DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.011
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0777-03

论著

TNFα、IL-1β模拟心肌缺氧预处理的实验研究

冉擘力,司良毅,何国祥 (第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要:目的 证实用低剂量白细胞介素-1β(Interleukin-1β,IL-1β)和肿瘤坏死因子α(Tumor necrosis factor alpha,TNFα)模拟缺血预处理(Preconditioning,PC)能否诱导心肌延迟保护(Delayed protection,DP),并探讨其机制。方法 在大鼠培养心肌细胞缺氧复氧模型上,观察IL-1β和/或TNFα预处理后即刻和24 h热休克蛋白72(Heat shock protein 72,HSP72)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(Malonadehyde,MDA)、谷胱甘肽(Glutathion,GSH)和细胞内游离钙[Ca^{2+}]i浓度的变化,并测定细胞存活率。结果 与正常对照组(Control)和缺氧复氧组(A/R)比较,IL-1β预处理(ILPC)和TNFα预处理(TNFPC)后24 h A/R末,HSP72表达和SOD含量显著增加($P<0.01$),GSH、细胞存活率有不同程度减少,而MDA、[Ca^{2+}]i有不同程度增加,但分别较A/R组降幅和增幅小($P<0.05$)。PC后即刻各组间比较差异无显著性($P>0.05$)。结论 低剂量IL-1β和/或TNFα预处理心肌细胞可诱导DP,其机制与心肌细胞氧化-抗氧化平衡和保护蛋白增加有关。

关键词:白细胞介素-1β;肿瘤坏死因子;预处理;延迟保护
中图法分类号:R322.11;R392.11;R845.22 文献标识码:A

Mimic hypoxia preconditioning on myocardiocytes by TNFα and IL-1β

RAN Bo-li, SI Liang-yi, HE Guo-xiang (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether mimic preconditioning (PC) by IL-1β and TNFα treatment at low concentration can induce the delayed protection of myocardium and explore the mechanism. **Methods** After the myocardiocytes were cultured under normal, anoxia/reoxygenation (A/R) conditions or with TNFα or IL-1β pretreatment, the expression of heat shock protein 72 (HSP72), the contents of superoxide dismutase (SOD), glutathion (GSH), malonadehyde (MDA) and the concentration of intracellular dissociative calcium ([Ca^{2+}]i) in the cells were measured with immunohistochemical and enzyme methods just after the pretreatment or 24 h later. The survival rate of the cultured cardiac myocytes was determined. **Results** In the cells with TNFα or IL-1β pretreatment for 24 h, at the end of A/R culture the expression of HSP72 and the content of SOD were increased significantly in comparison with those in control and A/R groups, and the GSH content and cell survival rate were reduced, but the MDA content and [Ca^{2+}]i concentration were elevated to some extents, with the increased and decreased amplitudes lower than those of A/R group ($P<0.05$). No significant difference was found among the groups immediate after culture. **Conclusion** Low IL-1β and/or TNFα pretreatment can induce the late cardioprotection and its mechanism is associated with the increase of protectiiv proteins and the balance of oxidants and antioxidants.

Key words: interleukin-1β; tumor necrosis factor; preconditioning; delayed protection

近年来,利用各种损伤性应激原刺激心脏以提高心肌细胞自身抗损伤耐受力的研究迅速增多,使用药物来诱导心肌自身保护能力成为一种研究的热点。以前的研究多集中在动物模型上而缺乏细胞水平的探索。故本实验拟用低剂量IL-1β和TNFα预处理培养大鼠心肌细胞,观察能否诱导其在延迟相对抗缺氧复氧(Anoxia/reoxygenation,A/R)损伤,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞模型及分组

新生Wistar大鼠80只,消毒后开胸,取左室近心尖部剪碎后置入小烧杯中,加0.05%胶原酶和0.1%的胰蛋白酶溶液消化,收集心肌细胞悬液,离心5 min。细胞混悬于DMEM培养液中(含10%胎牛血清)并将细胞浓度调整至1×10^5/ml,分装于培养瓶中,置5% CO_2孵箱37 ℃培养。培养至第5天的细胞为实验对象。

