

强力霉素预处理减轻在体大鼠心肌缺血/再灌注损伤及基质金属蛋白酶-1/9 的表达

吴黎明 范林 陈良龙

【摘要】 目的 观察强力霉素预处理对在体大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤时基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和 MMP-9 表达的影响。**方法** 64 只体重 300~350 g 的健康雄性 SD 大鼠被随机分为假手术组($n=16$)、I/R 组($n=24$)和强力霉素预处理组($n=24$)。分别观察在体大鼠心肌缺血 60 min 再灌注 120 min 后的心肌 I/R 损伤,以及强力霉素预处理对其心功能、血浆肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)水平及心肌组织髓过氧化物酶(MPO)活性的影响;以免疫组化法检测心肌细胞 MMP-1 和 MMP-9 的蛋白表达。**结果** 心肌再灌注 120 min 时,I/R 组左室收缩压(LVSP)、左室压最大上升和下降速率($\pm dp/dt_{max}$)均较假手术组显著下降,左室舒张末压(LVEDP)、血浆 CK 和 LDH 以及心肌组织 MPO 活性均显著升高,且 MMP-1 和 MMP-9 的蛋白表达明显增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。而强力霉素预处理组心功能各项指标以及血浆 CK、LDH 均明显改善,MMP-1 和 MMP-9 的蛋白表达均明显受抑,与 I/R 组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 强力霉素预处理在减轻在体大鼠心肌 I/R 损伤的同时,还可抑制 MMP-1 和 MMP-9 的蛋白表达。

【关键词】 缺血/再灌注损伤; 心肌; 大鼠; 预处理; 强力霉素; 基质金属蛋白酶

Precondition with doxycycline administration abates ischemia/reperfusion injury and reduces the expression of matrix metalloproteinase - 1/9 in myocardium in rat in vivo WU Li-ming, FAN Lin, CHEN Liang-long. Department of Cardiology, The Union Hospital, Fujian Medical University, Fujian Institute of Senile Disease, Fuzhou 350001, Fujian, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of preconditioning with doxycycline on ischemia/reperfusion (I/R) injury and expressions of matrix metalloproteinase - 1 (MMP - 1) and MMP - 9 in myocardium in rat in vivo. **Methods** Sixty - four healthy male SD rats, weighing 300 - 350 g, were randomly divided into three groups: sham operation group ($n=16$), I/R group ($n=24$), and doxycycline preconditioning group ($n=24$). The heart function, plasma level of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH), and the activity of myeloperoxidase (MPO) were respectively determined in rat myocardium after ischemia for 60 minutes and reperfusion for 120 minutes or with the same procedure but with precondition of Doxycycline. Also the expressions of MMP - 1 and MMP - 9 was determined by immunohistochemistry. **Results** In I/R group, left ventricular systolic pressure (LVSP) and the maximum and minimum first derivative of LVSP ($\pm dp/dt_{max}$) were significantly less, and left ventricular enddiastolic pressure (LVEDP), CK, LDH, the activity of MPO, and the protein expressions of MMP - 1 and MMP - 9 were remarkably higher compared with the sham operation group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Heart function was improved, CK, LDH, MPO and the expressions of MMP - 1 and MMP - 9 were reduced obviously by doxycycline preconditioning compared with the I/R group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Precondition with doxycycline could remarkably abate I/R injury of rat myocardium in vivo and inhibit the expressions of MMP - 1 and MMP - 9.

【Key words】 ischemia/reperfusion injury; rat; precondition; doxycycline; matrix metalloproteinase

强力霉素(Doxycycline)作为口服广谱长效四环素类抗生素,具有与内源性组织基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)相似的生物学作用,可以抑制胶原分解,而作为非特异性的 TIMPs 在稳定动脉粥样硬

化斑块中起着重要的作用,并可改善离体大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)的心脏功能^[1-2]。本研究拟观察强力霉素预处理能否在减轻在体大鼠心肌 I/R 损伤时抑制心肌细胞基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和 MMP-9 的蛋白表达,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验分组:健康雄性 SD 大鼠 64 只(福建医科大学动物实验中心提供),体重 300~350 g,按随机数字表法分为假手术组(Sham 组, $n=16$)、I/R 组

基金项目:福建省卫生厅创新课题基金项目(2003-CX-18)

