

①

## 褪黑激素抗缺血再灌注损伤

姚朝辉,王顺蓉 综述 李著华 审校

(四川泸州医学院病理生理学教研室,四川 泸州 646000)

**[摘要]** 缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是临床常见的病理过程,其发生发展过程涉及到自由基、钙超载、白细胞的呼吸爆发等损伤作用。长期以来主要围绕以上几个方面进行对IR损伤的防治。褪黑激素(melatonin, MEL)是由松果体分泌的一种吲哚类激素,能够增强机体多个系统功能,近年来研究发现其通过抗氧化以及在分子水平发挥抗器官IR损伤作用。

**[关键词]** 褪黑激素; 缺血再灌注损伤; 防治

**[中图分类号]** Q463 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2006)04-0363-04

## Melatonin's effect of counteracting ischemia-reperfusion injury

YAO Zhao-hui, WANG Shun-rong, LI Zhu-hua

(Pathophysiology Department of Luzhou Medical College, Luzhou Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** Ischemia-reperfusion injury (IRI) is a common pathophysiology process in clinical, the mechanisms of which involved the damage effect of free radical, calcium overload, the respiration burst of leukocytes, and so on. Then researches of prevention and therapy for IRI are focus on the above mechanisms. There is a very applicable future for clinical applying in many results of researches, and even some are having been used to alleviate IRI. Melatonin (MEL) secreted by pineal gland is a kind of benzopyrrole hormone, which can regulate rhythm of creature and the functions of multiple systems of the body. In recent years, many researchers have found MEL can counteract the multiple organs IRI through its anti-oxygen effect and play a protective role in complicated molecular level.

**[Key words]** melatonin; ischemia-reperfusion injury; prevention and therapy

[*Int J Pathol Clin Med*, 2006, 26(4):0363-04]

IRI是指机体在缺血基础上,恢复血流灌注损伤进一步加重的现象。其主要机制包括:钙超载、自由基(free radical)损伤、白细胞呼吸爆发和微血管无复流、内环境紊乱等。IRI能造成机体形态学的破坏和功能的严重障碍。MEL是主要由松果体分泌的非肽类激素,能够调节机体的睡眠、免疫、生殖、认知和生理节律等功能。此外, MEL能够清除自由基,增加机体的抗氧化能力。

### 1 MEL的合成、分布及代谢

MEL是由松果体分泌产生的吲哚类激素,其分布与其受体的分布一致,在体内主要分布于下丘脑结节部(PT)。在中枢其他部位如下丘脑视上核

(SCN)以及正中隆起(ME)也有分布,在周围组织中发现主要存在于睾丸和卵巢,脾脏也有少量分布。

MEL主要在松果体内合成,后来发现其他部位如视网膜、副泪腺、唾液腺、嗜铬细胞以及红细胞也能合成MEL。近年来又发现肥大细胞、自然杀伤细胞(NK)、嗜酸性粒细胞、内皮细胞、胸腺上皮细胞、APUD细胞等都可以合成MEL<sup>[1]</sup>。

MEL的分泌受外界光线控制,其分泌对光线极为敏感,由视网膜和松果体的多突触神经通路来完成调节,该通路是:视网膜-视神经-视交叉-视交叉上核-下丘脑-前脑内侧束-胸髓中间外侧柱细胞-颈上神经节,通过去甲肾上腺素能节后纤维作

①收稿日期:2006-04-09 修回日期:2006-06-10

作者简介:姚朝晖(1980-),男,河南汝州人,硕士研究生,主要从事肾脏微循环方面的研究。

用于松果体细胞膜上的  $\beta 1$  受体来调节 MEL 的分泌。

MEL 在吲哚胺羟化酶和甲酰胺化酶的催化下产生 N-乙酰-5-甲氧基犬尿酰胺而失去活性,并随尿液排出体外。

## 2 MEL 的生物学功能

MEL 主要通过与其受体 (melatonin receptor, MTNR) 经 G 蛋白耦联受体途径发挥生物学作用。根据 MEL 受体与  $2\text{-}^{125}\text{I-MEL}$  结合的药理和动力学特性,可将它们分为高亲和性的和低亲和性的 MEL 受体,后来又发现了第 3 型受体。MEL 与 MEL1 受体结合后,可以使 cAMP 减少而 cGMP 增加;MEL2 受体活化后可以激活磷脂酶,使磷脂酸肌醇二磷酸 (PIP<sub>2</sub>) 分解,生成三磷酸肌醇 (IP<sub>3</sub>) 和二酰基甘油 (DAG),通过一系列信号级联传递作用而产生生物学效应。MEL3 受体的具体作用机制尚不清楚。

