

曲美他嗪对小鼠心肌损伤的保护研究

郑二女 苏显明 樊 蓉

摘 要 **目的** 研究盐酸曲美他嗪(TMZ)对异丙肾上腺素(ISO)所致小鼠心肌损伤的保护作用。**方法** 6~7周龄BALB/c小鼠36只,随机分为3组(每组12只),生理盐水(NS)组、ISO组、TMZ组;NS组为空白对照组,ISO组为损伤组,TMZ组为治疗组,共喂养4周。计算心脏质量指数(HW/BW%),微量酶标法测定血清乳酸脱氢酶(LDH)活性、硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛(MDA)含量、WST-1法测定超氧化物歧化酶(SOD)活力、ELISA法检测血清Klotho浓度,心肌组织石蜡包埋行HE染色、Masson染色、caspase-3染色。**结果** 与NS组比较,ISO组HW/BW、乳酸脱氢酶(LDH)活性、丙二醛(MDA)含量均显著增加($P < 0.01$),SOD活力显著减低($P < 0.01$);TMZ组的HW/BW、LDH活性、MDA含量均显著低ISO组($P < 0.01$),SOD活力、Klotho浓度显著高于ISO组($P < 0.01$),HE染色结果显示,ISO组小鼠心肌细胞横径明显大于NS对照组,伴随着肌纤维紊乱和心肌间质成纤维细胞增生。TMZ组小鼠心肌细胞横径明显小于ISO组;Masson染色结果显示,ISO组小鼠心肌间质及血管壁有大量胶原纤维分布,而TMZ组小鼠的心肌间质及血管壁胶原纤维数量较ISO组明显减少;caspase-3染色结果:TMZ组棕黄色染色颗粒分布较ISO组明显减少(染色阳性结果表现为胞质中有大量棕黄色染色颗粒分布)。**结论** 曲美他嗪可以防止心肌损伤,其机制可能与上调Klotho水平有关。

关键词 Klotho 盐酸曲美他嗪 心肌损伤 氧化应激 异丙肾上腺素 小鼠

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.015

Protective Effect of Trimetazidine on Myocardial Injury in Mice. Zheng Ernv, Su Xianming, Fan Rong. Department of Geriatric Cardiology of the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Shaanxi 710061, China

Abstract **Objective** To study the protective effect of Trimetazidine on myocardial injury in mice. **Methods** 6 to 7 week-old male BALB/c mice were randomly divided into 3 groups at twelve for each group: normal saline (NS) group, ISO group and TMZ group, N.S group for blank control group, ISO group for damage group, TMZ as treatment group. After 4 weeks, cardiac index (HW/BW) was calculated, serum lactate dehydrogenase (LDH) activity were measured by enzyme standard method. Malondialdehyde (MDA) was detected by thiobarbituric acid method (TBA). Superoxide dismutase (SOD) activity were determined by WST-1 method. The concentrations of serum Klotho were measured by ELSIA. The cardiac muscular tissue was imbedded with paraffin and colored with HE, Masson and caspase-3. **Results** The experiment model meets the requirements. In TMZ groups' HW/BW, LDH activity and MDA level were significantly lower than those of the ISO group ($P < 0.01$). SOD energy, concentration of Klotho was significantly higher than those of the ISO group ($P < 0.01$). HE color results showed that the myocardial cell diameter of ISO group was obviously larger than that of NS group, combined with disordered muscle fibers and hyperplastic myocardial interstitial fibroblasts. The cardiomyocytes diameter of TMZ groups was much smaller than that of the ISO group. Masson color results showed that the level of collagen fiber distribution in the myocardial interstitial and hemal wall of TMZ group was lower than that of ISO group. Caspase 3 color results showed that the number of tan dye distribution was significantly lower in TMZ group than that of the ISO group (Color positive results showed obvious practical color distribution). **Conclusion** Trimetazidine could prevent myocardial injury and its mechanism might be related to raised Klotho level.

