

# 盐酸法舒地尔后适应对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响及其机制

蒋智慧, 冯广智, 钱志勇, 徐曙东

(江苏省泰兴市人民医院 蚌埠医学院附属泰兴医院心内科, 江苏省泰兴市 225400)

[关键词] 盐酸法舒地尔; 药物后适应; 缺血/再灌注; 大鼠

[摘要] **目的** 通过主动脉根部模拟冠状动脉内给药, 观察盐酸法舒地尔后适应对大鼠急性心肌缺血/再灌注损伤的保护作用, 并探讨其机制。**方法** 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组、PI3K 抑制剂组、盐酸法舒地尔组、盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组, 每组 12 只。各组于再灌注 180 min 后处死大鼠, 分别测定心功能参数、血浆心肌酶、细胞凋亡指数和心肌梗死范围。**结果** 盐酸法舒地尔组心肌细胞凋亡指数、心肌梗死范围与缺血再灌注组比较明显减少 ( $P < 0.01$ ); 给予 PI3K 抑制剂, 盐酸法舒地尔的后适应效应消失, 即盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组心肌细胞凋亡指数、心肌梗死范围与盐酸法舒地尔组比较明显增加 ( $P < 0.01$ )。**结论** 盐酸法舒地尔后适应的机制可能与激活 PI3K-Akt 传导通路有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Potential Mechanisms of Fasudil Hydrochloride on Postconditioning of Acute Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

JIANG Zhi-Hui, FENG Guang-Zhi, QIAN Zhi-Yong, and XU Shu-Dong

(Department of Cardiology, Taixing People's Hospital & Taixing Hospital Affiliated to Bengbu Medical College, Taixing, Jiangsu 225400, China)

[KEY WORDS] Fasudil Hydrochloride; Medicament Postconditioning; Ischemia/Reperfusion; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of fasudil hydrochloride on postconditioning of acute myocardial ischemia/reperfusion injury, and the potential mechanisms in rats. **Methods** Sixty rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, ischemia/reperfusion group, an inhibitor of PI3K group, fasudil hydrochloride group, fasudil hydrochloride and an inhibitor of PI3K group. There were 12 rats in each group. Animals were sacrificed after 180 minutes reperfusion to determine heart function parameters, plasma myocardial enzymes, cell apoptosis index and myocardial infarct size. **Results** The levels of apoptosis index and myocardial infarct size in the fasudil hydrochloride group were significantly lower than in the ischemia/reperfusion group (all  $P < 0.01$ ). But using an inhibitor of PI3K, fasudil hydrochloride couldn't protect myocardial ischemia/reperfusion injury, the levels of apoptosis index and myocardial infarct size in the fasudil hydrochloride and an inhibitor of PI3K group were significantly higher than in the fasudil hydrochloride group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** PI3K-Akt pathway was thought to be one of the main mechanisms responsible for the protection of fasudil hydrochloride postconditioning.

心肌缺血/再灌注损伤是急性心肌梗死再灌注期间常见的一种病理生理现象, 研究发现心肌梗死的面积由于心肌再灌注的持续而增加, 提示可能存在一种通过凋亡和炎症介导的心肌再灌注损伤<sup>[1]</sup>,

如何减轻或消除这种损伤一直是临床研究的热点。近来研究提示很多药物如腺苷、缓激肽、促红细胞生成素等能激活相关信号通路, 起到减轻心肌缺血/再灌注损伤的作用, 这种药物干预过程称之为药

[收稿日期] 2012-10-16

[基金项目] 蚌埠医学院自然科学研究资助项目 (Byky1298NF)

[作者简介] 蒋智慧, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础、临床及介入治疗, E-mail 为 zhihuij@163.com。冯广智, 主任医师, 研究方向为冠心病的临床及介入治疗, E-mail 为 fgz-tx@yahoo.com.cn。通讯作者徐曙东, 硕士, 副主任医师, 研究方向为心脏起搏及电生理, E-mail 为 xsd1971@126.com。

