

四氢生物蝶呤对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究

张正义, 关晓丽, 卢昌宏, 蒙颖, 商波, 余静*

兰州大学第二医院 心脏病医院, 甘肃 兰州 730030

摘要: 目的 研究四氢生物蝶呤对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用, 并探讨其作用机制。方法 Wistar 大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组及四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组, 每组 10 只。结扎左冠状动脉前降支, 制备急性心肌缺血再灌注损伤模型。对照组、假手术组和模型组均 ig 生理盐水 2 mL, 四氢生物蝶呤组 ig 四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg。1 次/d, 连续给药 14 d。导管法测定血流动力学指标: 左心室舒张最大速率 ($-dp/dt_{max}$)、左心室舒张期末压 (LVEDP)、左室开始收缩至左室内压上升速率峰值时间 (Tau); ELISA 法测定血浆脑钠素 (BNP) 活性; 按试剂盒说明测定心肌一氧化氮合酶 (eNOS) 活性、NO 生成量; 染色法测定心肌梗死面积, 计算心肌梗死程度; 免疫组化法测定 β_3 水平。结果 与模型组比较, 四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组 $-dp/dt_{max}$ 显著增高, LVEDP 显著降低, Tau 明显缩短, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01); 血浆 BNP 显著下降, eNOS 活性、NO 生成量均显著升高 ($P < 0.01$); 心肌梗死面积更小, 心肌梗死程度更轻 ($P < 0.01$); β_3 表达水平升高 ($P < 0.01$)。结论 四氢生物蝶呤可以减少急性缺血再灌注损伤大鼠心肌梗死面积, 改善心肌舒张功能, 对大鼠急性缺血再灌注损伤具有保护作用, 可能与激活 eNOS 活性、提高 NO 生成量和 β_3 受体有关。

关键词: 四氢生物蝶呤; 急性心肌缺血再灌注损伤; 血流动力学; 心肌梗死程度; 心肌舒张功能; 保护作用

中图分类号: R965; R972 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)06-0752-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.06.005

Protection of tetrahydrobiopterin against acute myocardial ischemia-reperfusion injury in rat and its mechanism

ZHANG Zheng-yi, Guan Xiao-li, LU Chang-hong, MENG Ying, SHANG Bo, YU Jing

Cardiac Hospital, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

Abstract: Objective To study protective effect of tetrahydrobiopterin against acute myocardial ischemia-reperfusion injury in rat, and discuss its mechanism. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control, Sham, model, and tetrahydrobiopterin (5 and 10 mg/kg) groups, and each group had 10 rats. Rats were ligated the left anterior descending coronary artery and were established acute myocardial ischemia-reperfusion injury models. Rats in the control, Sham, and model groups were ig administrated with normal saline 2 mL, and rats in the tetrahydrobiopterin groups were ig administrated with tetrahydrobiopterin 5 and 10 mg/kg. The treatment were carried out once daily, and lasted for 14 d. Hemodynamic parameters, such as left ventricular diastolic maximum rate ($-dp/dt_{max}$), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), and left ventricular began to shrink to left ventricular pressure rise rate peak time (Tau) were determined by catheter method. Brain natriuretic peptide (BNP) activity in plasma was determined by ELISA method. Activity of eNOS and NO generation amounts were determined according to kit instructions. The area of myocardial infarction was determined by staining method, the degree of myocardial infarction was calculated, and the level of β_3 was determined by immunohistochemistry method. **Results** Compared with the model group, $-dp/dt_{max}$ in tetrahydrobiopterin (5 and 10 mg/kg) groups were significantly increased, LVEDP were significantly decreased, and Tau were significantly shortened, with significant difference between two groups ($P < 0.05$, 0.01). BNP activities in plasma were significantly decreased, activity of eNOS and NO generation amounts were significantly increased ($P < 0.01$). Myocardial infarction areas were smaller, the degrees of myocardial infarction were more light, and β_3 expressions were significantly higher in tetrahydrobiopterin (5 and 10 mg/kg) groups

收稿日期: 2016-02-29

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (145RJZA174); 甘肃省青年科技基金计划资助项目 (145RJYA257); 甘肃省卫生行业科研计划项目 (GSWSKY-2014-33); 兰州市科学技术局项目 (2012-1-31)

作者简介: 张正义 (1971—), 男, 副主任医师, 在读博士, 研究方向为心血管。Tel: (0931)8942143 E-mail: 1939115272@qq.com

*通信作者 余静 Tel: (0931)8942341

($P < 0.01$). **Conclusion** Tetrahydrobiopterin can reduce myocardial infarction area in rats with acute myocardial ischemia-reperfusion injury, improve cardiac diastolic function, and has protective effect against acute myocardial ischemia-reperfusion injury in rat, which may be related to activate eNOS activity, improve the NO generation amount and β_3 receptors expression.

