

维拉帕米后处理和缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的对比

陆金梅, 姜艳

吉林大学第四医院药学部, 吉林 长春 130011

摘要: **目的** 对比观察维拉帕米后处理和缺血后处理(IPC)对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用。**方法** 60只雄性Wistar大鼠,将其随机分为假手术(Sham)组、模型(MIRI)组、维拉帕米后处理(VP)组和IPC组,每组10只。除Sham组仅穿线不结扎外,其余大鼠缺血30min,再灌注120min制备MIRI模型,VP组于再灌注前60min灌胃给予维拉帕米5mg/kg,IPC组于缺血30min后再灌注30s、再结扎30s,重复3个循环后再灌注120min。实验结束后计算心肌梗死面积(MIS),HE染色观察组织形态学变化,检测血清Ca²⁺、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、内皮素(ET)-1含量及心肌酶[天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)]、超氧化物歧化酶(SOD)活性。**结果** 与Sham组比较,MIRI组大鼠MIS明显扩大,血清AST、CK及LDH活性明显升高,SOD活性明显降低,Ca²⁺、MDA及ET-1含量明显升高,NO含量明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);心肌组织出现严重的病理损伤。与MIRI组比较,VP和IPC组大鼠MIS明显缩小,血清AST、CK及LDH活性明显降低,SOD活性明显升高,Ca²⁺、MDA及ET-1含量明显降低,NO含量明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);VP和IPC组心肌组织未见严重的病理损伤;且二者上述各指标水平相当(P 均 > 0.05)。**结论** 维拉帕米后处理与IPC对大鼠MIRI均具有保护作用,其机制与抗过氧化损伤、钙超载,改善内皮功能,减轻心肌病理损伤有关。

关键词: 维拉帕米; 缺血后处理; 心肌缺血再灌注; 大鼠; 丙二醛; 一氧化氮; 内皮素-1; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R-33 R 543.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)06-0726-04

Protective effect of verapamil postconditioning and ischemic postconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

LU Jin-mei, LOU Yan

Department of Pharmacy, Fourth Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130011, China

Abstract: Objective To observe the protective effects of verapamil postconditioning and ischemic postconditioning (IPC) on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** Sixty male Wistar rats were randomly divided into four groups ($n = 15$ each): sham group, model group (MIRI group), verapamil postconditioning group (VP group) and ischemia-reperfusion postconditioning group (IPC group). The MIRI model was established by ligating the anterior descending branch of the left coronary artery for 30 minutes leading to myocardial ischemia followed by reperfusion for 120 minutes in all groups except sham group (threading without ligation). In the VP group, verapamil (5 mg/kg) was given by lavage 60 minutes before reperfusion. In the IPC group, reperfusion was performed for 120 minutes after repeating 3 cycles (reperfusion for 30 seconds-re-ligation for 30 seconds) following ischemia for 30 minutes. After the end of the experiment, the myocardial infarct size (MIS) was calculated; the morphological changes of myocardial tissues were observed by HE staining; the contents of serum Ca²⁺, malonaldehyde (MDA), nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1) and myocardial enzymes including aspartate aminotransferase (AST), lactic dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and the activity of superoxide dismutase (SOD) were detected. **Results** In the MIRI group, MIS significantly increased; the levels of serum AST, CK and LDH significantly rose; the SOD activity significantly reduced; the contents of Ca²⁺, MDA and ET-1 significantly rose; the content of NO significantly decreased compared with sham group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); severe pathological injury of myocardial tissues occurred. In the groups VP and IPC, MIS significantly decreased; the levels of serum AST, CK and LDH sig-

nificantly decreased; the SOD activity significantly increased; the contents of Ca^{2+} , MDA 及 ET-1 significantly decreased; the content of NO significantly rose compared with MIRI group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); No severe pathological injury of myocardial tissues occurred. There were no significant differences in aforementioned indexes between VP group and IPC group (all $P > 0.05$). **Conclusion** Both verapamil postconditioning and ischemic postconditioning have protective effect on MIRI in rats, and the mechanism may be associated with resisting oxidative damage and calcium overload, improving endothelial functions and reducing myocardial pathological injury.

