

· 药理实验与临床观察 ·

心肌肽素对缺血-再灌流损伤大鼠离体心脏的影响

中国人民解放军第 458 医院传染病中心分子生物学科(广州 510602) 万华印* 孔祥平 易学瑞
中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所 宋 珍** 滕 健 范礼理

摘 要 为研究小分子多肽类物质心肌肽素抗心肌缺血-再灌流损伤作用,在大鼠离体 Langendoff's 心脏缺血-再灌流损伤模型上,观察心肌肽素对室颤(VF)发生率及心肌生化指标的影响。结果发现:心肌肽素能明显降低离体缺血-再灌流损伤心脏 VF 的发生率;剂量依赖性地降低心肌乳酸脱氢酶(LDH)活性和丙二醛(MDA)含量;提高心肌肌酸磷酸激酶(CPK)活性。提示心肌肽素对缺血-再灌流损伤心肌有保护作用,这可能与其抗脂质过氧化和影响心肌酶的活性有关。

关键词 心肌肽素 再灌流损伤 心肌酶 脂质过氧化物

Effect of Cardiomyopeptidin on Isolated Rat Heart Injured by Ischemia-Reperfusion

Department of Molecular Biology, the Infectious Disease Center of No. 458 Hospital of PLA (Guangzhou 510602) Wan Huayin, Kong Xiangping and Yi Xuerui

Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences Song Zhen, Teng Jian and Fan Lili

Abstract Effects of the low molecular weight polypeptide cardiomyopeptidin (CMP) on ischemia-reperfusion injury (IRI) inflicted on myocardium of the Langendorff model of isolated rat heart were studied. The results showed that CMP could obviously decrease the incidence of ventricular fibrillation in heart damaged by IRI; reduce the activity of LDH and MDA content and increase the activity of CPK in anterior wall of ventricular myocardium in a dose dependent manner. The results indicated that CMP had a protective effect on IRI infliction of the myocardium which be related to its inhibitory effect on lipid peroxidation and influencing the activities of myocardial enzymes.

Key words cardiomyopeptidin ischemia-reperfusion injury myocardial enzyme lipid peroxidation

自 Jennings 等^[1]1960 年发现再灌损伤以来,抗缺血-再灌流损伤(ischemia-reperfusion injury, I-RI)的研究就成为医学基础与临床的重点课题之一^[2]。有关多肽类物质抗缺血-再灌流损伤的研究也日益受到人们的重视^[3],但尚未见从乳猪心脏提取的活性多肽抗心肌缺血-再灌流损伤的报道。我们对该活性物质的药理作用进行了较系统的研究,旨在为新药开发提供药效学依据。

1 材料与方法

1.1 药物:心肌肽素(cardiomyopeptidin, CMP)溶液,橙色透明,由中国人民解放军第四五八医院提供,多肽含量为 10 mg/mL。盐酸维拉帕米(verapamil hydrochloride, Ver)注射液,江苏连云港制药厂生产,含量为 5 mg/2 mL。

1.2 试剂:肌酸磷酸激酶(creatine phosphokinase,

CPK)试剂盒及乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)试剂盒均购自北京化工二厂。硫代巴比妥酸为 Sigma 公司产品。

1.3 动物:Wistar 大鼠,购自中国医学科学院实验动物中心,体重为(300±50)g,雌雄兼用。10 只动物为一组。

1.4 离体心脏心肌缺血-再灌流损伤模型^[4]:大鼠 ip 麻醉后,经静注肝素抗凝,取心脏作主动脉插管,进行心脏灌流。灌流营养液成分:高 Ca^{2+} ,低 K^{+} 并充以 95% O_2 +5% CO_2 的混合气体。灌流速度 6~8 mL/min,温度(37±0.5)℃。阻断左前降支(LAD)10 min,再灌流 15 min。

1.5 分组与给药:正常对照组行假手术,持续灌流营养液;给药组于缺血前 5 min,开始灌流含有心肌肽素(终浓度为 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)或维拉帕米(1

* Address: Wan Huayin, Department of Molecular Biology, No. 458 Hospital of PLA, Guangzhou