Key words Klotho; Trimetazidine; Myocardial injury; Oxidative stress; Isoproterenol; mice

目前中国面临严重的老龄化问题,使得心血管疾病的发生率居高不下,已成为我国发生率和病死率的

第1位,严重威胁人类健康。而任何原因的初始心肌损伤引起心肌结构和功能的变化,均可以导致心室功能低下,造成心力衰竭。现已公认慢性心力衰竭发生、发展的根本原因是心室重构。Klotho蛋白是一种抗衰老蛋白,主要表达于大脑脉络膜和肾组织^[1]。研究发现,Klotho蛋白作为一种循环因子或激素,通过抑制氧化应激在心血管疾病中发挥作用^[2]。而血

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(2016JM8082)

作者单位:710061 西安交通大学第一附属医院老年心血管内科(郑二女、苏显明);710089 西安一四一医院老年内科(樊蓉)

通讯作者:苏显明,主任医师,电子信箱:suxianming2011@163.com

中 Klotho 蛋白与心室重构的关系却尚未明确,本研究以心肌损伤的小鼠为研究对象,进行曲美他嗪干预研究,观察 Klotho 蛋白对损伤心脏氧化应激的影响。

材料与方法

1. 实验材料:异丙肾上腺素注射液(上海天丰制药有限公司,批号 991011)。盐酸曲美他嗪(施维雅天津制药有限公司, Batch 2008262)。Klotho 蛋白试剂盒(Batch1606031)。总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(WST-1 法)(Batch 20160612),丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)(Batch 20160612)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(微板法)(Batch20160628),均由南京建成生物工程研究所提供。电子分析天平(德国 Meilteler 公司)。BX-60 光学显微镜(日本 Olympus 公司)。低温离心机(美国 Eppendorf 5415R)。分光光度计(德国 FLUOstar OPTIMA)。

2. 实验动物分组及干预方法:实验动物为 6~7 周龄 SPF 近交系 BALB/c 小鼠 36 只,由西安交通大学医学院实验动物中心提供,生产许可证:SYXK(陕)2016-003。实验动物随机分为 3 组(每组 12 只),NS 组[NS 10ml/(kg·d)背部皮下注射及 NS 10ml/(kg·d)灌胃 2 次/日]、ISO 组[ISO 5mg/(kg·d)背部皮下注射及 NS 10ml/(kg·d)灌胃 2 次/日]、TMZ 组[ISO 5mg/(kg·d)背部皮下注射及 TMZ 48mg/(kg·d)灌胃 2 次/日],每 4 只共同饲养在一个通气良好的饲养笼内,饲养室温度保持在 16±1℃,相对湿度在(55±5)%,春季自然光照节律,各组小鼠自由进食、饮水,干预前适应 2 周,共喂养 4 周。试验结束时(10~11 周龄),进行称重后用 4% 水合氯醛液 0.2ml/20g 腹腔麻醉,摘眼球采血 1.5ml,静置 0.5h,3000r/min,4℃,15min 离心。离心

后的血清置于-20℃冰箱保存,检测血浆乳酸脱氢酶(LDH)活性、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力、血清 Klotho 浓度。血标本采集后,立即处死小鼠后快速取出心脏,剪去心脏周围组织和血管,生理盐水冲洗后,用滤纸吸干残余液体,称全心重(heart weight, HW),计算心脏质量指数(HW/BW)。将心脏组织置于 4% 多聚甲醛固定,做常规石蜡切片,行 HE 染色、Masson 染色及 caspase-3 染色。

3. 血浆 Klotho 蛋白浓度、血浆乳酸脱氢酶(LDH)活性、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定:按试剂盒操作说明测定血清 LDH、MDA、SOD 活力值。

4. 统计学方法:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析采用 SPSS 18.0 统计学软件,对各组数据先进行正态检验和方差齐性检验,符合正态分布、方差齐者,进行 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 动物模型符合实验要求:本研究采用 ISO 诱导小鼠急性心肌损伤实验模型。为评估实验模型的有效性,实验中引入 HW/BW 指数、LDH 活性、MDA 含量、SOD 活力的检测指标并设立对照组。HE 染色结果发现持续的皮下注射 ISO(9 天)可引起心肌细胞的肥大以及肌纤维排列的紊乱;Masson 染色发现 ISO 可显著增加心肌间质及血管壁周围的胶原蛋白含量,引起心肌间质纤维化(图 1A);与 NS 组比较,ISO 组 HW/BW、乳酸脱氢酶(LDH)活性、丙二醛(MDA)含量均显著增加(*P*<0.01),SOD 活力显著减低(*P*<0.01)(图 B),说明实验模型建立成功。

