文章编号:1000-5404(2007)02-0129-05

论著

蛋白酶体抑制剂MG-132下调炎症因子表达抑制大鼠心肌再灌注损伤

戴翠莲,罗开良 (重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

提 要:目的 研究蛋白酶体抑制剂MG-132对大鼠缺血再灌注心肌组织中炎症因子的影响。**方法** 选择92只SD大鼠结扎左冠状动脉前降支30 min制作心肌缺血再灌注模型。治疗(I/R+T)组及假手术+治疗(Sham+T)组于再灌注前5 min静脉注射蛋白酶体抑制剂MG-132 0.75 mg/kg,对照(I/R)组及假手术(Sham)组注射与之相同容积的生理盐水。观察I/R组和I/R+T组再灌注0、1、2、6、24 h心肌组织超微结构变化,核因子-κBp65(NF-κBp65)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的mRNA和蛋白质水平,嗜中性白细胞(PMN)计数,髓过氧化物酶活(MPO)性以及各组存活率。**结果** 与Sham组及Sham+T组相比,I/R组的NF-κBp65、TNF-α水平,PMN计数,MPO活性均显著增加($P<0.05$)。I/R组中1、2、6、24 h组的上述各项炎性指标比0 h组显著增高($P<0.05$);电镜下观察可见缺血再灌注组弥漫性心肌细胞肿胀、大量肌丝溶解,线粒体肿胀空化。与I/R组相比,I/R+T组心肌细胞损伤程度大大减轻,并显著抑制了炎症因子的表达、嗜中性白细胞的浸润及MPO活性($P<0.05$),作用至少维持24 h,并使因心律失常死亡减少。**结论** MG-132通过降低缺血再灌注心肌组织中炎症因子的表达,抑制了再灌注损伤。

关键词: 再灌注;蛋白酶体抑制剂;炎症因子;PMN;MPO
中图法分类号: R392.1;R654.1;R654.2 **文献标识码:** A

Proteasome inhibitor MG-132 inhibits myocardial reperfusion injury in rats by suppressing expression of inflammatory factors

DAI Cui-lian, LUO Kai-liang (Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of proteasome inhibitor MG-132 on inflammatory factors in rat model of myocardial ischemia/reperfusion. **Methods** Adult Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups. I/R group: left anterior descending (LAD) coronary artery was ligated for 30 min, and then reperfused for 0, 1, 2, 6, 24 h; I/R+T group: MG-132 was used for treatment, and other procedures as I/R group; Sham operation group; Sham operation+T group. At 5 min before reperfusion, MG-132 (0.75 mg/kg) was given intravenously in I/R+T group and Sham operation+T group, and normal saline for I/R group and sham operation group. The changes of myocardial ultrastructure were checked, and the protein and mRNA levels of NF-κBp65 and TNF-α, the number of PMN, the activity of MPO and survival of each group were detected. **Results** As compared with Sham operation group and Sham operation+T group, the protein and mRNA levels of NF-κBp65 and TNF-α, the number of polymorphonuclear leucocytes (PMN) and the activity of myeloperoxidase (MPO) were significantly increased in I/R group ($P<0.05$), and these indexes were significantly higher at 1, 2, 6, 24 h after reperfusion than that at 0 h ($P<0.05$). The cardiocytes diffused and swelled, the myofilament was lysed, and the mitochondria swelled and vacuolizated. The above-mentioned inflammatory factors of I/R+T group were significantly decreased as compared with I/R group ($P<0.05$), and could keep at a low level at least for 24 h. The damaged degree of cardiocytes in I/R+T group was less and the mortality due to deadly arrhythmia was lower than that of I/R group. **Conclusion** Myocardial reperfusion injury can be inhibited by proteasome inhibitor MG-132 through suppressing the expression of inflammatory factor in rats.

