

· 论 著 ·

地塞米松预处理减轻异丙肾上腺素所致心肌损伤及 TNF- α 的表达

张严高¹, 余磊², 王建莉², 尹戴佳佳¹, 朱闽湘³, 祝春华¹, 范洁¹

〔摘要〕 **目的** 观察地塞米松(Dexamethasone, DEX)对异丙肾上腺素(Isoproterenol, ISO)致小鼠急性心肌缺血损伤的影响并探讨其作用机制。**方法** 16只昆明种小鼠随机分成正常对照(control, CON)组、ISO组、地塞米松预处理(Dexamethasone pretreatment, DEX-pre)组、DEX组,每组4只。CON组、ISO组首次处理前30 min给予等量0.9%氯化钠注射液腹腔注射预处理,然后CON组给予等量0.9%氯化钠注射液腹腔注射处理,ISO组小鼠给予ISO(5 mg/kg),每日腹腔注射1次,连续3 d;DEX-pre组在首次ISO注射前30 min给予DEX(1.25 mg/kg)腹腔注射,余同ISO组;DEX组在第2天、第3天ISO注射30 min后给予DEX(1.25 mg/kg)腹腔注射,余同ISO组。检测血清谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)了解心肌损伤;观察心肌组织的病理学改变并检测细胞因子TNF- α 的变化。**结果** ①与CON组比较,ISO组ASL、LDH、CK均明显升高($P < 0.01$),CK-MP无明显改变($P > 0.05$);ISO组心肌损伤明显加重,形态学计分为4.0比0.0($P < 0.01$);ISO组血清TNF- α 明显升高($P < 0.05$);DEX-pre组TNF- α 明显下降($P < 0.01$)。②与ISO组比较,EX-pre组ASL、CK下降非常显著($P < 0.01$),LDH、CK-MP轻度下降($P < 0.05$);DEX-pre组心肌损伤得到明显改善,形态学计分为2.0比4.0($P < 0.01$);DEX-pre组血清TNF- α 下降非常显著($P < 0.01$)。③与ISO组比较,DEX组ASL、LDH、CK、CK-MP均无明显改变($P > 0.05$);DEX组心肌损伤无明显变化,形态学计分为3.5比4.0($P > 0.05$);DEX组血清TNF- α 升高非常显著($P < 0.01$)。**结论** 地塞米松预处理对异丙肾上腺素致小鼠急性心肌损伤的心肌具有明显保护作用,TNF- α 等细胞因子改变可能是其机制之一。

〔关键词〕 地塞米松;异丙肾上腺素;心肌损伤;肿瘤坏死因子- α

〔中图分类号〕 R542.2 **〔文献标志码〕** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.05.006

Dexamethasone pretreatment reduces isoproterenol-induced myocardial injury and the expression of TNF- α

ZHANG Yan-Gao¹, YU Lei², WANG Jian-li², YIN Dai-jia-jia¹, ZHU Min-xiang³, ZHU Chun-huan¹, FAN Jie¹. 1. The First Department of Sanatorium, Hangzhou Sanatorium of Nanjing Military Command, Hangzhou, Zhejiang 310007, China; 2. Institute of Immunology, Medicine School of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China; 3. Department of Neurosurgery, 117 Hospital of PLA, Hangzhou, Zhejiang 310013, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate potential protective effect of glucocorticoid receptor (GR) agonist dexamethasone on isoproterenol-induced myocardial injury and the possible mechanism. **Methods** The sixteen mice were randomly divided into control (CON) group ($n = 4$), ISO group ($n = 4$), Dexamethasone pretreatment (DEX-pre) group ($n = 4$) and Dexamethasone treatment (DEX) group ($n = 4$). The mice in CON group and ISO group were given the same amount of 0.9% sodium chloride and DEX-pre group given dexamethasone (1.25 mg/kg) injection by intraperitoneal injection as a pretreatment before treatment 30 minutes. CON group was given the same amount of 0.9% sodium chloride injection by intraperitoneal injection. ISO group, DEX-pre group and DEX group received 5 mg/kg isoproterenol hydrochloride with daily intraperitoneal injection and continuous 3 days. At the two and three days, dexamethasone (1.25 mg/kg) was given after ISO injected 30 minutes in DEX group. Observe the serum ASL, LDH, CK, and CK-MP. Myocardial tissue injury was assessed by HE staining. The expression of TNF- α on serum was detected by ELISA. **Results** ① Compared with control group, the levels of ASL, LDH and CK was significantly increased; the degree of myocardial injury were greatly deteriorated in ISO group ($P < 0.01$). The expression of TNF- α on serum was greatly increased ($P < 0.05$) in ISO group. The expression of TNF- α on serum was significantly reduced ($P < 0.01$) in DEX-pre group. ② Compared with ISO group, the levels of ASL and CK was significantly reduced ($P < 0.01$) and the levels of LDH and CK-MP was reduced ($P < 0.05$). The degree of myocardial injury were greatly improved ($P < 0.01$) in DEX-pre group. The expression of TNF- α on serum was significantly reduced ($P < 0.01$) in DEX-pre group. ③ Compared with ISO group, the levels of ASL, LDH, CK, CK-MP and the degree of myocardial injury

