

TG-6 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究

秦 军,初晓倩,李庆平*

(南京医科大学药理学系,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:研究新化合物 TG-6 对大鼠心肌缺血再灌注(myocardial ischemia reperfusion,I/R)损伤的保护作用及其机制。方法:大鼠于 I/R 前 5 min 尾静脉注射药物,结扎大鼠左冠状动脉前降支缺血 45 min,再灌注 24 h 后,测定大鼠心电图,心肌组织 HE 染色观察其病理学变化;测定血清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、肌酸激酶(creatine kinase,CK)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)等含量;检测血清中炎症因子,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)、白介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)含量,Western blot 测定 TLR4、I κ B α 、NF- κ B 蛋白的表达。结果:与模型组相比,TG-6 可以明显改善心电图 S-T 段的抬高,减轻心肌组织梗死面积和病理损伤,显著降低血清中 LDH、CK、MDA、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量,增加 SOD 活性。TG-6 能减少心肌组织中 TLR4、I κ B α 、NF- κ B 蛋白的表达。结论: TG-6 对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与抗炎和抗氧化有关。

[关键词] TG-6;心肌缺血再灌注损伤;炎症;氧化应激

[中图分类号] R972

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)08-912-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160803

Protective effects of TG-6 on myocardial ischemia-reperfusion injury and its mechanism

Qin Jun, Chu Xiaoqian, Li Qingping*

(Department of Pharmacology, NJMU, Nanjing 21166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of TG-6 on myocardial ischemia reperfusion injury in rats and the underlying mechanism. **Methods:** The drugs were administered by intravenous injection 5 min before ischemia reperfusion(I/R)injury. Myocardial ischemia reperfusion injury (MI/RI)model was treated by 45 min of left anterior descending (LAD)occlusion followed by 24 h of reperfusion. Measurement of rat electrocardiogram (ECG), hematoxylin-eosin (HE)staining of cardiac tissue, serum lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Serum inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) were measured by ELISA kits. The protein expression of TLR4, I κ B α and NF- κ B were measured by Western blot. **Results:** Compared with the I/R group, TG-6 decreased S-T elevation, reduced myocardial pathological lesions, significantly decreased serum LDH, CK, MDA, TNF- α , IL-6, IL-1 β content, and increased SOD activity. TG-6 reduced TLR4, I κ B α and NF- κ B protein expression in cardiac tissue. **Conclusion:** TG-6 exerts strong favorable cardioprotective function on myocardial I/R injury, which may be related to anti-inflammatory and antioxidant activity.

[Key words] TG-6; myocardial ischemia-reperfusion injury; inflammation; oxidative stress

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08):912-916]

缺血性心脏疾病(IHD)是心血管疾病死亡的主要原因之一,其死亡人数占心血管疾病的 42%^[1]。缺血再灌注(ischemia/reperfusion,I/R)损伤是指机体因缺血而发生损伤,在缺血纠正后这种损伤反而加

重的一种病理现象^[2]。心肌 I/R 损伤是指心肌组织血液灌注减少时、心肌血氧和营养物质供应不足,在缺血纠正后不但不能改善组织的缺血性损伤,反而加重其损伤,进而引起细胞死亡^[3-4]。心肌 I/R 损伤会引起心律失常、心肌梗死和心室功能不全等症。心肌 I/R 损伤的机制是多方面的,如氧化应激、炎症、细胞内钙超载、中性粒细胞聚集和黏附、血管内皮细胞功能障碍等等。

[基金项目] 国家自然科学基金(30973534,81173052);南京医科大学科技发展基金(2013NJMU004)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:qpli@njmu.edu.cn

