维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0315－03

TNF－α在小鼠心肌应激性损伤中表达的实验研究

邓世雄[1],田　田[2]

(1.重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆　400016;2.四川省遂宁市人民医院普外科,遂宁　629000)

【摘　要】目的:探讨 TNF－α在应激性心肌损伤中的表达和意义。方法:以异丙肾上腺素(isoproterenol,ISO)作腹腔注射,建立小鼠应激性心肌损伤模型,应用免疫组化 SP 方法检测 TNF－α在小鼠心肌中的表达。结果:TNF－α在正常对照组偶见于局部视野的心肌细胞及血管内皮细胞(VEC);TNF－α在应激组的表达大大增加,且增加的程度与心肌的损害程度一致。结论:TNF－α在应激性心肌损伤中的表达明显增加,其增加程度与心肌损伤的程度密切相关,提示 TNF－α在这种心肌损伤的病理过程中起重要作用。

【关键词】TNF－α;异丙肾上腺素;心肌损伤;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R542－2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－11－20

An experimental study on the expression of TNF－α in myocardial injury during stress

DENG Shixiong, et al

(*Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect TNF－α in the tissue of myocardium injury during stress and discuss its significance. *Methods*: To establish a model of myocardium lesion by injecting ISO to mice abdominal cavity, then TNF－α in the tissue of heart was assessed by immunohistochemical method of SP and HE staining in paraffin sections. *Results*: There were little positive substance of TNF－α expressed in heart in normal control. The positive substance of TNF－α increased significantly after stress. *Conclusion*: Increase in the expression of TNF－α in stress indicate its participation in the process of myocardium injury, and it may be an objective marker for evaluation of myocardium injury.

【Key words】TNF－α; ISO; Myocardium injury; Immunohistochemical method

应激(Stress)是机体对多种强烈刺激的一种保护性反应,但当其反应失调时,也会产生各种损伤性效应。应激性心肌损伤是指非冠脉狭窄或堵塞,而因强烈刺激(急性灾难、死亡威胁、亲人亡故……)使机体释放大量儿茶酚胺(catecholamine,CA)所造成的心肌损伤。机体释放的大量 CA 导致心肌产生各种代谢变化,最终可造成心肌坏死甚至引起致死性心律紊乱而致心源性猝死。

本研究采用免疫组化方法,旨在发现在其他多种原因所致的心肌损伤中均有表达的 TNF－α是否在应激性心肌损伤中亦有表达及其发展规律,探讨 TNF－α在应激性心肌损伤的发生、发展中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

健康昆明种小鼠 20 只,体重 28±4g,由重庆医科大学实验动物中心提供。异丙肾上腺素由上海禾丰制药有限公司生产,批号:010101。抗 TNF－α单抗及 SP 试剂盒均由北京中山生物技术有限公司生产。

1.2　动物分组及应激性心肌损伤

模型制备 20 只小鼠随机分为应激组与对照组,每组 10 只。参考 Rone[1] 及何天培[2] 等人的方法,经预实验后约加改良,应激组经腹腔注射 ISO 30mg/(kg·d),1 次/日,间隔 24h,连续 3 天。对照组腹腔注射同等剂量的生理盐水。

1.3　取材及标本处理

在距首次注射 ISO 后 72h 时,所有动物均以颈椎脱臼法处死。立即取出心脏,切取心尖部(含部分房、室)用 0.9% 生理盐水(0～4℃)洗净,放入 10% 中性福尔马林液中固定

作者介绍:邓世雄(1963－　),男,副教授,
主要研究方向:法医病理学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

72h 后，常规脱水、石蜡包埋、切片后进行 HE 及免疫组化染色。

1.4 ISO 所致心肌损伤的病理学

分级参考 Rone[1] 标准将病理变化分为 5 级：0 度，无病变；Ⅰ度，心内膜下局灶性病变；Ⅱ度，心肌大范围灶性病变，肌纤维肿胀和断裂；Ⅲ度，心肌广泛融合性病变；Ⅳ度，心肌变性、坏死。

1.5 染色结果判定标准

TNF－α 的染色模式为细胞膜/细胞浆，胞核无着色。根据染色强度分为：强阳性(＋＋＋，棕黄色)；阳性(＋＋，黄色)；弱阳性(＋，浅黄色)；阴性(－，不着色)。

1.6 统计学分析

实验结果为等级资料，采用非参数统计方法的 Didit 分析进行检验。

2 结 果

2.1 小鼠应激后的临床表现

注射后迅即安静或短时疾跑后安静，呼吸频率明显加快，倦缩驼背，停止进食、进水，对外界刺激反应淡漠或易激惹。对照组无症状。

2.2 心肌损害

对照组未见损害(图 1)。应激组的典型心肌损害为广泛变性、局灶性坏死伴部分纤维结缔组织增生(图 2)。两组动物心肌损害的病理学观察结果见表 1。

2.3 免疫组化染色结果

2.3.1 应激组 TNF－α 的表达大多数为强阳性(＋＋＋)，部分为阳性，典型表现见(图 3)，对照组心肌 TNF－α 表达多数为阴性(－)，部分为弱阳性(＋)、

表 1 ISO 所致小鼠应激性心肌损伤的病理学观察结果(参考 Rone[1] 标准)

