

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0171-04

•实验研究•

## 曲美他嗪对大鼠缺血再灌注心肌线粒体的保护作用

赵艳芳<sup>1</sup>, 秦永文<sup>2</sup>, 王学敏<sup>3</sup>, 缪明永<sup>3</sup>

(1. 中国人民解放军第 81 医院心内科, 江苏省南京市 210002; 第二军医大学 2. 长海医院心内科;  
3. 基础医学部生物化学教研室, 上海市 200433)

[关键词] 内科学; 曲美他嗪; 缺血再灌注损伤; 线粒体; 心肌超微结构; 氧自由基; 钙离子

[摘要] 目的 探讨曲美他嗪对缺血再灌注损伤心肌线粒体的保护作用及其机制。方法 将 50 只 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、生理盐水组和曲美他嗪组(5 mg/kg 组及 10 mg/kg 组)4 组, 假手术组只开胸, 不结扎冠状动脉。余 3 组复制缺血再灌注损伤模型, 缺血前分别静脉注射曲美他嗪(5 或 10 mg/kg)及等量生理盐水, 在缺血 30 min 及再灌注 40 min 时测定缺血再灌注损伤区心肌线粒体丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶及总钙浓度, 并通过电镜观察心肌超微结构的改变。结果 与假手术组比较, 生理盐水组及曲美他嗪组线粒体中的丙二醛及总钙显著增高, 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽及谷胱甘肽过氧化物酶显著降低。与生理盐水组比较, 曲美他嗪组的丙二醛及总钙水平显著降低, 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽及谷胱甘肽过氧化物酶显著增高。电镜观察显示曲美他嗪组线粒体损伤较生理盐水组明显减轻。结论 以上提示曲美他嗪能减轻缺血再灌注心肌线粒体的脂质过氧化损伤, 其机制可能是通过提高线粒体内谷胱甘肽含量及超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性, 以增强其抗氧化能力, 并通过减轻线粒体内钙聚积在细胞水平提供心肌保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Protective Effect of Trimetazidine on Rat Mitochondria with Myocardial Ischemia Reperfusion Injury

ZHAO Yan Fang<sup>1</sup>, QIN Yong Wen<sup>2</sup>, Wang Xue Min<sup>3</sup>, and Miao Ming Yong<sup>3</sup>

(1. Department of Cardiology, No. 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002; 2. Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University; 3. Department of Biochemistry, College of Basic Medical Science, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[KEY WORDS] Trimetazidine; Reperfusion Injury; Mitochondria; Oxygen Free Radical; Ca<sup>2+</sup>; Myocardial; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of trimetazidine (TMZ) on mitochondria of myocardial ischemia and ischemia reperfusion injury and its mechanism. **Methods** Totally 50 SD rats were randomly divided into 4 groups: the pseudooperation group, the saline group and the TMZ treated groups (5 mg/kg and 10 mg/kg). In the pseudooperation group the coronary artery was not ligated but the chest was opened, the other groups were the model of myocardial ischemia reperfusion injury (RI). The level of malonaldehyde(MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the accumulation of Ca<sup>2+</sup> in mitochondria of myocardial were detected at ischemia 30 min and reperfusion 40 min. The myocyte ultrastructure was also observed by electron microscope in 4 groups. **Results** Compared with the pseudooperation group, the MDA and total Ca<sup>2+</sup> were significantly higher and the SOD, GSH, GSH-Px were significantly lower in saline group and treated groups. Compared with the saline group, the MDA and total Ca<sup>2+</sup> was significantly lower and the SOD, GSH, GSH-Px were significantly higher in treated group. The ultrastructure changes of myocardium under electron microscope showed that the damage degree of mitochondria is slighter in TMZ treated groups than in saline group. **Conclusions** TMZ could significantly reduce the injury of lipid peroxidation of myocardial mitochondrial induced by ischemia and ischemia reperfusion. The mechanism may be that TMZ could increase the content of GSH and the activity of SOD and GSH-Px, and enhance its antioxidant production. TMZ could protect the cardiac cells by reducing calcium overload in myocardial mitochondria.

