

Effect of the direct renin inhibitor aliskiren, the angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy[J]. *Circulation*, 2009,119(4):530-537.

[12] 邓春玉,钱卫民,阮小微,等. 川芎嗪对大鼠胸主动脉平滑肌电压依赖性氯离子(Cl⁻)通道的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2002,18(3):212,227.

[13] 文飞,冯义柏,田莉,等. 川芎嗪预处理大鼠心肌梗

血-再灌注损伤的保护[J]. 中华实用中西医杂志,2005,18(8):1099-1101.

[14] 朱萧玲,熊利泽,陈绍洋,等. 川芎嗪对内皮素引起心肌细胞肥大的影响[J]. 医学研究生学报,2006,19(3):214-216,220.

[15] 白新艳,王晶明,马晓涛,等. 川芎嗪抑制去甲肾上腺素引起心肌细胞肥大的研究[J]. 心脏杂志,2007,19(3):368.

依达拉奉预处理对心肌缺血-再灌注损伤大鼠的保护作用

宋祖军^{1,2},马俊清¹,余厚友¹,黄杨¹,张永和¹,陈军³

(1. 第四军医大学西京医院急诊科,西安 710032; 2. 解放军第309医院急诊科,北京 100091; 3. 第四军医大学唐都医院疼痛医学研究所,西安 710038)

[摘要] 目的 探讨依达拉奉预处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤(MIRI)的保护作用及其可能机制。方法 MIRI模型制备完成后,30只SD大鼠随即分为假手术组(0.9%氯化钠溶液预处理)、缺血-再灌注组(0.9%氯化钠溶液预处理)、依达拉奉组(依达拉奉预处理)。假手术组开胸后只穿线不结扎,缺血-再灌注组和依达拉奉组均结扎左冠状动脉前降支,用止血钳固定持续缺血30 min,放松止血钳120 min。测定血清超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)、心肌型肌酸激酶同工酶(CK-MB)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量,以及心肌坏死组织质量。结果 与假手术组比较,缺血-再灌注组的SOD活性明显降低,MDA、CK-MB、TNF-α含量明显升高,其差异均有极显著性($P < 0.01$);与缺血-再灌注组比较,依达拉奉组SOD活性明显升高,MDA、CK-MB、TNF-α含量明显降低,其差异有极显著性($P < 0.01$);与缺血-再灌注组比较,依达拉奉组AAR、IS/AAR明显降低,差异有显著性($P < 0.05$)。结论 依达拉奉预处理对MIRI具有保护作用,其可能的机制是提高SOD活性,减轻氧自由基对细胞膜的损伤。

[关键词] 依达拉奉;缺血-再灌注损伤;心肌保护

[中图分类号] R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2009)10-1268-03

Protective Effect of Edaravone Pretreatment on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats

SONG Zu-jun^{1,2}, MA Jun-qing¹, YU Hou-you¹, HUANG Yang¹, ZHANG Yong-he¹, CHEN Jun³ (1. Department of Emergency, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; 2. Department of Emergency, the 309 Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100091; 3. Tangdu Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective To investigate the protective effect and mechanism of edaravone pretreatment on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** 60 SD rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group (pretreated with normal saline), ischemia reperfusion injury group (pretreated with normal saline), and edaravone group (pretreated with edaravone) following the model of MIRI produced by the coronary artery ligation. Serum activity of superoxide dismutase (SOD), contents of malondialdehyde (MDA), creatine kinase-myocardial band (CK-MB), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and myocardial infarct sizes were detected, respectively. **Results** The total activity of SOD in ischemia reperfusion injury rats was significantly decreased compared with that in sham operation group, while contents of MDA, CK-MB and TNF-α significantly increased ($P < 0.01$). Edaravone elevated the activity of SOD, lowered the levels of MDA, CK-MB and TNF-α accordingly ($P < 0.01$), compared with MIRI group, and remarkably decreased AAR, IS/AAR ($P < 0.05$). **Conclusion** Edaravone pretreatment can protect myocardial ischemia reperfusion injury in rats, the mechanism of which may be associated with enhancing the activity of SOD, attenuating damage of oxygen free radicals on myocardial cellular membrane.

KEY WORDS Edaravone; Myocardial ischemia reperfusion injury; Myocardial protection

心肌缺血-再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 仍然是冠心病治疗中的难题。心肌在缺血后发生再灌注时,产生大量活性氧不能及时被清除是引起心肌细胞损伤的主要机制之一。研究表明,依达拉奉具有较强的自由基清除能力,发挥细胞保护作用,在缺血性脑卒中的治疗中得到广泛应用^[1]。有关依达拉奉对心肌缺血-再灌注损伤的影响,笔者很少见到国内报道。笔者在本研究根据心肌缺血-再灌注损伤机制和依达拉奉的药理作用,采用结扎大鼠左冠状动脉前降支的方法制作 MIRI 模型,并给予依达拉奉预处理,研究依达拉奉预处理对缺血-再灌注心肌的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 健康清洁 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供),雌雄不限,体质量 260~330 g;依达拉奉(上海先声药业有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 试剂盒(北京军事医学科学院);动物人工呼吸机 DH-140(浙江医科大学实验仪器厂生产);八导生理记录仪(日本光电公司, RM-6000)。