损伤程度	对照组(例)	应激组(例)
0	10	0
Ⅰ	0	0
Ⅱ	0	2
Ⅲ	0	5
Ⅳ	0	3

表 2 对照组与应激组心肌 TNF－α 的表达程度比较

表达程度	对照组	应激组
－	8	0
＋	2	0
＋＋	0	3
＋＋＋	0	7



图 1 对照组小鼠心肌 HE×400

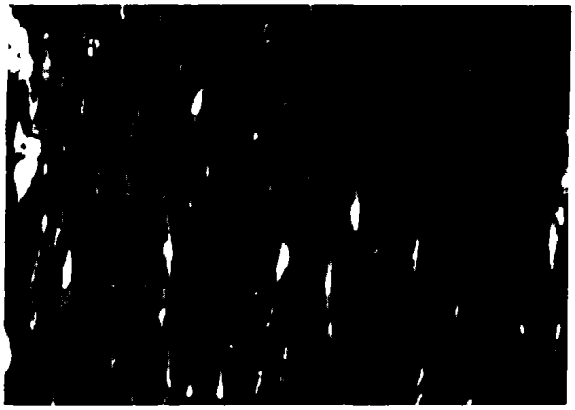


图 2 应激组小鼠心肌(Ⅱ度损伤) HE×400



图 3 应激组小鼠心肌 TNF－α 表达 SP×400



图 4 对照组小鼠心肌 TNF－α 表达 SP×400

维普资讯 http://www.cqvip.com

见(图 4)。两组动物的心肌 TNF－α 表达程度比较见表 2。可以看出,应激组表达明显增加,两组间有显著性差异($P<0.01$)。

2.3.2 在应激组不同损伤程度区域,心肌 TNF－α 的表达呈现坏死融合区(＋＋＋)＞局灶坏死区(＋＋～＋＋＋)＞轻度损害区(＋＋)＞未见损害区(＋)的趋势,说明心肌 TNF－α 的表达程度与心肌损伤程度可能呈正相关。

3 讨 论

目前认为,ISO 引起心肌损伤的可能机制是:①产生正性变时和正性变力作用,使心跳加强、加快,心肌耗氧量增加,导致心肌处于相对缺氧的状态,即功能性缺氧,心肌易损性增大,电活动不稳定,可诱发心性猝死;②刺激 B 受体使 Ca^{2+} 跨膜内流增加,形成钙超载,导致肌原纤维过度收缩、断裂;③ISO 的氧化产物对心肌的毒害作用;④ISO 在氧化过程中可产生氧自由基(oxygen－derived free radidicals, OFR),并引发脂质过氧化而使心肌膜结构受损,致心肌功能障碍;⑤引起血小板聚集,启动凝血过程影响心肌微循环,加剧心肌缺血、缺氧。典型的病理表现为心肌局灶性变性、坏死(肌浆凝聚、肌浆溶解)和灶性病变融合。

一般认为,体内的多种细胞,如单核/巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等均具有产生和释放肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF)的能力,其中激活的巨噬细胞是产生 TNF 的主要来源[3]。现已证明在多种病理状态下,TNF－α 也可由成熟的心肌细胞本身分泌产生,感染和内毒素是重要的刺激因素。Kapadia 等[4]证明在内毒素的刺激下,心肌细胞和心脏巨噬细胞几乎产生同样多的 TNF－α。应激性心肌损伤中 TNF－α 的产生机制目前尚未见阐述。推测与下列因素有关:

(1)缺血、缺氧。动物实验和临床观察均发现应激可以引起心肌缺血,其原因之一是冠脉痉挛。应激引起冠脉痉挛与以下因素有关:①交感－肾上腺髓质系统兴奋;②应激时产生的鸦片样物质;③诱导血小板聚集并释放 TXA_2。冠脉痉挛使冠脉血流量下降,心肌缺血,以及痉挛解除后发生再灌注使室颤阈下降,心肌易损性增大,进而甚至发生心性猝死。

(2)心肌坏死。正如本实验所得结果显示,心肌损伤程度增大,心肌 TNF－α 表达增多。心肌的变性、坏死可刺激炎症反应的发生,促使 TNF－α 产生。

有关 TNF－α 在应激性心肌损伤中对心肌的损害机制,目前考虑可能与下述因素有关:(1)参与激活并趋化白细胞。TNF－α 作为致炎细胞因子可致白细胞的趋化、聚积并释放化学物质引起组织损伤:TNF－α 先作用于原发损伤部位的 VEC,激活其表面的白细胞趋化粘附因子,此类因子进而诱导白细胞向原发损伤部位移动并粘附于损伤的组织细胞上,使白细胞释放一系列化学物质导致组织损伤。本实验结果显示在这种心肌损害时心肌 TNF－α 表达明显增加,且 TNF－α 在心肌中的表达量与白细胞浸润程度存在一定的相关性,表明 TNF－α 的表达与炎症反应有密切关系。所以我们认为,TNF－α 介导的炎症反应也是引起心肌损伤的机理之一。

(2)通过凋亡和/或坏死方式诱导心肌细胞死亡。已有研究证实了人的心肌细胞表面可表达 TNF 的两种特异性受体 TNF－R1 和 TNF－R2 的 mRNA 及受体蛋白[5],说明 TNF－α 可能直接结合到心肌细胞膜上的特异性受体而发挥其抑制效应。

参 考 文 献

[1] Rona G, Chappel CI, Balazs T, et al. An infarct－like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by Isoproterenol in the rats[J]. Arch Pathol, 1995;67:443.

[2] 何天培,顾景范,高兰兴. 牛黄酸对应激大鼠心功能异常变化及心肌损伤的保护作用[J]. 解放军预防医学杂志, 1998;16(4):255－258.

[3] Li D, Zhao L, Liu M, et al. Kinetics of tumor necrosis factor alpha in plasma and the cardioprotective effect ofamonoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha in acute myocardial infarction[J]. Am Heart J, 1999;137(6):1145－1152.

[4] Kapadia S, Lee J, Torre－Amione G, et al. Tumor necrosis factor－alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration[J]. J Clin Invest, 1995;96(2):1042－1052.

[5] Torre－Amione G, Kapadia S, Lee J, et al. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium[J]. Circulation, 1995;92(6):1487－1493.