

[文章编号] 1000-2200(2008)04-0383-03

· 基础医学 ·

亚牛磺酸对离体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

董淑英, 祝晓光, 韦颖梅, 童旭辉, 廖松岩, 钱江华

[摘要] **目的:** 观察亚牛磺酸对离体大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响, 探讨其保护的可能机制。 **方法:** 应用 Langendorff 恒压灌注大鼠心脏, 停灌/复灌方式制备缺血再灌注模型。观察缺血/再灌注期间心脏收缩期左室内压上升的最大变化速率 ($+LVdp/dt_{max}$)、舒张期左室内压下降的最大变化速率 ($-LVdp/dt_{max}$) 及左室发展压 (LVDP) 及心率 (HR); 采用比色法检测大鼠乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量的变化。 **结果:** 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 亚牛磺酸可以增加缺血/再灌注损伤后心脏 $\pm LVdp/dt_{max}$ 、LVDP 及 HR ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 降低流出液中 LDH 水平 ($P < 0.01$), 增加心肌组织中 SOD 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 减少心肌组织中 MDA 的生成 ($P < 0.01$)。 **结论:** 亚牛磺酸可拮抗缺血/再灌注引起的心脏收缩及舒张功能障碍, 其保护机制可能与增加心肌清除氧自由基的能力及改变心肌细胞膜稳定性有关。

[关键词] 心肌再灌注损伤; 亚牛磺酸; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 542.2 [文献标识码] A

Role of hypotaurine in prevention of myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of rats

DONG Shu-ying, ZHU Xiao-guang, WEI Ying-mei, TONG Xu-hui, LIAO Song-yan, QIAN Jiang-hua

(Department of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of hypotaurine on ischemia/reperfusion injury (IRI) in isolated hearts in rats and to study its mechanism. **Methods:** The ischemia/reperfusion (I/R) model of isolated perfused hearts was established by stopping and reperusing Krebs-Henseleit (KH) fluid to the hearts of the rats. The changes of maximal rate of the pressure ($+LVdp/dt_{max}$) increase, maximal rate of the pressure ($-LVdp/dt_{max}$) decrease, left ventricular developed pressure (LVDP) of heart and heart rate (HR) were observed. Colorimetric method was used to assay the activity of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA). **Results:** In the presence of 10^{-6} or 10^{-5} mol/L hypotaurine, $\pm LVdp/dt_{max}$ was higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the leakage of myocardial LDH was attenuated ($P < 0.01$), the SOD activity was increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the content of MDA was decreased after reperfusion ($P < 0.01$). **Conclusions:** Hypotaurine can prevent ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts, the mechanism of which may be related to its ability of clearing the oxygen-derived free radicals and stabilizing the cell membrane of the myocardium.

[Key words] myocardial reperfusion injury; hypotaurine; rats

急性心肌梗死发生的主要原因是冠状动脉粥样硬化, 且其病死率相当高。冠状动脉搭桥术及冠脉介入治疗是常规的治疗急性心肌梗死的有效方法^[1]。但许多患者在冠脉搭桥手术后由于心肌缺血再灌注损伤, 严重影响心肌梗死的治疗效果及预后, 因此心肌缺血再灌注损伤的防治在临床上有着非常重要的意义。牛磺酸是心脏中含量最为丰富的氨基酸, 已有大量文献报道其在心肌缺血再灌注损伤时大量释放, 外源性补充之可减轻这种损伤。亚牛磺酸 (hypotaurine) 为牛磺酸的前体物质, 其化学结构与牛磺酸相似, 且还原性更强, 本身具有强大的

抗氧化作用, 而且对脑缺血损伤具有一定的保护作用^[2,3]。本实验拟在离体大鼠模型中观察亚牛磺酸对心肌缺血再灌注损伤的影响, 并初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 亚牛磺酸为 Sigma 公司产品, 乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 均为南京建成生物公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 动物 SD 大鼠购自郑州大学实验动物中心, 清洁级, 体重 (300 ± 20) g, 雌雄兼用。

1.1.3 仪器 Powerlab/16sp 数据采集和分析多导系统 (AD Instruments Australia); Langendorff 心脏灌注系统及 chart 5 生物信号采集处理系统 (AD

[收稿日期] 2008-02-27

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2006kj125C)

[作者单位] 蚌埠医学院 药理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 董淑英 (1974 -), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 心脑血管药理学和药物动力学。

Instruments Australia); TU-1800 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 实验大鼠术前禁食过夜,自由饮水。腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉,股静脉注射 1% 肝素 0.1 ml/100 g 抗凝,然后迅速取出大鼠心脏,剪去左心耳,置于 Langendorff 灌流装置上行主动脉逆行灌注 Krebs-Henseleit (KH) 液,37 °C 恒温,100 cmH₂O 恒压,并以 95% O₂ ~ 5% CO₂ 饱和。从房室瓣插入带球囊的心导管抵左心室,充盈球囊使左心室舒张末压在 10 mmHg。使用 Powerlab 仪记录心率 (HR)、左心室发展压 (left ventricular developed pressure, LVDP, LVDP = 左室收缩压 - 左室舒张压) 及左室内压最大变化速率 (± LVdp/dt_{max})。

