

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

云 伟, 于艳秋, 卢晓梅, 金玉楠, 李 昆, 杜莉莉

(中国医科大学基础医学院病理生理学教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 心肌梗死; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 6; 白细胞介素 10

[摘要] 目的 探讨小鼠心肌梗死后血清细胞因子表达的变化与心肌炎症反应的关系。方法 冠状动脉结扎法复制小鼠心肌梗死模型, 采用 ELISA 方法测定结扎后不同时间点血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和白细胞介素 10 浓度和心肌组织病理变化。结果 心肌梗死后 1 h, 小鼠血清中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 10 浓度分别是 82.4 ± 27.6 ng/L 和 47.7 ± 22.3 ng/L, 与假手术组水平 (40.4 ± 9.7 ng/L 和 23.4 ± 4.3 ng/L) 比较均明显提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 以后呈逐渐下降趋势; 血清中白细胞介素 6 水平在心肌梗死后 1 h、2 h、4 h、1 d、2 d 和 5 d 分别为 202.7 ± 89.5 ng/L、 578.9 ± 198.0 ng/L、 696.8 ± 104.7 ng/L、 325.1 ± 131.7 ng/L、 218.5 ± 16.0 ng/L 和 195.8 ± 93.1 ng/L, 与假手术组水平 (54.0 ± 3.0 ng/L) 比较均有显著增高 ($P < 0.05$), 病理切片显示梗死心肌内大量的炎性细胞浸润。梗死后第 2 至 4 周细胞因子表达下降, 梗死区炎症细胞逐渐减少, 心肌纤维化。结论 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 和白细胞介素 10 三种细胞因子参与了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。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expressions of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-6 and Interleukin-10 and Pathologic Changes of Myocardium After Myocardial Infarction in Mice

YUN Wei, YU Yan-Qiu, LU Xiao-Mei, JIN Yu-Nan, LI Kun, and DU Li-Li

(Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukin-6; Interleukin-10

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between cytokines expression and inflammatory response after myocardial infarction in mice. **Methods** Develop mice model of myocardial infarction by coronary artery ligation. Levels of serum tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-10 were assayed by ELISA, and pathology of myocardium was detected by histochemistry. **Results** Expressions of tumor necrosis factor- α (82.4 ± 27.6 ng/L) and interleukin-10 (47.7 ± 22.3 ng/L) were found to be significantly higher in 1 h after myocardial infarction than that of sham operated groups (40.4 ± 9.7 ng/L and 23.4 ± 4.3 ng/L), and they decreased gradually after that; Expressions of interleukin-6 (202.7 ± 89.5 ng/L, 578.9 ± 198.0 ng/L, 696.8 ± 104.7 ng/L, 325.1 ± 131.7 ng/L, 218.5 ± 16.0 ng/L, and 195.8 ± 93.1 ng/L) were also found to be significantly higher in 1 h, 2 h, 4 h, 1 d, 2 d, and 5 d after myocardial infarction than that of sham operated groups (54.0 ± 3.0 ng/L). Leucocytes recruited in the infarcted myocardium after myocardial infarction. Inflammatory cytokines decreased during 2 weeks and 4 weeks after myocardial infarction, and Leucocytes in the infarcted myocardium decreased gradually. Myocardium fibrosis was found. **Conclusion** The changes of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and interleukin-10 take part in the inflammatory response after myocardial infarction, and play an important role in the development of myocardial infarction diseases.

心肌梗死(myocardial infarction, MI) 是冠状动脉闭塞导致部分心肌缺血性坏死的过程, 常伴随组织坏死和炎性细胞浸润。为探讨心肌梗死后细胞因子的表达与心肌炎症反应的关系, 本文应用冠状动脉

结扎法复制小鼠心肌梗死模型, 然后检测了血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和 IL-10 的浓度变化, 观察了心肌组织病理变化。

[收稿日期] 2006-10-24 [修回日期] 2007-03-26

[基金项目] 国家 973 计划项目 (2001CB509904) 资助

[作者简介] 云伟, 硕士研究生, 研究方向为心肌梗死发生机制与干细胞治疗; 联系电话 13840382285, E-mail 为 yunwei820225@163.com。
通讯作者于艳秋, 教授, 硕士研究生导师, 中国病理生理学学会理事, 主要从事干细胞研究; 联系电话 024-23256666-5362, E-mail 为 yqyu@mail.cmu.edu.cn。卢晓梅, 硕士研究生, 助教; 研究方向为心肌梗死机制; 联系电话为 13842074961, E-mail 为 luxmei@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Powerlab/4ST 型心电图机由 AD 仪器公司生产, HX-300 动物呼吸机由成都泰盟科技有限公司生产, 冷光源由 Cole-Parmer 仪器公司生产, 酶标仪由瑞士

