

## • 论著 •

纳洛酮对急性缺血-再灌注心肌细胞 Bcl-2 蛋白和肿瘤坏死因子- $\alpha$  表达的影响

汤晓琴 赵建洪 张正义 张煦 宋少莉

**【摘要】目的** 从分子水平探讨纳洛酮对急性心肌缺血-再灌注细胞凋亡和凋亡相关基因 bcl-2 产物 Bcl-2 蛋白表达的影响,及其对心肌的保护作用。**方法** SD 大鼠 30 只,随机分成 3 组,单纯缺血-再灌注组,纳洛酮干预组(缺血前 10 min 及再灌注 2 h 后腹腔注射纳洛酮 0.517 mg/kg)和正常对照组,每组 10 只。实验动物采用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,开胸,打开心包,穿线结扎左冠状动脉前降支再恢复灌注制备大鼠心肌缺血-再灌注模型。用免疫组化法检测心肌组织 Bcl-2 蛋白表达;用放射免疫法测定血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量。**结果** 正常对照组无 Bcl-2 蛋白表达,TNF- $\alpha$  含量为(0.39±0.06) $\mu$ g/L;单纯缺血-再灌注组 Bcl-2 蛋白表达及 TNF- $\alpha$  含量均增加。与单纯缺血-再灌注组比较,纳洛酮干预组 Bcl-2 蛋白表达明显增加(+++ vs. +);TNF- $\alpha$  含量明显降低[(0.55±0.12) $\mu$ g/L 比(0.86±0.11) $\mu$ g/L, $P$ <0.01]。**结论** 纳洛酮预处理可抑制 TNF- $\alpha$  的产生,并通过上调 Bcl-2 蛋白表达,抑制缺血-再灌注后心肌细胞的凋亡,从而保护缺血-再灌注对心肌细胞的损伤。

**【关键词】** 缺血-再灌注损伤; 心肌; 蛋白表达; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; Bcl-2; 纳洛酮

**Effect of naloxone on expression of Bcl-2 protein and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with acute myocardial ischemia/reperfusion injury** TANG Xiao-qin, ZHAO Jian-hong, ZHANG Zheng-yi, ZHANG Xu, SONG Shao-li. Department of Anatomy, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, Gansu, China

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of naloxone on myocardial cell apoptosis and apoptosis-related gene Bcl-2 in rats with acute myocardial ischemia/reperfusion (AMIR) injury, and explore the mechanism of protective effect of naloxone on myocardium. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups ( $n=10$ ): ischemia/reperfusion group, naloxone preconditioning group (naloxone was injected intraperitoneally 10 minutes before ischemia and 2 hours after reperfusion), and normal control group. The left anterior descending branch (LAD) of rat coronary artery was tied and untied in ischemia/reperfusion group and naloxone preconditioning group to establish the AMIR model in rats. The animals were then sacrificed and hearts were harvested. The expression of Bcl-2 protein was observed by immunohistochemical technique. Radioimmunoassay (RIA) was used to determine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in serum. **Results** In the normal control group, there was no Bcl-2 expression and TNF- $\alpha$  level was (0.39±0.06) $\mu$ g/L. Higher expression of Bcl-2 and increased TNF- $\alpha$  levels were found in ischemia/reperfusion group. The expression of Bcl-2 protein increased significantly (+++ vs. +), and TNF- $\alpha$  was significantly lower in naloxone preconditioning group than those in the normal control group [(0.55±0.12) $\mu$ g/L vs. (0.86±0.11) $\mu$ g/L, $P$ <0.01]. **Conclusion** Naloxone can protect myocardium from AMIR injury by inhibiting the apoptosis of cardiomyocytes induced by TNF- $\alpha$  and up-regulating protein expression of bcl-2 gene.

**【Key words】** ischemia/reperfusion injury; myocardium; protein expression; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Bcl-2; naloxone

纳洛酮为阿片受体拮抗剂,能拮抗因应激反应导致体内骤然产生大量阿片肽所引起的各种病理过程,如抑制呼吸系统、神经系统和心血管系统,因此,纳洛酮在临床被广泛用于吸食海洛因过量、酒精中毒等急症<sup>[1-4]</sup>,且用药安全,疗效可靠。自 1982 年 Fagbemi 等<sup>[5]</sup>首次报道纳洛酮对缺血-再灌注心肌

