

加兰他敏对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 CK-MB 活性及 TNF- α 和 IL-6 水平的影响*

李卉, 马敏, 咸淑悦, 王焱林**

(武汉大学中南医院 麻醉科, 湖北 武汉 430071)

[摘要] 目的: 探讨加兰他敏对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠血清肌酸激酶(CK-MB)活性和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)水平的影响。方法: SPF级雄性SD大鼠50只,随机均分为假手术组、心肌缺血再灌注(I/R)组、加兰他敏组、联合A组及联合B组;在5组大鼠左冠状动脉前降支(LAD)下穿线,假手术组穿线不结扎,其余4组大鼠穿线后结扎LAD 30 min后,再松开结扎线再灌注120 min,制作I/R模型,假手术组及I/R组造模前30 min静脉注射生理盐水(2 mL/kg),其余3组注射加兰他敏(4 mg/kg),联合A组在造模前45 min还注射阿托品(4 mg/kg)、联合B组在造模前45 min还切断两侧迷走神经;5组大鼠再灌注120 min后,测定大鼠血清CK-MB活性及TNF- α 、IL-6水平,取心肌组织进行HE染色,光镜下观察心肌结构。结果:与假手术组比较,I/R组CK-MB活性、TNF- α 及IL-6水平升高($P < 0.05$),提示造模成功;与I/R组比较,加兰他敏组CK-MB活性、TNF- α 和IL-6水平降低($P < 0.05$);与加兰他敏组比较,联合A组及联合B组CK-MB活性、TNF- α 和IL-6水平升高($P < 0.05$);400 \times 光镜视野下见假手术组心肌纤维排列整齐,I/R组心肌结构紊乱,可见细胞坏死和炎性细胞浸润,加兰他敏组心肌纤维排列较整齐,仅见水肿和少许炎性浸润,联合A组及联合B组心肌细胞排列紊乱,心肌水肿,组织间隙有炎性细胞浸润。结论:加兰他敏可能通过胆碱能抗炎通路减少炎性因子的产生,从而减轻心肌MIRI。

[关键词] 加兰他敏; 心肌再灌注损伤; 胆碱能抗炎通路; 细胞因子

[中图分类号] R542.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)03-0280-04

Effects of Galantamine on Serum CK-MB activity, TNF- α Level and IL-6 Level of Rats with Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury

LI Hui, MA Min, XIAN Shuyue, WANG Yanlin

(Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of galantamine on serum CK-MB activity, TNF- α level and IL-6 level of rats with MIRI. **Methods:** Fifty male SD rats were randomly divided into 5 groups ($n = 10$): group A (sham operation), group B (ischemia/reperfusion, I/R), group C (galantamine + I/R), group D (atropine + galantamine + I/R), group E (bilateral cervical vagotomy + galantamine + I/R). The rat ischemia/reperfusion injury model was established by ligation of left anterior coronary descending branch (LAD) for 30 min followed by reperfusion for 120 min. Group A (sham operation), group B (ischemia/reperfusion, I/R) were injected with physiological saline 30 min before model building (2 mL/kg) while other groups were injected with galantamine (4 mg/kg). Group D was injected with atropine 45 min before model building (4 mg/kg) besides galantamine injection and in group E bilateral cervical vagotomy of rats were cut off besides galantamine injection. 120 min after reperfusion, serum CK-MB activity, TNF- α and IL-6 level were measured. The myocardial tissue was

*[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金、武汉大学自主科研资助(No. 410500181)

**通信作者 E-mail: wyl0342@sina.com

网络出版时间: 2016-03-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160317.1051.042.html>

collected to make HE staining, and the myocardial structure was observed under optical microscope.

Results: Compared with group A (sham operation), the serum CK-MB activity, serum levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased in group B(I/R), $P < 0.05$, suggesting that I/R model was successfully constructed. Compared with group B(I/R), the serum CK-MB activity, serum levels of TNF- α and IL-6 in group C (galantamine + I/R) were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group C (galantamine + I/R), the serum CK-MB activity, serum levels of TNF- α and IL-6 in group D (atropine + galantamine + I/R) and group E (bilateral cervical vagotomy + galantamine + I/R) were increased significantly ($P < 0.05$). Under $400 \times$ optical microscope, cardiac muscle fibers arranged neatly in group A (sham operation) while myocardial structure was in disorder, and meronecrobiosis and inflammatory cell infiltration could be seen in group B(I/R). In group C (galantamine + I/R), cardiac muscle fibers arranged neatly, and hydroncus and inflammatory cell infiltration could be seen to some extent while in group D and group E myocardial structure was in disorder, and myocardial edema and inflammatory cell infiltration in interstitial space could be seen. **Conclusion:** Galantamine may attenuate the myocardial I/R injury by inhibiting the production of inflammatory cytokines through cholinergic anti-inflammatory pathway.

