

## • 论著 •

## 山莨菪碱和己酮可可碱对内毒素诱导大鼠心肌组织细胞间黏附分子-1 的抑制作用

孙华 顾建军 李峰 周爱玲 胡亚娥

**【摘要】** 目的 研究山莨菪碱(654-2)和己酮可可碱(PTX)对内毒素诱导大鼠心肌组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的抑制作用。方法 将健康 Wistar 大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、654-2 组、PTX 组和 654-2+PTX 组,每组各时间点 6 只。经尾静脉注射脂多糖(LPS)5 mg/kg 制备动物模型。于术后 0、2、4、6、8 和 10 h 不同时间点分别处死大鼠取心肌组织,采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测心肌组织 ICAM-1 蛋白的表达。结果 注射 LPS 6 h 时大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白的表达明显升高( $P < 0.01$ ),随后 ICAM-1 蛋白的表达逐渐下降,至 10 h 时仍有表达( $P < 0.05$ )。654-2 及 PTX 干预后均可减少心肌组织 ICAM-1 蛋白的表达( $P$  均  $< 0.01$ ),且 654-2 与 PTX 联合使用可使心肌组织 ICAM-1 蛋白的表达减少更显著,与单用 654-2 和 PTX 比较差异均有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。结论 654-2 和 PTX 联合使用可明显抑制内毒素诱导的大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白的表达,从而起到对心肌组织的保护作用。

**【关键词】** 山莨菪碱; 己酮可可碱; 内毒素; 心肌; 细胞间黏附分子-1

**Inhibitory effects of anisodamine and pentoxifylline on the expression of lipopolysaccharide - induced intercellular adhesion molecule - 1 in rat cardiac muscle** SUN Hua\*, GU Jian-jun, LI Feng, ZHOU Ai-ling HU Ya-e. \* Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the inhibitory effects of anisodamine (654-2) and pentoxifylline (PTX) on the expression of lipopolysaccharide (LPS) - induced intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM-1) in rat cardiac muscle in vivo. **Methods** The animals were randomly divided into five groups (each  $n=6$ ): ① normal control group, ② model group, ③ 654-2 treated group, ④ PTX treated group and ⑤ 654-2+PTX treated group. The endotoxemia model was reproduced by intravenous injection LPS 5 mg/kg. The expression of ICAM-1 protein in rat cardiac muscle was assayed by Western blotting at 0, 2, 4, 6, 8, 10 hours after intravenous LPS injection. Then the expression of ICAM-1 protein in different groups was assayed at different time points. **Results** The changes in expression of ICAM-1 in rat cardiac muscle after LPS injection were in a time-dependent pattern, gradually elevating to approach the peak at 6 h, then it lowered, but it still appeared at 10 hours ( $P < 0.05$ ). Western blotting also showed that ICAM-1 protein with decreased with pre-treatment of 654-2 or PTX respectively (both  $P < 0.01$ ). It was reduced to a much lower level when the animals were pretreated with a combination of 654-2 and PTX, compared with the group of 654-2 alone or PTX alone (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The combination of 654-2 and PTX may play a protective role in rat against injury to cardiac muscle induced by LPS in vivo via inhibiting the production of ICAM-1 protein.

**【Key words】** anisodamine; pentoxifylline; lipopolysaccharide; cardiac muscle; intercellular adhesion molecule - 1

内毒素血症是严重烧伤、休克、手术患者的常见并发症,常伴有不同程度的心功能不全,它是感染性休克和多器官功能衰竭(MOF)的重要因素之一,也是影响患者预后的重要因素<sup>[1]</sup>。细胞间黏附分子-1(ICAM-1)是免疫球蛋白超家族的成员之一,存在

