

[文章编号] 1007-3949(2010)18-01-0047-05

• 实验研究 •

重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白联合缺血后适应减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤

孙辉¹, 彭亚飞², 林伟³, 钟玲⁴

(福建医科大学附属协和医院 福建省冠心病研究所, 福建省福州市 350001)

[关键词] 心肌缺血再灌注损伤; 肿瘤坏死因子 α ; 缺血后适应; 细胞凋亡

[摘要] 目的 研究重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白、缺血后适应及其合用对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法 48只SD大鼠随机分为四组,四组大鼠均采取开胸结扎冠状动脉前降支1h再灌注6h建立缺血再灌注动物模型,对照组不予任何处理;重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白组在缺血后30min静脉给予重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白溶液2mL/kg(1g/L);缺血后适应组在再灌注开始瞬间实施再灌注10s,缺血10s共3个循环;联合治疗组缺血后30min静脉给予重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白溶液2mL/kg(1g/L),再灌注开始瞬间实施再灌注10s,缺血10s共3个循环。检测再灌注不同时间点血浆肿瘤坏死因子 α 活性的变化,测定再灌注末血清乳酸脱氢酶和肌酸激酶同工酶的活性、缺血和梗死面积、缺血区心肌Caspase-3、Bcl-2的活性和细胞凋亡。结果 重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白组、缺血后适应组、联合治疗组较对照组血浆乳酸脱氢酶、肌酸激酶同工酶、肿瘤坏死因子 α (再灌注后30min,1h,3h及6h)活性、梗死面积、凋亡指数和Caspase-3活性均有明显降低($P < 0.01$),Bcl-2活性明显增加($P < 0.01$),其中联合治疗组效果最为显著($P < 0.01$),对肿瘤坏死因子 α 浓度的降低,再灌注30min和1h时缺血后适应组较重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白组显著($P < 0.01$),再灌注3h和6h时重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白组较缺血后适应组显著($P < 0.01$)。结论 重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白和缺血后适应均能抑制再灌注期间肿瘤坏死因子 α 活性,减少心肌细胞凋亡,二者联合治疗有叠加效应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effects of rhTNFR: Fc Combined with Ischemic Postcondition on the Rat Heart Ischemia-Reperfusion Injury

SUN Hu¹, PENG Ya-Fei², LN Wei³, and ZHONG Ling⁴

(Fujian Institute of Coronary Artery Disease, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China)

[KEY WORDS] Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury; Tumor Necrosis Factor- α ; Ischemic Postcondition; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the recombinant human tumor necrosis factor- α receptor (rhTNFR: Fc), IgG Fc fusion protein (rhTNFR: Fc), ischemic postcondition (postcon), and both combination on the prevention of myocardium ischemia/reperfusion injury. **Methods** 48 SD rats were randomly divided into four groups, all rats were subjected to 1 h of LAD occlusion followed by 6 h of reperfusion. In Control group, no interventions were applied; in rhTNFR: Fc group, rhTNFR: Fc solution (2 mL/kg, 1 g/L) was administered intravenously at 30 min after ischemia; in postcon group, three cycles of 10 s of reperfusion and 10 s of reocclusion was applied immediately at the onset of reperfusion; in combination therapy group, rhTNFR: Fc solution (2 mL/kg, 1 g/L) was administered intravenously at 30 min after ischemia and three cycles of 10 s of reperfusion and 10 s of reocclusion was applied immediately at the onset of reperfusion. We measured plasma lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels at different time after reperfusion and examined ischemic and infarct area, apoptosis, the activity of Caspase-3, Bcl-2 at risk myocardium at the end of reperfusion. **Results** rhTNFR: Fc, ischemic postcondition, both combination reduced the plasma LDH, CK-MB, TNF- α levels (at 30 min, 1 h, 3 h, 6 h after reperfusion), infarct area, apoptotic myocytes, Caspase-3 activity, increased Bcl-2 activity when compared with controls ($P < 0.01$). Ischemic postcondition reduced the plasma TNF- α more significantly than rhTNFR: Fc at 30 min and 1 h after reperfusion ($P < 0.01$). However, at 3 h and 6 h after reperfusion, rhTNFR: Fc reduced the plasma TNF- α more significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Both rhTNFR: Fc and ischemic postcondition can inhibit TNF- α activity, attenuate myocyte apoptosis, and there is an additive effect when used in combination.

