

# 内皮素受体拮抗剂 BMS-182874 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

陈美芳<sup>1</sup>, 江俊麟<sup>2</sup>, 李元建<sup>2</sup>, 杨天伦<sup>1</sup>

(1. 中南大学湘雅医院心内科; 2. 中南大学药学院药理学系, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 药理学; 内皮素受体拮抗剂的药理作用; 大鼠离体心脏灌注法; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 肌酸激酶; 缺血再灌注; 心肌损伤

[摘要] 为观察选择性内皮素 A 受体拮抗剂 BMS-182874 对离体灌注心脏缺血再灌注损伤的影响, 并进一步探讨其可能的作用机制。按照 Langendorff 方式灌注离体大鼠心脏, 全心缺血 30 min 后再灌注 30 min 诱导急性心肌缺血模型。给予 BMS-182874 (10  $\mu$ mol/L 或 50  $\mu$ mol/L) 持续灌注离体心脏, 连续记录心功能, 检测冠状动脉流出液中的肌酸激酶和心肌组织中的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 含量。结果发现, 与对照组相比, 缺血再灌注组心功能显著下降, 左心室内压和左心室内压最大变化率 ( $\pm dp/dt_{max}$ )、冠状动脉流量明显降低 ( $P < 0.01$ ), 肌酸激酶 ( $23.9 \pm 2.2$  比  $217.5 \pm 14.1$ ,  $P < 0.01$ ) 以及心肌组织中肿瘤坏死因子 $\alpha$ 含量明显增加 ( $645 \pm 45$  比  $1926 \pm 141$ ,  $P < 0.01$ ), 而 10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L 的 BMS-182874 显著减轻缺血后心功能的损害, 升高左心室内压和左心室内压最大变化率 ( $\pm dp/dt_{max}$ ) ( $P < 0.01$ ), 同时降低肌酸激酶 ( $185 \pm 14$  和  $143 \pm 11$ , 与缺血再灌注组相比  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ) 和心肌组织中的肿瘤坏死因子 $\alpha$ 含量 ( $1222 \pm 67$  和  $1108 \pm 57$ , 与缺血再灌注组相比  $P < 0.01$ )。结果提示, 内皮素 A 受体拮抗剂能显著减轻心肌缺血再灌注损伤, 其保护作用可能与抑制心肌组织中肿瘤坏死因子 $\alpha$ 生成有关。

[中图分类号] R962

[文献标识码] A

## Effects of Endothelin A Receptor Antagonist BMS-182874 on Ischemia-Reperfusion Injury in Isolated Rat Hearts

CHEN Mei Fang<sup>1</sup>, JIANG Jun Lin<sup>2</sup>, LI Yuan Jian<sup>2</sup>, and YANG Tian Lun<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Xiangya Hospital; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Endothelin 1; Creatine Kinase; Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ; Ischemia-Reperfusion; Myocardial Injury; Antagonist

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of selective endothelin A receptor (ETA) antagonist BMS-182874 on myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury in isolated rat hearts. **Methods** The isolated hearts were perfused in a Langendorff mode and acute myocardial ischemic model was induced by 30 min of global ischemia and 30 min of reperfusion. The effects of ETA receptor antagonist BMS-182874 (10  $\mu$ mol/L, 50  $\mu$ mol/L) on heart function during reperfusion, the release of cardiac creatine kinase (CK) in the coronary effluent and the content of myocardial tumor necrosis factor $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were analyzed. **Results** 30-minute global ischemia caused a dramatic decrease in myocardial function, as shown by decreasing LVP,  $\pm dp/dt_{max}$ , CF ( $P < 0.01$ ) and increasing CK release ( $23.9 \pm 2.2$  vs  $217.5 \pm 14.1$ ,  $P < 0.01$ ) and myocardial TNF- $\alpha$  content ( $645 \pm 45$  vs  $1926 \pm 141$ ,  $P < 0.01$ ). However, treatment with 10  $\mu$ mol/L and 50  $\mu$ mol/L BMS-182874 significantly attenuated the ischemia-induced myocardial injury, increased LVP,  $\pm dp/dt_{max}$ , and reduced the release of CK ( $185 \pm 14$ ,  $143 \pm 11$ , compared with ischemia/reperfusion group,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  respectively) and the TNF- $\alpha$  content in myocardial tissues ( $P < 0.01$ ), but had no effect on HR and CF ( $1222 \pm 67$ ,  $1108 \pm 57$ , compared with ischemia/reperfusion group,  $P < 0.01$ ). **Conclusions**

These findings suggest the cardioprotective effects afforded by ETA receptor antagonist BMS-182874 may be related to inhibition of myocardial TNF- $\alpha$  production.

