

一种抗心肌缺血/再灌注损伤的新化合物的合成及心肌保护作用研究

刘文冲¹, 孙晓莉², 季乐乐¹, 王海波², 张海锋¹, 李嘉¹,
石磊¹, 景临林², 高峰^{1*}

(第四军医大学 1. 生理学教研室; 2. 药化教研室, 西安 710032)

摘要: 在心肌缺血/再灌注 (MI/R) 时, 一氧化氮 (NO) 生成量减少, 氧自由基 (ROS) 大量堆积, 均可加重 MI/R 损伤。据此设计合成了可同时释放 NO 的 ROS 清除剂——乙酰阿魏单硝酸异山梨醇酯 (AFI), 并研究了 AFI 对 MI/R 大鼠的心肌保护作用及其作用机制。建立常规大鼠 MI/R (30 min/3 h) 模型, 随机给予 AFI (10 mg·kg⁻¹)、阿魏酸 (40 mg·kg⁻¹) 或单硝酸异山梨醇酯 (30 mg·kg⁻¹) 药物治疗 (ig), 再灌注末检测大鼠心肌梗死面积和心功能指标, 同时测定血清肌酸激酶、乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢与丙二醛水平及 NO 含量。与阿魏酸钠、单硝酸异山梨醇单独治疗组或联合治疗组相比, AFI 治疗组心肌梗死面积显著减小 ($n = 8, P < 0.01$), 左室发展压、左室等容收缩/舒张期压力上升或下降最大速率显著提高 ($n = 8, P < 0.05$), 血清肌酸激酶和乳酸脱氢酶活性显著降低。与阿魏酸钠或单硝酸异山梨醇单独治疗组相比, AFI 治疗组血清超氧化物歧化酶活性增加、过氧化氢与丙二醛含量降低而 NO 含量显著升高 ($n = 8, P$ 均 < 0.05)。这些结果表明, AFI 这一新化合物可减轻大鼠 MI/R 损伤, 具有保护心脏功能, 其心肌保护作用比阿魏酸钠、单硝酸异山梨醇的单独使用或联合使用均强。

关键词: 乙酰阿魏单硝酸异山梨醇酯; 心肌缺血/再灌注损伤; 活性氧自由基; 一氧化氮

中图分类号: R916.4; R962

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 03-0321-06

Synthesis and cardioprotective effect of a novel anti-ischemic / reperfused injury compound

LIU Wen-chong¹, SUN Xiao-li², JI Le-le¹, WANG Hai-bo², ZHANG Hai-feng¹,
LI Jia¹, SHI Lei¹, JING Lin-lin², GAO Feng^{1*}

(1. Department of Physiology, 2. Department of Chemistry, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: The aim of present study is to investigate the cardioprotective effect of a new compound acetyl ferulaic isosorbide (AFI), composed of ferulaic acid (FA) and isosorbide mononitrate (ISMN) by esterification in myocardial ischemia/reperfusion (MI/R). Male Sprague-Dawley rats, subjected to 30 minutes of myocardial ischemia and 3 hours of reperfusion, randomly received one of the following treatments separately: SHAM, I/R (MI/R + solvent), SF (MI/R+SF, 40 mg·kg⁻¹, ig), ISMN (MI/R + ISMN, 30 mg·kg⁻¹, ig), SF + ISMN (MI/R + SF + ISMN, 40 mg·kg⁻¹ + 30 mg·kg⁻¹, ig) and AFI (MI/R + AFI, 10 mg·kg⁻¹, ig). Left ventricle developed pressures (LVDP) and the maximal first derivative of developed pressure ($\pm dP/dt_{max}$) were monitored throughout the experiments. Myocardial infarction size, serum creatine kinase (CK) activity, lactate dehydrogenase (LDH) activity, superoxide dismutase (SOD) activity, hydrogen peroxide (H₂O₂), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) production were determined at the end of reperfusion. Compared with SF, ISMN or SF + ISMN treatment groups, AFI treatment decreased infarction size ($n = 8, P < 0.01$), improved cardiac function as evidenced by increased LVDP and $\pm dP/dt_{max}$ ($n = 8, P < 0.05$), increased serum SOD activity, reduced serum CK

收稿日期: 2008-10-27.