[收稿日期] 2009-10-26

[修回日期] 2010-01-05

[作者简介] 孙辉, 硕士研究生, 研究方向为心肌缺血再灌注损伤的机制及对策, E-mail为 sunhuil09@163.com。通讯作者彭亚飞, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心力衰竭、冠心病的基础与临床。林伟, 硕士研究生, 研究方向为心肌梗死的机制及治疗。

心肌缺血后恢复再灌注是治疗心肌梗死的首要目标,然而再灌注本身也会导致心肌细胞不可逆的损伤,缺血再灌注会诱导大量炎症因子^[1,2]如白细胞介素 10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等的产生,高浓度的 TNF- α 参与心肌梗死后心肌的炎症反应,在心肌梗死的发生发展过程中起重要作用,在缺血再灌注损伤中扮演重要角色^[2,3]。研究表明,抑制缺血再灌注时期 TNF- α 的活性可以减轻缺血再灌注损伤,包括给予抗肿瘤坏死因子抗体^[4]、重组人肿瘤坏死因子受体融合蛋白(hTNFR:Fc)^[5]、敲除肿瘤坏死因子基因^[6,7]、利用转基因增加肿瘤坏死因子可溶性受体的表达^[8]。其中较易在临床推广应用的是 hTNFR:Fc,目前 hTNFR:Fc在国内已有商品化制剂益赛普。hTNFR:Fc是由人的肿瘤坏死因子膜外受体部分和人的免疫球蛋白(IgG1)的 Fc部分融合(hTNFR:Fc)而成的生物制品,hTNFR:Fc可特异性地与 TNF- α 结合,阻断其与细胞表面肿瘤坏死因子受体结合,抑制 TNF活性,临床上主要用于治疗类风湿性关节炎、强直性脊柱炎等自身免疫性疾病。缺血后适应是在再灌注早期阶段实施的反复几次短暂的缺血再灌注循环,近年来研究发现缺血后适应能减少再灌注时 TNF的产生^[9-11]。本研究通过建立大鼠缺血再灌注动物模型,研究 hTNFR:Fc联合后适应对心肌缺血再灌注损伤的保护作用并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验用雄性清洁级 SD 大鼠 48 只,体重 250~300 g 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 主要药品试剂与仪器

hTNFR:Fc(商品名益赛普,上海中信国健药业有限公司),大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司),TUNEL 凋亡试剂盒、Caspase-3(激活型)抗体和 Bcl-2 抗体(武汉博士德生物工程有限公司),小动物呼吸机(TKR-200C,江西特力麻醉呼吸设备公司),酶标仪(Bio-Rad 550)和电泳仪(Bio-Rad PAC 3000 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司),显微镜(CKX-31,日本 Olympus 公司)。

1.3 分组及给药方法

SD 大鼠随机分为四组,每组 12 只。四组大鼠均采用开胸结扎冠状动脉前降支缺血 1 h 再灌注 6 h 的方法建立缺血再灌注动物模型,对照组不予任何处理;hTNFR:Fc 组缺血 30 min 时自颈外静脉注射益赛普水溶液 2 mL/kg(1 g/L);缺血后适应组

再灌注开始瞬间实施再灌注 10 s 缺血 10 s 共 3 个循环;联合治疗组缺血 30 min 时自颈外静脉注射益赛普水溶液 2 mL/kg(1 g/L),再灌注开始瞬间实施再灌注 10 s 缺血 10 s 共 3 个循环。