内皮素 1 (endothelin-1) 是迄今所知作用最强的

缩血管活性肽, 其受体可分为 A 和 B 两种亚型, 广泛分布于冠状血管和心肌细胞中。研究发现, 心肌缺血可显著增加冠状动脉流出液中内皮素 1 的释放, 外源性给予内皮素 1 呈剂量依赖性地抑制心功能<sup>[1]</sup>; 而使用单克隆的内皮素 1 抗体、内皮素转化酶抑制剂 phosphoramidon、内皮素 A/B 受体拮抗剂 bosentan、TAK-044 以及内皮素 A 受体拮抗剂 BQ-123

[收稿日期] 2003-07-11

[修回日期] 2003-01-13

[作者简介] 陈美芳, 硕士, 研究方向主要为高血压的防治。李元建, 教授, 博士研究生导师, 中南大学药学院院长, 主要从事心血管药理研究, 已发表学术论文 102 篇, 被 SCI 收录的有 74 篇。杨天伦, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 中南大学湘雅医院心血管内科主任, 主要从事心血管疾病的科研和临床工作, 为本文通讯作者, 联系电话为 0731-4327250, E-mail 为 tlyang2003@yahoo.com。

和 BQ-610 可明显减少在体或离体动物心肌梗死面积,改善缺血后心功能和恢复血管内皮功能,并且减轻缺血再灌注诱导的心肌超微结构损伤<sup>[2]</sup>。这些结果均提示内皮素 1 在心肌缺血再灌注损伤过程中起着重要的作用。BMS-182874 是高选择性的非肽类内皮素 A 受体拮抗剂,目前尚未见到有关其对离体心脏缺血再灌注的报道。本实验拟研究内皮素 A 受体拮抗剂 BMS-182874 对离体大鼠缺血再灌注心功能的影响,并探讨其与心肌组织肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 生成的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只,体重 180~220 g,由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供。

### 1.2 药品和试剂

BMS-182874 (1, 5-(dimethylamino)-N-(3, 4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1-naphthalene sulfonamide) 由美国 Bristol-Myers Squibb 公司馈赠,试验当日溶于改良克氏(Krebs-Henseleit, K-H)液中配成终浓度立即使用;TNF- $\alpha$  试剂盒购于北京东亚免疫技术研究所;肌酸激酶(creatine kinase, CK)试剂盒购于北京中山生物试剂公司。

### 1.3 离体心脏灌注

SD 大鼠用戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔麻醉,开胸,迅速取出心脏置于预冷(4℃)改良 K-H 缓冲液(配方如下:氯化钠 119.0 mmol/L、碳酸氢钠 25.0 mmol/L、氯化钾 4.7 mmol/L、磷酸二氢钾 1.2 mmol/L、硫酸镁 1.2 mmol/L、氯化钙 2.5 mmol/L 和葡萄糖 11.0 mmol/L)中,1 min 内建立 Langendorff 灌注系统,用饱和 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的 K-H 液恒压逆行灌注心脏。剪开左心耳,左心室内插入一含水气囊,球囊导管连接压力换能器,经 MacLab A/D 转换器与 Power Macintosh 计算机相连,连续记录左心室内压(left ventricular pressure, LVP)、左心室内压最大变化率( $\pm dp/dt_{max}$ )和心率。定时收集冠状动脉流出液计算冠状动脉流量(coronary flow, CF)。

### 1.4 分组和处理

大鼠随机分为 4 组:对照组(n=6)用 K-H 液持续灌注 90 min;缺血组(n=8)在平衡 30 min 后,缺血 30 min,再灌注 30 min;低剂量(n=8)和高剂量 BMS-182874 组(n=8)在平衡 20 min 后分别使用 10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L 的 BMS-182874 灌注 10 min,缺血 30 min,再灌注 30 min。