于多种细胞表面,与一系列炎症性疾病和状态有关,是炎症过程中的一种关键性黏附分子。ICAM-1在脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等作用下,冠状动脉内皮细胞、心肌细胞 ICAM-1 表达增加<sup>[2]</sup>。文献报道己酮可可碱(PTX)可减少 LPS 诱导心肌细胞 ICAM-1 的表达,通过核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)途径对心肌细胞起保护作用<sup>[3]</sup>。山莨菪碱(654-2)广泛用于抗休克和平滑肌解痉治疗,研究发现 654-2 具有抑制 TNF- $\alpha$ 、白细胞三烯等炎症介质的产生,改善创/烧伤后全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症的作用<sup>[4]</sup>。本研究拟通过制备内毒

基金项目:江苏省南通市社会发展科技计划项目(S30011)

作者单位:226001 南通大学第二附属医院 ICU(孙华,顾建军,李峰);南通大学医学院病理生理实验室(周爱玲,胡亚娥)

作者简介:孙华(1962-),男(汉族),江苏省人,医学硕士,副教授,硕士生导师,主任医师,中国病理生理学会危重病专业委员会委员,研究方向为危重病的循环功能(Email:jsntsh@163.com)。

素大鼠心肌损伤模型,观察其心肌组织 ICAM-1 蛋白表达,以及应用 654-2 和 PTX 干预对心肌组织 ICAM-1 蛋白表达的影响,探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物:**体重 250 g 左右健康 Wistar 大鼠,由南通大学实验动物中心提供。按随机数字表法分组,每组各时间点 6 只。①模型组:尾静脉注射 LPS 5 mg/kg;②对照组:尾静脉注射生理盐水 2 ml/kg;③654-2 组:注射 LPS 的同时予 654-2 10 mg/kg;④PTX 组:注射 LPS 前 1 h,按 60 mg/kg 注射 PTX 进行干预;⑤654-2+PTX 组:注射 LPS 和 654-2 前 1 h,按 60 mg/kg 注射 PTX。于实验 0、2、4、6、8 和 10 h 分别检测各组 ICAM-1 表达。

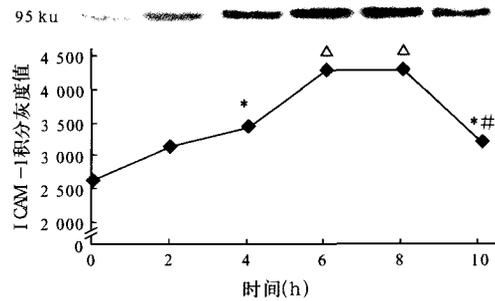
**1.2 观察指标与方法:**于各时间点放血取心肌,采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测。心肌组织中 ICAM-1 蛋白含量取 30 mg 心肌组织,加入 0.5 ml 细胞裂解液[0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 mol/L NaCl, 0.001 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 1 mg/L aprotinin, 100 mg/L phenylmethyl sulfonyl fluoride],冰上匀浆。取小部分样品,采用改良的 Lowry 法进行总蛋白定量;其余样品加入等量 2×十二烷基硫酸钠(SDS)的加样缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 0.2 mol/L dithiothreitol, 质量分数为 4%的 SDS, 0.2%溴酚兰,体积分数为 20%的甘油)。样品在 100 °C 下煮沸 5 min,室温超声粉碎 1 min,室温下 10 000×g 离心 10 min,样品经 7% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶分离,每份样品上样 50 μg 总蛋白,蛋白带全湿法电转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。PVDF 膜室温下用 TTBS(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1%吐温 20)阻断 1 h,室温下用一抗(1:500)孵育 2 h。用 TTBS 洗涤 3 次,每次 10 min,膜用二抗(1:1 500)室温孵育 2 h,用 TTBS 洗涤 3 次,每次 10 min,加入化学发光试剂,暗室中曝光 X 线片,胶片经显影定影,蛋白带用凝胶图像分析仪分析。

**1.3 统计学处理:**实验数据均以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,数据处理采用 Stata 7.0 软件进行 *t* 检验和方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 动物存活情况:**模型组单纯注射 LPS 5 mg/kg 后,有 1 只大鼠于注射 4 h 时死亡,2 只于注射 6 h 时死亡;其余 4 组中均没有大鼠死亡。