线粒体是细胞呼吸和产能的主要场所, 线粒体功能的完好在心肌缺血再灌注损伤(ischemia reperfu-

sion injury, RI) 中具有重要意义, 以往对离体大鼠心脏线粒体功能的研究提示曲美他嗪(trimetazidine, TMZ)可减轻缺血及再灌注对线粒体呼吸链的损害, 减轻自由基造成的膜损伤<sup>[1, 2]</sup>。本实验通过建立大鼠 RI 模型, 观察曲美他嗪对在体大鼠心肌线粒体自由基和 Ca<sup>2+</sup> 的影响及心肌超微结构的改变, 探讨其作用机理。

[收稿日期] 2004-07-21

[修回日期] 2005-01-20

[作者简介] 赵艳芳, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, 联系电话为 025-80864024, E-mail 为 yanfangz@sina.com。秦永文, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的介入治疗, 联系电话为 021-25072064, E-mail 为 chxnk@yaoxue.net。王学敏, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为线粒体的结构与功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与分组

健康 SD 雄性大鼠 50 只 (BK 公司产品, 由中国人民解放军第二军医大学动物中心提供), 体重 220 ~ 280 g, 随机分为假手术组、生理盐水组、TMZ 5 mg/kg 组和 TMZ 10 mg/kg 组。大鼠用氯胺酮 (50 mg/kg) 腹腔麻醉, 仰卧固定于手术台上, 四肢皮下连接心电图电极, 记录标准  $\text{VI}$  导联心电图, 切开气管行人工呼吸机辅助呼吸 (江湾 iv 型微量人工呼吸机), 分离右颈总动脉及右股静脉, 分别插管用于测血压、抽血及给药。参照文献 [3] 于胸骨左缘第二~四肋间开胸, 暴露心脏, 结扎左前降支血管, 心肌缺血 30 min, 再灌注 40 min。曲美他嗪组在缺血前 10 min 静脉注射 TMZ (两组分别按 5 mg/kg 及 10 mg/kg 剂量注射), 生理盐水组静脉注射等量生理盐水, 假手术组开胸暴露心脏后只穿线不结扎。实验结束时颈总动脉注射 10% 氯化钾 1 mL, 使心脏停跳于舒张状态。重新阻断前降支, 颈总动脉注入 75% 酒精 3 mL, 4 s 内注射完毕, 立即取出心脏, 生理盐水冲洗心室, 留取呈红色的 RI 区域心肌<sup>[4]</sup>。

### 1.2 心肌线粒体的制备及丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶的测定

取 RI 区的心肌组织冰生理盐水冲洗后称重、剪碎, 按 1:9 浓度 (W:V=1:9) 加入 4℃ 心肌线粒体分离介质, 置 Teflon 芯的玻璃匀浆管中, 充分研磨, 制成 10% 匀浆倒入离心管中, 整个过程在 4℃ 冰浴中进行。离心管置于低温高速离心机, 1 000 g 离心 10 min, 弃沉淀, 取上清液以 10 000 g 离心 7 min, 弃上清, 再加入适量 4℃ 分离介质以 10 000 g 离心 7 min,

弃上清, 沉淀物为线粒体, 加入少许匀浆介质制成线粒体悬液, 置于液氮待测各生物化学指标。丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 采用硫代巴比妥法, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 采用黄嘌呤氧化酶法, 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 采用二硫双硝基苯甲酸定量测定法, 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性采用 DTNB 法, 试剂盒由南京聚力生物工程研究所提供。

### 1.3 线粒体 $\text{Ca}^{2+}$ 测定

采用电极法测定线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  水平, 所用仪器为深圳粤华 MI-921 电解质分析仪。

### 1.4 电镜标本制备

取 RI 区心肌, 置于 4% 戊二醛固定, 按常规透射电镜样品制备方法进行脱水包埋和切片, H800 透射电镜观察心肌超微结构。

### 1.5 统计学处理

所有数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 显著性检验采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 各组线粒体丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶水平的比较

与假手术组比较, 生理盐水组及曲美他嗪组线粒体中的 MDA 显著增高, SOD、GSH 及 GSH-Px 显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与生理盐水组比较, 曲美他嗪组 MDA 显著降低, SOD、GSH 及 GSH-Px 显著增高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。不同剂量曲美他嗪组间差异无显著性 (表 1, Table 1)。

