

· 基础研究 ·

阿魏酸钠对大鼠心肌缺血再灌注后无复流的影响

韩 蕾¹, 鲍百丽^{2△}(1. 辽宁医学院研究生院, 辽宁锦州 121001; 2 辽宁医学院临床学院/
锦州市中心医院内科, 辽宁锦州 121001)

摘要:目的 探讨阿魏酸钠(SF)对大鼠心肌缺血再灌注后无复流现象的影响及可能机制。方法 健康雄性 SD 大鼠 56 只, 随机分为假手术组、缺血再灌注组(I/R 组)、SF 组、SF 联合 N-左旋硝基精氨酸(L-NNA)组(SF-L-NNA 组)。实验结束后测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)及心肌一氧化氮(NO)水平, 酶联免疫吸附测定(ELISA)血清白细胞介素-6(IL-6), 免疫组织化学法检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的水平, 比色法测 iNOS 及 eNOS 的活性, 心肌染色法区分缺血区、梗死区及无复流区。结果 与 I/R 组比较, SF 组血清 CK-MB、IL-6 水平显著降低, iNOS 的水平及活性显著减少, eNOS 的水平及活性显著增加, NO 水平明显增加, 梗死范围及无复流范围显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而 SF-L-NNA 组能部分阻断 SF 这一保护作用。结论 SF 通过调控 iNOS/eNOS-NO 途径, 改善内皮功能, 抑制炎症反应, 防治大鼠心肌缺血再灌注后的无复流现象。

关键词:阿魏酸钠; 心肌缺血; 再灌注; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 无复流

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)14-1607-04

Effects of sodium ferulate on no-reflow in rats of acute myocardial infarction and reperfusion

Han Lei¹, Bao Baili^{2△}

(1. Postgraduate College, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China;

2. Department of Cardiology, Jinzhou Municipal Central Hospital, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of sodium ferulate(SF) on the no-reflow phenomenon in the rats model of myocardial ischemia and reperfusion and its possible mechanism. **Methods** 56 healthy male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: the sham-operated group, the control group, the SF group and the SF plus L-NNA group. Myocardial endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS(iNOS) were detected by immunohistochemical(IHC) method and its activity detected by colorimetric method. After reperfusion, serum nitric oxide(NO) levels of myocardial tissue and the contents of CK-MB were measured. The IL-6 was measured by the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). The ischemic area, infarction area and the no-flow area were differentiated by the myocardial staining. **Results** Compared with the I/R group, serum CK-MB and IL-6 in the SF group were significantly reduced, the iNOS level and activity were obviously decreased, while the eNOS level and activity were significantly increased, the NO level also was significantly increased, and the infarction area and the no-flow area were significantly decreased, differences showing statistical significance($P < 0.05$). The SF-L-NNA group could partially block the SF protective role. **Conclusion** SF may regulate iNOS/eNOS-NO route to improve the endothelial function, inhibit the inflammatory reaction and prevent the no-flow phenomenon after myocardial ischemia and reperfusion in rats.

Key words: sodium ferulate; myocardial ischemia; reperfusion; nitric oxide synthase; nitric oxide; no-reflow

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)梗死相关动脉再通后, 心肌组织灌注可能未完全恢复, 即无复流现象。目前有研究显示, AMI 再灌注后无复流现象的发生率高达 37%^[1]。因此, 无复流现象是目前临床上研究的热点问题。阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是传统活血化瘀中药当归、川芎等的主要有效成分阿魏酸的钠盐, 具有很高的药理学价值, 已有研究表明心肌缺血再灌注损伤后 SF 可以通过调控诱导型一氧化氮合酶(iNOS)-内皮型一氧化氮合酶(eNOS)-一氧化氮(NO)系统保护心肌血管内皮功能^[2], 而减轻炎症反应, 但该系统是否在无复流中起作用尚待研究。因此, 本研究通过建立大鼠心肌缺血再灌注模型, 探讨无复流的发生机制及 SF 防治无复流的可能机制, 为临床应用提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物: 56 只雄性 SD 大鼠, 体质量(250±50)g, 由辽宁医学院动物实验中心提供。药物: SF 由哈尔滨三联