随机分为:①对照组(Control):细胞正常培养24 h;②缺氧复氧组(A/R):在孵箱中培养24 h 20 min,然后再缺氧1 h复氧1 h;③IL-1β预处理组(ILPC):将IL-1β(100 U/ml)加入细胞悬液中,置于充有95% N_2与5% CO_2混合气体(37 ℃)的孵箱中行2个循环的5 min孵育及没有IL-1β的5 min孵育,24 h后再置入95% O_2和5% CO_2孵箱中缺氧1 h复氧1 h;④TNFα预处理组(TNFPC):类似于第3组,除以TNFα(100 U/ml)替代IL-1β外。收集预适应前后、长时间缺氧复氧末培养皿中上清液及细胞待检,样本收集后立即评估细胞存活率。细胞贮存在-70 ℃冰箱。

1.2 检测指标

①HSP72表达:取培养细胞悬液0.5 ml,反复冻融3次,用ELISA法测定。②SOD、MDA、GSH含量均用试剂盒测定。③细胞内游离钙[Ca^{2+}]i测定[1,2]:将心肌细胞其混悬于Tyrode液中,浓度调至1×10^6/ml,取2 ml加Fura-2/AM和牛血清白蛋白至终浓度分别为2.5 μmol/L和1 g/L;37 ℃水浴,离心后又混悬于Tyrode液中,37 ℃孵育15 min后用荧光分光光度计测定荧光强度。公式为:[Ca^{2+}]i=kd(Fo-Fmin)/(Fmax-Fo)。④细胞存活

作者简介:冉擘力(1968-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心肌缺血再灌注损伤及血管再狭窄方面的研究。电话:(023)65428683

收稿日期:2000-09-05;修回日期:2000-12-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

率:通过台盼蓝染色来判断,死亡细胞呈蓝色,存活细胞则不着色。用细胞计数板计数100个细胞,计算存活细胞百分率。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 心肌细胞HSP72表达、SOD含量及[Ca^{2+}]i的变化规律

与对照组比较,PC后24 h复氧末A/R组SOD含量显著下降,[Ca^{2+}]i则明显增加($P<0.01$),HSP72表达无变化,但ILPC组和TNFα组SOD含量和HSP72表达较A/R组显著增加,[Ca^{2+}]i则明显减少($P<0.05$);PC后即刻各组差异无显著性($P>0.05$),见表1。

2.2 心肌细胞存活率、GSH及MDA含量变化规律

与对照组比较,PC后24 h复氧末各组细胞存活率及GSH含量均有显著下降,MDA含量显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),但ILPC组和TNFPC组细胞存活率及GSH含量的降幅和MDA增幅均较A/R组显著减小($P<0.05$);PC后即刻各组差异无显著性($P>0.05$),见表2。

表1 SOD含量、HSP72表达和[Ca^{2+}]i浓度变化规律($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of SOD contents, expressions of HSP72 and [Ca^{2+}]i concentrations ($\bar{x}\pm s$)

Group	SOD(nmol/ml)		HSP72(D_{460})		[Ca^{2+}]i(nmol/L)	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
Control	2.25±0.42	2.26±0.40	0.28±0.05	0.26±0.05	63.2±5.7	65.2±5.9
A/R	2.20±0.36	1.24±0.15 *	0.29±0.04	0.26±0.05	59.72±5.44	263.7±19.5 **
ILPC	2.35±0.60	6.40±0.45 **△△	0.30±0.05	0.70±0.06 **△△	63.27±5.77	175.8±18.2 **△
TNFPC	2.15±0.50	6.20±0.40 **△△	0.28±0.06	0.68±0.05 **△△	60.55±4.86	170.6±22.5 **△

Note: All the values were the average of 5 determinations; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* A/R

表2 细胞存活率、GSH和MDA含量变化规律($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of cell viability, GSH and MDA contents ($\bar{x}\pm s$)

Group	Cell viability(%)		MDA(nmol/ml)		GSH(nmol/ml)	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
Control	96.0±5.4	96.2±6.0	0.17±0.008	0.20±0.008	14.25±2.18	15.30±2.20
A/R	95.5±6.3	32.6±2.5 **	0.16±0.02	0.73±0.05 **	13.50±1.56	4.37±0.85 **
ILPC	94.7±5.5	63.4±5.5 *△	0.16±0.02	0.40±0.03 *△	14.80±2.16	8.22±1.35 **△
TNFPC	95.0±5.2	65.5±2.8 *△	0.15±0.03	0.44±0.04 *△	13.65±2.50	8.03±1.25 **△

