药物，再灌120min；（4）曲美他嗪低剂量组（10mg/kg）：缺血30min同时给予曲美他嗪药物，再灌120min。假手术组大鼠仅置缝线而不结扎冠状动脉。

1.2.2 给药方法 各组用药剂量均参照人与大鼠体表面积换算[5]。曲美他嗪高剂量组：20mg/kg灌胃，缺血30min同时给予。曲美他嗪低剂量组：10mg/kg灌胃，缺血30min同时给予。假手术组、后处理模型组均灌胃等量生理盐水注射液，给予时间及途径同上。

1.3 观察指标

1.3.1 梗死面积测量方法 每组取8只大鼠取血后剖取心脏，用生理盐水洗净心腔内积血，去掉心房组织及脂肪，称重，将左心室心肌横切4～5片，然后浸入氯化硝基四氮唑蓝（NB-T）磷酸缓冲液中，置37℃恒温水浴，待染色完全后取出，正常组织染色，缺血组织不染色。切下缺血心肌称重，用缺血心肌与左心室湿重的百分比计算梗死范围。

1.3.2 免疫组化测定Bcl2，Bax表达 采用SP法，实验步骤按照试剂盒说明。免疫组化结果分析采用Motic Images Advanced 3.2图像分析软件，结果为灰度值，灰度值越大阳性越低，灰度值越小阳性越高。照片均为放大200倍。

1.3.3 细胞超微结构观察 电镜观察:取左前壁上方5mm处部分心肌,立即投入预冷的戊二醛溶液中初固定4h，PBS漂洗30min×3次，1%鹅酸后固定3h，同样方法漂洗3次，以上实验在4℃下操作。50%乙醇脱水10min,4%醋酸铀染色过夜,90%乙醇10min,100%乙醇30min×3次,再置于100%乙醇加环氧丙烷1份中5min×3次,环氧树脂618包埋液1份加环氧丙烷1份浸透1～2h，包埋液37℃浸透2～3h，包埋聚合，37℃过夜，60℃24h，整修包埋头。用半薄切片定位后，进行超薄切片，在透射电子显微镜下观察。

1.4 统计学处理

数据用SPSS13.0软件进行统计学分析。各数据以均数±标准差表示，各组间比较用方差分析和q检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠梗死面积比较

假手术组未见梗死，其余各组大鼠心肌组织不同程度梗死，以后处理组及曲美他嗪高剂量组梗死程度最轻（$P<0.05$，$P<0.01$；表1，图1）。

2.2 Bcl2和Bax蛋白的表达

表2，图2，图3结果表明，在模型组中Bax蛋白强阳性表达，表现为软件分析结果灰度值最低（$P<0.01$）。而曲美他嗪高剂量组及后处理组灰度值较模型组比较灰度值明显增大（$P<0.05$）。而Bcl2蛋白在模型组中表达较少（$P<0.01$），在曲美他嗪高剂量组中及后处理组中明显表达，且差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.3 大鼠心肌组织电子显微镜下观察

假手术组心肌肌原纤维排列整齐，肌丝清晰；线

粒体结构完整，无肿胀。细胞核、核仁显示良好（图4A）。再灌注模型组心肌肌原纤维排列较紊乱，胞质基质局部空化，肌丝部分溶解；嵴断裂，线粒体肿胀，核固缩（图4B）。曲美他嗪低剂量组肌丝束上部分肌节可见，肌丝明显减少，溶解、消失，胞质基质空化，线粒体呈小圆形固缩状（图4C）。曲美他嗪高剂量组细胞核略不规则形，肌丝束减少，其上肌节可辨，线粒体呈小圆形（图4D）。后处理组肌丝束上部分肌节结构清楚，部分肌丝局部溶解、断裂，基质空化（图4E）。由此可见，除假手术组外，其余各组大鼠心肌均受到心肌梗死后再灌注损伤，其中以曲美他嗪高剂量组及后处理组损伤程度较轻。

表1 各组大鼠心肌梗死面积比较

Table 1 Comparison of myocardial infarct area between the 5 groups ($n = 8$, %, $\bar{x} \pm s$)

Group	Myocardial infarct area
Sham-operation group	–
MIRI model group	26.03 ± 7.9
Trimetazidine group(10mg/kg)	15.23 ± 5.57
Trimetazidine group(20mg/kg)	13.62 ± 4.22*
Post-conditioning group	11.28 ± 4.16**