### 1.5 肌酸激酶的检测

通过检测 CK 的释放量来反应心肌损伤程度。严格按照试剂盒操作,收集恢复再灌第 5 min 的冠状动脉流量,取样本 50  $\mu$ L,加入预先保温至 37℃的 CK 试剂盒工作液中,37℃温育 1 min,在 722 分光光度计 340 nm 波长处测定吸光度,根据公式计算出 CK 的释放量[mU/(min·g)]。

### 1.6 心肌组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ 含量的测定

试验结束时称取心脏重量和左心室重量(不包括室间隔),用生理盐水反复冲洗左心室心肌组织并称重,剪碎后取 0.4~0.5 g 组织加入 1 mL 冰生理盐水,组织匀浆,低温离心(4℃, 3 000 r/min, 15 min),留取上清液置于-70℃冰箱保存待测。严格按照试剂盒的要求,采用放射免疫法测定心肌组织中 TNF- $\alpha$  含量,具体操作如下:取组织匀浆上清液 100  $\mu$ L 加入<sup>125</sup>I-TNF 和抗 TNF 血清各 100  $\mu$ L,充分混合后放置 24 h(4℃),然后加入 PR 分离剂充分混匀,室温放置 20 min 离心后吸弃上清液,测定放射性,然后根据标准曲线计算出 TNF- $\alpha$  含量(pg/g)。

### 1.7 统计学分析

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SPSS10.0 软件处理,多组间比较采用方差分析,两两比较用多重比较 *t* 检验。双侧  $P < 0.05$  认为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 心功能的变化

与对照组相比,缺血组显著抑制心功能,减少 LVP、 $\pm dp/dt_{max}$  和 CF( $P < 0.01$ )。而 10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L 的 BMS-182874 可明显逆转缺血再灌注诱发的心功能损害,显著升高 LVP(复灌注 30 min 时分别为  $57.6 \pm 2.9$  和  $63.9 \pm 4.4$ ,与缺血组  $42.6 \pm 6.1$  相比, $P < 0.01$ )、 $\pm dp/dt_{max}$ (复灌注 30 min 时分别为  $1704 \pm 91$  和  $1782 \pm 153$ ,与缺血组  $1150 \pm 173$  相比, $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )和  $\pm dp/dt_{max}$ (复灌注 30 min 时分别为  $1323 \pm 87$  和  $1462 \pm 102$ ,与缺血组  $860 \pm 131$  相比  $P < 0.01$ ),轻度增加 CF,但差异没有显著性( $P > 0.05$ )(图 1, Figure 1)。与缺血组相比,两组心率的变化没有统计学意义(表 1, Table 1)。

### 2.2 肌酸激酶释放量的变化

各组 CK 释放量见表 2(Table 2)。与对照组相比,缺血组冠状动脉流出液中 CK 释放明显增加( $P < 0.01$ ),而预先给予 BMS-182874(10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L)则明显抑制 CK 的释放(与缺血组相比  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。

