· 基础研究 ·

卡维地洛和庚醇对心肌缺血再灌注损伤的保护作用

曾玉杰 冯义柏 于世龙 苗立夫 柯元南 王勇 朱丹丹 李志远 姜磊

【摘要】 目的 研究卡维地洛(CVD)、庚醇(HT)在缺血再灌注心肌损伤中作用。方法 通过建立的心脏缺血再灌注模型,采用2%氯化三苯四唑(TTC)染色测量心肌梗死的重量,监测心肌型肌酸激酶同功酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)等的变化。观察CVD、HT对心肌梗死的影响。结果 在缺血30min,再灌注6h后,CVD减少CK-MB、LDH及MDA的释放,稳定NO的分泌。HT组在一定程度上也减少了LDH、CK-MB的释放,但对NO、MDA的释放似乎没有太大影响。CVD组的大鼠梗死心肌仅占左心室心肌重量的(6.2±1.1)%,比对照组减少了51.6%。HT组梗死心肌占左心室心肌重量的(7.4±1.0)%,比对照组减少了42.2%。HE常规染色发现CVD组心肌细胞损伤程度明显减轻,粒细胞浸润也明显减少,大部分仅表现肌纤维肿胀和断裂。CVD可以防止内皮型一氧化氮合酶的减少。电镜下,CVD组和HT组心肌润盘肌丝、线粒体等损伤较轻。结论 CVD通过β受体拮抗、抗氧化等方面的作用来保护心肌。HT可能是使缝隙连接可逆性解藕联产生心肌保护作用。

【关键词】 再灌注损伤;卡维地洛;庚醇;心肌

Protective effects of carvedilol and heptanol against myocardial ischemia reperfusion injury

ZENG Yujie, FENG Yibai, YU Shilong, et al*

**Department of Cardiology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China*

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effects of cardioprotection provided by carvedilol (CVD) and heptanol (HT) in a rat model of acute myocardial ischemic-reperfusion injury. **Methods** Myocardial infarction was induced by left descending anterior coronary artery ligation for 30min, followed by 6h of reperfusion in rats. At the end of the reperfusion period, the infarct size was determined by 2% TTC staining. LDH, CK-MB, NO, MDA in blood and tissue samples of infarcted areas were measured. **Results** In CVD-treated rats, there was decrease in LDH, CK-MB and MDA, but no significant change in NO($P>0.05$). HT also could decrease LDH and CK-MB, but had no influence on NO and MDA. The myocardial infarct size was(6.2± 1.1)% of the left ventricle in CVD group, and (12.8±1.2)% in vehicle-treated rats. CVD produced 51.6% reduction in infarct size($P<0.01$). HT reduced infarct size by 42.2%($P<0.01$). In control group, HE-stained wax section examination and thin-section electron microscopic examination showed conspicuous extensive and focal necrosis of myocytes, disorganized intercalated disks and a large number of neutrophil infiltration in ischemic areas. In CVD group, the damage degree of myocytes and intercalated disks and neutrophil infiltration were markedly reduced. CVD could prevent the decrease in endothetial nitric oxide synthase. **Conclusion** CVD and HT provide powerful cardioprotective effect on ischemic-reperfused myocardium. CVD has antioxidative effect, reduces myocardial oxygen demand and neuotrophil infiltration in ischemic area, thus protecting myocardium. HT provides cardioprotection by reversible inhibition of gap junctional intercellular communication and intracellular Ca^{2+} fluctuation.

