

美托洛尔对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护机制研究*

李 强^{1,2}, 陈海燕¹, 胡厚祥^{1△}, 徐继前¹, 谭春燕¹,
徐 磊¹, 张 双¹, 王 欢¹, 张荣驿¹, 岳荣川¹, 罗 涛¹

(1. 川北医学院附属医院心内科, 四川南充 637000; 2. 重庆市南川区人民医院心内科 408400)

[摘要] **目的** 探讨美托洛尔对心肌缺血再灌注损伤保护作用的机制。**方法** 取健康 3~4 个月雄性 C57BL/6 小鼠 32 只, 分为 4 组($n=8$), 即对照组、美托洛尔组、缺血再灌注组(I/R 组)和美托洛尔+缺血再灌注组(美托洛尔+I/R 组)。检测各组小鼠心肌损伤情况、心肌细胞凋亡率、细胞色素 c(Cyt C)的释放、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)活性及钙蛋白酶(calpain)活性。**结果** 与 I/R 组相比, 美托洛尔预处理后, 显著减少了心肌梗死区与缺血危险区域的比率($P<0.05$), 而心肌缺血危险区域与左心室的比率并无明显变化; 与对照组相比, I/R 组心肌细胞凋亡率、心肌组织 Cyt C 的释放、Caspase-3 活性及 calpain 活性均明显增高($P<0.01$), 美托洛尔预处理能抑制 I/R 损伤引起的上述变化。**结论** 美托洛尔可能通过抑制心肌细胞内 calpain 的活化, 从而抑制心肌细胞凋亡, 最终减轻心肌的 I/R 损伤。

[关键词] 心肌; 心肌缺血; 心肌再灌注; 美托洛尔; 钙蛋白酶; 细胞凋亡**[中图分类号]** R541.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)03-0317-03

Protective effect of metoprolol on ischemia-reperfusion induced myocardial tissue injury in mice*

Li Qiang^{1,2}, Chen Haiyan¹, Hu Houxiang^{1△}, Xu Jiqian¹, Tan Chunyan¹,Xu Lei¹, Zhang Shuang¹, Wang Huan¹, Zhang Rongyi¹, Yue Rongchuan¹, Luo Tao¹

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2. Department of Cardiology, the People's Hospital of Nanchuan, Chongqing 408400, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the possible mechanism of metoprolol on protecting against ischemia-reperfusion induced injury. **Methods** A total of 32 healthy 3-4 months male C57BL/6 mice were divided into four groups($n=8$) as following: Sham-operating group(control group); metoprolol group; ischemia-reperfusion group(I/R group); metoprolol + I/R group. Myocardial injury, apoptosis, cytochrome c release, Caspase-3 activity and calpain activity were determined in these groups. **Results** Although there was no obvious changes in the regions at risk between I/R group and metoprolol + I/R group, metoprolol pretreatment significantly reduced the ratio of the infarct to risk regions($P<0.05$). In the I/R group, the rate of cardiomyocyte apoptosis, cytochrome c release, as well as the activity of Caspase-3 and calpain significantly increased compared to the control group($P<0.01$). However, these effects of I/R injury were alleviated by pretreatment with metoprolol. **Conclusion** metoprolol might protect against ischemia-reperfusion induced injury by preventing calpain activation.

[Key words] myocardium; myocardial ischemia; myocardial reperfusion; metoprolol; calpain; apoptosis

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是因冠状动脉阻塞后心肌细胞死亡引起的,是人类心血管疾病的主要死亡原因。迅速恢复正常的血液供应是减少心肌损伤唯一有效的方法。然而,再灌注本身也可引起心肌的损伤和心脏功能的紊乱,称之为“再灌注损伤”(reperfusion injury)^[1]。因此,减轻心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤是一种治疗缺血性心脏病的重要手段。