有防治作用后,相继有研究证明纳洛酮对急性心肌梗死(AMI)合并心律失常有较好疗效,可缩小心肌缺血范围、改善血液循环、减轻心脏负担等,国内杨天德等在此方面作了大量工作<sup>[6,7]</sup>。但从分子水平研究纳洛酮对心肌缺血-再灌注后心肌细胞凋亡和凋亡相关基因 bcl-2 产物 Bcl-2 蛋白表达及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量有何影响,至今尚未见中、外文献报道,为此,本研究拟对此作初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:**盐酸纳洛酮(1 ml,0.4 mg,0207152)由

基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(YS-022-A23-26)

作者单位:730000 甘肃,兰州医学院(汤晓琴,张煦);兰州医学院第二附属医院(赵建洪,张正义);第一附属医院(宋少莉)

作者简介:汤晓琴(1961-),女(汉族),甘肃省民乐县人,医学硕士,副教授(E-mail:tangxq@lzu.edu.cn)。

军事医学科学院研制,北京四环医药科技股份有限公司惠赠。Bcl-2 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。TNF- $\alpha$  放射免疫试剂盒由北京东雅生物技术研究所生产(50T)。主要仪器有石蜡切片机(AO-820,美国),心电图机(SB-613D,日本),人工呼吸机(DH-1,浙江大学医学仪器厂)。

**1.2 动物分组及心肌缺血-再灌注模型制备:**30 只 SD 大鼠体重(250±30)g,雌雄不拘,由兰州医学院实验动物中心提供。随机分成 3 组( $n=10$ )。A 组为单纯缺血-再灌注组,B 组为纳洛酮干预组,C 组为正常对照组。B 组于缺血前 10 min 及再灌注 2 h 后腹腔注射纳洛酮 0.517 mg/kg,A 组和 C 组于缺血前 10 min 及再灌注 2 h 后各注射与 B 组同体积的生理盐水。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/100 ml (40 mg/kg)麻醉,仰卧固定于鼠台上,胸骨左侧去毛切开皮肤,切断第 3~5 肋骨暴露心脏,剪开心包,用 0-4 号丝线结扎左冠状动脉前降支,术中用呼吸机维持人工呼吸。心肌缺血 30 min 后,剪断结扎线恢复心肌再灌注 4.5 h,术前、结扎后和再灌注后各描记心电图 1 次,以结扎后 ST 段升高为心肌缺血成功。正常对照组仅穿线而未结扎。

**1.3 Bcl-2 蛋白表达检测:**实验结束后,向大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,开胸,活体取出心脏,用冰生理盐水(4℃)将心脏清洗干净,放入 4 g/L 多聚甲醛中固定 24 h(4℃)后,常规石蜡包埋,于心肌梗死区中部沿左室轴线每隔 1 mm 连续切取数张 5  $\mu$ m 厚的切片,进行 Bcl-2 蛋白表达检测,其步骤严格按试剂盒提供的生物素卵白素过氧化物酶(SABC)法进行免疫组化反应。结果判断:胞浆中有棕黄色颗粒者为阳性表达细胞;无棕黄色颗粒者为阴性表达细胞。镜下无阳性表达细胞者为阴性(-);阳性表达细胞数<1/3 视野者为弱阳性(+);介于 1/3~2/3 视野者为阳性(++);>2/3 视野者为强阳性(+++)。

**1.4 TNF- $\alpha$  测定:**在缺血后 10 min、再灌注 4.5 h 后各采血 2 ml,4℃下 3 000 r/min 离心,取上清,统一时间测定 TNF- $\alpha$  含量。

**1.5 统计学处理:**用 SPSS8.0 软件对实验数据进行统计学处理,结果以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。3 组组内比较用配对样本  $t$  检验,各组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 Bcl-2 蛋白表达:**Bcl-2 蛋白阳性表达细胞主要位于心肌梗死区与非梗死区交界处。A 组有少量

阳性表达细胞(+,彩色插页图 1);B 组有大量阳性表达细胞(+++,彩色插页图 2);C 组无阳性表达细胞(-),彩色插页图 3)。

**2.2 TNF- $\alpha$  含量变化(表 1):**组内比较,A 组差异有显著性( $P<0.01$ )。组间比较,缺血 10 min 时各组差异无显著性( $P>0.05$ );再灌注 4.5 h 时,A 组与 B、C 组比较差异有显著性( $P$  均<0.01),B 组和 C 组比较差异无显著性( $P>0.05$ )。表明血清中 TNF- $\alpha$  含量在 B 组和 C 组中含量较低,而在 A 组中高。