Key words: tetrahydrobiopterin; acute myocardial ischemia-reperfusion injury; hemodynamics; myocardial infarction areas; cardiac diastolic function; protective effect

据世界卫生组织估计,到 2020 年急性冠状动脉梗阻性疾病将是人类的主要致死原因,不管通过内科用药还是介入和搭桥手术,冠状动脉再通后直接面临心肌缺血再灌注损伤。心肌缺血再灌注损伤是心肌组织在较长时间缺血后恢复血液灌流,反而出现比再灌注前更明显、更严重的损伤和功能障碍,包括收缩功能降低、冠脉流量下降及血管反应性改变。因此,如何有效地保护缺血心肌、减轻心肌缺血再灌注损伤是目前医学研究领域令人关注的重要问题。四氢生物蝶呤是一氧化氮合酶(eNOS)生成一氧化氮(NO)必须的辅助因子。研究发现^[1],外源性补充四氢生物蝶呤可以提高一氧化氮合酶的活性,促进内源性 NO 的生成,改善内皮功能不全导致的心血管疾病,减轻氧化应激,改善心肌缺血再灌注损伤。脑钠素(BNP)作为心衰的定量标志物,反映左室的收缩和舒张功能^[2],对于心功能不全具有极大的诊断价值。 β_3 受体对心血管疾病的病理生理具有重要的作用,其功能在心血管系统越来越受到重视,即将成为心脏疾病治疗的潜在靶点。本研究采用大鼠在体心肌缺血再灌注损伤模型,观察四氢生物蝶呤对心肌缺血再灌注损伤心肌舒张功能和心肌梗死程度的影响,及其与 β_3 受体之间可能的关系。

1 材料

1.1 实验动物

健康成年 Wistar 大鼠 50 只,SPF 级,体质量 180~220 g,雌雄各半,平均周龄 60 d,购自甘肃省中医学院动物实验室,动物使用合格证号 SYXK(甘)2015-0005,室温饲养,基础饲料为甘肃省中医院基础实验室提供的普通动物饲料,自由摄食和饮用自来水,饲养环境为清洁级。

1.2 试剂

戊巴比妥钠、肝素钠、四氢生物蝶呤(批号 BJZ1536,质量分数 99%以上)均购自广州库威生物科技有限公司,大鼠 BNP 酶联免疫分析试剂盒、大鼠心肌 NO 测定应用硝酸盐酶联免疫分析试剂盒、内皮型 eNOS 测试盒均购自南京建成生物工程研究所,肾上腺素能受体 β_3 抗体(镇江厚普生物

科技公司,货号 PR-1635)。

1.3 实验仪器

自动生化分析仪, Biolap-410 生物信号分析系统, HX-100E 型小动物呼吸机,病理图像采集与分析系统,低温冷冻离心, Millar 大鼠心导管。

2 方法

2.1 分组和给药

大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组及四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组,每组 10 只。对照组、假手术组和模型组均 ig 生理盐水 2 mL;四氢生物蝶呤与等体积生理盐水混匀,四氢生物蝶呤组 ig 四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg,1 次/d,连续给药 14 d。

2.2 急性心肌缺血再灌注损伤模型的制备

模型组按照文献^[3]方法稍加改进,ip 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉大鼠,固定于手术台上。行气管切开,动物呼吸机进行辅助呼吸,胸骨左旁第 3~4 肋间切开皮肤,开胸,暴露心脏,结扎左冠状动脉前降支,心电图显示 ST 段抬高,提示结扎成功。结扎 30 min 后打开结扎线,再灌注 4.5 h。假手术组仅在左冠状动脉前降支位置取同样大小的针缝针而不打结,余方法均同模型组。

2.3 血流动力学的测定

暴露右侧颈总动脉,导管法测定血流动力学(Millar 大鼠心导管, Biolap-410 生物信号分析系统),动态记录左室血流动力学指标:左心室舒张最大速率($-dp/dt_{max}$)、左心室舒张期末压(LVEDP)、左室开始收缩至左室内压上升速率峰值时间(Tau)。

2.4 血浆 BNP、eNOS 活性、NO 生成量的测定

各组大鼠再灌注 4.5 h 后,取大鼠颈动脉血 2 mL,离心后应用 ELISA 法测定血浆 BNP 活性。按试剂盒说明测定 L-精氨酸转化为 L-瓜氨酸代表心肌 eNOS 活性, $NO_3^- + NO_2^-$ 表示 NO 生成量。