[**Key words**] galantamine; myocardial reperfusion injury; cholinergic anti-inflammatory pathway; cytokines

心肌缺血再灌注损伤(Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury, MIRI)是阻碍缺血心肌得到有效治疗的难题。加兰他敏是一种胆碱酯酶抑制剂,对脓毒症有治疗作用,其机制可能是作用于以迷走神经及其递质乙酰胆碱为核心的胆碱能抗炎通路(Cholinergic anti-inflammatory pathway),从而产生抗炎效应^[1]。心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)过程有典型的炎症反应表现^[2],本研究探讨加兰他敏对心肌 I/R 过程中炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 动物选择、分组及处理

50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 225 ~ 275 g (湖北省武汉大学动物实验中心提供),随机均分为假手术组、I/R 组、加兰他敏组、联合 A 组及联合 B 组。I/R 组、加兰他敏组、联合 A 组及联合 B 组均穿线结扎大鼠左冠状动脉前降支(LAD)30 min 后,松开结扎线再灌注 120 min 制作 I/R 模型,假手术组仅丝线从 LAD 下方穿过但不结扎;假手术组、I/R 组在造模前 30 min 经大鼠股静脉缓慢注射生理盐水(2 mL/kg),加兰他敏组注射加兰他敏(4 mg/kg),联合 A 组和联合 B 组按加兰他敏组处理外,造模前 45 min 联合 A 组给予阿托品 4 mg/kg、联合 B 组切断双侧颈迷走神经。

1.2 制作 I/R 模型

SD 大鼠称重,以 1% 戊巴比妥钠按 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,将大鼠仰卧位固定于手术台,颈前正中切口行气管切开,插自制气管导管,接 DW-2000 型动物人工呼吸机(上海嘉鹏科技有限公司)行机械通气,潮气量 20 mL/kg,呼吸频率 60 次/min。连续监测大鼠标准 II 导联心电图。股静脉穿刺置管,用于给药及补液。于大鼠胸骨左缘第 3 ~ 4 肋间开胸,暴露心脏,剪开心包膜,在 LAD 距左心耳下缘约 2 mm 处穿线,平衡 15 min 后,活结结扎阻断 LAD 血流,30 min 后松开结扎线再灌注 120 min。以结扎后心电图 ST 段明显上抬,结扎线远端心肌颜色先变白后变暗判为心肌缺血;以再灌注后缺血区心肌变红、抬高的 S-T 段回落和 QRS 波振幅逐渐降低判为再灌注成功。

1.3 检测指标

大鼠再灌注 120 min 时处死大鼠,取大鼠静脉血 2 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min 离心收集血清,按试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书检测肌酸激酶(CK-MB)活性,按 ELISA 试剂盒(R&D 公司)说明书检测大鼠血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)的水平;取大鼠心肌组织包埋切片 HE 染色,400 \times 光镜下观察各组心肌组织结构。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量资料

以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与假手术组比较,I/R 组 CK-MB 活性和 TNF- α 、IL-6 水平升高($P < 0.05$),证实造模成功;与 I/R 组比较,加兰他敏组 CK-MB 活性、TNF- α 及 IL-6 水平降低($P < 0.05$);与加兰他敏组比较,联合 A 组及联合 B 组 CK-MB 活性、TNF- α 及 IL-6 水平升高($P < 0.05$),见表 1。光镜下观察心肌组织结构发现假手术组心肌排列整齐,I/R 组心肌排列紊乱、心肌水肿、可见心肌坏死融解,炎性细胞浸润;加兰他敏组心肌排列较整齐,有组织水肿,但未见心肌坏死,炎性细胞浸润轻;联合 A 组及联合 B 组