作者单位: 1. 310007 浙江杭州, 南京军区杭州疗养院疗养一科; 2. 310058 浙江杭州, 浙江大学免疫研究所; 3. 310013 浙江杭州, 解放军 117 医院神经外科

通讯作者: 朱闽湘, E-mail: hzlyy1kzyg@163.com

were not significantly different in DEX group ($P > 0.05$). The expression of TNF- α on serum was significantly increased ($P < 0.01$) in DEX group. **Conclusion** DEX pretreatment has protective effect against ISO-induced myocardial injury. The mechanism might be the changes of inflammatory cytokines.

[**Key words**] Dexamethasone; isoproterenol; myocardial injury; TNF- α

Debonera 等^[1]发现糖皮质激素对肝脏缺血-再灌注具有保护作用,首次证实地塞米松(Dexamethasone, DEX)可以通过炎症信号通路削弱实质性脏器缺血-再灌注损伤。已有研究证实削弱炎症反应可减轻急性心肌缺血损伤,DEX 等药物的预处理在心肌缺血-再灌注损伤、肾脏缺血-再灌注损伤等能有诱导保护作用^[2-3]。本研究观察 DEX 预处理或治疗对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)致小鼠急性心肌缺血损伤影响,并探索相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器 昆明种小鼠 16 只,雄性,体质量 20 ~ 22 g,浙江大学实验动物中心提供[实验动物合格证号 2007000580817,许可证号 SCXK(沪)2012-0002]。盐酸异丙肾上腺素注射液(1 mg/2 mL,上海禾丰制药有限公司,产品批号 131003),地塞米松磷酸钠注射液(5 mg/1 mL,湖北天药药业股份有限公司,产品批号 1408231);7180 型全自动生化分析仪(日本日立公司),谷草转氨酶(AST)试剂盒(北京执诚公司,产品批号 ZCAPRN012)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(产品批号 3102511)、肌酸激酶(CK)试剂盒(产品批号 403281A)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)试剂盒(产品批号 404213D,以上均为北京利德曼公司产品);肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(美国 Ebioscience 公司,货号 BMS607HS)。

1.2 动物模型分组与制备 采用腹腔注射 ISO 建立小鼠急性心肌缺血模型。将 16 只小鼠随机分为正常对照(control, CON)、异丙肾上腺素损伤(ISO)组、地塞米松预处理(Dexamethasone pretreatment, DEX-pre)组、地塞米松治疗(DEX)组,每组 4 只。CON 组、ISO 组首次处理前 30 min 给予等量 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射预处理,然后 CON 组给予等量 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射处理,ISO 组小鼠给予 ISO(5 mg/kg ISO)腹腔注射,1 次/d,连续 3 d;DEX-pre 组在首次 ISO 注射前 30 min 给予 DEX(1.25 mg/kg)腹腔注射,余同 ISO 组;DEX 组在第 2 天、第 3 天 ISO 注射 30 min 后给予 DEX(1.25 mg/kg)腹腔注射,余同 ISO 组。第 4 天各组小鼠用 10 g/L 戊巴比妥钠(50 g/kg)麻醉,在超净台中进行心脏取血后取全心室。

1.3 血清 AST、LDH、CK、CK-MB 含量检测 各组小鼠取血离心分离血清,转置于 -20 °C 低温冰箱保存待测,采用生化自动分析仪进行 AST、LDH、CK 及 CK-MP 值检测,ELISA 法检测血清 TNF- α 含量。