【Key words】 reperfusion injury; carvedilol; heptanol; myocardium

收稿日期:2006-08-22

作者单位:100029 北京市,中日友好医院心内科(曾玉杰、柯元南、王勇、朱丹丹、李志远、姜磊);430022 武汉市,华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科(冯义柏、于世龙);100039 北京市,清华大学华信医院心内科(苗立夫)

作者简介:曾玉杰,男,1964年8月生,湖北省襄樊市人,医学博士,副主任医师,心内科副主任。E-mail:zengyujiedxx@sina.com;Tel:13910282017

万方数据

再灌注的心肌中，心肌坏死的收缩带与血管分布并不完全一致，在有血供的区域也有心肌坏死。这种坏死可能是由于细胞间机械作用和化学作用的传递造成的[1]。缝隙连接(gap junction，GJ)通道可以直接进行细胞间 Ca^{2+} 和其他小分子物质转运，有可能在心肌坏死中起到一定的作用[2]。卡维地洛(carvedilol，CVD)是第三代β受体拮抗剂，具有 α 和β受体阻滞、抗氧化、抗细胞增殖及保护细胞等作用。本实验探讨CVD对大鼠在体心脏缺血再灌注损伤的保护作用，以及运用庚醇(heptanol，HT)改变GJ通道的通透性，减少细胞间 Ca^{2+} 转运来验证此作用是否对心肌具有保护作用。

1 实验模型和方法

1.1 **模型制作** 随机选用48只280～350g的Wistar雄性大白鼠(由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供)，术前常规心电图检查，心电图异常者剔除，术后ST段明显上移方视为手术成功。根据Evans的方法，乌拉坦0.65g/kg腹腔浅麻醉后，背位固定。正中切开、分离出气管，气管切开，插管并连接到人工呼吸机，进行人工呼吸。从气管左侧分离出左颈静脉，结扎并小心剪开一小口，用细硅胶管插入颈静脉固定，连接微泵注射器，给与30U肝素(以后每2h注入肝素10U)，打开胸腔，挤出心脏。在肺动脉圆锥与左心耳之间冠状动脉处用无创伤小圆针穿5号线，置小硅胶管后结扎左前降支冠状动脉，心电图示ST段抬高，确认造成左心室壁缺血损伤后，把心脏放回胸腔，迅速关闭胸壁。30min再打开胸壁，剪开硅胶管，抬高的ST段1～2h内回落至原来的一半以下或恢复正常，伴有(或)不伴有再灌注心律失常，为左前降支冠状动脉恢复灌流的指标[3]。再灌注6h，处死动物后并进一步验证左前降支血管是否开通。分别在心梗区、心梗和正常心肌交界处、远离心梗区的部位沿心肌纤维纵向，取5mm³大小新鲜心肌组织切块，立即放入Zamboni's固定液(2%多聚甲醛，0.2%苦味酸，0.1%磷酸盐缓冲液，pH 7.4)中，固定2～6h，用自来水冲洗，石腊包埋切片。

1.2 **心肌型肌酸激酶同工酶(MB isoenzyme of creatine kinase，CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)测定** 于实验动物缺血30min再灌注6h时，右心室抽血4～8ml，送生化室分别以N-乙酰胱氨酸激活法及免疫抑制法测定。

1.3 **一氧化碳(nitric oxide，NO)及丙二醛(malonyldialdehyde，MDA)测定** 实验动物再灌注6h，处死动物，取心梗部心肌各0.2g制备匀浆，用MDA和NO测试盒，按说明书进行检测。

1.4 **心肌梗死范围测定** 剪去心房和右心室，称左心室重量。将左心室横切成3～4片，约0.5～0.8cm厚，放入2%氯化三苯四唑(triphenyltetrazolium chloride，TTC)中染色，剪去正常心肌，称重，计算心梗占左心室重量的百分比。

1.5 **HE常规染色** HE常规染色，光镜下将病理损伤程度按于严等[4]的分级标准分成0～Ⅳ级。即：Ⅰ级为心内膜下局灶病变；Ⅱ级为心肌大范围坏死，肌纤维肿胀和断裂；Ⅲ级为心肌广泛融合性病变；Ⅳ级为心肌变性坏死。

1.6 **免疫组化染色** 石蜡切片脱蜡等处理，滴加1∶2000的小鼠抗鼠单克隆内皮型一氧化氮合酶(endothelium nitricoxide synthase，eNOS)抗体(博士德公司)，经系列处理，树脂封片，光镜观察。阴性对照以PBS代替小鼠抗鼠单克隆抗体，其余步骤相同。