表 1 两组血清 HW/BW、SOD 活力、LDH 活性、MDA 含量、Klotho 浓度变化

组别	HW/BW	SOD 活力(U/ml)	LDH 活性(U/L)	MDA 含量(nmol/ml)
NS 组	0.42±0.02	30.55±7.02	6260.73±661.29	5.23±2.37
ISO 组	0.50±0.03*	18.32±3.89*	12818.48±3338.26*	12.76±6.65*

与 NS 组比较,**P*<0.01

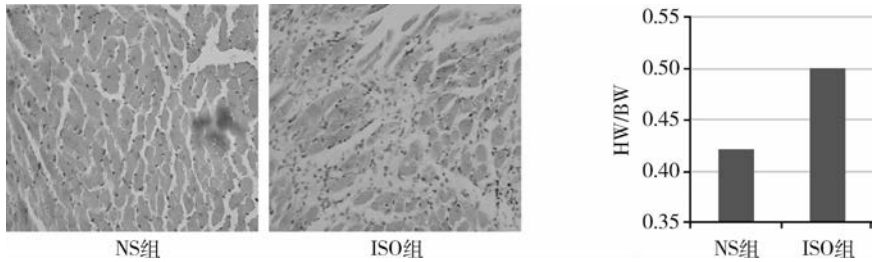


图 1 ISO 引起小鼠的改变

A. ISO 引起小鼠心脏结构改变(×400);B. ISO 引起小鼠心脏重量改变

2. 小鼠 HW/BW、SOD 活力、LDH 活性、MDA 含量、Klotho 浓度的比较:TMZ 组 HW/BW、LDH 活性显著低于 ISO 组,组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$);TMZ 组 SOD 活力显著高于 ISO 组,两组间比

较差异有统计学意义($P < 0.05$);TMZ 组 MDA 含量显著低于 ISO 组,组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);TMZ 组 Klotho 浓度显著高于 ISO 组,两组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组血清 HW/BW、SOD 活力、LDH 活性、MDA 含量、Klotho 浓度变化

组别	HW/BW	SOD 活力 (U/ml)	LDH 活性 (U/L)	MDA 含量 (nmol/ml)	Klotho 浓度 (pg/ml)
ISO 组	0.50 ± 0.03	18.32 ± 3.89	12818.48 ± 3338.26	12.76 ± 6.65	151.31 ± 74.97
TMZ 组	0.46 ± 0.04**	23.22 ± 4.82*	7911.99 ± 2810.54**	7.15 ± 4.23*	310.73 ± 116.22**

与 ISO 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3. 心肌组织 HE 染色、Massion 染色、caspase - 3 染色的比较:HE 染色结果显示,ISO 组小鼠心肌细胞横径明显大于治疗组,伴随着肌纤维紊乱和心肌间质成纤维细胞增生,而 TMZ 组小鼠的心肌细胞横径显著小于 ISO 组,成纤维增生较 ISO 组明显减少;Masson 染色

结果显示,ISO 组小鼠心肌间质及血管壁有大量胶原纤维分布,而 TMZ 组小鼠的心肌间质及血管壁胶原纤维数量较 ISO 组明显减少;TMZ 组棕黄色染色颗粒分布较 ISO 组明显减少(染色阳性结果表现为胞质中有大量棕黄色染色颗粒分布)。具体结果见图 2。

