

曲美他嗪影响巴马小型猪冠状动脉微栓塞后 心肌细胞凋亡的机制

刘阳春, 李浪, 苏强, 刘涛, 麻芝英, 王现涛

(广西医科大学第一附属医院心内科 广西心血管病研究所, 广西南宁市 530021)

[关键词] 曲美他嗪; 冠状动脉; 微栓塞; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 探讨曲美他嗪对巴马系小型猪急性冠状动脉微栓塞(CME)后心肌细胞凋亡的影响及意义。**方法** 健康巴马系小型猪随机分为假手术组、CME组和CME+曲美他嗪组,每组5只。采用经皮冠状动脉介入法,于左前降支中远端经微导管注入微栓塞球建立CME模型;假手术组注入等量生理盐水;CME+曲美他嗪组术前30 min经耳缘静脉注入曲美他嗪。术后9 h采用心脏超声检测心功能,TUNEL染色检测心肌细胞凋亡,Western blot检测活化Caspase-8和Caspase-3表达水平。**结果** 与假手术组相比,CME组左心室射血分数(LVEF)、左心室短轴缩短率(FS)及心排血量(CO)下降,左心室舒张期末内径(LVEDd)增加($P < 0.05$);与CME组相比,CME+曲美他嗪组心功能明显改善($P < 0.05$)。与假手术组相比,CME组心肌细胞凋亡率、活化Caspase-8及Caspase-3含量显著增加($P < 0.05$);与CME组相比,CME+曲美他嗪组心肌细胞凋亡率、活化Caspase-8及Caspase-3含量明显减少($P < 0.05$)。**结论** 曲美他嗪预处理可明显减少CME后心肌细胞凋亡并改善心功能,其机制可能是阻断心肌细胞Caspase-8介导的死亡受体凋亡途径的激活。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Pretreatment with Trimetazidine on Cardiomyocyte Apoptosis After Coronary Microembolization in Swine

LIU Yang-Chun, LI Lang, SU Qiang, LIU Tao, MA Zhi-Ying, and WANG Xian-Tao

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[KEY WORDS] Trimetazidine; Coronary Artery; Microembolization; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of trimetazidine on cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization (CME) in swine. **Methods** Fifteen swine were randomly and equally assigned into sham-operated (control) group, CME group and trimetazidine group. CME was induced by injection of microspheres selectively into left anterior descending artery; for control group, the same dose of normal saline was substituted for microspheres; and those in trimetazidine group were pretreated with trimetazidine 30 min before microspheres injection. Cardiac function was assessed by echocardiography, cardiomyocyte apoptosis was detected by TUNEL staining, and the expression levels of caspase-8 and caspase-3 were measured by Western blot 9 h after operation. **Results** Compared with sham-operated group, cardiac function was significantly decreased in CME group ($P < 0.05$); However, cardiac function was significantly improved in trimetazidine group compared with CME group ($P < 0.05$). Compared with control group, myocardial apoptosis rate and the levels of activated caspase-8 and -3 increased significantly in CME group ($P < 0.05$). Again, these effects were ameliorated by trimetazidine ($P < 0.05$). **Conclusion** Trimetazidine pretreatment suppressed post-CME myocardial apoptosis and improved cardiac function probably by inhibiting myocardial death receptor-mediated apoptotic pathway.

冠状动脉微栓塞 (coronary microembolization, CME) 是冠状动脉血栓性病变溶栓或经皮冠状动脉

[收稿日期] 2014-07-10

[修回日期] 2014-04-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81260042)

[作者简介] 刘阳春, 硕士研究生, 研究方向为冠心病介入诊疗, E-mail 为 liuyangc1989@foxmail.com。通讯作者李浪, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病介入诊疗, E-mail 为 drlilang@163.com。苏强, 博士研究生, 研究方向为冠心病介入诊疗。

