

[文章编号] 1007-3949(2006)14-05-0391-04

• 实验研究 •

心肌梗死后心肌组织一氧化氮、一氧化氮合酶和总抗氧化能力的变化及不同剂量消心痛的影响

张勇¹, 夏勇², 李东野², 林利², 徐瑞金², 于浩², 丁汝跃², 杨煜², 陈清枝²

(1. 徐州市第三人民医院心内科, 江苏省徐州市 221002; 2. 徐州医学院附属医院心内科, 江苏省徐州市 221002)

[关键词] 内科学; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 总抗氧化能力; 心肌梗死; 消心痛; 兔

[摘要] 目的 研究心肌梗死后心肌组织一氧化氮浓度、各型一氧化氮合酶活性、总抗氧化能力变化的意义及不同剂量消心痛的影响, 探讨相互影响因素。方法 新西兰兔 32 只, 随机分为四组: 假手术组、心肌梗死组、低剂量消心痛组 (1.5 mg/kg·d)、高剂量消心痛组 (4.0 mg/kg·d), 皆每日灌胃 3 次。6 周后取梗死灶边缘缺血心肌制作组织匀浆进行一氧化氮浓度、各型一氧化氮合酶活性、总抗氧化能力测定, 并作病理观察。结果 心肌梗死组、高剂量消心痛组心肌组织匀浆中一氧化氮浓度高于假手术组及低剂量消心痛组 (分别为 $0.980 \pm 0.180 \mu\text{mol/g}$, $1.112 \pm 0.210 \mu\text{mol/g}$, $0.497 \pm 0.129 \mu\text{mol/g}$, $0.637 \pm 0.126 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$ 或 0.01); 诱导型一氧化氮合酶活性较假手术组、低剂量消心痛组显著升高 (分别为 $1519 \pm 175 \text{ u/g}$, $1659 \pm 175 \text{ u/g}$, $565 \pm 112 \text{ u/g}$, $852 \pm 106 \text{ u/g}$, $P < 0.01$); 而总抗氧化能力水平低于假手术组、低剂量消心痛组 (分别为 $856 \pm 183 \text{ u/g}$, $901 \pm 174 \text{ u/g}$, $1654 \pm 207 \text{ u/g}$, $1467 \pm 302 \text{ u/g}$, $P < 0.05$); 结构型一氧化氮合酶活性亦低于上述两组 (分别为 $1034 \pm 301 \text{ u/g}$, $903 \pm 274 \text{ u/g}$, $1615 \pm 227 \text{ u/g}$, $1436 \pm 210 \text{ u/g}$, $P < 0.05$)。低剂量消心痛组心肌病理改变较高剂量消心痛组及心肌梗死组轻。结论 高浓度一氧化氮降低心肌梗死后心肌细胞抗氧化损伤能力并损害心肌细胞, 而低浓度一氧化氮显示出更好的保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Nitric Oxide, Nitric Oxide Synthase, Total Antioxidative Capability on Cardiac Myocyte After Myocardial Infarction and the Influence of Isosorbide Dinitrate in Different Dose

ZHANG Yong¹, XIA Yong², LI Dong-Ye², LIN Li², XU Rui-Jin², YU Hao², DING Ru-Yue², YANG Yu², and CHEN Qing-Zhi²

(1. Department of Cardiology, the Third Hospital of Xuzhou, Xuzhou 221002; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

[KEY WORDS] Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Total Antioxidative Capability; Myocardial Infarction; Isosorbide Dinitrate; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of nitric oxide (NO) in different concentration, nitric oxide synthase (NOS) activity and total antioxidative capability (T-AOC) in cardiac tissue, and the influence of isosorbide dinitrate (ISDN) in different dose after myocardial infarction (MI). **Methods** 32 New Zealand rabbits were randomly divided into four groups: sham-operated group, MI group, low dose of ISDN group (LISDN, 1.5 mg/kg·d), high dose of ISDN group (HISDN, 4.0 mg/kg·d), with the drugs gastric gavage three times everyday for six weeks. The NO concentration, all isoforms of NOS activity and T-AOC of cardiac tissue homogenate, adjacent to the infarcted area, were detected. The pathological changes were observed by microscope and electron microscope. **Results** The NO concentrations of MI group and HISDN group were higher than those of sham-operated group and LISDN group ($0.980 \pm 0.180 \mu\text{mol/g}$, $1.112 \pm 0.210 \mu\text{mol/g}$, $0.497 \pm 0.129 \mu\text{mol/g}$, $0.637 \pm 0.126 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$ or 0.01). The inducible NOS (iNOS) activity in myocardial tissue of MI group and HISDN group was higher than that of sham-operated group and LISDN group ($1519 \pm 175 \text{ u/g}$, $1659 \pm 175 \text{ u/g}$, $565 \pm 112 \text{ u/g}$, $852 \pm 106 \text{ u/g}$, $P < 0.01$), while T-AOC was lower ($856 \pm 183 \text{ u/g}$, $901 \pm 174 \text{ u/g}$, $1654 \pm 207 \text{ u/g}$, $1467 \pm 302 \text{ u/g}$, $P < 0.05$). And constitutive NOS (cNOS) activity in myocardial tissue of MI group and HISDN group was lower than that of sham-operated group and LISDN group ($1034 \pm 301 \text{ u/g}$, $903 \pm 274 \text{ u/g}$, $1615 \pm 227 \text{ u/g}$, $1436 \pm 210 \text{ u/g}$, $P < 0.05$). The injured pathological changes were light in sham-operated group and LISDN group. **Conclusion** High concentration of NO decreased the antioxidative capability of cardiomyocyte and led to injury after MI while low concentration of NO showed beneficial effects.