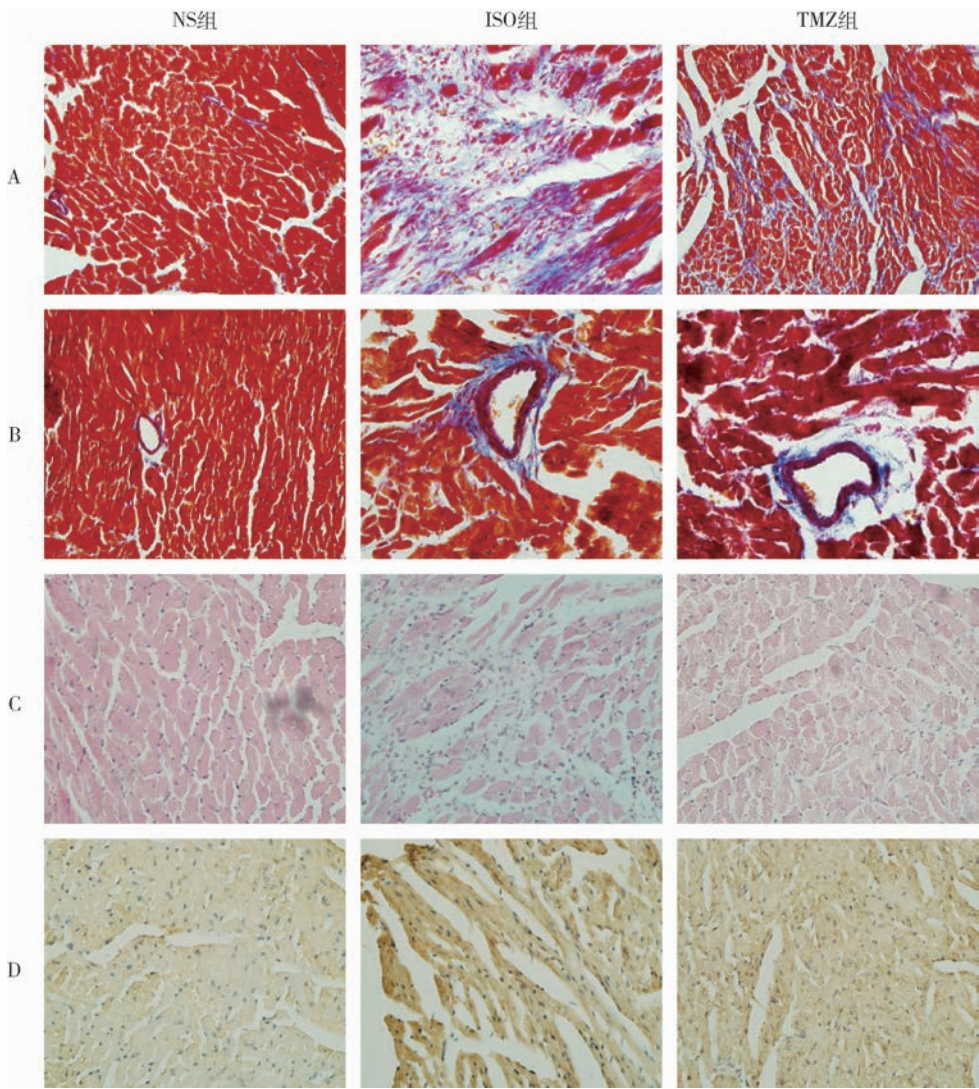


图 2 心肌组织 HE 染色、Massion 染色及 caspase - 3 染色的比较(×400)

A. NS 组、ISO 组、TMZ 组心肌组织的 Massion 染色图;B. NS 组、ISO 组、TMZ 组心肌间质及血管周围的 Massion 染色图;C. NS 组、ISO 组、TMZ 组心肌组织的 HE 染色图;D. NS 组、ISO 组、TMZ 组心肌组织的 caspase - 3 染色图

讨 论

ISO 是一个强 β 受体激动剂,在大量实验研究中被应用并得到公认。本实验采用 ISO 5mg/kg 共 9 天诱发小鼠心肌缺血损伤,结果发现小鼠血中 SOD 活性降低,MDA 含量增高,提示动物循环系统存在氧化应激损害;还存在 LDH 活性增高、HW/BW 指数升高现象和肌细胞变性,肌原纤维变性或凝固性坏死等病理改变。这些结果均提示异丙肾上腺素可引起模型动物小鼠心肌损伤。

Klotho 基因是近期发现并具有抗衰老作用的基因,主要存在于肾脏及脑组织中,通过基因表达,产生膜结合型和分泌型两种蛋白质^[3]。研究发现其可通过抑制细胞内胰岛素/胰岛素样生长因子-1 (insulin/IGF-1) 信号级联放大效应、抗氧化应激、减少血管内皮细胞的凋亡、保护血管内皮细胞、影响细胞信号转导通路等作用对心血管疾病起到防治作用,从而改善长期预后^[4~7]。