Key word: Verapamil; Ischemic postconditioning; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Malonaldehyde; Nitric oxide; Endothelin-1; Superoxide dismutase

心脏是需要高能量供给来维持自身功能的器官,当其缺血导致缺乏氧气和营养物质的运输时,可引起组织损伤^[1-2],但是,当缺血致血流受阻,随后血液恢复灌注时心肌组织损伤会进一步加重,即发生心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)^[3]。缺血后处理(ischemic postconditioning, IPC)是指对缺血心脏恢复血液灌注前实施的多次反复短暂的缺血/再灌注,可减轻再灌注引起的心肌损伤,起到保护心肌组织、治疗 MIRI 的作用^[4]。有文献报道,一些药物后处理对 MIRI 亦具有保护作用^[5-6],但未见维拉帕米后处理对 MIRI 的相关研究。本研究通过制备大鼠 MIRI 模型,对比观察维拉帕米后处理和 IPC 对大鼠 MIRI 的保护作用,为临床实施新的治疗方案提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Wistar 大鼠 60 只,雄性,体重 220 ~ 250 g,购自吉林大学基础医学院动物实验中心,合格证号:SCXK-(吉)2007-0003。动物饲养于通风动物房内,室温(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,自由进食与饮水。

1.2 实验药品和试剂 盐酸维拉帕米片(批准文号:国药准字 H12020051,40 mg/片)购自天津中央药业,批号:20120523,以 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成混悬液;钙离子(Ca^{2+})、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)测试盒购自南京建成生物工程,内皮素(ET)-1 购自北京普尔伟业生物科技。

1.3 实验方法 Wistar 大鼠 60 只,雄性,适应性饲养 1 周,将大鼠随机分为假手术(Sham)组、模型(MIRI)组、维拉帕米后处理(VP)组、缺血再灌注后处理(IPC)组,每组 10 只。除 Sham 组开胸暴露心脏后只穿线不结扎外,其他各组均行 MIRI 模型制备,具体方法^[6]:乙醚麻醉后将大鼠仰位固定,开胸暴露心脏,结扎冠状动脉左前降支,缺血 30 min 后,松开手术线恢复冠状动脉血流,再灌注 120 min;VP 组于再灌注前 60 min 灌胃给予维拉帕米 5 mg/kg;IPC 组于缺血 30 min 后松开手术线再灌注 30 s、再结扎 30 s,

循环 3 次后再灌注 120 min。

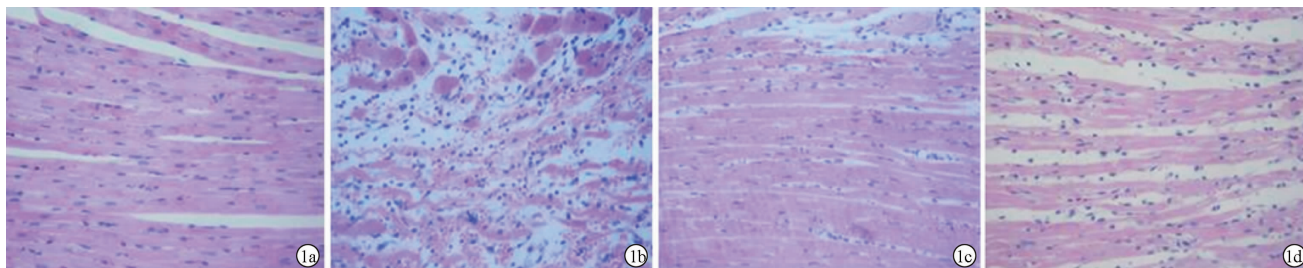
1.4 检测指标^[7] (1)心肌梗死面积(MIS):再灌注结束后,大鼠以戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,取出心脏,用生理盐水冲洗心腔内积血,去掉心房及脂肪组织,称重,将左心室心肌横切 4 ~ 5 片,用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)磷酸缓冲液染色,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴,待染色完全后取出,正常组织染色,缺血组织不染色,切下缺血心肌称重。MIS = 缺血心肌/左心室湿重 \times 100%。(2)血清心肌酶:大鼠腹主动脉采血 1 ~ 2 ml 置于离心管中,静置分离血清后,2 500 r/min,离心 10 min,取上层血清用 COBAS-FARA 自动生化分析仪检测血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)含量。(3)血清生化指标:按上述方法腹主动脉取血后分离得到血清,按试剂盒操作方法测定 SOD 活性,MDA、 Ca^{2+} 、NO、ET-1 的含量。(4)心肌组织形态学:取出心脏后用生理盐水冲洗去积血,将左心室横切 3 ~ 5 片放入 10% 甲醛溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存(pH 7.4),固定 24 h 以上,常规石蜡包埋,切片(4 μm)HE 染色,光镜检查。