1.2.2 实验分组 SD 大鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只。(1) 对照组 (C 组): KH 液灌流心脏 80 min; (2) 缺血/再灌注组 (I/R 组): KH 液灌流平衡 20 min 后,停灌 30 min,复灌 30 min; (3) 亚牛磺酸

组: 分别用含 10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 亚牛磺酸的 KH 液灌流 20 min,停灌 30 min,含 10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L 亚牛磺酸的 KH 液复灌 30 min。

1.2.3 LDH 测定 各组复灌 30 min 时收集灌流液,按试剂盒说明书检测灌流液中 LDH 的活性。

1.2.4 SOD 及 MDA 测定 复灌结束后迅速取左心室心肌,按每克心肌加入 10 ml 0.9% 生理盐水的比例制成 10% 组织匀浆,离心收集上清, -80 °C 保存,蛋白含量测定采用 BCA 法,按试剂盒说明书测定心肌组织中 SOD 及 MDA 含量。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 亚牛磺酸对心功能的影响 I/R 组再灌注 30 min 后, LVDP、± LVdp/dt_{max}、HR 值显著降低,提示心脏的舒缩功能明显受损。亚牛磺酸组 LVDP、± LVdp/dt_{max}、HR 值均显著升高,提示亚牛磺酸可使缺血再灌注损伤所致的心脏功能障碍明显减轻 (*P* < 0.05 ~ *P* < 0.01) (见表 1)。

表 1 亚牛磺酸对缺血再灌注后心功能的影响 (*n*₁ = 10; $\bar{x} \pm s$)

分组	灌注 20 min	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}	再灌 30 min	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
LVDP (mmHg)								
C 组	70.9 ± 9.8				72.8 ± 17.8			
I/R 组	71.2 ± 10.8	0.03	>0.05	104.595	37.3 ± 15.4 ^{△△}	7.53	<0.01	314.643
10 ⁻⁶ mol/L 亚牛磺酸组	70.8 ± 12.1				55.9 ± 17.9*			
10 ⁻⁵ mol/L 亚牛磺酸组	72.1 ± 7.7				65.7 ± 19.6**			
+ dp/dt _{max} (mmHg/s)								
C 组	2 067 ± 282				2 061 ± 340			
I/R 组	2 130 ± 331	1.32	>0.05	97 905.500	1 150 ± 190 ^{△△}	18.47	<0.01	89 309.250
10 ⁻⁶ mol/L 亚牛磺酸组	2 075 ± 296				1 431 ± 241*			
10 ⁻⁵ mol/L 亚牛磺酸组	2 311 ± 339				1829 ± 384**			
- dp/dt _{max} (mmHg/s)								
C 组	-1 293 ± 210				-1 261 ± 181			
I/R 组	-1 354 ± 202	0.86	>0.05	57 637.250	-715 ± 148 ^{△△}	16.96	<0.01	31 747.250
10 ⁻⁶ mol/L 亚牛磺酸组	-1 290 ± 211				-890 ± 168*			
10 ⁻⁵ mol/L 亚牛磺酸组	-1 440 ± 318				-1 045 ± 210**			
HR (次/分)								
C 组	256 ± 30				264 ± 18			
I/R 组	261 ± 36	0.39	>0.05	921.500	190 ± 14 ^{△△}	29.44	<0.01	334.500
10 ⁻⁶ mol/L 亚牛磺酸组	259 ± 31				209 ± 23*			
10 ⁻⁵ mol/L 亚牛磺酸组	270 ± 23				221 ± 17**			

q 检验: 与 C 组比较 $\Delta P < 0.01$; 与 I/R 组比较 * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.2 亚牛磺酸对缺血再灌注心肌 LDH、SOD 和 MDA 的影响 缺血再灌注组在 30 min 复灌后 LDH

含量明显增高 (*P* < 0.01), 提示灌流液中有大量的 LDH 漏出。与缺血再灌注组相比, 亚牛磺酸可使缺

血再灌注损伤所致的 LDH 的漏出明显减少 ($P < 0.01$), 10^{-5} mol/L 浓度的亚牛磺酸效果更好 ($P < 0.01$)。缺血再灌注组在 30 min 复灌后 SOD 明显降低, MDA 明显增加 ($P < 0.01$)。亚牛磺酸组与缺血再灌注组比, SOD 明显升高, MDA 明显降低 ($P < 0.01$) (见表 2)。