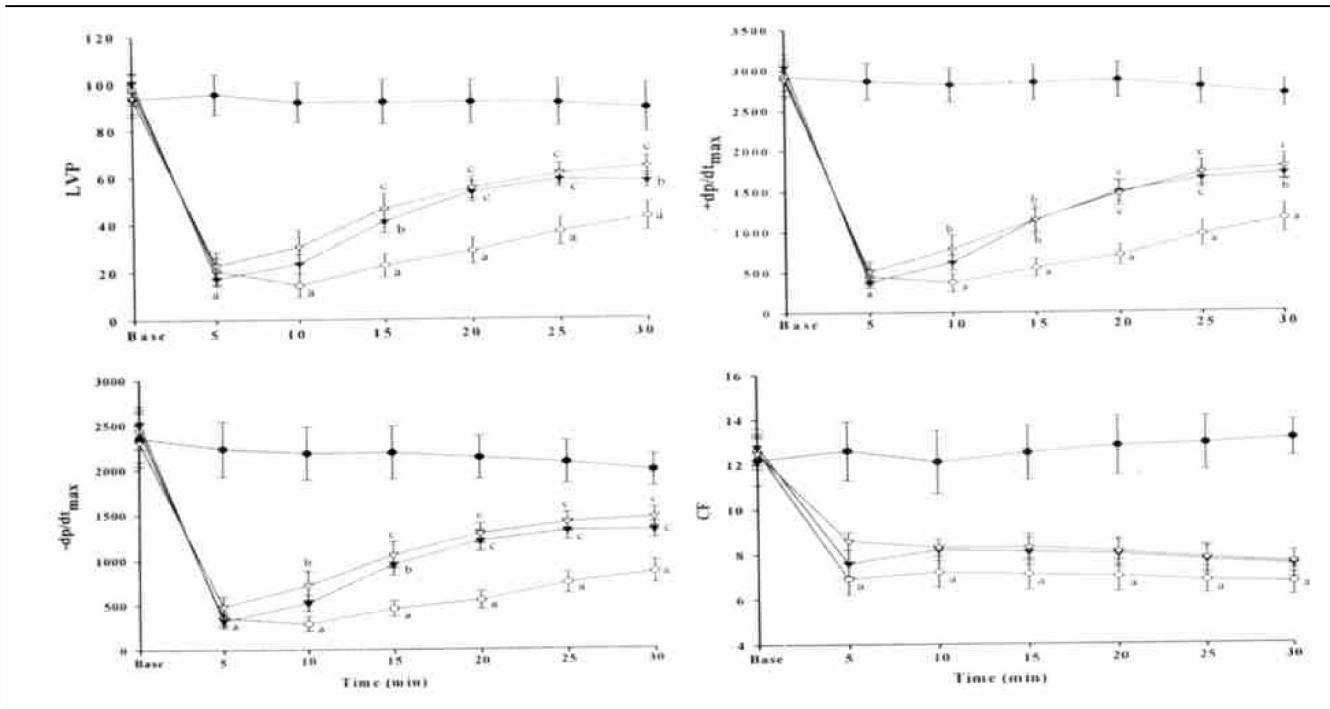


图 1. BMS-182874 对心功能的影响 a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , 与缺血组比较。

Figure 1. Effects of BMS-182874 on cardiac function

表 1. 各组间心率的比较

Table 1. Comparison of heart rate in various groups

分 组	n	基础值	复灌 5 min	复灌 10 min	复灌 20 min	复灌 30 min
对照组	6	323.6 ± 16.7	306.1 ± 14.1	298.7 ± 12.5	302.3 ± 16.2	299.9 ± 18.3
缺血组	8	309.2 ± 12.8	123.9 ± 35.6 <sup>b</sup>	197.4 ± 60.5	269.1 ± 27.2	273.7 ± 17.2
低剂量组	8	323.5 ± 14.1	161.5 ± 45.2 <sup>a</sup>	196.2 ± 45.3	287.6 ± 14.5	291.8 ± 9.9
高剂量组	8	298.4 ± 12.8	139.9 ± 22.3 <sup>a</sup>	259.2 ± 44.6	266.5 ± 7.7	266.8 ± 6.5

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$  与对照组比较。

表 2. BMS-182874 对肌酸激酶释放量和心肌组织肿瘤坏死因子  $\alpha$  含量的影响

Table 2. Effects of BMS-182874 on CK release and the content of myocardial TNF- $\alpha$

分 组	n	CK 释放量 [mU/(min·g)]	TNF- $\alpha$ 含量(pg/g)
对照组	6	23.9 ± 2.2	645 ± 45
缺血组	8	218 ± 14 <sup>a</sup>	1 926 ± 141 <sup>a</sup>
低剂量组	8	185 ± 14 <sup>b</sup>	1 222 ± 67 <sup>c</sup>
高剂量组	8	143 ± 11 <sup>c</sup>	1 108 ± 57 <sup>c</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , 与缺血组比较。

### 2.3 心肌组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ 含量的变化

如表 2 所示, 缺血再灌注组心肌组织中 TNF- $\alpha$  含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而预先给予 BMS-182874 (10  $\mu$ mol/L 或 50  $\mu$ mol/L) 可显著减少心肌组织 TNF- $\alpha$  的生成 (与缺血组相比,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