药业有限公司提供; N-左旋硝基精氨酸(L-NNA)由沈阳碧云天生物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 随机将 56 只 SD 大鼠分为 4 组: (1)假手术组($n=8$), 左前降支冠状动脉(left anterior descending artery, LAD)穿线不结扎 180 min; (2)缺血再灌注组(I/R 组, $n=16$), 结扎 LAD 60 min 再灌注 120 min; (3)SF 组($n=16$), 结扎 LAD 60 min, 再灌注前 30 min 后, 以 SF 20 mg/kg 持续尾静脉给药; (4)SF 联合 L-NNA 组(SF-L-NNA 组, $n=16$), 再灌注前 15 min 给予 L-NNA 15 mg/kg 与生理盐水配成 1 mL 药液尾静脉注入, SF 处理同上组, 后两组缺血再灌注方法同 I/R 组。假手术组给予等量的生理盐水尾静脉注射。

1.2.2 动物模型的制作 大鼠用 20% 乌拉坦 5 mL/kg 行腹腔麻醉, II 导联记录心电图, 气管插管, 接人工呼吸机(频率 55 次/分, 潮气量 1.5 mL/100 g), 开胸, 于 LAD 起始 0.2 cm 处穿

线,待呼吸、血压平稳 15 min 后,在血管与结扎线之间垫一充水(0.5 mL)球囊,球囊与三通管连接,用针筒经三通管向球囊注水,结扎造成心肌缺血。LAD 缺血 60 min 再灌注 120 min (假手术组仅穿线不结扎)。冠状动脉结扎成功标准:结扎线远端心肌发绀,心电图示 ST 段进行性抬高。再灌注后无复流成功的标准:缺血心肌发绀减轻,再灌注 30 min 后抬高的 ST 段下降小于 30%;硫黄素 S 心肌染色时可见缺血区。

1.2.3 血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、白细胞介素-6(IL-6)测定 再灌注结束后,颈动脉插管处采血 1.0 mL 进行离心,取血清于-80℃条件下保存备检测血清心肌酶 CK-MB、IL-6。

1.2.4 缺血范围、梗死范围、无复流范围^[1]评估 实验结束时每组(假手术组除外)随机选取 8 只大鼠,自尾静脉注射硫黄素 S(1 mL/kg),1 min 后原位结扎 LAD,自尾静脉注射 2%伊文思蓝(1 mL/kg),1 min 后立即处死大鼠取出心脏,剪除左右心耳及右心室,于冰生理盐水中荡洗去除残余血液,-80℃下冷冻 10 min,平行房室沟将心室切成均匀 5 片。心肌切片于 pH7.4 的 1%的氯化三苯基四氮唑磷酸(TTC)溶液 37℃孵箱中孵化 30 min,然后 10%甲醛固定 24 h 强化颜色对比。经上述处理,于 365 nm 波长光源下无荧光区域为无复流区(area of no-reflow, ANR),有荧光区域为复流区;普通光照条件下,非蓝染区域为缺血区(area at risk, AAR),蓝染区域为非缺血区,其中灰白色区域为梗死区心肌(necrosis area, NA),浅红色区域为缺血未梗死区,拍照并用 Image pro6.0 软件计算出上述图像中的各面积,然后测定上述图像中的 AAR 占左心室质量的百分比(AAR/LV%)、NA/AAR%及 ANR/AAR%。

1.2.5 免疫组织化学法检测心脏血管 iNOS、eNOS 取左心室前壁 AAR 心肌组织,常规制作石蜡切片,按 NOS 试剂盒说明书进行免疫组织化学检测。采用普通光学显微镜下观察心脏血管(×400),每张切片随机选取 10 个视野并拍照,采用

Image pro6.0 软件进行半定量分析。测定阳性染色积分光密度(integral optical density, IOD)值,分别取其平均值作为该组心肌组织阳性染色平均光密度值(MD)^[3]。

