

依达拉奉与缺血后处理对急性心肌缺血再灌注损伤的影响

张永明^{1a}, 王禹^{1a}, 刘秀华^{1b}, 张大为^{1a}, 张威^{1a}, 张国明^{1a}, 杨菲菲^{1a}

[摘要] 目的 观察依达拉奉进行药物后处理对急性心肌缺血再灌注损伤的影响。方法 40 只大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组(简称“再灌注组”)、缺血后处理组(简称“后处理组”)、依达拉奉动脉给药组(简称“动脉途径组”)和依达拉奉静脉给药组(简称“静脉途径组”),每组 8 只。建立大鼠急性心肌缺血再灌注模型,描记术中心电图变化,于再灌注末检测血流动力学指标,测定血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活力,采用伊文思蓝和三苯基氯化四氮唑(TTC)染色方法确定梗死以及缺血的心肌范围。结果 与再灌注组相比,后处理组、动脉途径组的心肌梗死范围明显减小,CK-MB、MDA 的水平明显降低($P < 0.01$),SOD 活力增加($P < 0.05$);静脉途径组与再灌注组相比,心肌梗死范围减小,CK-MB、MDA 水平降低,SOD 活力增加($P < 0.05$)。上述指标后处理组、动脉途径组和静脉途径组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 对于急性缺血的心肌,在再灌注前注射依达拉奉进行药物后处理可减轻心肌缺血再灌注损伤,保护强度与机械性缺血后处理接近,有效清除氧自由基,提高机体抗氧化应激能力是两者的共同机制;主动脉根部-冠脉注射途径给药的保护效果不逊于静脉注射途径。

[关键词] 缺血/再灌注损伤;缺血后处理;自由基;药物后处理

Effect of Edaravone and Ischemic Postconditioning on Acute Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury ZHANG Yong-ming, WANG Yu, LIU Xiu-hua, et al. The Department of Cardiology, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Edaravone pharmacological postconditioning and ischemic postconditioning on acute myocardial ischemia and reperfusion injury. **Methods** 40 rats were randomly divided into the sham operation group, ischemia/reperfusion group, ischemic postcondition group, Edaravone group A (injected through artery before reperfusion) and Edaravone group V (injected through vein before reperfusion) with 8 animals in each group. The animal model of acute myocardial ischemic and reperfusion was established. ECG changes were monitored during the procedure, dynamic parameters and serum biochemical markers creatine kinase MB (CK-MB), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) of different groups were assessed and evaluated at the end of reperfusion. Ischemic and infarct areas were measured by Evans blue and TTC staining respectively. **Results** The myocardial infarct area and levels of serum CK-MB, MDA all significantly reduced ($P < 0.01$) and activity of SOD enhanced ($P < 0.05$) in the ischemic postcondition group and Edaravone group A compared with the ischemia/reperfusion group. The myocardial infarct area and levels of serum CK-MB, MDA reduced and activity of SOD enhanced ($P < 0.05$) in the Edaravone group V compared with the ischemia/reperfusion group. There were no statistical differences in the foregoing indexes among the ischemic postcondition group, Edaravone group A and Edaravone group V group ($P > 0.05$). **Conclusion** Edaravone injected through artery just before the onset of coronary reperfusion can reduce myocardial infarct area, which is similar to the cardio protective effect of mechanical postconditioning. The common potential mechanism of them might be associated with decreasing the injury by reactive oxygen species and strengthening the resistance to oxidation stress. The effect of intra aorta root-coronary injection is not worse than that of intra vein

Key words: ischemia/reperfusion injury; ischemic postconditioning; free radical; pharmacological postconditioning

[中图分类号] R541.4 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2008)04-0311-03

[本文著录格式] 张永明,王禹,刘秀华,等.依达拉奉与缺血后处理对急性心肌缺血再灌注损伤的影响[J].中国康复理论与实践,2008,14(4):311-313.