1.4 心脏组织 HE 染色 取小鼠心脏后用甲醛固定,石蜡包埋,行心肌间断连续切片,切片厚约 5 μ m,常规 HE 染色,光镜下观察各组动物心肌病理改变。形态学计分标准参照文献^[4]方法进行。0 级:心肌细胞排列紧密,横纹清晰,心肌纤维染色均匀,核居中,间质未见血管扩张及炎细胞浸润,组织间隙无水肿,无出血坏死,心外膜、心内膜无异常计 0 分;I 级:心肌细胞排列稀疏,间质血管扩张及少量炎细胞浸润,肌浆分布不均,心肌间质水肿,无出血,可见心肌散在的点状坏死,主要为凝固性坏死灶,局限在心内膜下,计 2 分;II 级:部分心肌坏死灶呈片状分布,灶间无连接,病变累及心壁全层,间质可见血管扩张及炎细胞浸润,有灶性出血,心肌间质有炎性出血及心肌间质水肿,计 4 分;III 级:心肌广泛性大片坏死,灶间相互连接累及心壁全层,有明显的间质血管扩张、水肿、出血及炎细胞浸润,计 6 分。

1.5 统计学处理 用 SPSS 16.0 软件进行数据分析。所有实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

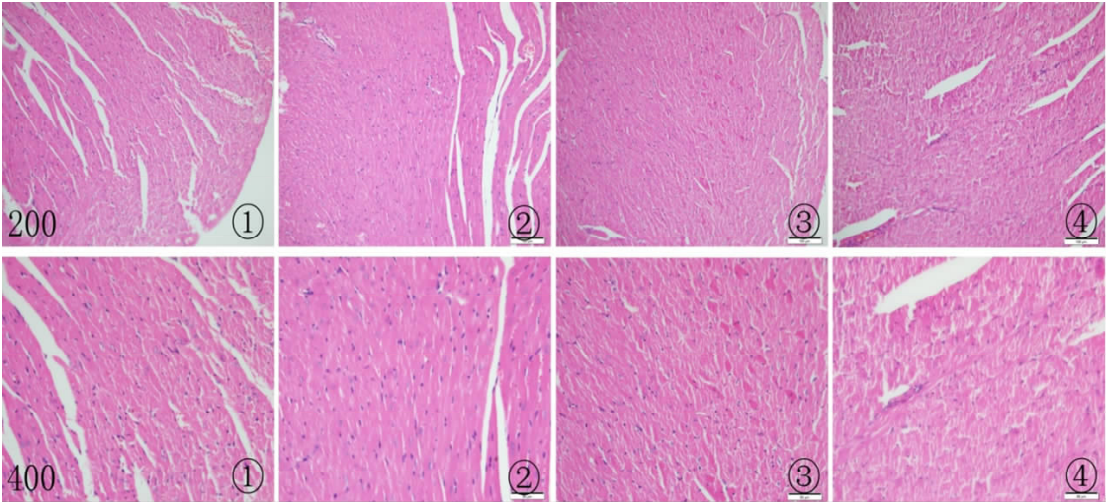
2.1 血清 AST、LDH、CK、CK-MP 含量检测 与 CON 组比较,ISO 组 AST、LDH、CK 均明显升高($P < 0.01$),CK-MP 无明显改变($P > 0.05$);与 ISO 组比较,DEX-pre 组 AST、CK 下降非常显著($P < 0.01$),LDH、CK-MP 轻度下降($P < 0.05$);与 ISO 组比较,DEX 组 AST、LDH、CK、CK-MP 均无明显改变($P > 0.05$,表 1)。

2.2 心肌组织的病理学改变 光镜下观察各组动物心肌病理显示,CON 组心肌细胞排列整齐、致密,胞质着色均匀,胞核清晰,间质细胞无增生,未见炎性渗出、无水肿(图 1①)。ISO 组心肌细胞体积增大呈圆形或类圆形,排列紊乱,细胞核固缩深染,血管和心肌细胞之间可见纤维增多、炎性细胞浸润、少许淋巴细胞浸润,少量红细胞外渗,多处见局灶性坏死,肌溶解、核消失或不着色(图 1②)。DEX-pre 组

表 1 各组 ASL、LDH、CK、CK-MP 水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ASL(U/L)	LDH(U/L)	CK(U/L)	CK-MP(U/L)
CON 组	4	83 ± 5. 2	309 ± 12. 6	452 ± 22. 4	195 ± 16. 2
ISO 组	4	170 ± 12. 8 **	451 ± 21. 6 **	692 ± 28. 6 **	215 ± 18. 2
DEX-pre 组	4	87 ± 6. 1 ▲▲	385 ± 14. 3 ▲	329 ± 24. 3 ▲▲	187 ± 13. 6 ▲
DEX 组	4	156 ± 9. 8	436 ± 18. 9	671 ± 30. 2	214 ± 18. 2