万华印 男,1989 年毕业于第一军医大学医疗系,获医学学士;1994 年毕业于该校药理专业,获医学硕士。现为中国人民解放军第 458 医院主治医师。主要研究方向:心血管药理及临床,生化新药的基础研究与开发。现已发表论文 12 篇,参与编写著作 1 部,获军队科技进步奖 3 项。

** 中国医学科学院阜外医院临床药理基地

“九·五”国家重点科技攻关项目(No. 96-902-01-04)

μg/mL) 的营养液,直至再灌流 5 min,换成不含药的营养液;缺血-再灌流组则持续灌流营养液。

1.6 检测指标:以试剂盒测定左心室前壁(缺血区)与后壁(非缺血区)心肌 CPK、LDH 活性,用硫代巴比妥酸法^[5]测定脂质过氧化终产物丙二醛(MDA)含量。蛋白质定量用 Folin 酚法。

1.7 统计处理:实验数据以百分率或均数±标准差表示。进行 χ^2 检验或 t 检验。

2 结果

2.1 心肌肽素对缺血-再灌流离体大鼠心脏 VF 发生率的影响:缺血-再灌流组心脏 VF 发生率高达 90%,与假手术组比较有非常显著意义($P<0.01$)。心肌肽素各剂量组 VF 发生率仅 10%~20%,与缺血-再灌流组比较,下降均有非常显著意义($P<0.01$),见表 1。

表 1 心肌肽素对缺血-再灌流离体大鼠心脏 VF 发生率的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (μg/mL)	心室纤颤	
		发生数	发生率(%)
假手术	—	0	0
缺血-再灌流	—	9	90
缺血-再灌流+ 心肌肽素	10	1	10*
	50	2	20*
	100	1	10*
缺血-再灌流+ 维拉帕米	1	0	0*

与假手术组比较: $P<0.01$

与缺血-再灌流组比较: * $P<0.01$

2.2 对离体大鼠心脏缺血-再灌流心肌 CPK 活性的影响:缺血-再灌流组左室前壁与后壁心肌的 CPK 活性均降低,与假手术组比较有非常显著意义($P<0.01$),且以前壁(缺血区)降低更为明显。心肌肽素 10~100 μg/mL 3 个剂量组的心肌 CPK 活性均较缺血-再灌流组升高,且均有非常显著意义($P<0.01$)。其作用与灌流维拉帕米 1 μg/mL 相似,见表 2。

表 2 心肌肽素对离体大鼠心肌 CPK 活性的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (μg/mL)	心肌 CPK(U/100 mg·pro)	
		前 壁	后 壁
假手术	—	271±25	245±21
缺血-再灌流	—	113±7.7	174±18
缺血-再灌流+ 心肌肽素	10	166±17*	206±13*
	50	194±13*	203±11*
	100	187±15*	201±16*
缺血-再灌流+ 维拉帕米	1	185±17*	206±27*

与假手术组比较: $P<0.01$ * 与缺血-再灌流组比较: $P<0.01$

2.3 对离体大鼠心脏缺血-再灌流心肌 LDH 活性的影响:缺血-再灌流引起心肌 LDH 活性增加,与假

手术组比较有非常显著意义($P<0.01$)。3 个剂量心肌肽素组 LDH 活性剂量依赖性下降($r_{前壁}=-0.96, P<0.01$),与缺血-再灌流组比较均有非常显著意义($P<0.01$)。此作用亦与维拉帕米 1 μg/mL 相似,见表 3,图 1。

表 3 心肌肽素对离体大鼠心肌 LDH 活性的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (μg/mL)	心肌 LDH(U/100 mg·pro)	
		前 壁	后 壁
假手术	—	21.0±1.5	21.2±0.92
缺血-再灌流	—	35.5±3.3	24.3±1.5
缺血-再灌流+ 心肌肽素	10	26.2±0.98*	21.9±0.99*
	50	23.6±1.5*	21.1±0.73*
	100	22.4±0.72*	20.7±0.93*
缺血-再灌流+ 维拉帕米	1	24.0±1.6*	22.3±1.3*