缺血/再灌注损伤的防治是长期以来急性心肌缺血再灌注治疗研究领域的热点课题。近年来,国外学者提出了缺血后处理(ischemic postconditioning)这一新的心肌保护概念^[1],是指心肌缺血后,在长时间的再灌注之前,进行一次或数次短暂重复心肌缺血/再灌注,能提高心肌对之前发生的较长时间缺血的耐受性。与缺血预处理相比,缺血后处理在实施上有更好的可预测性及可控性,因此具有较好的临床应用前景^[2-4],部分动物实验^[5]和小样本临床研究^[6]已初步证实其有效性。

药物后处理(pharmacological postconditioning)是指在缺血后,再灌注之前通过使用模拟内源性保护机制的药物发挥后处理的保护作用^[2,5]。依达拉奉(Edaravone,3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮)是一种新型自由基清除剂,动物脑缺血再灌注实验显示,该药能高效清除病变部位的各种自由基,减轻脑缺血再灌注损伤,临床上用于治疗急性脑梗死患者取得一定疗效,因

此用于心肌缺血再灌注保护具有很大潜力^[7]。本研究旨在观察在体情况下,冠状动脉再灌注前给予依达拉奉注射进行药物后处理与缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用,并探讨其机制,为临床寻找缺血再灌注心肌保护的可行方法提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,购于军事医学科学院实验动物中心,许可证号 SCXK(军)2002-001,体重(280 ± 20)g;依达拉奉注射液(10 mg/5 ml)由先声药业提供(国药准字 H20031342);丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 模型制作 主要参考赵秀梅等的垫扎球囊法^[8]复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型。腹腔注射 20%乌拉坦(6 ml/kg)麻醉大鼠,仰卧固定,颈部正中切口,插入气管插管以 HX-200 型动物呼吸机辅助呼吸(潮气量 30 ml/kg,频率 48~50 次/min,吸呼比 1:2)。经右颈总动脉插入左心室导管,使用生物信号及压力测试系统(MFL1ab 200)监测血流动力学参数;描记标准肢体导联及前胸 V1、V3、V5 共 9 个导联的心电图。开

基金项目:国家自然科学基金科学部主任基金项目(No.30740080)

作者单位:1.解放军总医院 a.心血管内科;b.病理生理学研究室,北京市 100853。作者简介:张永明(1980-),男,山东寿光市人,硕士研究生,主要从事冠心病基础与临床研究。通讯作者:王禹。

胸后暴露心脏,剪开心包,在左心耳下缘与肺动脉圆锥间用 6-0 无创带针缝合线穿过前降支深部,将充盈的医用血管扩张球囊($\varnothing 2.5$ -L20)垫于血管与结扎线之间,用力结扎,观察结扎区域变白,局部心肌运动减弱,两个以上肢体导联或胸导联出现 ST 段明显上抬,提示结扎成功。45 min 后,用注射器将球囊快速抽空便可即刻实现前降支血流再灌注(以心电图相关导联 ST 段明显回落为判断标准),并持续 3 h。

1.2.2 实验分组 将动物随机分为 5 组(每组 8 只):①假手术组:开胸,分离左冠状动脉并穿线,不结扎,旷置 225 min;②心肌缺血再灌注组(以下简称“再灌注组”,实验中死亡 1 只,故补充 1 只):缺血 45 min,再灌注 3 h;③机械性缺血后处理组(以下简称“后处理组”):心肌缺血 45 min 后,再灌注前通过球囊放气-充盈实现 30 s 再灌注和 30 s 缺血反复 3 轮后,持续再灌注 3 h;④依达拉奉主动脉根部-冠脉途径给药组(以下简称“动脉途径组”):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,再灌注前 1 min 内将依达拉奉按 10 mg/kg 经动脉导管注入,继之再灌注 180 min;⑤依达拉奉静脉途径给药组(以下简称“静脉途径组”):再灌注前 1 min 内将依达拉奉按 10 mg/kg 经右股静脉注入。

1.2.3 监测并记录术中中心电变化 记录术中缺血时 ST 段抬高幅度,再灌注后 ST 段回落程度,再灌注后心律失常的发生及再灌注 3 h 出现 Q 波的导联数。

1.2.4 血流动力学指标 监测并记录各组再灌注 3 h 的血流动力学参数,包括心率(heart rate, HR)、颈动脉压和左心室压力最大上升、下降速度($+dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$)及左心室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)。