Key words: reperfusion; proteasome inhibitor; inflammatory factor; polymorphonuclear leucocyte; myeloperoxidase

作者简介:戴翠莲(1966-),女,新疆维吾尔族自治区乌鲁木齐市人,博士,副主任医师,主要从事急性心肌缺血再灌注损伤方面的研究,现在遵义医学院附属医院心血管内科工作。电话:13193228593,E-mail: dai_cui_lian@yahoo.com.cn
通讯作者:罗开良,电话:(023)66737128
收稿日期:2006-02-21;修回日期:2006-05-29

对梗死相关血管迅速而有效地开通，极大地提高了急性心肌梗死的抢救成功率，并改善了患者的预后。但再灌注损伤成为阻碍缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效的主要难题。如何减轻再灌注损伤成为医学界的新挑战。近年来，随着对泛素-蛋白酶体系统（ubiquitin proteasome system，UPS）维持机体生理功能重要性的深入认识，越来越重视其在炎症性疾病中的作用。本研究观察了蛋白酶体抑制剂 MG-132 对抑制缺血再灌注心肌组织中炎症因子表达的影响，为冠脉再通后心肌缺血再灌注损伤的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立和实验分组

动物模型建立参照王淑侠等[1]的方法并加以改进。同窝出生的成熟 SD 大鼠 92 只，体质量（220±50）g，雌雄各半（重庆医科大学实验动物中心提供）。以 3.5% 水合氯醛（10 ml/kg）腹腔注射麻醉后将大鼠接心电图机，气管插管后接小动物呼吸机（浙江医科大学生产）。于胸骨左缘 0.5 cm 切开皮下组织，剪断第 3、4 肋骨，暴露胸腔，于左冠状动脉前降支（LAD）发出 2 mm 处穿线，打活结以阻断其血流 30 min，造成急性心肌梗死后，松开结扎线，形成再灌注。以心电图改变及心肌颜色变化作为心肌梗死/再灌注模型成功的标志。

根据缺血/再灌注的时间和是否给予 MG-132 进行干预，按随机数字表法将大鼠随机分为缺血/再灌注（I/R）组：阻断 LAD 30 min 后再灌注；缺血/再灌注 + MG-132（I/R + T）组：阻断 LAD 30 min 后再灌注，于 25 min 时股静脉注入 MG-132（Calbiochem 公司，0.75 mg/kg，溶于 2 ml 二甲基亚砜中），5 min 推注完；假手术（Sham）组：手术过程相同，但只穿线不打结，再观察 2 h；假手术 + MG-132（Sham + T）组：假手术过程及时间计算同 Sham 组，于假手术 25 min 后股静脉注入 MG-132，剂量和方法同 I/R + T 组。I/R组和 I/R + T 组又分为再灌注 0、1、2、6 和 24 h 5 个亚组（每个亚组 8 只），假手术组和假手术 + T 组各 6 只。除 I/R + T 组及 Sham + T 组外，其余各组均于前述注射 MG-132 相同的时间点于股静脉注入 2 ml 生理盐水，5 min 推注完作为对照。

1.2 采集标本

在完成前述的实验步骤后立即于腹腔内注入致死量的水合氯醛，心脏停跳前摘取心脏，Sham 组和 Sham + T 组均于再灌注后 2 h 处死动物并摘取心脏。迅速分离出左心室，取再灌注 2、6、24 h 的梗死周围心肌组织，切 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织数块，用于电镜检查，余左室心肌组织沿长轴横切成 2 mm 的薄片。各组取一片心肌组织制作石蜡包埋切片，用于免疫组化、HE（苏木精和伊红）染色，其余组织 −70 ℃保存。

1.3 透射电镜

将用于电镜检查的组织在 1 min 内置于 2.5% 戊二醛前固定，1% 锇酸后固定，丙酮逐级脱水，环氧树脂 Epon812 包埋，LKBⅢ型超薄切片机切片，1% 醋酸双氧铀及枸橼酸铅双重染色，JEM-1200EX 型透射电镜观察。

1.4 HE 染色

在每一张 HE 染色切片心肌梗死周围区随机选择 5 个高倍视野（×400），计数嗜中性白细胞（PMN），取其平均值。

1.5 髓过氧化物酶（MPO）活性检测

由于嗜中性白细胞中存在有髓过氧化物酶，该酶具有使过氧化氢还原的能力，因此当其与供氢体邻连茴香胺作用时生成黄色化合物，在 460 nm 处通过比色测定此产物的生成量，就能够推算出 MPO 的活力并间接代表白细胞数目。本实验将各组取一片心肌组织，准确称质量后制备 5% 的心肌组织匀浆，按 MPO 试剂盒（购于南京建成生物公司）说明操作，在 460 nm 处测对照管和实验管的光密度值［$D(460)$］，计算 MPO 活力。MPO 试剂盒计算公式如下：

$$\text{MPO（单位/克湿片）} = \frac{\text{实验管光密度值} - \text{对照管光密度值}}{11.3 \times \text{取样量(g)}}$$