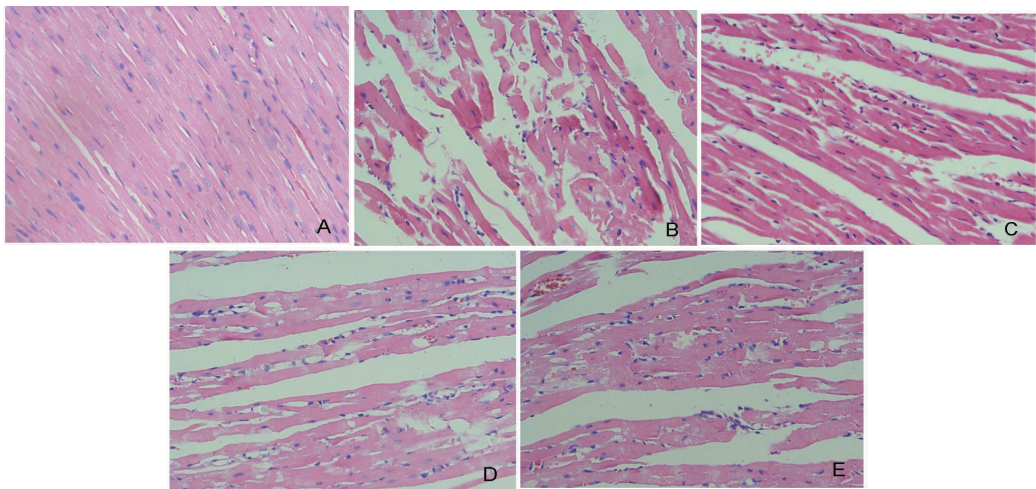
心肌细胞排列紊乱,心肌水肿,组织间隙有炎性细胞及血细胞浸润。见图 1。

表 1 各组大鼠血清 CK-MB 活性和 TNF- α 、IL-6 水平($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The serum CK-MB activity, serum levels of TNF- α and IL-6 in each group

组别	血清		
	CK-MB(U/L)	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)
假手术组	1 008 ± 160	17 ± 4	53 ± 10
I/R 组	2 118 ± 249 ⁽¹⁾	41 ± 5 ⁽¹⁾	316 ± 37 ⁽¹⁾
加兰他敏组	1 316 ± 119 ⁽¹⁾⁽²⁾	25 ± 1 ⁽¹⁾⁽²⁾	164 ± 16 ⁽¹⁾⁽²⁾
联合 A 组	2 086 ± 208 ⁽¹⁾⁽³⁾	40 ± 3 ⁽¹⁾⁽³⁾	297 ± 22 ⁽¹⁾⁽³⁾
联合 B 组	2 240 ± 231 ⁽¹⁾⁽³⁾	41 ± 4 ⁽¹⁾⁽³⁾	362 ± 25 ⁽¹⁾⁽³⁾

⁽¹⁾与假手术组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与 I/R 组比较, $P < 0.05$; ⁽³⁾与加兰他敏组比较, $P < 0.05$



注:A 为假手术组,B 为 I/R 组,C 为加兰他敏组,D 为联合 A 组,E 为联合 B 组

图 1 各组大鼠心肌组织结构(HE, ×400)

Fig. 1 The cardiac muscle fiber structure in each group

3 讨论

加兰他敏是一种可以透过血脑屏障的胆碱酯酶抑制剂,临床用于治疗阿尔茨海默病,可以通过中枢毒蕈碱胆碱能受体激活胆碱能抗炎通路,降低内毒素血症时促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 等的水平^[1]。炎症在心肌 MIRI 的发生发展中起着重要的作用,使用抗炎疗法可以减轻心肌 MIRI^[2-3]。近年来发现的胆碱能抗炎通路是一条通过迷走神经及其递质乙酰胆碱为主的胆碱能系统,可通过神经系统直接调控机体的免疫系统^[4]。与传统的体

液抗炎通路相比,胆碱能抗炎通路具有作用范围广泛灵敏、调控迅速的特点^[5-6]。有研究报道,使用电刺激迷走神经或者药物激活胆碱能抗炎通路可以降低感染性休克、风湿性关节炎和 MIRI 中血清及组织促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的水平,对组织器官产生保护作用^[5,7-8]。TNF- α 是心肌 MIRI 机制中的关键细胞因子,不仅有直接的细胞毒性作用和心肌抑制作用,还可以通过启动其他促炎性细胞因子如 IL-1 和 IL6 的产生和释放,触发血小板激活等途径损害心肌功能,促进心肌 MIRI,减少 TNF- α 产生可以减轻心肌 MIRI^[9-12]。本研究中,与假手术组比较,I/R 组大鼠心肌结构破坏严

