

· 论 著 ·

新化合物 TG6 对心肌缺血/再灌注损伤的影响及机制研究

程晶晶¹, 刘谋治², 李洪娇³, 阎 澜⁴, 姜远英⁴, 颜天华² (1. 武警河南省总队医院药剂科, 河南 郑州 450000; 2. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009; 3. 第二军医大学附属长海医院, 上海 200433; 4. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

【摘要】 目的 研究 TG6 对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及机制。方法 采用整体大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)实验, 离体大鼠心脏低灌复灌实验和乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤(H/R)实验等模型, 以血清 CK、LDH、T-SOD、MDA 等为指标, 研究 TG6 对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。结果 在整体大鼠心肌缺血再灌注损伤实验中, TG6 显著减少 I/R 损伤后心肌梗死面积, 减少血清中 CK 活力和 MDA 含量, 减少 LDH 活力, 增加 T-SOD 活力; 在离体大鼠心脏低灌复灌实验中, TG6 显著增加低灌复灌后心肌冠脉流量, 减少心肌组织中 MDA 含量和 CK、LDH 外漏, 提高心肌组织中 T-SOD 活力; 在乳鼠心肌细胞 H/R 损伤实验中, TG6 对正常生长条件下的细胞没有明显影响, 提高 Na₂S₂O₄ 制备的心肌细胞 H/R 模型下细胞的存活率、降低细胞 CK 的释放率及细胞 [Ca²⁺]_i 的含量。结论 TG6 对心肌 I/R 损伤有一定的保护作用。

【关键词】 钠氢交换器抑制剂; 心肌缺血/再灌注; 冠脉结扎; 离体心脏灌流; 心肌细胞; 缺氧/复氧

【中图分类号】 R541.6 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2014)06-0440-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.06.010

Effects and mechanism of TG6 on myocardial ischemia and reperfusion injury

CHENG Jingjing¹, LIU Mouzhi², LI Hongjiao³, YAN Lan⁴, JIANG Yuanying⁴, YAN Tianhua² (1. Department of Pharmacy, Henan People's Armed Police Corps Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 4. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects and mechanism of TG6 on myocardial ischemia/reperfusion injury. **Methods** the protective effects of TG6 on myocardial ischemia/reperfusion was investigated by setting up models of ischemia and reperfusion of rats induced by ligating the left coronary anterior descending artery *in vivo*, isolated rat hearts through an improved Langendorff device, and hypoxia/reoxygenation injury of neonatal rat cardiomyocytes, and the serum CK, LDH, T-SOD, MDA were taken as research markers. **Results** TG6 significantly reduced the myocardial infarct size, decreased the activity of CK and the content of MDA in serum, reduced the activity of LDH, and increased the activity of T-SOD *in vivo*; TG6 obviously increased the coronary blood flow after low rate perfusion and reperfusion, decreased the content of MDA and the leakage of CK, LDH in myocardial tissue, elevated the activity of T-SOD *in vitro* of isolated rat hearts; TG6 had no effects on cells in normal growth condition, raised the viability of cardiomyocytes significantly, and reduced the rate of CK leakage and the content of [Ca²⁺]_i obviously in Na₂S₂O₄ treated cells *in vitro* of neonatal rat cardiomyocytes. **Conclusion** TG6 could effectively protect myocardial ischemia/reperfusion injury.

【Key words】 NHEI; myocardial ischemia/reperfusion; coronary artery ligation; isolated heart perfusion; cardiomyocyte; H/R

心肌缺血再灌注损伤(MIRI)是指缺血期处于可逆损伤的心肌细胞恢复血液供应后产生更为严重的损伤,主要包括:炎症反应、内皮细胞损伤、血流障碍、心肌细胞坏死和凋亡所致的心肌梗死面积(MIS)扩大等。随着冠状动脉搭桥术(CABG)、经皮冠状动脉内成形术(PTCA)、溶栓疗法等血管再通术的迅速开展,急性心肌梗死(AMI)再灌注治疗出

现了一个飞跃^[1]。目前 MIRI 是阻碍缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效的主要难题,如何减轻 MIRI 成为临床上的新挑战。

钠氢交换器(Na⁺-H⁺ exchanger, NHE)是一种在多种哺乳动物细胞中均有表达的蛋白质,它在调节细胞内 pH 值,维持 Na⁺ 和 Ca²⁺ 稳定方面起重要的调节作用^[2]。目前,已经有 10 种 NHE 亚型(NHE1~NHE10)被确认^[3],其中 NHE1 在组织中普遍分布,尤其在心肌细胞中占绝大多数,因此 NHE1 在调节心肌功能方面起重要作用。在对心肌缺血再灌注损伤机制研究过程中发现,心肌在缺血

【基金资助】“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103101-069)。

【作者简介】程晶晶 药师。Tel: 18625598588 E-mail: jinganswer_890721@126.com.

