

不同浓度硝酸甘油对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的作用

姜翠荣, 高 琴, 王晓梅, 李正红

[摘要] 目的: 探讨不同浓度硝酸甘油(nitroglycerin, GTN)对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的作用。方法: 采用离体大鼠心脏 Langendorff 灌流方法, 结扎冠状动脉左前降支 30 min 和再灌注 120 min 复制局部缺血/再灌注损伤模型, 测定各项心室动力学指标、冠状动脉流出液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)含量及心肌梗死面积。结果: 与单纯缺血/再灌注组相比, GTN 高浓度组(2×10^{-6} mol/L)抑制了再灌注后心功能的恢复($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 增大了心肌梗死面积($P < 0.01$), 再灌注时冠状动脉流出液中 LDH 释放增加($P < 0.05$); GTN 中浓度组(1×10^{-7} mol/L)与单纯缺血/再灌注组相比, 对心功能的恢复、心肌梗死面积和 LDH 含量改变不明显; GTN 低浓度组(1×10^{-8} mol/L)明显促进了再灌注后心功能的恢复, 减小了心肌梗死面积, 冠状动脉流出液中 LDH 释放减少($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。结论: 高浓度 GTN 加重心肌缺血/再灌注损伤, 中浓度 GTN 对缺血/再灌注心肌作用不明显, 低浓度 GTN 可保护缺血/再灌注心肌。

[关键词] 硝酸甘油; 心肌; 缺血/再灌注损伤; 一氧化氮; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 331.33 **[文献标识码]** A

The role of different concentrations of nitroglycerin on cardiac ischemia and reperfusion injury in isolated perfused rat hearts

JIANG Cui-rong, GAO Qin, WANG Xiao-mei, LI Zheng-hong

(Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the effects of different concentrations of nitroglycerin (GTN) on cardiac ischemia and reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were used for Langendorff isolated heart perfusion. The hearts were subjected to 30 min regional ischemia (occlusion of left anterior descending artery) and 120 min reperfusion. The ventricular hemodynamic parameters, lactate dehydrogenase (LDH) release during reperfusion and myocardial infarct size were measured. **Results:** Administration of GTN at high concentration (2×10^{-6} mol/L) significantly aggravated post-ischemic myocardial injury characterized by depressed cardiac function recovery ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), enlarged myocardial infarct size ($P < 0.01$) and increased LDH release ($P < 0.05$). GTN at middle concentration (1×10^{-7} mol/L) did not change the cardiac function recovery, myocardial infarct size and LDH release ($P < 0.01$). GTN at low concentration (1×10^{-8} mol/L) further improved the cardiac function recovery, reduced infarct size and LDH release ($P < 0.05 \sim P < 0.01$). **Conclusions:** GTN at high concentration can aggravate cardiac ischemia and reperfusion injury, GTN at middle concentration do not influence heart while GTN at low concentration can protect heart.

[Key words] nitroglycerin; myocardial; ischemia/reperfusion injury; nitric oxide; rats

长期以来硝酸酯类作为治疗心血管疾病的药物其疗效已得到公认。硝酸酯类在体内经生物转化释放一氧化氮(nitric oxide, NO), 激活鸟苷酸环化酶生成 cGMP, 使血管平滑肌细胞胞质内 Ca^{2+} 减少, 扩张动静脉, 改善心肌供血、供氧, 降低心肌前后负荷和耗氧量及发挥心肌保护作用^[1]。随着硝酸甘油(nitroglycerin, GTN)在临床上广泛应用, 其耐药性引起了学者的重视。研究^[2]表明, 长期使用硝酸酯类

可能加重心肌组织缺血/再灌注损伤。范谦等^[3]研究发现大剂量 GTN 加重大鼠离体心脏缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤, 其损伤的具体机制尚不清楚; 不同浓度 GTN 对缺血/再灌注心肌的作用报道甚少。本研究在离体大鼠心肌缺血再灌注模型上, 观察不同浓度 GTN 对缺血/再灌注心肌的作用, 并分析其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物及主要药品和试剂 雄性 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250 g, 由蚌埠医学院实验动物中心提供。Evans blue, 2,3,5-triphenyl-tetrazoliumchloride (TTC) (Sigma 公司产品)。GTN 注射液(北京益民药业有限公司)。Krebs-Henseleit (K-H) 液(国产分析纯试