1.6 NF-κB p65 及 TNF-α 的蛋白质表达

用免疫组化 S-P 法（S-P 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司；兔抗大鼠 NF-κBp65 IgG、山羊抗大鼠 TNF-α IgG 为 Santa Cruz 公司产品）观察心肌细胞 NF-κB p65 及 TNF-α 的蛋白质表达情况。

1.6.1 NF-κB p65 蛋白质半定量分析　石蜡包埋切片脱蜡，梯度酒精浸泡，PBS 冲洗，5% 山羊血清封闭后，兔抗大鼠 NF-κBp65 IgG（一抗，1∶100 稀释）孵育 4 ℃过夜。次日分别滴加生物素标记山羊抗兔 IgG（二抗）和辣根酶标记链霉卵白素，DAB 显色，苏木精复染，封片，拍照。高倍镜下（×400）观察 NF-κBp65 蛋白质表达情况，半定量分析方法参照 Wang 等[2]所述，以心肌细胞核中出现棕色颗粒为阳性细胞，计算阳性指数（PI），PI = 阳性细胞数/视野内总细胞数 × 100%。每片观察 5 个高倍视野，取其平均值。

1.6.2 TNF-α 蛋白质半定量分析　实验方法同上，但一抗（1∶100 稀释）、二抗分别为山羊抗大鼠 TNF-α IgG 及兔抗山羊 IgG。用 HPLAS-1000 图像分析系统计算积分光密度值作为半定量参数，测量 TNF-α 的蛋白质表达。

1.7 RT-PCR 检测 NF-κB p65 及 TNF-α mRNA 表达

采用两步法进行 RT-PCR（TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0 购于大连宝生物工程有限公司）。提取心肌总 RNA（按照说明书进行），测定 $D(460)$ 值计算 RNA 的纯度。引物设计：NF-κB p65（288 bp）上游 5′-ATGGACGATCTGTTTCCCCT-3′，下游 5′-GGTGCGTCTTAGTGGTATCT-3′；TNF-α（388 bp）上游 5′-AGCAAACCACCAAGCAGAGG-3′，下游 5′-CGGACTCCGTGATGTCTAAG-3′；GAPDH（216 bp）上游 5′-CCTTCATTGACCTCAACTACATG-3′，下游 5′-CTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3′。制备 cDNA，逆转录体系为 $MgCl_2$ 2 μl，10 × RT Buffer 1 μl，DEPC 水 3.75 μl，4 × dNTP 1 μl，Rnase Inhibitor 0.25 μl，OligodT 0.5 μl，MML-V 0.5 μl，RNA 3 μg。反应参数为 30 ℃ 10 min，50 ℃ 30 min，99 ℃ 5 min，5 ℃ 5 min。PCR 反应体系为 cDNA 10 μl，灭菌蒸馏水 28.75 μl，5 × Buffer 10 μl，上游引物 0.5 μl，下游引物 0.5 μl，*Taq* 酶 0.25 μl。反应参数为 94 ℃预变性 2 min 后，94 ℃变性 30 s，52 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，31 个循环后；72 ℃延伸 7 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内对照。以 5 μl PCR 产物行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，凝

胶图像分析系统扫描扩增产物电泳条带的密度，将 GAPDH 的产物设为 100，计算 NF-κB p65 及 TNF-α 电泳条带密度。

1.8　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SAS 6.12 统计软件进行两组间比较 t 检验。

2　结果

2.1　各组大鼠生存及死亡分析

13 只大鼠于实验中死亡。I/R 组存活 31 只，存活率为 78%，再灌注 0、1、2、6、24 h 分别存活 6、7、5、7、6 只；I/R + T 组存活 36 只，存活率为 90%，上述再灌注时间点分别存活 7、7、7、8、7 只；Sham 组及 Sham + T 组大鼠均全部存活。所有死亡中，心律失常占 54%。I/R 组因心律失常死亡 5 只，其中室速 2 只，室颤 2 只，三度房室传导阻滞 1 只，麻醉意外及大出血分别死亡 1 只和 2 只，其他原因死亡 1 只；I/R + T 组因室性心律失常死亡 2 只，大出血死亡 1 只，其他原因死亡 1 只。I/R 组和 I/R + T组因恶性心律失常死亡的大鼠分别占总死亡的 39% 和 15%。将以上各组存活大鼠实验数据进行统计学分析。