【通讯作者】颜天华。E-mail: yth0001@126.com.

再灌注损伤时可激活 NHE, 进而引起 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换, 致细胞内 Ca^{2+} 超负荷, 造成心肌细胞损伤。根据这种病理生理基础研究提示, $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换抑制剂 (sodium hydrogen exchange inhibitor, NHEI) 有可能为防止心肌细胞损伤提供新的治疗方法^[4]。

中国药科大学新药研究中心将卡立泊来德 (cariporide) 分子的有效基团与曲美他嗪分子的有效基团相结合, 合成了一系列化合物。经初步筛选, 发现化合物 TG6 作用突出, 经查新证实为结构新型的化合物 (图 1)。

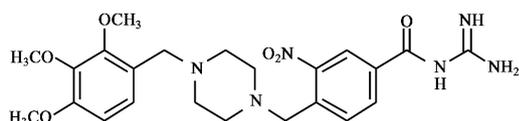


图 1 TG6 化学结构式

TG6 分子可能兼具 NHEI 抑制剂和代谢类药的特点, 其作用机制可能与减轻氧自由基损伤、改善自由基清除系统平衡、扩张冠状动脉、改善心肌能量代谢、抑制细胞内 Ca^{2+} 超载等有关, 有望成为预防和治疗心肌缺血再灌注损伤的新药。本研究旨在观察 TG6 在缺血再灌注损伤保护方面的作用效果和机制, 为其临床应用和进一步研发提供可靠的理论依据和思路。

1 材料和方法

1.1 药品与材料 TG6、卡立泊来德、盐酸曲美他嗪均由中国药科大学新药研究中心提供; 连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 分析纯, 天津市福晨化学试剂厂生产); 二甲亚砜 (DMSO), 上海凌峰化学试剂有限公司生产; 肌酸激酶 (CK) 测定试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒、丙二醛测定 (MDA) 试剂盒、总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、超微量 $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶测定试剂盒均由南京建成生物试剂有限公司生产。

SD 大鼠, 雄性, 220 ~ 250 g (第二军医大学实验动物中心提供, 合格证: SCXK(沪) 2007 - 0003)。

1.2 方法

1.2.1 TG6 对冠脉结扎造成 SD 大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的影响 大鼠用 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于手术台上, 肢体导联监测心电图, 记录正常心电图。气管插管, 接动物人工呼吸机进行人工呼吸, 左侧第 4 肋间开胸, 剪开心包暴露心肌, 并用圆形无创缝合针 5-0 丝线置于左冠状动脉前降支起始部下 2 mm 处备

用。结扎冠状动脉, 以 ECG II 导联 ST 段抬高或 T 波高耸、心肌颜色变暗红色为结扎成功的标志^[5]。结扎 45 min 后松开结扎线再灌注 90 min。56 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为 7 组 (每组 8 只): 模型组; 假手术组 (冠状动脉下只穿线不结扎, 其余操作同模型组); 卡立泊来德 (1 mg/kg) 组; 曲美他嗪 (5 mg/kg) 组; TG6 高剂量组 (1 mg/kg)、中剂量组 (0.5 mg/kg)、低剂量组 (0.25 mg/kg)。卡立泊来德, 曲美他嗪, TG6 高、中、低剂量均在再灌注前 5 min 于尾静脉给予。

