DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.05.006



# 中性粒细胞对缺血心肌的损伤作用及药物防治的研究

李晓辉 唐汝恩 (第三军医大学基础部药理学教研室) 630038

**提 要** 异丙肾上腺素皮下注射 2h 循环白细胞即明显升高,反复注射 3 d 心肌方发生严重坏死。预先用环磷酰胺耗竭循环白细胞再致伤动物则心肌坏死明显减少。另一方面,对照组兔中性粒细胞(Neu)吞噬功能显著增强,酸性磷酸酶释放明显增多,显示 Neu 功能亢进;试用地塞米松、吲哚美辛抑制 Neu 功能再致伤动物,则心肌中前列腺素 $E_2$ 及丙二醛含量明显降低,超氧化物歧化酶活性显著升高,心肌坏死也随之明显减少,并与功能呈显著正相关。上述结果表明,Neu 通过释放溶酶体酶,产生氧自由基及花生四烯酸代谢产物等方式可能在心肌梗塞发病中有重要病理学作用,用药物调控 Neu 功能对心肌梗塞可产生一定防治效果,这为寻找防治心肌梗塞的新药开辟了新途径。

**关键词** 心肌梗塞;嗜中性白细胞;过氧化脂质类;前列腺素 E 类;地塞米松;吲哚美辛

近年临床研究发现,循环白细胞(尤以中性粒细胞 neutrophils,Neu)数量与心肌梗塞(myocardial infarction,MI)发生率关系密切,白细胞计数每增 1000/μl($1\times10^9$/L),MI 发生率即增加 14%[1];并且高的白细胞计数还预示病人 MI 后死亡率高及再次发生 MI 的可能性大[2]。另一方面,通常患有良性白细胞减少症的也门犹太人则极少发生 MI。上述提示白细胞与 MI 关系密切,可能在 MI 发病中有重要病理学作用,因而 MI 与白细胞关系的研究已引起国外学者的极大兴趣,但国内尚未见类似报道,故本文对 Neu 在 MI 中的可能作用及药物防治进行了初步实验探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

健康大耳兔 63 只,体重 1.90±0.21kg,性别不拘,由本校动物所提供。地塞米松,卫生部药品生物制品检定所提供;吲哚美辛,石家庄第一药厂产品;环磷酰胺,上海第十二制药厂产品;异丙肾上腺素(isoprenaline,Iso),上海信谊药厂产品;2,3,5-氯化三苯四氮唑,E. Merk 进口分装;前列腺素 $E_2$ 放免分析药盒,军科院基础所生化室提供;超氧化物歧化酶,上海生物化学研究所产品。

### 1.2 方法

参照 Ostadal[3] Iso 法制备急性心肌梗塞模型,并略加改进。即给兔背部皮下注射 Iso 10mg/kg,每日上、下午各 2 次,两次相隔 2 h,连续 3 d。采用 Lie[4] 氯化三苯四氮唑法染色坏死心肌(经病理切片证实),计算坏死心肌在全心所占百分率。参照文献方法[5]用环磷酰胺耗竭循环白细胞;采用密度离心法分离循环 Neu,常规法[6]测定 Neu 吞噬功能,比色法[7]测定 Neu 酸性磷酸酶;采用硫代巴比妥酸法[7]测定心肌过氧化脂质含量,化学发光法[8]测定超氧化物歧化酶活性,放免分析法[9]测定心肌前列腺素 $E_2$ 含量。

实验数据用本校数学教研室提供的程序包中 PDA-2、PDA-3 进行显著性检验及相关分析。

## 2 结果

### 2.1 环磷酰胺耗竭白细胞对心肌坏死量的影响

结果见表 1。Iso sc 2 h 循环白细胞即显著升高,反复注射可使心肌发生严重坏死;预先用环磷酰胺 iv 耗竭白细胞后再同法致伤动物,则心肌坏死明显减轻。将两组动物的循环白细胞计数与相应动物心肌坏死百分率进行相关分析,结果两者正相关显著($n=14$, $r=0.905$, $P<0.01$)。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 环磷酰胺对兔循环白细胞计数及心肌坏死量的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 Effects of cytoxan in circulating leukocyte count (c-LeuC) and percentage of myocardial necrosis induced by isoprenaline in rabbits（$\bar{x} \pm s$）

| | Control （$n=7$） | Cytoxan(iv,80mg/kg.dx3)（$n=7$） |
|---|---|---|
| C-LeuC($\times 10^9$/L) | | |
| Base level | 9.21±1.90 | 10.89±1.42 |
| After iv normal saline or cytoxan (the 3rd d) | 9.24±1.94 | 2.71±0.64$^{**\triangle\triangle}$ |
| After sc isoprenaline (the 2nd h) | 13.30±1.80$^{\triangle\triangle}$ | 3.12±0.56$^{**}$ |
| Percentage of myocardial necrosis (%) | 49.90±15.1 | 24.3±5.8$^{**}$ |

$^{\triangle\triangle}$ $P<0.01$, compared with corresponding base level; $^{**}$ $P<0.01$, compared with control

