维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0528-04

蛋白酶体抑制剂 MG-132 对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究

戴翠莲,罗开良

(重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究蛋白酶体抑制剂 MG-132 对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的影响。方法:结扎 SD 大鼠左冠状动脉前降支 30min 后,松开结扎线再灌注 6h 制作心肌缺血再灌注模型。治疗(I_{30min}/R_{6h}+T)组于再灌注前 5min 静脉注射蛋白酶体抑制剂 MG-132 0.75mg/kg,对照(I_{30min}/R_{6h})组、假手术(Sham)组和缺血 30min 无再灌注(I_{30min})组注射与之相同容积的生理盐水,观察各组心肌梗死体积、心肌酶标志物水平变化。结果:与 Sham 组相比,I_{30min} 组的心肌梗死体积以及心肌梗死体积占左室心肌体积的百分比均明显增加($P<0.01$),血浆肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肌钙蛋白 I(TnI)显著升高;再灌注前蛋白酶体抑制 MG-132 治疗则明显减小了缺血 30min 再灌注 6h 组大鼠的心肌梗死体积($P<0.05$)以及降低了血浆心肌损伤标志物水平($P<0.05$)。结论:MG-132 能有效地预防急性心肌梗死后的再灌注损伤。

【关键词】再灌注损伤;蛋白酶体抑制剂;急性心肌缺血

【中国图书分类法分类号】R541.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-24

Protective effect of proteasome inhibitor MG-132 on myocardial reperfusion injury in rats

DAI Cuilian, et al

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective:* To investigate the effect of proteasome inhibitor MG-132 on myocardial infarction size and biochemical marker levels in rat myocardium after reperfusion injury. *Methods:* Adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: left anterior descending (LAD) coronary artery ligation for 30 minutes without treatment (I_{30min}), LAD ligation for 30 minutes with subsequent 6 hours reperfusion without treatment (I_{30min}/R_{6h}), LAD ligation for 30 minutes with subsequent 6 hours reperfusion with treatment (I_{30min}/R_{6h} + I_{30min}/R_{6h}) and Sham (Sham30min). After LAD was ligated for 25 min, at 5 min before reperfusion, MG-132 (0.75mg/kg) or sterile saline was given to all the treatment group/sham rats, the myocardial infarct size, levels of serum creatine kinases (CK), CK muscle-brain fraction (CK-MB), and troponin I (TnI), were measured. *Results:* Compared with Sham group, the myocardial infarct size and the ratio of the volume of myocardial infarct over the total volume of left ventricular wall, as well as the levels of serum CK, CK-MB, TnI were significantly increased in I30mingroup ($P<0.01$). While proteasome inhibitor- MG-132 treatment significantly reduced the size of myocardial infarct and decreased serum CK, CK-MB, TnI levels in I_{30min}/R_{6h} + T group ($P<0.05$). *Conclusion:* Our data suggest that myocardial reperfusion injury can be inhibited by proteasome inhibitor MG-132.

【Key words】Reperfusion injury; Proteasome inhibitor; Acute myocardial ischemia

随着冠状动脉搭桥术、经皮冠状动脉内成形术等血管再通术的迅速开展,冠心病再灌注治疗出现了一个飞跃。但再灌注损伤成为阻碍缺血心肌从再灌注疗法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 20 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,本文首次报告了蛋白酶体抑制剂 MG-132 对心肌再灌注损伤的治疗作用。

1 材料与方法

作者介绍:戴翠莲(1966-),女,博士生,副主任医师,主要研究方向:急性心肌缺血再灌注损伤的研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 动物模型的建立和实验分组