内皮素 1 是促进心肌缺血再灌注损伤的主要因素。离体实验证明, 心肌缺血显著增加冠状动脉流出液中内皮素 1 的释放; 冠状动脉内灌注内皮素 1 (4~ 400 pmol) 呈剂量依赖性地抑制心功能, 当一次性给予的内皮素 1 剂量达到 400 pmol 时冠状动脉流量几乎中断<sup>[1]</sup>。在体实验证明, 缺血心肌组织中内皮素 1 水平较非缺血心肌组织高 7 倍, 缺血心肌中前内皮素 1 原 mRNA 表达明显增加, 并发现内皮素 1 升高的水平与心肌缺血时间呈显著正相关<sup>[3]</sup>。在不同的心肌缺血模型, 内皮素受体拮抗剂能明显缩小心肌梗死面积, 减轻缺血心肌的超微结构损伤, 减少 CK 的释放, 降低心律失常的发生率<sup>[4,5]</sup>。BMS-182874 是一种高选择性的非肽类内皮素 A 受体拮抗剂, 可呈剂量依赖性地拮抗内皮素 1 的升压反应。

本文在离体心肌缺血再灌注损伤模型发现, 给予 10  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$  BMS-182874 能显著改善缺血心肌的心功能, 减少 CK 的释放, 但是 BMS-182874 处理组和缺血再灌注组相比较 CF 并没有显著增加, 说明 BMS-182874 对心脏的保护作用并不完全依赖于内皮素拮抗剂对冠状动脉的扩张作用。

内皮素受体拮抗剂介导的心肌保护作用机制不清。TNF- $\alpha$  作为一重要的致炎症因子, 大量存在于心血管组织中, 可诱导多种血管活性物质产生, 因而不少学者将其视为启动缺血再灌注细胞因子级联反应的上游因子<sup>[6]</sup>。免疫组织化学证实在缺血再灌注过程中心肌细胞是产生 TNF- $\alpha$  的主要细胞<sup>[7]</sup>, 研究显示缺血诱导再灌注时 TNF- $\alpha$  释放和合成增加, 且它的升高程度和缺血后心功能恶化和细胞坏死数量相关<sup>[7,8]</sup>, 而抗 TNF- $\alpha$  抗体可以改善再灌时心肌功能的恢复<sup>[9]</sup>。近年来相继发现缺血预适应介导的心肌保护作用与抑制心肌组织 TNF- $\alpha$  的生成有关, 认为 TNF- $\alpha$  可能是缺血预适应信号传导途径中的最终效应子<sup>[10]</sup>。另外, 还发现内皮素 1 可以诱导单核细胞和巨噬细胞 TNF- $\alpha$  释放增加<sup>[11]</sup>, 肥大细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 表达增加<sup>[12]</sup>, 内皮素受体拮抗剂抑制肝脏缺血组织 TNF- $\alpha$  的生成<sup>[13]</sup>。基于内皮素 1 和 TNF- $\alpha$  的关系, 我们检测了内皮素受体拮抗剂的心肌保护作用 and 心肌组织 TNF- $\alpha$  生成之间的关系。结果发现, BMS-182874 明显减轻 I/R 诱导的心肌损伤的同时减少了心肌组织 TNF- $\alpha$  含量。说明 BMS-182874 通过内皮素 A 受体介导的心脏保护作用与抑制心肌组织中 TNF- $\alpha$  生成有关。

然而, 内皮素受体拮抗剂抑制心肌组织中 TNF- $\alpha$  生成的机制目前尚不清楚。有研究证实内皮素 1 与心肌 I/R 诱导的炎症损伤有关。内皮素 1 参与中性粒细胞的活化和聚集, 不仅内皮细胞, 其它炎症细胞如巨噬细胞、多型核白细胞也可产生内皮素肽。在离体灌注的大鼠心脏, 内皮素 A 受体拮抗剂 LU135252 明显减轻中性粒细胞诱导的缺血心肌损伤<sup>[14]</sup>。Pearl 等<sup>[15]</sup> 发现内皮素 A/B 受体拮抗剂 Bosentan 完全取消了中性粒细胞专有酶心肌脂过氧化酶活性以及脂质过氧化过程, 这些研究结果皆提示内皮素 1 可能参与了缺血再灌注诱导的炎症损伤过程。有研究提示核因子  $\kappa\text{B}$  与 TNF- $\alpha$  关系密切<sup>[16,17]</sup>, 其信号传导途径参与了内皮素的生物学效应, 而抑制核因子  $\kappa\text{B}$  的活性可以抑制 TNF- $\alpha$  的生