[收稿日期] 2010-07-03

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(090413097); 安徽省高校优秀青年人才基金资助项目(2009SQRZ128)

[作者单位] 蚌埠医学院 生理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 姜翠荣(1977 -), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 李正红, 硕士研究生导师, 副教授。

剂配制)。

1.2 离体心脏缺血/再灌注模型复制 SD 大鼠断头后开胸迅速取出心脏,置于 4℃ 改良 K-H 液中洗净血液,迅速转移、固定于 Langendorff 灌流装置,以改良 K-H 液行常规 76 mmHg 恒压灌流。改良 K-H 液成分如下:NaCl 118.0 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, K_2PO_4 1.2 mmol/L, $MgSO_4$ 1.2 mmol/L, $NaHCO_3$ 25.0 mmol/L, $CaCl_2$ 1.25 mmol/L, 葡萄糖 11.0 mmol/L, pH 7.3 ~ 7.4, 均以 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体饱和,维持灌流液温度 37℃。采用 5-0 医用无损缝合线穿过冠状动脉左前降支以备结扎。各组心脏均稳定 20 min 后,进行实验。结扎冠状动脉左前降支使局部心肌缺血 30 min,随后松开结扎再灌注 120 min。

1.3 实验动物分组 SD 大鼠 48 只,随机分为 4 组,每组 12 只,其中 6 只用于测生化指标,6 只用于测心肌梗死面积。(1) I/R 组:稳定灌流 20 min 后,结扎冠状动脉左前降支 30 min 后松开结扎线,再灌注 120 min;(2) GTN 高浓度组:同 I/R 组,但在缺血末 5 min,再灌注初期 10 min,以含有 GTN 2×10^{-6} mol/L 的 K-H 液灌流 15 min;(3) GTN 中浓度组:同 GTN 高浓度组,但 GTN 的浓度为 1×10^{-7} mol/L;(4) GTN 低浓度组:同 GTN 高浓度组,但 GTN 的浓度为 1×10^{-8} mol/L。

1.4 左心室功能评价 向插入左心室内的乳胶囊注水使左心室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)维持在 4 ~ 10 mmHg,连续记录实验过程中左心室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP)、心率(heart rate, HR)和心率与发展压的乘积(rate pressure product, RPP = LVDP × HR)和 LVEDP 等各项指标。

1.5 灌流心脏流出液乳酸脱氢酶的测定 分别在再灌注 5 min 和 10 min 收集冠状动脉流出液,利用分光光度法测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的含量。

1.6 心肌梗死面积测定 离体心脏再灌注 120 min 后结扎冠状动脉,取 1% Evans 蓝经主动脉注入心脏,冷冻后与心脏纵轴垂直切成 2 mm 均匀薄片,1% TTC 染色 10 ~ 15 min,10% 甲醛溶液固定,根据颜色不同区分各区域。蓝色为非梗死区,红色为危险区,苍白色为梗死区。拍摄染色的心脏切片,使用 Image/J 软件测量相关区域面积,计算梗死区占危险

区的比值。

1.7 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 左心室功能的变化 与 I/R 相比,GTN 高浓度组在再灌注期明显降低了 LVDP,增大了 LVEDP 的抬高,并抑制了 RPP 的恢复($P < 0.01$);GTN 中浓度组对 LVDP、LVEDP 和 RPP 均无明显影响($P > 0.05$);GTN 低浓度组抬高了再灌注期 LVEDP,抑制了整个再灌注期 LVDP 和 RPP 的下降($P < 0.05$ ~ $P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 各组离体大鼠心脏血流动力学 LVDP、LVEDP、RPP 参数($n_i = 12$; $\bar{x} \pm s$)

