



心肌缺血大鼠血浆8-异前列腺素 $F_{2\alpha}$ 水平及N-乙酰半胱氨酸干预作用

研究表明, 心肌缺血再灌注后氧自由基的大量产生是造成心肌损害的病理生理机制之一, 抗氧化剂能够清除氧自由基而起到保护缺血心肌的作用。近年来, 人们已建立了一些反映体内氧自由基的生化指标, 如超氧化物歧化酶(SOD)、脂质过氧化物(LPO)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和丙二醛(MDA)等, 但它们易受体内外因素的影响, 测定结果不稳定, 不能准确反映体内真实水平, 临床意义有限[1]。8-异前列腺素 $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$)是通过非环氧化酶催化的自由基分解机制, 损伤脂质细胞膜花生四烯酸后的产物, 具有收缩肺、肾、冠状动脉、脑血管和视网膜动脉, 以及促进血小板粘附和聚集等生物活性[1][2][3][4]。8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 性质稳定, 为一种敏感和特异性反映缺血再灌注后, 氧自由基增加所致的脂质过氧化作用的生化指标[5]。本研究应用大鼠急性心肌缺血模型, 分析血浆与心肌8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 水平相关性和抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)的治疗效果, 探讨测定血浆8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 反映心肌缺血严重性及NAC疗效的可能性。

1 材料和方法

1.1 抗氧化剂

NAC由意大利和海南金晓制药有限公司生产。颗粒剂(100 mg/包)使用时用蒸馏水配成5%的溶液, 用于动物灌胃。

1.2 实验动物和分组

雄性Wistar健康大鼠45只, 体质量160~180 g, 由广东省医学实验中心提供。随机分为缺血组、缺血+NAC组和对照组, 每组15只。分笼块料饲养, 随意饮水。

1.3 实验方法

缺血+NAC组以NAC(0.1 g/kg·d, 相当于0.5%NAC溶液20 ml//kg·d)灌胃, 缺血组和对照组则以等量生理盐水灌胃。2周后, 缺血组和缺血+NAC组腹腔注射垂体后叶素(上海生物化学制药有限公司)20 U/kg·b. w., 复制大鼠心肌缺血模型, 以十二导联心电图仪动态记录大鼠心电图。

1.4 样品的收集及处理

断头处死大鼠, 取出心脏。用磷酸缓冲液反复冲洗干净后, 留取心室组织约100 mg, -20 °C保存。测定8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 时, 将低温保存的心肌组织标本于4 °C冰箱中解冻, 加10倍体积的HEPES缓冲液, 匀浆后以12 000 r/min离心20 min, 上清保存于-4 °C待测。

1.5 8-iso-PGF $F_{2\alpha}$ 的测定

使用抗原竞争ELISA法检测血浆和心肌组织中8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 含量。所用试剂盒由美国Cayman Chemical Company提供, 主要试剂包括纯化的羊抗兔IgG抗体包被的微孔板、8-iso-PGF $_{2\alpha}$ 标准物、抗血清和胆碱酯酶标记的抗原等。定量检测在酶标仪(Anths HT3, 瑞士AUSLAB公司)上进行。批内和批间变异系数分别为6.8%和10.2%, 最低可测范围为10 pg/ml。

1.6 统计学处理

应用SPSS 10统计软件进行统计学处理, 行ANOVA分析, 两两比较用SNK法; 直线回归分析血浆与心肌组

2 结果

2.1 各组大鼠心电图ST段动态变化

缺血组缺血15、30、45和60 min时心电图ST段均抬高，分别为(0.12±0.02)、(0.17±0.04)、(0.34±0.05)和(0.17±0.04) mV，明显高于正常对照组(P<0.01)，并于缺血45 min时达到高峰；缺血+NAC组缺血15、30、45和60 min时心电图ST段有抬高，分别为(0.10±0.02)、(0.15±0.02)、(0.18±0.05)和(0.15±0.02) mV，其15、30 min时的ST段抬高幅度与缺血组相当(P>0.05)，而45、60 min时的ST段抬高幅度低于缺血组(P<0.01)。

2.2 各组大鼠血浆和心肌组织8-iso-PGF_{2α}含量

从表1可知，大鼠急性心肌缺血后血浆和心肌组织8-iso-PGF_{2α}水平明显高于对照组(t=8.587, P<0.01)；而在急性心肌缺血前，以NAC灌胃的大鼠血浆和心肌组织8-iso-PGF_{2α}含量较缺血组明显降低(t=8.312, P<0.01)，但仍高于正常对照组(t=4.355, P<0.01)。

