

T 型钙通道拮抗剂对未成熟心肌缺血再灌注损伤的保护作用

唐浩¹, 周新民¹, 胡建国¹, 肖献忠², 胡野荣¹, 杨一峰¹, 彭昊¹, 李津¹, 喻杰锋¹

(中南大学 1. 湘雅二医院胸心外科, 湖南省长沙市 410011; 2. 湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; T 型钙通道阻断剂; Mibefradil; 缺血再灌注损伤; 未成熟心肌; 心肌保护; 兔

[摘要] 目的 探讨 T 型钙通道拮抗剂 Mibefradil 对未成熟心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法 2~3 周龄新西兰大白兔 32 只随机分为 4 组: ST 组为 St. Thomas 液停搏, SV 组为 St. Thomas 液中加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Verapamil, SM1 组为 St. Thomas 液中加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Mibefradil, SM2 组为 St. Thomas 液中加入 1 $\mu\text{mol/L}$ Mibefradil。建立 Langendorff 模型后, 分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 按上述心脏停搏液停搏, 维持局部心肌温度在 15 $^{\circ}\text{C}$, 停止灌注 90 min, 再灌注 45 min。观测各组停搏前、再灌注后冠状动脉流量、冠状动脉流出液乳酸脱氢酶浓度、心功能(左心室发展压、左心室内压最大上升/下降速率)恢复率、心肌丙二醛含量和心肌钙离子含量等指标。结果 各组冠状动脉流量没有明显差异。心功能恢复发现再灌注后 45 min 时, SV 组的左心室发展压、左心室内压最大上升/下降速率恢复率分别为: 0.70 ± 0.23 、 0.72 ± 0.23 和 0.67 ± 0.25 , 明显低于其余各组 ($P < 0.05$), 其余各组之间没有明显差异。SV 组乳酸脱氢酶浓度 (12.2 ± 2.7 IU/L) 明显高于其他各组 ($P < 0.05$), 同时 ST 组 (9.3 ± 3.2 IU/L) 也明显高于 SM2 组 (6.6 ± 2.2 IU/L), $P < 0.05$ 。心肌丙二醛含量 ST 组 (1.64 ± 0.39 $\mu\text{mol/g}$) 和 SV 组 (1.76 ± 0.51 $\mu\text{mol/g}$) 明显高于 SM2 组 (1.14 ± 0.24 $\mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$)。SV 组心肌钙离子含量 (0.225 ± 0.041 mg/g) 明显高于其他各组 ($P < 0.05$)。同时 ST 组 (0.184 ± 0.021 mg/g) 也明显高于 SM2 组 (0.147 ± 0.020 mg/g, $P < 0.05$)。结论 Mibefradil 对未成熟心肌缺血再灌注损伤有保护作用, Verapamil 损害未成熟心肌。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Myocardial Protection of T Type Calcium Channel Blocker Against Ischemia-Reperfusion Injury in Immature Rabbit Heart

TANG Hao¹, ZHOU XinMin¹, HU JianGuo¹, XIAO XianZhong², HU YeRong¹, YANG YiFeng¹, PENG Hao¹, LI Jin¹, and YU JieFeng¹

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011; 2. Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] T Type Calcium Channel Blocker; Ischemia-Reperfusion Injury; Immature Myocardium; Myocardial Protection; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** This study was designed to identify the T-type calcium channel blocker Mibefradil as a cardioprotective agent in terms of its efficacy in immature cardioprotection. **Methods** By a Langendorff model, 32 hearts of 14- to 21-day-old New Zealand rabbits underwent 90 min of global hypothermic (15 $^{\circ}\text{C}$) ischemia protected with a different single dose of hypothermic (4 $^{\circ}\text{C}$) cardioplegia (group ST: St. Thomas solution; group SV: St. Thomas solution combined with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Verapamil; group SM1: St. Thomas solution combined with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Mibefradil; group SM2: St. Thomas solution combined with 1 $\mu\text{mol/L}$ Mibefradil). The coronary flux, percent recovery of the cardiac function, LDH release, myocardium MDA, and myocardium ionized calcium were compared. **Results** There are no significant difference in coronary flux between the groups. Verapamil provided significantly the worst postreperfusion percentage recovery of the cardiac function (developed pressure: 0.70 ± 0.23 , dp/dt: 0.72 ± 0.23 , and - dp/dt: 0.67 ± 0.25) than the other groups ($P < 0.05$). There are no significant difference in the cardiac function between others groups. The higher concentration Mibefradil (1 $\mu\text{mol/L}$) showed a significant reduction of LDH release (6.6 ± 2.2 IU/L vs 9.3 ± 3.2 IU/L) in the coronary flow, and lower myocardium MDA (1.14 ± 0.24 $\mu\text{mol/g}$ vs 1.64 ± 0.39 $\mu\text{mol/g}$) and ionized calcium (0.147 ± 0.020 mg/g vs 0.184 ± 0.021 mg/g) than group ST ($P < 0.05$). Verapamil showed a highest LDH release (12.2 ± 2.7 IU/L) in the coronary flow and myocardium ionized calcium (0.225 ± 0.041 mg/g) ($P < 0.05$). **Conclusion** St. Thomas solution combined with Mibefradil provided better protection during ischemia-reperfusion in the immature rabbit heart than St. Thomas' solution, whereas St. Thomas' solution combined with Verapamil showed the worst protective effects in immature hearts.