1.2.2 TG6 对大鼠离体心脏低灌/复灌损伤的影响 80 只清洁级雄性 SD 大鼠随机分为 8 组 ($n = 10$): 正常对照组, 用改良 K-H 液以正常流速灌注 80 min; 模型组, 平衡 20 min 后用改良 K-H 液低灌 30 min, 再复灌 30 min; 溶媒组, 低灌液为含 0.001% DMSO 的改良 K-H 液, 其余同模型组; 曲美他嗪组, 低灌液为含 50 $\mu\text{mol/L}$ 曲美他嗪的改良 K-H 液, 其余同模型组; 卡立泊来德组, 低灌液为含 10 $\mu\text{mol/L}$ 卡立泊来德的改良 K-H 液, 其余同模型组; TG6 高、中、低剂量组, 低灌液分别为含 50、10、2 $\mu\text{mol/L}$ TG6 的改良 K-H 液, 其余均同模型组。实验前将大鼠脱颈处死, 迅速开胸, 快速取下心脏放入改良的 K-H 缓冲液冰浴中洗净残血, 迅速主动脉插管悬挂心脏于改良的 Langendorff 灌流装置上^[5], 用改良的 K-H 缓冲液 (以 95% O_2 和 5% CO_2 饱和) 行主动脉逆行灌流 (速度 5 ~ 7 ml/min), 温度稳定在 37°C, 然后依据各组别进行处理。

1.2.3 TG6 对乳鼠心肌细胞缺氧再复氧损伤的影响 体外培养原代乳鼠心肌细胞^[7], 采用连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 引起的心肌细胞缺氧/复氧模型来考察 TG6 对缺氧/复氧损伤的影响^[8]。TG6 在复氧前给予, MTT 法测定心肌细胞存活率, 并测定细胞培养液中肌酸激酶 (CK) 含量以及细胞中 Ca^{2+} 的含量。

1.2.4 统计学分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS11.0 统计软件进行分析, 单因素方差分析进行组间显著性比较, 两组间样本均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TG6 对冠脉结扎造成 SD 大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的影响

2.1.1 TG6 对大鼠心肌梗死范围的影响 假手术组的心肌梗死区不明显, 而缺血再灌注模型组的心肌梗死范围明显 ($P < 0.01$)。给药组各组不同程度地减少了心肌梗死范围, 与模型组比较具有显著性

差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果显示, TG6 对冠脉结扎所致缺血再灌注损伤有明显的保护作用。结果见图 2。

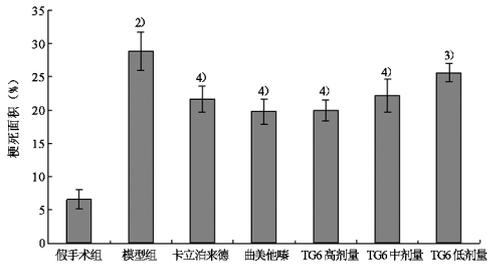


图 2 TG6 对缺血 45 min 后再灌注 90 min 的大鼠心肌梗死范围的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)
1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 与假手术组比较;
3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ 与模型组比较

2.1.2 TG6 对大鼠血清中 CK、LDH、T-SOD 活力及 MDA 含量的影响 模型组血清中 CK、LDH 活力、MDA 的含量明显高于假手术组, T-SOD 活力明显低于假手术组, 两者相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。TG6 高剂量组血清中 CK、LDH、T-SOD 活力、MDA 含量分别与卡立泊来德组、曲美他嗪组比较, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。TG6 投给剂量越大, 血清中 CK、LDH 活力和 MDA 含量越低, T-SOD 活力越高。结果显示, TG6 具有抗氧化损伤、减少过氧化产物的作用, 可减少缺血再灌注引起的心肌细胞膜损伤。结果见图 3、图 4。

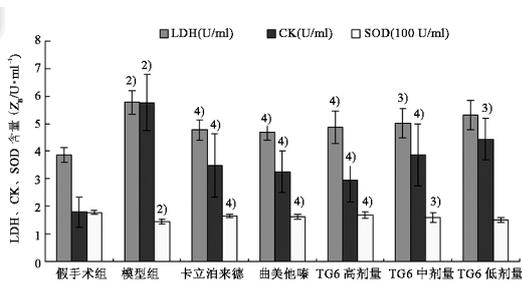


图 3 TG6 对缺血 45 min 后再灌注 90 min 的大鼠血清中 LDH、CK 和 SOD 含量的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)
1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 与假手术组比较;
3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ 与模型组比较

2.2 TG6 对离体大鼠心脏低灌复灌的影响 模型组复灌初和复灌末的冠脉流量明显低于对照组 ($P < 0.01$)。溶媒组与模型组无明显差异 ($P > 0.05$)。各给药组的复灌初和复灌末的冠脉流量都明显高于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果显示, TG6 有扩张冠状动脉的作用, 见图 5。模型组心肌组织中的