介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)过程中常见并发症^[1],可导致术后即刻“无血流”或“慢血流”,是患者远期预后不良和主要心脏不良事件发生的强烈预测因子^[2]。既往研究发现,CME致心肌损伤除与心肌局部炎性反应密切相关外^[3],微栓塞所致心肌细胞凋亡亦发挥了重要作用^[4]。曲美他嗪是一种新型抗心肌缺血药,可改善心肌代谢、增加心肌能量供应,对心肌细胞具有独特的保护作用^[5]。临床研究表明,PCI术前给予曲美他嗪可显著减轻围术期心肌损伤,使心功能得到明显改善^[6-7]。动物实验证实,心肌缺血再灌注前给予曲美他嗪预处理可减小心肌梗死面积,改善心功能,并认为曲美他嗪的心血管保护作用可能与其具有的抗心肌细胞凋亡有关^[8,9],然而曲美他嗪在CME中的作用及具体机制尚未明确。因此,本研究通过建立猪CME模型,观察曲美他嗪预处理对猪CME后心肌细胞凋亡的影响,以探讨曲美他嗪防治CME致心肌损伤的作用机制,为CME的临床防治提供重要理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

40~120 μm 微栓塞球(Biosphere Medical Inc);曲美他嗪(施维雅,法国,生产批号:H20055465);TUNEL试剂盒(Roche, USA);兔抗猪Caspase-8及Caspase-3多克隆抗体购自美国Abcam公司,兔抗猪GAPDH多克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;羊抗兔荧光二抗购自美国LI-COR公司;0.014英寸Runthrough导丝(Terumo Medical Corporation);微导管(1.8F, Terumo Medical Corporation);指引导管(6F, JR4.0, Cordis Inc);彩色M型超声(Philips sonos 7500型);DMR+Q550病理图像分析仪(Leica,德国);Odesay双色红外激光成像系统扫描仪(LI-COR,美国)。

1.2 实验动物及分组

健康巴马系小型猪,雌雄不拘,体重25~30 kg,由广西大学动物科学技术学院提供(许可证号:SCXK桂2007-0003)。实验动物饲养于清洁环境中,自由饮用纯净水及饲料,实验过程符合《中华人民共和国实验动物管理条例》及伦理要求。15只巴马系小型猪随机分为假手术组($n=5$)、CME组($n=5$)以及CME+曲美他嗪组($n=5$)。CME+曲美他嗪组术前30 min经耳缘静脉注射曲美他嗪2.5

mg/kg^[10-11],假手术组和CME组给予等量生理盐水。各组实验动物的体重和心率差异无显著性($P>0.05$)。

1.3 猪CME模型的建立

参考Chen等^[12]的方法,我们前期已成功建立猪CME模型^[13-14],具体步骤如下:巴马系小型猪经氯胺酮(5~10 mg/kg)肌注诱导麻醉后,予地西洋0.5 mg/(kg·h)静注维持麻醉。分离穿刺一侧股动脉,植入6F动脉鞘,经鞘注入肝素200 U/kg达肝素化,后以100 U/(kg·h)维持。行冠状动脉造影,并经指引导管送入微导管至左前降支分出第一对角支后的远端,经微导管注入10万计数微栓塞球建立猪CME模型。术毕肌注80万U青霉素预防感染。同样操作过程,以注射等量生理盐水作为假手术组。

1.4 心功能检测

术后9 h检测各组实验动物左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室舒张期末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd)、左心室短轴缩短率(short axis fractional shortening, FS)和心排量(cardiac output, CO)。探头频率为12 MHz。所有测量值均取三个心动周期的平均值。

1.5 组织取材

检测心功能后,经耳缘静脉注入10 mL 10%氯化钾处死实验动物,立即开胸取出心脏,去除心耳、心房,平行于房室沟于左心室长轴中点处,将心室分为心尖部和心底部。心尖部立即用液氮速冻后转入-80℃冰箱保存,用于Western blot检测;心底部用4%多聚甲醛固定12 h后,石蜡包埋,分别连续切片≥12张(每张厚4 μm),采用HE染色和苏木精碱性复红苦味酸(HBFP)染色检测心肌微梗死面积,TUNEL染色检测心肌细胞凋亡。