Note: All the values were the average of 5 determinations; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* A/R

3 讨论

缺血预处理能够减轻心肌缺血再灌注损伤[3],但应用受到很多限制。目前,运用药物预处理防治冠心病正日益受到重视,大量证据表明,低剂量细胞因子如IL-1、TNF对生物体有保护作用,比如IL-1β(0.2~2 μg)可刺激血细胞生成和保护大鼠免受射线辐射[4],诱导肝细胞和成纤维细胞抗氧化酶的增加[5]。文献[6]报道,用IL-1α预处理大鼠6 h后,心肌Mn-SOD的mRNA表达增多,12 h后Mn-SOD蛋白质合成,24~48 h达高峰。本实验用IL-1β和TNF提前24 h预处理大鼠,我们发现,这有助于提高后期内源性心肌保护蛋白HSP72表达和抗氧化剂SOD、GSH含量,减少脂质过氧化物如MDA的形成,使细胞内钙超载的程度减轻,从而减轻细胞缺氧复氧所导致的损伤,而预处理后即刻上述指标无显著变化,说明细胞因子介导的保护作用主要在后期,其内在机制仍不清。研究表明,IL-1、TNF能激活蛋白质的基因表达[7],用IL-1预处理能激活细胞信号传导中蛋白激酶A(Protein kinase A, PKA)和蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)的活性,引起HSP的磷酸化[8]。且已有报道证实细胞核转录因子(Nuclear factor-kappa B, NF-κB)也参与了TNF和IL-1的生物学作用[9~11];这些都充分说明低剂量细胞因子诱导心肌延迟保护的产生涉及了细胞信号传导。从这些实验结果我们推测细胞因子模拟预处理诱导心肌延迟保护的机制可能是低剂量细胞因子引起类似于缺血或高温诱导的应激反应,引起早期心肌中性粒细胞积聚和氧化反应,通过细胞内信号传导影响细胞内抗氧化酶及保护蛋白的基因转录使延迟相心肌抗氧化酶活性及保护蛋白增加,从而发挥保护作用。这种特性使之在临床应用上有着广阔的前景,有望成为一种新的防治冠心病心绞痛、心肌梗塞的药物。

参考文献:

[1] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. J Biol Chem, 1985, 260(6):3 440—3 448.

[2] Stanimirovic D, Shapiro A, Wong J, *et al*. The induction of ICAM-1 in human cerebromicrovascular endothelial cell(HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion[J]. J Neuroimmunol, 1997, 76(2):193—205.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] 冉擘力, 司良毅, 王国超, 等. 缺血预处理对大鼠心肌离子泵、离子及氧自由基的影响[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(4): 333－335.
[4] Constine L S, Harwell S, Keng P, *et al*. Interleukin-1-alpha stimulates hemopoiesis but not tumor cell proliferation and protects mice from lethal total body irradiation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1991, 20(5): 447－456.
[5] Ono M, Kohda H, Kawaguchi T, *et al*. Induction of Mn-superoxide dismutase by tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 in human hepatoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 182(3): 1 100－1 107.
[6] Nogae C, Makino N, Hata T, *et al*. Interleukin 1α-induced expression of manganous superoxide dismutase reduces myocardial reperfusion injury in the rat[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(10): 2 091－2 099.
[7] Lieb K, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, *et al*. Interleukin-1 beta uses common and distinct signaling pathways for induction of the interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha genes in the human astrocytoma cell line U373[J]. J Neurochem, 1998, 66(4): 1 496－1 503.
[8] Xu Y X, Pindolia K R, Janakiraman N, *et al*. Curcumin inhibits IL-1 alpha and TNF-alpha induction of AP-1 and NF-κB DNA-binding activity in bone marrow stromal cells[J]. Hematopathol Mol Hematol, 1997, 11(1): 49－62.
[9] Marks Konczalik J, Chu S C, Moss J. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites[J]. J Biol Chem, 1998, 273(35): 22 201－22 208.
[10] Gottlieb R A, Gruol D L, Zhu J Y, *et al*. Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar, proton ATPase, and apoptosis[J]. J Clin Invest, 1996, 97(10): 2 391－2 398.
[11] Pindolia K R, Noth C J, Xu Y X, *et al*. IL-4 upregulates IL-1-induced chemokine gene expression in bone marrow stromal cells by enhancing NF-kB activation[J]. Hematopathol Mol Hematol, 1996, 10(2): 171－185.