TECAN 公司生产。阿托品为天津金耀氨基酸有限公司产品,水合氯醛为天津市光复精细化工研究所产品,青霉素为大连美罗大药厂产品,ELISA 免疫检测试剂盒为 R&D 系统产品。

1.2 实验动物及分组

昆明小鼠 104 只,雌雄不限,体重 20~30 g,由中国医科大学实验动物部提供。随机分为手术组和假手术组,手术组又分为梗死后 30 min 组、1 h 组、2 h 组、4 h 组、1 d 组、2 d 组、3 d 组、5 d 组、7 d 组、10 d 组、14 d 组、28 d 组。每组 8 只小鼠。

1.3 小鼠心肌梗死模型建立

腹腔注射阿托品 1 mg/kg, 30 min 后 5% 水合氯醛(8 mL/kg)腹腔注射,麻醉后气管插管接呼吸机(潮气量 4~8 mL,呼吸比 5:4,呼吸频率 90 次/min),右侧卧位固定小鼠,连接心电图机电极;于胸骨左旁第 3、4 肋间打开胸腔,剪开心包暴露心脏,用 6-0 缝线结扎左冠状动脉^[1]中上 1/3 部位,结扎瞬间可观察到小鼠左心室前壁失去原有光泽,而显暗灰色或青紫色,心肌活动度减弱,心电图表现为 ST 段弓背向上抬高,模型复制成功;关胸,并用注射器抽取胸腔内气体以恢复负压,术后肌注青霉素预防感染。术后待小鼠呼吸平稳且无呼吸困难,拔出气管插管,小鼠恢复自主呼吸。

1.4 三种细胞因子的测定

分别于术后 30 min、1 h、2 h、4 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d 和 28 d 各时间点,采用摘取眼球的方法采血,注入无菌离心管中,静置 3 h 后 3 kr/min 离心 10 min,吸取血清加入无菌冻存管中,采用酶联免疫吸附法检测三种细胞因子,严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 心肌组织病理检测

剪下心脏,用生理盐水冲洗血液,浸泡于 10% 甲醛溶液中固定 24 h,经过结扎点位置横断心脏,制作石蜡块,切片后用 HE 染色,显微镜下观察。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小鼠心肌梗死后血清细胞因子浓度的变化

同假手术组相比,MI 后初期 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 表达均有明显上升趋势($P < 0.05$),第 2~4 周细胞因子表达下降,其中 IL-10 在梗死后 1 周和 2 周出现显著下降趋势($P < 0.05$,表 1)。

表 1. 心肌梗死后血清中细胞因子浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

时 间	TNF- α	IL-6	IL-10
假手术组	40.4 \pm 9.7	54.0 \pm 3.0	23.4 \pm 4.3
术后 30 min	82.4 \pm 27.6	105.1 \pm 80.2	23.4 \pm 3.1
术后 1 h	265.4 \pm 224.8 ^a	202.7 \pm 89.5 ^a	47.7 \pm 22.3 ^a
术后 2 h	106.8 \pm 31.8	578.9 \pm 198.0 ^a	27.8 \pm 4.2
术后 4 h	117.4 \pm 43.8	696.8 \pm 104.7 ^a	21.3 \pm 6.0
术后 1 d	65.8 \pm 14.9	325.1 \pm 131.7 ^a	22.8 \pm 2.5
术后 2 d	89.4 \pm 16.9	218.5 \pm 16.0 ^a	22.9 \pm 8.4
术后 3 d	64.5 \pm 18.1	143.2 \pm 15.2	21.4 \pm 5.8
术后 5 d	98.2 \pm 43.3	195.8 \pm 93.1 ^a	19.9 \pm 2.6
术后 7 d	89.4 \pm 36.4	132.7 \pm 22.5	13.0 \pm 2.7 ^a
术后 10 d	41.0 \pm 5.1	100.2 \pm 13.0	16.1 \pm 2.9
术后 14 d	45.6 \pm 22.2	73.9 \pm 24.6	12.3 \pm 1.6 ^a
术后 28 d	47.4 \pm 41.8	74.5 \pm 43.7	15.5 \pm 4.8