1.6 心肌微梗死面积测量

HBFP染色是诊断早期心肌缺血的一种重要染色方法。缺血心肌、红细胞呈红染,正常心肌胞浆黄染、胞核蓝染。采用DMR+Q550病理图像分析仪,每张HBFP染色切片随机选取5个视野($\times 100$),使用Leica Qwin分析软件(德国)平面法测量心肌梗死区域,结果表示为总分析切片面积的百分比,取平均值^[15]。

1.7 TUNEL染色检测心肌细胞凋亡

按试剂盒说明书操作,光镜下凋亡细胞核呈棕黄色(TUNEL阳性),每张切片分别在梗死区、梗死边缘区和远离梗死区,随机选取共40个非重叠400

高倍镜视野,计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数,心肌细胞凋亡率 = 凋亡心肌细胞数/心肌细胞总数 $\times 100\%$ [16]。

1.8 Western Blot 检测心肌组织中 Caspase-8 及 Caspase-3 蛋白含量

用组织裂解液提取心肌组织总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品,配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干法转膜 30 min,用 TBST 配置的 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 清洗后,放入兔抗猪 Caspase-8 (1:1000) 或 Caspase-3 (1:1000) 多克隆抗体,以兔抗猪 GAPDH (1:2000) 作为内参,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 5 min \times 5 次,羊抗兔红外荧光二抗 (1:5000) 室温孵育 2 h 后双色红外激光成像系统扫描成像。采用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析软件 (Bio-Rad 公司) 分析目标条带的灰度值,经 GAPDH 校正后,分别以

Caspase-8、Caspase-3 灰度值与 GAPDH 灰度值比值反应 Caspase-8、Caspase-3 相对表达水平。

1.9 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组实验动物心功能的比较

与假手术组相比,CME 组术后 9 h LVEF、FS、CO 明显下降,LVEDd 明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 CME 组比较,CME + 曲美他嗪组 LVEF、FS、CO 有所升高,LVEDd 减小,差异有统计学意义 ($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 各组小型猪心功能指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Changes of cardiac function in each group ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	LVEF	FS	CO (L/min)	LVEDd (cm)
假手术组	5	67.28% \pm 1.58%	40.93% \pm 1.89%	3.91 \pm 0.23	3.49 \pm 0.13
CME 组	5	55.01% \pm 3.70% ^a	30.62% \pm 4.23% ^a	3.17 \pm 0.28 ^a	4.43 \pm 0.14 ^a
CME + 曲美他嗪组	5	61.68% \pm 2.35% ^b	36.57% \pm 1.74% ^b	3.50 \pm 0.19 ^b	3.98 \pm 0.24 ^b

a 为 $P < 0.05$,与假手术组相比;b 为 $P < 0.05$,与 CME 组相比。

2.2 CME 病理学改变

HBFP 染色结果显示,假手术组偶见心内膜下缺血,未见明显心肌微梗死灶;CME 组和 CME + 曲美他嗪组均可见多发心肌微梗死灶,多为楔形,呈局灶性分布,非透壁性,以内膜下和左心室多见 (图

1)。HE 染色显示微梗死灶内心肌细胞核溶解或消失,胞浆红染,周边细胞水肿、变性,周围炎性细胞浸润和红细胞渗出 (图 2)。CME 组和 CME + 曲美他嗪组梗死面积分别为 (9.25 \pm 2.39)% 和 (8.71 \pm 2.01)% ,两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