2.2　心肌细胞中 PMN 的聚集及 MPO 活性

Sham 组和 Sham + T 组心肌组织中的 PMN 无明显差异（$P>0.05$），分别为（0.86 ± 0.32）个/高倍视野和（1.0 ± 0.05）个/高倍视野。缺血 30 min PMN 即开始升高[（5.6 ± 0.81）个/高倍视野]，与其相比，I/R 1、2、6、24 h 组的 PMN 显著增加（$P<0.05$），再灌注 2 h 最大。I/R + T 各组的 PMN 均显著降低（$P<0.05$），由 I/R 2 h 组的（33.7 ± 2.3）个/高倍视野降低至（4.4 ± 0.5）个/高倍视野（$P<0.01$）。

Sham 组和 Sham + T 组心肌组织中的 MPO 无明显差异（$P>0.05$）。再灌注 0、1、2 h 亚组的 MPO 依次升高，2 h 亚组最高，然后又依次降低趋势。I/R + T 组的 0 h 亚组与 I/R 组 0 h亚组无明显差异，其余各亚组较 I/R 各亚组显著降低（$P<0.05$），见表 1。

表 1　各时间点 MPO 活性检测结果

组别	再灌注亚组				
	0 h	1 h	2 h	6 h	24 h
Sham 组	–	–	1.02 ± 0.24	–	–
Sham + T 组	–	–	0.98 ± 0.24	–	–
I/R 组	4.08 ± 0.08	10.29 ± 0.24	15.56 ± 0.26	12.25 ± 0.10	8.30 ± 0.25
I/R + T 组	3.98 ± 0.06	4.65 ± 0.41[a]	6.08 ± 0.28[b]	6.04 ± 0.10[a]	5.11 ± 0.20[a]

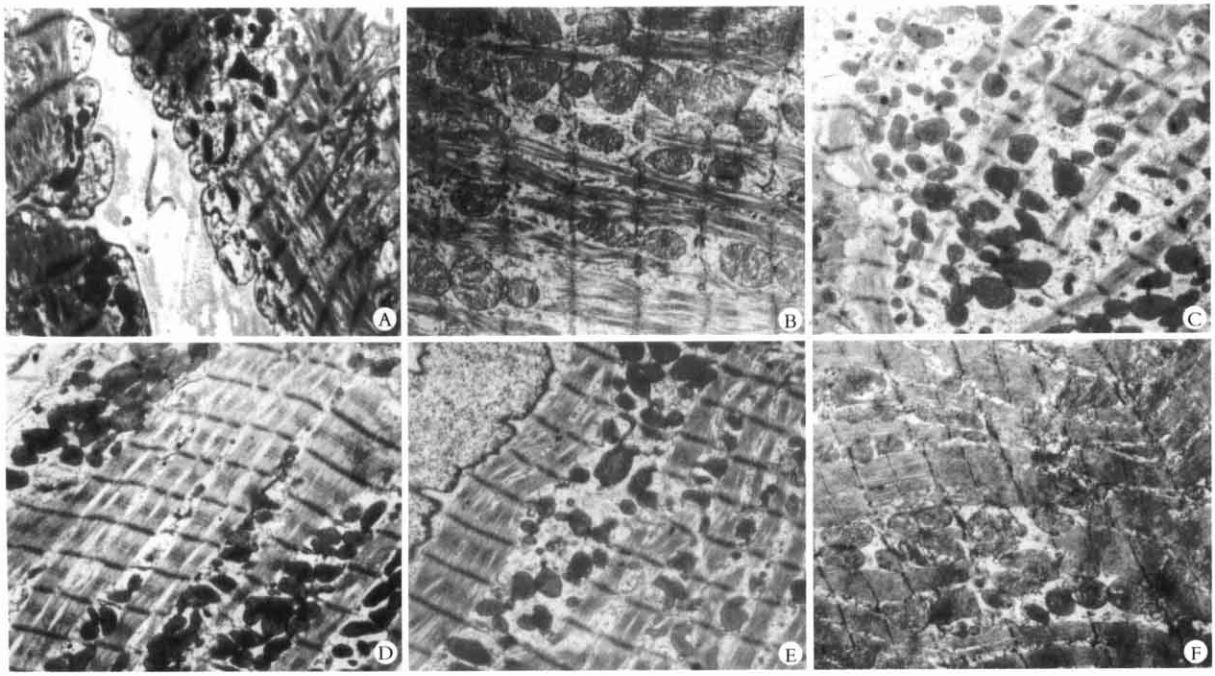
a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 I/R 组比较