1.5 统计学分析 实验数据用 SPSS 10.0 统计软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 q 检验。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 各组大鼠 MIS、血清 AST、CK 及 LDH 的变化情况 与 Sham 组比较,MIRI 组大鼠 MIS 明显扩大,血清 AST、CK 及 LDH 活性均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 MIRI 组比较,VP 组及 IPC 组大鼠 MIS 明显缩小,血清 AST、CK 及 LDH 含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);VP 组及 IPC 组两组间比较各指标差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.2 各组大鼠血清 Ca^{2+} 、MDA 含量及 SOD 活性的变化情况 与 Sham 组比较,MIRI 组大鼠血清 Ca^{2+} 、MDA 含量明显升高,SOD 活性明显降低(P 均 < 0.01);与 MIRI 组比较,VP 组及 IPC 组大鼠血清 Ca^{2+} 、MDA 含量明显降低,SOD 活性升高(P 均 $<$



注:1a, Sham 组;1b, MIRI 组;1c, VP 组;1d, IPC 组。

图 1 各组 MIRI 大鼠心肌组织形态学的变化情况

表 1 各组大鼠 MIS、血清 AST、CK 及 LDH 的变化

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	MIS (%)	AST (U/L)	CK (U/L)	LDH (U/L)
Sham 组	0	200.25 ± 79.38	821.39 ± 268.40	567.22 ± 231.55
MIRI 组	19.31 ± 5.28 ^{##}	435.62 ± 99.86 [#]	1133.56 ± 433.25 [#]	964.37 ± 296.02 ^{##}
VP 组	14.22 ± 4.62 ^{**}	209.63 ± 68.26 [*]	920.48 ± 365.12 [*]	657.39 ± 264.66 [*]
IPC 组	13.84 ± 3.96 ^{**}	231.49 ± 63.23 [*]	932.25 ± 299.64 [*]	630.12 ± 263.87 [*]

注:与 Sham 组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 MIRI 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠血清 Ca^{2+} 、MDA 含量及

SOD 活性的变化 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	Ca^{2+} (U/ml)	MDA (nmol/ml)	SOD (U/ml)
Sham 组	2.33 ± 0.40	5.43 ± 1.25	266.89 ± 40.98
MIRI 组	3.96 ± 0.79 [#]	8.26 ± 3.02 [#]	196.33 ± 34.56 [#]
VP 组	2.63 ± 0.41 [*]	5.68 ± 0.98 [*]	239.42 ± 45.31 [*]
IPC 组	2.97 ± 0.75 [*]	5.47 ± 1.56 [*]	233.65 ± 38.21 [*]

注:与 Sham 组比较,[#] $P < 0.01$;与 MIRI 组比较,^{*} $P < 0.01$ 。

表 3 各组大鼠血清 NO 及 ET-1 含量的变化

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ET-1 (ng/L)
Sham 组	59.26 ± 10.33	143.69 ± 31.29
MIRI 组	45.38 ± 8.76 [#]	262.53 ± 55.87 [#]
VP 组	51.85 ± 9.64 [*]	201.56 ± 51.38 [*]
IPC 组	53.78 ± 10.02 [*]	182.15 ± 43.96 [*]

注:与 Sham 组比较,[#] $P < 0.01$;与 MIRI 组比较,^{*} $P < 0.01$ 。

0.01);VP 组及 IPC 组两组间比较各指标差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.3 各组大鼠血清 NO 及 ET-1 含量的变化情况

与 Sham 组比较,MIRI 组大鼠血清 ET-1 含量明显升高,NO 含量明显降低(P 均 < 0.01);与 MIRI 组比较,VP 组及 IPC 组血清 ET-1 含量明显降低,NO 含量升高(P 均 < 0.01);VP 组及 IPC 组两组间比较两指标差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 3。