与假手术组比较: $P<0.01$; 与缺血-再灌流组比较: * $P<0.01$

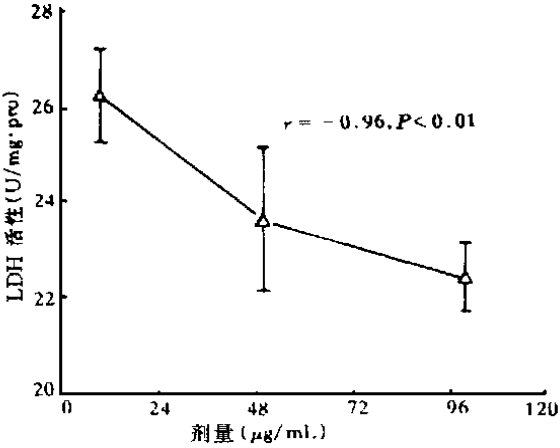


图 1 心肌肽素剂量与离体大鼠左室前壁心肌 LDH 活性的关系

2.4 对离体大鼠心脏缺血-再灌流心肌 MDA 含量的影响:缺血-再灌流导致心肌 MDA 含量明显升高,与假手术组比较有非常显著意义($P<0.01$)。10~100 μg/mL 心肌肽素灌流,能剂量依赖性地降低左室前壁 MDA 含量($r_{前壁}=-0.98, P<0.01$),与缺血-再灌流组比较均有非常显著意义($P<0.01$);而对后壁 MDA 含量均无明显影响($P>0.05$)。维拉帕米组 MDA 含量也下降,与缺血-再灌流组比较亦有非常显著意义($P<0.01$),见表 4,图 2。

3 讨论

在缺血-再灌流损伤中,氧自由基发挥了重要作用^[6], Ca^{2+} 的超载又易导致心律失常^[7]。本实验以 CPK、LDH 活性反映缺血心肌细胞受损情况;检测脂质过氧化反应终产物 MDA 的含量,以反映氧自由基损伤的程度,并探讨它们与心室颤动的关系。结

表 4 心肌肽素对离体大鼠心肌 MDA 含量的影响
($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	心肌 MDA (nmol/100 mg. pro)	
		前 壁	后 壁
假手术	—	84.3 $\pm$ 5.5	77.3 $\pm$ 4.6
缺血-再灌流	—	161 $\pm$ 14.0	90.0 $\pm$ 3.1
缺血-再灌流+ 心肌肽素	10	112 $\pm$ 7.7 ^{**}	88.2 $\pm$ 4.0 [*]
	50	94.7 $\pm$ 4.0 ^{**}	90.1 $\pm$ 5.1 [*]
	100	83.8 $\pm$ 5.3 ^{**}	84.4 $\pm$ 4.9 [*]
缺血-再灌流+ 维拉帕米	1	89.3 $\pm$ 3.6 ^{**}	81.4 $\pm$ 3.5 ^{**}