钠氢交换器($\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger, NHE)在调节细胞内 pH 值、维持 Na^+ 和 Ca^{2+} 稳定方面起重要的调节作用^[5]。目前,已经有 10 种 NHE 亚型(NHE1~NHE10)被确认,其中 NHE1 在心肌细胞中占绝大多数,因此 NHE1 在调节心肌功能方面有着重要作用。在对心肌 I/R 损伤机制研究过程中,由于心肌内 H^+ 增加,造成了细胞内 pH 值下降,进而激活 NHE。 Na^+ 进入细胞内,而氢离子则被转运到细胞外,进而引起 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交换,致细胞内 Ca^{2+} 超负荷,造成心肌细胞损伤^[6]。因此, $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交换抑制剂在心肌 I/R 损伤的治疗中起着重要作用。目前研制的 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 交换抑制剂主要抑制 NHE1 的活性。阿米洛利(Amiloride)为第 1 代心肌钠氢交换抑制药。第 2 代心肌钠氢交换抑制药为苯甲酰胍类,如卡立泊来德(Cariporide)和依泊来德(Eniporide),在心肌缺血的治疗中发挥重要作用。

中国药科大学新药研究中心将卡立泊来德分子的有效基团与曲美他嗪分子的有效基团相结合,合成了一系列化合物。经初步筛选发现化合物 TG-6 作用突出^[7]。本研究旨在研究 TG-6 对心肌 I/R 损伤保护作用及其可能的机制,为其临床应用提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠,220~250 g[生产许可证号:SCXK(浙)2014-0001,浙江省实验动物中心提供]。动物饲养环境为(24 ± 2)℃,相对湿度 50%~60%,昼夜交替时间 12 h,自由饮水及普通饲料喂养,适应 1 周后用于实验。

TG-6(中国药科大学新药研究中心提供);盐酸地尔硫卓(大连美仑生物);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH),肌酸激酶(creatine kinase, CK),丙二醛(malondialdehyde, MDA),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),白介素(interleukin, IL)-6, IL-1 β 酶联免疫试剂盒(ELISA, 北京达科为生物技术有限公司);TLR4、p-I κ B α 、I κ B α 、p-NF- κ B、NF- κ B 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国)。

全波长酶联免疫检测仪(SH-1000, 日本株式会社日立制造所);四道生物信号采集处理系统(BL-420S, 成都泰盟科技股份有限公司);小动物人工呼吸机(BW-BM1103-300, 上海软隆科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

SD 大鼠随机分为 5 组,每组 10 只:假手术(Sham)组、模型(I/R)组、地尔硫卓(Dit, 1.5 mg/kg)组、TG-6 高剂量(1.0 mg/kg)组和 TG-6 低剂量(0.5 mg/kg)组。大鼠于 I/R 前 5 min 尾静脉注射药物, I/R 组及 Sham 组注射等量生理盐水, Dit 组作为阳性对照组。

1.2.2 冠状动脉左前降支结扎致大鼠心肌 I/R 损伤模型

参考文献[8],大鼠腹腔注射 3%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后,仰卧位固定于手术台,颈部、左前胸备皮,碘伏消毒。连接 II 导联心电图系统,记录实验大鼠心电图。取颈部正中切口,小心分离皮下脂肪和肌肉,气管作“一”字切口连接呼吸机,设定呼吸机参数为:80 次/min,潮气量 10 mL/kg 体重,呼吸比 2:1。于胸部左侧第 2~4 肋间切口,止血钳逐层分离皮下组织,开胸并破坏心包膜,暴露心脏左前降支结扎点,于左心耳下缘 2 mm 处用无菌带线眼科缝合针(6-0 丝线),穿过心肌浅层,结扎冠状动脉左前降支,并置一内径 1.5 mm、长 0.5 cm 带凹槽的乳胶管备用,将线两端分别穿入小圈内,动物呼吸平稳后收紧结扎线连同乳胶管一并结扎,使冠状动脉左前降支受到乳胶管压迫。以心电图 S-T 端明显上抬并且结扎线以下心肌颜色变白为心肌缺血标志。缺血 30 min 后剪断结扎线恢复供血,使用棉签清理胸腔淤血,关闭胸腔并适度挤压胸腔排气,逐层缝合肋骨、肌肉和皮肤;观察心电图,待波形及心率稳定后撤去呼吸机并缝合气管。伪手术组进行同样操作,但进针后只穿线不接扎。术后注意保温,供应食水,24 h 后处死。