1.2 动物模型的制备 参照文献^[2]并加以改进。以戊巴比妥钠(30 mg·kg⁻¹)腹腔麻醉,气管插管并接小动物呼吸机(频率 80~90 次·min⁻¹,潮气量 3~4 mL)。开胸暴露心脏,用无创缝合线置于左冠状动脉前降支起始部下 2 mm 处备用,将丝线两端套一小塑料垫片,再穿入一聚乙烯小管以形成环路,拉紧闭环即产生缺血(ST 段抬高和 R 波增高,左室发绀),放松闭环即发生再灌注(抬高的 ST 段和 R 波恢复,发绀区变红)。结扎前 1 min 给予肝素 250 U·kg⁻¹,全程记录心电图变化。

1.3 实验分组与药物预处理 30 只 SD 大鼠随即分为假手术组、缺血再灌注组、依达拉奉组,每组 10 只。依达拉奉组第 1 和第 2 天经颈静脉静脉滴注依达拉奉 5 mg·kg⁻¹,第 3 天以同剂量的依达拉奉静脉注射 10 min,再以 10 mg·kg⁻¹依达拉奉微量泵泵注维持 50 min;假手术组和缺血再灌注组同法给予等量 0.9%

氯化钠溶液。之后行动物造模,假手术组开胸后只穿线不结扎,缺血再灌注组和依达拉奉组均结扎左冠状动脉前降支,用止血钳固定持续缺血 30 min,放松止血钳 120 min。以 ST 段下降 $\geq 1/2$,心肌颜色恢复为再灌注成功标志。

1.4 标本收集和检测指标 再灌注 120 min 后经颈静脉取血,离心分离血清,严格按照试剂盒说明书操作,测定 SOD 活性和 MDA、肌酸激酶同工酶(CK-MB)(抗体抑制/酶速率法,在 BECKMAN LX20 全自动生化分析仪上检测)、TNF- α (ELISA 法)含量。

1.5 坏死组织质量测定 参照文献^[3]。再灌注 2 h 后重新拉紧闭环使冠脉阻塞。50 g·L⁻¹ Evans Blue 1 mL 颈静脉注入,观察眼球变蓝后处死大鼠。取心脏,并放于 -20 °C 冰箱中冻存。30 min 后将心脏沿长轴均匀切为 6~9 片,可观察到灌注区为蓝色,非灌注区未染色。分离出未染色区并浸泡于 pH 值 7.4, 10 g·L⁻¹ 的 TTC 溶液中,于 37 °C 水箱孵化 20 min 后取出,可观察到坏死区未染色,未坏死区为红色,分离染色区与未染色区。分别称蓝色区、红色区、未染色区的质量。红色区与未染色区之和为缺血区(AAR),未染色区为坏死区(IS),用 IS/AAR $\times 100\%$ 表示。

1.6 统计学方法 用 SPSS12.0 软件处理,所有数据用均数 \pm 标准差表示,采用方差分析,组间多重比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠 SOD 活性、MDA、CK-MB、TNF- α 含量 与假手术组比较,缺血-再灌注组的 SOD 活性明显降低,MDA、CK-MB、TNF- α 含量明显升高,其差异均有极显著性($P < 0.01$);与缺血再灌注组比较,依达拉奉组 SOD 活性明显升高,MDA、CK-MB、TNF- α 含量明显降低,其差异有极显著性($P < 0.01$),见表 1。

2.2 各组大鼠心肌缺血、坏死组织质量比较 与缺血再灌注组比较,依达拉奉组 AAR、IS/AAR 明显降低,差异有显著性($P < 0.05$);而两组的心脏质量比较,差异无显著性($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

MIRI 的主要机制之一是产生的活性氧对细胞损

表 1 各组大鼠 SOD 活性、MDA、CK-MB、TNF- α 含量的比较

组别	SOD/	MDA/	CK-MB/	TNF- α /
	(U·mL ⁻¹)	(nmol·mL ⁻¹)	(U·L ⁻¹)	(ng·L ⁻¹)
依达拉奉组	63.87 \pm 10.94 ^{*1*2}	4.024 \pm 0.612 ^{*1*2}	1 260.800 \pm 101.044 ^{*2*3}	793.700 \pm 85.569 ^{*2*3}
假手术组	75.04 \pm 15.04	3.484 \pm 0.512	346.700 \pm 92.644	389.800 \pm 72.466
缺血再灌注组	45.33 \pm 9.66 ^{*3}	7.934 \pm 0.335 ^{*3}	524.800 \pm 120.956 ^{*3}	1 078.800 \pm 103.196 ^{*3}