物后适应<sup>[2]</sup>,越来越多的研究也证明药物后适应在心肌缺血/再灌注损伤保护方面具有广阔的应用前景。

近年来研究表明,Rho 激酶通过与血管紧张素 II、内皮素 1、血小板衍生生长因子等多种血管活性物质的相互调控影响平滑肌细胞的功能和结构,直接参与心血管疾病的病理过程,与动脉粥样硬化、冠状动脉痉挛、心肌缺血等主要心血管病理现象的发生发展关系密切。既往我们研究发现,盐酸法舒地尔作为 Rho 激酶抑制剂,可以模拟缺血后适应效应,减轻心肌缺血再灌注损伤<sup>[3]</sup>,本研究即是在此基础上进一步探讨盐酸法舒地尔后适应的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选择健康清洁级雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 60 只,体重  $250 \pm 10$  g,由第二军医大学实验动物中心提供。大鼠分笼饲养,每笼 6 只,保持室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,相对湿度 60% ~ 65%,自由进食饮水。

### 1.2 仪器与试剂

动物呼吸机 (ALC-V8,上海奥尔科特生物技术有限公司),Power Lab 生理实验系统 (8/30,澳大利亚 AD 公司),半自动生物化学分析仪 (XD811,上海迅达医疗仪器有限公司),高压球囊 (Lacrosse,日本 Goodman 公司);乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 及肌酸激酶 (creatinase, CK) 试剂盒 (武汉博士德生物工程公司),原位细胞凋亡检测试剂盒 (transferase-mediated dUTP nick end-labeling box, TUNEL box,武汉博士德生物工程公司),氯化硝基四氮唑 (上海浩然生物有限公司),盐酸法舒地尔 (fasudil hydrochloride, HAI077,商品名川威,批号 1011051,天津红日药业),PI3K 抑制剂 LY294002 (德国 Calbiochem 公司)。

### 1.3 动物模型建立

按赵秀梅等<sup>[4]</sup>球囊垫扎法复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型。动物称重后 3% 戊巴比妥 ( $2 \mu\text{L/g}$ ) 麻醉,仰卧固定,颈部正中切口,插入气管插管以动物呼吸机辅助呼吸 (潮气量  $30 \mu\text{L/g}$ ,频率 50 ~ 60 次/分,吸呼比 1:2),连接心电电极检测 II 导联心电图记录心肌缺血再灌注时的心电图变化;分离右侧颈总动脉,插入内径为 0.8 mm 聚乙烯塑料导管,沿向心方向插入至出现特征性左心室压力波为标志,接压力换能器,信号输入 Power Lab 生理实

验系统。手术区剃毛,消毒,快速开胸,剪断第 3、4 肋骨暴露心脏。撕开心包将心脏轻轻挤出,在左心耳下 1 mm,肺动脉圆锥旁边 0.5 mm 处用微创缝合针进针,进针深度为 1 ~ 1.5 mm,宽 2 ~ 3 mm,连同大静脉、高压球囊  $3.0 \text{ mm} \times 10.0 \text{ mm}$  (预先保持 2 atm, 1 atm = 101.325 kPa),垫于血管与结扎线之间,一齐结扎 (松结)。迅速将压力泵调节为 12 atm,心电图出现 ST 段抬高和 (或) T 波高耸或倒置,提示完全阻塞冠状动脉前降支 (图 1)。轻轻提拉切口皮肤将心脏送回胸腔,止血钳夹闭胸腔。结扎后 60 min,迅速调节压力泵压力为 0 atm,抬高的 ST 段恢复正常或下降超过 50% 以上,视为冠状动脉前降支血液再灌注成功 (图 2)。

