

# 环孢素预处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用

方 平 曹 薇

**【摘要】 目的:**研究环孢素(CsA)预处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用,并探讨其可能机制。**方法:**36只10周龄SD大鼠随机分为环孢素预处理(CsA)组、缺血-再灌注(IR)组、假手术(Sham)组,每组12只。应用Medlab生物信号采集处理系统连续监测各组左心室收缩末期压(LVESP)和心电图。再灌注结束后采集血液、心肌组织标本,检测血清肌酸激酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平及心肌组织半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)活性、心肌细胞线粒体通透性。**结果:**与IR组比较,CsA组大鼠再灌注性心律失常明显减少,抬高的ST段回落明显,LVESP保持稳定;血清CK-MB、LDH、TNF- $\alpha$ 浓度明显降低;心肌组织Caspase-3活性显著降低;心肌细胞线粒体通透性减小。**结论:**CsA预处理能够减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤,其机制可能与CsA减小心肌细胞线粒体通透性,改善线粒体功能障碍;减少TNF- $\alpha$ 的生成,减轻炎症反应和损伤;下调心肌组织Caspase-3表达,减少心肌细胞凋亡等有关。

**【关键词】** 环孢素;心肌缺血-再灌注损伤;线粒体通透性

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2011.04.016

## The protective effects of pretreatment with cyclosporine A on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

Fang Ping, Cao Heng. Department of Cardiology, yijishan hospital of WanNan medical college, Ahui 241000, China

**【Abstract】 Objective:** The purpose of this study was to investigate the protective effects of cyclosporineA(CsA) on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and its possible mechanism.

**Methods:** Thirty-six ten-week old Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to 3 groups: namely, cyclosporineA pretreating (CsA) group, ischemia-reperfusion (IR) group and sham operation (Sham) group. Each group consisted of 12 rats. (1) CsA group: myocardial ischemia and reperfusion model after a week of CsA gavage (45 minutes ischemia and 6 hours reperfusion of anterior descending coronary) (2) IR group: myocardial ischemia and reperfusion model after a week of equal amount of physiological saline gavage (3) Sham group. ECG and left ventricular end-systolic pressure (LVESP) were monitored continually by Medlab. The blood and myocardial tissue samples were taken after reperfusion. CK-MB, LDH, and TNF- $\alpha$  in serum, Caspase-3 in myocardial tissue and cardiomyocyte mitochondrial permeability were detected after the experiment. **Results:** In comparison with IR group, reperfusion arrhythmia in the rats in CsA group was reduced significantly within reperfusion; Raised ST segments were progressively decreased to considerable extent, while LVESP was normally stable; CK-MB, LDH and TNF- $\alpha$  in serum decreased significantly; the Caspase-3 activity in myocardial tissue was significantly lower and cardiomyocyte mitochondrial permeability decreased. **Conclusion:** These results suggested that myocardial ischemia-reperfusion injury can be relieved through CsA pretreatment. Its mechanism may be relate to reducing cardiomyocyte mitochondrial permeability, and improved mitochondrial function improved; down-regulating expression of TNF- $\alpha$  so as to reduce inflammatory response and inflammatory injury; decreasing myocardial tissue expression of Caspase-3 to reduce cardiac cell apoptosis.

**【Key words】** CyclosporineA; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Mitochondrial permeability

环孢素(cyclosporine A, CsA)是一种免疫抑制

剂,由11个氨基酸组成的环状多肽,最初是从真菌代谢产物中提取的。作为一种强效的免疫抑制剂,CsA上已经广泛地用于治疗自身免疫性疾病、器官

移植术后排斥反应等。目前大量研究表明,心肌缺血-再灌注损伤过程中炎症反应起了重要的作用,炎症细胞过度激活及炎症介质释放增加在心肌损伤过程中有重要作用<sup>[1-5]</sup>。本研究用 CsA 预处理干预大鼠心肌缺血-再灌注过程,通过对相关指标的观察及检测,研究 CsA 预处理能否减轻 MIRI,并探讨其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