MEL 的作用具体表现在以下几个方面: MEL 通过调整脑内单胺类神经递质的水平,启动一系列级联反应激活睡眠; MEL 可以使垂体促性腺激素释放激素 (GnRH) 受体数量减少,抑制下丘脑 GnRH 的分泌、控制下丘脑对垂体的过度兴奋、减少下丘脑-垂体轴对靶性腺的刺激、抑制哺乳动物性腺的发育; MEL 可以促进免疫细胞的增殖,提高机体免疫力; MEL 既可以发挥本身的自由基清除剂作用,直接清除羟自由基 (OH·)、超氧阴离子 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、单线态氧、过氧亚硝酸阴离子 (ONOO<sup>-</sup>), 又可以提高具有自由基清除作用的酶的活性,如谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶 (GSH-Rd)、超氧化物歧化酶 (SOD)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6P-H) 等,还可以抑制诱导性一氧化氮合酶 (iNOS) 的活性<sup>[2]</sup> 和增加抗氧化酶的基因表达<sup>[3]</sup>, 提高抗氧化酶含量而清除自由基,发挥抗衰老作用<sup>[4,5]</sup>; MEL 通过改善睡眠,抗氧化功能保护脑细胞而提高认知能力<sup>[4,5]</sup>; MEL 通过多种途径发挥抗 IRI 方面保护作用<sup>[2,3,6]</sup>。

## 3 MEL 与 IRI

### 3.1 心脏

3.1.1 MEL 与心肌氧化应激 在心脏 IRI 时,氧化应激使心肌细胞膜脂质过氧化以及蛋白质成分发生交联,导致细胞功能障碍,使心脏收缩功能受到抑制;同时使线粒体氧化磷酸化脱耦联,能量产生障碍,心肌细胞发生凋亡和坏死。MEL 通过发挥自身的自由基清除剂作用,以及增加谷胱甘肽 (GSH),减

少缺血再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 后心肌组织中丙二醛 (MDA) 产生等抗氧化作用,减少心肌组织细胞凋亡和坏死,从而减少 IR 后心脏的梗死面积。在缺血再灌注心脏模型中,短期或长期不连续给与 MEL,都可以发挥心肌保护作用,减少心肌梗死面积;而用 MEL 受体拮抗剂 2-苯基-N-乙酰色胺 (luzindole) 和 N-乙酰色氨酸 (N-acetyltryptamine) 处理,这种保护作用明显减少。由此可知 MEL 受体在 MEL 的抗缺血再灌注损伤中发挥重要作用,但具体的作用机制目前尚未阐明<sup>[6]</sup>。MEL 还可以减少由于缺血再灌注引起的心律失常,缩短心律失常持续时间,但同时降低心肌的收缩能力,具体的原因尚未研究清楚<sup>[7]</sup>。

3.1.2 MEL 与心肌线粒体功能 研究发现 MEL 能够阻止自由基引起的线粒体膜上的电势降低,从而抑制线粒体内外膜之间的通透性转换孔 (PTP) 开放,减少线粒体呼吸链上的细胞色素 c 释放,进而使细胞凋亡大大受阻<sup>[8]</sup>。在 Langerdoff 液灌注的离体心脏模型中,缺血再灌注处理明显降低线粒体生物能量参数,如线粒体的氧耗、电子传递链复合体 I 和 III 活性、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生、脂质过氧化程度、心肌磷脂含量及其氧化等,在灌注液中给与 MEL 可以显著削弱这些指标变化。这些保护作用部分是由于通过稳定心肌线粒体膜磷脂以及维持电子传递链复合体 I、III 的活性来实现的<sup>[9]</sup>。

### 3.2 脑

3.2.1 MEL 与脑部炎症反应 脑部 IR,继发于谷氨酸释放、酸中毒,以及胞内钙离子增加激活磷脂酶 A<sub>2</sub> 导致游离脂肪酸增加等,释放了大量的活性物质如活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS) 等,可以使神经元和神经胶质细胞死亡,而 MEL 可以通过阻断多个 IRI 途径进而发挥抗 IRI 作用。在对阻断双侧颈动脉进行 IR 处理的大鼠松果体进行切除后,4~6 h 发现有较大的脑梗死灶,凋亡神经元显著增加。缺血后使用 MEL 处理可以减少额脑区的一氧化氮 (NO)、环磷酸鸟苷 (cGMP)、iNOS,同时减少微血管中黏附因子的生成和附壁白细胞的数目,减轻 IR 后组织器官微循环的无复流现象<sup>[10]</sup>。在大脑中动脉阻塞 (MCAO) 的脑中风模型中,用 MEL (5 mg/kg) 预处理大鼠,阻断大脑中动脉后检测炎症因子,发现单侧应用 MEL 处理可以减少同侧 nNOS、环氧酶-2 (COX-2)、髓过氧化物 (MPO) 的生成,而不影响胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 的表达,可以减少由于大脑