1.7 **电镜标本制作** Zamboni's固定液中固定5～10min的5mm³大小标本中，切出0.5～1mm³大小的标本，放入2.5%戊二醛固定2h，整块标本用二氧化铀染色。脱水，环氧树脂包埋。超薄切片用二氧化铀和柠檬酸铅染色，透射电子显微镜观看。

1.8 **给药方案** 大鼠随机分为4组，以缺血30min，再灌注6h时各组大鼠成活8只为目标，不到终点死亡的剔出实验：(1)假手术组：8只，大鼠开胸，左冠状动脉穿线，不结扎；(2)对照组：8只，未给药手术；(3)CVD组：8只，术前7d连续胃管给CVD1mg/(kg·d)；(4)HT组：8只，术前5min静脉注射含HT 3mmol/L的生理盐水20ml/kg使血中HT浓度在1～1.2mmol/L之间。

1.9 **统计学处理** 数值为平均值和标准差，计算资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间以 t 检验进行统计学处理，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计过程均用Excel软件在计算机上进行。

2 结 果

2.1 **CVD、HT对LDH、CK-MB、NO、MDA的影响** 缺血30min，再灌注6h后，测定心肌释放LDH、CK-MB、NO、MDA，发现CVD可以减少心肌细胞的损伤，减少CK-MB、LDH及MDA的释放，稳定NO的分泌。HT组在一定程度上也减少LDH、CK-MB的释放，但对NO、MDA的释放似乎没有太大影响(表1)。

万方数据

表1 CVD、HT对LDH、CK-MB、NO、MDA影响($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	LDH(U/L)	CK-MB(U/L)
假手术组	1350±658	1198±243
对照组	5126±480	2876±258
CAV组	3152±579*	1852±340*
HT组	4023±450*	2336±267*
组别	**NO(μmol/g)**	**MDA(μmol/g)**
假手术组	90±5	6.14±1.48
对照组	70±5	36.3±4.23
CAV组	82±4#	19.4±3.78*
HT组	75±5#	37.8±4.56#

注:与对照组比较,* $P<0.05$,与对照组比较,# $P>0.05$

2.2 CDV、HT对大鼠心脏缺血再灌注心肌梗死范围的影响 大鼠缺血30min,再灌注6h后,对照组梗死心肌重量占左心室心肌重量的(12.8±1.2)%。CVD组的大鼠梗死心肌仅占左心室心肌重量的(6.2±1.1)%,心肌梗死比对照组减少了51.6%($P<0.01$)。HT组梗死心肌占左心室心肌重量的(7.4±1.0)%,心肌梗死比对照组减少了42.2%($P<0.01$)。