1.2.5 心肌缺血范围和梗死范围测定 再灌注 3 h 末原位结扎冠状动脉,经颈动脉插管注入 1%伊文氏蓝 2 ml,将非缺血心肌染成蓝色,从而显示缺血区心肌。剪去左心室外心脏的其余部分,按垂直于左心室长轴方向切片(厚 1~2 mm),置入 2% TTC 磷酸缓冲液(pH 7.4)中,37℃孵育 20 min。此时梗死区呈灰白色,非梗死区呈砖红色。置图像采集系统扫描后采用 Image-Pro Plus 图像分析软件分别计算各部分的面积。缺血的范围用缺血心肌面积(area at risk, AAR)与左心室(left ventricular, LV)面积之比表示,梗死范围以梗死心肌面积(area of nec-

rosis, AN)与 AAR 之比表示。

1.2.6 血清肌酸激酶同功酶(creatine kinase MB, CK-MB)、MDA、SOD 测定 于再灌注结束时经颈动脉插管抽取动脉血约 1.2 ml,3000 r/min 离心 10 min 分离留上清。全自动生化分析仪监测 CK-MB 活性;硫代巴比妥酸(TBA)法测算血清 MDA 活性;黄嘌呤氧化酶法测算血清 SOD 活力。

1.3 统计学处理 实验数据采用($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行分析,多组间比较应用单因素方差分析,组间两两比较应用 q 检验。

2 结果

2.1 5 组动物术中心电变化 再灌注组与后处理组、动脉途径组和静脉途径组相比,再灌注后 ST 段回落程度较低,再灌注 3 h 出现 Q 波导联较多,再灌注后室性心律失常的发生例数较多,但以上 4 组间的差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。再灌注组 1 例出现室颤并导致死亡,后处理组、动脉途径组和静脉途径组动物未出现致死性心律失常。

2.2 血流动力学指标 5 组动物在再灌注 180 min 时的 HR 差异无统计学意义($P>0.05$);经历了缺血过程的再灌注组、后处理组、动脉途径组和静脉途径组的平均动脉压(mean blood pressure, MBP)及左心室压力变化 $+dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 均低于假手术组($P<0.05$),反映了急性心肌梗死的血流动力学的病理生理变化;后处理组的 MBP 较再灌注组升高($P<0.05$),动脉途径组和静脉途径组的 MBP 较再灌注组升高,差异无显著性意义,但静脉途径组的 LVEDP 低于再灌注组($P<0.05$),动脉途径组的 LVEDP 明显低于再灌注组($P<0.01$);后处理组上述指标与动脉途径组和静脉途径组的差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 各组大鼠心电变化比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	再灌 5 min ST↑ %	再灌 3 h ST↑ %	3 h Q 波导联数	室性 心律失常	致死性 心律失常
假手术组	-	-	0	0	0
再灌注组	54.0±29.0	82.0±17.0	3.3±1.6	3	1
后处理组	70.0±9.0	94.0±7.5	2.4±1.2	2	0
动脉途径组	76.0±14.0	93.0±8.0	2.5±1.6	1	0
静脉途径组	71.0±13.0	92.0±13.0	2.4±1.1	1	0

注:上述指标再灌注组、后处理、动脉途径组和静脉途径组,与假手术组相比差异有非常显著性统计学意义($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠再灌注 180 min 时血流动力学指标比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	HR $F=1.8135$ $P=0.1310$	MBP (mmHg) $F=3.9988$ $P=0.0047$	$+dp/dt_{\max}$ (mmHg/s) $F=2.7602$ $P=0.0304$	$-dp/dt_{\max}$ (mmHg/s) $F=6.2373$ $P=0.0002$	LVEDP (mmHg) $F=4.2277$ $P=0.0033$
假手术组	355.28±39.22	116.63±10.95	977.58±118.70	672.52±119.05	23.32±5.10
再灌注组	298.99±70.34	94.95±11.48 ^d	609.36±210.86 ^d	335.30±154.29 ^d	42.44±11.44 ^d
后处理组	335.52±23.24	106.09±9.90 ^{a,c}	768.44±194.27	479.43±93.59 ^{a,d}	34.19±10.04 ^c
动脉途径组	316.26±45.08	103.52±8.45 ^c	746.99±268.72 ^c	489.94±176.34 ^{a,d}	30.26±8.13 ^b
静脉途径组	320.02±42.16	104.61±10.19 ^c	711.13±293.91 ^c	427.08±107.79 ^d	31.42±7.69 ^a

注:a.与再灌注组比较, $P<0.05$;b.与再灌注组比较, $P<0.01$;c.与假手术组比较, $P<0.05$;d.与假手术组比较, $P<0.01$ 。

2.3 心肌缺血范围和梗死范围 假手术组的心肌缺血范围为 0,其余各组实验动物冠脉结扎所造成的心肌缺血范围(AAR/LV)为(50.30±7.78)%,组间差异无统计学意义。后处理组和动脉途径组的梗死面积比再灌注组分别减小 54%和 45%,差异有非常显著性意义($P<0.01$),静脉途径组梗死面积比再灌注组减小 25%($P<0.05$),后处理组、动脉途径组和静脉途径组的组间差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1。