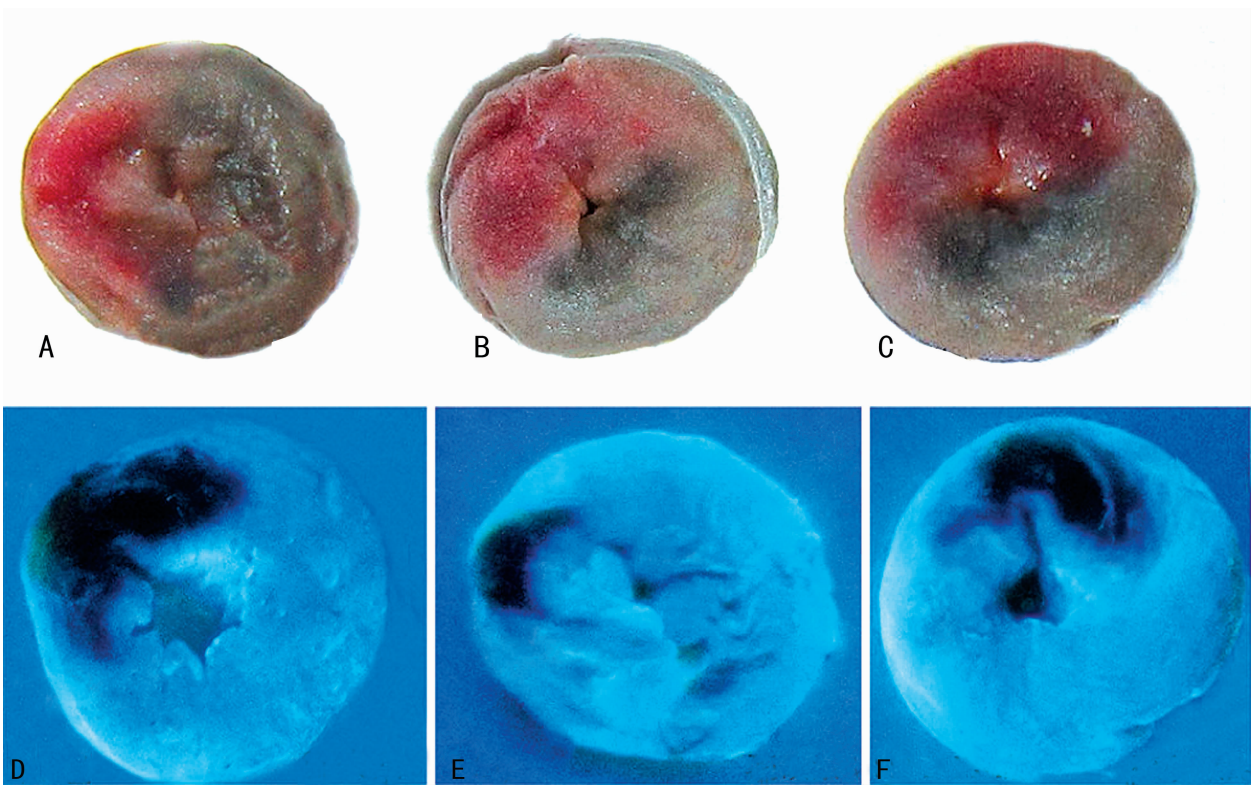
1.2.6 心肌 iNOS、eNOS 活性及 NO 水平测定 取左心室前壁心肌组织 100 mg,制成 10%组织匀浆,4℃下 3 000 r/min 离心 15 min 后收集匀浆上清液,比色法测定 NOS 活性,硝酸还原酶法测 NO 水平。

1.3 统计学处理 全部数据采用 SPSS16.0 统计分析软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间的比较用单因素方差分析,多组间内两两比较采用 SNK 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SF 对缺血范围、梗死范围、无复流范围及 CK-MB、IL-6 的影响 缺血 60 min 再灌注 120 min 后各组间的 AAR/LV% 差异均无统计学意义($P>0.05$)。与 I/R 组相比, SF 组可以明显减少缺血和再灌注损伤引起的 CK-MB 和 IL-6 的升高,同时减少心肌梗死范围及无复流范围(均 $P<0.05$);与 SF 组相比, SF-L-NNA 组可部分阻断 SF 减少心肌梗死范围及无复流范围的作用,以及降低 CK-MB 和 IL-6 的作用(均 $P<0.05$)。见图 1、表 1。

2.2 SF 对大鼠 iNOS、eNOS 的水平及活性的影响 免疫组织化学染色后可见 iNOS、eNOS 主要在血管内皮细胞表达(图 2)。与假手术组比较, I/R 组 iNOS 水平及活性显著增加(均 $P<0.05$), eNOS 水平及活性显著降低(均 $P<0.05$);与 I/R 组比较, SF 组 iNOS 水平及活性显著降低(均 $P<0.05$), eNOS 水平及活性显著增加(均 $P<0.05$);与 SF 组比较, SF-L-NNA 组 eNOS 活性显著降低($P<0.05$), iNOS 活性及水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。