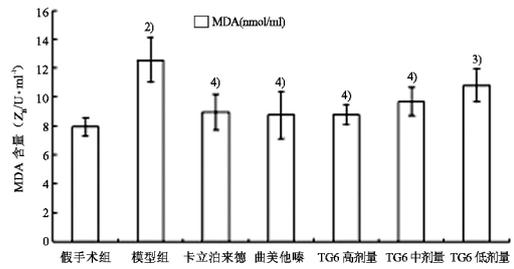


图 4 TG6 对缺血 45 min 后再灌注 90 min 的大鼠血清中 MDA 含量的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)
1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 与假手术组比较;
3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ 与模型组比较

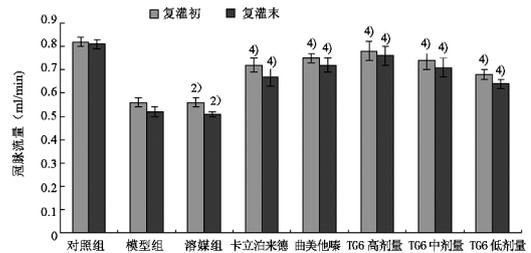


图 5 TG6 对 30 min 低灌后再复灌 30 min 的离体大鼠心脏冠脉血流量的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)
1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 与假手术组比较;
3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ 与模型组比较

CK、LDH、T-SOD 活力明显低于对照组 ($P < 0.01$), 而 MDA 含量明显高于对照组 ($P < 0.01$)。溶媒组与模型组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。各给药组心肌组织中的 CK、LDH、T-SOD 活力都明显高于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 MDA 含量低于模型组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。TG6 高剂量组心肌组织中的 CK、LDH、T-SOD 活力和 MDA 含量分别与曲美他嗪组和卡立泊来德组相比均无明显差异 ($P > 0.05$)。结果进一步提示, TG6 对离体心脏的缺血再灌注损伤也有保护作用, 见图 6、图 7。

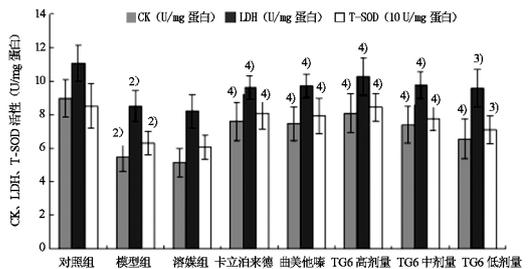


图 6 TG6 对 30 min 低灌后再复灌 30 min 的离体大鼠心脏中 CK、LDH 和 T-SOD 活性的影响 ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)
1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 与假手术组比较;
3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ 与模型组比较

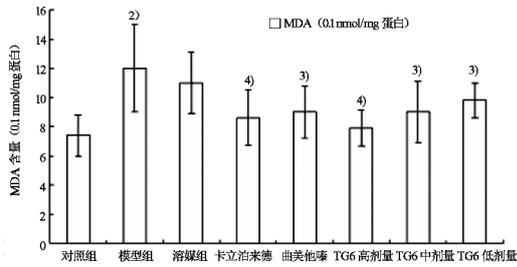


图 7 TG6 对 30 min 低灌后再灌 30 min 的离体大鼠心脏中 MDA 含量的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 与假手术组比较;
³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 与模型组比较

2.3 TG6 对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起乳鼠心肌细胞缺氧再复氧损伤的影响 与对照组比较,模型组细胞的存活率明显下降 ($P < 0.01$);同时细胞内 CK 释放率和 Ca^{2+} 含量也显著升高 ($P < 0.01$),均表明心肌细胞受到严重损伤、活性下降。复氧前给予药物孵育 1 h 后,与模型组比较,卡立泊来德组 (10^{-4} mol/L) 和 TG6 高、中剂量组 (10^{-4} 、 10^{-5} mol/L) 均不同程度地改善了心肌细胞的缺氧/复氧损伤,显著提高了乳鼠心肌细胞的存活率,明显降低了细胞内 CK 的释放率和 Ca^{2+} 含量 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。说明 TG6 对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 引起的缺氧/复氧损伤的心肌细胞有一定的保护作用。结果见表 1、表 2。