2.4 血清 CK-MB 活性 后处理组、动脉途径组的血清 CK-MB 活性明显低于再灌注组($P<0.01$),分别降低 59%、58%。静

脉途径组的 CK-MB 活性比再灌注组降低 42%($P<0.05$),见表 3。

2.5 血清 MDA、SOD 活性 与假手术组比较,再灌注组的血清 MDA 活性明显增高($P<0.01$),血清 SOD 活力降低($P<0.05$)。与再灌注组比较,后处理组、动脉途径组和静脉途径组的 MDA 的活性降低, SOD 活力增高($P<0.05$);动脉途径组的 SOD 活力有比后处理组增高的趋势。

3 讨论

急性冠脉综合征是目前临床上发生率最高、最为凶险、猝死

率最高的急症之一。血运重建进行及时的心肌再灌注可显著降低其死亡率,但潜在的再灌注损伤可能会引起心肌细胞坏死、凋亡加重、心肌顿抑及无复流现象,成为影响预后的一个重要因素。活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)在再灌注开始的前几分钟内生成过多是缺血再灌注损伤发病机制的重要环节。ROS 可通过脂质过氧化损伤蛋白质及生物膜,导致细胞内钙超载、DNA 断裂和细胞凋亡。因此,把握再灌注开始几分钟内的时间窗,有效清除再灌注时生成的大量自由基,减轻 ROS 的细胞毒性损伤对于再灌注心肌保护具有重要意义^[4,9,10]。

表 3 各组大鼠血清生化指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	CK-MB (IU/L)	MDA (nmol/ml)	SOD 活力 (U/ml)
	$F=5.4102$ $P=0.0006$	$F=7.9173$ $P=0.0001$	$F=3.2667$ $P=0.0140$
假手术组	14.9 ± 13.8	1.92 ± 0.84	102.10 ± 6.17
再灌注组	2832.4 ± 1575.2 ^d	4.66 ± 2.03 ^d	90.74 ± 11.44 ^c
后处理组	1154.0 ± 589.2 ^{b,c}	2.11 ± 0.72 ^b	100.37 ± 15.82 ^a
动脉途径组	1195.9 ± 1077.1 ^{b,c}	1.65 ± 0.50 ^b	108.39 ± 2.39 ^b
静脉途径组	1634.1 ± 1353.1 ^{a,b}	3.32 ± 0.93 ^{a,c}	102.67 ± 9.51 ^a

注:a.与再灌注组比较, $P < 0.05$; b.与再灌注组比较, $P < 0.01$; c.与假手术组比较, $P < 0.05$; d.与假手术组比较, $P < 0.01$ 。

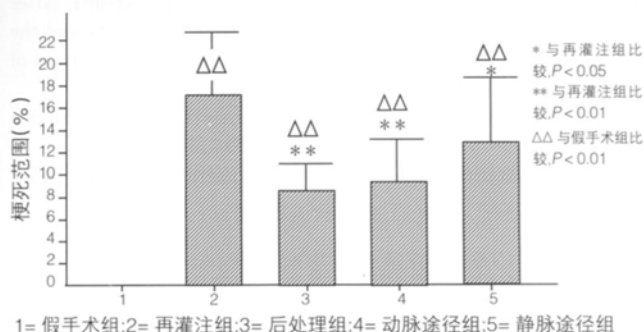


图 1 各组大鼠心肌梗死范围 (%) 比较

本实验建立了大鼠急性心肌梗死再灌注模型,且通过控制冠脉外垫扎球囊的放气-充气,实现了后处理的反复短暂缺血-再灌注时间的准确控制,心电图、心肌酶学、TTC 染色均显示急性心肌梗死构建成功。与心肌梗死再灌注组相比,机械性缺血后处理组、动脉途径组和静脉途径组均表现出心肌梗死面积减小、心肌酶释放减少、氧化应激反应减轻的保护效应,且血流动力学及心电活动相对较稳定。