表 1. 大鼠缺血再灌注心肌线粒体中丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1. The change of MDA, SOD, GSH and GSH-Px in myocardial mitochondrial with ischemia reperfusion on rats

分 组	丙二醛 (nmol/mg 蛋白)	超氧化物歧化酶 (U/mg 蛋白)	谷胱甘肽 (mol/mg 蛋白)	谷胱甘肽过氧化物酶 (U/mg 蛋白)
假手术组	157.4 $\pm$ 94.8	428.5 $\pm$ 73.4	3.11 $\pm$ 0.54	0.62 $\pm$ 0.08
生理盐水组	366.3 $\pm$ 94.3 <sup>a</sup>	139.6 $\pm$ 90.3 <sup>b</sup>	1.23 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
曲美他嗪组 5 mg/kg	247.3 $\pm$ 65.3 <sup>ac</sup>	351.4 $\pm$ 61.3 <sup>ad</sup>	1.96 $\pm$ 0.75 <sup>bc</sup>	0.38 $\pm$ 0.06 <sup>bd</sup>
曲美他嗪组 10 mg/kg	219.0 $\pm$ 53.6 <sup>d</sup>	385.7 $\pm$ 56.1 <sup>d</sup>	2.35 $\pm$ 0.53 <sup>c</sup>	0.59 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与假手术组比较, c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , 与生理盐水组比较。

### 2.2 线粒体 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的改变

假手术组、生理盐水组、TMZ 5 mg/kg 组和 TMZ 10 mg/kg 组线粒体总钙水平分别为 0.18  $\pm$  0.024、0.32  $\pm$  0.028、0.29  $\pm$  0.042 和 0.23  $\pm$  0.038 mmol/mg

蛋白。生理盐水组总钙水平显著高于假手术组 ( $P < 0.01$ ), 曲美他嗪组总钙水平显著低于生理盐水组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), TMZ 5 mg/kg 和 TMZ 10 mg/kg 组间差异亦有显著性 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 电镜下心肌超微结构的改变

假手术组线粒体嵴致密,膜完整,无肿胀,结构正常,肌节排列整齐,Z线清晰(图 1A, Figure 1A)。生理盐水组线粒体极度肿胀,嵴数目减少,部分嵴消

失或空泡化,肌丝松散,排列紊乱,Z线不清或消失(图 1B, Figure 1B)。TMZ 5 mg/kg 组和 TMZ 10 mg/kg 组线粒体损害较生理盐水组明显减轻(图 1CD, Figure 1CD)。

