

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2015.05.004

利多卡因后处理对家兔心肌缺血一再灌注损伤 TNF- α NF- κ B 表达的影响^{*}

王 友 朱苏红 王建礼 林 娜 王保生

(济宁医学院基础学院, 山东 济宁, 272067)

摘 要 目的 研究家兔心肌缺血一再灌注损伤时, 利多卡因后处理对其体内 TNF- α 水平及 NF- κ B 表达的影响。**方法** 18 只家兔随机分为假手术组、缺血一再灌注组和利多卡因组 3 组。结扎家兔心脏的左室支 40min 后解除结扎, 恢复血液供应, 再灌注 2h 后测定各组家兔血浆 TNF- α 的水平, 通过免疫组化染色和免疫印迹方法观察心肌 NF- κ B 的表达情况。**结果** 与缺血一再灌注组比较, 利多卡因组再灌注后血浆 TNF- α 浓度明显降低, 心肌细胞 NF- κ B 的表达显著减少。**结论** 利多卡因可以抑制再灌注心肌炎症反应, 减轻损伤。

关键词 利多卡因; 后处理; 心肌缺血一再灌注损伤; NF- κ B; TNF- α

中图分类号: R363.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2015)10-318-03

The effect of lidocaine post-treatment on TNF- α and NF- κ B in rabbits with myocardial ischemia reperfusion injury

WANG You, ZHU Suhong, WANG Jianli, LIN Na, WANG Baosheng

(School of Basic Sciences, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of lidocaine post-treatment on TNF- α and NF- κ B in rabbits with myocardial ischemia reperfusion injury. **Methods** Eighteen rabbits were randomly divided into 3 groups, sham operation group, ischemic reperfusion group and lidocaine group. The left ventricular branch (LVB) of rabbits was ligated for 40 minutes, then the ligation was removed. After 120 minutes the level of plasma TNF- α was measured, meanwhile the degree of NF- κ B was detected with immunohistochemical staining and Western blot. **Results** Compared with those of ischemic reperfusion group, the concentration of TNF- α was decreased in lidocaine group ($P < 0.01$). The expression of NF- κ B was inhibited by lidocaine too. **Conclusion** The results demonstrated that lidocaine could protect cardiac function, inhibit inflammatory response and attenuate reperfusion injury in ischemic heart.

Keywords: Lidocaine; Post-treatment; Myocardial ischemia reperfusion; NF- κ B; TNF- α

在我国, 缺血性心脏病已成为死亡的首要原因, 在缺血性心脏病的防治中, 经皮腔内冠状动脉成形术、心脏动脉搭桥术及心脏移植等治疗技术广泛的开展使缺血性心脏病得到了有效的防治, 可是术后心肌缺血一再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)的发病率在逐年增高, 减轻 MIRI 已成为缺血性心脏病治疗的重要环节。本文旨在探讨在体情况下, 利多卡因后处理对家兔心肌缺血一再灌注时炎性损伤的抑制作用, 进而减轻 MIRI, 为临床 MIRI 的防治提供新的手段。

1 材料和方法

1.1 材料

实验选用健康的新西兰白兔(本校实验动物中心提供)18 只, 雄性, 体重 2.5~3.0kg; 家兔 TNF- α ELISA 检测试剂盒(R&D 美国); NF- κ B 抗体(武汉博士德); 全自动酶标分析仪(MK3 Thermo, 美国)。

1.2 动物的分组及处理

将 18 只家兔随机分成缺血一再灌注组(IR 组)、利多卡因组(L 组)和假手术组(sham 组)。各组处理方式如下: 1) IR 组: 家兔全身麻醉后, 于颈

* [基金项目] 2008 年济宁医学院青年基金资助项目

部甲状软骨至胸骨上行正中切口,分离气管后行气管插管术连接动物呼吸机(30ml,45 次/min);家兔四肢皮下插入针性电极,实时监测心电图(Ⅱ导联);沿家兔胸骨左缘处纵行切开皮肤(2~5 肋),将肌肉逐层结扎切开分离,暴露肋软骨,仔细分离肋间肌肉,暴露第 3、4 肋骨,剪断肋骨暴露胸腔。小心剪开心包,暴露心脏,以左心耳到心尖连线的中点为结扎点,使用带线缝合针(6-0)结扎左室支,其上放置一段硅胶管(长 15mm,直径 5mm),结扎硅胶管,阻断左室支血流,以心电图示 ST 段明显上抬,作为左室支结扎成功、心肌发生缺血的标准。心肌缺血 40 min 后,耳缘静脉注射生理盐水(0.5ml/kg)后剪去结扎线,以心电图 ST 段回落,表明心肌灌注恢复,再灌注 120 min 后终止实验。2)L 组:手术处理与 IR 组相同,再灌注前耳缘静脉注射利多卡因(5mg/kg,10mg/ml),再灌注 120min 终止实验;3)sham 组:手术处理与 IR 组相同,但只穿线,不结扎,于 40min 时耳缘静脉注射生理盐水(0.5ml/kg),120min 后终止实验。