1.2.3 心电图的测定

大鼠腹腔注射 3%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后,仰卧位固定于手术台,颈部、左前胸备皮,碘伏消毒。连接 II 导联心电图系统,记录实验大鼠心电图。

1.2.4 心肌组织 HE 染色

取大鼠心脏,用预冷(4℃)生理盐水冲洗心脏,除去大血管、结缔组织,取冠脉结扎部位下 1 cm 处的少量心室肌组织,用 10%福尔马林溶液固定,进行病理组织切片检查。

1.2.5 血清生化指标和炎症因子的测定

大鼠左侧颈总动脉插管取血,3 500 r/min 离心 15 min,收集上清,冻存于-80℃中,用于进一步检测。按照相关试剂盒的说明书分别检测血清中 SOD、CK、

LDH 活性和 MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量。

1.2.6 Western blot 检测心肌组织中相关蛋白含量

取大鼠心脏，于预冷的生理盐水中洗净淤血后，除去大血管、结缔组织，取冠脉结扎部位下 1 cm 处的少量心室肌组织，立即投入液氮中保存，Western blot 测定心肌组织中相关蛋白含量。

1.3 统计学方法

所有实验结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，运用 SPSS16.0、GraphPad Prism 5 统计学软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。P \leq 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TG-6 对心肌 I/R 损伤大鼠心电图的影响

相比于 Sham 组，I/R 组大鼠心电图 S-T 段明显抬高，说明造模成功；与 I/R 组相比，Dit 组和 TG-6

组可以显著改善心电图 S-T 段的抬高。表明 TG-6 能够改善心肌 I/R 损伤诱导的心电图改变(图 1)。

2.2 TG-6 对心肌 I/R 大鼠心肌组织病理的影响

Sham 组大鼠心肌组织形态无明显改变，横纹清晰，心肌细胞无变性、坏死，间质无充血、水肿，无炎性细胞浸润等病变；I/R 组大鼠心肌组织心肌纤维排列不规则，结构紊乱，出现肿胀、断裂和坏死融合，有炎性细胞浸润；Dit 组心肌组织病变程度明显轻于模型组，心肌纤维轻度肿胀，多数区域心肌细胞无变性、坏死，局部有小灶性坏死和炎性细胞浸润；TG-6 高、低剂量组心肌细胞病变程度明显轻于 I/R 组，心肌纤维轻度肿胀，小范围内排列不规则、断裂，无炎性细胞浸润，心肌受损程度进一步下降，TG-6 高剂量效果优于低剂量。实验结果表明，TG-6 明显改善心肌 I/R 损伤，减轻心肌组织病理学损伤(图 2)。



图 1 TG-6 对心电图的影响

Figure 1 Effects of TG-6 on electrocardiogram

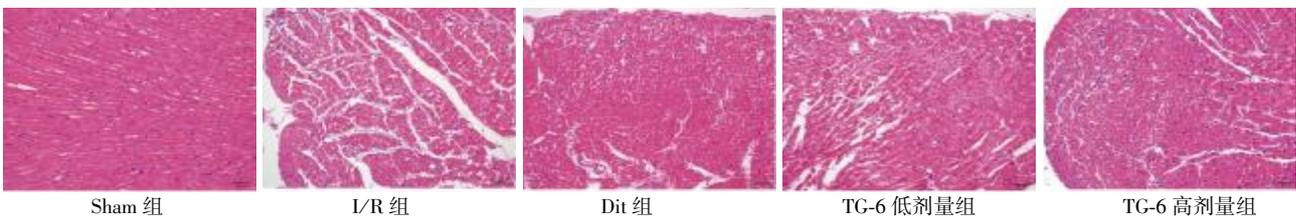


图 2 TG-6 对心脏病理损伤的影响(HE, $\times 200$)

Figure 2 Effects of TG-6 on histopathological examination in the cardiac tissue(HE, $\times 200$)