作者单位:350001 福建,福建医科大学附属协和医院心内科,福建省老年病研究所

作者简介:吴黎明(1956-),男(汉族),山东省人,教授,硕士生导师,主任医师。

($n=24$)和强力霉素预处理组($n=24$)。

1.2 动物模型制备:参照文献^[3]方法略加改进制备动物心肌 I/R 损伤模型。以质量分数为 3% 的戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉大鼠,颈正中切口行呼气末正压通气(潮气量 30 ml/kg,呼吸频率 60 次/min),经右颈总动脉插入左心室导管测量心功能参数。于胸骨左侧约 0.5 cm、第 3~5 肋纵行切口开胸,剪开心包,由股静脉注入肝素(500 U/kg)。I/R 组将丝线穿入一管径 2 mm 的聚乙烯管中,稳定 10 min 后收紧丝线,阻断左冠状动脉(冠脉)60 min 后恢复血流 120 min;同时将针形电极插入四肢皮下监测各导联心电图,ST 段抬高 0.2 mV 为心肌缺血标志,ST 段骤降为再灌注成功标志。Sham 组穿线但不收紧线。预处理组于心肌 I/R 前予强力霉素 50 mg/kg 灌胃,每日 2 次,连续灌胃 1 周^[4]。

1.3 观察指标

1.3.1 心功能:用多导生理信号采集系统记录大鼠缺血前和再灌注 120 min 的左室功能,包括左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室压最大上升速率(+dp/dtmax)和左室压最大下降速率(-dp/dtmax)。

1.3.2 血浆肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH):再灌注 120 min 时从股静脉抽取静脉血 1 ml 置于肝素抗凝管中,室温下离心(3 000 r/min,离心半径 17.5 cm)10 min,取血浆并冻存于 -20℃ 低温冰箱中,比色法测定血浆 CK 和 LDH 值,试剂盒由南京建成生物工程研究所生产,操作步骤严格按说明书进行。

1.3.3 心肌组织髓过氧化物酶(MPO)活性:每组随机取 8 只大鼠,于再灌注 120 min 时在大鼠心脏结扎线以下沿心尖至心底垂直方向横切,剪去右室心肌,将剩余心肌组织称重,在心肌组织样品中分别加入 10 倍体积的溴试剂十六烷三甲胺(HTAB)溶液〔溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中,pH 6.0〕进行匀浆,4℃ 下 $12\,000\times g$ 离心 30 min,上清液于 -20℃ 冰箱保存,以 751 分光光度计测定 MPO 活性,以 25℃ 时 1 min 分解 1 μmol H_2O_2 为 1 U 表示,试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

表 1 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠心功能的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effects of doxycycline preconditioning on myocardial function in rats after I/R($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	LVSP(kPa)	LVEDP(kPa)	+dp/dtmax(kPa/s)	-dp/dtmax(kPa/s)
Sham 组	16	19.31 $\pm$ 1.74	0.58 $\pm$ 0.07	758.69 $\pm$ 76.52	526.63 $\pm$ 53.50
I/R 组	24	12.87 $\pm$ 2.25*	1.31 $\pm$ 0.14*	379.75 $\pm$ 51.40*	292.21 $\pm$ 52.62*
预处理组	24	16.29 $\pm$ 1.71* Δ	1.09 $\pm$ 0.13* Δ	529.87 $\pm$ 77.49* Δ	356.58 $\pm$ 43.21* Δ

注:与 Sham 组比较;* $P<0.05$;与 I/R 组比较; $\Delta P<0.01$

1.3.4 心肌组织免疫组化染色:实验结束时自左室活体灌注含肝素的生理盐水及体积分数为 4% 的多聚甲醛冷固定液,取出心脏,在结扎线以下沿心尖到心底垂直方向横切,固定液中固定 18 h 后常规脱水,石蜡包埋,4 μm 连续切片。以链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)法进行免疫组化检测,阳性染色为棕黄色。MMP-1 工作浓度为 1:100, MMP-9 工作浓度为 1:50, 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)溶液按试剂盒说明书配制,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 图像处理及分析:将各组免疫组化切片置于显微镜下放大 200 倍,每张切片随机选择 5 个视野,通过 Motic-image Advance 3.0 计算机图像分析仪于表达阳性区进行半定量分析:测定心肌组织 MMP-1 和 MMP-9 的平均灰度值,其灰度值越高,表达量越少。

1.5 统计学处理:用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理。结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠心功能的影响(表 1):3 组大鼠缺血前心功能指标差异无统计学意义(P 均 >0.05);再灌注 120 min 时 I/R 组大鼠的 LVSP 和 $\pm dp/dtmax$ 明显下降,LVEDP 显著升高,与 Sham 组比较差异有统计学意义(P 均 <0.05)。强力霉素预处理后 LVSP 和 $\pm dp/dtmax$ 下降程度以及 LVEDP 升高程度均小于 I/R 组,差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。