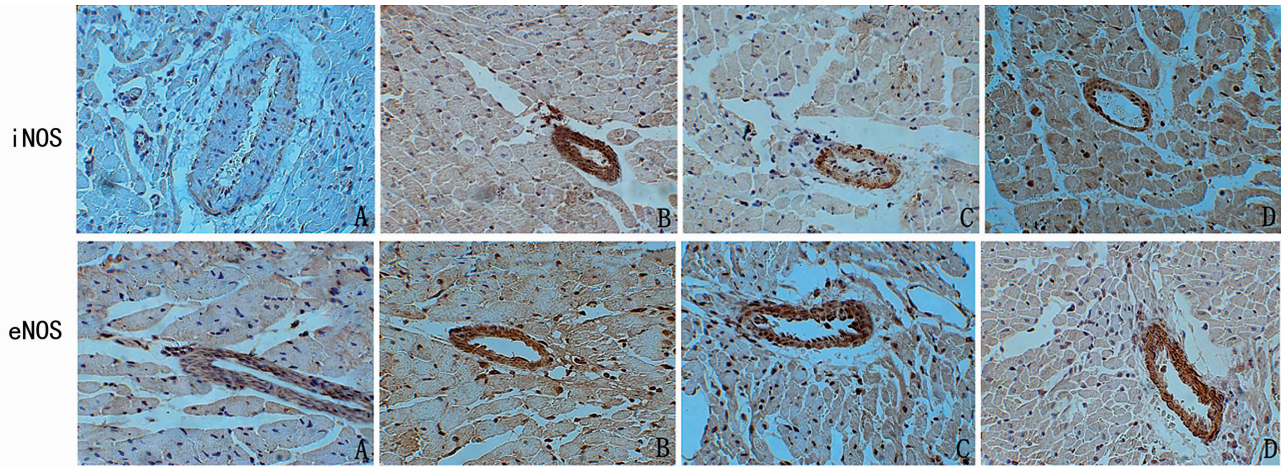
A、B、C:分别为 I/R 组、SF 组、SF-L-NNA 组伊文思蓝染色;D、E、F:分别为 I/R 组、SF 组、SF-L-NNA 组硫黄素 S 染色。

图 1 SF 对大鼠 AMI 心肌缺血再灌注后无复流范围的影响

表 1 SF 对缺血范围、梗死范围、无复流范围及 CK-MB、IL-6 的影响(±s)

组别	n	CK-MB(IU/L)	IL-6(ng/L)	AAR/LV(%)	NA/AAR(%)	ANR/AAR(%)
假手术组	8	1 187.60±285.18	57.54±5.08	—	—	—
I/R 组	16	5 031.40±370.31▲	162.85±5.10▲	42.45±7.32	86.40±7.25	50.53±6.68
SF 组	16	2 695.20±453.60▲★	109.10±9.08▲★	38.38±7.04	74.88±7.29★	33.08±6.84★
SF-L-NNA 组	16	3 790.37±470.52▲★◆	128.31±8.47▲★◆	39.71±6.96	80.76±7.60★◆	47.19±8.21★◆

▲:P<0.05,与假手术组比较;★:P<0.05,与 I/R 组比较;◆:P<0.05,与 SF 组比较;—:此项无数据。



A:假手术组;B:I/R 组;C:SF 组;D:SF-L-NNA 组。

图 2 各组大鼠心脏微血管的 iNOS、eNOS 蛋白免疫组织化学图(×400)

表 2 SF 对大鼠心脏血管 iNOS、eNOS 的 MD 及心肌 iNOS、eNOS 活性等的影响(±s)

组别	n	iNOS(MD)	eNOS(MD)	iNOS(U/mgprot)	eNOS(U/mgprot)	NO(μmol/gprot)
假手术组	8	0.26±0.03	0.46±0.13	0.32±0.11	1.37±0.20	49.52±2.27
I/R 组	16	0.59±0.07▲	0.37±0.05▲	1.05±0.10▲	0.91±0.15▲	17.29±3.73▲
SF 组	16	0.43±0.06▲★	0.62±0.07▲★	0.58±0.12▲★	1.13±0.17▲★	35.46±3.73▲★
SF-L-NNA 组	16	0.45±0.18▲★	0.62±0.19▲★	0.59±0.10▲★	0.95±0.12▲	20.00±2.85▲◆