美托洛尔是一种 β -受体阻滞剂,大量实验表明, β -受体阻滞剂可以减少心肌梗死面积,减少室颤的发生,改善心室重构,从而保护心脏功能^[2-3]。最近研究表明,美托洛尔可以减轻心肌 I/R 损伤^[4],但其具体机制仍有待进一步阐明。本研究采用结扎/松解小鼠左冠状动脉前降支(LAD)的方法建立心肌 I/R 模型,美托洛尔预处理后,通过检测小鼠心肌损伤情况、心肌细胞凋亡率、细胞色素 c(Cyt C)的释放、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)活性及钙蛋白酶(calpain)活性,以探讨美托洛尔减轻心肌 I/R 损伤的可能机制。

1 材料与方**1.1 材料** 清洁级 3~4 个月雄性 C57BL/6 小鼠(由第三军

医大学实验动物中心提供),饲养于温度和湿度可控制的设施中,给予正常饮水和饮食,正常光照(光照:黑暗=12 h:12 h)。所有的实验操作均符合美国国立卫生研究院颁布的《实验动物管理和使用指南》,实验方案得到第三军医大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 取健康 3~4 个月雄性 C57BL/6 小鼠 32 只,分为 4 组($n=8$)。(1)对照组:每日给予 1 mL 0.9% NaCl(NS)空腹灌胃 1 次,连续 3 d 后行假手术,麻醉开胸后,只穿线,不结扎血管。(2)美托洛尔组:按对照组的方法,NS 中含美托洛尔缓释片(10 mg/kg)。(3)缺血再灌注组(I/R 组):每日给予 1 mL NS 空腹灌胃 1 次,连续 3 d 后,结扎 LAD,缺血 45 min 后,再灌注 3 h。(4)美托洛尔+缺血再灌注组(metoprolol+I/R 组):按 I/R 组的方法,NS 为含美托洛尔的溶液(10 mg/kg)。

1.2.2 心肌 I/R 损伤模型的建立 实验小鼠以 4%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,待小鼠麻醉后,胸前区去毛,仰卧固定于鼠台,行气管插管后连接小动物呼吸机维持通气。胸

前区消毒,于心尖搏动处纵行逐层分离皮肤、肌层,挣开 4~5 肋骨,暴露心脏,剥离心包膜,并以 8-0 丝线在距离左心耳下缘 2 mm 左右处穿过心肌层,在肺动脉圆锥旁出针,在结扎 LAD 时连同一 50 号聚乙烯管 (polyethylene tubing 50, PE 50) 一同结扎,行缺血实验。给予 4 mm H₂O 正压通气,挤出胸腔内空气后关闭胸腔。在缺血 45 min 后,重新打开胸腔,移除 PE 50 管,恢复再灌注 3 h。假手术组以相同方式手术,但不做结扎。

1.2.3 心肌梗死面积的测定 心肌梗死面积的大小由梗死区域与危险区域质量的百分比表示。按照文献[5]方法测定心肌梗死面积。缺血 45 min,再灌注 3 h 后打开胸腔,再次结扎 LAD,自主动脉根部逆行注入 1% 伊文思蓝染料 1 mL 使相应冠状动脉所灌注的心肌着色(而结扎血管远端心肌即缺血危险区不着色)。处死小鼠,取出心脏,分离出左心室,从心尖起横向切成均匀等厚的 4 片薄片,置于 1% 的氯化三苯基四氮哇 (TTC) 磷酸缓冲液中,37 °C 常温孵育 15 min。采用高分辨率解剖显微镜对每片心肌组织进行拍照。使用图像分析系统 (Sigma ScanPro, Ashburn, VA) 对每块染色区域进行定量分析。正常区域(蓝色)、危险区域(红色)和梗死区域(白色)的大小用总体积的质量百分比表示,心肌梗死范围的大小以梗死区质量除以缺血危险区的质量表示。

1.2.4 Cyt C 的测定 胞质 Cyt C 的浓度用 Quantikine 小鼠 Cyt C ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Quantikine, USA) 测定。取梗死区周围心肌组织,匀浆,离心 (1 600 g, 10 min, 4 °C),收集上清液并测量蛋白浓度。加入酶标试剂后,将样本转移到微孔板中,加入抗 Cyt C 抗体,室温下孵育 120 min,之后加入过氧化物酶底物试剂室温孵育 10 min,用稀释好的 HCl 溶液终止反应,最后用酶标仪测量 A450,做标准曲线计算出 Cyt C 的浓度。