成<sup>[18]</sup>。但内皮素受体拮抗剂是否通过核因子  $\kappa\text{B}$  途径抑制 TNF- $\alpha$  生成有待下一步的研究证实。

#### [参考文献]

- [1] Goodwin AT, Amrani M, Gray CG, Jayakumar J, Marchbank AJ, Yacoub MH. Differential effects of endothelin 1 on isolated working rat hearts before and after ischaemia and reperfusion. *Clin Sci (Lond)*, 2002, **103** (S48): 189-193
- [2] Pernow J, Wang QD. Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 1997, **33** (3): 518-526
- [3] Gourine AV, Gonon AT, Pernow J. Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemic reperfusion. *Am J Physiol*, 2001, **280** (3): H1105-1112
- [4] Beyer ME, Fischer M, Hovelborn T, Hoffmeister HM. ET(A) receptor blockade improves post-ischaemic functional recovery in 'hibernating' rat myocardium. *Clin Sci (Lond)*, 2002, **103** (S48): 215-218
- [5] Xu H, Lin L, Yuan WJ. Antiarrhythmic effect of endothelin A receptor antagonist on acute ischemic arrhythmia in isolated rat heart. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, **24** (1): 37-44
- [6] Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39** (7): 1 229-235
- [7] Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Lifschitz-Mercer B, Berger E, Paz Y, et al. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30** (6): 1 554-561
- [8] Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Cain BS, Meng X, Harken AH. Increased myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemic reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 1998, **65** (2): 439-443
- [9] Hohlfeld T, Klenm P, Thiemermann C, Warner TD, Schorr K, Vane JR. The contribution of tumor necrosis factor- $\alpha$  and endothelin 1 to the increase of coronary resistance in hearts from rats treated with endotoxin. *Br J Pharmacol*, 1995, **116** (8): 3 309-315
- [10] Peng J, Xiao J, Ye F, Deng HW, Li YJ. Inhibition of cardiac tumor necrosis factor- $\alpha$  production by calcitonin gene-related peptide-mediated ischemic preconditioning in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol*, 2000, **407** (3): 303-308
- [11] Ruetten H, Thiemermann C. Endothelin 1 stimulates the biosynthesis of tumor necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol*, 1997, **48** (4): 675-688
- [12] Coulombe M, Battistini B, Stankova J, Pouliot P, Bissonnette EY. Endothelins regulate mediator production of rat tissue cultured mucosal mast cells. Up-regulation of Th1 and inhibition of Th2 cytokines. *J Leukoc Biol*, 2002, **71**: 829-836
- [13] Geshi E, Nomizo A, Arata Y, Nakatani M, Katagiri T. Effect of non-selective endothelin blockade, TAK-044, on the ischemic cellular injury of rat heart. *Basic Res Cardiol*, 1999, **94**: 94-101
- [14] Gonon AT, Wang QD, Pernow J. The endothelin A receptor antagonist LU 135252 protects the myocardium from neutrophil injury during ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*, 1998, **39**: 674-682
- [15] Pearl JM, Nelson DP, Wagner CJ, Lombardi JP, Duffy JY. Endothelin receptor blockade reduces ventricular dysfunction and injury after reoxygenation. *Ann Thorac Surg*, 2001, **72**: 565-570
- [16] 李凝旭, 李建军, 李庚山, 王晶, 徐红新, 李夏, 等. 细菌脂多糖诱导人外周血单核细胞肿瘤坏死因子  $\alpha$  的合成及核因子  $\kappa\text{B}$  的活化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 320-323
- [17] 黄虔, Gräfe M, Gräfe K, Fleck E. 普罗布考和抗氧化维生素不影响体外实验条件下内皮细胞的白细胞粘附. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9**: 115-118
- [18] Ishizuka T, Takamizawa-Matsumoto M, Suzuki K, Kurita A. Endothelin 1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 1999, **369**: 237-245

(此文编辑 胡必利)