2.2 地塞米松、吲哚美辛对兔 Neu 功能及心肌坏死量的影响

结果见表 2。致伤对照组动物心肌梗死明显，Neu功能显著增强；若于用Iso造成MI同时给兔sc地塞米松1，2.5及7.5mg/kg每日1次，连续3 d，则能剂量依赖性地抑制 Neu 吞噬功能及溶酶体酶释放，并显著减轻心肌坏死。较大剂量的吲哚美辛有类似作用。

表 2 地塞米松、吲哚美辛对中性粒细胞功能及心肌坏死量的影响（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 Effects of dexamethasone (Dex) and indomethacin (Ind) on neutrophil functions and the percentage of myocardial necrosis (MN)（$\bar{x} \pm s$）

| | $n$ | Acid-phosphatase (K Unit/$10^7$ Neu) | Phagocytosis index | Phagocytisis % | MN % |
|---|---|---|---|---|---|
| Dex(mg/kg.d x 3) | | | | | |
| 1 | 7 | 20±9.6$^{*}$ | 0.37±0.05$^{*}$ | 33±11 | 33.7±8.7$^{*}$ |
| 2.5 | 7 | 17±9.2$^{*}$ | 0.32±0.06$^{*}$ | 24±6.7$^{*}$ | 28.4±6.8$^{**}$ |
| 7.5 | 7 | 8±2.9$^{**}$ | 0.25±0.08$^{**}$ | 19±6.1$^{**}$ | 24.9±9.0$^{**}$ |
| Ind(mg/kg.d x 3) | | | | | |
| 3.3 | 7 | 32±9.1 | 0.41±0.08 | 32±8.4 | 41.6±8.6 |
| 10 | 7 | 15 ±6.6$^{*}$ | 0.36±0.04$^{*}$ | 26±4.5$^{*}$ | 37.7±5.6$^{*}$ |
| 30 | 7 | 11±7.3$^{**}$ | 0.30±0.08$^{**}$ | 20±7.4$^{**}$ | 34.7±8.2$^{*}$ |
| Control | 7 | 34±11$^{\triangle\triangle}$ | 0.45±0.10$^{\triangle\triangle}$ | 35±6.9$^{\triangle}$ | 49.9±15.1 |
| Normal | 7 | 12±5.8 | 0.28±0.06 | 24±6.3 | ——— |

$^{\triangle}$ $P<0.05$, $^{\triangle\triangle}$ $P<0.01$ compared with normal; $^{*}$ $P<0.05$, $^{**}$ $P<0.01$ compared with control.

2.3 地塞米松、吲哚美辛对兔心肌花生四烯酸代谢及脂质过氧化的影响

结果见表 3。致伤对照组动物心肌花生四烯酸代谢产物 $PGE_2$ 含量及过氧化脂质 MDA 水平明显升高，SOD 活性显著降低。地塞米松、吲哚美辛在所用剂量下能不同程度地逆转这一变化，且呈剂量依赖性。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3 地塞米松、吲哚美辛对兔心肌花生四烯酸代谢及脂质过氧化的影响

Tab 3 Effects of dexamethasone (Dex) and indomethacin (Ind) on prostaglandin $E_2$ ($PGE_2$) content, malondialdehyde (MDA) level in myocardium and myocardial superoxide dismutase (SOD) activity

| | $n$ | $PGE_2$ (pg/mg. protein) | MDA (nmol/mg. protein) | SOD (unit/mg. protein) |
|---|---|---|---|---|
| Dex(mg/kg. d x 3) | | | | |
| 1 | 7 | 62±5.9** | 2.80±0.87* | 521±124** |
| 2.5 | 7 | 38±3.2** | 2.20±0.71* | 578±87** |
| 7.5 | 7 | 13±2.9** | 1.60±0.63** | 612±100** |
| Ind(mg/kg. d x 3) | | | | |
| 3.3 | 7 | 87±23* | 3.10±0.69 | 226±93 |
| 10 | 7 | 22±6.1** | 2.60±0.68* | 255±85 |
| 30 | 7 | 14±4.4** | 1.90±0.74** | 447±83** |
| Control | 7 | 163±76△△ | 3.40±0.73△△ | 218±114△△ |
| Normal | 7 | 12±4.4 | 0.97±0.30 | 560±69 |

$\bar{x}\pm s$, △△ $P<0.01$ copmared with normal; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control.

### 2.4 Neu 功能与心肌坏死量的相关分析

将对照组、地塞米松及吲哚美辛共7组动物($n=49$)Neu 或能与相应心肌坏死百分率进行相关分析,结果心肌坏死百分率与 Neu 吞噬指数相关系数 $r=0.513$, $P<0.01$,与 Neu 酸性磷酸释放相关系数 $r=0.544$, $P<0.01$。

## 3 讨论

心肌梗塞是一常见的心肌缺血性中老年危重疾病,对其发病机制的研究通常局限在高血脂,高血压吸烟等因素[1],但尚缺乏较有力的防治措施,提示其它重要致病因素的存在[1,2]。近年观察到循环白细胞数量与 MI 发生率关系密切[1]可能在 MI 中有重要病理学作用;这促使对其机制进行深入探讨,已引起医学界的极大兴趣[2]。