2.2 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠心肌组织 MMP-1、MMP-9 表达的影响(表 2):Sham 组 MMP-1 表达在大鼠冠脉呈弱阳性,而心肌细胞胞质基本无表达(彩色插页图 4A);I/R 组 MMP-1 表达明显增强,并广泛分布于心肌细胞胞质(彩色插页图 4B);强力霉素预处理可减弱 MMP-1 表达(彩色插页图 4C)。MMP-9 在 Sham 组大鼠心肌细胞胞质中呈弱阳性表达(彩色插页图 5A);I/R 组 MMP-9 表达明显增强(彩色插页图 5B);预处理组可抑制 MMP-9 表达(彩色插页图 5C)。

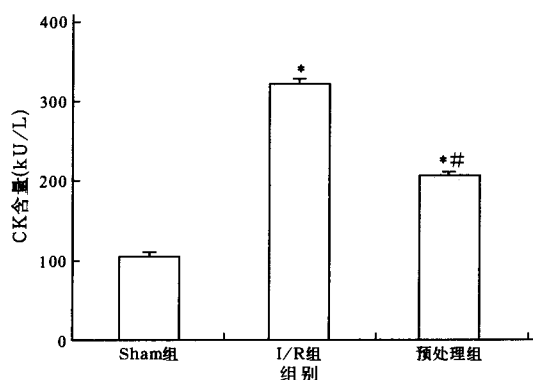
表 2 强力霉素预处理对心肌 I/R 大鼠心肌组织 MMP-1 和 MMP-9 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of doxycycline on the expression of MMP-1 and MMP-9 in myocardium

of rats after I/R($\bar{x} \pm s$)		灰度值	
组别	动物数(只)	MMP-1	MMP-9
Sham 组	8	223.12 ± 14.75	178.25 ± 12.29
I/R 组	8	132.46 ± 9.70*	133.50 ± 14.55*
预处理组	8	157.34 ± 11.25 [△]	161.18 ± 13.68 [△]

注:与 Sham 组比较: * $P < 0.01$; 与 I/R 组比较: $\Delta P < 0.01$

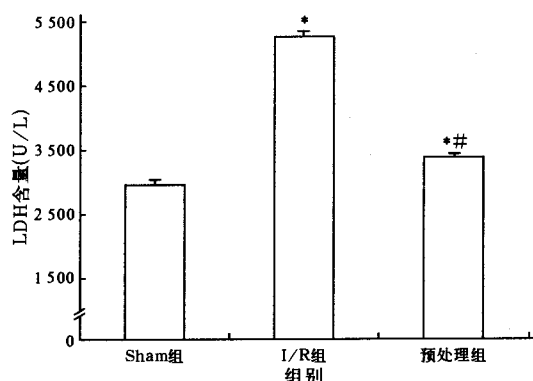
2.3 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠血浆 CK、LDH 的影响(图 1, 图 2): I/R 组血浆 CK、LDH 水平均较 Sham 组明显升高(P 均 < 0.05); 强力霉素预处理后血浆 CK、LDH 水平均较 I/R 组显著降低(P 均 < 0.05)。



注:与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: ** $P < 0.05$

图 1 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠血浆 CK 的影响

Figure 1 Effects of doxycycline on CK in plasma of rats after I/R



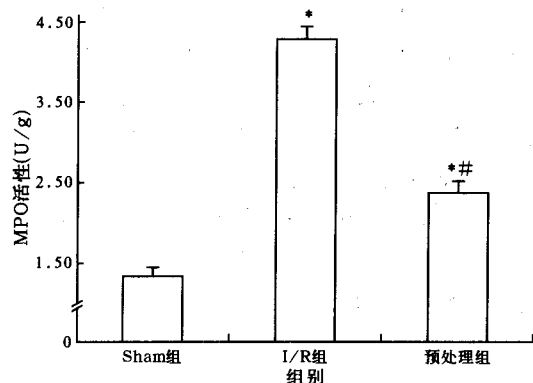
注:与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: ** $P < 0.05$

图 2 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠血浆 LDH 的影响

Figure 2 Effects of doxycycline on LDH in plasma of rats after I/R

2.4 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠心肌组织 MPO 活性的影响(图 3): I/R 损伤致大鼠心肌组织 MPO 活性显著高于 Sham 组($P < 0.05$); 强力霉