1.4 大鼠心肌缺血再灌注模型制作

各组大鼠经 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉,以针形电极插于四肢皮下,观察记录标准肢体 II 导联心电图。气管插管接呼吸机,按 15 mL/g 潮气量,80 次/分的频率给予呼气末持续正压呼吸,吸气:呼气比为 1.5:1。胸骨左缘小心分离 3、4 肋间组织,暴露胸腔,使用小动物开胸器撑开两侧肋骨。小心破心包,左手用眼科镊夹一小棉球,用棉球将胸腺及左心耳轻轻向左推开,暴露动脉圆锥与左心耳根部间的左冠状静脉。以左冠状静脉为标志,用无创缝合针 8/0 号丝线在左心耳下方 2 mm 处缝一针。进针深度应穿过心肌 1 mm 左右,进出针间宽度应在静脉周围 1.5~2 mm 左右,结扎时用一细小塑料管(直径约 1.0 mm)垫于血管与结扎线之间,以活结结扎左冠状动脉前降支,分别造成阻断冠状动脉血流和再灌注。以左心室前壁发绀或呈浅红色及同步心电图示 ST 段抬高 0.1 mV 或 T 波高耸、QRS 变宽幅度升高为结扎成功标志。复灌时左心室前壁缺血区发绀消失。各组在大鼠结扎冠状动脉后,分离颈部皮下组织,颈外静脉放置留置针。缺血 1 h 后松开结扎线再灌注 6 h。

1.5 肿瘤坏死因子 α 和血清心肌酶学的测定

分别在再灌注后 0 min、30 min、1 h、3 h 及 6 h 自颈外静脉抽血,前 4 次每次抽取 0.5 mL,最后一次抽取 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min 分离血清,-20℃保存待测。测定所有时间点血浆 TNF- α 活性及再灌注后 6 h 肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH),具体步骤按试剂盒说明书操作。

1.6 心肌缺血区和坏死区范围的评定

缺血再灌注完毕,气管插管取胸部正中切口,暴露心脏,再次结扎阻断的左冠状动脉,从颈动脉注入 1% 伊文思兰 2 mL,待小鼠心脏蓝染后,取下心脏,冰冷生理盐水冲洗,游离左心室称重,并将无蓝染缺血区从蓝染非缺血区分离下来。将用滤纸吸干后置于 -20℃冰冻 10 min,垂直其长轴水平连续切 4~5 片,每片厚 2 mm,置入 1% TTC 磷酸缓冲液(pH 7.4)中 37℃孵育 20 min,10% 甲醛固定过夜,梗死区呈灰白色,非梗死区呈深红色,实体显微镜下放大 10 倍,用图像采集系统拍照后采用图像分析软件分别计算各部分的面积,并计算缺血区面积(AAR)占左心室面积(LV)的比例及梗死面积(IS)与缺血区面

积的比值 (IS/AAR)。

1.7 心肌细胞凋亡检测

再灌注后于心尖部 3 mm 取部分缺血区心肌组织, 4% 甲醛溶液中固定 24 h, 常规石蜡包埋、切片, 采用 TUNEL 法检测凋亡心肌细胞。光镜下正常心肌细胞核染成蓝色, 凋亡的细胞核呈棕褐色。每张切片在凋亡细胞阳性区域随机取高倍视野分别计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数, 以凋亡心肌细胞数占心肌细胞总数的百分比作为凋亡指数 (AI)。

1.8 Western blotting 法测定 Caspase-3 和 Bcl-2

再灌注后取缺血区心尖部心肌, 置于液氮中冻存后转至 -80°C 存放。称取冻存心肌样品 0.1 mg 冰浴, 各组心肌组织用裂解缓冲液提取总蛋白, 用 Bradford 方法进行蛋白定量。以每个样品的总蛋白为 20 μg 上样, 分别采用 8% SDS 和 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离, 转膜至 PVDF, 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗封闭 4°C 过夜, 二抗 37°C 孵育 1 h (羊抗兔), 最后用增强化学发光底物检测蛋白表达, 以 GAPDH 为内参, 用 BandScan 图像分析软件测定 Caspase-3、Bcl-2、GAPDH 的条带灰度值, 并与内参灰度值比较, 计算其比值。