**2.2 LPS 诱导心肌组织 ICAM-1 蛋白表达(图 1):**心肌组织静止时仅表达微量的 ICAM-1 蛋白;但注射 LPS 后能明显诱导 ICAM-1 蛋白表达,且呈时间依赖性。与 0 h 比较, LPS 5 mg/kg 作用 2 h, ICAM-1 蛋白的表达已开始升高,6 h 时差异有统计学意义( $P<0.01$ );至 10 h 时 ICAM-1 蛋白表达较 6 h 显著下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

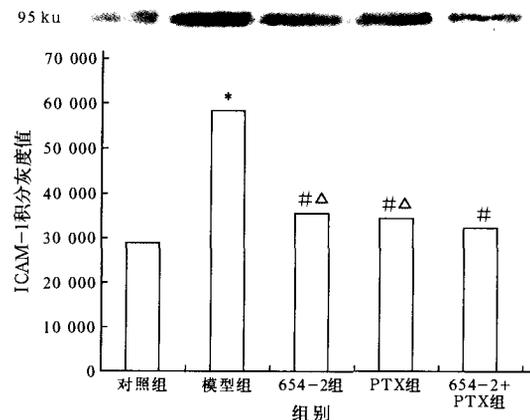


注:与 0 h 比较: \* $P<0.05$ ,  $\Delta P<0.01$ ; 与 6 h 比较: # $P<0.05$

图 1 LPS 诱导大鼠心肌组织不同时间点 ICAM-1 蛋白的表达

Figure 1 Expression of ICAM-1 protein in cardiac muscle of rats induced by LPS at different time points

**2.3 654-2 和 PTX 对 LPS 刺激 6 h 后心肌组织 ICAM-1 蛋白表达的影响(图 2):**对照组大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白表达较微弱;而模型组注射 LPS 6 h 时 ICAM-1 蛋白表达显著增强,与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。用 654-2 和 PTX 干预的大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白表达均较模型组减弱( $P$  均  $<0.01$ );而联合 654-2 和 PTX 干预组大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白表达较单用 654-2 组和 PTX 组均显著减弱( $P$  均  $<0.05$ )。



注:与对照组比较: \* $P<0.01$ ; 与模型组比较:

# $P<0.01$ ; 与 654-2+PTX 组比较:  $\Delta P<0.05$

图 2 654-2 和 PTX 对 LPS 诱导大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of 654-2 and PTX on the expression of ICAM-1 protein in cardiac muscle of rats induced by LPS

### 3 讨论

革兰阴性(G<sup>-</sup>)菌感染在临床感染中占有重要地位,内毒素是其主要毒性物质,也是脓毒症的触发因素及引起炎症反应和休克的关键性介质之一。目前已知,炎症因子如白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、ICAM-1是造成心功能损害的重要介质,而且心肌局部炎症因子的水平似与脏器损害程度有更直接的关系<sup>[5]</sup>。脓毒症患者常出现心肌收缩能力下降等心功能障碍,其严重程度与患者的预后密切相关<sup>[6]</sup>。若不及时治疗可导致类似心力衰竭的临床特征,甚至会进一步恶化为心源性恶病质。因此,有必要深入研究脓毒症对心肌的影响以及有效的干预措施。

ICAM-1是一种细胞表面黏附分子,为单链跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超基因家族,其相对分子质量为76 000~114 000。ICAM-1分布十分广泛,包括各种上皮细胞、血管内皮细胞、心肌细胞、成纤维细胞、单核细胞和淋巴细胞等,其在血管内皮表达最强。在正常动物体内心肌细胞 ICAM-1 呈极低表达<sup>[2]</sup>。ICAM-1 与一系列炎症性疾病和状态如烧伤、休克、感染性休克及其所引发的多器官功能障碍综合征(MODS)有关,其表达受 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )等炎症介质、应激反应、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等的调节,在细胞因子作用下,心肌细胞 ICAM-1 表达增加<sup>[7]</sup>。