1.3 血浆中 TNF- α 水平测定

各组家兔再灌注 120min 后,于颈总动脉放血 2ml,置于离心管中,离心 15min(3000r/min,4℃)后取上清,置于-20℃冻存备用。使用家兔 TNF- α ELISA 检测试剂盒检测血浆 TNF- α 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 心肌组织中 NF- κ B 的检测

各组家兔再灌注 120min 后,从左室支结扎点以下横切留取心肌标本,厚度约为 0.4cm,置于 4%多聚甲醛溶液固定;留取心尖组织约 1g,-80℃冻存备用。固定的心肌组织标本进行石蜡包埋,制成约 5 μ m 厚切片行免疫组织化学染色。留取的心尖组织剪碎,加入蛋白裂解液,使用匀浆机匀浆,冰上静置 30min,离心 30min(12000g,4℃),取上清。BCA 法测定蛋白质浓度,取 80 μ g 进行 SDS-PAGE (10%)电泳,Western blot 分析 NF- κ B 的表达。

1.5 统计学方法

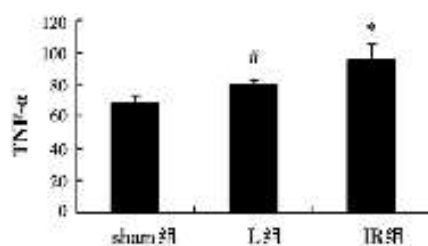
采用 SPSS13.0 统计学软件对实验数据进行统计分析。

2 结果

2.1 各组家兔血浆 TNF- α 的水平比较

再灌注 120min 后,sham 组、IR 组、L 组家兔血浆 TNF- α 水平分别为(68.2 $\pm$ 5.1)、(95.3 $\pm$ 9)、

(80.3 $\pm$ 2.4),后两组 TNF- α 水平明显高于 sham 组($P<0.05$),且 IR 组血浆 TNF- α 水平高于 L 组($P<0.05$)。(见图 1)。

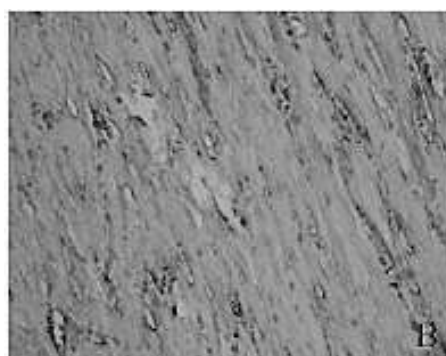


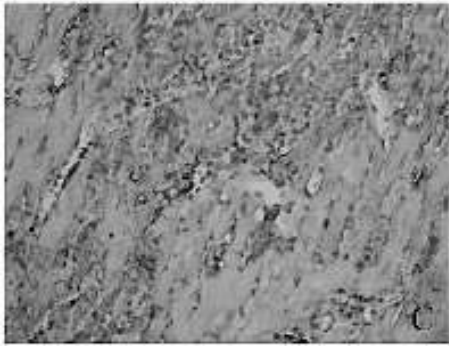
与假手术组比较 * $P<0.01$;与缺血一再灌注组比较 # $P<0.01$