MDA 是氧自由基攻击生物膜上的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用的标志产物,其血清水平的高低间接反映了机体受自由基攻击的严重程度。SOD 是超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 的清除剂, SOD 的活力反映了机体清除氧自由基、抗氧化应激的能力。与 Zhao^[11] 和 Kin^[10] 等的研究结果相近,本实验显示给予缺血后处理与依达拉奉药物后处理均能明显降低血清 MDA 水平并提高 SOD 的活力,表明机械性后处理与外源性给予依达拉奉药物后处理均可提高机体的抗氧化能力。如果选择合理的给药剂量和途径,依达拉奉药物后处理可起到接近于缺血后处理的心肌保护作用,两种方式减少过氧化产物的作用近似,从另一方面提示抑制自由基氧化应激损伤是缺血后处理保护的重要机制,也是机械性缺血后处理与依达拉奉药物后处理两者保护作用的共同机制。目前,对于依达拉奉保护机制的研究显示,除传统的抑制花生四烯酸脂氧合酶途径^[11]外,对羟自由基 ($\cdot OH$) 的有效清除可能是其产生强效心肌保护作用并区别于其他自由基清除剂的优势所在^[12]。

以往的文献中,进行药物后处理均采用静脉途径给药,而从理论上讲,如在主动脉根部给药因毗邻冠状动脉开口,可模拟冠脉内给药,增加冠脉内血药浓度和心肌药物灌注,提高给药效率。本实验基于此对依达拉奉药物后处理给药途径的选择进行了观察,两种给药方式都未见对血流动力学的不利影响,动脉给药组(主动脉根部给药)的梗死面积值和 CK-MB 释放值均小于静脉给药组(差异无统计学意义),表明主动脉根部给药的保护效果不逊于静脉途径,可能是一种临床上适宜的药物治疗方式。

临床上可以采用缺血后处理这一保护策略进行再灌注心肌保护,但其具有潜在危险性。例如,在直接经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术中,球囊在冠脉中反复扩张和放气可能会导致冠脉斑块破裂引起再狭窄或冠脉远端血栓栓塞。而药物后处理实施简易、安全,因此可能是后处理临床应用的一个重要方向。本实验结果显示依达拉奉作为一种可清除多种活性氧的强效自由基清除剂在再灌注开始时实施药物后处理进行心肌保护简易可行,安全有效。因此,临床上进行急诊介入血运重建抢救急性冠脉综合征患者时,可考虑在开通前冠脉内注射依达拉奉进行药物后处理以抑制再灌注早期严重的氧化应激,减轻缺血再灌注损伤,进一步改善患者的预后。最近,国外也有对急性心肌梗死患者行直接 PCI 时采用依达拉奉药物后处理减轻再灌注损伤的随机、安慰剂对照临床试验,显示依达拉奉是一种有效的再灌注器官保护药物^[13]。进一步积极开展缺血后处理及药物后处理的基础及临床研究,确定具体实施时间、操作方法、作用机制、临床安全性及有效性,对于防治缺血性心肌的再灌注损伤,具有十分重要的理论意义和临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. Am J Physiol (Heart Circ Physiol), 2003, 285(2): 579-588.
- [2] Kloner RA, Rezkalla SH. Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology [J]. Cardiovasc Res, 2006, 70: 297-307.
- [3] Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, et al. Postconditioning: A new link in nature's armor against myocardial ischemic reperfusion injury [J]. Basic Res Cardiol, 2005, 100: 295-310.
- [4] 刘秀华,唐朝枢.缺血再灌注损伤的防治—从实验室到临床[J].中华心血管病杂志, 2006, 34(8): 677-679.
- [5] Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury [J]. Cardiovasc Res, 2006, 70: 200-211.
- [6] Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart [J]. Circulation, 2005, 112(14): 2143-2148.
- [7] Higashi Y, Jitsuike D, Chayama K, et al. Edaravone, a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases [J]. Recent Patents Cardiovasc Drug Discovery, 2006, 1: 85-93.
- [8] 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, 2006, 11(3): 206-208.
- [9] Griending KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease [J]. Circulation, 1997, 96: 3264-3265.
- [10] Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(1): 74-85.
- [11] Yanagisawa A, Miyagawa M, Ishikawa K, et al. Cardioprotective effect of MCF-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) during acute ischemia reperfusion injury in rats [J]. Int J Angiol, 1994, 3: 12-15.
- [12] Onogi H, Minatoguchi S, Chen XH, et al. Edaravone reduces myocardial infarct size and improves cardiac function and remodeling in rabbits [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(11): 1035-1041.
- [13] Tsujita K, Shimomura H, Kawano H, et al. Effects of Edaravone on reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2004, 94: 481-484.

(收稿日期: 2007-11-15 修回日期: 2007-12-20)