▲:P<0.05,与假手术组比较;★:P<0.05,与 I/R 组比较;◆:P<0.05,与 SF 组比较。

2.3 SF 对心肌组织 NO 水平的影响 SF 对大鼠心脏血管 iNOS、eNOS 的 MD 及心肌 iNOS、eNOS 活性以及 NO 水平的影响,与假手术组比较,I/R 组 NO 水平显著降低($P<0.05$);与 I/R 组比较,SF 组 NO 水平显著升高($P<0.05$);与 SF 组比较,SF-L-NNA 组 NO 水平显著降低($P<0.05$)。见表 2。

3 讨 论

AMI 后无复流的发生严重影响患者预后,因此无复流的防治也是近年研究的热点问题。本研究通过缺血 60 min 再灌注 120 min 成功建立大鼠心肌缺血再灌注无复流模型,其缺血范围、梗死范围及无复流范围与既往文献相符^[4-5]。

SF 具有改善内皮功能和抑制炎症反应的作用^[6],这些作用是否参与无复流的改善目前报道尚比较少见。NO 是反应内皮功能的常用指标,体内的 NO 几乎均是由 NOS 催化 L-精氨酸生成的,NOS 主要有两种亚型——eNOS 与 iNOS。eNOS 主要存在于血管内皮细胞,在生理状态下,有基础量的 NO 释放,可舒张所有的血管,保护心肌。iNOS 在正常状态下,无活性表达,在受到炎症等刺激后释放大量的 NO,进而产生过氧化亚硝酸盐对血管内皮产生损伤。研究发现,炎症损伤贯穿在心肌缺血再灌注损伤的全过程,且能与其他损伤因素协同发挥作用,Helmy 等^[7]认为 IL-6 是一种多功能细胞因子,在心肌缺血再灌注损伤中比 C 反应蛋白或肌酸激酶更敏感,可作为应激

反应及心肌受损程度的重要指标。另有研究表明,实验性无复流中有冠状动脉严重内皮肿胀,功能失调,白细胞黏附和炎症过程的激活^[8-10]。本实验观察到 I/R 组血清 IL-6 水平明显升高,血管 iNOS 水平及活性增加,eNOS 水平及活性降低,心肌 NO 水平降低,心肌梗死及无复流范围显著增加,表明了无复流的发生伴随着内皮功能失调及炎症的激活,内皮功能失调时 eNOS 活性降低,其产生保护性 NO 减少,炎症刺激引起 iNOS 激活,其产生破坏性 NO 增加,净结果为 NO 减少。而 SF 组 IL-6 水平降低,iNOS 水平及活性降低,eNOS 水平及活性增加,心肌 NO 水平增加,无复流及梗死范围减少,表明应用 SF 后内皮功能及炎症损伤程度减低,无复流现象改善,联合 L-NNA 可部分阻断上述作用,与刘现亮等^[11]报道一致。目前认为 SF 可能通过以下几种机制改善无复流:(1)SF 可抑制 β 淀粉样肽介导的 p38MAPK 的活性,使 iNOS、NO 水平降低^[12-13];(2)SF 还可以抑制核因子-KB(NF-KB),抑制炎症反应瀑布及 iNOS 的激活,进一步抑制恶性循环^[14];(3)SF 可通过 PI3K-Akt-eNOS-NO 通路提高内皮系统的 NO 生物利用度^[15-16];(4)SF 还调节了心肌组织中 NO 在有益与有害的平衡,利于发挥有益作用。而一氧化氮合酶抑制剂 L-NNA 抑制 NOS 活性,阻断 NO 生成,部分阻断 SF 减少血清 IL-6 水平、心肌梗死范围及无复流范围的保护作用,提示 SF 可以通过调控

iNOS/eNOS-NO 系统, 保护内皮功能, 抑制炎症反应, 减轻 AMI 后的梗死及无复流范围。

本研究结果还显示 SF 可以减轻缺血再灌注损伤, 减小梗死面积。SF 减少心肌 I/R 后梗死范围的机制是否与缩小无复流范围有关尚不清楚, Reffelmann 等^[10]认为无复流范围可能会减少灌注挽救的心肌组织, 因此无复流或许与心肌梗死之间存在因果关系。