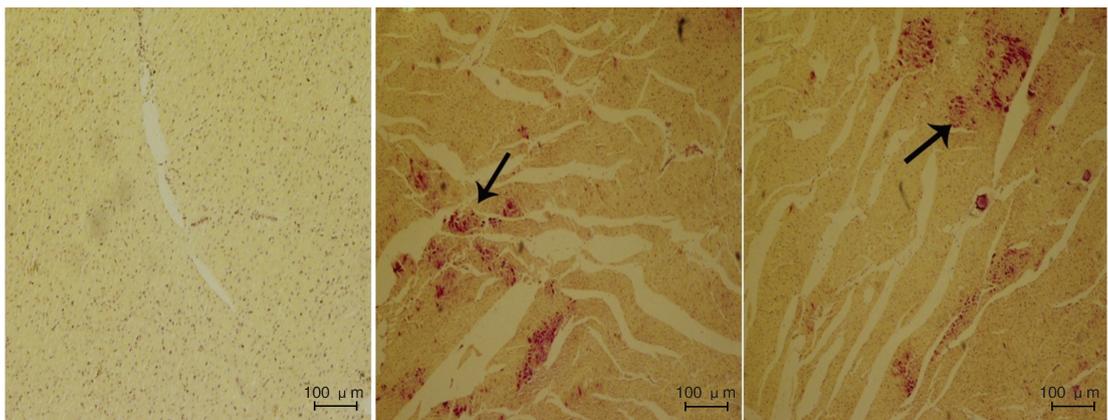


图 1. 各组小型猪心肌微梗死灶 (HBFP) 从左到右分别为假手术组、CME 组以及 CME + 曲美他嗪组。缺血心肌红染,箭头示微梗死灶。

Figure 1. Microinfarcts (arrow) in each group (HBFP)

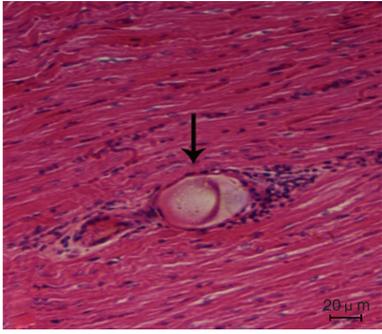


图 2. CME 组局部心肌微梗死灶(HE) 箭头示微球。
Figure 2. Microinfarct in coronary microembolization group(HE, $\times 400$)

2.3 心肌细胞凋亡情况

凋亡心肌细胞 TUNEL 染色细胞核呈棕黄色 (TUNEL 阳性), 正常细胞核呈淡蓝色 (图 3)。CME

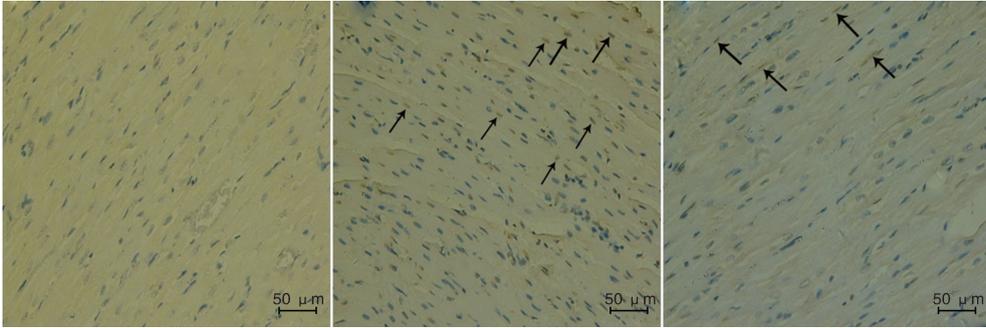


图 3. 各组小型猪心肌细胞凋亡 (TUNEL) 从左到右分别为假手术组、CME 组以及 CME + 曲美他嗪组。箭头示凋亡心肌细胞核。
Figure 3. Cardiomyocyte apoptosis (arrow) after coronary microembolization in each group(TUNEL)