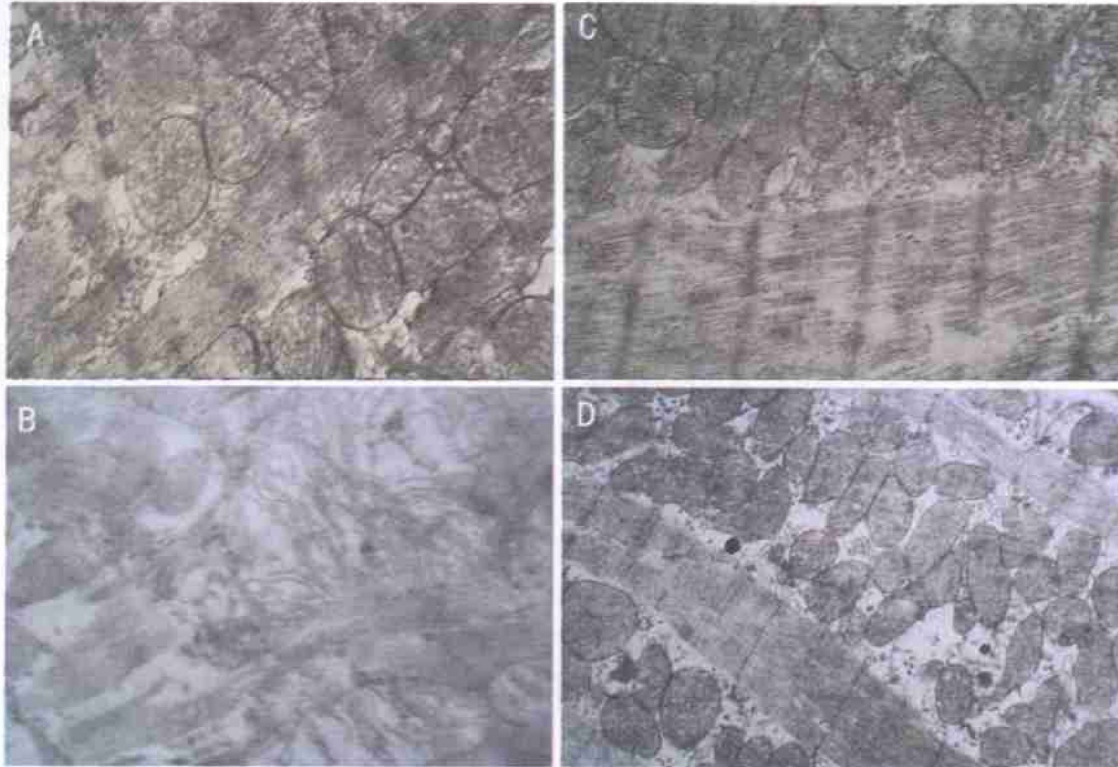


图 1. 电镜下心肌超微结构的改变( $\times 15\ 000$ ) A 为假手术组, B 为生理盐水组, C 为 TMZ 5 mg/kg 组, D 为 TMZ 10 mg/kg 组。

**Figure 1. The myocardium ultrastructure under electron microscope( $\times 15\ 000$ )** A: The pseudooperation group, mitochondria cristae were tight, membrane were intact, no swelling, structure was normal, and the myotome line up in order. B: The saline group, mitochondria swelling, cristae disappear or vacuoles, myofilament break and lysis. C and D: The TMZ treated groups(5 mg/kg and 10 mg/kg), slight swelling of mitochondria, cristae damaged slightly and the myotome line up in order.

### 3 讨论

在心脏,线粒体的主要功能是合成 ATP 并维持  $Ca^{2+}$  平衡,这两个过程有赖于线粒体膜内的电子转运所产生的  $H^+$  电化学梯度,在有氧的生理条件下,线粒体内  $Ca^{2+}$  浓度增加便能刺激三羧循环和 NADH 的氧化还原,产生 ATP<sup>[4]</sup>。而在心肌缺血缺氧条件下,有氧氧化受抑制,ATP 产生不足, $Na^+-K^+-ATP$  酶活性受抑制,细胞内  $Na^+$  增多,无氧酵解增强,乳酸堆积,造成  $H^+$  蓄积,细胞内酸中毒, $Na^+-H^+$  交换被激活,也使细胞内  $Na^+$  增多,进而激活  $Na^+-Ca^{2+}$  泵,造成钙超载,线粒体内  $Ca^{2+}$  聚积可引起膜通透性改变,导致线粒体肿胀,造成细胞不可逆的损伤。当再灌注时,大量氧供虽能使线粒体呼吸链功能有所恢复,但也可引起大量氧自由基产生和细胞内  $Ca^{2+}$  聚

积,钙超载可激活磷脂酶,进一步加重膜损伤。本实验观察到缺血再灌注损伤后,生理盐水组线粒体的  $Ca^{2+}$  水平显著高于假手术组,而曲美他嗪组  $Ca^{2+}$  水平显著低于生理盐水组,说明缺血再灌注可导致线粒体内钙聚积, TMZ 能减轻线粒体内钙聚积,其作用机制可能是 TMZ 能增强葡萄糖的有氧氧化,降低游离脂肪酸的氧化速率,抑制游离脂肪酸的  $\beta$  氧化,并使心肌对脂肪酸的利用降低,从而减少了  $H^+$  和乳酸堆积造成的细胞内酸中毒<sup>[5,6]</sup>,使  $Na^+-H^+$  交换减弱, $Na^+$  内流减少,进而降低钙离子超载,保护线粒体氧化功能,抑制  $Ca^{2+}$  引起的线粒体肿胀<sup>[6]</sup>。