2.4 各组大鼠组织形态学的变化情况

HE 染色结果可见,Sham 组心肌细胞排列整齐,未见明显病理改变;MIRI 组心肌细胞排列扭曲、紊乱,心肌细胞不规则排列,间质水肿,炎细胞浸润,出现明显心肌坏死;VP 组心肌细胞损伤较轻,排列较整齐,少见炎细胞浸润,心肌坏死范围较小;IPC 组与 VP 组作用相当,细

胞排列较整齐,心肌坏死范围较小。见图 1。

3 讨论

MIRI 是心肌缺血、恢复血流再灌注后所致的心脏结构改变及功能障碍进一步加重的现象,是心脏缺血性疾病发病机制之一。目前,探讨其发病机制成为研究热点,但由于其机制十分复杂,确切机制尚不清楚。近年研究表明,心肌能量代谢障碍、氧自由基的产生、钙超载和血管内皮细胞损伤等因素可能与 MIRI 的发病过程相关^[8-9]。有大量研究表明,IPC 为反复多次缺血/再灌注之后再恢复血流,可减轻 MIRI,具有一定的心肌保护作用^[4]。本实验选择缺血 30 s,再灌注 30 s,重复 3 个循环,之后再灌注 120 min 这种经典的方案进行研究。

维拉帕米为 IV 类抗心律失常药,是一种 Ca^{2+} 内流的抑制剂(慢通道阻滞剂),由于其对冠状动脉有舒张作用,可增加冠脉流量、改善心肌供血,进而对 MIRI 具有一定的保护作用。有文献报道,维拉帕米可明显减轻家兔 MIRI,其心肌保护机制可能是通过其促进缺血再灌注心肌组织 Bcl-2 蛋白的表达来实现的^[9]。另外,维拉帕米长期治疗可缓解糖尿病大鼠 MIRI 引起的心功能下降,机制可能与其可对抗钙超载有关^[10]。

MIS 是用于评价左心室功能的重要指标之一,也是评价心血管药物在缺血性心脏疾病中治疗作用的一个重要参数。MIRI 引起细胞膜的渗透或破裂,会导致 AST、CK 及 LDH 泄漏进入血液。血清中 AST、CK 和 LDH 的水平反映心肌细胞膜的膜完整性和流动性及心肌损伤的程度^[11]。因此,血清中心肌酶水平增加,表明产生了心肌损伤。本实验结果表明,VP 组及 IPC 组可使大鼠 MIS 明显缩小,且能明显降低大鼠血清中 AST、CK 及 LDH 活性,改善心肌组织病理损伤,二者作用相当,说明 VP 和 IPC 均能使心肌缺血范围缩小,且可改善心功能及心肌组织病理损伤。

MIRI 可以诱导产生严重的氧化应激。过量产生的活性氧超过抗氧化防御系统和/或抗氧化剂活性降

低可能导致脂质过氧化过程,影响 MIRI 的发生发展。清除自由基的酶如 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是抗氧化应激的第一线细胞防御,负责清除活性氧自由基^[12]。MDA 是脂质过氧化的最终产品,MDA 含量的增加表明脂质过氧化过程处于激活状态^[13]。心肌缺血氧化应激可能产生隔膜缺陷,导致细胞内钙超载和心脏收缩功能障碍^[14]。本实验结果显示,VP 组及 IPC 组均能明显降低大鼠血清中 Ca^{2+} 、MDA 含量,升高 SOD 活性,二者作用相当,提示 VP 和 IPC 通过对抗过氧化损伤及钙超载来保护 MIRI,从而起到保护心肌的作用。

NO 和 ET-1 是反映内皮功能的重要指标,在发生 MIRI 期间,NO 水平持续下降,ET-1 水平逐渐升高,二者呈显著负相关^[15]。本实验结果显示,VP 组及 IPC 组均能明显降低大鼠血清中 ET-1 含量,升高 NO 含量,二者作用相当,提示 VP 和 IPC 可改善内皮功能起到保护心肌损伤的作用。

综上所述,维拉帕米后处理与 IPC 对大鼠 MIRI 均具有保护作用,其机制与对抗过氧化损伤及钙超载,改善内皮功能,减轻心肌病理损伤有关。

参考文献

[1] Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133(2): 230-255.