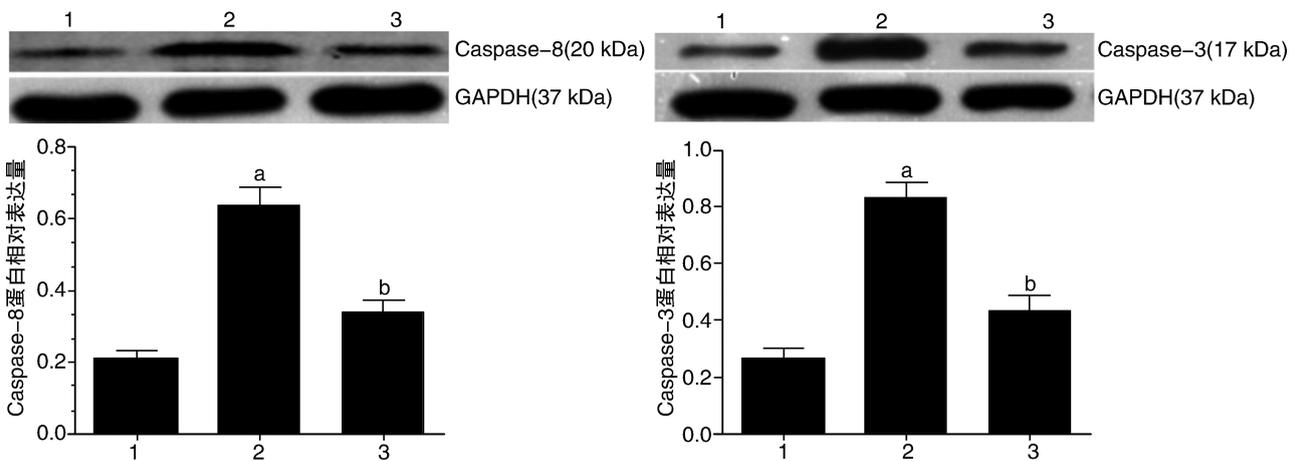


图 4. 曲美他嗪对冠状动脉微栓塞后活化 Caspase-8 和 Caspase-3 表达的影响 1 为假手术组, 2 为 CME 组, 3 为 CME + 曲美他嗪组。a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CME 组比较。

Figure 4. Effect of trimetazidine on caspase-8 and caspase-3 expression after CME

3 讨论

冠状动脉微栓塞 (CME) 是急性冠状动脉综合

后心肌细胞凋亡主要存在于微梗死灶及其周围, 假手术组偶见心肌细胞凋亡存在于心内膜下与乳头肌处。假手术组、CME 组及 CME + 曲美他嗪组心肌细胞凋亡率分别为 $0.46\% \pm 0.18\%$ 、 $9.85\% \pm 2.47\%$ 及 $3.86\% \pm 1.67\%$ 。与假手术组相比, CME 组心肌细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.05$); 与 CME 组相比, CME + 曲美他嗪组心肌细胞凋亡率显著减小 ($P < 0.05$)。

2.4 心肌组织活化 Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白的表达

Western blot 定量分析显示, 与假手术组相比, CME 组心肌组织活化 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达水平较高 ($P < 0.05$); 与 CME 组相比, CME + 曲美他嗪组活化 Caspase-8 及 Caspase-3 表达水平较低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 4)。

征及冠状动脉介入治疗中常见临床事件, 表现为动脉粥样硬化斑块自发或由于溶栓、介入治疗导致斑块破裂产生微小栓子造成冠状动脉微循环栓塞和

微梗死^[17]。研究显示,CME 常引起微循环功能障碍并显著降低心肌收缩功能,是远期预后不良和主要心脏不良事件发生的强烈预测因子^[2,18]。关于 CME 致心肌损伤的机制,既往研究发现 CME 后冠状动脉血流短暂减少即可恢复正常,而局部心肌收缩能力却进行性降低,说明 CME 致心肌损伤的机制并非冠状动脉血流减少^[19]。进一步研究显示,CME 常伴心肌局部炎症反应和心肌细胞凋亡,并认为心肌细胞凋亡在 CME 致心肌损伤中发挥重要作用^[15-16]。我们前期实验已证实心肌细胞凋亡在 CME 致心肌损伤中发挥重要作用,而抑制心肌细胞凋亡后心功能明显改善^[4,20]。