2.3　透射电镜结果

I/R 2 h 时见弥漫性心肌细胞肿胀、细胞核肿胀及线粒体肿胀，I/R 6 h 时肌丝溶解，Z 线增宽、模糊，24 h 时可见线粒体空泡样变性，大量肌丝溶解。与 I/R 组相比，I/R + T 组心肌细胞损伤程度大大减轻，仅部分区域线粒体轻度肿胀，肌丝间隙增宽，肌丝部分溶解。见图 1。

2.4　NF-κB p65 及 TNF-α 的蛋白质表达

2.4.1　NF-κB p65 的阳性指数　Sham 组和 Sham + T 组的 NF-κB p65 的 PI 无明显差异（$P>0.05$）。I/R 各亚组的 PI 均较 Sham 组和 Sham + T 组显著升高（$P<0.05$），与 PMN 和 MPO 相似，再灌注 0、1、2、6、24 h 各亚组先升后降，再灌注 2 h 时最高；与 I/R 组各亚组相比，I/R + T 各组的 PI 显著降低（$P<0.05$），2 h 时降低最大（表 2）。



A：I/R 2 h；B：I/R 6 h；C：I/R 24 h；D：I/R + T 2 h；E：I/R + T 6 h；F：I/R + T 24 h

图 1　各组心肌组织电镜变化　（×10 000）

表2 NF-κB p65 的阳性指数($\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注亚组				
	0 h	1 h	2 h	6 h	24 h
Sham 组	-	-	1.2 ±0.5	-	-
Sham +T 组	-	-	1.4 ±0.4	-	-
I/R 组	5.6 ±1.4	10.0 ±2.0	21.0 ±2.6	17.0 ±3.2	15.4 ±13.4
I/R +T 组	4.1 ±2.0	5.0 ±1.8[a]	7.0 ±3.2[a]	8.4 ±5.7[a]	10.0 ±2.0[a]

a: $P<0.05$,与 I/R 组比较

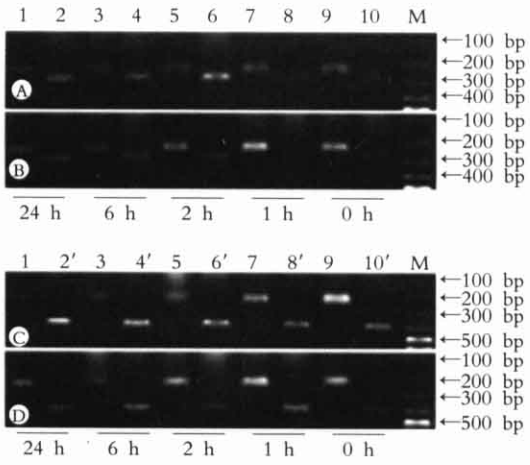
2.4.2 TNF-α 的积分光密度值 Sham 组和 Sham + T 组 TNF-α 积分光密度值分别为 1.42 和 1.25,I/R 各组显著增加。与 0 h 时相比,I/R 其余各组的该值增加明显($P<0.05$);与 I/R 组相比,I/R +T 各组显著减少($P<0.05$),于再灌注 6 h 由 I/R 组的 87.8 降低到 39.5($P=0.008$),达到最低(表 3)。

表3 TNF-α 的积分光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注亚组				
	0 h	1 h	2 h	6 h	24 h
Sham 组	-	-	1.42 ±0.75	-	-
Sham +T 组	-	-	1.25 ±0.45	-	-
I/R 组	9.12 ±1.02	19.62 ±1.39	37.35 ±2.44	87.88 ±3.29	80.36 ±3.94
I/R +T 组	7.74 ±1.27	14.81 ±2.34[a]	27.69 ±2.98[a]	39.47 ±5.97[a]	37.52 ±4.34[a]

a: $P<0.05$,与 I/R 组比较

2.5 RT-PCR 示 NF-κB p65 及 TNF-α 的 mRNA 水平 Sham 组和 Sham + T 组的 NF-κB p65 及 TNF-α 的 mRNA 无明显变化(数据未显示),I/R 组与其相比显著增加($P<0.05$)。I/R 组中,与 0 h 时相比,其余各组的 NF-κB p65 及 TNF-α 的 mRNA 表达均增加明显($P<0.05$),并于再灌注后 2 h 和 6 h 达高峰。与 I/R 组相比,I/R + T 各组的 NF-κB p65 及 TNF-α mRNA 均显著下降($P<0.05$),2 h 组 NF-κB p65 mRNA 水平由 150 下降为 36($P<0.01$),6 h 组的 TNF-α mRNA 水平由 232 下降为 110($P<0.05$)。见图 2。