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组相比。

2.2 病理切片

心肌梗死后 1 h 心肌内未见异常改变,尚无炎症细胞浸润,2 d 可见梗死区部分炎性细胞浸润及心肌细胞膜不完整表现,5 d 时梗死相关区的炎症反应较强,大量中性粒细胞浸润,出现心肌纤维排列紊乱,7 d 可见心肌纤维断裂、心肌细胞坏死,14 d 时,梗死区心肌纤维间隙增宽,横纹消失,核固缩或溶解;梗死区边缘可见充血,出血带及不等量中性粒细胞浸润,28 d 时心肌梗死区镜下基本全部是纤维母细胞和纤维细胞以及致密的胶原纤维束,胶原纤维束之间几乎无残存的存活心肌组织,炎性细胞浸润已少见(图 1)。

3 讨论

研究表明,炎症细胞释放的各种细胞因子通过不同的致炎和抗炎途径参与冠心病的病理过程^[2]。根据细胞因子在炎症反应中的不同作用,其分为:促炎因子和抗炎因子。

结扎小鼠冠状动脉可导致心肌局部急性缺血缺氧,刺激一些细胞因子释放,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 等。在本研究中,小鼠心肌梗死后 1h 至 1d, TNF- α 和 IL-6 表达均达到高峰,与国外研究一致^[3,4],促炎因子 TNF- α 属于一种炎症前细胞因子,主要由心肌内的单核-巨噬细胞及心肌细胞产生,调节 IL-1 和 IL-6 等多种因子的表达。TNF- α 可促使 ICAM-1 和内皮-白细胞黏附分子(ELAM-1)表达,从而促进了中性粒细胞在心肌内的黏附、聚集并释放可溶性介

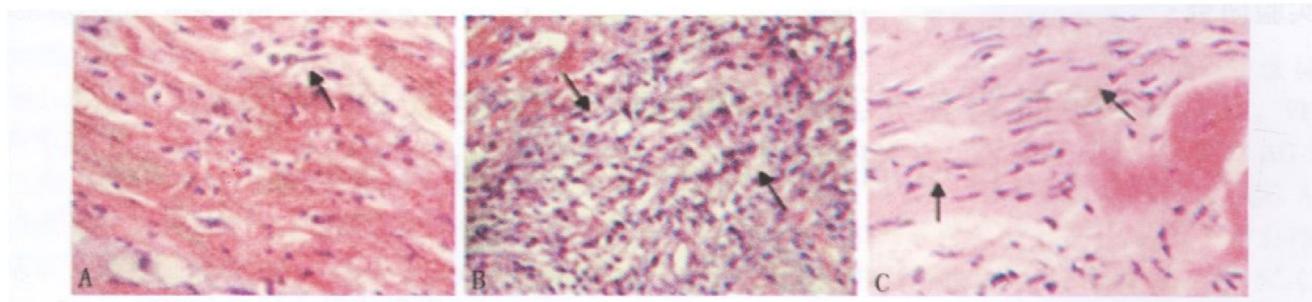


图 1. 心肌梗死后心肌组织病理变化 ($\times 400$) A 为心肌梗死后 2 d, B 为心肌梗死后 5 d, C 为心肌梗死后 28 d。

质, 导致心肌微血管的阻塞和心肌损伤加重^[5], 有研究提示 TNF- α 与心力衰竭的发生密切相关^[6,7]。IL-6 由激活的巨噬细胞、淋巴细胞及上皮细胞分泌, 能被 IL-1 β 和 TNF- α 诱导。IL-6 也可以促进 ICAM-1 表达, 进而引起其合成, ICAM-1 与其配体的结合促进了心肌血管内皮细胞与中性粒细胞的黏附, 能促进中性粒细胞释放超氧阴离子、穿孔素及抑制内皮细胞合成释放 NO 等细胞毒物引起或加重心肌损伤^[8]。心肌梗死发生后 TNF- α 释放增加, 而 TNF- α 又促进 IL-6 的释放, 两者协同促进炎症反应的发生发展, 从而导致心肌损害。