曲美他嗪为哌嗪类衍生物,主要通过抑制线粒体长链 3-酮酰辅酶 A 硫解酶,减少脂肪酸氧化和增加葡萄糖供氧,减轻心肌细胞内酸中毒,增加碳水化合物利用等来改善心肌代谢^[21];此外,曲美他嗪亦可通过减少氧自由基生成^[22]、抑制心肌细胞凋亡^[9]、改善内皮细胞功能^[23]等发挥心肌保护作用。研究显示,PCI 术前给予曲美他嗪可显著减轻 PCI 所致心肌损伤,改善心功能^[24-25]。动物实验表明,心肌缺血再灌注前给予曲美他嗪可明显减轻心肌损伤,保护心功能^[9]。我们前期研究发现注入 10 万计数微球可成功制作小型猪急性 CME 模型,同时在 CME 9 h 后心功能降至最低^[13-14]。因此,本研究选取 CME 后 9 h 作为观察点。本研究证实,与假手术组相比,CME 9 h 后心肌出现多发微梗死灶,心肌细胞出现凋亡与坏死,心功能下降,静脉注射曲美他嗪可显著改善心功能并减少 CME 所致心肌细胞凋亡。因心肌细胞是不可再生细胞,抑制心肌细胞凋亡可能是曲美他嗪改善 CME 预后的重要机制之一。曲美他嗪预处理后心肌微梗死面积虽没有显著差异,但是本研究发现微梗死灶周围的心肌细胞凋亡是显著减少的,这可能会抑制心肌梗死的进展。

细胞凋亡途径主要包括外源性细胞膜表面死亡受体途径、内源性线粒体途径和内质网途径。死亡受体凋亡途径是靶细胞表面的死亡受体与配体结合而导致死亡结构域(DD)与连接蛋白(FADD)碳末端的 DD 结合,从而激活 Caspase-8 及下游 Caspase-3,并最终引起细胞凋亡。死亡受体属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族,其胞外部分有一富含半胱氨酸的区域,胞质内有一由同源氨基酸残基构成的具有蛋白水解功能 DD。目前死亡受体主要包括 5 种,分别介导 Fas/FasL、TRAIL/TRAIL-R 及 TNFR1/TNF- α 凋亡通路。当配体与相关细胞表面的死亡受体结合,通过胞浆内 DD 与 FADD 结合,

FADD 效应结构域与 pro-caspase-8 结合形成死亡诱导信号复合物(DISC)。pro-caspase-8 具有弱的催化活性,在 DISC 中的局部浓度升高,可发生自我剪接并活化。活化的 Caspase-8 释放到胞质中启动 Caspase 的级联反应,激活下游的 Caspase-3 等,导致细胞凋亡。因此,Caspase-8 是死亡受体凋亡途径中的关键凋亡蛋白^[26-27],而 Caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,也是细胞凋亡的主要效应分子和最重要的凋亡执行者^[28-29]。我们早前研究已证实 Caspase-8 介导的死亡受体凋亡途径显著激活是 CME 致心肌细胞凋亡及心功能损伤的重要机制^[30],而抑制心肌细胞死亡受体凋亡途径的激活可显著抑制心肌细胞凋亡并改善心功能^[4]。本研究结果显示,与 CME 组相比,给予曲美他嗪预处理可显著抑制 CME 后心肌细胞死亡受体凋亡途径的激活,主要表现为显著抑制心肌组织活化 Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达,降低心肌细胞凋亡率,提示曲美他嗪减少 CME 后心肌细胞凋亡,改善心功能,与阻断 Caspase-8 介导的死亡受体凋亡通路有关。