2.3 TG-6 对心肌 I/R 损伤大鼠血清生化指标的影响

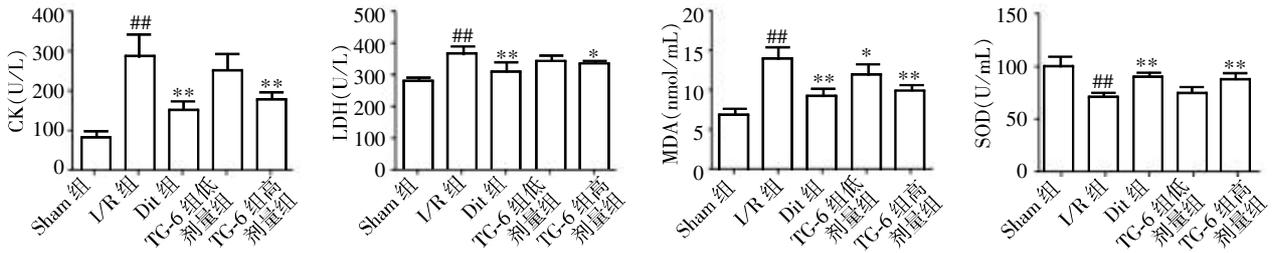
与 Sham 组相比，I/R 大鼠血清中 LDH、CK 活力明显升高(P < 0.01)，SOD 活力明显降低(P < 0.01)，MDA 含量明显增加(P < 0.01)；与 I/R 组相比，Dit 组和 TG-6 高剂量组中 LDH、CK 的活力显著降低(P < 0.01)，SOD 活力增加(P < 0.01)，MDA 含量减少(P < 0.01)；与 I/R 组相比，TG-6 低剂量组的 LDH、CK 活力减少，SOD 活力增加，但是三者都无显著性差异(P > 0.05)，而 MDA 则显著减少(P < 0.05)。显示 TG-6 可能通过抗氧化作用对心肌 I/R 损伤发挥保护作用(图 3)。

2.4 TG-6 对心肌 I/R 损伤大鼠血清炎症因子的影响与 Sham 组相比，I/R 组大鼠血清中 TNF- α 、IL-

6、IL-1 β 的含量明显升高(P < 0.01)，与 I/R 组相比，Dit 组和 TG-6 高、低剂量组血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量明显降低(P < 0.01 或 P < 0.05)。显示 TG-6 可能通过抗炎作用对心肌缺血损伤发挥保护作用(图 4)。

2.5 TG-6 对 I/R 损伤大鼠心肌组织中相关蛋白表达的影响

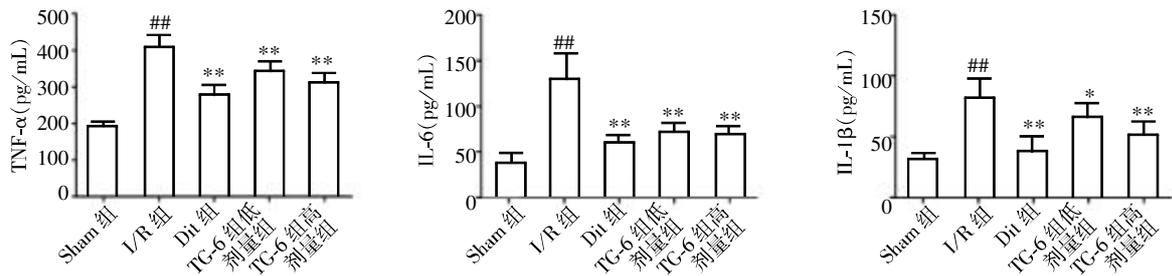
与 Sham 组相比，I/R 组心肌组织中 TLR4、I κ B α 和 NF- κ B 表达增加(P < 0.01)。相比于 I/R 组，Dit 组和 TG-6 高、低剂量组心肌组织中 TLR4、I κ B α 和 NF- κ B 表达减少(P < 0.01 或 P < 0.05)。显示 TG-6 可能通过抑制 TLR4/ NF- κ B 信号通路发挥一定的抗炎作用(图 5)。



与 Sham 组相比, # $P < 0.01$; 与 I/R 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=10$)。