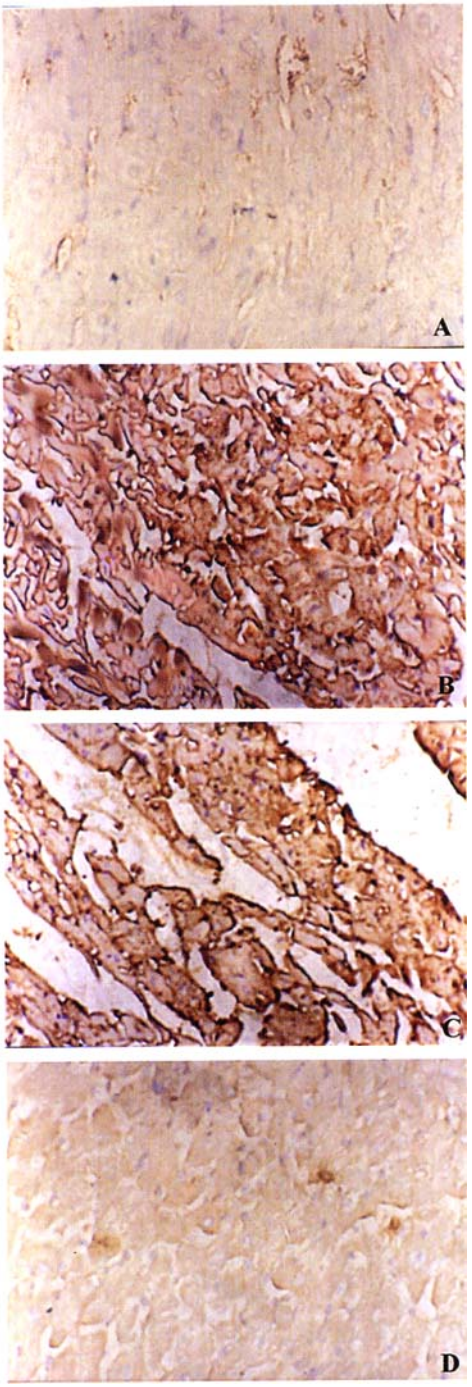
2.3 HE常规染色发现 对照组缺血30min,再灌注6h,心肌细胞明显呈片状或灶性坏死,部分肌浆凝聚,部分溶解,在一条肌纤维上呈深浅不一的特点。反应性的中性粒细胞浸润于坏死细胞之间。CVD组心肌细胞损伤程度明显减轻,粒细胞浸润也明显减少,大部分仅表现肌纤维肿胀和断裂(表2)。

表2 CVD、HT对大鼠心脏在体缺血再灌注病理损伤程度的影响($n=8$)

组别	病理损伤程度			
	0级	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级
对照组	0	0	3	5
CVD组	0	3	5	0
假手术组	7	1	0	0
HT组	0	2	4	2

2.4 免疫组化染色显示 缺血30min,再灌注6h后,对照组eNOS(图1-A)染色与假手术组eNOS染色(图1-B)相比相差明显,对照组组织切片几乎没有染色。CVD组染色(图1-C)只是比假手术组染色稍微减轻。HT组(图1-D)和对照组没有明显差异。

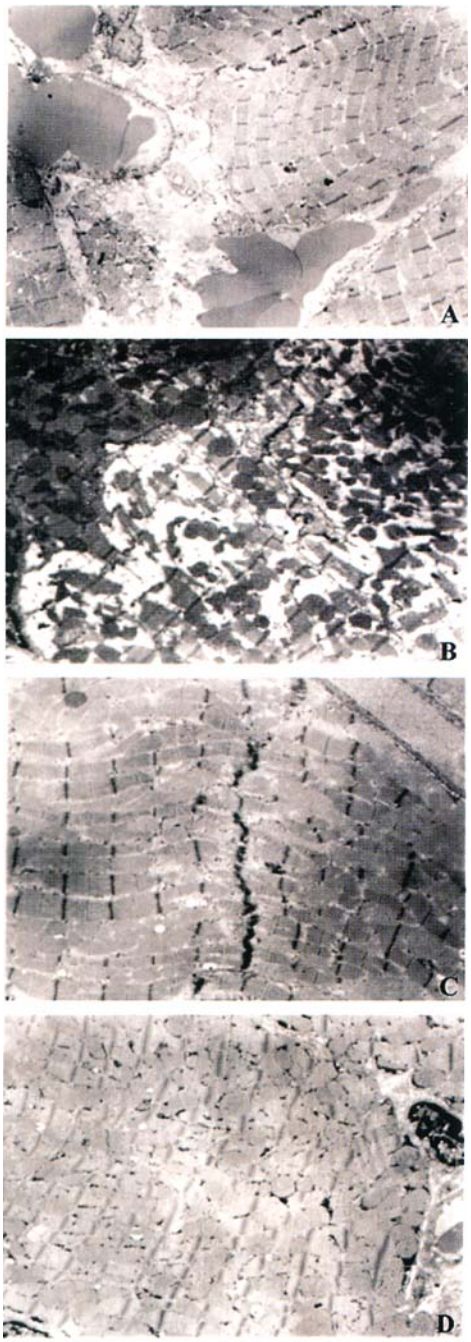
2.5 透射电子显微镜观察 透射电镜下,假手术组线粒体、肌丝结构基本正常(图2-A)。对照组缺血30min,再灌注6h线粒体呈空泡样变性、絮状改变,肌丝严重断裂(图2-B)。CVD组线粒体呈匀质样改变,肌丝尚好,无明显断裂(图2-C),HT组(图2-D)线粒体呈匀质样和空泡样改变,肌丝部分溶解。



