

前胡丙素与硝苯啶对大鼠工作心脏 缺血再灌注损伤的保护作用*

杨解人** 李庆平 饶曼人

(南京医学院心血管药理研究室,南京 210029)

提要 大鼠 ip 前胡丙素(Pra-C 15 mg/kg, bid×3d)和硝苯啶(Nif 60 μg/kg, bid×3d),使离体缺血再灌注工作心脏的收缩(AP, LVSP, +dP/dt_{max})舒张(-dP/dt_{max} LVEDP 和 T 值)性能在 35 min 时得到改善,尤以舒张性能改善明显,并能促进 CO, CF, SV 及 HR 恢复,改善心脏工作效率,减少 CK 释放和心肌线粒体钙含量,表明 Pra-C 和 Nif 对心肌缺血都有保护作用, Pra-C 的效应与 Nif 相近。

关键词 前胡丙素;硝苯啶;离体心脏;血流动力学;线粒体

前胡丙素(praeruptorin C, Pra-C)是从伞形科白花前胡中提取的有效成分,化学名为 10-乙酰氧基-9,10-二羟基-8,8-二甲基-2-氧代 2H,8H-苯并(1,2-b;3,4-b')二吡喃-9-醇-2-甲基-2-丁烯酸酯⁽¹⁾。它明显抑制 KCl, CaCl₂ 引起的兔主动脉条收缩;对离体血管和心肌收缩力的抑制作用均与拮抗细胞外钙内流有关⁽²⁾。另外能抑制离体豚鼠心房的自律性及 CaCl₂ 的正性频率作用,改善肥厚性心肌病患者的心肌顺应性⁽³⁾。但该药对心脏抗缺血的保护作用尚未见报道。本研究采用预先给药 3 d,观察 Pra-C 对离体大鼠工作心脏缺血再灌注损伤的保护作用,并与 Nif 进行比较。

材 料 和 方 法

Pra-C 及 Nif 用 100%聚乙二醇 400 略加温溶解后配制成所需浓度,于 4℃避光保存,使用期限不超过 1 周。

取 Sprague-Dawley 大鼠 27 只,体重 260±15 g,雌雄兼有,随机分为 5 组, Pra-C 组(15 mg/kg), Nif 组(60 μg/kg),溶剂组(50%聚乙二醇 400 10 ml/kg),均为 bid×3 d, ip。此外设正常组和缺血组,给等量生理盐水。给药 3 d 后,击昏大鼠开胸取出心脏,制备离体工作心脏⁽⁴⁾,左房充盈压 0.147 kPa,主动脉静水压 9.3 kPa,灌注液为改良的 Krebs-Henseleit(KH)液(mmol/L: CaCl₂ 2.5, KCl 4.7, NaCl 118, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Na₂EDTA 0.5, 葡萄糖 11.5)⁽⁵⁾,持续通入 95%O₂+5%CO₂ 混合气体, pH 7.45±0.05, 温度 36±0.5℃。将聚乙烯管由主动脉插管的侧管插入主动脉或从心尖部插入左心室,另端通过压力换能器连于 SJ-42 型四道生理记录仪(上海医用电子仪器厂)上同步记录主动脉压(AP),左室内压(LVSP),室内压变化最大速率(±dP/dt_{max}),将 LVSP 信号放大增益,记录左室舒张末期压(LVEDP),推算等容舒张期心室内

本文于 1992 年 2 月 9 日收到。

* 自然科学基金资助课题

** 现址:皖南医学院药理教研室,芜湖 241001

压下降的时间常数(T)值,定时收集 1 min 主动脉流出液(AF)和冠脉流出液(CF),将两者相加得到心输出量(CO),计算每搏输出量(SV)。工作心脏顺灌 15 min 后,记录各指标为缺血前对照值。夹闭左房流入道和主动脉流出道,用 ROB-IV 型蠕动泵(沙州仪表仪器总厂)控制冠脉流量,经主动脉对各组进行逆灌,以正常组为非缺血对照组,即灌注程序对照,以排除心脏自然衰竭对实验的影响,其 CF 为顺灌时的 $61.1 \pm 20\%$ (该流量已能满足逆灌心脏需要,增加流量易加速心衰),逆灌 50 min,其它 4 组均为缺血组,球型缺血 50 min(CF 为缺血前对照值的 $4.2 \pm 0.3\%$)。然后开始再灌注,先以 9.3 kPa 的灌注压对所有 5 组逆灌 15 min,再转工作心脏,顺灌 20 min,测定复灌后 35 min 时的各项指标。实验完毕,取心,剪去大血管、心房和结缔组织,吸干水分,称心脏湿重。