与假手术组比较: $P < 0.01$

与缺血-再灌流组比较: $^* P > 0.05$ $^{**} P < 0.01$

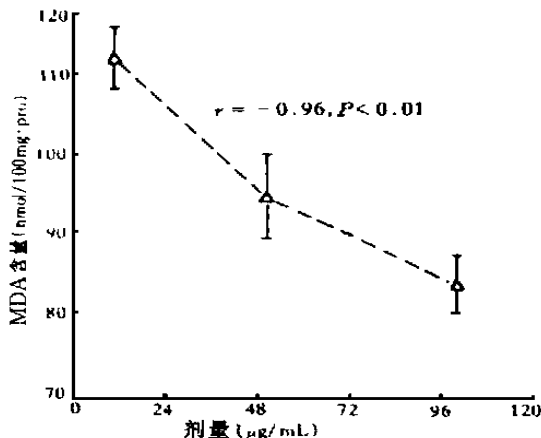


图 2 心肌肽素剂量与离体大鼠左室前壁心肌 MDA 含量的关系

果发现损伤组心脏室颤发生率较假手术组显著提高,同时,心肌酶活性及 MDA 含量也发生显著改变。

动物药是中药的一个重要组成部分^[8], 利用生

化技术提取脏器中有效成分, 应用于临床治疗已有报道^[9]。心肌肽素为从乳猪心脏中提取的活性多肽, 我们发现其对离体心脏缺血-再灌流损伤导致的室颤有明显的预防作用。在缺血-再灌流后心肌脂质过氧化反应加强, MDA 含量增加, 心肌肽素可剂量依赖性地降低 MDA 含量, 减轻自由基损伤。损伤组心肌出现变性、坏死, 使膜功能受损, 细胞内 CPK 外逸, 致心肌 CPK 活性显著下降^[10], 心肌肽素可显著提高心肌 CPK 活性, 提示其可减轻心肌损伤。心肌缺血后细胞内无氧代谢加强, 诱导产生 LDH 增加^[10], 心肌肽素能剂量依赖性地降低心肌前壁 LDH 活性, 改善缺血-再灌流心肌能量代谢。心肌 MDA、CPK 及 LDH 的变化均以缺血部位心肌为甚, 提示缺血损伤是缺血-再灌流损伤的基础。钙拮抗剂预防性给药对缺血-再灌流损伤也有明显的保护作用。

上述结果提示心肌肽素对大鼠缺血-再灌流损伤离体心脏有保护作用, 可能与其降低心肌 MDA 含量及 LDH 活性, 提高 CPK 活性有关。至于其与细胞内 Ca^{2+} 的关系等, 将另文报道。

参考文献

- Jennings R B, *et al.* Arch Pathol, 1960, 70(7): 68
- Hammerman C, *et al.* Clin Perinatol, 1998, 25(3): 757
- Kalfin R, *et al.* J Pharmacol Exp Ther, 1994 268(2): 952
- Shekher A, *et al.* Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1997, 19(4): 223
- 万华印, 等. 中草药, 1996, 27(2): 103
- Du G, *et al.* Free Radic Biol Med, 1998, 25(9): 1066
- Yoshizumi M, *et al.* Scand Cardiovasc J, 1998, 32(3): 167
- 邓明鲁, 等. 长春中医学院学报, 1995, 11(1): 50
- 傅建明, 等. 中国新药杂志, 1997, 6(1): 40
- Ma X L, *et al.* Cardiovasc Res, 1997, 36(2): 195

(1999-05-18 收稿)

莲心碱对豚鼠心室肌细胞动作电位及钠与钙电流的影响

同济医科大学药理教研室(武汉 430030) 王嘉陵* 农 艺 姚伟星 江明性

摘 要 为探讨莲心碱(liensinine, Lien)对心肌离子流的影响及抗心律失常作用机制。采用全细胞膜片钳技术, 记录了 Lien 对单个豚鼠心室肌细胞动作电位(AP)及钠电流(I_{Na})与 L-型钙电流($I_{\text{Ca-L}}$)的影响。Lien 3 ~ 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 可剂量依赖性地降低 AP 幅度(APA)、静息电位(RP), 延长 AP 时程。Lien 10, 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 分别使 I_{Na} 及 $I_{\text{Ca-L}}$ 从给药前的 (8.6 $\pm$ 2.3) nA 和 (758 $\pm$ 177) pA 降至 (5.4 $\pm$ 1.7)、(2.2 $\pm$ 1.6) nA 和 (335 $\pm$ 122)、(137 $\pm$ 100) pA。Line 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 抑制 I_{Na} 和 $I_{\text{Ca-L}}$ 的 I-V 曲线并使后者的峰值电流电位略右移。结果表明 Lien 有钠、L-型钙通道阻滞作用, 这些可部分解释其抗心律失常作用机制。

关键词 莲心碱 心室肌细胞 膜片钳技术 L-型钙电流 钠电流

Effects of Liensinine on Action Potentials and I_{Na} , $I_{\text{Ca-L}}$ in Guinea Pig Ventricular Myocytes

* Address: Wang Jialing, Department of Pharmacology, Tongji University of Medical Sciences, Wuhan.

王嘉陵 男, 博士, 留美博士后, 教授, 硕士生导师, 中国药理学会全国药理学教学与科普专业委员会委员, 武汉市药理学学会理事。承担国家及省部级等课题多项, 负责 4 项, 参与 3 项, 鉴定成果 4 项, 获教育部及省科技进步奖 3 项, 获发明专利 3 项。发表科研论文 50 余篇, 参编著作 2 部。主要从事心血管药理及植化研究。

卫生部科研基金资助及武汉市科委重点项目基金