表 1 再灌注前给予 TG6 对乳鼠心肌细胞存活率的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度 ($C_B/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	活力 (A490)	存活率 (%)
对照组	0	0.831 ± 0.063	100.00
模型组	0	$0.439 \pm 0.039^{2)}$	52.83
卡立泊来德组	10^{-4}	$0.598 \pm 0.046^{2)}$	71.96
TG6 高剂量组	10^{-4}	$0.613 \pm 0.080^{2)}$	73.77
TG6 中剂量组	10^{-5}	$0.545 \pm 0.078^{1)}$	65.58
TG6 低剂量组	10^{-6}	0.461 ± 0.038	55.48

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 与对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 与模型组比较

细胞存活率 (%) = 给药组 OD 值/正常对照组 OD 值 \times 100%

表 2 再灌注前给予 TG6 对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 损伤的乳鼠心肌细胞中 Ca^{2+} 含量及 CK 释放率的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度 ($C_B/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($C_B/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CK 释放率 (%)
对照组	0	450.25 ± 117.84	6.56 ± 2.10
模型组	0	$1042.51 \pm 252.10^{2)}$	$22.05 \pm 2.72^{2)}$
卡立泊来德组	10^{-4}	$602.19 \pm 152.82^{2)}$	$12.20 \pm 1.92^{2)}$
TG6 高剂量组	10^{-4}	$574.47 \pm 127.29^{2)}$	$11.00 \pm 1.98^{2)}$
TG6 中剂量组	10^{-5}	$784.61 \pm 101.71^{1)}$	$16.92 \pm 3.42^{1)}$
TG6 低剂量组	10^{-6}	950.24 ± 165.81	20.75 ± 3.10

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 与对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 与模型组比较

3 结论

综上所述,笔者通过整体大鼠冠脉结扎缺血及再灌注实验,首次发现 TG6 能减轻心肌缺血再灌注损伤,具有减少自由基损伤的作用;通过离体大鼠心脏低灌复灌实验,首次发现 TG6 改善心肌缺血再灌注损伤的机制还与扩张冠状动脉、改善心肌组织能量代谢有关;通过乳鼠心肌细胞实验,首次发现 TG6 对心肌细胞的缺氧/复氧损伤有保护作用,可以稳定细胞膜、减少细胞内 Ca^{2+} 超载。结果显示, TG6 对心肌缺血再灌注具有显著的保护作用。

【参考文献】

- [1] 石燕燕,李树青. 心肌缺血再灌注损伤治疗进展[J]. 中国心血管病研究, 2007, 5(10): 777-779.
- [2] 胡若愚. 钠氢通道抑制剂在心脏缺血再灌注损伤中的保护作用[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(24): 2931-2933.
- [3] Lee SH, Kim T, Park ES, et al. NHE10, a novel osteoclast-specific member of the Na^+/H^+ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369(2): 320-326.
- [4] Kim JC, Woo SH. Role of Na^+/H^+ exchange in the modulation of L-type Ca^{2+} current during fluid pressure in rat ventricular myocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 431(2): 239-245.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 1042-1052.
- [6] 戴小燕,方秋娟. Langendorff 离体心脏灌注模型的制备及应用[J]. 医学综述, 2012, 13(13): 2036-2039.
- [7] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 2版,世界图书出版公司, 2008: 200-201.
- [8] 许蜀闽,王培勇,马红英,等. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 359-360.
- [9] 张新宁,吕琪,张永亮,等. 大鼠心肌缺血再灌注模型建立方法的改进[J]. 武警医学院学报, 2008, 17(11): 941-943.
- [10] 周燕. 心肌损伤标志物的研究进展与心肌梗死的诊断标准[J]. 临床医学, 2009, 22(12): 2860-2862.
- [11] Zhu X, Zuo L. Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia[J]. Cell Death Dis, 2013, 4:e787.
- [12] 赵芳,徐立,许立. 参附注射液对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的作用[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(1): 17-19.
- [13] 王丽艳,刘艳,李丹露,等. 胆碱对离体大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(5): 600-603.
- [14] 许蜀闽,王培勇,马红英,等. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 359-360.
- [15] Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K. Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca^{2+} overload[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 53(3): 233-239.

【收稿日期】 2013-10-09 【修回日期】 2014-03-19

【本文编辑】 李睿晨