A:对照组eNOS几乎没有被染色;B:假手术组正常组织eNOS表达;C:CVD组eNOS染色明显;D:HT组eNOS染色不明显

图1 缺血再灌注6h时心梗部心肌组织eNOS免疫组化染色

万方数据



A:假手术组:线粒体、肌丝结构基本正常,肌丝润盘尚好,无断裂,肌丝尚好;B:对照组:缺血30min再灌注6h,肌丝严重断裂,线粒体呈空泡样变性、絮状改变;C:CVD组:肌丝润盘尚好,无明显断裂,线粒体呈匀质样改变,肌丝尚好,无明显断裂;D:HT组:线粒体呈匀质样和空泡样改变,肌丝部分溶解

图2 缺血再灌注6h时心梗部心肌组织透射电子显微镜图(×4000)

3 讨 论

大鼠缺血30min,再灌注6h后,用了CVD的大鼠梗死心肌仅占左心室心肌重量的(6.2±1.1)%,与对照组相比,心肌梗死减少了51.6%($P<0.01$)。CVD通过β受体阻断剂降低心率、心肌收缩力来减少心肌需氧量达到抗心肌缺血作用。另外还具有其他β_1受体拮抗剂所不具备的减少心室壁张力作用使心肌需氧量减少更多,α_1受体阻滞作用可以使总外周血管阻力减少,从而具有较强的抗心肌缺血作用[5]。目前,已知自由基介导的脂质过氧化反应是心肌缺血再灌注损伤的重要环节,缺血再灌注后,机体通过多种途径产生多种自由基,自由基攻击细胞膜产生过氧化反应,因此测定心肌内MDA含量可反映脂质过氧化程度。本实验显示心肌缺血再灌注过程中,对照组MDA含量逐步升高,CVD组上升程度明显减少。CVD是一种强有力的抗氧化剂,这种抗氧化作用衍生于它的咔唑部分,它可以直接清除氧自由基,这种特性在其他肾上腺素受体拮抗剂中没有观察到。CVD对脂质过氧化有强烈的抑制作用,而其它β受体拮抗剂在相同的实验条件下缺乏这种效应。CVD通过抑制细胞脂质过氧化保持细胞的完整性,以及减少内源性抗氧化剂维生素E和谷胱甘肽的消耗,避免氧自由基诱导细胞死亡。CVD的代谢产物3-羟-咔唑衍生物比CVD抗氧化作用强50～80倍[6]。CVD由于有了上述独特的抗氧化特性,所以进一步加强了在缺血再灌注过程中对心肌的保护作用。

HT组MDA的含量与对照组相比没有差异性($P>0.05$),说明HT没有抗氧化作用。

实验还发现CVD明显减少中性粒细胞在缺血再灌注损伤心肌上的聚集。现已知中性粒细胞在缺血再灌注心肌浸润减少和梗死范围的减少相关[6]。实验中HT没有发现有类似的作用。大鼠心肌在缺血30min后,对照组、CVD组及HT组大鼠心肌NO含量相比,之间无显著差异($P>0.05$)。但是,缺血30min,再灌注6h后,对照组eNOS染色与假手术组eNOS染色相比相差明显,对照组组织切片几乎没有染色。CVD组染色只是比假手术组染色稍微减轻。HT组和对照组没有明显差异。这说明缺血再灌注后HT组和对照组eNOS表达明显减少,CVD组减少不明显,原因可能是:在心肌缺血再灌注早期微血管内皮损伤开始,eNOS减少,合成NO减少。随着缺血