1.9 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较用 LSD 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 多个时间点各组之间比较用重复测量的方差分析。

2 结果

2.1 术后动物存活率及死亡原因

模型建立中, 手术成功率达 91.7%, 共死亡 4 只, 其中对照组 1 只, shTNFR:Fc 组 2 只, 联合治疗组 1 只, 主要死亡原因有气管插管不当所致损伤、气胸、左心耳损伤出血等。

2.2 血清心肌酶水平比较

shTNFR:Fc 组、缺血后适应组及联合治疗组 CK-MB 和 LDH 水平降低, 与对照组相比有统计学意义 ($P < 0.01$), 联合治疗组 CK-MB 和 LDH 水平的降低与 shTNFR:Fc 组和缺血后适应组比较有统

计学意义 ($P < 0.01$; 表 1)。

2.3 心肌缺血和梗死范围比较

各组缺血区面积无显著性差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比, shTNFR:Fc 组、缺血后适应组和联合治疗组梗死面积明显减小 ($P < 0.01$), 联合治疗组梗死面积的减小与 shTNFR:Fc 组和缺血后适应组比较有统计学意义 ($P < 0.01$; 表 2)。

表 1 各组大鼠血清 CK-MB 和 LDH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

分组	CK-MB	LDH
对照组	3057.4 \pm 313.6	4657.1 \pm 538.4
shTNFR:Fc 组	2353.5 \pm 229.7 ^a	3347.3 \pm 391.8 ^a
缺血后适应组	2439.8 \pm 248.1 ^a	3429.6 \pm 383.6 ^a
联合治疗组	1986.4 \pm 235.3 ^{ab}	2867.4 \pm 298.3 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 shTNFR:Fc 组和缺血后适应组比较。

表 2 各组大鼠梗死面积和缺血面积比较

分组	AAR/LV	IS/AAR
对照组	48.8% \pm 6.9%	56.1% \pm 8.5%
shTNFR:Fc 组	47.9% \pm 5.3%	38.5% \pm 6.6% ^a
缺血后适应组	48.1% \pm 6.2%	39.9% \pm 5.4% ^a
联合治疗组	49.2% \pm 7.5%	30.8% \pm 4.9% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 shTNFR:Fc 组和缺血后适应组比较。

2.4 血清肿瘤坏死因子 α 水平的变化

对照组 TNF- α 水平在再灌注后迅速升高, 并在再灌注后 1 h 达到高峰, shTNFR:Fc 组、缺血后适应组和联合治疗组再灌注后 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$), 联合治疗更为显著 ($P < 0.01$; 表 3)。

2.5 细胞凋亡比较

经 TUNEL 染色及苏木素复染后正常心肌细胞核染色呈蓝紫色, 凋亡细胞核呈棕黄色。对照组凋亡细胞较多, 缺血后适应组、 shTNFR:Fc 治疗组和联合治疗组凋亡细胞较少。与对照组相比, 缺血后适应组、 shTNFR:Fc 组和联合治疗组凋亡指数显著降低 ($P < 0.01$), 其中以联合治疗组最为显著 ($P < 0.01$; 图 1 和表 4)。

表 3 大鼠再灌注后不同时间点血清 TNF- α 水平 (ng/L)