[2] Frank A, Bonney M, Bonney S, et al. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside[J]. *Semin Cardiothoracic Vascular Anesth*, 2012, 16(3): 123-132.

[3] Zuo L, Roberts W J, Tolomello RC, et al. Ischemic and hypoxic preconditioning protect cardiac muscles via intracellular ROS signaling[J]. *Front Biol*, 2013, 8(3): 305-311.

[4] Maslov LN, Naryzhnaya NV, Pei JM, et al. Problem of end-effector of ischemic postconditioning of the heart[J]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2015, 101(6): 647-669.

[5] Burley DS, Baxter GF. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(2): 177-188.

[6] 阮斐斐,周大亮,赵学忠,等. 曲美他嗪后处理与缺血后处理对大鼠再灌注心肌保护作用的对比[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(5): 1106-1108.

[7] 张虹. 白介素-18 融合蛋白对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其增效作用[D]. 长春: 吉林大学, 2012.

[8] Zhou T, Chuang CC, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury[J]. *Biomol Res Int*, 2015: 864946.

[9] Thind GS, Agrawal PR, Hirsh B, et al. Mechanisms of myocardial ischemia-reperfusion injury and the cytoprotective role of minocycline: scope and limitations[J]. *Future Cardiol*, 2015, 11(1): 61-76.

[10] 苏晓灵,程彦斌,王嵘,等. 维拉帕米对缺血再灌注损伤心肌保护机制的探讨[J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19(7): 412-415.

[11] Kelley WE, Lockwood CM, Cervelli DR, et al. Cardiovascular disease testing on the Dimension Vista system: biomarkers of acute coronary syndromes[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(13/14): 1444-1451.

[12] De Rosa S, Cirillo P, Paglia A, et al. Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach? [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2010, 8(2): 259-275.

[13] Azizova OA, Sergienko VI, Syrkin AL, et al. Clinical and prognostic significance of free radical processes in patients with coronary heart disease[J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2009(10): 32-40.

[14] Clanachan AS. Contribution of protons to post-ischemic Na^{+} and Ca^{2+} overload and left ventricular mechanical dysfunction[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2006, 17 Suppl 1: S141-S148.

[15] 连瑞珍,郑玉云. 内皮功能障碍、氧化应激与心肌缺血再灌注损伤[J]. *疾病监测与控制*, 2013, 7(7): 416-419.

收稿日期: 2016-02-23 修回日期: 2016-03-01 编辑: 周永彬

(上接第 725 页)

[7] Halici Z, Dengiz GO, Odabasoglu F, et al. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 566(1/3): 215-221.

[8] Lim SY, Jeong MH, Bae EH, et al. Predictive factors of major adverse cardiac events in acute myocardial infarction patients complicated by cardiogenic shock undergoing primary percutaneous coronary intervention[J]. *Circ J*, 2005, 69(2): 154-158.

[9] Sun Y, Qi G, Gao Y, et al. Effect of different loading doses of atorvastatin on percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes[J]. *Can J Cardiol*, 2010, 26(9): 481-485.

[10] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 304(2): 115-126.

[11] Lshida H, Higashijima N, Hirota Y, et al. Nicorandil attenuates the

mitochondrial Ca^{2+} overload with accompanying depolarization of the mitochondrial membrane in the heart[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004, 369(2): 192-197.

[12] Brener SJ, Ellis SG, Schneider J, et al. Frequency and long-term impact of myonecrosis after coronary stenting[J]. *Eur Heart J*, 2002, 23(11): 869-876.

[13] Bail DH, Walker T, Gruler M, et al. Preserved Windkessel function in patients following reduction aortoplasty of the ascending aorta[J]. *Echocardiography*, 2007, 24(5): 457-463.

[14] 吴献贤,秦玮,张勇. 他汀类药物治疗糖尿病心肌病微血管病变的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2015, 5(7): 29-34.

[15] 杨冬梅,袁白杨. 他汀类药物的临床多效性研究进展[J]. *中国药房*, 2013, 24(4): 378-382.

收稿日期: 2016-02-23 修回日期: 2016-03-01 编辑: 周永彬