PTX 是甲基黄嘌呤衍化物,是一种非选择性磷酸二酯酶抑制剂,能阻断 cAMP 转变为 AMP,使细胞内 cAMP 和 ATP 浓度升高。作为血管扩张剂,曾用于治疗血管性疾病。有人发现其具有显著抗炎、抗免疫作用,对内毒素血症机体产生有益的保护作用,可阻止内毒素引起的发热,并显著提高动物存活率<sup>[8]</sup>。既往有报道 PTX 可减少 LPS 诱导的心肌细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症介质表达;笔者研究也发现 PTX 可减少 LPS 诱导心肌细胞 ICAM-1 的表达,通过 NF- $\kappa$ B 途径抑制 ICAM-1 的表达而对心肌细胞起保护作用<sup>[3]</sup>。

654-2 具有 M 受体的拮抗作用,通过解痉、改善微循环而广泛用于抗休克和平滑肌解痉治疗;进一步研究发现,654-2 具有拮抗钙内流和抗氧化作用,抑制细胞钙超载和生物膜的脂质过氧化,对组织细胞起保护作用;同时,654-2 可抑制炎症介质,如前列腺素、白细胞三烯等产生,因而 654-2 用于抗

休克的同时,也用于各种原因所致的 MODS 并取得良好疗效<sup>[9]</sup>。

在本实验中,静脉注射 LPS 后 2 h ICAM-1 蛋白表达已开始升高,6 h 差异则有统计学意义,而用 654-2 或 PTX 干预的大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白表达较模型组均有所减弱;且联合 654-2 和 PTX 干预的大鼠心肌组织 ICAM-1 蛋白表达较单用 654-2 或 PTX 组更显著减弱。表明 654-2 和 PTX 对内毒素所致的心肌损害均有保护作用,而且联合使用可进一步减少心肌 ICAM-1 蛋白表达。目前尚不知 654-2 与 PTX 在内毒素所致心肌损害的保护过程中是否存在共同的保护机制,但本研究表明,654-2 和 PTX 联合使用可能比单一使用 654-2 或 PTX 对内毒素血症中受损的心肌更有保护作用,说明两者至少存在协同作用。

#### 参考文献:

- Huang Y S, Yang Z C, Yan B G, et al. Pathogenesis of early cardiac myocyte damage after severe burns[J]. J Trauma, 1999, 46(3):428-432.
- Hartman J C, Anderson D C, Wiltse A L, et al. Protection of ischemic/reperfused canine myocardium by CL18/6, a monoclonal antibody to adhesion molecule ICAM-1[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(1):47-54.
- 顾建军,孙华.己酮可可碱对内毒素诱导大鼠心肌细胞间黏附分子-1 表达的影响及其机制[J].中国危重病急救医学,2006,18(2):109-112.
- 孙晓庆,付小兵,晋桦,等.山莨菪碱对烫伤大鼠血浆内毒素及肿瘤坏死因子- $\alpha$  水平的影响[J].中国危重病急救医学,2000,12(2):73-75.
- Kumar A, Thota V, Dee L, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum[J]. J Exp Med, 1996, 183(3):949-958.
- White J, Thomas J, Maass D L, et al. Cardiac effects of burn injury complicated by aspiration pneumonia-induced sepsis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(1):H47-58.
- Hubbard A K, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 expression and cell signaling cascades[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(9):1379-1386.
- Hoebel K H, Gonzalez Ramon N, Nijmeijer S M, et al. Differential effects of pentoxifylline on the hepatic inflammatory response in porcine liver cell cultures increase in inducible nitric oxide synthase expression[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(9):1137-1144.
- 沼兆新,李培英,王培英,等.山羊内毒素休克诱发脂质过氧化作用及 654-2 其影响的研究[J].畜牧兽医学,1998,29(2):179-185.

(收稿日期:2007-01-06 修回日期:2007-09-18)

(本文编辑:李银平)