图 3 TG-6 对血清生化指标的影响

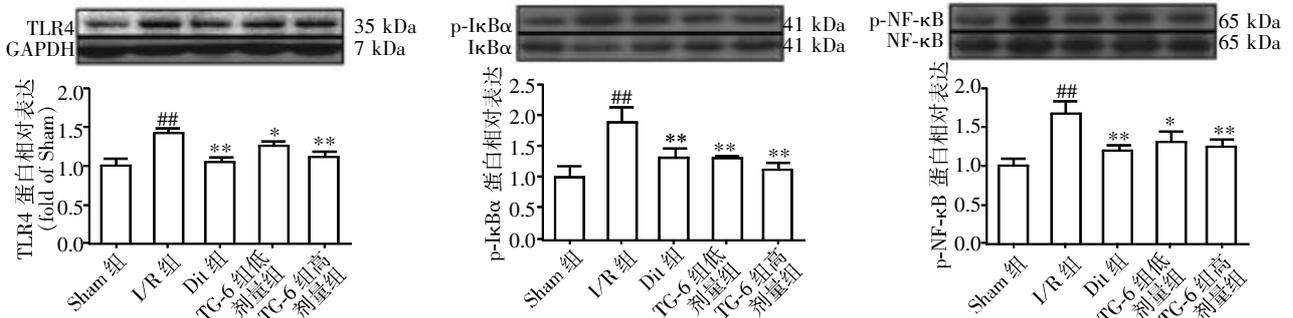
Figure 3 Effects of TG-6 on biochemical markers in serum



与 Sham 组相比, # $P < 0.01$; 与 I/R 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=10$)。

图 4 TG-6 对血清炎症因子的影响

Figure 4 Effects of TG-6 on pro-inflammatory cytokines in serum



与 Sham 组相比, # $P < 0.01$; 与 I/R 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=6$)。

图 5 TG-6 对心脏促炎症蛋白的影响

Figure 5 Effects of TG-6 on pro-inflammatory protein in cardiac tissue

3 讨论

缺血的过程由于干扰了活性氧(ROS)的形成和消除之间的平衡,从而导致 ROS 的积累,致使在 I/R 应激反应下机体产生大量的 ROS。内源性防御系统,主要是抗氧化酶系统(如 SOD 和 GSH-PX),在减少 I/R 损伤中起着重要作用。血清中 LDH 和 CK 反映了心肌损伤^[9],SOD 和 MDA 是重要的心肌氧化损伤指标。在 I/R 时,脂质过氧化产物 MDA 含量显著增加,提示引起了严重的氧化性损伤。再灌注时,心肌细胞 CK 快速生成并达到最大值,并释放入血。TG-6 降低了 MDA、LDH、CK 含量,增强了 SOD 的活性,显示 TG-6 具有一定的抗氧化作用。

大量研究表明,缺血性疾病中各个阶段炎症起

着关键作用。有报道显示,炎症在心肌 I/R 损伤过程中起着重要作用,是非常活跃的介导损伤因子之一。心肌 I/R 损伤的病理过程中,中性粒细胞释放具有趋化作用的炎症物质,诱导细胞黏附分子和血管细胞黏附分子的表达,促使中性粒细胞进入缺血区,从而引起炎症反应,加重心肌组织损伤^[10-11]。心肌 I/R 损伤可能促进自由基的产生,并触发缺血组织释放 TNF- α 。TNF- α 可以进一步刺激组织释放促炎性细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 等等^[12]。在本研究中, TG-6 可以降低血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量,显示 TG-6 具有一定的抗炎作用。

Toll 样受体(toll like receptor, TLR)是一类天然免疫受体,可以对不同病原相关分子模式进行识别、结合,并引发一系列信号转导,进而导致炎症介