分组	0 min	30 min	1 h	3 h	6 h
对照组	626.8 \pm 87.1	2 078.6 \pm 271.5	2219.1 \pm 301.9	653.7 \pm 75.3	252.5 \pm 31.6
shTNFR:Fc 组	508.3 \pm 64.2 ^{ac}	1213.4 \pm 101.3 ^{ac}	987.4 \pm 118.6 ^{ac}	306.9 \pm 42.9 ^{ac}	73.8 \pm 66.4 ^{ac}
缺血后适应组	631.9 \pm 75.0	917.4 \pm 896.7 ^a	672.7 \pm 72.3 ^a	431.2 \pm 50.2 ^a	128.3 \pm 18.9 ^a
联合治疗组	491.1 \pm 58.2 ^a	605.6 \pm 709.6 ^{ab}	434.1 \pm 39.9 ^{ab}	227.6 \pm 27.1 ^{ab}	49.3 \pm 7.0 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 shTNFR:Fc 组和缺血后适应组比较; c 为 $P < 0.01$, 与缺血后适应组比较。

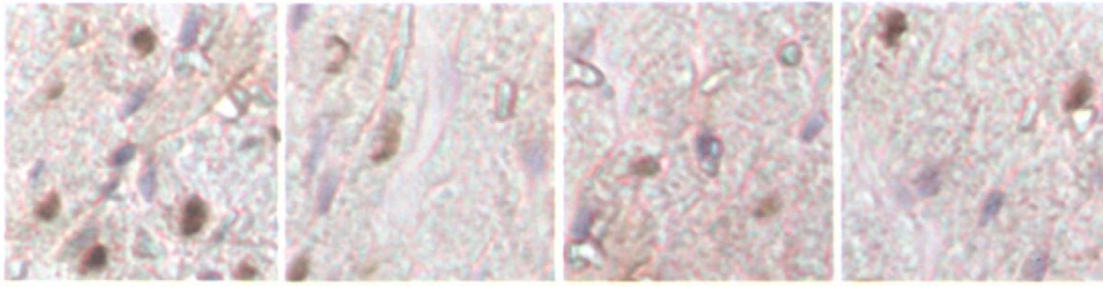


图 1 大鼠缺血区心肌 TUNEL 染色 ($\times 400$) 从左至右为对照组、rhTNFR:Fc 组、缺血后适应组和联合治疗组。

表 4 各组大鼠缺血区心肌细胞凋亡指数比较

分 组	凋亡指数
对照组	25.6% \pm 4.1%
rhTNFR:Fc	18.3% \pm 3.7% ^a
缺血后适应组	17.9% \pm 3.9% ^a
联合治疗	10.8% \pm 2.6% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 rhTNFR:Fc 组和缺血后适应组比较。

2.6 Caspase-3 和 Bcl-2 的表达

与对照组相比较, rhTNFR:Fc 组、缺血后适应组和联合治疗组 Caspase-3 表达明显减少 ($P < 0.01$), Bcl-2 表达明显增加 ($P < 0.01$), 其中尤以联合治疗组最显著 ($P < 0.01$; 图 2 和表 5)。

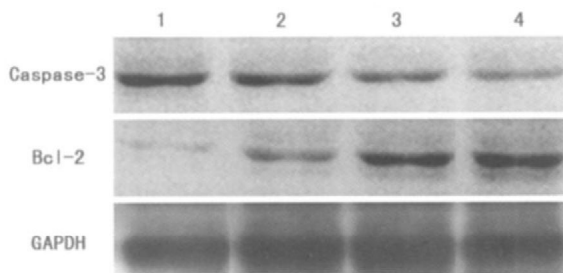


图 2 大鼠缺血区心肌 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达
~ 4 分别为对照组、rhTNFR:Fc 组、缺血后适应组和联合治疗组。

表 5 大鼠缺血区心肌 Caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达

分 组	Caspase-3	Bcl-2
对照组	60.9% \pm 8.5%	32.5% \pm 4.9%
rhTNFR:Fc 组	51.3% \pm 6.3% ^a	47.2% \pm 5.7% ^a
缺血后适应组	47.8% \pm 5.8% ^a	68.3% \pm 9.6% ^a
联合治疗组	38.4% \pm 5.5% ^{ab}	78.7% \pm 10.4% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 rhTNFR:Fc 组和缺血后适应组比较。