### 1.4 实验分组

SD 大鼠编号后随机分为 5 组,每组 12 只。(1) 假手术组:开胸,以 5 ~ 0 无创缝合线穿过冠状动脉前降支,不结扎,旷置 180 min;(2) 缺血再灌注组:缺血 60 min 后,将压力泵迅速调节为 0 atm,恢复血流,持续灌注 120 min;(3) PI3K 抑制剂组:将 PI3K 抑制剂 LY-294002 采用生理盐水配制浓度为 75 mg/L,在缺血前 10 min 采用股静脉给药,给药体积为  $1 \mu\text{L/g}$ ,然后按照缺血再灌注组进行;(4) 盐酸法舒地尔组:缺血 60 min 后将压力泵迅速调节为 0 atm,立即使用微量注射泵,通过插入右侧颈总动脉的聚乙烯塑料导管,以左心室压力波形消失为标志将测压导管从左心室撤到主动脉根部,将溶有盐酸法舒地尔的生理盐水 (500 mg/L) 以  $0.5 \mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{min}) \times 5 \text{ min}$  注入主动脉根部模拟冠状动脉内给药,然后持续再灌注 115 min;(5) 盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组:将 PI3K 抑制剂 LY-294002 采用生理盐水配制浓度为 75 mg/L,在缺血前 10 min 采用股静脉给药,给药体积为  $1 \mu\text{L/g}$ ,然后按照盐酸法舒地尔组进行。

### 1.5 心功能参数测定

经右侧颈总动脉插入左心室导管,接压力换能器输入 Power Lab 监测并记录各组再灌注末时的血流动力学功能参数,即左心室最大压力、左心室最小压力、心率、左心室压力最大上升及下降速率 ( $\pm \text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ )。

### 1.6 心肌酶谱测定

再灌注末,经颈动脉插管取血 2 mL,以 3 000 r/min 离心 10 min 取血浆,分别依试剂盒说明书测定 CK、LDH 含量。



图 1. 冠状动脉前降支完全阻塞后心电图表现

Figure 1. The performance of ECG after the left anterior descending coronary artery completely blocked

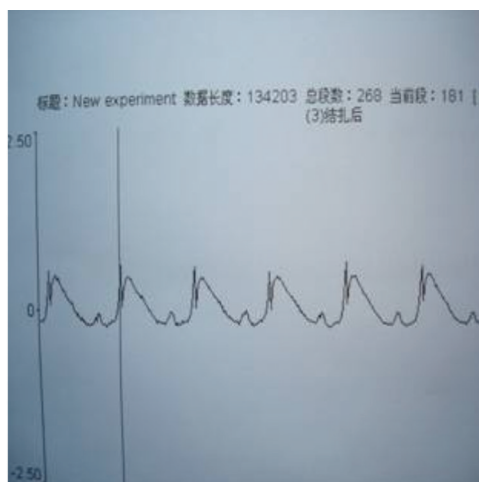
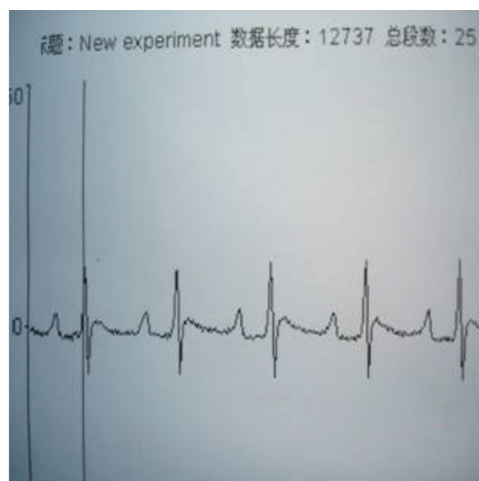


图 2. 冠状动脉前降支再灌注后心电图表现

Figure 2. The performance of ECG after the left anterior descending coronary artery reperfusion



### 1.7 凋亡检测

取出心脏,将缺血区心肌组织(左心室前壁中间段)剪下,中性甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋,用 TUNEL 法检测细胞凋亡,具体操作按试剂盒说明书进行。正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡细胞核呈褐色。每张切片在放大 400 倍视野下随机选取梗死周边区的 5 个视野,计数 TUNEL 阳性细胞数和细胞总数,并以百分数表示凋亡指数 (apoptotic index, AI)。

### 1.8 心肌梗死范围测定

通过心肌梗死重量与全心室重量比值测定心肌梗死范围。再灌注末经颈动脉插管取血后,脱臼处死动物,迅速取出心脏,生理盐水冲洗,滤纸吸干,称全心室重量,然后从心尖向心底平行于房室沟方向将全心室切成相等厚度 5 片,置 37°C 0.1% 氯化硝基四氮唑液染色。10~20 min 后立即用生理