素预处理能显著降低 I/R 大鼠心肌组织 MPO 活性($P < 0.05$)。



注:与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: ** $P < 0.05$

图 3 强力霉素预处理对心肌 I/R 损伤大鼠心肌组织中 MPO 活性的影响

Figure 3 Effects of doxycycline on MPO in myocardium of rats after I/R

3 讨论

体内外研究均证明强力霉素为 MMPs 的抑制剂,可抑制 MMPs 活性^[4],因而有别于其他大环内脂类药物,可用于稳定动脉粥样硬化斑块。Brown 等^[5]发现,强力霉素能够稳定斑块,并降低急性冠脉综合征患者致死性心肌梗死的发生率。Cheung 等^[6]发现,强力霉素可改善离体大鼠 I/R 心脏的心功能。本研究结果则显示:与 I/R 组比较,强力霉素预处理可明显改善在体大鼠心功能,缩小 I/R 损伤心肌梗死面积,减少心肌酶学释放,降低 MPO 活性等,提示强力霉素预处理可明显减轻在体大鼠 I/R 心肌损伤的程度。

MMPs 是一类结构同源、以酶原形式分泌、有降解细胞外基质功能的酶家族,具有广谱底物选择性。动脉粥样硬化斑块内的炎性细胞释放 MMP-1 和 MMP-9 等可削弱纤维帽强度,降低斑块稳定性。在肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等细胞因子诱导下,粥样硬化斑块内的平滑肌细胞也可表达 MMP-1 和 MMP-9 等。在离体动物 I/R 模型中, MMPs 的表达和活性均明显升高,说明可能在心肌 I/R 损伤过程中发挥了较重要的作用^[7-8]; Axisa 等^[9]在一项前瞻性、随机、双盲研究中发现,强力霉素组死亡、心肌梗死、脑梗死、颈动脉栓塞等临床终点事件发生率明显低于对照组,且颈动脉斑块中 MMP-1 水平和 MMP-1 mRNA 表达均明显低于对照组。

I/R 损伤可产生大量 IL-1、TNF- α 等,并诱导 MMPs 表达^[10]; 而强力霉素预处理组大鼠 I/R 心

肌的 MMP-9 活性被抑制;强力霉素可抑制 IL-1、TNF- α 处理后角膜上皮细胞 MMP-9 mRNA 表达,并呈量-效关系^[11]。本研究结果提示,强力霉素预处理通过在蛋白水平抑制 MMP-1 和 MMP-9 的表达而减轻在体大鼠心肌细胞损伤,分析其机制可能是强力霉素与 MMPs 的活性中心结合,导致其构象改变,从而非选择性地阻断其活性;或通过干扰 MMPs 活性必需的 Zn²⁺来发挥作用。因此可以推测,强力霉素预处理降低 MMP-1 和 MMP-9 的蛋白表达可能存在 MMP-1 和 MMP-9 转录水平和(或)转录后的调控机制,并与 IL-1、TNF- α 等炎症因子的表达受抑相关;强力霉素预处理对大鼠 I/R 损伤心肌的保护作用机制之一,可能是通过降低 MMP-1 和 MMP-9 的蛋白表达,进而抑制心脏胶原降解实现的。

参考文献:

- 1 Brinckerhoff C E, Matrisian L M. Matrix metalloproteinases, a tail of a frog that became a prince[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002,3(3):207-214.
- 2 Axisa B, Loftus I M, Naylor A R, et al. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques[J]. Stroke, 2002,33(12):2858-2864.
- 3 Curci J A, Mao D, Bohner D G, et al. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patient with abdominal aortic aneurysms[J]. J Vasc Surg, 2000,31(2):325-342.
- 4 Li D, Williams V, Liu L, et al. LOX-1 inhibition in myocardial ischemia-reperfusion injury, modulation of MMP-1 and inflammation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002,283(5):H1795-1801.
- 5 Brown D L, Desai K K, Vakili B A, et al. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subanti microbial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004,24(4):733-738.
- 6 Cheung P Y, Sawicki G, Wozniak M, et al. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart[J]. Circulation, 2000,101(15):1833-1839.
- 7 Roach D M, Fitridge R A, Laws P E, et al. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2002,23(3):260-269.
- 8 Danielsen C C, Wiggers H, Andersen H R. Increased amounts of collagenase and gelatinase porcine myocardium following ischemia and reperfusion[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998,30(7):1431-1442.
- 9 Axisa B, Loftus I M, Naylor A R, et al. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaque[J]. Stroke, 2002,33(12):2858-2864.
- 10 Cawston T E. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown[J]. Pharmacol Ther, 1996,70(3):163-182.
- 11 Li D Q, Lokeshwar B L, Solomon A, et al. Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2001,73(4):449-459.