| 分组 | 再灌注 10 min | 再灌注 120 min |
|-----------|-------------------|-------------------|
| LVDP(%) | | |
| I/R 组 | 61.54 ± 8.25 | 32.94 ± 5.13 |
| 高 GTN 组 | 43.08 ± 6.35 ** | 24.17 ± 1.10 ** |
| 中 GTN 组 | 58.49 ± 11.83 | 30.23 ± 4.34 |
| 低 GTN 组 | 71.87 ± 12.39 * | 73.22 ± 5.66 ** |
| F | 16.94 | 255.22 |
| P | <0.01 | <0.01 |
| $MS_{组内}$ | 100.462 | 23.500 |
| LVEDP(%) | | |
| I/R 组 | 277.21 ± 14.93 | 209.33 ± 15.51 |
| 高 GTN 组 | 317.53 ± 28.08 ** | 295.10 ± 19.08 ** |
| 中 GTN 组 | 288.85 ± 27.70 | 222.14 ± 15.13 |
| 低 GTN 组 | 155.65 ± 18.61 ** | 176.85 ± 20.11 ** |
| F | 115.40 | 96.72 |
| P | <0.01 | <0.01 |
| $MS_{组内}$ | 531.253 | 309.484 |
| RPP(%) | | |
| I/R 组 | 58.56 ± 3.08 | 37.99 ± 5.93 |
| 高 GTN 组 | 35.49 ± 1.82 ** | 22.56 ± 1.61 * |
| 中 GTN 组 | 47.92 ± 13.93 | 32.66 ± 4.47 ** |
| 低 GTN 组 | 83.99 ± 5.84 ** | 60.98 ± 3.96 ** |
| F | 84.66 | 168.51 |
| P | <0.01 | <0.01 |
| $MS_{组内}$ | 60.237 | 18.355 |

q 检验:与 I/R 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 灌流心脏流出液乳酸脱氢酶的变化 与 I/R 组相比,GTN 高浓度组在再灌注 5 min 时 LDH 释放增加($P < 0.01$);GTN 中浓度组无明显差异;低浓度组明显降低了冠状动脉流出液中 LDH 的含量($P < 0.01$)(见表 2)。

2.3 心肌梗死面积的变化 与 I/R 组相比,GTN

高浓度组明显增大了心肌梗死面积,差异有统计学意义($P < 0.01$);GTN 中浓度组心肌梗死面积改变不明显;GTN 低浓度组明显减小了心机的梗死面积($P < 0.01$)(见表 3)。

表 2 各组对离体心脏冠状动脉结扎 30 min、再灌注 120 min 冠状动脉流出液中 LDH 含量的影响($n_i = 6; \bar{x} \pm s; U/L$)

| 分组 | 再灌注 5 min | 再灌注 10 min |
|------------------|----------------|-----------------|
| L/R 组 | 63.06 ± 5.24 | 73.28 ± 7.27 |
| 高 GTN 组 | 73.67 ± 6.45 * | 79.02 ± 6.06 * |
| 中 GTN 组 | 67.83 ± 9.50 | 76.50 ± 10.69 |
| 低 GTN 组 | 54.06 ± 7.03 * | 38.00 ± 8.70 ** |
| F | 7.90 | 31.90 |
| P | < 0.01 | < 0.01 |
| MS _{组内} | 52.183 | 69.886 |

q 检验:与 L/R 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 各组对离体大鼠心脏心肌梗死面积的影响($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

| 分组 | 梗死面积(%) | F | P | MS _{组内} |
|---------|-----------------|--------|--------|------------------|
| L/R 组 | 41.42 ± 1.96 | | | |
| 高 GTN 组 | 55.46 ± 1.71 ** | 296.40 | < 0.01 | 3.455 |
| 中 GTN 组 | 39.32 ± 1.98 | | | |
| 低 GTN 组 | 23.55 ± 1.77 ** | | | |

q 检验:与 L/R 组比较 * $P < 0.01$

3 讨论

硝酸酯类药物具有显著的心肌保护作用,但如长期、大量使用,反而加重心肌损伤^[4]。NO 是硝酸酯类药物的主要效应因子,文献^[5-6]报道,适当浓度的内源性 NO 的增加或外源性 NO 的补充,可减轻缺血再灌注的不可逆损伤,但 NO 是一把“双刃剑”,过多或过少对机体都是不利因素。