3 讨论

心肌梗死病情凶险、发病率高, 及时血运重建给予缺血心肌再灌注是治疗心肌梗死的首要目标, 但潜在的再灌注损伤可能会加重心肌细胞坏死、凋亡、心肌顿抑及无复流现象, 成为影响预后的一个重要因素。缺血再灌注损伤的机制之一是过度的炎症反应^[1, 2], TNF- α 是最重要的炎症因子之一。本研究测得缺血再灌注时 TNF- α 大量表达。虽然无论是否再灌注, 仅缺血就会导致 TNF- α 等炎症因子的大量产生, 研究发现再灌注会激活互联性炎症级联反应, 释放包括 TNF- α 在内的更多的炎症因子, 使炎症反应加速和放大^[12, 13]。缺血再灌注时高表达的 TNF- α 可通过多种途径对心肌造成损害, TNF- α 可以触发炎症因子的级联反应^[12, 14], 抑制心肌收缩^[2, 15], 诱导心肌细胞凋亡^[16], 促进巨噬细胞和中性粒细胞的趋化, 增强它们的吞噬和细胞毒性杀伤活性, 造成心肌组织持续的炎症破坏^[17]。大量研究证实抑制 TNF- α 是减轻缺血再灌注损伤的有效途径之一^[4-8]。研究发现, 缺血前静脉给予狗 rhTNFR:Fc 显著抑制 TNF- α 活性, 使再灌注后心肌收缩力、血压、心肌局部血流有所增加, 梗死面积、髓过氧化物酶、细胞间粘附分子 1、NF- κ B 表达均减少^[4]。然而心肌梗死的发生不可预知, 且 rhTNFR:Fc 价格昂贵, 作为长期预防用药难以实行, 因此在缺血后再灌注前静脉给予大鼠 TNF- α 抑制剂益赛普处理, 而且选择再灌注前 30 min 为给药时间点, 更符合临床实际情况, 本研究发现益赛普显著抑制再灌注期间, 尤其是再灌注后期 TNF- α 活性, 明显减少心肌细胞凋亡、降低心肌坏死标志物 LDH 及 CK-MB, 缩小心肌梗死面积。

后适应是在再灌注的早期阶段实施的反复几次缺血再灌注循环, 2003 年由 Zhao 等^[18] 首次发现并提出的, Staat 等^[19] 在心肌梗死患者的冠状动脉成

形术中,在开通冠状动脉血流的第一分钟内利用球囊反复四次缺血再灌注,发现对心脏起到保护作用。后适应保护再灌注心肌的可能机制主要包括主动激活再灌注损伤补救激酶(RISK)通路^[20];抑制 mPTP(线粒体膜转换孔通道)开放^[21],减少细胞凋亡;被动减少再灌注有害代谢物质的产生,减少氧自由基的产生,减轻钙超载^[22];减少中性粒细胞浸润。近年来研究还发现缺血后适应在转录水平上减少 TNF- α 的产生,抑制细胞凋亡^[9-11],这与我们的研究一致。进一步发现缺血后适应仅能减少再灌注早期 TNF- α 的产生,起效迅速但不持久。于是在再灌注前 30 min 给大鼠静脉注射益赛普,再灌注开始瞬间实施后适应,发现再灌注后 TNF- α 得到迅速而持久的抑制。

再灌注后高表达 TNF- α 得到积极有效的抑制无疑能减少再灌注诱发的心肌细胞凋亡,因为再灌注后高浓度的 TNF- α 的 Fas 相关的死亡蛋白结构域与 TNFR-1 相偶联导致多分子信号传导复合体的形成,并迅速激活下游信号通路,直接或间接磷酸化 Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7 等,最终导致程序性细胞死亡。在这个过程中 Bcl-2 参与调节 Caspase 级联活化过程,起到抑制凋亡的作用^[23-24]。通过本研究发现,shTNFR:Fc 后适应通过抑制再灌注后 TNF- α ,使 Caspase-3 表达减少、Bcl-2 表达增多、凋亡指数降低,二者联合应用效果更显著。凋亡是心肌梗死后细胞死亡的主要原因,是心肌梗死面积的决定因素。本研究中治疗组心肌细胞凋亡减少,LDH、CK-MB 降低,心肌梗死面积也明显缩小。