雄性 10 周龄 SD 大鼠 36 只,体重(220±20)g,购自南京青龙山实验动物养殖厂。CsA 软胶囊(北京诺华公司,批号:80024B),大鼠 Caspase-3 活性检测试剂盒、大鼠血清 TNF- $\alpha$  检测试剂盒、大鼠心肌组织线粒体分离试剂盒(碧云天生物技术研究),线粒体通透性测定液(昆明杰辉公司)。

### 1.2 分组及实验方法

36 只 SD 大鼠,随机分为缺血-再灌注(IR)组、假手术(Sham)组、环孢素预处理(CsA)组,每组 12 只。(1)CsA 组:术前每日定时按 50 mg/kg 剂量,将溶解的环孢素软胶囊用生理盐水稀释为 1 ml 灌胃,每日 1 次。连续灌胃 7 d 后建立心肌缺血-再灌注模型(即缺血 45 min 后再灌注 6 h)后采集血液及心肌标本。(2)Sham 组:术前 7 d 灌等量的生理盐水,每日 1 次。术中只穿线,旷置 405 min。标本采集、检测时机、手段、方法均与 CsA 组相同。(3)IR 组:术前 7 d 灌等量的生理盐水,每日 1 次。缺血-再灌注模型的建立、标本采集、检测时机、手段、方法均与 CsA 组相同。

### 1.3 动物模型制作

SD 大鼠在室温(23±2)℃的条件下,局部消毒皮肤,用 20%乌拉坦 1.25 g/kg 腹腔注射麻醉大鼠后仰卧固定,选用标准肢体 II 导联,连接多导生理信号采集处理系统,全程记录 IR 时的心电图。于大鼠颈前正中部纵向剪开皮肤 2.5~3.0 cm,用止血钳分离出气管,行气管插管,连接呼吸机(潮气量 10~20 ml/kg,频率 80 次/分);稳定 1 min 后,用止血钳分离出左颈总动脉,并用肝素化聚氯乙烯细管(直径 1 mm),一端连接于多道生理信号采集处理系统,另一端从左颈总动脉插管至左室(根据左室内压波形判断),固定插管,用温湿医用纱布覆盖颈部切口,全程记录 IR 时的 LVESP;稳定 1 min 后,沿胸骨左缘剪开皮肤,用止血钳游离大鼠左侧胸大肌,暴露第 2、3、4 肋后,可以清晰看到心脏的暗影,用弯头止血钳沿胸骨左缘第 3 肋间分开肋骨,挤出心脏,充分暴露心脏及其表面的血管,用 4/0 医用缝

合线平左心耳下缘,贴冠状动脉前降支管壁外 1~2 mm 穿线,然后迅速将心脏送回胸腔,医用缝合线的两端留置体外备用。用长嘴止血钳把胸部皮肤和肌肉以及心脏挂线一端固定,上提另一端挂线,造成心肌缺血,观察心电图变化:出现 ST 段抬高和(或)T 波高耸或者倒置,再灌注时则松开止血钳,放松挂线,若抬高的 ST 段恢复正常或下降超过 50%,视为 IR 模型制作成功<sup>[1]</sup>。

### 1.4 标本采集

再灌 6 h 后大鼠腹主动脉采集 5 ml 血液制备血清。剪取左室前壁缺血心肌组织 80 mg,从 -20℃冰箱取出大鼠心肌组织线粒体分离试剂盒,按试剂盒使用说明提取线粒体。剪取左室前壁缺血心肌组织 80 mg,从 -20℃冰箱取出大鼠心肌组织 Caspase-3 活性检测试剂盒中的心肌组织裂解液,按试剂盒使用说明的步骤分离 Caspase-3 蛋白。

### 1.5 标本检测

Caspase-3 活性、TNF- $\alpha$  测定按照检测试剂盒使用说明的步骤进行。大鼠血清 LDH、CK-MB 送至皖南医学院弋矶山医院检验科由全自动生化分析仪检测。心肌细胞线粒体通透性的大小通过线粒体吸光度来测定,用线粒体通透性测定液(pH 7.4)测定。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件包,计量资料数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,3 组之间比较用单因素方差分析(ANOVA),两两比较用  $q$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