1,3,5,7,9: GAPDH; 2,4,6,8,10: NF-κB p65; 2′,4′,6′,8′,10′: TNF-α; M: 标准 A: I/R 组; B: I/R +T 组; C: I/R 组; D: I/R +T 组

图2 I/R 组及 I/R +T 组各时间点 NF-κB p65 及 TNF-α 的 mRNA 表达结果

3 讨论

NF-κB 是异二聚体 Rel 家族成员,为心脏应激反应的快速表达基因[3],其活性形式是 p50/p52 和 p65。通常,p50 和 p65 组成异二聚体并与抑制性因子 IκB 结合,在细胞质中以无活性状态存在。再灌注时由于氧自由基的作用,使 NF-κB 从无活性的复合物中解离出来,进入细胞核后启动炎症相关基因的转录,上调包括肿瘤坏死因子-α、白介素-6 等炎症因子表达[4]。这些炎症介质激活内皮细胞和白细胞表达多种粘附分子,介导白细胞与内皮间的黏附反应,使白细胞浸润到缺血的心肌组织,释放细胞毒性物质,引起心肌损伤。降低循环中 PMN 的数量可以抑制再灌注损伤[5]。目前认为 PMN 能够释放 MPO,MPO 具有致炎因子的特性并能够损伤组织[6-8]。因此,再灌注引起了血管内皮细胞和心肌细胞的炎症性损伤,NF-κB 的激活是关键[9]。有研究使用 NF-κB 的拮抗剂姜黄素(curcumin)显著下调了致炎因子的表达,抑制了心肌的缺血再灌注损伤[10]。

泛素-蛋白酶体系统(UPS)控制着 NF-κB 的激活。首先,NF-κB 的前体 p105 以泛素依赖的方式在蛋白酶体复合物中降解为成熟的 p50。其次,UPS 降解了磷酸化的 IκB,使 NF-κB 得以释放激活。因此,通过抑制蛋白酶体活性,则可能抑制 NF-κB 激活而引起的炎症级联反应。目前,UPS 在心肌再灌注损伤中的研究甚少,可能的原因是分离心肌组织中的蛋白酶体非常困难[11]。而且由于不同的组织 UPS 的含量可能不一致,对蛋白酶体抑制的反应也不尽相同,因此大量的研究还需要进行。有作者将乳胞素类蛋白酶体抑制剂 MLN519 用于大鼠脑[12]以及猪心肌[13]的缺血再灌注模型中,结果显示,MLN-519 显著降低了脑和心肌的梗死面积,研究其作用机制发现 MLN-519 通过抑制 NF-κB 的激活,下调了炎症因子包括 TNF-α、IL-6、ICAM-1 等的表达。醛基肽类蛋白酶体抑制剂 MG-132 是一种可逆的具有高度选择性的蛋白酶体抑制剂,在早期的研究中,将其用于体外抑制肿瘤生长、抑制血管再狭窄以及一些炎症性疾病中。用 MG-132 处理球囊损伤后大鼠颈动脉内皮细胞发现,MG-132 呈剂量依赖性地抑制了 NF-κB 的激活,并抑制了 TNF-α 诱导的 IκB 的降解,减轻了颈动脉内皮细胞的炎症性损伤[14]。最近的研究显示,给自发性高血压大鼠每天静脉注射 MG-132 共 12 周,MG-132 通过抑制 NF-κB 激活,抑制了大鼠