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目 (30625033); 国家自然科学基金资助项目 (30370525).

*通讯作者 Tel: 86-29-84776423, E-mail: fgao@fmmu.edu.cn

and LDH activities, H_2O_2 and MDA production ($n = 8, P < 0.05$). The new compound AFI showed a stronger cardioprotective effect against MI/R injury than SF, ISMN or their combined administration did.

Key words: acetyl ferulaic isosorbide; myocardial ischemia/reperfusion injury; reactive oxygen species; nitric oxide

目前, 缺血性心脏病已成为威胁人类健康的重大疾病之一。缩短组织缺血时间、尽早恢复血流是防治缺血损伤最有效的措施, 溶栓、经皮冠状动脉成形术和冠状动脉旁路移植术等血管再通术可有效地恢复缺血组织的供血, 但上述疗法都存在一个心肌缺血/再灌注 (MI/R) 损伤的问题。大量证据表明, MI/R 早期即出现内源性一氧化氮 (NO) 生成量降低, 该变化可诱发中性粒细胞激活, 加剧心肌损伤^[1]。作者及其他实验室前期工作均表明, NO 具有扩张小血管^[2]、改善缺血心肌灌注、增加心肌收缩力^[3]、抗炎^[4]、抗凋亡^[5]等作用。因此, 临床上常用硝酸酯类药物作为外源性 NO 供体减轻 MI/R 损伤。单硝酸异山梨醇 (isosorbide mononitrate, ISMN, 图 1) 即是一种广泛应用于临床的 NO 供体药物, 可在体内迅速释放 NO。

此外, MI/R 早期的氧自由基 (ROS) 大量生成, 通过脂质过氧化反应破坏心肌细胞膜, 这是造成心脏损伤的最主要的原因。作者发现 NO 生成过多对 MI/R 产生显著不良作用的原因在于再灌注时暴发产生的 ROS 与 NO 反应生成的过氧亚硝基阴离子 ($ONOO^-$)^[6]。阿魏酸 (ferulaic acid, FA, 图 1) 是从中药川芎中提取的一种有效成分, 可通过提高心肌对 ROS 的清除能力来保护缺血心肌。

再灌注时 NO 生成量降低可加重心肌损伤, 但是, 如果给予 NO 供体药物治疗, 它可与再灌注期间过度生成的 ROS 反应生成 $ONOO^-$ 显著加重损伤。可见, NO 在 MI/R 损伤中是一把“双刃剑”, 根据中国传统的“扶正抑邪”理念, 设计合成了可同时释放 NO 的 ROS 清除剂—乙酰阿魏单硝酸异山梨醇酯 (acetyl ferulaic isosorbide, AFI, 图 1), 并探讨其在 MI/R 损伤中是否具有比阿魏酸钠 (sodium ferulate, SF) 和 ISMN 更好的心肌保护效果。

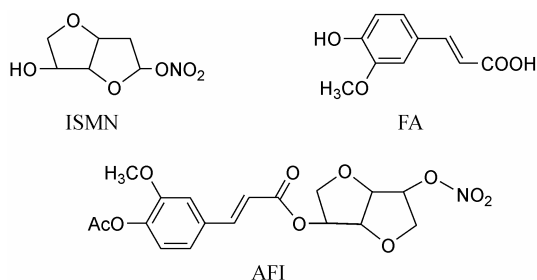


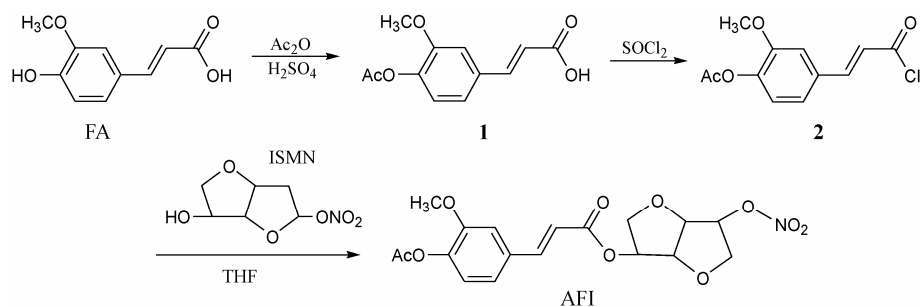
Figure 1 Structures of isosorbide mononitrate (ISMN), ferulaic acid (FA) and acetyl ferulaic isosorbide (AFI)