（编辑 陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2001)07-0779-01

个案与短篇

静脉免疫球蛋白治疗重症格林-巴利综合征 38 例

Severe Guillain-Barre syndrome treated by intravenous immunoglobulin in 38 children

杨晓波, 王兴勇 （重庆医科大学儿童医院, 重庆 400014）

格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome, GBS)一旦并发呼吸衰竭, 急需紧急人工呼吸, 否则将危及生命。人工呼吸机的应用, 患儿的治疗费用往往成倍增长, 且常存在某些并发症。探讨能阻止 GBS 病情进展, 防止呼吸衰竭的发生, 是治疗重症 GBS 的有效举措。我院 1996－1999 年, 采用静脉免疫球蛋白(IVIG)治疗重症 GBS 38 例, 疗效满意, 报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

共 69 例, 男 31 例, 女 38 例; 年龄 2～13 岁; 均符合 GBS 诊断标准[1]。伴有颅神经麻痹 33 例次, 呼吸肌麻痹 21 例次, 感觉障碍 7 例。

1.2 分组及治疗方法

随机分两组: IVIG 治疗组 38 例, 其中男 20 例, 女 18 例, 平均年龄 6.47 岁, 四肢肌力≤Ⅱ、Ⅲ及Ⅳ级分别为 10、18、10 例, 呼吸肌麻痹及球麻痹分别为 20、14 例。对照组 31 例, 其中男 11 例, 女 20 例, 平均年龄 5.71 岁, 四肢肌力≤Ⅱ、Ⅲ及Ⅳ级分别为 6、15、10 例, 呼吸肌麻痹及球麻痹分别为 13、7 例。对照组采用神经营养药如 B 族维生素、脑活素等, 吸痰、给氧、对症、支持, 需气管插管者行人工呼吸等综合治疗。IVIG 组在对照组的基础上加用 IVIG 1 g/kg, 1 次疗法, 以后输同型血浆 5～10 $ml^{-1}\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, 连续 5 d。

1.3 疗效评定标准[2]

痊愈: 半年内四肢肌力恢复正常, 4 周内呼吸肌麻痹及球麻痹消失。

显效: 2 周内四肢肌力恢复较最重时恢复好转Ⅰ级档次, 呼吸肌麻痹及球麻痹症状在 10 d 内消失。好转: 2 周内肌力开始恢复且不进展恶化, 呼吸肌麻痹及球麻痹症状改善。无效: 2 周内呼吸肌麻痹及球麻痹症状无改善。

2 结果

两组疗效比较: 显效: IVIG 组 19 例, 对照组 11 例; 痊愈: IVIG 组 14 例, 对照组 3 例; 好转: IVIG 组 4 例, 对照组 10 例; 无效: IVIG 组 1 例, 对照组 7 例。平均住院日数: IVIG 组 16.36 d, 对照组 21.71 d; 上呼吸机人数: IVIG 组 1 例, 对照组 3 例; 并发症发生人数: IVIG 组 8 例, 对照组 12 例。

3 讨论

GBS 是一类免疫介导的急性或亚急性自发免疫性多发性周围神经病, IVIG 用于治疗 GBS 可能机制[3]是: 通过提供病毒中和抗体, 抗毒素抗体而直接发挥作用, 同时通过对抑制性 T 细胞及 B 细胞的抑制, 减少其抗毒素抗体或自身抗体的产生则间接的减少神经髓鞘消失; 另一方面通过阻断吞噬细胞 Fc 受体及消除循环免疫复合物保护自身组织和细胞不被破坏, 对于重症 GBS, 主张早期应用。

本组 69 例 GBS 患儿入院时病情差异无显著性。但 IVIG 组在疗效、并发症发生率、住院治疗天数等明显优于对照组, 有极

（下转 782 页）

作者简介: 杨晓波(1960－), 女, 江苏省常熟市人, 实验师。电话: (023) 63632756-3412

收稿日期: 2001-02-13; 修回日期: 2001-04-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net