[收稿日期] 2005-05-09

[修回日期] 2005-07-10

[作者简介] 唐浩, 博士, 主治医师, 主要研究方向为冠心病外科治疗和大血管外科治疗, 联系电话为 0731-5295502, E-mail 为 sanyanliangyu@tom.com。周新民, 硕士, 教授, 主要研究方向为围手术期心肺保护及心脏瓣膜外科。胡建国, 硕士, 教授, 博士研究生导师。

未成熟心肌有着与成熟心肌不同的结构和生理特点,对缺血再灌注损伤的反应也有其独特之处,如冷挛缩现象等^[1]。如何有效减少未成熟心肌缺血再灌注损伤一直是小儿心脏外科的研究重点之一。缺血再灌注损伤的一个核心机制是钙离子超负荷。钙离子转运机制的不同包括肌浆网发育、 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白表达等是未成熟心肌与成熟心肌的主要区别之一。最近研究表明,在人、鼠等胚胎期和新生心肌中T型钙离子通道的表达明显高于L型钙离子通道的表达^[2,3]。随着心肌成熟,T型钙离子通道和L型钙离子通道的表达比例发生逆转,在成熟心肌中以L型钙离子通道表达为主,而T型钙离子通道的表达罕见。本文将特异性T型钙通道拮抗剂Mibefradil^[4]加入心脏停搏液中,观察其对未成熟心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

取2~3周龄新西兰大白兔32只,雌雄不拘,平均体重 183 ± 27 g。根据不同停搏液组分实验分为4组,每组8只。ST组为St. Thomas停搏液;SV组为St. Thomas液中加入 $0.1 \mu\text{mol/L}$ Verapamil; SM1组为St. Thomas液中加入 $0.1 \mu\text{mol/L}$ Mibefradil; SM2组为St. Thomas液中加入 $1 \mu\text{mol/L}$ Mibefradil。其中Mibefradil和Verapamil均为Sigma公司产品。

1.2 心肌缺血再灌注模型的建立

断颈处死后开胸取心迅速在Radnoti离体心脏灌流装置(美国)上建立Langendorff模型,工作液为 37°C 、 $95\% \text{O}_2$: $5\% \text{CO}_2$ Krebs-Henseleit液,主动脉逆灌注静水压 70 mm Hg 。经左心房置入左室内充水球囊,连接压力传感器,接Buxco生理记录分析系统,调节左心室舒张末期压力为 10 mm Hg 左右,平衡 30 min 。单次 4°C 上述4种不同成分的心脏停搏液停搏,维持局部心肌温度在 15°C ,停止灌注 90

min, 37°C $95\% \text{O}_2$: $5\% \text{CO}_2$ Krebs-Henseleit液再灌注 45 min 。

1.3 心功能指标的检测

分别于停灌注前、再灌注后 20 min 和 45 min ,使用Buxco生理记录分析系统(美国)记录并分析左心室收缩末压(left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)以及最大压力变化速率($\pm \text{dp/dt}$)。计算左心室发展压(developed pressure, DP, 为LVESP与LVEDP之差)以及 $\pm \text{dp/dt}$ 、DP恢复率。其中恢复率为再灌注后各项指标与基础值之比 $\times 100\%$ 。

1.4 其它指标的检测

分别于停灌注前、再灌注后不同时段测量冠状动脉流量(coronary flux, CF)。

分别于停灌注前、再灌注后 45 min 使用日立7170A自动生物化学分析仪测定冠状动脉流出液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)浓度(IU/L)。