中动脉栓塞(MCAO)引起的脑组织梗死面积。因此,MEL可以在一定程度上通过抑制炎症反应来发挥抗脑IRI的作用<sup>[11]</sup>。用磁共振检查脑IR模型,造模前给予MEL同未用MEL相比,猴脑IR后组织水肿程度减少达50%以上,不仅对神经元有保护作用,而且对胶质细胞亦有保护作用<sup>[12]</sup>。

**3.2.2 MEL与线粒体功能及脑电生理** MEL可以保护IR后脑细胞线粒体,限制线粒体内膜电子传递链中电子泄漏,提高线粒体呼吸指数,这种作用呈剂量依赖性,小于20 mg/kg不能起到显著的保护效果<sup>[13]</sup>。与维生素C、E相比,MEL可以穿透血脑屏障,在周围用药后10 min出现在脑部,在对抗IRI方面更为有效。此外,研究还发现MEL可以促进一过性局灶缺血后脑部神经电生理的恢复。用MEL处理短暂MCAO(1.5 h)的大鼠脑部,在再灌注开始后72 h时检查脑部体感诱发电位(SSEP)发现,MEL可以明显提高脑部前、后肢分布区域的SSEP幅度,分别提高达33%和37%;MEL提高感觉、运动神经行为结果分别达40%和28%,减少脑皮质和文状体梗死面积达32%和40%<sup>[14]</sup>。

**3.3 肾脏** Kunduzova等<sup>[15]</sup>研究发现将双侧肾脏缺血45 min,在缺血前15 min给予MEL可以显著减少再灌注后血肌苷和血清尿素氮,提高肾功能。进一步研究发现MEL可以抑制caspase-3激活,减少IR后的氧化应激损伤,从而保护肾小管细胞,促进肾功能恢复。有文献报道,MEL受体可以激活丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)级联反应而发挥保护作用,因此MEL不局限于通过自由基清除来抗氧化应激损伤,还可以在分子水平上通过调节一系列细胞信号转导通路发挥保护作用。然而,MEL受体是否参与MEL的抗IRI及其机制,目前尚不清楚<sup>[16]</sup>。MEL可以通过核转录因子NF $\kappa$ B活化而抑制iNOS的表达,从而减少NO的生成,进而减少由NO与OH $\cdot$ 合成氧化作用超强的自由基:ONOO $^{-}$ <sup>[17]</sup>。

**3.4 肝脏** 研究表明MEL可以降低IR后肝组织的氧化损伤程度,减少多形核白细胞(PMN)的浸润。应用组织化学方法标记用MEL再灌注的缺血处理肝脏中的ROS,处理组活性氧主要分布在肝门区,而未处理组则在肝小叶区也有大量分布,而且ATP水平较低。处理组的肝细胞形态受到保护,并且肝细胞内ROS反应较弱<sup>[18]</sup>。对术前给予MEL处理实行肝切除的病人全血中白细胞进行凋亡检测,中性粒细胞凋亡显著减少,而且呼吸爆发减弱,中性

粒细胞胞膜上CD18分子表达减少<sup>[19]</sup>,而CD11b/CD18分子能够与内皮细胞间黏附分子-1(ICAM-1)结合,促进白细胞附壁和迁移,因此用MEL处理缓解微循环的无复流,使微循环获得改善。MEL可以降低肝细胞中iNOS的表达进而减少NO生成,明显减少肝脏肿瘤坏死因子(TNF)的表达。另外MEL能够减少PMN在肝组织中浸润,抑制MPO、MDA以及蛋白质氧化物(PO)减少,降低血清中转氨酶含量,保护了肝细胞<sup>[20]</sup>。

**3.5 胃、肠** 肠道IR后肠管平滑肌收缩性下降,给予MEL作用后可以抗细胞膜脂质过氧化,保护肠黏膜和平滑肌细胞,提高回肠对乙酰胆碱(Ach)的反应性,增加其收缩频率<sup>[21]</sup>。研究发现MEL通过发挥抗氧化作用可以保护肠黏膜,稳定肠道屏障,从而减少肠道内一些有害菌群移位<sup>[22]</sup>。进一步研究表明缺血前和再灌注后分别给予MEL处理都可以发挥抗氧化损伤作用,提示MEL的保护作用与给药处理的时间分布无关<sup>[23]</sup>,这与其他许多抗氧化剂必须在缺血前给药才能发挥抗IRI不同,其潜在机制可能与MEL目前尚未知的作用有关。