表 1 各组大鼠血浆和心肌组织 8-iso-PGF_{2α} 含量 (n=15, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 8-iso-prostaglandin F_{2α} levels in the plasma and myocardium of rats in different groups (n=15, Mean±SD)

Goup	Plasma (ng/ml)	Myocardium (ng/g)
Control	60.4±13.7	88.6±16.9
NAC+ischemia	88.2±16.4*#	109.4±24.7**
Ischemia	187.1±45.8*	259.3±47.5*

*P<0.01 vs control, # P<0.01 vs ischemia. NAC: N-acetylcysteine

2.3 血浆和心肌组织8-iso-PGF_{2α}水平相关性

将三组大鼠血浆和心肌组织8-iso-PGF_{2α}测定值合并在一起，ANOVA分析显示：血浆(P)和心肌组织(C)8-iso-PGF_{2α}水平间存在着直线关系(F=54.95, P<0.01)，用直线方程表达为P=3.361+0.712C，标准偏回归系数是0.712，相关系数为0.856，具有显著意义(t=21.33, P<0.01)。

3 讨论

心肌缺血时心肌细胞可发生严重的缺血性损伤，紧接着出现的再灌注不但不能使损伤减轻，反而加速了心肌细胞的死亡，其原因在于氧自由基的大量产生所致的脂质过氧化作用[6][7][8]。正常情况下，氧自由基的产生和消除处于动态平衡状态，即体内产生的氧自由基可通过SOD、GSH-PX等酶的作用还原成分子氧和水；心肌缺血时，细胞内SOD减少，产生大量的氧自由基不能及时清除而堆积。氧自由基可攻击细胞膜中的花生四烯酸的不饱和双键，导致脂质过氧化作用，激起自由基的连锁反应，形成一系列脂质自由基及其降解产物MDA，使膜通透性增加，流动性降低，线粒体肿胀，溶酶体破坏和酶的释放等[3][9]。

8-iso-PGF₂是一种具有生物活性的拟前列腺物质，是细胞膜上花生四烯酸发生脂质过氧化作用后的产物。由于这一过程不需要酶催化，8-iso-PGF₂在体液内含量非常稳定，故被认为是判断活体内自由基氧化强度和临床上作为评价抗氧化剂疗效的最理想的生化指标[5][9]。国外的研究表明，神经系统疾病、呼吸系

统疾病、肝硬化及糖尿病患者的血、尿8-iso-PGF_{2α}水平升高且与疾病的严重程度呈正相关[1][3]。心血管系统疾病也可以影响8-iso-PGF_{2α}含量,如在实验性高胆固醇血症模型中,8-iso-PGF_{2α}水平升高,并产生收缩冠脉的作用[10];氧自由基损伤可导致动脉粥样硬化,其严重程度与8-iso-PGF_{2α}水平呈正相关[5][6];应用免疫组化方法,发现人类冠心病患者的冠脉内有大量的8-iso-PGF_{2α}积聚[10];心功能衰竭患者血、尿8-iso-PGF_{2α}水平升高程度与其严重程度呈正相关[3]。最近,有作者发现血浆8-iso-PGF_{2α}水平能够准确无误地评估心绞痛和心肌梗死患者的病情和预后[11]。

NAC作为一种化痰药广泛应用于临床,无明显不良反应。事实上,它还是一种有效的氧自由基清除剂,在维持细胞氧化还原平衡,以及保护细胞不受氧化损伤中具有重要作用。NAC清除氧自由基的原理是:(1)直接发挥抗氧化作用;(2)它是一种小分子物质,易进入细胞,脱去乙酰基后,作为谷胱甘肽的前体,促进细胞内GSH的合成。而GSH是体内游离巯基的主要来源,后者可中和自由基外层上的不配对电子,灭活和清除破坏力极强的羟自由基、脂质过氧化物自由基和过氧化氢;(3)增加SOD、GSH-PX等酶的合成[12][13]<HZ[14]>。迄今为止,尚未见应用NAC治疗心肌缺血报道。本研究中,我们在建立大鼠心肌缺血模型之前,预防性给予大鼠NAC 0.1 mg/kg·d,共3周,发现可明显降低急性心肌缺血所致的8-iso-PGF_{2α}升高和ST段抬高,提示NAC具有消除氧自由基、改善心肌缺血的作用。

此外,本研究还发现:急性心肌缺血时,血浆和心肌组织8-iso-PGF_{2α}明显升高,在ECG上表现为ST段抬高;并且血浆与心肌8-iso-PGF_{2α}水平间存在正相关。这些提示血浆8-iso-PGF_{2α}测定可以用来评估心肌缺血程度和治疗效果。

参考文献:

[1] de-Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, et al. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26(1-2): 202-26.