1.2.5 Caspase-3 活性测定 按照文献[6]方法用 BIOMOL (Plymouth Meeting, PA) Caspase-3 检测试剂盒 AK-700 来检测细胞 Caspase-3 的活性。取梗死区域周围心肌组织,匀浆,测量蛋白浓度。取 200 μg 样本,加入 Caspase-3 底物 Ac-DEVD-AMC,加或不加抑制剂 Ac-DEVD-CHO,37 °C 孵育 4 h,用酶标仪测荧光强度(激发波 360 nm,发射波 460 nm),Caspase-3 的活性由 μg 每小时 AMC 的水解量来表示。

1.2.6 calpain 活性测定 按照文献[7-8]方法,通过检测 calpain 的特异性荧光底物 N-succinyl-LLVY-AMC (Cedarlane Laboratories) 来测定细胞 calpain 的活性。称取梗死区域周围心肌组织,裂解,匀浆,取上清液并测定蛋白浓度。分别用含钙和无钙检测缓冲液将 SUC-LLVY-AMC 稀释,将稀释好的 SUC-LLVY-AMC 加入样本中,37 °C 孵育 2 h,用酶标仪检测荧光强度(激发波 380 nm,发射波 460 nm)。calpain 的活性用在含钙和无钙检测缓冲液中所测得的荧光强度差异来表示。

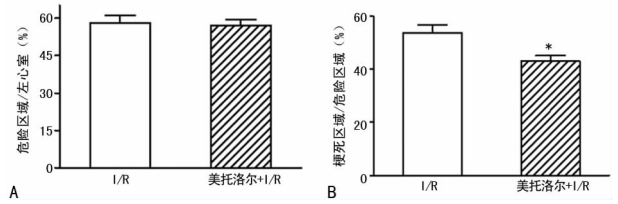
1.2.7 细胞凋亡的检测 采用 TUNEL 法标记凋亡细胞,按照文献[9]方法,使用原位细胞凋亡检测试剂盒 (Roche, Indianapolis, IN) 来定位和定量检测心肌细胞的凋亡。取梗死区域周围心肌组织,用 4% 的多聚甲醛固定,常规石蜡包埋后切成 5 μm 厚的切片,用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法,根据试剂盒说明行心肌组织切片细胞凋亡的原位检测。15 个不同的梗死区域周围的心肌组织使用荧光显微镜在放大 630 倍的视野下计算 TUNEL 阳性核染色的细胞数,激光共聚焦显微镜下采集图片。在双盲的条件下计算出各组 TUNEL 阳性心肌细胞占总细胞数的百分比。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件作统计分

析并作图,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,总体采用 one way ANOVA 分析,多组间差异比较采用 Newman-Keuls 分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

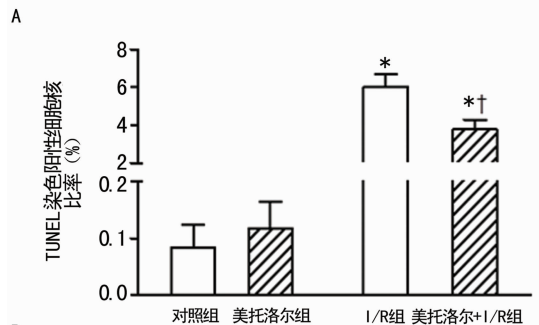
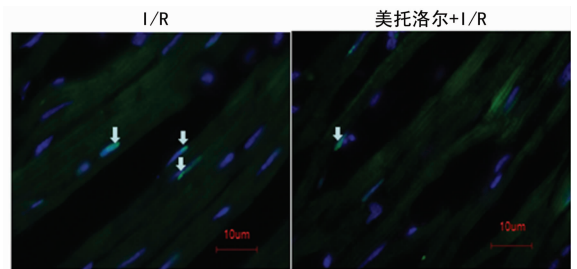
2.1 美托洛尔减轻 I/R 引起的心肌损伤 结扎 LAD 45 min,再灌注 3 h。美托洛尔+I/R 组与 I/R 组相比,虽然心肌缺血危险区域与左心室的质量百分比并无明显变化,但其梗死区域与危险区域质量百分比明显减小 ($P < 0.05$),见图 1。