肌酸激酶(CK)测定 留取缺血前、缺血后再灌注 1,5,10,15,20,25,30,35 min 冠脉流出液标本,置冰液中保存,于 6 h 内用肌酸显色法⁽⁶⁾测定 CK 含量,并计算($\text{IU} \cdot \text{min}^{-1}/\text{g wet wt}$)。

心肌线粒体制备及钙离子含量测定 依照文献^(7,8)改良而成,用冷分离液(蔗糖 250 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.4)冲洗心脏,剪碎,按 20 ml/g 湿重加入分离液,匀浆 4.5, 10 s,共 4 次,每次间隔 10 s,再用玻璃匀浆器研磨,将匀浆 $225 \times \text{g}$ 离心 10 min,取上清液,双层沙布过滤后, $12000 \times \text{g}$ 离心 10 min,取沉淀液,加入 5 ml 冷分离液,洗涤后 $3700 \times \text{g}$ 离心 5 min 重复 2 次,最终沉淀为心肌线粒体,整个过程在 0°C 进行。用比色法测定线粒体蛋白含量⁽⁹⁾。线粒体沉淀中加入 1 mol/L 硝酸适量, 25°C 振荡 24 h, $1200 \times \text{g}$ 离心 10 min,取上清液,适当稀释后,在 AA-1475 型原子吸收分光光度计上于 442.7 nm 处测定线粒体钙,用光谱纯碳酸钙作标准。测定 Ca^{2+} 含量所用玻璃器皿均用稀硝酸浸泡一月,用 1% Na_2EDTA 溶液冲洗,最后用去离子水冲洗,所用试剂均用去离子水配制。

全部数据输入 IBM 微电脑,结果用方差分析处理。

结果

对缺血再灌注工作心脏的影响

1 对心肌收缩及舒张性能的影响(表 1) 以 AP, LVSP 和 $\times dP/dt_{\max}$ 作为反映心肌收缩性能的指标,以 $-dP/dt_{\max}$, LVEDP 和 T 值作为反应心肌舒张性能的指标。正常组经过同样时程正常流量灌注后,舒缩功能无明显改变($P > 0.05$)。球型缺血 50 min,各组的 AP, LVSP 和 $\pm dP/dt_{\max}$ 均在 5 min 内降至接近零,再灌注后,缺血组舒缩功能明显下降,复灌 35 min 后的 AP, LVSP, $+dP/dt_{\max}$ 和 $-dP/dt_{\max}$ 仅恢复了 $22 \pm 4\%$, $31 \pm 4\%$, $25 \pm 11\%$ 和 $22 \pm 11\%$, T 值和 LVEDP 分别提高了 $305 \pm 84\%$ 和 $111 \pm 64\%$ 。溶剂组结果类似缺血组,无显著差异($P > 0.05$)。提示缺血对心肌舒缩性能损伤甚为严重。溶剂组无干扰。

Pra-C 组经过同样时程的缺血再灌注损伤,心肌舒缩性能均得到良好恢复,复灌 35 min 后的 AP, LVSP, $+dP/dt_{\max}$ 和 $-dP/dt_{\max}$ 较缺血前分别恢复了 $80 \pm 19\%$, $82 \pm 16\%$, $78 \pm 21\%$ 和 $85 \pm 11\%$, T 值和 LVEDP 分别提高了 $33 \pm 21\%$ 和 $36 \pm 77\%$,其结果与 Nif 相似,但略逊于 Nif,与缺血组及溶剂组比较差异显著($P < 0.01$)并接近正常组。

2 对心脏血流动力学的影响(表 1) 缺血组在复灌 35 min 后对 CO, CF 和 SV 分别较缺血前恢复了 $20.9 \pm 3.8\%$, $35 \pm 18\%$ 和 $42 \pm 8\%$,提示缺血再损伤能明显降低 CO, CF 和 SV。Pra-C 使 CO, CF 和 SV 较缺血前分别恢复了 $80 \pm 12\%$, $81 \pm 11\%$ 和 $104 \pm 20\%$ 。提示 Pra-C 能防止缺血再损伤所致 CO 减少。扩张冠脉,改善冠脉循环。其结果 Pra-C 与 Nif 相似($P > 0.05$),

但明显优于缺血组,溶剂组($P<0.01$),接近正常组。

Tab 1 Effects of Pra C (15 mg/kg, bid \times 3d) and Nif (60 μ g/kg, bid \times 3d) on contractility and relaxation of postischemic reperfused myocardium in isolated working rat hearts ($\bar{x}\pm SD$)