[收稿日期] 2005-10-31 [修回日期] 2006-05-12

[基金项目] 江苏省社会发展基金资助 (BS2002009)

[作者简介] 张勇, 硕士, 主治医师, 从事心内科临床及科研。通讯作者夏勇, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病介入治疗。李东野, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管超声与生物化学、分子生物学。

一氧化氮(nitric oxide, NO)在生理性自稳态过程中发挥重要作用,是影响细胞生存的关键因素之一。有研究显示^[1],氧化应激是NO形成细胞损害、介导细胞凋亡、导致心肌细胞不断丧失的主要原因,参与了心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心力衰竭的基本病理生理进程。本研究通过结扎家兔冠状动脉建立MI动物模型,在提供外源性NO供体情况下,比较各组实验动物心肌组织中NO浓度、各型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性、总抗氧化能力(total antioxidative capability, T-AOC)的变化,观察不同剂量消心痛(isosorbide dinitrate, ISDN)的影响,并探讨相互影响因素。

1 材料与方法

1.1 实验分组及动物模型制备

健康新西兰兔32只,4~6月龄,雌雄不拘。体重2.25~3.00 kg。随机分为四组,每组8只。假手术组:左室支远端穿过缝线后不结扎。心肌梗死组:结扎冠状动脉左室支远端,观察供血区域心肌组织苍白,运动减弱,心电图相关导联ST段抬高持续20 min以上。低剂量消心痛组:同心肌梗死组,喂饲消心痛6周(1.5 mg/kg·d)。高剂量消心痛组:同心肌梗死组,喂饲消心痛6周(4.0 mg/kg·d)。药品研碎后按5 mL/kg加水,每日灌胃3次,共6周。

1.2 标本取材及取样

于术后6周再次开胸取出心脏置于冰块上,生理盐水冲洗,剪除右心室及室间隔,剪除发白变薄梗死组织,沿梗死灶边缘3 mm范围内剪取约0.1 g缺血区心肌数块。假手术组于左室外侧壁近心尖处留取标本。随机选取两块标本滤纸吸干称重后置入液氮中冻存,按重量体积比加9倍生理盐水用电动匀浆器高速匀浆10次(以上操作均在冰浴中进行),1 000~1 500 r/min离心10 min,取上清待测。每组选取两块心肌切成1 mm×1 mm×2 mm肌块数块浸入3%戊二醛固定液备行电镜检测,另留取标本放入10%甲醛液中以备制作病理切片。

表1. 各组心肌组织匀浆中生化指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	NO (μmol/g)	T-AOC (u/g)	eNOS (u/g)	iNOS (u/g)
假手术组	0.497±0.129	1 654±207	1 615±227	565±112
心肌梗死组	0.980±0.180 ^{bc}	856±183 ^{ac}	1 034±301 ^{ac}	1 519±175 ^{bd}
低剂量消心痛组	0.637±0.126	1 467±302	1 436±210	852±106
高剂量消心痛组	1.112±0.210 ^{bd}	901±174 ^{ac}	903±274 ^{ac}	1 659±175 ^{bd}

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$,与假手术组比较; c为 $P < 0.05$, d为 $P < 0.01$,与低剂量消心痛组比较。

1.3 生化指标的检测

用硝酸还原酶法检测心肌匀浆的 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量间接反映组织中NO水平。比色法测定T-AOC及各型NOS,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,按说明书步骤进行操作并计算。

1.4 电镜标本处理

取样品组织置入3%戊二醛内预固定,0.1 mmol/L磷酸盐缓冲液冲洗,10 g/L四氧化锇后固定,双蒸水冲洗,逐级丙酮脱水,环氧树脂618包埋,半薄切片,光镜观察定位,超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染,H-600型透射电镜观察。