图 1 各组血浆 TNF- α 的水平

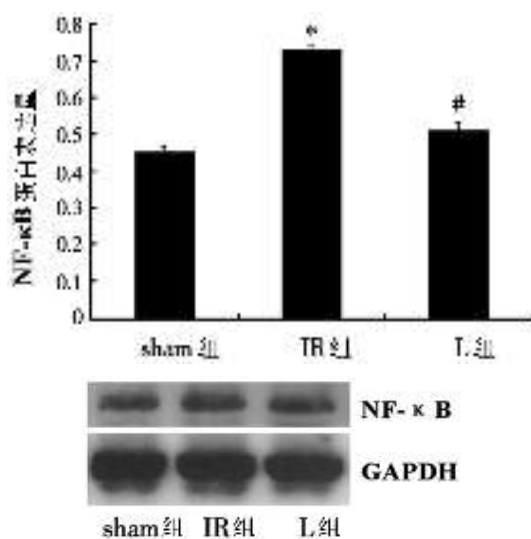
2.2 家兔心肌组织中 NF- κ B 的表达

免疫组化染色可见,sham 组(图 2A)家兔心肌细胞排列正常,无水肿、出血等,除血管内皮细胞有微弱 NF- κ B 表达,其余部位基本不表达。IR 组(图 2B)心肌细胞断裂明显,有大量的单核细胞浸润,损伤严重,细胞内 NF- κ B 呈强阳性(棕黄色)表达。L 组(图 2C)心肌细胞损伤较轻,细胞内阳性表达较弱。Western blot 检测,以 GAPDH 校准后蛋白条带的 IOD 值表示心肌组织 NF- κ B 表达的变化。与 sham 组 NF- κ B 表达量(0.45 $\pm$ 0.018)相比,IR 组(0.73 $\pm$ 0.015)和 L 组(0.5 $\pm$ 0.023)NF- κ B 表达分别增加 61%,13%,与 IR 组比较,L 组表达低 29%。见图 3。





A:假手术组;B:缺血一再灌注组;C:利多卡因组
图2 利多卡因后处理对心肌缺血一再灌注家兔
心肌组织 NF-κB(p50)表达的影响(HE×400)



与假手术组比较 * $P < 0.01$; 与缺血一再灌注组比较 # $P < 0.01$

图3 各组心肌组织中 NF-κB 的表达

3 讨论

MIRI 临床主要表现为心肌舒缩功能降低、心律失常及心肌顿抑等,如何有效的改善 MIRI 已成为临床上治疗缺血性心肌病的重要课题。1986 年, Murry^[1] 首次提出了缺血预处理的概念,即缺血前,反复几次的短暂的“缺血一再灌注”循环处理可以减轻缺血一再灌注损伤,但是缺血预处理在临床上的可操作性不强。2003 年, Zhao^[2] 等发现缺血后处理的方法可有效减轻缺血一再灌注损伤,这为临床上防治缺血一再灌注损伤提供了更具操作性的措施,现已证实缺血后处理和多种药物后处理的方法均可有效减轻缺血一再灌注损伤。心肌缺血一再灌注时,血管内皮细胞、白细胞等被激活,生成、释放大量的炎症因子,介导组织细胞的炎症损伤是 MIRI 的主要发生机制。TNF- α 是体内重要

的炎症因子,可以刺激中性粒细胞激活,促进血管内皮细胞表达黏附分子,使中性粒细胞在缺血心肌组织中聚集,释放蛋白水解酶和活性氧等物质,加重心肌组织损伤^[3]。本文结果显示, MIRI 时,机体血浆中 TNF- α 的表达明显增加,利多卡因后处理可明显的减少 TNF- α 的表达,减轻炎症损伤。

NF- κ B 参与 MIRI 的病理生理过程, NF- κ B 活化后移位入核可能是急性炎症发生发展的最早启动的关键环节。NF- κ B 活化会促进多种炎症介质、黏附分子如 ICAM-1 等基因的表达^[4]。本文结果显示缺血一再灌注组和利多卡因组心肌细胞在缺血一再灌注时, NF- κ B 表达均增加,且与 TNF- α 的表达呈正相关,表明利多卡因后处理可使心肌 NF- κ B 的表达减少,进而减少炎症因子 TNF- α 的表达,减轻 MIRI。

利多卡因在临床上多作为局麻药和抗心律失常药使用,近年来研究发现,利多卡因对多种炎症因子有抑制作用,且已在各种疾病模型中得到证实,其抗炎作用甚至超过了传统的非甾体类抗炎药^[5]。本实验前期研究表明,利多卡因可以有效地减轻家兔心肌缺血一再灌注后的炎症损伤^[6],本文结果显示利多卡因后处理可减少心肌细胞 NF- κ B 的表达及炎症介质 TNF- α 的表达,减轻心肌炎症损伤,对于缺血一再灌注心脏有一定的保护作用。

参考文献:

- [1] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A, et al. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124-1136.
- [2] Zhao Z Q, Corvett J S, Halkos M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic post-conditioning during reperfusion: comparison with ischemic pre-conditioning [J]. Am J Physiol 2003, 285(2): 579-588.
- [3] Balkwill F, Joffroy C. TNF: a tumor-suppressing factor or a tumor-promoting factor? [J]. Future Oncol, 2010, 6(12): 1833-1836.
- [4] Nichols T C. NF-kappaB and reperfusion injury [J]. Drug News Perspect, 2004, 17(2): 99-104.
- [5] Azuma Y, Shinohara M, Wang P L, et al. Comparison of inhibitory effects of local anesthetics on immune functions of neutrophils [J]. Int J Immunopharmacol, 2000, 22(10): 789-796.
- [6] 王友, 王保生, 林丽文, 等. 利多卡因减轻家兔心肌缺血一再灌注炎症损伤的研究 [J]. 济宁医学院学报, 2012, 35(2): 100-103.

(收稿日期 2015-08-17)