表 1 血清中 TNF- $\alpha$  含量的变化( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	缺血 10 min	再灌注 4.5 h
A 组	0.43±0.05	0.86±0.11 <sup>*</sup>
B 组	0.47±0.03	0.55±0.12 <sup>*</sup>
C 组	0.40±0.08	0.39±0.06 <sup>*</sup>

注:与 A 组比较;<sup>\*</sup> $P<0.01$ ;与本组缺血 10 min 比较;<sup>\*</sup> $P<0.01$

## 3 讨论

传统观念认为急性心肌缺血所致的心肌损伤主要是心肌坏死。目前的研究证明,心肌细胞在长时间缺血或缺血-再灌注后,同时还存在心肌细胞凋亡。凋亡基因和抗凋亡基因的相互作用决定了凋亡的启动或抑制。在与细胞凋亡有关的基因中,bcl-2 是目前公认的促进细胞生存、抑制细胞凋亡的长寿基因,正常情况下,Bcl-2 蛋白在心肌中不表达。本实验中发现,左室梗死与非梗死交界处 Bcl-2 蛋白表达增加。其机制可能为心肌细胞受到缺血损伤时,bcl-2 基因立即启动,诱导 bcl-2 基因产物 Bcl-2 蛋白表达,从而抑制或逆转了细胞凋亡的发生。Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的机制尚不清楚,可能与抗氧化途径、阻止细胞内钙重新分布、直接或间接影响其他死亡信号对细胞的作用以及加速 DNA 修复作用有关。因此,对心肌细胞凋亡机制的研究与干预有可能为缺血性心脏提供一条新的防治途径。纳洛酮对心肌缺血-再灌注损伤有保护作用,可以减轻细胞内钙超载,减少氧自由基的产生等,故推测纳洛酮可能通过上述几种机制减轻或抑制缺血-再灌注心肌细胞的死亡过程而达到保护心肌的作用。

TNF- $\alpha$  在细胞凋亡发生机制中有非常重要的意义,同时它也是一个强有力的促炎细胞因子。在缺血-再灌注心肌中,TNF 不仅直接损害心肌组织,且 TNF/跨膜肿瘤坏死因子受体(transmembrane tumor necrosis factor receptor, mTNFR1)作为细胞因子网络中的一个重要环节,可以诱导产生其他多

种炎性介质,如磷脂酶 A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)、血小板活化因子(PAF)、氧自由基等,进一步造成心肌微循环障碍、缺血、缺氧和弥散性微血管渗漏,致使大量炎性细胞浸润和聚集,并出现心肌细胞的水肿和炎性坏死<sup>[8]</sup>。本实验结果显示,纳洛酮预处理后,TNF- $\alpha$ 明显降低,说明纳洛酮可以通过降低 TNF- $\alpha$  的含量,导致炎性介质释放减少,从而减轻心肌细胞的水肿和坏死,同时也可促进心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达,延长心肌细胞的存活,有效抑制缺血-再灌注所致心肌损伤。同时纳洛酮干预还可使凋亡抑制基因 bcl-2 产物 Bcl-2 蛋白表达明显增强。推测纳洛酮的保护作用可能与以下因素有关:①通过改善心肌血流量,抑制细胞内钙超载和 TNF- $\alpha$  的产生,清除氧自由基,减少中性粒细胞浸入等途径,从而上调 Bcl-2 蛋白并与其发生协同的抗凋亡作用<sup>[9-10]</sup>。②可能通过上调 c-fos、c-jun 等基因的表达,间接上调 bcl-2 基因等晚期基因的表达,从而发挥抗凋亡作用。③纳洛酮还可通过抑制 TNF- $\alpha$  的产生,减轻 TNF- $\alpha$  激活心肌细胞表面 TNFR1,与其结合后诱导 TNFR1 胞浆段的受体反应蛋白,引起一系列反应,最终激活 caspase 而引起的心肌细胞凋亡<sup>[11]</sup>。这从另一个角度说明纳洛酮通过抑制 TNF- $\alpha$  的产生,从而阻止心肌细胞的凋亡。

综上所述:本实验结果说明,纳洛酮可以抑制 TNF- $\alpha$  的产生,促进心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达,抑制心肌细胞的坏死与凋亡,最终达到保护缺血-再灌