		Control (n=5)	Ischemia (n=6)	Pra-C (n=6)	Nif (n=5)	Solvent (n=5)
AP(kPa)	B	8.5 \pm 2.0	8.6 \pm 1.3	8.4 \pm 2.4	8.3 \pm 1.4	7.9 \pm 0.6
	A	8.2 \pm 2.5 ^{###}	1.7 \pm 0.5 ^{**}	6.7 \pm 2.8 ^{###}	8.8 \pm 2.9 ^{###}	1.7 \pm 0.2 ^{**}
LVSP(kPa)	B	10.1 \pm 3.0	10.1 \pm 0.9	9.4 \pm 1.9	9.7 \pm 1.1	9.6 \pm 2.1
	A	10.4 \pm 2.6 ^{###}	3.2 \pm 0.8 ^{**}	7.6 \pm 2.4 ^{###}	8.6 \pm 2.3 ^{###}	3.5 \pm 0.5 ^{**}
LVEDP(kPa)	B	0.48 \pm 0.24	0.47 \pm 0.11	0.57 \pm 0.24	0.40 \pm 0.07	0.58 \pm 0.07
	A	0.57 \pm 0.23 ^{###}	1.72 \pm 0.25 ^{**}	0.66 \pm 0.24 ^{###}	0.56 \pm 0.15 ^{###}	1.01 \pm 0.20 [*]
+dP/dt _{max} (kPa·S ⁻¹)	B	431 \pm 61	428 \pm 58 ^{**}	421 \pm 52	365 \pm 51	399 \pm 57
	A	456 \pm 44 ^{###}	102 \pm 31 ^{**}	329 \pm 99 ^{###}	330 \pm 76 ^{###}	155 \pm 70 ^{**}
-dP/dt _{max} (kPa·S ⁻¹)	B	358 \pm 78	331 \pm 21	311 \pm 20	300 \pm 68	300 \pm 39
	A	290 \pm 96 ^{###}	74 \pm 37 ^{**}	266 \pm 41 ^{###}	315 \pm 78 ^{###}	80 \pm 42 ^{**}
T(ms)	B	9.7 \pm 1.4	10.2 \pm 2.3	9.8 \pm 0.7	9.6 \pm 2.9	10.4 \pm 3.0
	A	14.8 \pm 5.0 ^{###}	41.0 \pm 8.0 ^{**}	12.9 \pm 1.6 ^{###}	13.1 \pm 1.9 ^{###}	36.3 \pm 5.8 ^{**}
HR(bpm)	B	276 \pm 40	272 \pm 18	274 \pm 44	280 \pm 25	272 \pm 19
	A	249 \pm 53 ^{###}	133 \pm 11 ^{**}	210 \pm 19 ^{###}	226 \pm 50 ^{###}	131 \pm 33 ^{**}
AF(ml·min ⁻¹)	B	28 \pm 4	27 \pm 4	29 \pm 3	29 \pm 7	27 \pm 4
	A	25 \pm 6 ^{###}	4.2 \pm 1.5 ^{**}	23 \pm 4 ^{###}	22 \pm 4 ^{###}	5.2 \pm 1.6 ^{**}
CF(ml·min ⁻¹)	B	9.3 \pm 1.6	8.8 \pm 1.4	8.0 \pm 1.1	8.2 \pm 0.8	8.6 \pm 0.5
	A	8.3 \pm 1.1 ^{###}	3.4 \pm 1.3 ^{**}	6.4 \pm 0.8 ^{###}	6.6 \pm 0.6 ^{###}	3.2 \pm 1.2 ^{**}
CO(ml·min ⁻¹)	B	37 \pm 4	36 \pm 5	37 \pm 3	37 \pm 6	36 \pm 5
	A	33 \pm 5 ^{###}	7.5 \pm 1.8 ^{**}	29 \pm 4 ^{###}	29 \pm 4 ^{###}	8.6 \pm 2.3 ^{**}
SV(ml)	B	0.134 \pm 0.007	0.133 \pm 0.019	0.138 \pm 0.029	0.133 \pm 0.029	0.130 \pm 0.020
	A	0.140 \pm 0.030 ^{###}	0.056 \pm 0.014 ^{**}	0.141 \pm 0.022 ^{###}	0.130 \pm 0.040 ^{###}	0.067 \pm 0.014 ^{**}

AP=Aortic pressure. LVSP=Left ventricular systolic pressure. T=Time constant of isovolumic diastolic pressure decay; HR=Heart rate; AF=Aortic flow; CF=Coronary flow; CO=Cardiac output; SV=Stroke volume; B=Before ischemia; A=35 min after reperfusion. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs B. # $P<0.05$, ### $P<0.01$ vs ischemia.