注:与 CON 组比较, ** $P < 0. 01$; 与 ISO 组比较, ▲ $P < 0. 05$, ▲▲ $P < 0. 01$



① CON 组;②ISO 组;③DEX-pre 组;④DEX 组

图 1 光镜下各组心肌组织形态结构(HE 染色 上×200,下×400)

心肌损害较 ISO 组明显减轻,可见残存正常肌纤维明显增多,核圆形、有核仁,胞浆深红色,局灶性坏死明显减少散在的点状,肌纤维排列紊乱改善,血管和心肌细胞之间未见纤维增多、炎性细胞浸润、淋巴细胞浸润(图 1③)。DEX 组肌纤维间充血水肿明显,可见残存少许正常肌纤维;多处见肌溶解、核消失或不着色的局灶性坏死,炎性细胞浸润不明显(图 1④)。与 CON 组比较,ISO 组心肌损伤明显加重,形态学计分为 4.0 比 0.0 ($P < 0. 01$);与 ISO 组比较,DEX-pre 组心肌损伤得到明显改善,形态学计分为 2.0 比 4.0 ($P < 0. 01$),DEX 组心肌损伤无明显变化,形态学计分为 3.5 比 4.0。

2.3 血清 TNF-α 含量检测 ISO 组 TNF-α 明显升高[ISO 组、CON 组分别为($2. 346 \pm 0. 423$) pg/mL、($1. 578 \pm 0. 205$) pg/mL, $P < 0. 05$]; DEX-pre 组与 ISO 组比较,TNF-α 下降非常显著[分别为($0. 415 \pm 0. 089$) pg/mL、($2. 346 \pm 0. 423$) pg/mL, $P < 0. 01$]; DEX 组与 ISO 组比较,TNF-α 升高非常显著[分别为($18. 728 \pm 2. 803$) pg/mL、($2. 346 \pm 0. 423$) pg/mL, $P < 0. 01$];DEX-pre 组 TNF-α 明显低于 CON 组[分别为($0. 415 \pm 0. 089$) pg/mL、($1. 578 \pm 0. 205$)

pg/mL, $P < 0. 01$]。

3 讨论

采用皮下注射或腹腔注射 ISO 可导致心肌细胞缺血缺氧损伤,是常用的动物实验性急性心肌缺血模型。目前认为 ISO 诱导的心肌损伤与心肌相对缺血缺氧、膜通透性改变、氧自由基损伤等有关^[5]。连续注射 ISO 使心肌中氧化应激剧增导致氧自由基聚集,细胞膜通透性增高,肌浆内的可溶性酶大量释放进入血液中,导致血清心肌酶(ASL、LDH、CPK)的水平显著升高。AST、CK、LDH 的活力及心肌病理学改变是评价心肌细胞损害程度的重要指标^[6]。本研究中 ISO 造成心肌细胞损伤后 ASL、LDH、CK 的水平显著升高,心肌局灶性坏死明显,与以往研究相符^[4,6],说明本文小鼠心肌缺血模型造模成功。TNF-α 是重要的前炎性细胞因子和免疫调节因子,在介导炎症反应中有重要的作用。临床研究提示,冠心病患者血清 TNF-α 水平明显高于正常人,并随病情的加重而升高,TNF-α 在急性心梗发病早期即可明显升高,检测 TNF-α 对急性心梗发病早期诊断具有重要意义^[7-9],TNF-α 水平的升高亦与心肌功能

抑制有明显的相关性^[10]。本研究证实 ISO 造成心肌细胞损伤后 TNF- α 明显升高 ($P < 0.05$), TNF- α 与急性心肌缺氧损伤有一定相关性。