本实验结果显示,与缺血/再灌注相比,高浓度 GTN(2×10^{-6} mol/L)加重了心肌的损伤作用,表现为抑制心室力学指标恢复,心肌梗死面积增大,LDH 释放增多;中浓度 GTN(1×10^{-7} mol/L)对心肌的心室力学指标、心肌梗死面积和 LDH 释放无明显差异;低浓度 GTN(1×10^{-8} mol/L)对心肌具有明显的保护作用,表现为促进心室力学指标恢复,心肌梗死面积减小及 LDH 释放减少。结果提示,不同浓度 GTN 对缺血/再灌注心肌发挥不同作用。

有学者^[7]研究表明,大剂量的 NO 供体可能加重心肌缺血再灌注损伤。心肌缺血再灌注损伤时产生大量氧自由基(reactive oxygen species, ROS),尤其是线粒体内 ROS 生成大量增加,造成超氧阴离子

(O_2^-)等氧自由基“爆发式”生成^[8]。过多的 NO 可与 O_2^- 反应,生成具有很强的细胞毒性的过氧亚硝酸阴离子($ONOO^-$)^[9-12],对细胞内众多的蛋白、巯基(-SH)、脂质进行修饰,影响其功能,引起细胞损伤。作为体内重要的保护因子巯基(-SH)可与 $ONOO^-$ 反应,降低其毒性作用^[13]。但硝酸酯类在生成 NO 的过程中-SH 作为底物被消耗掉,再灌注时 O_2^- 释放,进一步造成还原型-SH 的氧化,同时 $ONOO^-$ 可抑制谷胱甘肽还原酶等一些促进-SH 生成酶的活性^[14],从而间接增强了 $ONOO^-$ 的细胞毒性。已有研究^[15]表明, $ONOO^-$ 可能是硝酸酯类药物发挥损伤作用的主要介导因子。

本实验中不同浓度 GTN 对缺血/再灌注心肌发挥的作用是不同的。高浓度 GTN 灌注缺血/再灌注心脏时,与缺血/再灌注组相比加重了心肌的损伤,可能是高浓度的 GTN 生成了过量的 NO,消耗掉了心肌细胞中大量的-SH,同时大量的 NO 与 O_2^- 反应,生成了大量具有细胞毒性的 $ONOO^-$,超出了体内的-SH 清除 $ONOO^-$ 的能力,从而打破了心肌组织本身-SH 与新生成的 $ONOO^-$ 平衡状态, $ONOO^-$ 大量蓄积,加重了心肌细胞损伤,从而表现为心肌梗死面积增大及 LDH 释放增多等一系列心肌损伤。其损伤机制也可能是再灌注时磷酸二酯酶活性增加、或 cGMP 依赖的蛋白激酶活性降低等减弱了 NO 的生物利用度和有效性^[16]。中浓度 GTN 对缺血/再灌注心肌的总体作用不明显,可能是 NO 的保护作用和损伤作用达到动态平衡。低浓度 GTN 对心肌的保护作用可能是一定浓度的 NO 作用于心肌组织,清除了大量的氧自由基,减少了心肌细胞的过氧化程度;同时 NO 作用于心肌的冠状动脉血管,减少了血管平滑肌细胞胞质内 Ca^{2+} 超载,扩张冠状动脉,从而改善心肌的供血、供氧及降低心肌的耗氧量而发挥心肌保护作用^[1]。GTN 发挥心肌保护和损伤的作用与其在体内生成的 NO 量之间的关系目前仍尚不明确。

本实验结果推断低浓度 GTN(1×10^{-8} mol/L)对缺血/再灌注心肌可能起到保护作用;高浓度 GTN(2×10^{-6} mol/L)对缺血/再灌注心肌可能起到损伤作用。该结果有望为临床上应用硝酸酯类药物使其发挥最好的心肌保护作用提供理论依据。

[参 考 文 献]