3 对心率的影响(表1) 缺血组 HR 随着再损伤时间延长而逐渐减弱,在 35 min 时,较缺血前恢复了 49 \pm 5.1%。结果与溶剂组类似($P>0.05$)。Pra-C 能明显保护 HR,使 HR 较缺血前恢复了 78 \pm 7.1%,Nif 恢复了 80 \pm 14%,二组结果类似,无显著差异($P>0.05$)。与缺血组,溶剂组比较差异显著($P<0.01$)。

对心肌 CK 释放的影响

由图 1 可见,缺血前冠脉流出液中可测得少量 CK,其值均小于 4 IU·min⁻¹/g wet wt,缺血期,由于冠脉流出液极少,测得的 CK 释放量低于缺血前,各组间无明显差异(预实验结果)。再灌注期,心肌释放 CK 明显增加,在 35 min 时,溶剂组和缺血组 CK 释放量高达 15.3 \pm 7.4 和 9.6 \pm 5.1 IU·min⁻¹/g wet wt。Pra-C 和 Nif 均使 CK 释放量较缺血组减少 30%和 40%(6.7 \pm 1.02 和 5.7 \pm 2.1 IU·min⁻¹/g wet wt),与缺血组,溶剂组比较差异显著($P<0.01$)。

对心肌线粒体钙含量的影响

由图 2 可见,缺血组和溶剂组心肌线粒体钙含量较正常组分别增加了 152%和 156% ($P<0.01$),而 Pra-C 和 Nif 能显著对抗缺血再损伤所致的心肌线粒体钙过负荷,钙含量分别

较缺血组低 41% 和 46% ($P < 0.01$), 接近正常组, 表明 Pra-C 具有钙拮抗作用。

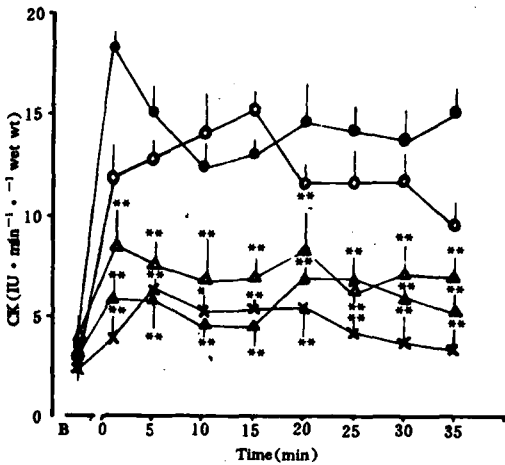


Fig 1 Effects of praeuroptin C (Pra-C) and nifedipine (Nif) on creatine kinase (CK) release in ischemia and reperfusion. B; Before ischemia; X-X Control (n=5); O-O Ischemia (n=6); Δ-Δ Pra-C (n=6); ▲-▲ Nif (n=5); ●-● Solvent (n=5); $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ischemia

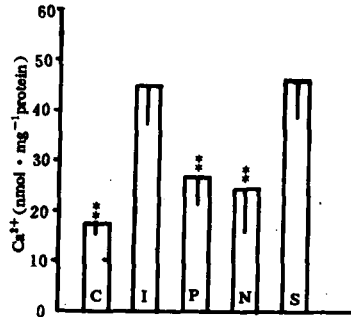


Fig 2 Effect of Pra-C and Nif on Ca^{2+} content of the myocardial mitochondria in isolated working rat heart subjected to ischemia and reperfusion. C=Control (n=5); I=Ischemia (n=6); P=Pra-C (n=6); N=Nif (n=5); S=Solvent (n=5); $\bar{x} \pm SD$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs I.

讨论

缺血再灌注损伤可导致细胞内钙超负荷, 当胞浆内游离钙过多, 可激活依赖钙的 ATP 酶, 使 ATP 过度消耗, 同时大量钙进入线粒体, 损害线粒体的功能和结构, 使 ATP 合成不足, 最终造成心肌细胞内高能磷酸盐耗竭, 胞内钙超负荷和能量缺乏导致主动转运障碍, 胞内离子失稳态、细胞损伤或坏死、线粒体肿胀、心肌酶漏出、出现收缩带、舒张不全、冠脉流量减少和顺应性降低^(10,11)。文献报道钙拮抗剂可抑制心肌能源物质耗竭, 同时又能防止心肌细胞坏死⁽¹²⁾, 保存心功能⁽¹³⁾。本研究也发现, Pra-C 与钙拮抗剂 Nif 类似, 能显著抑制心肌线粒体钙聚集, 对抗心肌缺血所致心肌线粒体钙超负荷; 保护心肌细胞膜, 减少心肌细胞内肌酸激酶释放; 故而使心肌收缩及舒张性能得到明显改善, 尤其心肌舒张功能更为明显; 心肌舒缩性能改善, 即改善了冠脉循环, 提高工作效率, 故缺血再灌注后冠脉流量、主动脉流量、心输出量和心率的恢复均明显优于缺血组, 接近于正常组。实验证明 Pra-C 对大鼠工作心脏缺血再灌注损伤具有明显保护作用, 其疗效(等效量)与 Nif 近似。