综上所述,shTNFR:Fc 联合缺血后适应可显著抑制再灌注后 TNF- α 的活性,减少心肌细胞凋亡,减轻再灌注损伤,作用迅速、持久,可操作性强。

[参考文献]

- [1] Madhulika S, Nimal KG, Gaurav C, et al. Release of pro-inflammatory mediators during myocardial ischemia/reperfusion in coronary artery bypass graft surgery [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, **247** (1-2): 23-30
- [2] Schulz R, Aker S, Belosjorow S, et al. TNF- α in ischemia/reperfusion injury and heart failure [J]. *Basic Res Cardiol*, 2003, **98**: 8-11
- [3] 云伟,于艳秋,卢晓梅,等.小鼠心肌梗死后肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6和白细胞介素10表达变化及心肌病理改变[J].中国动脉硬化杂志,2007, **15** (4): 245-247
- [4] Gurevitch J, Frokic I, Yuhua Y, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30**: 1554-561
- [5] Gu Q, Yang XP, Bonde P, et al. Inhibition of TNF-alpha reduces myo-

- cardial injury and proinflammatory pathways following ischemia-reperfusion in the dog [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, **48** (6): 320-328
- [6] Maekawa N, Wada H, Kanda T, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39**: 1229-235
- [7] Ren X, Wang Y, Jones WK. TNF- α is required for late ischemic preconditioning but not for remote preconditioning of trauma [J]. *Surg Res*, 2004, **121**: 120-129
- [8] Sugano M, Tsuchida K, Hata T, et al. In vivo transfer of soluble TNF- α receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats [J]. *FASEB J*, 2004, **18**: 911-913
- [9] Hajme K, NP Wang, James M, et al. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kB translocation and TNF- α release [J]. *Shock*, 2008, **29** (6): 761-768
- [10] Snay L, Kurthy M, Horvath SZ, et al. Ischemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2008, **40** (2): 133-142
- [11] Wang N, Lu JG, He XL, et al. Effects of ischemic postconditioning on reperfusion injury in rat liver grafts after orthotopic liver transplantation [J]. *Hepatol Res*, 2009, **39** (4): 382-390
- [12] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML, et al. The inflammatory response in myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, **53**: 31-47
- [13] Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, et al. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium [J]. *Am J Pathol*, 1995, **146**: 419-428
- [14] Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Circulation*, 1998, **7**: 699-710
- [15] Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, et al. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart [J]. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 2303-312
- [16] Akasaka Y, Morimoto N, Ishikawa Y, et al. Myocardial apoptosis associated with the expression of proinflammatory cytokines during the course of myocardial infarction [J]. *Mod Pathol*, 2006, **19** (4): 588-598
- [17] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, **53** (1): 31-47
- [18] Zhao ZQ, Corvers JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **285** (1): H579-588
- [19] Staat G, Rioufol C, Piot Y, et al. Postconditioning the human heart [J]. *Circulation*, 2007, **116** (12): 1344-345
- [20] Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, et al. Postconditioning: A form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway [J]. *Circ Res*, 2004, **95**: 230-232
- [21] Laurent A, Odile GR, Olivier R. Postconditioning Inhibits Mitochondrial Permeability Transition [J]. *Circulation*, 2005, **111**: 194-197
- [22] Sun HY, Wang NP, Faraz K, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **288**: H1900-908
- [23] 余泽洪,邹玮,陈林祥,等.伊贝沙坦对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡及相关基因 Bax, Bcl-2 和 P53 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (4): 415
- [24] Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond [J]. *Cell Res*, 2005, **15** (1): 24-27

(此文编辑 文玉珊)