于再灌注 45 min 取心肌标本一部分,经消化加热烘烤,冷却和去离子水处理后,以岛津A680原子吸收分光光度计(日本)测定钙离子含量(mg/g 组织干重)。

于再灌注 45 min 取心肌标本一部分,经组织匀浆后使用丙二醛测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定心肌组织丙二醛含量($\mu\text{mol/g}$ 蛋白质)。

1.5 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS11.5统计软件包对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 兔体重、冠状动脉流量、心功能、心肌酶学各组基础值的比较

停灌注前幼兔体重、冠状动脉流量、心功能、心肌酶学等检测结果见表1(Table 1)。可见上述各项指标各组间无统计学差异($P > 0.05$)。

表1. 缺血前各组基础值比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1. Baseline data of each group before ischemia

分 组	体重(g)	CF(mL/min)	LDH (IU/L)	DP(mm Hg)	+ dp/dt(mmHg/s)	- dp/dt(mmHg/s)
ST 组	185 ± 26	5.6 ± 1.8	5.4 ± 1.0	72.3 ± 14.4	1087 ± 214	-1355 ± 642
SV 组	186 ± 31	7.1 ± 2.3	7.5 ± 3.1	71.8 ± 24.9	1268 ± 350	-1139 ± 264
SM1 组	179 ± 24	5.6 ± 1.4	5.7 ± 1.8	74.5 ± 13.4	1091 ± 240	-970 ± 241
SM2 组	181 ± 27	5.8 ± 2.9	6.7 ± 2.7	72.5 ± 15.6	1274 ± 360	-1151 ± 287

2.2 不同时段冠状动脉流量的比较

灌注前后冠状动脉流量见表 2(Table 2)。可见在整个缺血再灌注过程中, 各组冠状动脉流量的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 缺血再灌注后心功能恢复

缺血再灌注过程中测得的心功能各项指标见表 3(Table 3)。

2.4 再灌注 45 min 冠状动脉流出液及心肌其它指标的比较

再灌注 45 min 冠状动脉流出液 LDH 含量、心肌

丙二醛含量和心肌钙离子含量见表 4(Table 4)。

表 2. 各组缺血再灌注不同时段冠状动脉流量的比较(mL/min , $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	5 min	10 min	20 min	45 min
ST 组	8.8 ± 3.0	6.5 ± 2.2	5.6 ± 1.8	5.4 ± 1.8
SV 组	9.2 ± 2.3	7.2 ± 2.9	5.3 ± 2.3	5.2 ± 2.7
SM1 组	7.4 ± 1.3	6.0 ± 1.3	5.2 ± 1.0	5.1 ± 1.2
SM2 组	8.7 ± 3.3	7.2 ± 3.0	5.6 ± 1.8	6.0 ± 2.4

表 3. 缺血再灌注 20 min 和 45 min 后心功能恢复($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 3. Postischemic Recovery of Hemodynamic Parameters at 20 min and 45 min after reperfusion

分 组	DP		+ dp/dt		- dp/dt	
	20 min	45 min	20 min	45 min	20 min	45 min
ST 组	1.00 ± 0.27	1.00 ± 0.25 ^b	1.05 ± 0.28	1.12 ± 0.27 ^b	0.95 ± 0.32	1.02 ± 0.23 ^b
SV 组	0.79 ± 0.56	0.70 ± 0.23	0.70 ± 0.41	0.72 ± 0.23	0.70 ± 0.35	0.67 ± 0.25
SM1 组	1.16 ± 0.26	1.07 ± 0.15 ^b	1.19 ± 0.34 ^a	1.10 ± 0.24 ^b	1.16 ± 0.28 ^b	1.03 ± 0.17 ^b
SM2 组	1.03 ± 0.18	1.07 ± 0.15 ^b	0.99 ± 0.11	1.00 ± 0.27 ^b	0.99 ± 0.14 ^a	0.96 ± 0.27 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 SV 组比较。

表 4. 再灌注 45 min 乳酸脱氢酶(IU/L)、丙二醛($\mu\text{mol/g}$)和 Ca^{2+} (mg/g) 测定结果($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4. Date of LDH(IU/L), MDA($\mu\text{mol/g}$), Ca^{2+} (mg/g) at 45 min after reperfusion