注损伤心肌的目的。

#### 参考文献:

- 1 姜志民,查舜.以纳洛酮为主综合抢救急性海洛因中毒 37 例[J].中国危重病急救医学,2000,12:431.
- 2 周裔培,秦放军,石志斌.纳洛酮抢救肺性脑病并多器官功能失常 9 例疗效观察[J].中国危重病急救医学,1999,11:764.
- 3 Liao S L, Chen W Y, Raung S L, et al. Neuroprotection of naloxone against ischemic injury in rats: role of mu receptor antagonism[J]. Neurosci Lett, 2003, 345: 169-172.
- 4 Weber T P, Stypmann J, Meissner A, et al. Naloxone improves functional recovery of myocardial stunning in conscious dogs through its action on the central nervous system [J]. Br J Anaesth, 2001, 86: 545-549.
- 5 Fagbemi D, Lepra H, Parrrt J R. Naloxone inhibit early arrhythmic resulting from acute coronary ligation[J]. Br J Pharmacol, 1982, 75: 504.
- 6 杨天德,刘桥义,王舟琪.纳洛酮对缺血再灌注心肌局部血流量的变化的影响[J].中华麻醉学杂志,1995,15:439-441.
- 7 杨天德,刘桥义,王舟琪.纳洛酮对缺血-再灌注心肌腺苷酸环化酶活性和环磷酸腺苷含量的影响[J].中国危重病急救医学,1996,8:521-522.
- 8 杜成辉,方国恩,陈战,等.跨膜肿瘤坏死因子受体在大鼠多器官功能障碍中的表达及其意义[J].第二军医大学学报,2003,24:73-76.
- 9 杨天德,刘桥义,王舟琪.纳洛酮对缺血再灌注心肌脂质过氧化物和钙含量的影响[J].现代应用药理学,1996,13:3-5.
- 10 杨天德,刘桥义,王舟琪.纳洛酮对缺血再灌注心肌微循环血量及其超微结构变化的影响[J].微循环技术杂志,1997,1:6-8.
- 11 胡野,凌志强,单小云.细胞凋亡的分子医学[M].北京:军事医学科学出版社,2002.230-231.

(收稿日期:2005-03-08 修回日期:2005-06-28)

(本文编辑:李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

### 欢迎订阅 2005 年《中国中西医结合急救杂志》

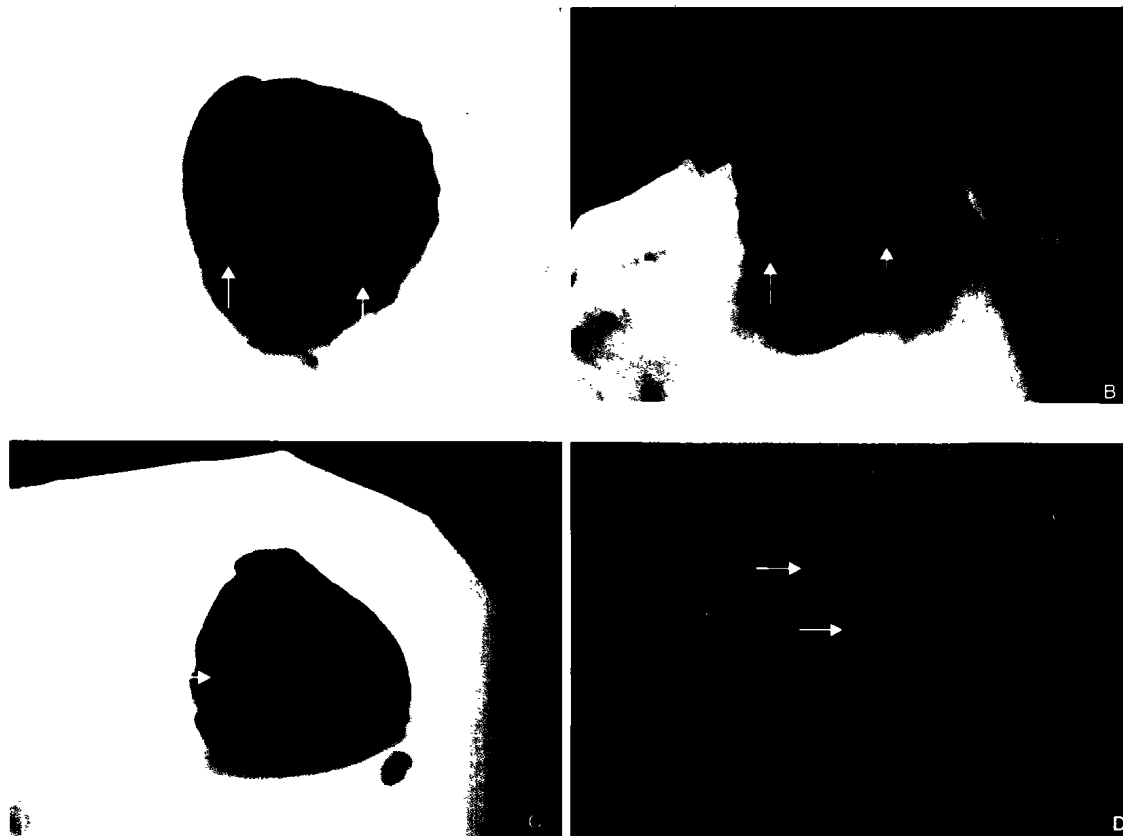
《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一,由《中西医结合实用临床急救》杂志更名),是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊,已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊,64 页,国际通用 16 开大版本,80 克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2005 年的订阅手续,邮发代号:6-93,定价:每期 6.9 元,全年 41.4 元。