(收稿日期:2007-01-04 修回日期:2007-09-29)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅《中国危重病急救医学》杂志

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院主办的中华医学会系列杂志,是我国急救医学界权威性学术期刊,为中文核心期刊和中国科技核心期刊。本刊为月刊,每月 10 日出版,国际通用 16 开大版本,内文用 80 克铜版纸印刷,内容丰富,且适合各种病理图片印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2006 年的订阅手续。邮发代号:6-58;定价:8.6 元/期,全年 103.2 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志已进入美国 NLM《MEDLINE》、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》、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”和“em120.com 危重病急救在线”。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。本刊设有各种栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。

2006 年以前的合订本和单行本请在杂志社发行部电话订购:022-23042150。

地址:天津市和平区睦南道 122 号天和医院内;邮编:300050。

(本刊编辑部)

强力霉素预处理减轻在体大鼠心肌缺血/再灌注损伤及基质金属蛋白酶-1/9的表达

(正文见679页)



A: Sham组; B: I/R组; C: 预处理组

图4 各组心肌I/R损伤大鼠心肌组织MMP-1蛋白阳性表达 (免疫组化, ×40)
Figure 4 Positive expression of MMP-1 in myocardium of rats after I/R in each group(immunohistochemistry, ×40)

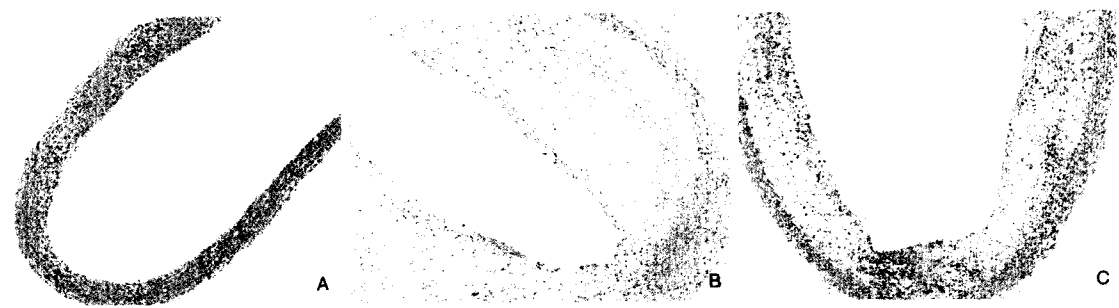


A: Sham组; B: I/R组; C: 预处理组

图5 各组心肌I/R损伤大鼠心肌组织MMP-9蛋白阳性表达 (免疫组化, ×40)
Figure 5 Positive expression of MMP-9 in myocardium of rats after I/R in each group(immunohistochemistry, ×40)

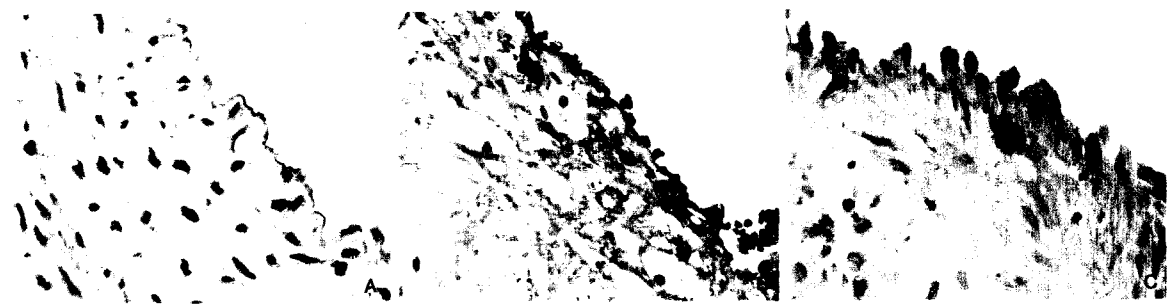
缬沙坦对兔动脉成形术后血管内膜增生及内皮细胞血管性假血友病因子表达的影响

(正文见695页)



A: 对照组; B: 模型组; C: 缬沙坦组

图1 各组兔腹主动脉组织形态学观察(HE, ×40)
Figure 1 Pathologic and morphologic analysis of abdominal aorta of rabbits in each group(HE, ×40)



A: 对照组; B: 模型组; C: 缬沙坦组

图2 各组兔内皮细胞vWF阳性表达(SP, ×400)
Figure 2 Positive expression of vWF of endothelial cell of rabbits in each group(SP, ×400)

641: m