本研究以微导管介入技术建立的巴马系小型猪 CME 模型作为实验对象,主要出于以下考虑:(1)以大鼠为代表的小动物 CME 模型,均采用开胸的方法,在夹闭升主动脉的同时,经心尖部或主动脉根部注入微栓塞剂^[3]。虽然成本较低,易于操作,但开胸手术对实验动物造成了较大损伤,而由此引发的全身炎症反应将明显干扰、影响 CME 所致心肌损伤相关分子机制的探讨,并且此模型亦不符合临床上 CME 发生的病理生理情况;(2)猪的心脏结构和冠状动脉系统较狗或羊等动物而言更接近人的心脏,以微导管技术建立猪 CME 模型,在避免上述不利因素的同时,能更好的反映、模拟临床上 CME 所致心肌损伤的病理生理改变^[31]。当然,本研究采用的微栓塞剂为塑料微球,与临床上动脉粥样硬化斑块破裂所形成的富含血小板、内皮细胞以及胆固醇等具有生物活性的栓塞物质不同,可能不能很好地反映临床上斑块破裂所导致的复杂病理生理改变。因此,制备具有上述生物活性的栓塞物质,对进一步完善 CME 动物模型具有重要意义,为今后进一步开展探讨 CME 致心肌损伤的具体分子机制具有重要价值。