另外在 TNF- α 和 IL-6 明显增高的同时, IL-10 也有显著增高, IL-10 是体内重要的抑制炎症反应的抗炎性细胞因子之一^[9], 在急性心肌梗死的早期炎症反应中起保护性作用^[10]。心肌缺血时, IL-10 主要由心肌内的 Th2 细胞、单核细胞及心肌细胞分泌, 它能够抑制单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞等炎症细胞的激活及多种炎症因子如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-12 等的合成, 减轻炎症反应, 内源性的 IL-10 可以减轻缺血心肌中性粒细胞的浸润, 下调细胞间黏附分子的表达, 抑制 TNF- α 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的合成^[11]。虽然 IL-10 的重要性在于降低 TNF- α 和 IL-6 的浓度, 但后两者仍明显升高的原因可能与过度炎症反应使 IL-10 分泌相对不足有关^[12]。病理显示梗死心肌内大量炎症细胞浸润, 表示三种细胞因子均参与了 MI 后心肌的炎症反应。但 IL-10 对心肌是否具有保护作用现在还有争议: 临床资料显示 20 例不稳定性心绞痛 (UAP) 患者与 16 例健康对照者相比较血清 IL-10 水平并无显著性差异^[13]。

小鼠心肌梗死后 2 至 4 周 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 表达均明显减少, IL-10 更是出现了显著下降趋势, 而此时心肌内炎症细胞逐渐减少, 间质纤维母细胞增多, 心肌纤维化修复, 提示心肌组织由坏死后炎症反应逐渐转变为心肌组织的修复, 有研究指出 TGF- β 1 可能扮演重要角色^[14]。

总之, 具有多种生物活性的细胞因子 TNF- α 、IL-6 及 IL-10 与 MI 的发生发展存在一定的关系, 这些细胞因子的检测将有助于进一步探讨其在 MI 中的作用机制。

[参考文献]

- [1] Yang Y, Min JY, Rana JS, Ke Q, Cai J, Chen Y, et al. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells [J]. *J Appl Physiol*, 2002, **93** (3): 1 140-151.
- [2] Dominguez Rodriguez A, Abreu Gonzalez P, Garcia Gonzalez MJ, Ferrer Hita J. Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty [J]. *Rev Esp Cardiol*, 2005, **58** (6): 626-630.
- [3] Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is up regulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, **55** (2): 329-340.
- [4] Irwin M, Mak S, Mann D, Qu R, Dawood F, Wen WH, et al. Tissue expression and immunolocalization of tumour necrosis factor-alpha in post infarction dysfunctional myocardium [J]. *Circulation*, 1999, **99** (11): 1 492-498.
- [5] Gurevitch J, Frolkis I, Yuhay Y, Lifschitz-Mercer B, Berger E, Paz Y, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30** (6): 1 554-561.
- [6] 谢萍, 徐义先, 祝善俊, 杨铮, 高志凌. 肿瘤坏死因子 α 介导大鼠心肌梗死后心功能变化的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 662-664.
- [7] 吴黎明, 唐闻. 肿瘤坏死因子 α 抑制豚鼠急性缺血心室肌细胞 L 型钙通道电流 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 287-190.
- [8] Pudil R, Pidman V, Krejssek J, Gregor J, Tichy M, Andrys C, et al. Cytokines and adhesion molecules in the course of acute infarction [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, **280** (1-2): 127-134.
- [9] Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury [J]. *J Immunol*, 2000, **165** (5): 2 798-808.
- [10] Dybdahl B, Slordahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction [J]. *Heart*, 2005, **91** (3): 299-304.
- [11] Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2000, **101** (9): 1 019-026.
- [12] 赵玉娟, 傅世英, 刘凤岐, 王岚峰, 周立君, 李为民, 等. 胸段硬膜外麻醉对大鼠急性心肌梗死早期血清及心肌白介素 10、肿瘤坏死因子 α 影响的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2005, **85** (40): 2 854-856.
- [13] Tziakas DN, Chalikiak CK, Hatzinikolaou HI, Parissis JT, Papadopoulos ED, Tripsianis GA, et al. Anti-inflammatory cytokine profile in acute coronary syndromes: behavior of IL-10 in association with serum metalloproteinases and proinflammatory cytokines [J]. *Int J Cardiol*, 2003, **92** (2-3): 169-175.
- [14] 刘英, 廖玉华, 程翔, 李彬, 葛洪霞, 张玲, 等. 大鼠心肌梗死后心肌炎症反应和细胞因子表达 [J]. *中国免疫学杂志*, 2004, **20** (12): 858-861. (此文编辑 胡必利)