2.5 心肌梗死范围和梗死程度的测定

再灌注 4.5 h 后用颈椎脱臼法处死大鼠,取出心脏。心肌梗死范围测定根据文献报道方法^[4],以伊文思蓝和氯化三苯四氮唑磷酸缓冲液(TTC, pH 7.4)染色心脏标本,以区分危险区和坏死区,伊文思蓝染色正常心肌呈蓝色,TTC 染色正常心肌和危

险心肌呈砖红色，梗死心肌染色呈白色。数码照相，通过计算机图像分析软件 image-Pro 计算左室总面积和梗死心肌面积，以梗死心肌面积占整个左室心肌面积的百分比表示梗死程度。

2.6 免疫组化法测定 β3 水平

使用 10% KCl 用压力灌注法获得舒张期心脏，冰冻切片厚度为 6 mm，固定于 10%福尔马林中，分别用抗 β3-AR 抗体 4 °C 孵育过夜，用二抗 37 °C 孵育 1 h，切片用 DAB 染色。对 β3 免疫组化图片应用 Image-Pro 软件，以 density-mean 为统计量进行处理。

2.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。非正态分布资料取对数进行转换，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 对 $-dp/dt_{max}$ 、LVEDP 和 Tau 的影响

与对照组、假手术组比较，模型组 $-dp/dt_{max}$ 、LVEDP 显著增高，Tau 明显延长；与模型组比较，

四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组 $-dp/dt_{max}$ 显著增高，LVEDP 显著降低，Tau 明显缩短，差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)，见表 1。

3.2 对血浆 BNP、eNOS 活性、NO 生成量的影响

与假手术组、对照组比较，模型组血浆 BNP、eNOS 活性明显增高，NO 生成量显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.05)；与模型组比较，四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组血浆 BNP 显著下降，eNOS 活性、NO 生成量均显著升高 ($P < 0.01$)，见表 2。

3.3 对心肌梗死范围和梗死程度的影响

与模型组比较，四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组心肌梗死面积更小，见图 1；心肌梗死程度更轻 ($P < 0.01$)，见表 3。

3.4 对 β3 表达的影响

以抗 β3 肾上腺素受体做抗体，各组均呈阳性。四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组 β3 表达较模型组明显增强，见图 2。

与对照组比较，模型组 β3 表达水平下降 ($P < 0.01$)；与模型组比较，四氢生物蝶呤 5、10 mg/kg 组 β3 表达水平均升高 ($P < 0.01$)，见表 4。

表 1 四氢生物蝶呤对心肌缺血再灌注损伤大鼠血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of tetrahydrobiopterin on hemodynamics of rats with myocardial ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例	剂量/(mg·kg ⁻¹)	$-dp/dt_{max}$ /(mmHg·s ⁻¹)	LVEDP/mmHg	Tau/ms
对照	10	—	-6 513.0 ± 129.0	6.1 ± 0.5	12.8 ± 0.3
假手术	10	—	-6 897.1 ± 197.2	5.9 ± 0.4	13.5 ± 0.3
模型	9	—	-3 928.6 ± 79.8**	22.2 ± 0.7**	24.5 ± 0.6**
四氢生物蝶呤	9	5	-4 915.1 ± 33.4▲▲	10.5 ± 0.8▲▲	19.1 ± 1.0▲▲
	10	10	5 085.1 ± 134.9▲▲	8.9 ± 0.4 ▲▲	17.7 ± 1.1▲▲

与假手术、对照组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：▲▲ $P < 0.01$ (1 mmHg = 133 Pa)

** $P < 0.01$ vs control group and Sham group; ▲▲ $P < 0.01$ vs the model group (1 mmHg = 133 Pa)

表 2 四氢生物蝶呤对心肌缺血再灌注损伤大鼠血浆 BNP、eNOS 活性、NO 生成量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of tetrahydrobiopterin on activities of BNP and eNOS, and NO generating capacity rats with myocardial ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BNP/(pg·mL ⁻¹)	eNOS 活性/%	NO 生成量/(μmol·mg ⁻¹)
对照	10	—	6.4 ± 0.5	0.63 ± 0.01	3.58 ± 0.32
假手术	10	—	6.4 ± 0.2	0.62 ± 0.01	3.66 ± 0.22
模型	9	—	7.9 ± 0.7**	0.65 ± 0.01*	2.94 ± 0.18**
四氢生物蝶呤	9	5	6.9 ± 0.4▲▲	0.75 ± 0.02▲▲	3.94 ± 0.17▲▲
	10	10	6.7 ± 0.6▲▲	0.79 ± 0.01▲▲	4.31 ± 0.16▲▲