材料和方法

材料 Sprague-Dawley 雄性大鼠, 体质量 200~250 g, 由第四军医大学实验动物中心提供, 清洁级 II 级, 动物合格证号 SCXK (军) 2007-007; FA 和 ISMN (上海化学试剂一厂); 二氯亚砷 ($SOCl_2$)、三乙胺 (Et_3N) (天津化学试剂二厂); 四氢呋喃 (THF) (天津市博迪化工有限公司); 阿魏酸钠 (sodium ferulate, SF) (成都恒达药业有限公司); 肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢 (H_2O_2)、丙二醛 (MDA)、NO 试剂盒 (南京建成公司); RM-6280 多道生理记录和分析处理系统 (成都仪器厂)。

AFI 的合成 合成路线见合成路线图 1。将 1.94 g (10 mmol) 阿魏酸加入到 5 mL 乙酸酐中, 室温搅拌下, 滴加一滴浓 H_2SO_4 , 继续反应 5 min, 将反应液倒入 20 mL 冰水中, 慢慢析出白色固体。用少量水洗涤白色固体, 乙酸乙酯重结晶, 可得乙酰化产物 **1**。称取 2.36 g (10 mmol) 化合物 **1**, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 缓慢加入新蒸的二氯亚砷 10~15 mL, 搅拌, 回流反应 3 h。反应完毕后降至室温, 减压除去残余的二氯亚砷, 析出固体, 得产物 **2**。称取单硝酸异山梨醇 2.02 g (10.6 mmol), 加入新蒸 THF 100 mL, 室温搅拌至全溶, 同时加入 4.2 mL 三乙胺。将 3.02 g 化合物 **2** (10 mmol) 溶解于 10 mL THF 中, 缓慢滴加到单硝酸异山梨醇的溶液中, 室温反应 8~12 h, TLC 检测 (乙酸乙酯-石油醚 3:2) 反应完全后, 将反应液过滤, 旋干, 柱层析分离 (乙酸乙酯-石油醚 3:2), 得目标产物 2.99 g, 总收率 73%, 熔点 162.5~163 °C。¹H NMR δ : 7.64 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H-C=C), 7.04~7.26 (m, 3H, Ar-H), 6.34 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, C=C-H), 5.38 (br s, 2H, Cy-H), 5.02~5.4 (m, 1H, Cy-H), 4.56~4.58 (m, 1H, Cy-H), 3.85~4.10 (m, 7H, Cy-H, OCH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3); IR (cm^{-1}): 2 930, 1 760, 1 710, 1 635, 1 625, 1 270, 1 250, 1 070, 1 040, 915, 855, 750; HRMS (ESI) $[M+Na]^+$: Calcd. $C_{18}H_{19}NNaO_{10}$: 432.090 7; Found. 432.090 1。

AFI 量效曲线 采用 GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) 统计软件, 用 Hill 方程 $Y = 100 / \{1 + EC_{50} / [S]\}^n$ 拟合得到 AFI 剂量对血清中 NO 含量影响的量效曲线。



Scheme 1 The synthesis of AFI

心肌缺血模型的制备及实验方案 将SD大鼠以 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠 ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 经腹腔注射麻醉后,按常规方法制备大鼠MI/R (30 min/3 h) 模型^[7]:颈正中切口气管插管,连接呼吸机行正压人工呼吸。经右颈总动脉插管至左心室记录左室压及其微分。开胸暴露心脏,5-0 丝线结扎左冠状动脉前降支中上 1/3 处,心电图 ST 段抬高为结扎成功指标。缺血 30 min 后松开丝线,再灌注 3 h。将大鼠随机分为以下 6 组:假手术组 (SHAM); 心肌缺血/再灌注 (MI/R) 组 (I/R); MI/R + SF 组 (SF, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); MI/R + ISMN 组 (ISMN, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); MI/R + SF + ISMN 组 (SF, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; ISMN, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); MI/R + AFI 组 (AFI, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。AFI 治疗组手术前 2 h 给药 (ig), 其他治疗组手术前 15 min 给药 (ig), 剂量根据药品说明书和新药的药效曲线确定。