综上所述,曲美他嗪可通过抑制心肌细胞死亡受体凋亡途径中的关键凋亡蛋白 Caspase-8 的活化,从而抑制 CME 所致心肌细胞凋亡,该机制可能是 PCI 术前预防性应用曲美他嗪改善患者预后的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Heusch G, Schulz R, Haude M, et al. Coronary microembolization [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 37(1): 23-31.
- [2] Brosh D, Assali AR, Mager A, et al. Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality[J]. *Am J Cardiol*, 2007, 99(4): 442-445.
- [3] Li L, Zhao X, Lu Y, et al. Altered expression of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with reduced cardiac function in rats following coronary microembolization [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342(1-2): 183-190.
- [4] Li L, Su Q, Wang Y, et al. Effect of atorvastatin (Lipitor) on myocardial apoptosis and caspase-8 activation following coronary microembolization[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 61(2): 399-406.
- [5] Szwed H. Clinical benefits of trimetazidine in patients with recurrent angina[J]. *Coron Artery Dis*, 2004, 15 (Suppl 1): S17-21.
- [6] Labrou A, Giannoglou G, Zioutas D, et al. Trimetazidine administration minimizes myocardial damage and improves left ventricular function after percutaneous coronary intervention[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2007, 7(2): 143-150.
- [7] 苏强, 李浪, 黄伟强, 等. 曲美他嗪对不稳定型心绞痛患者经皮冠状动脉介入治疗围术期炎症因子的影响[J]. *中国全科医学*, 2013, 15(35): 4 156-159.
- [8] Yin RX, Liang WW, Liu TW, et al. Inhibitory effect of trimetazidine on cardiac myocyte apoptosis in rabbit model of ischemia-reperfusion[J]. *Chin Med Sci J*, 2004, 19(4): 242.
- [9] Khan M, Meduru S, Mostafa M, et al. Trimetazidine, administered at the onset of reperfusion, ameliorates myocardial dysfunction and injury by activation of p38 mitogen-activated protein kinase and Akt signaling[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333(2): 421-429.
- [10] Castedo E, Segovia J, Escudero C, et al. Ischemia-reperfusion injury during experimental heart transplantation. Evaluation of trimetazidine's cytoprotective effect [J]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2005, 58(8): 941-950.
- [11] 赵艳芳, 秦永文, 王学敏, 等. 曲美他嗪对大鼠缺血再灌注心肌线粒体的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(2): 171-174.
- [12] Chen Z, Qian J, Ma J, et al. Glucocorticoid ameliorates early cardiac dysfunction after coronary microembolization and suppresses TGF-beta1/Smad3 and CTGF expression[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(5): 2 278-284.
- [13] 苏强, 李浪, 马国添, 等. 猪急性冠状动脉微栓塞模型的建立[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(4): 335-339.
- [14] Su Q, Li L, Zhou Y, et al. Induction of myocardial PDCD4 in coronary microembolization-related cardiac dysfunction: evidence from a large-animal study [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(2): 533-542.
- [15] Thielmann M, Dorge H, Martin C, et al. Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine[J]. *Circ Res*, 2002, 90(7): 807-813.
- [16] Zhang QY, Ge JB, Chen JZ, et al. Mast cell contributes to cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(5): 515-523.
- [17] Heusch G, Kleinbongard P, Bose D, et al. Coronary microembolization: from bedside to bench and back to bedside [J]. *Circulation*, 2009, 120(18): 1 822-836.
- [18] Jaffe R, Charron T, Puley G, et al. Microvascular obstruction and the no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention [J]. *Circulation*, 2008, 117(24): 3 152-156.
- [19] Ma J, Qian J, Ge J, et al. Changes in left ventricular ejection fraction and coronary flow reserve after coronary microembolization [J]. *Arch Med Sci*, 2012, 8(1): 63-69.
- [20] Su Q, Li L, Liu YC, et al. Effect of metoprolol on myocardial apoptosis and caspase-9 activation after coronary microembolization in rats [J]. *Exp Clin Cardiol*, 2013, 18(2): 161-165.
- [21] Bertomeu-Gonzalez V, Bouzas-Mosquera A, Kaski JC. Role of trimetazidine in management of ischemic cardiomyopathy [J]. *Am J Cardiol*, 2006, 98(5A): 19J-24J.
- [22] Maridonneau-Parini I, Harpey C. Effect of trimetazidine on membrane damage induced by oxygen free radicals in human red cells [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1985, 20(2): 148-151.
- [23] Park KH, Park DW, Kim MK, et al. Effects of sheath injury and trimetazidine on endothelial dysfunction of radial artery after transradial catheterization [J]. *J Interv Cardiol*, 2012, 25(4): 411-417.
- [24] Chen YD, Zhao LK, Tian F, et al. Evaluation of the myocardial protection of trimetazidine during percutaneous coronary intervention: a multi-center randomized and controlled clinical study [J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2010, 49(6): 473-476.
- [25] Bonello L, Sbragia P, Amabile N, et al. Protective effect of an acute oral loading dose of trimetazidine on myocardial injury following percutaneous coronary intervention [J]. *Heart*, 2007, 93(6): 703-707.
- [26] Hong S, Kim HY, Kim J, et al. Smad7 protein induces interferon regulatory factor 1-dependent transcriptional activation of caspase 8 to restore tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 3 560-570.
- [27] Kominami K, Nakabayashi J, Nagai T, et al. The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: quantitative experimental validation of a mathematical model [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(10): 1 825-840.
- [28] Li X, Luo R, Jiang R, et al. The role of the Hsp90/Akt pathway in myocardial calpain-induced caspase-3 activation and apoptosis during sepsis [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2013, 13: 8.
- [29] Wu L, Xi Z, Guo R, et al. Exogenous ARC down-regulates caspase-3 expression and inhibits apoptosis of broiler chicken cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide [J]. *Avian Pathol*, 2013, 42(1): 32-37.
- [30] 李浪, 苏强, 王炎, 等. 冠状动脉微栓塞致心肌细胞凋亡及心功能损伤的死亡受体途径研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38(4): 363-368.
- [31] Chen ZW, Qian JY, Ma JY, et al. TNF-alpha-induced cardiomyocyte apoptosis contributes to cardiac dysfunction after coronary microembolization in mini-pigs [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(10): 1 953-963.