盐水冲去多余染料。梗死心肌不着色,非梗死心肌被染成黑色,拍照,然后剪去着色部分,将未着色的梗死区称重。计算心肌梗死重量与全心室重量比值。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组均数间比较采用配对  $t$  检验,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组心功能参数的比较

各组间左心室最小压力、心率比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与假手术组比较,其他 4 组左心室最大压力、 $\pm dp/dt_{\max}$  明显降低 ( $P < 0.01$ );

与缺血再灌注组比较,盐酸法舒地尔组左心室最大压力、 $\pm dp/dt_{max}$  明显升高( $P < 0.01$ );与盐酸法舒

地尔组比较,盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组左心室最大压力、 $\pm dp/dt_{max}$  明显降低( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1. 各组心功能参数( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Heart function parameters in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	大鼠(只)	左心室最大压力(mmHg)	左心室最小压力(mmHg)	心率(次/分)	+ dp/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	- dp/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)
假手术组	12	134.2 ± 10.9	10.5 ± 0.8	430 ± 17	3 873 ± 291	3 449 ± 305
缺血再灌注组	12	87.5 ± 14.1 <sup>a</sup>	12.5 ± 4.7	433 ± 42	2 265 ± 569 <sup>a</sup>	1 899 ± 599 <sup>a</sup>
PI3K 抑制剂组	12	87.1 ± 7.9 <sup>a</sup>	12.1 ± 2.4	428 ± 47	2 343 ± 363 <sup>a</sup>	2 097 ± 380 <sup>a</sup>
盐酸法舒地尔组	12	108.2 ± 16.1 <sup>ab</sup>	11.4 ± 3.6	431 ± 18	2 933 ± 320 <sup>ab</sup>	2 529 ± 330 <sup>ab</sup>
盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组	12	88.2 ± 3.9 <sup>ac</sup>	11.8 ± 3.1	428 ± 22	2 235 ± 122 <sup>ac</sup>	1 977 ± 133 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与缺血再灌注组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与盐酸法舒地尔组比较。

## 2.2 各组血浆 CK、LDH 含量的比较

与假手术组比较,其他 4 组 CK 和 LDH 含量明显升高( $P < 0.01$ );与缺血再灌注组比较,盐酸法舒地尔组 CK 和 LDH 含量明显降低( $P < 0.01$ );与盐酸法舒地尔组比较,盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组 CK 和 LDH 含量明显升高( $P < 0.01$ )(表 2)。

## 2.3 各组心肌细胞凋亡指数的比较

假手术组凋亡指数为  $7.11\% \pm 1.24\%$ ,其余 4 组凋亡指数明显增加,分别与假手术组比较,具有显著统计学差异( $P < 0.01$ );盐酸法舒地尔组( $28.56\% \pm 2.87\%$ )与缺血再灌注组( $41.12\% \pm 5.47\%$ )比较,凋亡指数明显减少( $P < 0.01$ );与盐酸法舒地尔组比较,盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组

( $40.42\% \pm 7.89\%$ )凋亡指数显著增加( $P < 0.01$ )(图 3)。

表 2. 各组血浆 CK 和 LDH 含量( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Plasma CK and LDH in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	大鼠(只)	CK(ku/L)	LDH(ku/L)
假手术组	12	910.3 ± 201.9	1 076.3 ± 178.2
缺血再灌注组	12	3 126.2 ± 532.1 <sup>a</sup>	2 262.6 ± 523.1 <sup>a</sup>
PI3K 抑制剂组	12	2 962.0 ± 471.5 <sup>a</sup>	2 108.0 ± 194.3 <sup>a</sup>
盐酸法舒地尔组	12	1 921.4 ± 425.0 <sup>ab</sup>	1 481.8 ± 218.9 <sup>ab</sup>
盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组	12	2 801.0 ± 720.2 <sup>ac</sup>	2 277.0 ± 798.6 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与缺血再灌注组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与盐酸法舒地尔组比较。