综上所述, SF 可以通过保护内皮功能, 抑制炎症反应, 从而改善微循环, 减小大鼠心肌缺血再灌注后无复流面积, 这可能是其防治无复流, 改善预后的一条重要途径。但是 AMI 再灌注后无复流现象的发生机制复杂, 各种因素间可能相互促进、相互影响, 有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 刘玲梅, 张梅, 刘艳红, 等. 替罗非班对大鼠心肌缺血再灌注后无复流及 NF- κ B 激活的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(10): 1892-1897.
- [2] 钱国强, 蔡川, 梁雪冰, 等. 当归四逆汤有效成分组合对大鼠缺血再灌注模型中 iNOS eNOS 表达相关性的实验研究[J]. 中成药, 2011, 33(6): 1039-1041.
- [3] 吕宏升, 朱庆生, 王军, 等. 全自动显微镜及图像分析系统处理免疫组化图像[J]. 中国体视学与图像分析, 2004, 9(1): 37-40.
- [4] Reffelmann T, Kloner RA. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(3): H1099-1107.
- [5] 黄雨胜, 张英杰, 阿托伐他汀对大鼠心肌缺血再灌注后无复流的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(7): 890-893.
- [6] 李海英, 吕艳霞. 阿魏酸钠对缺血-再灌注损伤影响的研究进展[J]. 河北医药, 2009, 31(8): 995-996.
- [7] Helmy SA, Wahby MA, El-Nawaway M. The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production[J]. Anaesthesia, 1999, 54(8): 733-738.

- [8] Rabelink TJ, Luscher TF. Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(2): 267-271.
- [9] Movahed MR, Butman SM. The pathogenesis and treatment of no-flow occurring during percutaneous coronary intervention[J]. Cardiovasc Revasc Med, 2008, 9(1): 56-61.
- [10] Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion [J]. Basic Res Cardiol, 2006, 101(5): 359-372.
- [11] 刘现亮, 丁玲岩, 赵希军, 等. 阿魏酸对兔急性心肌梗死再灌注后无复流的影响[J]. 岭南心血管病杂志, 2009, 15(2): 140-145.
- [12] 姚素艳, 郑德宇, 李淑云, 等. 阿魏酸钠抑制 A β 25-35 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 p38MAPK 活化[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(3): 449-452.
- [13] Zhang B, Li S, Harbrecht BG. Akt-mediated signaling is induced by cytokines and cyclic adenosine monophosphate and suppresses hepatocyte inducible nitric oxide synthase expression Independent of MAPK P44/42 [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(1): 73-79.
- [14] Allan RB. The nuclear factor- κ B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 211-218.
- [15] 潘会君, 唐宁, 华晓东, 等. 中药调控一氧化氮合酶-一氧化氮系统的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 202-205.
- [16] Liu CM, Ma JQ, Sun YZ. Puerarin protects rat kidney from lead-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 258(3): 330-342.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2013-01-22)

(上接第 1606 页)

- [5] 孔琪, 秦川. 肺纤维化的发病机制及关键靶点[J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2005, 25(5): 331-333, 336.
- [6] 石永利, 孟凡青. TGF- β_1 诱导的上皮-间叶转变与肺纤维化[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(5): 527-529.
- [7] Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, et al. p38MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts[J]. Hepatology, 2003, 38(4): 879-889.
- [8] Emura M. Stem cells of the respiratory epithelium and their in vitro cultivation[J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1997, 33(1): 3-14.
- [9] Uhal BD. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium[J]. Am J Physiol, 1997, 272(6 Pt 1): L1031-1045.
- [10] Pison U, Wright JR, Hawgood S. Specific binding of surfactant apoprotein SP-A to rat alveolar macrophages[J]. Am J Physiol, 1992, 262(4 Pt 1): L412-417.
- [11] 黄政坤, 包建东, 戴军, 等. p38MAPK 抑制剂对急性肺损伤大鼠肺组织核因子- κ B 表达的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2007, 23(4): 323-325.

- [12] Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(3): 155-166.
- [13] 张新志, 黄迪, 吴锋, 等. TGF- β_1 /p38MAPK 通路对肾间质纤维化影响及抗纤灵冲剂干预机制的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(2): 245-248.
- [14] Matsuoka H, Arai T, Mori M, et al. A p38 MAPK inhibitor, FR-167653, ameliorates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(1): L103-112.
- [15] Willis BC, Dubois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(4): 377-382.
- [16] 宋建国, 王冬梅. 上皮细胞向间质细胞转变的调控及其与细胞凋亡的关系[J]. 生命科学, 2010, 22(11): 1147-1153.
- [17] 杨耀芳. 青蒿素及衍生物的药理作用和临床应用[J]. 中国临床药理学杂志, 2003, 12(4): 253-254.

(收稿日期: 2012-10-18 修回日期: 2013-02-20)