表 2 亚牛磺酸对缺血再灌注后心肌 LDH、SOD、MDA 的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	LDH(u/L)	SOD(u/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
C 组	104.5 ± 36.1	31.5 ± 5.8	1.94 ± 0.25
I/R 组	527.8 ± 63.8 ^{△△}	20.1 ± 2.7 ^{△△}	7.58 ± 0.63 ^{△△}
10^{-6} mol/L 亚牛磺酸组	277.5 ± 55.0 ^{**}	26.0 ± 3.2 ^{**}	4.47 ± 0.54 ^{**}
10^{-5} mol/L 亚牛磺酸组	151.9 ± 30.2 ^{**#}	28.1 ± 5.2 ^{**}	3.71 ± 0.41 ^{**#}
F	154.33	11.72	241.43
P	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	2 327.673	19.553	0.230

q 检验: 与 C 组比较 $\Delta \Delta P < 0.01$; 与 I/R 组比较 $** P < 0.01$; 与 10^{-6} mol/L 亚牛磺酸组比较 $\# P < 0.01$

3 讨论

牛磺酸作为一个在心脏中含量丰富的氨基酸, 对心肌缺血再灌注损伤具有良好的防治作用, 其机制主要涉及到膜稳定作用、抗脂质过氧化损伤、改善血液流变学、减轻钙超载及减少细胞凋亡^[4,5]。亚牛磺酸是牛磺酸的结构类似物及前体物, 体内可在氧化酶的作用下转化为牛磺酸发挥作用。亚牛磺酸本身亦有抗氧化作用^[6-8]。脑缺血时海马组织释放牛磺酸增多^[2], 亚牛磺酸可促进牛磺酸的释放^[3], 提示亚牛磺酸具有一定的抗脑缺血作用。

本研究选用的是大鼠离体心脏缺血/再灌注模型中目前较成熟且应用较广的 Langendorff 模型。排除了在体心脏受神经、体液等多种因素的影响, 同时也排除了药物分布、代谢因素的干扰, 从而观察药物对心脏的直接作用。

在反映心功能的指标中 LVDP 反映了左室收缩功能。心肌收缩和舒张速率同样也是常用的衡量心肌收缩功能的指标, $+LVdp/dt_{max}$ 代表等容收缩期左室内压力及其最大上升速率, 在一定程度上显示心室壁肌张力的变化, 从而反映心肌纤维收缩性能的改变; 心肌舒张性能参数 $-LVdp/dt_{max}$ 变异程度较小, 代表等容舒张期左室内压力最大下降速率, 是反映舒张性能的较好指标。在本实验中缺血再灌

注组心脏的 LVDP、HR、 $\pm LVdp/dt_{max}$ 明显降低, 提示心脏功能明显受损。亚牛磺酸组在再灌注期间可使心脏 $\pm LVdp/dt_{max}$ 显著增高, 表明亚牛磺酸可改善缺血/再灌注心脏收缩及舒张性。

在缺血再灌注损伤中, 氧自由基发挥了重要作用, 脂质过氧化导致心肌细胞膜受损, 脂质代谢产物 (如 MDA) 水平升高, 是心肌缺血再灌注损伤的重要机制之一。心肌在变性、坏死时细胞内无氧代谢加强, LDH 的生成增加。因此 LDH 和 MDA 的含量以及 SOD 活性可作为自由基损伤的依据。缺血再灌注组的渗出液中 LDH 含量明显增高, 提示缺血再灌注时心肌细胞膜稳定性下降, 而亚牛磺酸可以降低 LDH 含量, 这反映了它可以增加心肌细胞膜的稳定性。亚牛磺酸可提高 SOD 活性, 减少 MDA 的含量, 提示它可以通过清除氧自由基, 抑制脂质过氧化作用, 从而减轻心肌细胞膜的损伤。

总之, 本研究显示亚牛磺酸可拮抗缺血/再灌注引起的心脏收缩及舒张功能障碍, 其作用机制可能与增强心肌清除氧自由基的能力、抗脂质过氧化及稳定心肌细胞膜有关。

[参 考 文 献]

- [1] Hong YJ, Jeong MH, Lee SH, et al. The long-term clinical outcomes after rescue percutaneous coronary intervention in patients with acute myocardial infarction [J]. *J Interv Cardiol*, 2003, 16(3): 209-216.
- [2] Saransaari P, Oja SS. Characteristics of ischemia-induced taurine release in the developing mouse hippocampus [J]. *Neuroscience*, 1999, 94(3): 949-954.
- [3] Saransaari P, Oja SS. Mechanisms of ischemia-induced taurine release in mouse hippocampal slices [J]. *Brain Res*, 1998, 807(1-2): 118-124.
- [4] 董淑英, 祝晓光, 吴华璞. 牛磺酸对心脏作用的研究进展 [J]. *淮海医药*, 2005, 23(3): 258.
- [5] Huxtable RJ. Physiological actions of taurine [J]. *Physiol Rev*, 1992, 72(1): 101-163.
- [6] Dawson R Jr, Baker D, Eppler B. Taurine inhibition of metal-stimulated catecholamine oxidation [J]. *Neurotox Res*, 2000, 2(1): 1-15.
- [7] Messina SA, Dawson R Jr. Attenuation of oxidative damage to DNA by taurine and taurine analogs [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 483: 355-367.
- [8] Suzuki C, Yoshioka K, Sakatani M, et al. Glutamine and hypotaurine improves intracellular oxidative status and *in vitro* development of porcine preimplantation embryos [J]. *Zygote*, 2007, 15(4): 317-324.