本文用 Iso 法造成缺血性心肌损伤,结果观察到 Iso sc 2 h 即能显著升高循环白细胞,反复注射 3 d 方致心肌明显坏死,说明白细胞升高发生于心肌坏死之前,可能也是 Iso 造成心肌损伤的一个重要因素。继之,本文试用环磷酰胺预先耗竭动物循环白细胞而后再 sc Iso,结果心肌坏死明显减轻,且其减轻程度与循环白细胞水平有较好相关性。国外学者也观察到,用抗血清耗竭狗 Neu 后再手术造成缺血再灌注模型,结果心肌梗死明显减少[4]。另一方面,本文还观察到致伤对照组兔 Neu 吞噬功能显著增强,酸性磷酸酶释放明显增加,显示 MI 时 Neu 处于功能亢进状态;活化的 Neu 除释放溶酶体酶外,还能产生毒性氧如氧自由基、羟自由基及过氧化氢等直接造成组织损伤[2,5,7],并通过生成大量的花生四烯酸代谢产物进一步激活,趋化 Neu 加重组织损伤[9,10]。本文用地塞米松,吲哚美辛抑制 Neu 功能[6],结果心肌中 $PGE_2$ 含量及 MDA 水平明显降低,SOD 活性升高,心肌坏死量也随之明显减少;即可能反映了活化 Neu 对兔心肌的损伤作用。相关分析显示两药减轻心肌梗死的作用与其抑制 Neu 功能的程度存在显著正相关关系,这与其它学者报道[10]体外能抑制 Neu 功能的萘氧唑酮(nafazatrom),体内能减轻缺血性心肌损伤的结果相吻合[10]。

上述结果显示,抑制心肌缺血动物的 Neu 功能或减少其数量均能一定程度地减轻心肌坏死,表明 Neu 在 MI 形成中有重要致病作用;药物调控 Neu 功能可对 MI 产生一定的防治效果,这为寻找防治 MI 的新药开

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

辟了新途径。

(致谢:本教研室宋裕南,李新芳副教授协助部分实验工作。)

## 参考文献

1. Grimm RH Jr, Neaton JD, Ludwig W, et al. Prognostic importance of the white blood cell count for coronary, cancer, and all-cause mortality. JAMA, 1985;254:1932
2. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, et al. Leukocytes and the risk of ischemic diseases. JAMA, 1987;257:2318
3. Ostadal B, Rychterova V, Poupa O. Isoproterenol-induced acute experimental cardiac necrosis in the turtle (Testudo Horsfield). Am Heart J, 1968;76:645
4. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation, 1983;67:1016
5. 冯中明 黎 鳌 杨宗城,等。自由基在大鼠烟雾吸入性损伤发病机制中的作用。中华整形烧伤外科杂志,1989;5:130
6. 唐汝愚 姚丹凡 何凤慈,等。消炎痛和苯丙酸衍生物对小白鼠腹腔白细胞数量、巨噬细胞吞噬功能及细胞内 cAMP 含量的影响。第三军医大学学报,1985;7:13
7. 陈思锋 张红红 李少华,等。狗磷脂酶 $A_2$ 与白细胞活性关系。基础医学与临床,1992;12:280
8. 李益新 方允中。一种测定超氧化物歧化酶的新方法——化学发光法。生物化学与生物物理进展,1983;(2):59
9. 程锦轩 段金虹 韩风云,等。前列腺素 $E_2$($PGE_2$)放射免疫测定方法。中国医学科学院学报,1987;9:229
10. Bednar M, Smith B, Pinto A, et al. Nafazatrom-induced salvage of ischemic myocardium in anesthetized dogs is mediated through inhibition of neutrophil function. Cir Res, 1985;55:131

(收稿:1992-11-09;修回:1993-06-14)

# Study of the injurious effects of neutrophils on myocardium and their medicinal therapy in rabbits

Li Xiaohui, Tang Ruyu (Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

**Abstract** It was found that there was a significant increase of the number of circulating leucocytes 2 h after a subcutaneous injcetion of isoprenaline and severe myocardial necrosis occurred after consecutive injections for 3 d. Cytoxan-induced depletion of leucocytes resulted in an obvious decrease of the percentage of myocardial necrosis. In the control, the neutrophilic phagocytosis was enhanced and their release of acid phosphatase elevated greatly, which indicates that the neutrophils are in an activated state. After the neutrophils were inhibited with dexamethasone or indomethacin, significant reduction of the contents of prostaglandin $E_2$ and malondialdehyde and an increase of superoxide dismutase activty in the myocardium were observed and consequently myocardial necrosis was greatly alleviated.

Our findings suggest that neutrophils might play an important role in the pathogenesis of myocardial infarction through the release of lysosomal enzymes and the production of oxygen-derived free radicals and certain metabolites of arachidonic acid, and proper regulation of the neutrophilic functions could exert prophylactic effects on myocardial infarction. This might be a promising direction to look for more effective drugs to treat myocardial infarction.

**Key words** myocardial infarction; neutrophils; lipid peroxides; prostaglandins E; dexamethasone; indomethacin

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net