线粒体是细胞产能的主要场所,如上所述,心肌缺血再灌注时,线粒体功能受损,产生大量的氧自由基,氧自由基造成的膜脂质过氧化损伤又使心肌和线粒体功能进一步受损,形成恶性循环。MDA 为脂

质过氧化代谢产物,测定MDA含量可反映机体内脂质过氧化损伤的程度,GSH是体内主要的抗氧化物质,能自行或经过GSH-Px催化还原过氧化氢和过氧化脂质,消除自由基造成的损害。SOD为超氧阴离子自由基清除酶,GSH-Px为过氧化氢清除酶,它们为氧自由基的主要清除酶,测定GSH含量及SOD、GSH-Px活性可间接反映机体抗氧化损伤和清除自由基的能力。文献[7]报道TMZ能加速线粒体氧化磷酸化,增加ATP的合成,减轻自由基造成的膜损伤<sup>[8]</sup>,在细胞水平提供心肌保护作用。本实验结果显示,缺血再灌注后,线粒体MDA含量较假手术组显著增高,GSH含量及SOD、GSH-Px活性明显降低,说明缺血再灌注时,线粒体脂质过氧化反应明显增强,而抗氧化损伤和清除自由基的能力明显下降,使用TMZ保护后线粒体MDA含量较生理盐水组显著降低,GSH含量及SOD、GSH-Px活性明显升高,说明TMZ不仅能减轻缺血再灌注心肌线粒体的脂质过氧化损伤,而且能通过提高线粒体内GSH含量及SOD、GSH-Px活性,增强其清除自由基的能力和抗氧化的

能力,但其确切的机制还有待于进一步的研究证实。

#### [参考文献]

- [1] Demaison L, Fantini E, Sentex E, Grynberg A, Athias P. Trimetazidine: In vitro influence on heart mitochondrial function. *Am J Cardiol*, 1995, **76**(6): 31B-37B
  - [2] De Leiris J, Boucher F. Rationale for trimetazidine administration in myocardial ischaemia reperfusion rabbits. *Eur heart J*, 1993, **14**suppl G: 34-40
  - [3] Kane KA, Parratt JR, Williams FM. An investigation into the characteristics of reperfusion induced arrhythmias in the anaesthetized rat and their susceptibility to antiarrhythmic agents. *Br J Pharmacol*, 1984, **82**: 349-357
  - [4] Clark C, Foreman ML, Kane KA, McDonald FM, Parratt JR. Coronary artery ligation in anesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size. *J Pharmacol Meth*, 1980, **3**(4): 357-368
  - [5] Aussedat J, Ray A, Kay L, Verdys M, Harpey C, Rossi A. Improvement of long-term preservation of isolated rat heart: beneficial effect of the antiischemic agent trimetazidine. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, **21**(6): 128-135
  - [6] Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res*, 1997, **33**(2): 243-257
  - [7] Rossi A, Lavanchy N, Martin J. Anti-ischaemic effects of trimetazidine: <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy study in the isolated rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1990, **4** suppl 4: 812-813
  - [8] 赵艳芳,秦永文,王学敏,缪明永. 曲美他嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用. *第二军医大学学报*, 2003, **24**(3): 324-326
- (此文编辑 朱雯霞)

## 《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》 (生物医药类)一览表(2003年度)

哈尔滨医科大学学报  
航天医学与医学工程  
河北医科大学学报  
湖南医科大学学报  
湖南中医学院学报  
护理管理杂志  
护理学杂志  
护理研究  
护士进修杂志  
华西口腔医学杂志  
华西药学杂志  
华西医学  
华中科技大学学报医学版  
化学与生物工程  
环境与健康杂志  
环境与职业医学  
基础医学与临床  
激光生物学报  
吉林大学学报医学版

疾病控制杂志  
寄生虫与医学昆虫学报  
江苏医药信息  
江西医学院学报  
解放军护理杂志  
解放军药学报  
解放军医学杂志  
解放军医院管理杂志  
解放军预防医学杂志  
解剖学报  
解剖学杂志  
介入放射学杂志  
颈腰痛杂志  
军事医学科学院院刊  
军医进修学院学报  
口腔颌面外科杂志  
口腔颌面修复学杂志  
口腔医学研究  
口腔医学仪器