TNF- α 可通过肿瘤坏死因子受体参与信号传递和 T 细胞增殖,而肿瘤坏死因子受体对 TNF 也具有动态调节作用^[11];核转录因子-kB 抑制剂可通过干扰 TNF- α 的基因转录而导致其分泌的蛋白量降低,发挥有益效应^[12],以往研究证实 DEX 预处理可减轻缺血再灌注后心肌损伤并起保护作用^[13-14]。糖皮质激素通过调节细胞生长、发育、自身稳定和细胞凋亡来维持机体组织细胞的平衡及其功能,而且糖皮质激素具有抗炎等作用。本研究以糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 激动药 DEX 通过干扰 TNF- α 合成,对急性心肌缺氧损伤产生保护作用。研究结果显示经 DEX 预处理,ISO 导致的 ASL 和 CK 升高得到明显抑制 ($P < 0.01$),ISO 导致的 TNF- α 升高亦得到明显抑制 ($P < 0.01$),心肌损害明显减轻,表明 DEX 预处理对小鼠心肌缺血缺氧有一定的保护作用,与以往 DEX 对小鼠心肌缺血-再灌注损伤、肾缺血-再灌注损伤、脑出血大鼠脑水肿引起 TNF- α 水平的改变的报道相符^[3,15]。而 ISO 导致小鼠心肌损伤后给予 DEX 治疗却没有相似的保护作用,在 ISO 导致损伤后给予 DEX 治疗后 TNF- α 反而明显升高 ($P < 0.01$)。因此,本文认为 DEX 预处理对 ISO 所致小鼠心肌缺血具一定的保护作用,其中 TNF- α 水平的改变发挥重要的作用,但以 DEX 治疗并无明显得益。可能 DEX 预处理可显著减少炎症因子 TNF- α 的表达,使 ISO 导致心肌炎性损伤控制在一定的水平,从而减轻心肌缺血损伤;DEX 预处理还可通过发挥抗凋亡等多途径作用,而减轻心肌缺血损伤,而以 DEX 治疗使 TNF- α 明显升高可能抵消 DEX 预处理诱导的其他有益作用。在 ISO 所致急性心肌细胞缺血缺氧损伤中,DEX 预处理诱导产生的早期保护作用 and 延迟保护作用,尤其后者保护时间长更具潜在的实用价值,使机体较长时间处于一种保护状态。这种保护作用,可能在不稳定性冠心病,尤其是急性心肌梗死超早期产生的类似效应,具有一定的临床应用价值。

【参考文献】

- [1] Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE, et al. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation [J]. *Hepatology*, 2003, 38(6): 1563-1572.
- [2] 庄梅, 方颖, 吴立荣, 等. 地塞米松对大鼠心肌缺血再灌注后细胞凋亡及金属硫蛋白表达的影响 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2008, 10(7): 533-536.
- [3] 张炯, 张颖, 江潮, 等. 地塞米松预处理减轻肾缺血再灌注损伤 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2014, 14(3): 173-176.
- [4] 石孟琼, 白彩虹, 孙桂林, 等. 开口箭不同提取部位对异丙肾上腺素所致小鼠心肌缺血损伤的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(12): 1344-1352.
- [5] 任平, 杜敏, 闵清, 等. 黄芪注射液与牛磺酸合用对小鼠实验性急性心肌缺血的保护作用 [J]. *咸宁学院学报*, 2009, 23(5): 369-372.
- [6] 严思敏, 吴双, 蒋碧梅, 等. 异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚中核仁的表达 [J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41(2): 113-117.
- [7] 董军, 姜华, 陈树涛. 白细胞介素-6、白细胞介素-10、肿瘤坏死因子- α 与冠心病关系的初步研究 [J]. *天津医药*, 2014, 42(11): 1112-1113.
- [8] 陈文惠. 肿瘤坏死因子与白细胞介素-8 在不同类型冠心病患者中的表达水平 [J]. *白求恩医学杂志*, 2014, 12(3): 211-213.
- [9] 吴心语, 张朝明, 王刚, 等. 探讨白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等血清炎症因子在急性心梗中的应用价值 [J]. *实用检验医师杂志*, 2014, 6(1): 31-34.
- [10] 冉华, 王正中, 何艺, 等. 心肌缺血再灌注损伤中肿瘤坏死因子- α 血清水平表达对心肌收缩功能影响的实验研究 [J]. *中华临床医师杂志 (电子版)*, 2014, 8(9): 140-143.
- [11] 陆春雷, 韩晓鹏, 田志强, 等. 肾上腺髓质素对大鼠肾脏机械损伤早期 TNF- β 及其受体表达的影响 [J]. *东南国防医药*, 2012, 14(5): 416-418.
- [12] 吴勇, 叶芬, 葛铁轶, 等. SN50 对缺血再灌注损伤中 TNF- α 影响的实验研究 [J]. *东南国防医药*, 2014, 16(5): 453-455.
- [13] 奚群英, 祝宝华, 刘晨. 乳鼠心肌细胞缺血预适应模型的建立及电镜下超微结构的改变 [J]. *实用临床医药杂志*, 2005(3): 18-20.
- [14] 庄梅, 方颖, 吴立荣, 等. 地塞米松对缺血再灌注大鼠血流动力学和心肌超微结构的影响 [J]. *贵阳医学院学报*, 2007, 32(1): 24-28.
- [15] 方洁, 陆勤, 王浩, 等. 糖皮质激素对脑出血大鼠脑水肿的 TNF- α 影响研究 [J]. *河北医学*, 2013, 19(3): 321-324.

(收稿日期: 2015-06-21; 修回日期: 2015-07-11)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)