参考文献

- 1 陈政雄, 等. 中药白花前胡化学成分的研究: 四种新香豆素的结构. 药学报 1979; 14: 486.
- 2 吴欣, 饶曼人. 前胡丙素对豚鼠心房和主动脉条的钙拮抗作用. 中国药理学与毒理学杂志 1990; 4: 104.
- 3 吴欣, 饶曼人. 前胡丙素对离体豚鼠心房及人体心肌顺应性的影响. 中国药理学报 1990; 11: 235.
- 4 郭兆贵, 等. 氟碳溶液灌注对离体豚鼠工作心脏的作用. 中国药理学报 1986; 7: 243.

- 5 Neely JR and Rovetto MJ. Techniques for perfusion of isolated rat hearts. In: Colowick SP and Kaplan No, eds. *Methods in Enzymology*. vol 39. New York; Academic Press, 1975: 43.
- 6 Duma RJ and Siegel AL. Serum creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1965;115: 443.
- 7 Jenning RB, et al. Electrolytes of damaged myocardial mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 135: 515.
- 8 Peng GF, et al. Abnormal mitochondrial oxidative phosphorylation of ischemic myocardium reversed by Ca^{2+} chelating agents. *J Mol Cell Cardiol* 1977;9: 897.
- 9 Mecknight GS. A colorimetric method for the determination of submicrogram quantities of protein. *Anal Biochem* 1977;78: 86.
- 10 Shen AC and Jennigns RB. Kinetics of calcium accumulation in acute ischemia myocardial injury. *Am J pathol* 1979;87: 417.
- 11 Fleckenstein A. *Experimental Facts And Therapeutic Prospects*. 1 st ed. New York, Chichester. Brisbane, Toronto, Singapore; J Wiley and Sons, 1983: 5.
- 12 Fleckenstein A. *Calcium In The Heart*. 1 st ed. New York; Academic press, 1971;135.
- 13 Yeager JC and Whitehurst ME. Verapamil prevents isoproterenol induced cardiac failure in the rat. *Life Sci* 1982;30: 299.

PROTECTIVE EFFECTS OF PRAERUPTORIN C AND NIFEDIPINE ON ISCHEMIA-REPERFUSED INJURY IN WORKING RAT HEARTS

JR Yang, QP Li and MR Rao

(Department of Cardiovascular Pharmacology, Nanjing Medical College, Nanjing 210029)

ABSTRACT The effects of praeruptorin C (Pra-C, 15 mg/kg, bid \times 3 d, ip) on global myocardial ischemia and reperfusion were investigated in the isolated working rat hearts. The results at 35 min after reperfusion showed that as compared with the values before ischemia, AP, LVSP, $+dP/dt_{max}$, $-dP/dt_{max}$, LVEDP and T were recovered up to $80 \pm 19\%$, $82 \pm 16\%$, $78 \pm 21\%$, $85 \pm 11\%$, $136 \pm 77\%$ and $133 \pm 21\%$, respectively. The corresponding parameters of Nifedipine (Nif, 60 μ g/kg, bid \times 3 d, ip) were $80 \pm 16\%$, $97 \pm 30\%$, $102 \pm 24\%$, $106 \pm 32\%$, $129 \pm 41\%$ and $145 \pm 46\%$, respectively. The CF, SV and HR were recovered by $81 \pm 11\%$, $104 \pm 20\%$ and $78 \pm 7\%$ when using Pra-C and $86 \pm 11\%$, $106 \pm 25\%$ and $82 \pm 11\%$, respectively, when using Nif. Additionally, in comparison of Pra-C and Nif with the ischemia group, the levels of creatine kinase released from cardiac cells decreased by 30% and 40%; while calcium accumulation in myocardial mitochondria were 41% and 46%, respectively. The study suggests that the protective effects of Pra-C on myocardial cells in the isolated working rat heart during myocardial ischemia are similar to those Nif.

Key words Praeruptorin C; Nifedipine; Isolated working heart; Hemodynamics; Mitochondria