的心肌重塑，并具有很好的安全性[15]。但是，以前并没有将 MG-132 用于在体心肌缺血再灌注模型的研究报道。本研究在大鼠的缺血再灌注模型中，于再灌注前 5 min 静脉注射 MG-132，分别从蛋白质水平和基因水平动态观察了 MG-132 对缺血再灌注后 0、1、2、6、24 h NF-κB 及其下游作用因子 TNF-α 表达的变化，数据证明，与对照组相比，MG-132 治疗组的心肌细胞损伤程度大大减轻，仅部分区域线粒体轻度肿胀，肌丝间隙增宽，肌丝部分溶解，心肌缺血再灌注心肌细胞损伤程度显著减轻。我们对 MG-132 的心肌保护机制进行了研究，结果显示 MG-132 显著抑制了心肌组织中 NF-κB 的激活并下调了 TNF-α 表达，减少了心肌组织中白细胞的聚集、降低 MPO 的活性，而且该治疗作用至少能够维持 24 h；MG-132 减少了治疗组大鼠心律失常的发生率，并使存活率由对照组的 78% 升高到 90%。

本结果中，白细胞的聚集随 NF-κB 的活性增加而增加，其间的关系还有待于进一步研究，至于 TNF-α 的高峰值是在再灌注后的 6 h，明显晚于 NF-κB，可能一方面是因为 TNF-α 的合成需要首先发生 NF-κB 的核转位；另一方面，激活的 TNF-α 又可以作为配体与心肌细胞膜上的 TNF-α 受体结合，再磷酸化并激活 IκB 激酶（IKK）复合物[16]，从而再次激活 NF-κB[17]。

本研究将蛋白酶体抑制剂 MG-132 用于在体的心肌缺血/再灌注模型中，研究证明 MG-132 能够降低心肌组织中炎症因子的表达、抑制 PMN 聚集及释放 MPO、降低了因恶性心律失常导致的死亡，抑制了心肌的再灌注损伤。由于心肌缺血再灌注损伤有多种机制共同参与，因此 MG-132 的心脏保护作用机制还需要进一步扩展研究，比如对热休克蛋白的影响等，而且还需要进一步明确 MG-132 的最佳剂量和最佳治疗时间窗，已及其对心肌梗死是否具有治疗作用。

参考文献：

[1] 王淑侠，兰小莉，王吉文，等. 大鼠心肌缺血/再灌注损伤模型的改进与评价[J]. 解剖科学进展，2000，6(4)：371－373.

[2] Wang S, Kotamraju S, Konorev E, *et al*. Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide[J]. Biochem J, 2002, 367(Pt 3): 729－740.

[3] Li C, Browder W, Kao R L. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart[J]. Am J Physiol, 1999, 276(2 Pt 2): H543－H552.

[4] Li Q, Verma I M. NF-kappaB regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10): 725－734.

[5] Ma X L, Lefer D J, Lefer A M, *et al*. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion[J]. Circulation, 1992, 86(3): 937－946.

[6] Eiserich J P, Baldus S, Brennan M L, *et al*. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase[J]. Science, 2002, 296(5577): 2391－2394.

[7] MEMG Y, ZHANG M, XU J, *et al*. Effect of resveratrol on microcirculation disorder and lung injury following severe acute pancreatitis in rats[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(3): 433－435.

[8] Olanders K, Borjesson A, Zhao X, *et al*. Effects of anticoagulant treatment on intestinal ischaemia and reperfusion injury in rats[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2005, 49(4): 517－524.

[9] 张　波，王志农，王　军，等. 核因子 kappaB 在早期心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华实验外科杂志，2004，21(9)：1042－1044.

[10] Yeh C H, Lin Y M, Wu Y C, *et al*. Inhibition of NF-kappa B activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2005, 45(4): 301－309.

[11] Gomes A V, Zong C, Edmondson R D, *et al*. The murine cardiac 26S proteasome: an organelle awaiting exploration[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1047: 197－207.

[12] Williams A J, Berti R, Dave J R, *et al*. Delayed treatment of ischemia/reperfusion brain injury: extended therapeutic window with the proteosome inhibitor MLN519[J]. Stroke, 2004, 35(5): 1186－1191.

[13] Pye J, Ardesshirpour F, Mccain A, *et al*. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(3): H919－H926.

[14] Meiners S, Laule M, Rother W, *et al*. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis[J]. Circulation, 2002, 105(4): 483－489.

[15] Meiners S, Hocher B, Weller A, *et al*. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome[J]. Hypertension, 2004, 44(4): 471－477.

[16] Wilkinson K D. Signal transduction: aspirin, ubiquitin and cancer[J]. Nature, 2003, 424(6950): 738－739.

[17] Berthonneche C, Sulpice T, Boucher F, *et al*. New insights into the pathological role of TNF-alpha in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(1): H340－H350.

（编辑　王　红）