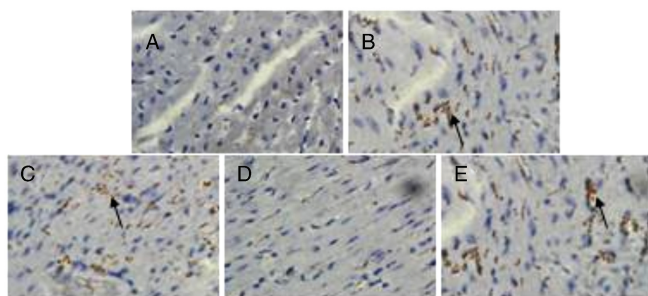
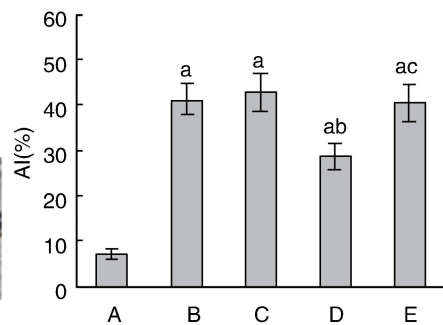


图 3. 各组心肌细胞凋亡指数( $400 \times$ ,  $n = 12$ ) A 为假手术组, B 为缺血再灌注组, C 为 PI3K 抑制剂组, D 为盐酸法舒地尔组, E 为盐酸法舒地尔 + PI3K 抑制剂组。a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与缺血再灌注组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与盐酸法舒地尔组比较。

Figure 3. Apoptotic index of cardiocytes in each group ( $400 \times$ ,  $n = 12$ )



## 2.4 各组心肌梗死范围的比较

各组间大鼠体重、全心室重量比较,差异无统

计学意义( $P > 0.05$ )。假手术组心肌梗死范围为 0;盐酸法舒地尔组( $8.61\% \pm 2.90\%$ )与缺血再灌注

组(18.48% ± 5.19%)比较,心肌梗死范围明显减少( $P < 0.01$ );与盐酸法舒地尔组比较,盐酸法舒地

尔 + PI3K 抑制剂组(16.90% ± 5.80%)心肌梗死范围明显增大( $P < 0.01$ )(图4)。

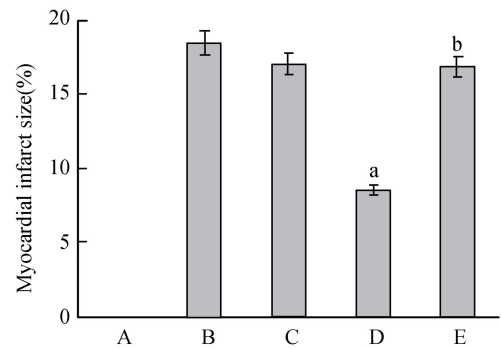


图4. 各组心肌梗死范围( $n = 12$ ) A为假手术组,B为缺血再灌注组,C为PI3K抑制剂组,D为盐酸法舒地尔组,E为盐酸法舒地尔 + PI3K抑制剂组。a为 $P < 0.01$ ,与缺血再灌注组比较;b为 $P < 0.01$ ,与盐酸法舒地尔组比较。

Figure 4. Myocardial infarct size of cardiocytes in each group( $n = 12$ )

### 3 讨论

近年来,静脉溶栓、经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉旁路移植术等方法广泛应用于急性心肌梗死的治疗,使缺血心肌得到有效再灌注,对于挽救濒死心肌、缩小心肌梗死面积、保护心功能起到了重要的作用。但是,缺血/再灌注损伤阻碍了缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效,造成心肌细胞代谢功能障碍和形态结构破坏,进而加剧心肌损害<sup>[5,6]</sup>,所以,如何减轻心肌缺血/再灌注损伤成为临床上新的挑战。心肌缺血/再灌注损伤的机制涉及氧自由基损伤、钙超载、细胞凋亡、内皮功能障碍等,近年研究表明,细胞凋亡是心肌缺血/再灌注损伤机制中的重要环节<sup>[7]</sup>,是心肌受损、心力衰竭发生发展的重要因素。最新研究提示长时间持续缺血或短暂缺血后再灌注可以引起心肌细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本实验研究结果证实,大鼠心肌缺血/再灌注损伤存在大量凋亡细胞;假手术组由于心肌细胞新陈代谢存在少许凋亡细胞,而其余4组由于经过缺血/再灌注过程,心肌凋亡细胞显著增多,与假手术组比较,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。