本实验中 IR 组 2 只大鼠在再灌注期间因室颤而死亡,故其他 2 组随机剔除 2 只,每组取 10 只进行分析。

### 2.1 各组心律失常情况比较

与 IR 组相比,CsA 组心律失常的发生率低及严重程度轻,心律失常积分显著低于 IR 组(见表 1)。

表 1 各组大鼠再灌注期间心律失常情况 ( $n = 10$ )

	室性早搏	室速累计 时间(s)	室颤累计 时间(s)	心律失常 积分
IR 组	40±5	120.3±15.2	12.6±4.2	4.0±0.5 <sup>(2)</sup>
CsA 组	14±6	0	0	0.6±0.4 <sup>(1)(2)</sup>
Sham 组	4±2	0	0	0.3±0.2 <sup>(1)</sup>

注:与 IR 组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.05$ ,与 Sham 组比较,<sup>(2)</sup> $P < 0.05$

### 2.2 各组心电图 ST 段变化

CsA 组心电图 ST 段在恢复血液灌注早期回落明显,再灌注 30 min 时回落 30%左右,再灌注期间

呈下降趋势,与 IR 组比较下降更显著(见表 2)。

2.3 各组 LVESP 变化

CsA 组和 Sham 组 LVESP 在再灌注期间保持稳定,IR 组再灌注期间 LVESP 进行性下降至 30 mmHg 左右,各组大鼠再灌注 0、30、60 min 的

LVESP 变化见表 3。

2.4 各组血清指标比较

与 IR 组比较,再灌注结束时 CsA 组大鼠的血清 LDH、CK-MB、TNF- $\alpha$  浓度明显减低,Caspase-3 活性减、线粒体通透性减小(见表 4)。

表 2 各组大鼠再灌注过程中 ST 段变化

(mV,  $n=10$ )

	0 min	30 min	60 min
IR 组	$0.52 \pm 0.052^{(2)}$	$0.44 \pm 0.039^{(2)(3)}$	$0.46 \pm 0.027^{(2)(3)}$
Sham 组	$0.04 \pm 0.047^{(1)}$	$0.06 \pm 0.070^{(1)}$	$0.05 \pm 0.063^{(1)}$
CsA 组	$0.35 \pm 0.038^{(1)}$	$0.29 \pm 0.059^{(1)(2)(3)}$	$0.23 \pm 0.047^{(1)(2)(3)}$

注:与 IR 组比较,  $^{(1)}P<0.05$ ,与 Sham 组比较,  $^{(2)}P<0.05$ ,与再灌 0 min 时比较,  $^{(3)}P<0.05$

表 3 各组大鼠再灌注过程中 LVESP 变化

(mmHg,  $n=10$ )

	0 min	30 min	60 min
IR 组	$35.55 \pm 1.48^{(2)}$	$32.28 \pm 3.63^{(2)(3)}$	$29.53 \pm 2.37^{(2)(3)}$
Sham 组	$42.97 \pm 2.81^{(1)}$	$41.33 \pm 2.53^{(1)}$	$42.59 \pm 2.06^{(1)}$
CsA 组	$40.76 \pm 2.80^{(1)(2)}$	$40.59 \pm 2.09^{(1)(2)}$	$40.63 \pm 2.45^{(1)(2)}$

注:与 IR 组比较,  $^{(1)}P<0.05$ ,与 Sham 组比较,  $^{(2)}P<0.05$ ,与再灌 0 min 时比较,  $^{(3)}P<0.05$

表 4 各组大鼠血清指标比较

( $n=10$ )