Compared with MIRI model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

表2 各组大鼠Bcl2, Bax蛋白表达灰度值比较

Table 2 Comparison of expression of Bcl2, Bax protein between the 5 groups ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Bax	Bcl2
Sham-operation group	152.0 ± 8.2	122.2 ± 29.7
MIRI model group	121.0 ± 3.7**	139.2 ± 13.1**
Trimetazidine group (10mg/kg)	130.0 ± 13.9*	120.7 ± 30.1
Trimetazidine group (20mg/kg)	135.0 ± 9.7*#	114.0 ± 9.6#
Post-conditioning group	147.2 ± 15.9*#	109.0 ± 15.5#

Compared with sham-operation group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; compared with MIRI model group, $^{\#}P < 0.05$

3 讨 论

心肌缺血再灌注损伤的发生机制尚未完全明确，多项基础和临床研究结果显示，心肌代谢障碍，氧自由基产生过多、钙超载、中性粒细胞聚积、内皮功能受损、细胞凋亡等均可能直接参与心肌缺血再灌注损伤[6,7]。

2003年Zhao等[8]提出了缺血后处理的方法；之后，较多的临床实验证实这种经典的后处理方法对缺血再灌注心肌有明确保护作用。由于后处理的方法不易操作，近年来人们逐渐尝试在心肌再灌注开始时应用某些药物以模拟后处理机制，并取得了相同或相似的心肌保护作用[9]。

笔者在实验中发现，与假手术组相比各组大鼠

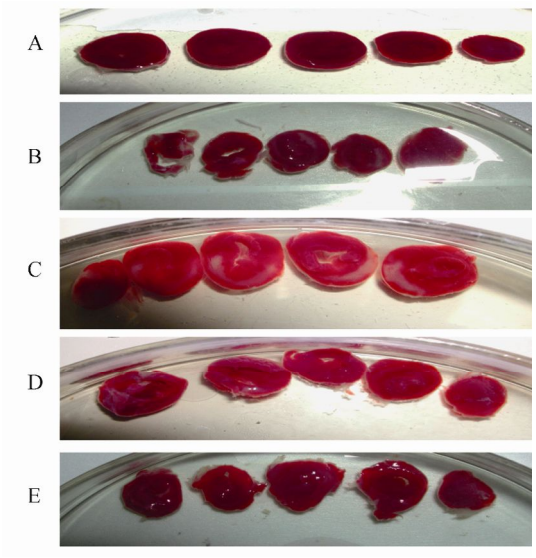


图1 心肌TTC染色结果

Figure 1 Results of myocaridial staining (TTC staining)

A: Sham-operation group; B: MIRI model group; C: Trimetazidine(10mg/kg) group; D:Trimetazidine(20mg/kg) group; E:Post-conditioning group

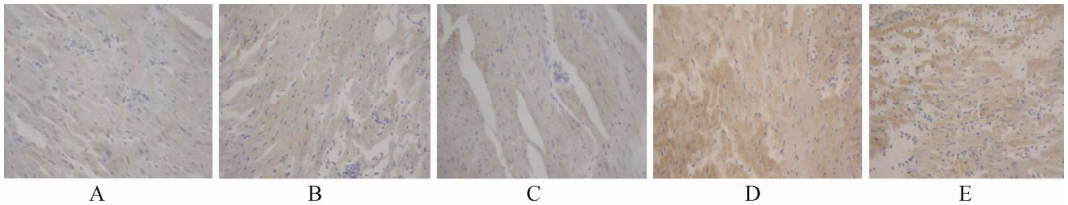


图2 Bcl2蛋白的表达

Figure 2 Expression of Bcl2 protein (×200)

A:Sham-operation group; B:MIRI model group; C: Trimetazidine（10mg/kg）group; D: Trimetazidine（20mg/kg）group; E: Post-conditioning group

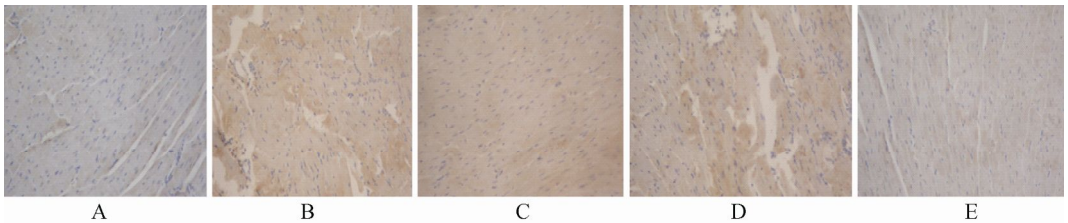


图3 Bax蛋白的表达

Figure 3 Expression of Bax protein(×200)

A:Sham-operation group; B:MIRI model group; C: Trimetazidine（10mg/kg）group; D: Trimetazidine（20mg/kg）group; E: Post-conditioning group