成熟 SD 大鼠 25 只，体重 220 ± 50g，雌雄各半（重庆医科大学动物中心提供）。以 3.5%水合氯醛（10ml/kg）腹腔注射麻醉后气管插管并接小动物呼吸机（浙江医科大学生产）。于胸骨左缘 0.5cm 处逐层打开胸腔，剪开心包，在左冠状动脉前降支（LAD）发出 2mm 处穿线，打活结以阻断其血流 30min，造成急性心肌梗死，松开结扎线则形成再灌注。以心电图改变及心肌颜色变化作为心肌缺血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，将大鼠随机分为（1）缺血 30min 组（I_{30min}）：阻断 LAD30min；（2）缺血 30min 再灌注 6h 组（I_{30min}/R_{6h}）：阻断 LAD 30min 后再灌注 6h；（3）缺血 30min 再灌注 6h+ 治疗组（I_{30min}/R_{6h}+T）：阻断 LAD 30min 后再灌注 6h，于再灌注前 5min 股静脉注入 MG-132（Calbiochem 公司，0.75mg/kg，溶于 2ml 二甲基亚砜中），5min 推完；（4）假手术（Sham）组：与 I_{30min} 组相同，但只穿线不打结。Sham 组 6 只大鼠，余每组 8 只大鼠。除 I_{30min}/R_{6h}+T 外，其余各组均于结扎 LAD 25min 后于股静脉注入 2ml 生理盐水，5min 推完。

1.2 采集标本及检测指标

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，心脏停跳前右心室取血、摘取心脏，迅速分离出左心室，沿左心室长轴横切成 2mm 的薄片。

左心室心肌组织薄片立即全部置于 1% 的四氮唑红（TTC）磷酸缓冲液（pH7.4）中，37℃水浴 15min，梗死心肌为灰白色（TTC 染色阴性），非梗死部位心肌呈砖红色（TTC 染色阳性），置一毫米直尺于心肌组织旁作为比例尺，尼康 500 万象素专业数码相机照相，输入 Adobe PhotoShop5.5 系统，利用 NIH 图像分析软件计算各例的左室心肌体积（LVWV）、心肌梗死体积（MIV）以及心肌梗死体积与左室心肌体积的百分比（MIV / LVWV × 100%）。

1.3 血浆肌酸激酶（CK）、肌酸激酶同工酶（CK-MB）、肌钙蛋白 I（TnI）水平

分离血清，血清肌钙蛋白定量采用化学发光法，在美国 DPC1000 全自动化学发光仪上测定，试剂盒由该公司提供，正常参考值 <0.1ng/ml。用日立 7020 全自动生化分析仪测定 CK 及 CK—MB，试剂由中生北控生物股份有限公司提供，由一名专业技师进行上述检测。

1.4 统计学处理

用 SAS 6.12 软件进行统计学分析，所有的数据以均数 ± 标准差表示。两组间比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

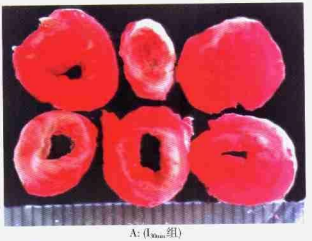
2.1 各组心肌梗死体积测量

结果见表 1 和图 1。

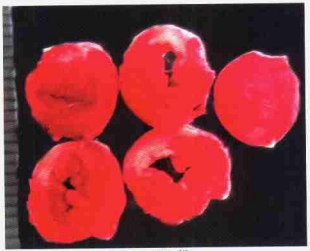
表 1 各组大鼠心肌梗死体积测量

	LVWV(cm^3)	MIV(cm^3)	MIV/LVWV(%)
Sham（n=6）	3.13 ± 0.59	0	0
I_{30min}（n=6）	3.35 ± 0.32	1.12 ± 0.32	36.04 ± 35.37
I_{30min}/R_{6h}（n=6）	3.29 ± 0.41	0.87 ± 0.34	26.85 ± 12.14
I_{30min}/R_{6h}+T（n=7）	2.99 ± 0.40	0.47 ± 0.11	15.69 ± 2.44

注：与 I_{30min}/R_{6h} 组相比，*P<0.05



A: (I_{30min}组)



B: (I_{30min}/R_{6h}组)



C: (I_{30min}/R_{6h}+T组)

维普资讯 http://www.cqvip.com



D: (Sham 组)

图 1 各组大鼠心肌组织 TTC 染色结果

注: I_{30min} 组可见大片坏死心肌(A),再灌注后心肌梗死体积明显缩小(B),但是范围仍然大于 I_{30min} /R6h + T 组(C)、Sham 组(D)无心肌坏死。图中灰白色为梗死心肌,红色为非梗死心肌