## 4 展望

研究表明MEL也可对距缺血部位较远的器官产生保护作用。当肾脏IR后引起远隔器官肝脏细胞损伤,MEL可以对肝脏发挥保护作用<sup>[19]</sup>。在病理情况下,如机体IR时MEL产生的主要部位并不是松果体,而是机体周围部位,机体动员全身MEL生成而抵抗损伤。抗氧化剂可以削弱缺血预处理的保护作用,而MEL不能抑制缺血预处理引起的抗IRI作用。对MEL的进一步研究发现,缺血预处理通过开放ATP依赖的钾通道(K<sub>ATP</sub>)而抑制自由基氧化损伤来发挥保护作用,同时缺血预处理还可以通过产生大量的腺苷来发挥保护作用,由于MEL有抗氧化和自由基清除作用,但并没有减少产生腺苷功能,因此MEL并不能完全阻断缺血预处理的保护效果,相反两者合用起到协同作用<sup>[24]</sup>。MEL抗IRI方面诸多分子机制目前还没有完全阐明,因此随着分子生物学技术的发展,尚需进一步研究MEL的保护作用,为MEL抗IRI的临床应用做好基础性工作。

## 参考文献

- 01 季从亮,储明星,陈国宏. MEL受体基因的研究进展[J]. *HEREDITAS (Beijing)*, 2003,25(2): 221-224.
- 02 Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart[J]. *Cardiovascular Res*, 2003,58(1): 10-19.

- 03 Han YX, Zhang SH, Wang XM, et al. Inhibition of mitochondria responsible for the anti-apoptotic effects of melatonin during ischemia-reperfusion[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2006,7(2): 142-147.
- 04 Liu XH, Xu L, Qiu XC, et al. The effect of melatonin on enhancing immune function and inhibiting the ability of NO over-release in morphine dependent mice[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2000, 35(11): 806-809.
- 05 Wu YH, Feenstra MG, Zhou JN, et al. Molecular changes underlying reduced pineal melatonin levels in Alzheimer disease: alterations in preclinical and clinical stages [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(12): 5898-5906.
- 06 Lochner A, Genade S, Davids A, et al. Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery[J]. *J Pineal Res*, 2006, 40(1): 56-63.
- 07 Vazan R, Pancza D, Beder I, et al. Ischemia-reperfusion injury-antiarrhythmic effect of melatonin associated with reduced recovering of contractility[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2005, 24(3): 355-359.
- 08 Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, et al. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes[J]. *Physiol Res*, 2005, 54(5): 491-495.
- 09 Petrosillo G, Di Venosa N, Pistolesi M, et al. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia-reperfusion: role of cardiolipin [J]. *FASEB J*, 2006, 20(2): 269-276.
- 10 Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, et al. Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion[J]. *J Pineal Res*, 2000, 28(1): 52-63.
- 11 Pei Z, Cheung RT. Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model [J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(2): 85-91.
- 12 Torii K, Uneyama H, Nishino H, et al. Melatonin suppresses cerebral edema caused by middle cerebral artery occlusion/reperfusion in rats assessed by magnetic resonance imaging [J]. *J Pineal Res*, 2004, 36(1): 18-24.
- 13 Watanabe K, Wakatsuki A, Shinohara K, et al. Maternally administered melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative mitochondrial damage in premature fetal rat brain [J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(4): 276-280.
- 14 Lee EJ, Wu TS, Lee MY, et al. Delayed treatment with melatonin enhances electrophysiological recovery following transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Pineal Res*, 2004, 36(1): 33-42.
- 15 Kunduzova OR, Escourrou G, Seguelas MH, et al. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion [J]. *FASEB J*, 2003, 17(8): 872-874.
- 16 Chan AS, Lai FP, Lo RK, et al. Melatonin MT1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(3): 249-257.
- 17 Rodriguez-Reynoso S, Leal C, Portilla-de Buen E, et al. Melatonin Ameliorates Renal Ischemia/Reperfusion Injury [J]. *J Surg Res*, 2004, 116(2): 242-247.
- 18 Freitas I, Bertone V, Guarnaschelli C, et al. In situ demonstration of improvement of liver mitochondria function by melatonin after cold ischemia [J]. *In Vivo*, 2006, 20(2): 229-237.
- 19 Kacmaz A, User EY, Sehirlı AO, et al. Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat [J]. *Surg Today*, 2005, 35(9): 744-775.
- 20 Sener G, Tosun O, Sehirlı AO, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion [J]. *Life Sci*, 2003, 72(24): 2707-2718.
- 21 Arslan SO, Gelir E, Sayan H, et al. L-Arginine and melatonin interaction in rat intestinal ischemia reperfusion [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005, 19(5): 533-535.
- 22 Sileri P, Sica GS, Gentileschi P, et al. Melatonin reduces bacterial translocation after intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(10): 2944-2946.
- 23 Ates B, Yılmaz I, Geçkil H, et al. Protective role of melatonin given either before ischemia or prior to reperfusion on intestinal ischemia-reperfusion damage [J]. *J Pineal Res*, 2004, 37(3): 149-152.
- 24 Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, et al. Melatonin does not prevent the protection of ischemic preconditioning in vivo despite its antioxidant effect against oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(4): 500-510.