分 组	LDH	丙二醛	Ca^{2+}
ST 组	9.3 ± 3.2 ^a	1.64 ± 0.39	0.184 ± 0.021 ^a
SV 组	12.2 ± 2.7	1.76 ± 0.51	0.225 ± 0.041
SM1 组	7.3 ± 2.3 ^a	1.32 ± 0.67	0.159 ± 0.34 ^a
SM2 组	6.6 ± 2.2 ^{ac}	1.14 ± 0.24 ^{ac}	0.147 ± 0.020 ^{ac}

a: $P < 0.05$, 与 SV 组比较; c: $P < 0.05$, 与 ST 组比较。

3 讨论

T 型钙离子通道于 1985 年首次在豚鼠中发现^[5]。与 L 型钙离子通道相比, T 型钙通道激活、失活及到达峰值电流所需的膜电位较 L 型更低。T 型钙通道可被选择性 T 型钙通道阻断剂米贝地尔(mibefradil)等阻断, 也可被 Ni^{2+} 阻断, 而对能阻滞 L 型钙通道的有机和无机化合物则相对不敏感^[6]。另外, L 型钙离子通道与 T 型钙离子通道对缺血的敏感性也不尽相同, L 型对缺氧更敏感^[7]。在缺血损害初期, T 型钙通道仍发挥作用, 而 L 型钙通道已失活。提示就缺血保护而言, T 型钙离子通道拮抗剂可能比 L 型钙离子通道拮抗剂更有效。

在成熟心肌中 T 型钙通道与心脏起搏相关^[8]。

研究表明, T 型钙电流在新生大鼠中有表达, 但在成年大鼠心室肌细胞不存在^[2]。除豚鼠以外, T 型钙电流在成熟哺乳动物心肌细胞中罕见^[6]。这一点提示 T 型钙离子通道表达的改变可能是心肌成熟的标志之一, 在心脏发育学上具有重要意义。另外, 当压力超负荷引起心肌肥厚或心肌损伤后心肌细胞发生重构时, 均有大量的 T 型钙离子通道基因的表达并导致 T 型钙电流的重新出现^[9, 10], 提示 T 型钙离子通道与成熟心肌重构密切相关。

本研究发现, 与 Verapamil 相比, 两种浓度的 Mibefradil 均明显提高幼兔心肌缺血再灌注后的心功能。再灌注 45 min 时, DP 和 $\pm \text{dp/dt}$ 均有明显差异。与此对应的是 Mibefradil 较 Verapamil 明显减少了心肌缺血再灌注后 LDH 的释放和 MDA 的产生。说明在维持幼兔心功能和减轻幼兔心肌缺血再灌注损伤方面, Mibefradil 明显优于 Verapamil。Mibefradil 缺血再灌注后心肌钙离子含量明显降低说明, 减少心肌钙离子超负荷是 Mibefradil 有效保护缺血再灌注心肌的重要机制。同时各时段的冠状动脉流量没有明显差异, 提示 Mibefradil 的心肌保护作用可能与冠状动脉血管内皮保护关系不大, 这有待进一步证实。

与单纯应用 St. Thomas 停搏液相比, 两种浓度 Mibefradil 心功能各项指标没有明显差异。然而, 较高浓度 Mibefradil (1 $\mu\text{mol/L}$) 却明显减少了心肌缺血

再灌注后 LDH 的释放和 MDA 的产生。1 $\mu\text{mol/L}$ Mibefradil 组的心肌钙离子浓度也明显低于单纯 St. Thomas 液组。说明加用 Mibefradil 能通过减少缺血再灌注后钙离子内流而达到保护幼兔心肌的作用。心功能上的无差异可能与本研究采取了低温停搏液保护下缺血有关,虽然有酶学改变,但器官整体功能没有明显变化。在今后的实验中拟延长缺血时间进一步研究。

大量研究表明,未成熟心肌的兴奋-收缩耦联对细胞外钙离子浓度依赖很大,高浓度钙离子拮抗剂对未成熟心肌有更明显的抑制作用^[11]。在我们的研究中,两种浓度的 Mibefradil 在各检测指标上未发现明显差异。只是在缺血再灌注 20 min 时,0.1 $\mu\text{mol/L}$ Mibefradil 组的 +dp/dt 恢复率明显高于 Verapamil 组,而 1 $\mu\text{mol/L}$ Mibefradil 组与 Verapamil 组没有差异。有关 Mibefradil 对未成熟心肌缺血再灌注损伤保护的浓度问题值得继续深入探讨。