[2] Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometry of prostanoids: F2-iso- prostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism[J]. Method Enzym, 1994, 233(1): 163-75.

[3] Pratico D, Lawson JA, Rokach J, et al. The isoprostanes in biology and medicine [J]. Trends Endocrinol Metabol, 2001, 12(6): 243-7.

[4] Brault S. Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-iso- prostaglandin F_{2α}: possible role in ischemic brain injury[J]. Stroke, 2003, 34(3): 776-82.

[5] Pratico D. F2-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo[J]. Atherosclerosis, 1999, 147(1): 1-10.

[6] Gerald GA. Isoprostanes: Indices of oxidant stress in atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2000, 151(1): 234.

[7] Basu S, Nozari A, Liu XL, et al. Development of a novel biomarker of free radical damage in reperfusion injury after cardiac arrest[J]. FEBS Lett, 2000, 470(1): 1-6.

[8] Mohammad RM, Cen E, Franz T, et al. The isoprostane, 8-epi-PGF_{2α}, is accumulated in coronary arteries isolated from patients with coronary heart disease[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(2): 492-9.

[9] Basu S. Metabolism of 8-iso-prostaglandin F_{2α} [J]. FEBS Lett, 1998, 428(1-2): 32-6.

[10] Wilson SH, Best PJ, Lerman LO, et al. Enhanced coronary vasocon- striction to oxidative stress product, 8-iso-prostaglandin F_{2α} in experi- mental hypercholesterolemia [J]. Cardiovasc Res, 1999, 44(3): 601-7.

[11] 严群超, 肖昕, 熊爱华, 等. 8-异前列腺素 F_{2α}在冠心病病情和预后评估中的价值[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(7): 402-5.

Yan QC, Xiao X, Xiong AH, et al. The value of 8-iso-prostaglandin F_{2α} in evaluating the

condition and prognosis of patients with coronary heart disease[J]. Chin J Cardiol, 2002, 30(7): 402-5.

[12] Schman J. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later. What do we know and what would we like to know[J]? J Am Coll Cardiol, 2002, 39(9): 1422-8.

[13] Ozaras R. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 791-4. Sci, 2003, 60(1): 6-20.

参考文献:

[1] de-Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, et al. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 26(1-2): 202-26.

[2] Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometry of prostanoids: F₂-iso- prostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism[J]. Method Enzym, 1994, 233(1): 163-75.

[3] Pratico D, Lawson JA, Rokach J, et al. The isoprostanes in biology and medicine [J]. Trends Endocrinol Metabol, 2001, 12(6): 243-7.

[4] Brault S. Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-iso- prostaglandin F_{2α}: possible role in ischemic brain injury[J]. Stroke, 2003, 34(3): 776-82.

[5] Pratico D. F₂-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo[J]. Atherosclerosis, 1999, 147(1): 1-10.

[6] Gerald GA. Isoprostanes: Indices of oxidant stress in atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2000, 151(1): 234.

[7] Basu S, Nozari A, Liu XL, et al. Development of a novel biomarker of free radical damage in reperfusion injury after cardiac arrest[J]. FEBS Lett, 2000, 470(1): 1-6.

[8] Mohammad RM, Cen E, Franz T, et al. The isoprostane, 8-epi-PGF_{2α}, is accumulated in coronary arteries isolated from patients with coronary heart disease[J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(2): 492-9.

[9] Basu S. Metabolism of 8-iso-prostaglandin F_{2α}[J]. FEBS Lett, 1998, 428(1-2): 32-6.

[10] Wilson SH, Best PJ, Lerman LO, et al. Enhanced coronary vasocon- striction to oxidative stress product, 8-iso-prostaglandin F_{2α} in experi- mental hypercholesterolemia [J]. Cardiovasc Res, 1999, 44(3): 601-7.

[11] 严群超, 肖昕, 熊爱华, 等. 8-异前列腺素 F_{2α} 在冠心病病情和预后评估中的价值[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(7): 402-5.

Yan QC, Xiao X, Xiong AH, et al. The value of 8-iso-prostaglandin F_{2α} in evaluating the condition and prognosis of patients with coronary heart disease[J]. Chin J Cardiol, 2002, 30(7): 402-5.

[12] Schman J. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later. What do we know and what would we like to know[J]? J Am Coll Cardiol, 2002, 39(9): 1422-8.

[13] Ozaras R. N-acetylcysteine attenuates alcohol-induced oxidative stress in rats [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(4): 791-4. Sci, 2003, 60(1): 6-20.