质的释放^[15]。TLR 家族识别受体不仅参与免疫应答,也参与心肌 I/R 损伤中的炎症反应^[14]。研究表明,TLR4 表达增加在心肌 I/R 损伤炎症反应中起着重要作用^[15]。进一步研究表明,相比于正常小鼠,TLR4 缺陷型小鼠(C3H/HeJ 小鼠)可以减少 40% 的心肌梗死,减少中性粒细胞浸润以及降低 NF- κ B 活性和 AP-1 核易位^[16],表明 TLR4 可以通过激活 NF- κ B 进一步激活炎症反应。I κ B α 是 NF- κ B 抑制蛋白,当细胞受到细胞外信号刺激后 I κ B α 磷酸化,游离的 NF- κ B 迅速转移到细胞核,诱导相关炎症的转录^[17]。参与炎症反应的炎症因子大多数都受其调控,如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、iNOS、COX2 等等。TG-6 降低心肌组织中 TLR4、I κ B α 和 NF- κ B 蛋白的表达,显示 TG-6 可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,减少炎症反应,进而对心肌 I/R 损伤具有一定的保护作用。

本研究结果显示,TG-6 对大鼠心肌 I/R 损伤具有一定的保护作用,其作用机制可能是通过抗氧化,抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路,进而抑制炎症因子的产生,抑制炎症反应。

[参考文献]

- [1] Salomon JA,Wang H,Freeman MK,et al. Healthy life expectancy for 187 countries,1990–2010;a systematic analysis for the Global Burden Disease Study 2010 [J]. *Lancet*,2012,380(9859):2144–2162
- [2] Li C,Hu M,Wang Y,et al. Hydrogen sulfide preconditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through inhibition of endo/sarcoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(7):7740–7751
- [3] Sharma V,Bell RM,Yellon DM. Targeting reperfusion injury in acute myocardial infarction;a review of reperfusion injury pharmacotherapy [J]. *Exp Opin Pharmacother*,2012,13(8):1153–1175
- [4] Sivaraman V,Yellon DM. Pharmacologic therapy that simulates conditioning for cardiac ischemic/reperfusion injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*,2014,19(1):83–96
- [5] 胡若愚,景华. 钠氢通道抑制剂在心脏缺血再灌注损伤中的保护作用 [J]. *实用医学杂志*,2006,22(24):2931–2933
- [6] Kim JC,Woo SH. Role of Na⁺-H⁺ exchange in the modulation of L-type Ca²⁺ current during fluid pressure in rat ventricular myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2013,431(2):239–245
- [7] Zhou Y,Gong G,Yang W,et al. The cardioprotective effect of TG-6,a newly synthesized compound,on ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Eur J Pharmacol*,2012,683(1/3):190–196
- [8] 李文雯,韦艺丹,魏林林,等. 复方丹参滴丸防治急性心肌梗死作用机制的研究进展 [J]. *药学与临床研究*,2014,22(1):67–71
- [9] Yang Z,Sharma AK,Marshall M,et al. NADPH Oxidase in bone marrow-derived cells mediates pulmonary ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2009,40(3):375–381
- [10] Cheng L,Jin Z,Zhao R,et al. Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia-reperfusion injury;role of Nrf2/ARE pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*,2015,8(7):10420–10428
- [11] Xing J,Xue F,Yuan Y,et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway;a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Chin Med J*,2010,123(19):2720–2726
- [12] Ahn J,Kim J. Mechanisms and consequences of inflammatory signaling in the myocardium [J]. *Curr Hypertens Rep*,2012,14(6):510–516
- [13] Otsui K,Inoue N,Kobayashi S,et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries [J]. *Heart Vessels*,2007,22(6):416–422
- [14] Li Y,Si R,Feng Y,et al. Myocardial ischemia activates an injurious innate immune signaling via cardiac heat shock protein 60 and Toll-like receptor 4 [J]. *J Biol Chem*,2011,286(36):31308–31319
- [15] Yang J,Guo X,Yang J,et al. RP105 protects against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced myocardial damage in rats by suppressing TLR4-mediated signaling pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*,2015,36(6):2137–2148
- [16] Zhu P,Wei T,Gao J,et al. The cardioprotective effect of salidroside against myocardial ischemia reperfusion injury in rats by inhibiting apoptosis and inflammation [J]. *Apoptosis*,2015,20(11):1433–1443
- [17] Wang C,Sun H,Song Y,et al. Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion;role of TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*,2015,8(2):1737–1746

[收稿日期] 2016-01-03