	LDH (U/L)	CK-MB(U/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	Caspase-3 活性( $\mu$ M)	线粒体吸光度(OD)
IR 组	$1172 \pm 42^{(2)}$	$3219 \pm 57^{(2)}$	$160.54 \pm 18.74^{(2)}$	$137.03 \pm 6.01^{(2)}$	$0.067 \pm 0.004^{(2)}$
Sham 组	$748 \pm 35^{(1)}$	$2180 \pm 41^{(1)}$	$62.21 \pm 10.41^{(1)}$	$77.13 \pm 2.74^{(1)}$	$0.126 \pm 0.006^{(1)}$
CsA 组	$948 \pm 39^{(1)(2)}$	$2761 \pm 74^{(1)(2)}$	$89.32 \pm 7.55^{(1)(2)}$	$99.55 \pm 5.10^{(1)(2)}$	$0.091 \pm 0.008^{(1)(2)}$
P 值	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$

注:与 IR 组比较,  $^{(1)}P<0.05$ ,与 Sham 组比较,  $^{(2)}P<0.05$

3 讨论

Caspase 蛋白是一类特殊的蛋白水解酶家族, Caspase 家族在凋亡的执行阶段起主要作用,凋亡的发生是一系列 Caspase 家族成员共同参与完成的<sup>[2]</sup>。曾志勇等<sup>[3]</sup>在猫的体外循环实验中发现,再灌注 15 min 时心肌的 Caspase-3 mRNA 的表达量较主动脉阻断前明显增加,再灌注 90 min 时心肌 Caspase-3 mRNA 的表达量为主动脉阻断前的 4 倍。徐强等<sup>[4]</sup>研究大鼠心肌再灌注不同时相 Caspase-3 激活与心功能变化的关系,提出 Caspase-3 激活是 MIRI 后心肌细胞凋亡导致心功能下降的机制之一。心肌缺血、缺氧时核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)活性增加,有研究表明 CsA 能抑制核转录因子(nuclear transcription factor)的激活<sup>[5]</sup>。NF- $\kappa$ B 是细胞核内重要核转录因子,参与了与凋亡有关的基因的转录,使促凋亡基因 Bax、Fas 等表达增加<sup>[6]</sup>。CsA 通过抑制缺血-再灌注心肌组中 NF- $\kappa$ B 的激活,进而抑制 Bax、Fas 等促凋亡基因的表达,最终产生降低缺血-再灌注心肌组织 Caspase-3 活性的效应,抑制了缺血-再灌注期间心肌细胞的凋亡,改善了心功能。

TNF- $\alpha$  是在机体处于应激状态时由激活的单

核细胞、巨噬细胞产生,其在体内的半衰期较短,为 6~20 min。TNF- $\alpha$  可直接作用于多种效应细胞,具有广泛的生物学效应,参与体内肿瘤细胞的杀伤、炎症反应、组织损伤等病理生理反应<sup>[7,8]</sup>。TNF- $\alpha$  可促进氧自由基产生、活化中性粒细胞、诱导心肌细胞凋亡<sup>[9,10]</sup>。CsA 作为一种免疫抑制剂,通过抑制 Th4 淋巴细胞合成细胞因子,抑制单核细胞、巨噬细胞等的活化,使 TNF- $\alpha$  生成减少。在本研究中, CsA 预处理使缺血-再灌注心肌组织中 TNF- $\alpha$  的产生明显减少,对心肌起到保护作用。

线粒体功能障碍在心肌缺血-再灌注损伤中占有重要地位。近年研究发现,线粒体的功能障碍和线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)密切相关<sup>[11,12]</sup>。MPTP 是由位于线粒体膜上多蛋白组成的非选择性复合孔道,其主要由外膜的电压依赖性阴离子通道(VDAC),内膜的腺苷酸转位子(ANT),基质的亲环蛋白 D(CyP-D)组成,其中 CyP-D 是免疫抑制剂 CsA 在细胞内的结合蛋白。心肌缺血-再灌注时会导致 MPTP 开放, CsA 通过特异的作用于 MPTP 上的亲环蛋白 D(CyP-D)成分,抑制再灌注期间 MPTP 的开放,减轻再灌注诱发的线粒体通透性增

加,减少线粒体损伤和功能障碍。线粒体通透性的改善使大鼠再灌注期间的心肌细胞能量供应障碍得到缓解,线粒体损伤减轻,并减少了线粒体内促凋亡物质的释放,发挥了抗心肌缺血-再灌注损伤作用。