1.5 统计分析

采用SPSS11.5软件分析系统,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),相关关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 病理检查结果

HE染色光镜下假手术组标本及梗死灶远端各组心肌及细胞排列有序,横纹清晰,未见异常病理改变;低剂量消心痛组心肌组织见有少量炎性细胞浸润,部分见有心肌纤维化;心肌梗死组心肌间质水肿、充血,较多炎性细胞浸润及心肌纤维化,胞质空泡样变;高剂量消心痛组心肌镜下改变与心肌梗死组相似(图1)。电镜检查发现假手术组心肌形态结构正常;心肌梗死组心肌肌原纤维间隙明显增宽,排列紊乱,部分挛缩,可见局灶性肌丝溶解,肌浆网明显扩张;高剂量消心痛组可见与心肌梗死组相似变化,线粒体较密集;低剂量消心痛组心肌超微结构较心肌梗死组轻(图2)。

2.2 生化指标检测结果

心肌梗死组、高剂量消心痛组心肌组织匀浆中NO浓度、诱导型NOS(inducible NOS, iNOS)含量较假手术组、低剂量消心痛组显著升高($P < 0.05$ 或 0.01);而T-AOC水平、结构型NOS(constitutive NOS, cNOS)含量低于上述两组($P < 0.05$,表1)。

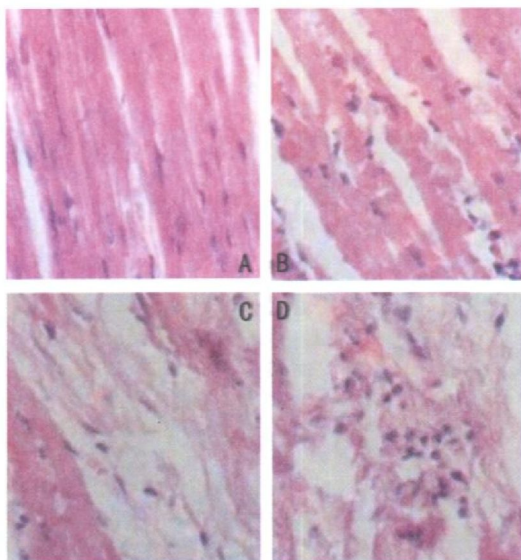


图 1. 各组 HE 染色结果(×400 倍) A 为假手术组, B 为低剂量消心痛组, C 为心肌梗死组, D 为高剂量消心痛组。

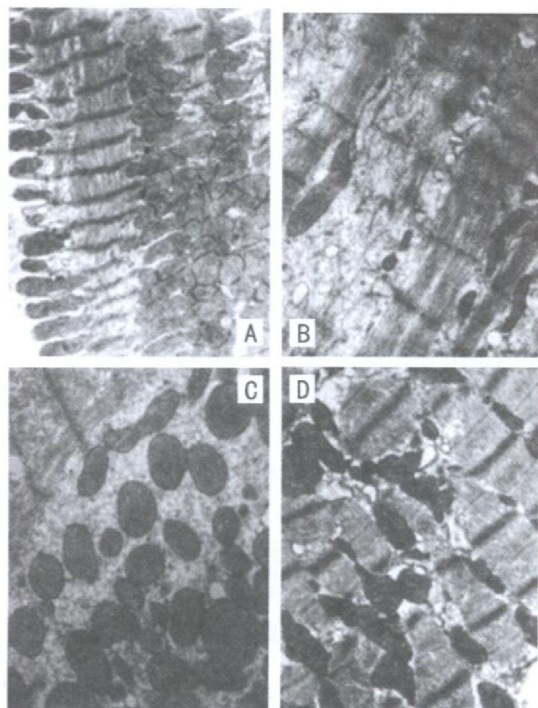


图 2. 各组电镜检查结果 A 为假手术组(×6000 倍), B 为心肌梗死组(×10000 倍), C 为高剂量消心痛组(×12000 倍), D 为低剂量消心痛组(×10000 倍)。