与假手术、对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：▲▲ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group and Sham group; ▲▲ $P < 0.01$ vs the model group

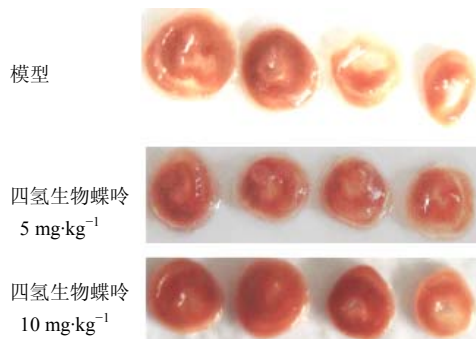


图 1 心肌梗死范围的比较

Fig. 1 Comparison on degree of myocardial infarction

表 3 四氢生物蝶呤对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌梗死程度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison on degree of myocardial infarction of rats with myocardial ischemia- reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例	剂量/(mg·kg ⁻¹)	心肌梗死程度/%
模型	9	—	0.24±0.02
四氢生物蝶呤	9	5	0.16±0.02 ^{▲▲}
蝶呤	10	10	0.12±0.01 ^{▲▲}

与模型组比较: ^{▲▲}P<0.01

^{▲▲}P<0.01 vs the model group

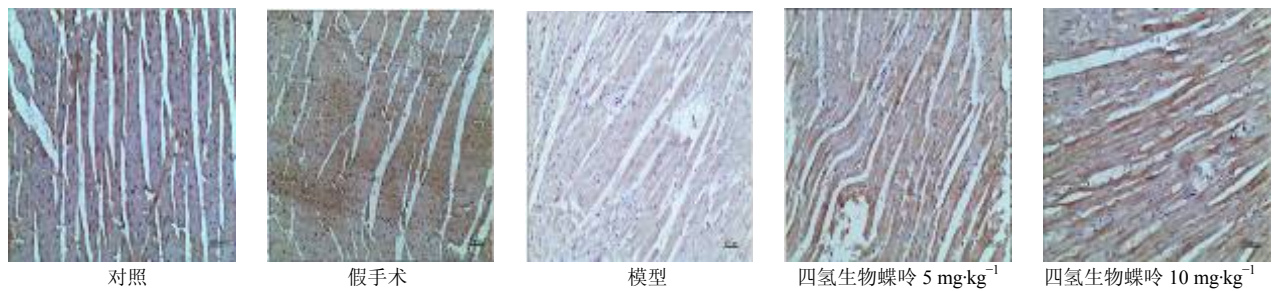


图 2 心肌组织病理学 (DAB 染色)

Fig. 2 Histopathology of heart tissues (DAB staining)

表 4 四氢生物蝶呤对心肌缺血再灌注损伤大鼠 β3 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison on β3 expression levels in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/例	剂量/(mg·kg ⁻¹)	β3 表达量
对照	10	—	0.58±0.07
假手术	10	—	0.55±0.06
模型	9	—	0.32±0.06 ^{**}
四氢生物蝶呤	9	5	0.45±0.02 ^{▲▲}
	10	10	0.50±0.03 ^{▲▲}

与假手术、对照组比较: ^{**}P<0.01; 与模型组比较: ^{▲▲}P<0.01

^{**}P<0.01 vs control group and Sham group; ^{▲▲}P<0.01 vs model group

4 讨论

心肌缺血再灌注损伤导致心肌梗死面积扩大, 心功能恶化。以往的大量研究集中于收缩功能不全, 但是近年来, 左心室舒张功能不全受到越来越多的关注。舒张功能不全可单独存在, 亦可与收缩功能障碍并存, 其在多种疾病的病程中先于收缩功能障碍的出现。为了进一步研究舒张功能不全, 本研究观察不同剂量四氢生物蝶呤对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤后舒张功能的影响, 并对机制进行了探索。

慢性心衰处于氧化应激状态时, 活性氧类物质的产生是增加的(超氧化物、过氧化氢、羟自由基)。当 NO 与超氧阴离子反应生成过氧亚硝酸盐时, 其由有利变为有害。这样, 抗氧化应激及增加 NO 的活性的治疗策略成为慢性心力衰竭患者可能的干预新靶点。缺血再灌注损伤后, 活性氧 (ROS) 生成增多, 心肌处于高氧化应激状态, NO 生成减少^[1]。本研究发现, 与模型组比较, 应用外源性 5、10 mg/kg 四氢生物蝶呤能够显著提高 eNOS 活性, 增加 NO 生成量, 从而改善心肌缺血再灌注损伤。