Verapamil 虽然在成熟心肌缺血再灌注中具有明确保护效果^[12,13],然而本研究发现了相反的结果:Verapamil 组在心功能恢复上明显差于其他各组;冠状动脉流出液 LDH 浓度、心肌 MDA 浓度也明显较其他组高,表明 Verapamil 加重了缺血再灌注后未成熟心肌的心肌损害。Verapamil 组心肌钙离子浓度也是均明显高于其他各组,提示 Verapamil 不仅没有减少未成熟心肌缺血再灌注后钙离子内流,反而增加了钙离子内流,从而加重心肌损伤。有研究表明其他种类 L 型钙离子通道拮抗剂硝苯吡啶^[14]、尼卡地平^[15]等对缺血再灌注的未成熟心肌具有保护作用,分析原因可能是硝苯吡啶、尼卡地平主要作用于血管,而对心脏的作用相对很弱,其心肌保护作用机制在于冠状动脉扩张和血管内皮保护。而同样具有较强心脏作用的 L 型钙离子拮抗剂地尔硫卓^[14]也有损伤未成熟心肌的作用,其具体机制仍然不清楚。

未成熟心肌与成熟心肌在结构、功能、代谢等方面的区别,决定了未成熟心肌的保护方法也与成

熟心肌有着巨大的差别。本研究首次使用特异性 T 型钙离子拮抗剂 Mibefradil 对未成熟心肌缺血再灌注损伤进行保护,并证实了 Mibefradil 保护未成熟心肌,以及 Verapamil 损害未成熟心肌,为未成熟心肌保护实验及临床研究提供了新的方法和思路。

[参考文献]

- [1] 万里飞,苏肇元. 未成熟心肌与冷挛缩. 国外医学·心血管疾病分册, 1997, **24** (5): 8-11
- [2] Ferron L, Capuano V, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF. Functional and molecular characterization of a T-type Ca^{2+} channel during fetal and postnatal rat heart development. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (5): 533-546
- [3] Qu Y, Boutjdir M. Gene expression of SERCA2a and L- and T-type Ca^{2+} channels during human heart development. *Pediatr Res*, 2001, **50** (5): 569-574
- [4] Triggle DJ. Cardiovascular T-type calcium channels: physiological and pharmacological significance. *J Hypertens Suppl*, 1997, **15** (5): S9-15
- [5] Hagiwara N, Irisawa H, Kaneyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol (Lond)*, 1988, **395** (1): 233-253
- [6] Heubach JF, Kehler A, Wettwer E, Ravens U. T-type and tetrodotoxin-sensitive Ca^{2+} currents coexist in guinea pig ventricular myocytes and are both blocked by mibefradil. *Circ Res*, 2000, **86** (2): 628-635
- [7] Francor Obregón, Alfredo, Jose Lopez Barneo. Low PO_2 inhibits calcium channel activity in arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1996, **271**: H2 290-299
- [8] Lipsius SL, Huser J, Blatter LA. Intracellular Ca^{2+} release sparks atrial pacemaker activity. *Neurophysiol Sci*, 2001, **16**: 101-106
- [9] Izumi T, Kihara Y, Sarai N, Yoneda T, Yoneda T, Iwanaga Y, Inagaki K, et al. Reinduction of T-type calcium channels by endothelin-1 in failing hearts in vivo and in adult rat ventricular myocytes in vitro. *Circulation*, 2003, **108** (20): 2 530-535
- [10] Clozel JP, Ertel EA, Ertel SL. Voltage-gated T-type Ca^{2+} channels and heart failure. *Proc Assoc Am Physic*, 1999, **111** (5): 429-437
- [11] Kolar F, Ostádal B, Papoušek F. Effect of verapamil on contractile function of the isolated perfused rat heart during postnatal ontogeny. *Basic Res Cardiol*, 1990, **85** (5): 429-434
- [12] Chouairi S, Carrie D, Puel J. Myocardial protection with calcium channel blockers during ischaemia and reperfusion by PTCA. *Eur Heart J*, 1995, **16** (Suppl): 3-8
- [13] Massoudy P, Becker BF, Seligmann C, Gerlach E. Preischemic as well as postischemic application of a calcium antagonist affords cardioprotection in the isolated guinea pig heart. *Cardiovasc Res*, 1995, **29** (4): 577-582
- [14] Orita H, Fukasawa M, Hirooka S, Uchino H, Fukui K, Kohi M, et al. In vitro evaluation of nicorandil, diltiazem, and prostaglandin E1 on hypothermic injury to immature myocytes. *J Surg Res*, 1995, **58** (3): 313-320
- [15] 张晓彤,左景珍,于昂,张志尧. 钙通道阻滞剂对未成熟心肌的保护作用. 中国胸心血管外科杂志, 2002, **18** (5): 306-308

(此文编辑 胡必利,朱雯霞)