研究表明线粒体渗透性转换孔道(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是一种跨线粒体膜的非特异性孔道,是一条重要的细胞凋亡途径,增加线粒体通透性是缺血/再灌注损伤的关键性因素<sup>[9]</sup>。再灌注损伤营救激酶(reperfusion injury salvage kinase, RISK)是参与维持细胞存活的蛋白激酶,其中PI3K-Akt途径是RISK信号通路的一个重要部

分,能够抑制MPTP的开放,减轻缺血再灌注损伤<sup>[10,11]</sup>。PI3K是一种脂质激酶,主要由催化亚基p110和调节亚基p85组成,通过受体细胞因子、酪氨酸激酶或G2蛋白偶联受体激活,将磷脂酰肌醇4,5-二磷酸催化生成磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸,募集并激活Akt、磷脂酰肌醇依赖性激酶1、单体G蛋白(如Rac-GTPases),进一步磷酸化其下游靶分子,其中包括内皮一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、糖原合成酶激酶3 $\beta$ 及一些抗凋亡效应因子等。Akt被认为是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,是PI3K最重要的靶酶,eNOS是PI3K-Akt途径的主要下游靶点,活化的Akt有抗凋亡、促细胞生存作用。Yang等<sup>[12]</sup>发现,使用PI3K抑制剂LY294002后,缺血后适应不能减轻心肌缺血/再灌注损伤,提出缺血后适应通过PI3K-Akt途径发挥其心肌保护作用。本实验研究结果显示,PI3K抑制剂LY294002本身对缺血/再灌注损伤没有影响(PI3K抑制剂组与缺血再灌注组比较, $P > 0.05$ ),但与盐酸法舒地尔联合使用后,盐酸法舒地尔的后适应作用消失,即盐酸法舒地尔 + PI3K抑制剂组凋亡细胞明显增多、梗死范围明显扩大(与盐酸法舒地尔组比较, $P < 0.01$ )。根据本实验结果,初步推断盐酸法舒地尔后适应与缺血后适应存在类似的保护机制,即盐酸法舒地尔通过PI3K-Akt途径发挥其心肌保护作用。

本研究目前只是通过具体现象得出该结论,尚有待通过分子生物学的研究进一步证实该机制;另外通过本研究发现药物后适应与缺血后适应存在

类似的保护机制,两者之间是否存在协同作用也值得进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Singh MV, Anderson ME. Is CaMK II a link between inflammation and hypertrophy in heart[J]? *Journal of Molecular Medicine*, 2011, 89(6): 537-543.
- [2] Tissier R, Waintraub X, Couvreur N, et al. Pharmacological post-conditioning with the phytoestrogen genistein[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(1): 79-87.
- [3] 蒋智慧, 张俊峰, 龙盼, 等. 盐酸法舒地尔后适应对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2012, 14(5): 531-534.
- [4] 赵秀梅, 孙胜, 刘秀华. 垫扎球囊法复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型[J]. *中国微循环*, 2007, 11(3): 206-208.
- [5] Garcia-Dorado D, Andres-Villarreal M, Ruiz-Meana M, et al. Myocardial edema: a translational view[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(5): 931-939.
- [6] Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 365-371.

- [7] Singh SS, Kang PM. Mechanisms and inhibitors of apoptosis in cardiovascular diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(8): 1783-793.
- [8] Alloatti G, Arnoletti E, Bassino E, et al. Obestatin affords cardioprotection to the ischemic-reperfused isolated rat heart and inhibits apoptosis in cultures of similarly stressed cardiomyocytes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(2): H470-H481.
- [9] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-1135.
- [10] Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, et al. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning[J]? *Cardiovasc Res*, 2002, 55(3): 534-543.
- [11] Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning[J]. *Heart Fail Rev*, 2007, 12(3-4): 181-188.
- [12] Yang XM, Philipp S, Downey JM, et al. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation[J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(1): 57-63.

(此文编辑 曾学清)