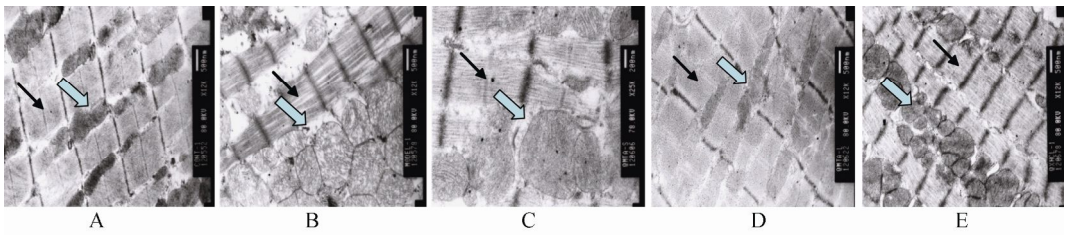


图4 大鼠心肌组织透射电子显微镜下观察

Figure 4 Myocardium of rats under transmission electron microscope(× 10000)

A:Sham-operation group; B:MIRI model group; C: Trimetazidine（10mg/kg）group; D: Trimetazidine（20mg/kg）group; E: Post-conditioning group. Myocardial fibers in the sham -operation group arrange neatly, and other rats show different degree of damage（↑）. No swelling of mitochondria is observed in the sham-operation group（A）, and there have different degree of damage in other groups（B, C, D, E; ↑）

心肌都存在不同程度的梗死面积，在电子显微镜下也呈现出不同程度的损害，说明除假手术组外其余各组大鼠出现了心肌梗死后缺血再灌注损伤，提示梗死再灌注模型制作成功。更重要的是笔者发现了与再灌注模型组相比，曲美他嗪高剂量组及后处理组可以明显减少心肌梗死面积，而且电子显微镜下损伤亦较再灌注损伤组轻。因此提示曲美他嗪高剂量组与后处理组产生了相似的心肌保护作用。

心肌缺血再灌注损伤后，细胞凋亡机制将激活，大量的细胞凋亡将导致心肌进一步坏死。细胞凋亡是有许多基因参与的细胞新陈代谢过程，机制非常复杂，其中Bcl2基因家族是目前较公认与凋亡密切相关的基因[10]，Bcl2基因产物主要位于线粒体膜，核膜及内质网上，Bcl2基因可抑制许多因素引起的细胞凋亡，也成为抗凋亡蛋白。Bax基因属于Bcl2基因家族成员，其功能与Bcl2基因相反，为促凋亡蛋白[10,11]。最近研究结果表明，Bcl2/bax比值可反映Bcl2和Bax在细胞凋亡中的作用，若Bcl2/bax比值升高，则抑制细胞凋亡，反之则促进细胞凋亡。我们的实验结果显示，心肌缺血再灌注期间，曲美他嗪高剂量组、后处理组与缺血再灌注组大鼠相比Bcl2/Bax比值明显升高，提示这两组经过治疗后均抑制了缺血细胞凋亡的进一步发展。

总之，在成功复制缺血再灌注损伤模型后，给予曲美他嗪后处理，发现曲美他嗪对心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡具有一定的抑制作用，但其机制尚不完全明晰，有待于进一步研究。

【参考文献】

[1] Zhao ZQ, Makamura M, Wang NP, *et al*. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 651−660.

[2] Freude B, Master TN, Robicsek F, *et al*. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 32(2): 197−208.

[3] Dhote V, Balaraman R. Anti-oxidant activity mediated neuroprotective potential of trimetazidine on focal cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(5−6): 630−637.

[4] Jayle C, Favreau F, Zhang K, *et al*. Comparison of protective effects of trimetazidine against experimental warm ischemia of different durations: early and long-term effects in a pig kidney model[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(3): F1082−1093.

[5] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京：中国中医药出版社, 1997: 142−145.

[6] Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. Cardiovasc Pathol, 2005, 14(4): 170−175.

[7] Hoffman JW Jr, Gilber TB, Poston RS, *et al*. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies[J]. J Extra corpor Technol, 2004, 36(4): 391−411.

[8] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, *et al*. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): H579−588.

[9] Burley DS, Baxter GF. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(2): 177−188.

[10] Kumar P, Coltas IK, Kumar B, *et al*. Bcl-2 protects endothelial cells against gamma-radiation *via* a Raf-MEK-ERK-survivin signaling pathway that is independent of cytochrome c release[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1193−1202.

[11] Lalier L, Cartron PF, Juin P, *et al*. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 887−896.

（编辑：周宇红）