万方数据

再灌注时间延长,诱生型一氧化氮合酶生成增多,生成的NO也相应增多。两种NO作用完全相反,前者对心脏有保护作用,后者则促进心肌细胞凋亡[6]。CVD能减轻NO的波动,可能与其对血管内皮细胞保护作用有关。实验发现HT可能缺乏这样的作用。

在大鼠缺血30min,再灌注6h后,对照组梗死心肌重量占左心室心肌重量的(12.8±1.2)%。HT组的大鼠梗死心肌为(7.4±1.0)%,心肌梗死比对照组减少了42.2% ($P<0.01$)。说明HT对心肌有一定的保护作用。

以前研究发现,长链醇类如:HT、辛醇可以可逆性使GJ解藕联,抑制GJ的通讯,[7] GJ通道可以通过cAMP、Ca^{2+}、三磷酸肌醇等第二信使,在心肌缺血时,细胞内高Ca^{2+}、酸中毒和ATP消耗时可以导致GJ通道的关闭。再灌注后,成活的细胞内pH值和Ca^{2+}快速恢复,使GJ通道开放。GJ通道开放并不能保持细胞内Ca^{2+}浓度的恒定,相邻过收缩细胞内的高Ca^{2+}通过GJ通道进入,因此出现过收缩传递,加重心肌坏死[8]。在培养的成对心肌细胞上显微注射Ca^{2+}发现,GJ通道通过传递Ca^{2+}而产生心肌细胞过收缩传递,运用HT后可以使心肌细胞过收缩传递消失[9]。缺血再灌注可以引起心肌过收缩,梗死的心肌往往出现在心肌收缩带中,并且不与被阻塞的血管分布范围相一致[1]。HT可能通过使GJ解藕联来抑制再灌注时心肌过收缩,达到心肌保护作用。

对缺血再灌注心肌,CVD和HT均可产生保护作用。从实验中可以看出HT的作用比较单一,不象CVD那样具有α和β受体阻滞、抗氧化,抗炎细胞浸润多种心肌保护作用。HT仅通过对GJ通道的作用,来达到对心肌保护作用。

参考文献

[1] Garcia-Dorado D, Therous P, Duran JM, et al. Regional contractile blockade at the oneset of reperfusion reduces infarct size in the dog heart. Pflugers Arch, 1994, 428: 134-141.

[2] Eloff BC, Gilat E, Wan X, et al. Pharmacological modulation of cardiac gap junctions to enhance cardiac conduction: evidence supporting a novel target for antiarrhythmic therapy. Circulation, 2003, 108: 3157-3163.

[3] Evans RG, Val-Mjias J E, Kulevich J, et al. Evaluation of a rat model for assessing interventions to salvage ischaemic myocardium: effects of ibuprofen and verapamil. Cardiovasc Res, 1985, 19: 132-138.

[4] 于严,汤健,王东,等. 牛黄酸对大鼠异丙肾上腺素性心肌损伤的保护作用. 中国病理生理杂志, 1991, 7: 566-568.

[5] Feuerstein GZ, Hamburger SA, Smith Ⅲ EF, et al. Myocardial protection with carvedilol. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 19 (Suppl 1): S138-S141.

[6] Niu XF, Smieh WS, Kubes P. Inracellular oxidation stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. Circ Res, 1994, 74: 1133-1140.

[7] Kimura H, Oyamada Y, Ohshika H, et al. Reversible inhibition of gap junctional intercellular communication, synchronous contraction, and synchronism of intracellular Ca^{2+} fluctuation in cultured neonatal rat cardiac myocytes by heptanol. Exp Cell Res, 1995, 220: 348-356.

[8] Lin X, Gemel J, Beyer EC, et al. Dynamic model for ventricular junctional conductance during the cardiac action potential. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288: H1113-H1123.

[9] Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, et al. Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. Cardiovasc Res, 2004, 61: 386-401.

万方数据