众所周知, 血流动力学指标中, $-dp/dt_{max}$ 表示心室舒张期室内压下降最大速率, LVEDP 主要反映左心室的舒张功能, 作为心脏前负荷的指标; Tau 左室松弛时间常数, 作为左室舒张功能评价的金指标; 血浆 BNP 作为心衰的标志物, 反映左室的舒张功能及收缩功能。本研究结果发现, 与模型组比较, 应用外源性 5、10 mg/kg 四氢生物蝶呤后, 降低 LVEDP、增高 $-dp/dt_{max}$, 缩小心肌梗死面积, 改善左室舒张功能, 从而使 BNP 活性下降。

本研究结果显示, 外源性 5、10 mg/kg 四氢生物蝶呤干预后, 可以增加 eNOS 活性并增加 NO 生

产量,与文献报道结果^[5-6]一致,其机制可能是四氢生物蝶呤增加 NOS 再耦联,从而提高 NOS 的活性,促进内源性 NO 的生成。逆转 NOS 耦联是一种潜在的治疗心肌功能障碍的新策略^[7-8]。本研究结果显示,在一定剂量范围内,增加四氢生物蝶呤产生的心脏保护效应具有剂量相关性,与 Moens 等^[9]研究一致。

β_3 受体对心血管疾病的病理生理具有重要的作用,其功能在心血管系统中越来越受到重视,已经作为治疗心脏病的潜在靶点^[10-11]。 β_3 受体的表达可增加 NO 生物活性,对心肌缺血再灌注损伤具有保护效应^[12]。本研究结果发现,与模型组比较,增加外源性四氢生物蝶呤,能够提升 β_3 受体在心肌的表达,其机制可能为四氢生物蝶呤不仅是 NOS 必须辅助因子,而且是酪氨酸生成儿茶酚胺的必须辅助因子^[13],后者对 β_3 受体具有兴奋激动作用,推测四氢生物蝶呤可能对 β_3 在心肌的表达发挥提升调节作用。

综上所述,四氢生物蝶呤可以减少急性缺血再灌注损伤大鼠心肌梗死面积,改善心肌舒张功能,对大鼠急性缺血再灌注损伤具有保护作用,这种作用可能与激活 eNOS 活性、提高 NO 生成量和 β_3 受体有关。

参考文献

- [1] Wang Q, Yang M, Xu H, *et al.* Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in cardiovascular disease: A systematic review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 1-7.
- [2] Baptista R, Jorge E, Sousa E, *et al.* B-type natriuretic peptide predicts long-term prognosis in a cohort of critically ill patients [J]. *Heart Int*, 2011, 6(2): e18.
- [3] Xu Z, Alloush J, Beck E, *et al.* A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery [J]. *J Vis. Exp*, 2014, 86: e51329.
- [4] Khan B V, Rahman S T, Haque T, *et al.* Vascular effects of nebivolol added to hydrochlorothiazide in African

americans with hypertension and echocardiographic evidence of diastolic dysfunction: The nasaa study [J]. *J Cardiovas Pharmacol Therap*, 2012, 17(3): 291-297.

- [5] Wajima T, Shimizu S, Hiroi T, *et al.* Reduction of myocardial infarct size by tetrahydrobiopterin: Possible involvement of mitochondrial katp channels activation through nitric oxide production [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47(2): 243-249.
- [6] Hiroi T, Wajima T, Kaneko Y, *et al.* An important role of increase in tetrahydrobiopterin via H₂O₂-JAK2 signalling pathway in late phase of ischaemic preconditioning [J]. *Exp Physiol*, 2010, 95(5): 609-621.
- [7] Moens A L, Champion H C, Claeys M J, *et al.* High dose folic acid pre-treatment blunts cardiac dysfunction during ischemia coupled to maintenance of high energy phosphates and reduces post-reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2008, 117(14): 1810-1819.
- [8] Takimoto E, Champion H C, Li M, *et al.* Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(5): 1221-1231.
- [9] Moens A L, Ketner E A, Takimoto E, *et al.* Bi-modal dose-dependent cardiac response to tetrahydrobiopterin in pressure-overload induced hypertrophy and heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(4): 564-569.
- [10] Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, *et al.* Functional beta3-adrenoceptor in the human heart [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(2): 556-562.
- [11] Rozec B, Gauthier C. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 111(3): 652-673.
- [12] Stanhewicz A E, Alexander L M, Kenney W L. Oral sapropterin augments reflex vasoconstriction in aged human skin through noradrenergic mechanisms [J]. *J Appl Physiol*, 2013, 115(7): 1025-1031.
- [13] Aragón J P, Condit M E, Bhushan S, *et al.* Beta3-adrenoceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(25): 2683-2691.