与假手术组比较,^{*1} $P < 0.05$,^{*3} $P < 0.01$;与缺血再灌注组比较,^{*2} $P < 0.01$

害。心肌发生缺血-再灌注后,组织内活性氧明显增加,SOD等自由基清除剂活性降低,抗氧化能力明显下降,细胞膜脂质发生过氧化反应而被破坏,引起MDA含量的增加和细胞内钙超载^[4],最终导致心肌细胞的死亡,并释放大量的心肌酶,使血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、CK-MB等含量增高。同时,MIRI引起明显的炎症反应,产生大量的TNF- α ,进一步加重心肌的损伤^[5]。

表2 两组大鼠心肌缺血和坏死组织比较 $\bar{x} \pm s$

组别	心脏质量/g	AAR/g	IS/AAR/%
依达拉奉组	1.380 \pm 0.128	0.306 \pm 0.113	28.300 \pm 9.393
缺血再灌注组	1.206 \pm 0.113	0.413 \pm 0.108	45.900 \pm 14.348
t值	0.593	2.161	3.245
P值	>0.05	<0.05	<0.01

依达拉奉具有较强的清除体内活性氧、抑制脂质过氧化反应、减轻组织炎症反应、保护血管内皮细胞等作用,常用于急性缺血性脑卒中的治疗^[1,6]。出于相同的机制,人们研究发现依达拉奉对肝、肾脏、肠道等器官的缺血性损伤均具有保护作用^[7-9]。笔者在本研究中正是根据依达拉奉的药理作用和心肌缺血-再灌注损伤的机制而设计,总SOD活力可反映机体清除氧自由基的能力,MDA可反映细胞膜受氧自由基攻击的严重程度,CK-MB反映心肌细胞是否损伤及其损伤程度,TNF- α 反映心肌发生缺血-再灌注损伤的早期炎症反应。实验结果表明,心肌发生缺血-再灌注后血清SOD活性明显降低,MDA、CK-MB、TNF- α 含量明显升高,提示心肌细胞发生明显的损伤,与对照组比较差异有极显著性;经依达拉奉预处理的大鼠,其缺血-再灌注损伤明显减轻,表现为血清SOD活性升高,MDA、CK-MB、TNF- α 含量的降低,与缺血-再灌注组比较差异有极显著性($P < 0.01$),并且AAR、IS/AAR在依达拉奉组与缺血再灌注组比较差异有显著性($P < 0.05$)。表明依达拉奉具有较强的清除活性氧的作用,提高组织抗氧化能力,减轻早期炎症反应,发挥对MIRI的保护作用。

大量的实验研究表明,药物预处理对组织器官有明显的保护作用,其机制可能是通过促进内源性活性

物质的效应而发挥作用^[10]。本研究结果也显示,依达拉奉预处理具有良好的心肌保护效应,可能是提高心脏内源性抗氧化的能力,具体作用机制还有待于进一步的深入研究。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.10.007

[参考文献]

- [1] Eदारavone Acute Infarction Study Group. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction, randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2003, 15 (3): 222 - 229.
- [2] 高治平, 胡弼. 现代实用医学机能实验技术与方法 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004: 56 - 57.
- [3] CHULEX J E J, YAO Z, CAVERA I, et al. Glibenclamide induce of ischemic preconditioning is time dependent in infarct rat heart [J]. *AMJ Physiol*, 1997, 272 (H2): 607 - 615.
- [4] FUKUDA A, OKUBO S, TANABE Y, et al. Cardioprotective effect of edaravone against ischaemia-reperfusion injury in the rabbit heart before, during and after reperfusion treatment [J]. *J Int Med Res*, 2006, 34 (5): 475 - 484.
- [5] SQUADRITO F, ALLABILLA D, ZINGARDI D, et al. The effect of cloricrimme, a coumarine derivation, on leukocyte accumulation, myocardial necrosis and TNF production in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 1993, 53 (4): 341 - 355.
- [6] YASUOKA N, NAKAJIMA W, ISHIDA A, et al. Neuroprotection of edaravone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004, 151 (1 - 2): 129 - 139.
- [7] TANIGUCHI M, UCHINAMI M, DOI K, et al. Edaravone reduces ischemia-reperfusion injury mediators in rat liver [J]. *J Surg Res*, 2007, 137 (1): 69 - 74.
- [8] IGUCHI T, NISHIKAWA M, CHANG B, et al. Edaravone inhibits acute renal injury and cyst formation in cisplatin-treated rat kidney [J]. *Free Radic Res*, 2004, 38 (4): 333 - 341.
- [9] TOMATSURI N, YOSHIDA N, TAKAGI T, et al. Edaravone, a newly developed radical scavenger, protects against ischemia-reperfusion injury of the small intestine in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13 (1): 105 - 109.
- [10] 王永功, 陈广明. 缺血与药物预处理的研究进展 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2003, 23 (2): 169 - 171.

[收稿日期] 2008-11-21

[作者简介] 宋祖军(1962-),男,安徽人,副教授,硕士生导师,主要从事急危重病的基础与临床研究。电话:029-84773726, E-mail: songzj@fmmu.edu.cn。

[通讯作者] 马俊清,男,主治医师,电话:029-84775915, E-mail: majunqing026@yahoo.com.cn。