《中国中西医结合急救杂志》已经进入俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、“em120.com 危重病急救在线”以及国家中医药管理局“中国传统医药信息网”(http://www.Medicine China.com)。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。

(期刊编辑部)

# 尼可地尔对猪急性心肌梗死再灌注后无再流的影响

(正文见421页)

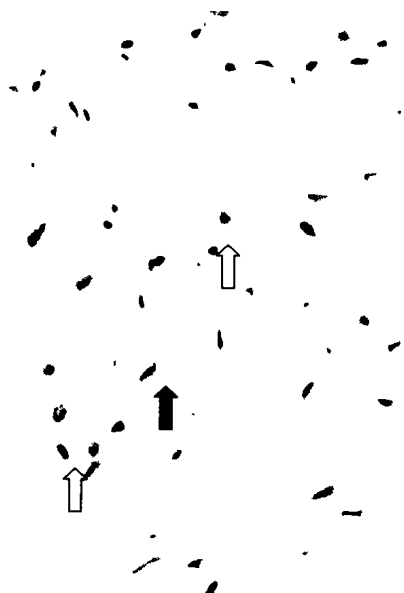


A为对照组，箭头间红色区为AMI结扎区心肌范围；B为对照组，荧光下箭头间黑色区为再灌注后无再流区；C为尼可地尔组，箭头间红色区为AMI结扎区心肌范围；D为尼可地尔组，荧光下箭头间黑色区为再灌注后无再流区

图2 对照组和尼可地尔组病理染色所测AMI结扎区心肌范围  
Figure 2 LA% and ANR% showed by pathological staining in the control and nicorandil groups

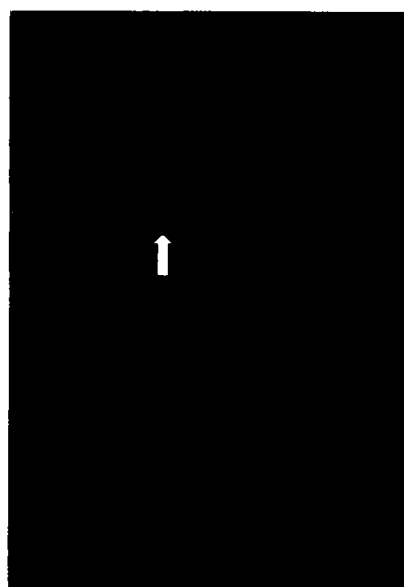
# 纳洛酮对急性缺血-再灌注心肌细胞Bcl-2蛋白和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达的影响

(正文见430页)



$\Rightarrow$ 为阳性表达， $\rightarrow$ 为阴性表达  
图1 A组有一些Bcl-2蛋白表达阳性细胞 (SABC,  $\times 400$ )

Figure 1 Positive expression cells of Bcl-2 protein in group A(SABC,  $\times 400$ )



$\Rightarrow$ 为阳性表达  
图2 B组有大量Bcl-2蛋白表达阳性细胞 (SABC,  $\times 400$ )

Figure 2 Plentiful of positive expression cells of Bcl-2 protein in group B(SABC,  $\times 400$ )



$\rightarrow$ 为阴性表达  
图3 C组无Bcl-2蛋白表达阳性细胞 (SABC,  $\times 400$ )

Figure 3 No positive expression cells of Bcl-2 protein in group C(SABC,  $\times 400$ )