2.2 CK、CK-MB、TnI 水平

结果见表 2。

表 2 各组大鼠血浆 CK、CK-MB、TnI 水平

组别	CK(U/ml)	CK-MB (ng/ml)	TnI(ng/ml)
Sham (n=6)	179 ± 12	75 ± 17	<0.1
I_{30min} (n=6)	729 ± 60	666 ± 61	0.35 ± 0.10
I_{30min} /R_{6h} (n=6)	4 219 ± 1 928	3 622 ± 1 755	1.13 ± 0.15
I_{30min} /R_{6h} + T(n=7)	1 993 ± 363*	1 773 ± 288*	0.61 ± 0.06**

注: *与 I_{30min} /R_{6h} 组相比, *P<0.05, **P<0.01

3 讨 论

冠状动脉的急性闭塞引起心肌细胞坏死,使心肌 CK、CK-MB 和 TnI 显著升高,并出现典型的心电图表现,能否及时进行再灌注治疗是决定患者近期和远期预后的关键性因素。但血管再通后,由于异常氧化、钙超载以及炎症性损伤等原因,常常出现心肌缺血 - 再灌注损伤,甚至导致心肌细胞死亡[1]。由于再灌注损伤的存在抵消了一部分血管再通后的有益作用[2,3],因此,在心肌梗死后强调尽快开通梗死相关动脉的同时,也在寻找预防再灌注损伤的措施。

再灌注损伤由多种因素介导,炎症性损伤是其主要原因。研究发现,核转录因子 - κB(NF- κB)在心肌缺血再灌注早期被激活[4],在炎症性损伤过程中起了关键作用[5]。NF- κB 是异二聚体 Rel 家族成员,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,在胞浆中以无活性状态存在。当外界信号刺激时,IκB 蛋白质被磷酸化,磷酸化的 IκB 由多聚泛素链标记后,被 26 蛋白酶体识别、降解,使 NF- κB 从无活性的复合物中解离出来,进入细胞核后与核内特异基因序列结合,启动炎症相关基因的转录,引起炎症因子的表达[6]。Onai[7]和 Yeh[8]在实验中发现,用 IκB 磷酸化的阻断剂 IMD-0354 抑制 IκB 磷酸化或者用 NF- κB 的拮抗剂姜黄素(curcumin)阻断 NF- κB 的激活,显著地下调了大鼠和兔的缺血再灌注模型心肌的炎症因子的表达,缩小了心肌梗死范围,降低了心肌损伤标志物水平。因此,有效地抑制 NF- κB 的激活有可能抑制再灌注损伤。

MG-132 是一种醛基肽类蛋白酶体抑制剂,具有高度选择性和有效性以及抗增殖、抗炎症、促进热休克蛋白表达的特点,在早期的研究中,将其用于抑制肿瘤生长、抑制血管再狭窄以及一些炎症性疾病中。Meiners[9]用 MG-132 处理球囊损伤后大鼠颈动脉内皮细胞发现,MG-132 抑制了 NF- κB 的激活,下调了炎症因子的表达,减轻了颈动脉内皮细胞的炎症性损伤。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 下调了通过 NF- κB 激活所诱导的基质金属蛋白酶和胶原的表达,显著抑制了心肌的纤维化,并且大鼠的心率、血压及体重无明显变化,具有很好的安全性[10]。但是,以前并没有将 MG-132 用于急性心肌梗死以及缺血再灌注损伤的研究报告。本研究发现,在大鼠的缺血再灌注模型中,于再灌注前 5min 静脉注射 MG-132,在同样缺血 30min 再灌注 6h 的情况下,MG-132 治疗组较对照组的心肌梗死体积及其占左室体积百分比、心肌损伤标志物水平均显著降低,说明 MG-132 能够抑制心肌的缺血再灌注损伤。这与以前研究使用的 PS-519[11]以及 PR-39[12]在心肌梗死再灌注模型中得到的结论一致。本实验中假手术组的 CK-MB 升高,可能为心肌穿针损伤所致。与 I30min 组相比,除假手术组以外,各组的 CK、CK-MB、TnI 均显著升高,但 I30min /R6h 组和 I30min /R6h + T 组的上述指标高于 I30min 组并不代表心肌损伤加重,而是由于再灌注后心肌损伤标志物大量释放入血所致。与没有进行 MG-132 治疗相比,MG-132 显著降低了缺血 30min 再灌注 6h 大