### 参 考 文 献

- [1] 徐叔云,陈修,卞如濂. 药理实验方法学[M]. 第三版. 北京:人民卫生出版社,2002:938.
- [2] Mirakian R, Nye K, Palazzo FF, et al. Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases[J]. J Immunol Methods, 2002, 265(1-2):161-175.
- [3] 曾志勇,王志农,何斌,等. 猫体外循环时心肌 caspase-3 mRNA 表达的变化[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(4):383-385.
- [4] 徐强,司良毅,张红. 大鼠心肌再灌注不同时相 caspase-3 激活与心功能变化的关系[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23):2338-2340.
- [5] 杜美蓉,李大金. 环孢素 A 的药效学研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(1):1-3.
- [6] 郭双平,王文亮,翟宇强. 核转录因子(NF- $\kappa$ B)的研究进展[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(5):379-380.
- [7] Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG. TNF-alpha and reactive oxygen species in necrotic cell death [J]. Cell Res, 2008, 18(3):343-349.
- [8] Bartee E, Mohamed MR, McFadden G. Tumor necrosis factor and interferon: cytokines in harmony [J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(4):378-383.
- [9] Dhingra S, Sharma AK, Singla DK, et al. P38 and ERK1/2MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(6):H3524-H3531.
- [10] Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, et al. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways[J]. J Clin Invest, 2007, 117(9):2692-2701.
- [11] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death [J]. Biochem J, 1999, 341(Pt 2):233-249.
- [12] Halestrap AP, Clarke SJ, Javallov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(3):372-385.

(收稿:2010-11-03 修回:2011-04-11)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 244 页)

NF- $\kappa$ B 结合位点,活化的 NF- $\kappa$ B 能与结合位点结合,启动和调节众多炎症因子基因转录,进而炎症因子极大增加,炎性损伤加重。本研究结果表明,中、高剂量的 PFC 可有效抑制 NF- $\kappa$ B 的激活,提示 PFC 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 的激活来降低 IL-6 水平,进而减轻炎症反应,减轻心肌病理形态学改变,保护缺血心肌。

### 参 考 文 献

- [1] 刘书盈,钱桂生. 全氟化碳对急性肺损伤的保护作用及临床应用前景[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(5):338-339.
- [2] Gregor T, Schmalisch G, Burkhardt W, et al. Aerosolization of perfluorocarbons during mechanical ventilation: an in vitro study[J]. Intensive Care Med, 2003, 29(8):1354-1360.
- [3] 王晓光,刘又宁. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的新进展[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2005, 25(7):517-519.
- [4] Wiedemann HP. Partial liquid ventilation for acute respiratory distress syndrome [J]. Clin Chest Med, 2000, 21(3):543-554.
- [5] von der Hardt K, Schoof E, Kandler MA, et al. Aerosolized perfluorocarbon suppresses early pulmonary inflammatory response in a surfactant-depleted piglet model[J]. Pediatr Res, 2002, 51(2):177-182.
- [6] Rotta AT, Steinhorn DM. Partial liquid ventilation reduces pulmonary neutrophil accumulation in an experimental model of systemic endotoxemia and acute lung injury[J]. Crit Care Med, 1998, 26(10):1707-1715.
- [7] Gabriel AS, Ahnve S, Wretling B, et al. IL-6 and IL-1 receptor antagonist in stable angina pectoris and relation of IL-6 to clinical findings in acute myocardial infarction[J]. J Intern Med, 2000, 248(1):61-66.
- [8] Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, et al. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men [J]. Circulation, 2000, 101(15):1767-1772.
- [9] Myshwska J, Wieckiewicz J, Hak L, et al. Interleukin-6 polymorphism corresponds to the number of severely stenosed coronary arteries [J]. Eur Cytokine New, 2006, 17(3):181-188.
- [10] 张亚峰,王骏飞,蒋青. NF- $\kappa$ B 信号转导途径与炎症性疾病[J]. 国际免疫学杂志, 2007, 9(30):288-291.
- [11] Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10):725-734.

(收稿:2010-12-15 修回:2011-02-23)

(本文编辑:丁媛媛)