2.3 相关关系分析

相关分析发现 T-AOC 水平与心肌组织 NO 浓度呈显著负相关($r = -0.780, P < 0.01, n = 32$)。

3 讨论

影响高剂量消心痛组中 NO 浓度的因素有两

个:一是消心痛的剂量;另为 iNOS 的高表达。在基因水平 NOS 分为三种形式:神经型 NOS(neuronal NOS, nNOS)、内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)和 iNOS, nNOS 与 eNOS 属 cNOS, 三种形式在心脏皆有表达。cNOS 为钙依赖型,而 iNOS 不依赖钙。cNOS 主要由血管内皮细胞产生, iNOS 主要产生于巨噬细胞中^[2,3]。本文结果发现,高剂量消心痛组心肌组织匀浆中 cNOS 活性较假手术组及低剂量消心痛组降低,而 iNOS 活性增强,分析原因为急性心肌梗死后引发的炎症、缺氧等刺激因素可使 iNOS 大量表达,使心肌细胞暴露在高浓度 NO 环境下。NO 反应活泼,可与 O_2^- 形成过氧化亚硝酸阴离子($ONOO^-$),且使活性氧中间物(reactive oxygen intermediates, ROI)如 OH^- 、 $\cdot OH$ 、 NO_2 、 NO_2^- 产生更多,易与细胞膜上的多不饱和脂肪酸及胆固醇反应产生氧化脂质,也能使铁蛋白释放铁增强氧化应激; $ONOO^-$ 氧化损害蛋白质、脂类和核酸,也能氧化巯基,能使超氧化物歧化酶的酪氨酸残基硝基化,形成亚硝基酪氨酸诱导细胞凋亡,并破坏线粒体去极化和肿胀,释放内容物,通过半胱天冬酶途径诱导细胞凋亡^[4,5]。国内杨长春等^[6]亦观察到 NO 诱导血管平滑肌细胞凋亡。本实验结果发现, T-AOC 水平与心肌组织 NO 浓度呈显著负相关,高浓度 NO 可能由于其直接的细胞过氧化损伤心肌细胞致 cNOS 活性降低, T-AOC 水平下降。

硝酸酯类药物释放 NO 可替代内源性 L-精氨酸/NO 途径,以补充内源性 NO 的不足,这是该药物防治某些心血管疾病的理论基础。低剂量消心痛释放 NO 可替代内源性 L-精氨酸/NO 途径,以补充内源性 NO 的不足,扩张冠状动脉血管,扩张体循环动、静脉,减轻心脏前、后负荷,扩张侧枝血管增加缺血区血流,改善心内膜下心肌缺血,从而保护血管内皮、心肌细胞正常表达分泌 cNOS。至于 iNOS 活性表达较低,心肌细胞 T-AOC 水平升高,可能与其炎症反应较轻、巨噬细胞较少浸润有关,这与本组病理观察相一致,其机制尚需进一步研究。

不同 NOS 分泌 NO 发挥不同作用,推测可能与其作用方式有关。心肌细胞、巨噬细胞等的 iNOS 催化分泌 NO 立即与氧反应生成氧自由基,并且 NO 亦可直接作用于心肌细胞,这可以理解为是一种自分泌方式,对心肌组织具有毒性作用;而 cNOS 催化分泌 NO 弥散进入周围心肌、血管平滑肌细胞、粒细胞和血小板,是一种旁分泌方式,对心肌具有保护作用。NO 和 NOS 对缺血损伤心肌的最终作用取决于这种旁分泌方式和自分泌方式的综合结果。提高

eNOS 的活性、增加旁分泌方式的 NO 对心肌可能具有保护作用。

硝酸酯类药物已长期应用于临床,如何将此类药物控制在最合适剂量发挥其保护作用而不至于引起组织氧化损伤诱导凋亡仍是一重要课题。临床应用半衰期长硝酸酯类药物,开发新型特异性 iNOS 抑制剂可能对 MI 后心肌发挥更有益作用。黄忠耀等^[7]发现心肌 NOS 同工酶活性及 NO 产生的失常是心肌再灌注损伤的重要机制之一,卡托普利可通过调节心肌 NOS 同工酶活性,维持正常的 NO 水平,起到保护心肌作用。

本实验模型与临床仍有一定差距,缺少粥样硬化及内皮功能损害的病理生理过程。实验结果有待更多实验观察进行验证。

[参考文献]

- [1] Andreka P, Tran T, Webster KA, Bishopric NH. Nitric oxide and promotion of cardiac myocyte apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, **263** (1-2): 35-53
- [2] Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle autocrine and paracrine influences [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 1 846-858
- [3] Marcella M, Hallenmeesch, Janssen Ben JA, de Jonge WJ, Soeters PB, Lamers WH, et al. NO production by eNOS and iNOS reflects blood pressure changes in LPS-challenged mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, **285** (4): 871-875
- [4] 罗义, 刘伊丽, 陈瑗. 一氧化氮和过氧亚硝酸阴离子的心肌损害作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 172-174
- [5] Takanichi Uchiyama, Hajime Otani, Takayuki Okada, Hideki Ninomiya, Masakuni Kido, Hiroji Imamura, et al. Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (8): 1 049-061
- [6] 杨长春, 温进坤, 韩梅. 粘着斑激酶在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 10-12
- [7] 黄忠耀, 朱洪生, 张有荣. 卡托普利对缺血一再灌注鼠心肌一氧化氮及其合酶活性的影响[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2002, **9** (4): 276-278

(此文编辑 许雪梅)