维普资讯 http://www.cqvip.com

鼠的心肌损伤标志物水平，得到了与能降低心肌梗死体积、抑制心肌再灌注损伤一直的结论。

随着冠状动脉介入治疗的广泛开展，心肌的再灌注损伤越来越受到重视，如何限制再灌注损伤成为关注的热点，我们的研究首次将蛋白酶体抑制剂 MG-132 用于在体的心肌缺血/再灌注损伤研究，证明 MG-132 能够降低血浆心肌酶标志物水平，缩小心肌梗死范围，具有减轻心肌缺血再灌注损伤的作用。但是，由于本研究动物数量较少，最后结论还需要扩大样本进一步研究证实，而且，治疗的最佳剂量、治疗的时间窗有待于进一步研究，特别是还要研究其对实验动物生存率的影响。

参 考 文 献

[1] Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. Hypertens, 2000;18(6):655-673.

[2] Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning[J]. Physiol Rev, 1999;79:609-634.

[3] Elsasser A, Vogt AM, Nef H, et al. Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death[J]. JACC,2004;43(12): 2191-2199.

[4] Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF-kappaB during ischemia in perfused rat heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1999;276:H543-H552.

[5] 张 波,王志农,王 军,等.核因子 kappa B 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.

[6] Li Q, Verma IM. NF-B regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002;2:725-734.

[7] Onai Y, Suzuki J, Kakuta T, et al. Inhibition of IB phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Cardiovascular Research, 2004;63:51-59.

[8] Yeh C, Lin Y, Wu Y, et al. Inhibition of NF-kB activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression[J]. Cardiovasc Pharmacol TM, 2005;45:301-309.

[9] Meiners S, Laule M, Rother W, et al. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis[J]. Circulatio,2002;29: 483 - 489.

[10] 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;44:471-477.

[11] Pye JP, Ardeshirpour F, McCain A, et al. Proteasome inhibitor ablates activation of NF-kappaB induced during myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2003;284: H919 - H926.

[12] Jialin B, Kaori S, Li M, et al. PR-319 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated I-B degradation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2001;H2612-H2618.

（上接第 527 页）

可以从目的蛋白的氨基端自身剪切，切下 intein，回收目的蛋白。从而为纯化提供了高效的途径。

本研究中除通过挑选新的表达载体和宿主工程菌外，并采取降低工程菌的生长温度、减少诱导剂 IPTG 的浓度、减少诱导时间以及添加促进重组蛋白可溶性表达的生长添加剂和保护剂等手段，降低无活性聚集体形成的速率以减少包涵体的形成。在 28℃，诱导时间为 5h，IPTG 最佳诱导浓度为 0.2mmol/L 时，表达量可占菌体总蛋白的 26 %以上。其中 80%以上的诱导表达蛋白是以非包涵体的形式存在于上清中。因此，不必进行包涵体的复性。从而节约了大量的时间和成本，而且避免了复性中蛋白质复性率一般都很低的问题。表达的融合蛋白过柱纯化后纯度达 95%以上，具有明显的生物学活性。本研究以非包涵体形式高效表达 IL-18 为进一步研究奠定了基础。

（通信作者：王亚平 Tel:023-68485898；宋方洲 Tel: 023-68485898）

参 考 文 献

[1] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells [J].Nature, 1995; 378-388.

[2] Tanaka H, Narita M, Teramoto S, et al. Role of interleukin-18 and T-helper type 1 cytokines in the development of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in adults [J]. Chest,2002 ;121(5):1493-1497.

[3] Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine[J]. Eur Cytokine Netw, 2000 ;11(3):483-486.

[4] Yamanaka R, Tsuchiya N, Yajima N, et al. Induction of an antitumor immunological response by an intratumoral injection of dendritic cells pulsed with genetically engineered Semliki Forest virus to produce interleukin-18 combined with the systemic administration of interleukin-12[J]. J Neurosurg,2003 ;99(4):746-753.

[5] Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, et al. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice [J]. J Immunol, 2000 1;164(11):6067-6074.

[6] Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, et al. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function[J]. Cancer Immunol Immunother, 2004 ;53(3):176-186.

[7] Schmidt OI, Morganti-Kossmann MC, Heyde CE, et al. Tumor necrosis factor-mediated inhibition of interleukin-18 in the brain: a clinical and experimental study in head-injured patients and in a murine model of closed head injury [J]. J Neuroinflammation, 2004;28 1(1):13.