重,CK-MB 增高, TNF- α 和 IL-6 水平升高,证明 I/R 模型复制成功。使用加兰他敏预处理 I/R 模型大鼠后,与假手术组比较,大鼠心肌结构损伤减轻,血清 CK-MB 活性和 TNF- α 、IL-6 水平明显降低($P < 0.05$),说明加兰他敏可通过降低促炎性细胞因子水平,对心肌 MIRI 大鼠的心肌起到保护作用。而与加兰他敏组比较,联合 A 组和联合 B 组 CK-MB 活性、TNF- α 及 IL-6 水平升高($P < 0.05$),说明阿托品或者切断迷走神经可以消减加兰他敏对心肌 MIRI 大鼠的心肌保护作用,提示加兰他敏的保护作用与迷走神经及毒蕈碱型胆碱能受体有关。

综上,加兰他敏可能通过激活胆碱能抗炎通路、减少促炎性细胞因子的产生来减轻心肌 I/R 大鼠的心肌损伤,加兰他敏对治疗心肌 MIRI 起一定的作用。

4 参考文献

- [1] Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, et al. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. Brain Behav Immun, 2009(1):41-45.
 - [2] Lin Y, Chen L, Li W, et al. Role of high-mobility group box-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate [J]. Exp Ther Med, 2015(4):1537-1541.
 - [3] Yang M, Chen J, Zhao J, et al. Etanercept attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by decreasing inflammation and oxidative stress [J]. PLoS One, 2014(9):e108024.
 - [4] Terrando N, Yang T, Ryu JK, et al. Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against neuroinflammation after tibia fracture and endotoxemia in mice [J]. Mol Med, 2015(20):667-675.
 - [5] Tracey KJ. Reflex control of immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2009(6):418-428.
 - [6] 赵文晖,陈军,景桂霞,等. 异丙酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤中 TLR-4、TNF- α 和 NF- κ B 表达及其超微结构的影响 [J]. 西安交通大学学报:医学版, 2014(3):357-360.
 - [7] 孙经武,王艳艳,房灿. 藏红花酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤中炎症反应和细胞凋亡的影响及其机制 [J]. 中国循环杂志, 2015(2):172-175.
 - [8] 徐盟. 心肌缺血再灌注损伤的主要机制与相关药物治疗的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2014(8):1052-1055.
 - [9] 王阳,米树华,贾淑杰,等. 心肌缺血再灌注损伤药物研究现状及进展 [J]. 中国实用内科杂志, 2012(12):958-961.
 - [10] 辛平,朱伟,魏盟. 远端缺血预处理心肌保护效应研究进展 [J]. 中国实用内科杂志, 2010(4):362-363.
 - [11] 张国中,刘增长. 内质网应激与心肌缺血再灌注损伤 [J]. 实用临床医药杂志, 2015(7):170-172.
 - [12] 尉迟海琴,李昌熙,方华. 体外循环中西维来司钠对犬心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2013(9):5-10.
- (2015-12-20 收稿,2016-02-25 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华
-
- (上接第 275 页)
- [7] Lv M, Liu Y, Zhang J, et al. Roles of inflammation response in microglia cell through Toll-like receptors 2/interleukin-23/interleukin-17 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neuroscience, 2011(1):162-172.
 - [8] Mracsko E. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage [J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014(8):388-388.
 - [9] Ning H, Ding SJ, Tao WU. Correlation of free radical level and apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats [J]. Neuroscience Bulletin, 2008(6):351-358.
 - [10] Tanaka J, Maeda N. Microglial Ramification Requires Nondiffusible Factors Derived from Astrocytes [J]. Experimental Neurology, 1996(2):367-375.
 - [11] Ni M, Aschner M. Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications [J]. Current Protocols in Toxicology, 2010(12):1-16.
 - [12] 李锐,郭民侠,李晓青,等. 不同分离纯化法原代培养小胶质细胞的生物学差异 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009(4):366-368.
- (2015-12-08 收稿,2016-02-21 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华