[1] 戚文航. 硝酸酯治疗新进展[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30

- (3):187-189.
- [2] Nakamura Y, Moss AJ, Brown MW, *et al.* Long term nitrate use may be deleterious in ischemic heart disease; A study using the databases from two large-scale post infarction studies [J]. *Am Heart J*, 1999, 138(3 Pt 1):577-585.
- [3] 范谦, 王文勇, 高峰, 等. 大剂量硝酸甘油加重大鼠离体心脏缺血/复灌损伤[J]. *中国心脏杂志*, 2005, 17(3):204-206.
- [4] Dupuis J, Laionde G, Lemieux R, *et al.* Tolerance to intravenous nitroglycerin in patients with congestive heart failure; Role of increased intravascular volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N-acetylcysteine[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1990, 16(4):923-931.
- [5] Berges A, VanNassauw L, Bosmans J, *et al.* Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning[J]. *Acta Cardiol*, 2003, 58(2):119-132.
- [6] Davidson SM, Duchon MR. Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes; Pathophysiological relevance [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 71(1):10-12.
- [7] Kormaz A, Oter S, Sadir S, *et al.* Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats[J]. *J Urol*, 2005, 173(5):1793-1796.
- [8] Lesnfsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, *et al.* Mitochondrial dysfunction in cardiac disease ischemia reperfusion, aging, and heart failure[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(6):1065-1089.
- [9] Zweier JL, Fertmna J, Wei G. Nitric oxide and peorxynitrite in postischemic myocardium. Atioxid [J]. *Redox Signal*, 2001, 3(1):11-22.
- [10] Baud O, LI J, Zhnag Y, *et al.* Nitric oxide induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis inducing factor translocation [J]. *Eur J Neuro Sci*, 2004, 20(7):1713-1726.
- [11] Ma XL, Gao F, LoPez BL, *et al.* Peorxynitrite, a two-edged sword in Post-ischemic myocardial injury-dichotomy of action in crystalloid-versus blood-perfused hearts [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292(3):912-920.
- [12] Ma XL, Lopez BL, Liu GL, *et al.* Peroxynitrite aggravates myocardial reperfusion injury in the isolated perfused rat heart [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 36(2):195-204.
- [13] Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia/reperfusion injury and preconditioning [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 138(4):532-543.
- [14] 范谦, 张麟, 高峰, 等. 硝酸甘油耐受对心肌缺血/复灌损伤影响的研究[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2006, 14(6):353-356.
- [15] Mihm LJ, Coyle CM, Jin L, *et al.* Vascular peroxynitrite formation during organic nitrate tolerance [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 291(1):194-198.
- [16] Gerzanich V, Ivanov A, Ivanova S, *et al.* Alternative splicing of cGMP dependent protein kinase I in angiotensin-hypertension: novel mechanism for nitrate tolerance in vascular smooth muscle [J]. *Circ Res*, 2003, 93(9):805-812.

(本文编辑 章新生)

(上接第6页)

[参 考 文 献]

- [1] Papadimitraki ED, Bertias GK, Boumpas DT, *et al.* Toll like receptors and autoimmunity; a critical appraisal [J]. *J Autoimmun*, 2007, 29(4):310-318.
- [2] Baccala R, Hoeb K, Kono DH, *et al.* TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity [J]. *Nat Med*, 2007, 13(5):543-551.
- [3] Lenert PS. Targeting Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells and autoreactive B cells as a therapy for lupus [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(1):203.
- [4] Takeda K, Kaisho T, Akira S, *et al.* Toll-like receptors [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21:335-376.
- [5] Migita K, Miyashita T, Maeda Y, *et al.* Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Rheumatol*, 2007, 34(3):493-500.
- [6] 沈育娟, 沈凌汛. Toll 样受体 4 在系统性红斑狼疮患者外周血单核源性巨噬细胞上的表达以及在其产生白介素 6 上的作用 [J]. *中华实用中西医杂志*, 2006, 19(12):1453-1456.
- [7] Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoids and the innate immune system: crosstalk with the Toll-like receptor signaling network [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 275(1/2):30-42.
- [8] Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk [J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76:447-480.
- [9] Ogawa S, Lozach J, Benner C, *et al.* Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors [J]. *Cell*, 2005, 122(5):707-721.
- [10] Broad A, Kirby JA, Jones DE, *et al.* Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon-beta production [J]. *Immunology*, 2007, 120(1):103-111.

(本文编辑 刘畅)