A: 危险区域与左心室质量百分比; B: 梗死区域与危险区域质量百分比。*: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较。

图 1 美托洛尔对小鼠心肌 I/R 损伤的影响

2.2 美托洛尔减少 I/R 引起的心肌细胞凋亡 与对照组相比,I/R 组 TUNEL 染色阳性细胞核比率显著增高,细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.01$),见图 2。与对照组相比,美托洛尔+I/R 组 TUNEL 染色细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.01$),但与 I/R 组相比,美托洛尔+I/R 组 TUNEL 染色阳性细胞核比率显著降低 ($P < 0.05$)。

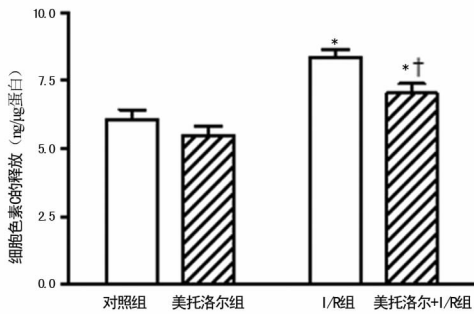


A: 心肌细胞 TUNEL 染色的代表性图片; B: 各组心肌细胞 TUNEL 染色阳性细胞核比率统计图。*: $P < 0.01$, 与对照组比较; †: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较。

图 2 美托洛尔对小鼠心肌 I/R 细胞凋亡的影响

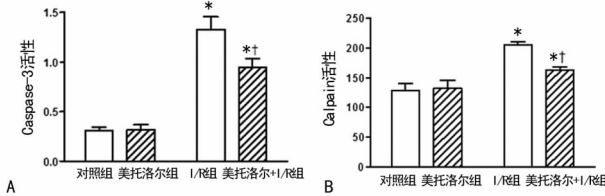
2.3 美托洛尔能抑制 Cyt C 释放 如图 3 所示,与对照组相比,I/R 组小鼠心肌梗死周围区域细胞质 Cyt C 水平显著升高 ($P < 0.01$),经美托洛尔预处理后 Cyt C 水平显著降低 ($P < 0.05$),但仍高于对照组 ($P < 0.01$)。

2.4 Caspase-3 活性及心肌细胞内 calpain 的活化 与对照组相比,I/R 组 Caspase-3 活性明显升高 ($P < 0.01$),美托洛尔+I/R 组则明显低于 I/R 组 ($P < 0.05$),但仍高于对照组 ($P < 0.01$),见图 4A。经 I/R 处理后,小鼠心肌细胞内 calpain 活性显著增高 ($P < 0.01$),美托洛尔预处理后明显抑制了 calpain 活性 ($P < 0.05$),但仍高于对照组 ($P < 0.01$),见图 4B。



*: $P < 0.01$, 与对照组比较; †: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较。

图 3 美托洛尔对 Cyt C 释放的影响



*: $P < 0.01$, 与对照组比较; †: $P < 0.05$, 与 I/R 组比较。

图 4 美托洛尔对 Caspase-3 活性(A) 及 calpain 活性(B)的影响

3 讨论

心血管疾病是人群死亡的主要原因,其中缺血性心脏病占很大的比例。缺血性心脏病是一种常见的具有高发病率和病死率的临床综合征^[10]。经皮冠状动脉介入治疗(PCI)和溶栓治疗能有效地减少心肌梗死面积和改善临床症状,但同时也会引起心机的再灌注损伤及心脏功能紊乱,其潜在机制是很复杂的,目前研究主要集中于 Ca^{2+} 超载、氧化应激、炎症反应及细胞凋亡^[11]。另外,有研究表明,calpain 在心肌 I/R 损伤、线粒体通透性转换及细胞凋亡中发挥重要作用^[12]。过多的 calpain 活化在心肌 I/R 损伤的线粒体损伤和氧化磷酸化中起重要作用。此外,使用 calpain 抑制剂可抑制 I/R 损伤中凋亡诱导因子(AIF)及 Caspase-3 的释放,从而减少心肌梗死面积和细胞凋亡^[13-14]。