曲美他嗪 (trimetazidine, TMZ) 主要通过抑制游离脂肪酸代谢,增加葡萄糖代谢,增加心肌能量供应,是一种抗心肌缺血的新药。TMZ 能提供代谢性心肌细胞保护作用,主要是通过减少细胞内 H^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 的超载,提高乳酸的利用率,减少细胞的酮体产生,有效抑制缺氧所致的细胞酸中毒来实现的。在实验性心肌缺血模型中,TMZ 可改善心肌收缩力,缩小梗死面积;抑制细胞内 pH 值和 ATP 的降低;减少中性粒细胞堆积及心肌细胞内氧自由基的产生,抑制自由基对心肌细胞的损害,增加心肌细胞对低氧应激的耐受能力,维持线粒体的正常功能,保护心肌细胞。本实验中 TMZ 组显著降低 ISO 诱导所致心肌损伤后血浆 LDH 活性、MDA 含量及心脏指数比,提高 ISO 诱导心肌损伤后血浆 SOD 活力,组织形态学观察显示,曲美他嗪给药后,小鼠心肌组织明显趋于正常,肌纤维紊乱和心肌间质成纤维细胞增生明显减少,小鼠的心肌间质及血管壁胶原纤维数量减少,说明 TMZ

对 ISO 诱导的小鼠心肌多方面损伤均有明显的改善和保护作用。

本研究进一步观察到,曲美他嗪可升高血 Klotho 水平,相关分析表明,Klotho 与炎症标志物 LDH 及氧化标志物 MDA 呈明显负相关,与具有抗氧化能力的 SOD 呈正相关,提示 Klotho 与机体抗氧化密切相关,说明曲美他嗪可上调 Klotho 基因表达并减轻心肌损害^[8]。综上所述,本研究初步结果显示曲美他嗪上调 Klotho 与减轻氧化损伤有关,可能是其心肌损伤的保护机制之一,确切机制有待于开展更深入的研究予以阐明。

参考文献

- 1 Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, *et al.* Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing [J]. *Nature*, 1997, 390(6655): 45-51
 - 2 Tang R, Zhou Q, Liu Z, *et al.* Effects of fosinopril and losartan on renal Klotho expression and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats [J]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban*, 2011, 36(1): 27-33
 - 3 Kokkinaki M, Abu-Asab M, Gunawardena N, *et al.* Klotho regulates retinal pigment epithelial functions and protects against oxidative stress [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(41): 16346-16359
 - 4 Yang K, Nie L, Huang Y, *et al.* Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215(2): 77-83
 - 5 Rakugi H, Matsukawa N, Ishikawa K, *et al.* Anti-oxidative effect of Klotho on endothelial cells through cAMP activation [J]. *Endocrine*, 2007, 31(1): 82-87
 - 6 Kitagawa M, Sugiyama H, Morinaga H, *et al.* A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56695
 - 7 Donate-Correa J, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernandez C, *et al.* Fibroblast growth factor23/Klotho system in the context of cardiovascular damage [J]. *Med Clin (Barc)*, 2013, 140(9): 420-423
 - 8 Oh HJ, Nam BY, Lee MJ, *et al.* Decreased circulating klotho levels in patients undergoing dialysis and relationship to oxidative stress and inflammation [J]. *Perit Dial Int*, 2015, 35(1): 43-51
- (收稿日期:2017-01-22)
(修回日期:2017-02-20)
-
- (接第 193 页)
- 14 王生. 活血化瘀中药对寻常性银屑病患者白介素-18 及尿酸影响的大样本研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(8): 982-984
 - 15 牛瑞菊. 阿维 A 联合窄谱中波紫外线对寻常型银屑病患者外周血 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2015, 21(11): 1594-1596
 - 16 岳致丰, 韩雪松, 尹冬, 等. 复方甘草酸苷联合 NB-UVB 对寻常型银屑病患者 T 淋巴细胞亚群及相关细胞因子的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(18): 2157-2159
 - 17 陈国生, 沈观妍, 黄育青, 等. 窄谱中波紫外线联合阿维 A 对寻常型银屑病患者 T 淋巴细胞免疫功能影响的探讨 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(17): 46-49
 - 18 李双, 谭茜, 李惠, 等. 卡泊三醇联合保湿润肤剂对寻常性银屑病皮肤屏障功能的影响 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2014, 43(4): 210-214
 - 19 汪海珍, 张予晋, 杨志波. 润肤保湿软膏对血虚风燥证银屑病皮肤屏障功能干预作用及机制的研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(6): 78-81
- (收稿日期:2017-01-20)
(修回日期:2017-02-19)