美托洛尔是一种高选择性 β_1 -受体拮抗剂,它广泛使用于AMI和心力衰竭的临床治疗及临床前应用。有研究表明,在家兔心力衰竭模型中,美托洛尔的应用可减轻心室重构、心脏肥大、氧化应激及心肌细胞凋亡^[15]。该研究采用结扎/松解小鼠LAD的方法建立心肌I/R模型,证明美托洛尔能通过抑制Cyt C从线粒体向细胞质中释放及降低Caspase-3活性,从而减轻心肌I/R后细胞凋亡。同时,该研究发现美托洛尔能抑制心肌I/R引起的细胞内calpain活化。表明美托洛尔可能通过减少细胞内calpain的活化,抑制线粒体途径的细胞凋亡通路,减少心肌细胞凋亡,从而发挥对心肌I/R损伤的保护作用。

参考文献

[1] Inafuku H, Kuniyoshi Y, Yamashiro S, et al. Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts[J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 19(3): 186-194.
 [2] Ibanez B, Cimmino G, Prat-Gonzalez S, et al. The cardioprotection granted by metoprolol is restricted to its administration prior to coronary reperfusion[J]. Int J Cardi-

ol, 2011, 147(3): 428-432.
 [3] Zhu BQ, Simonis U, Cecchini G, et al. Comparison of pyrroloquinoline quinone and/or metoprolol on myocardial infarct size and mitochondrial damage in a rat model of ischemia/reperfusion injury[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2006, 11(2): 119-128.
 [4] Zhang Q, Xiang J, Wang X, et al. Beta(2)-adrenoceptor agonist clenbuterol reduces infarct size and myocardial apoptosis after myocardial ischaemia/reperfusion in anaesthetized rats[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(6): 1561-1572.
 [5] Hu H, Xenocostas A, Chin-Yee I, et al. Effects of anemia and blood transfusion in acute myocardial infarction in rats[J]. Transfusion, 2010, 50(1): 243-251.
 [6] Hu H, Xenocostas A, Chin-Yee N, et al. Transfusion of fresh but not old stored blood reduces infarct size and improves cardiac function after acute myocardial infarction in anemic rats[J]. Crit Care Med, 2012, 40(3): 740-746.
 [7] Li Y, Arnold JM, Pampillo M, et al. Taurine prevents cardiomyocyte death by inhibiting NADPH oxidase-mediated calpain activation[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(1): 51-61.
 [8] Hu H, Li X, Li Y, et al. Calpain-1 induces apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells under septic conditions[J]. Microvasc Res, 2009, 78(1): 33-39.
 [9] Xenocostas A, Hu H, Chin-Yee N, et al. Erythropoietin is equally effective as fresh-blood transfusion at reducing infarct size in anemic rats[J]. Crit Care Med, 2010, 38(11): 2215-2221.
 [10] Lauro FV, Francisco DC, Elodia GC, et al. Activity exerted by a testosterone derivative on myocardial injury using an ischemia/reperfusion model[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 217865.
 [11] Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(5): H1723-1741.
 [12] Smith MA, Schnellmann RG. Calpains, mitochondria, and apoptosis[J]. Cardiovasc Res, 2012, 96(1): 32-37.
 [13] Yang Y, Duan W, Zhou J, et al. Protective effects of adenosine on the diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: role of calpain[J]. Med Hypotheses, 2012, 79(4): 462-464.
 [14] Shan L, Li J, Wei M, et al. Disruption of Rac1 signaling reduces ischemia-reperfusion injury in the diabetic heart by inhibiting calpain[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(11): 1804-1814.
 [15] Chang R, Li Y, Yang X, et al. Protective role of deoxy-schizandrin and schisantherin A against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61590.