心脏功能检测 通过多导生理记录仪 (RM-4200) 持续监测大鼠心电图及血流动力学各指标。心电图、左室发展压 (LVDP)、左室等容收缩/舒张期压力上升或下降最大速率 ($\pm \text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) 等均通过数据分析系统由计算机自动采集、记录并计算^[7]。

CK、LDH、SOD 活性及 H_2O_2 、MDA 水平检测 于再灌注 3 h 后由颈动脉取血 2 mL, 常温静置 30 min 后, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取血清, 严格按照试剂盒说明书操作, 检测 CK、LDH、SOD 的活性和 H_2O_2 、MDA 的含量。

NO 水平检测 利用硝酸还原酶法检测 NO 含量。NO 在生物体内经历一系列化学反应, 最终形成相对稳定的氧化产物亚硝酸盐 NO_2^- 和硝酸盐 NO_3^- , 利用硝酸还原酶法先把血清 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 在 pH 7.5~8.1 条件下, NO_2^- 与对氨基苯磺酸发生重氮化, 再与 N-(1-萘基)-乙二胺偶联生成深紫红色的偶氮化合物, 用酶标仪 (Molecular Devices 公司 SpectraMAX190) 测定其吸收度以确定 NO 浓度。

心肌梗死范围测定 按本室建立的方法检测心肌梗死范围^[7]。简述如下: 再灌注 3 h 结束后, 再次

结扎冠脉, 向左心室腔注入 2% 伊文蓝 (1~2 mL)。迅速取出心脏, 冻存于 -20°C 。用心脏切片器垂直于心脏长轴将其切成 1 mm 厚的薄片, 分片置于含 2 mL 1% TTC (pH 7.4) 的 12 孔培养皿中, 37°C 孵育 15 min。用数码相机拍照并输入计算机。采用单盲法分别将伊文蓝染色区 (非缺血区)、TTC 染色区 (红染, 缺血但仍存活组织) 以及非 TTC 染色区 (梗死心肌), 用 Sigma Scan 面积测算软件进行计算处理。心肌梗死范围以每一心脏总梗死面积 (INF) 占总缺血区面积 (AAR) 的百分比表示^[8]。

统计学处理 采用 GraphPad Prism software 5.0 统计软件进行统计学分析和曲线拟合, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 。多组间数据比较采用方差分析 (ANOVA), 若总体差异显著, 再以 *t* 检验分析相应两组间的显著性差别。以 $P < 0.05$ 为差异显著的界限。

结果

1 AFI 量效曲线

Hill 方程 $Y = 100 / \{1 + \text{EC}_{50} / [S]\}^h$ 拟合得到 AFI 剂量对血清中 NO 含量影响的量效曲线 ($n = 6$), 求得半数最大效应浓度为 7.02 mg (图 2), 式中 *Y* 为血清中 NO 含量, 公式中 [*S*] 为 AFI 的各个不同浓度, *h* 为 Hill 系数。

2 心功能检测

为观察 AFI 对缺血心肌是否具有保护作用, 监测了大鼠血流动力学指标。缺血前各指标 baseline 值无明显差异。再灌注后, 各组间心率 (HR) 无统计学差异; LVDP 值正常对照组为 (22 ± 3) kPa, MI/R 组比 SHAM 组有显著降低 [(5.9 ± 1.4) vs. (22 ± 3) kPa, $n = 8$, $P < 0.01$], SF [(10.8 ± 1.3) kPa, $n = 8$, $P < 0.05$], ISMN [(11.2 ± 1.0) kPa, $n = 8$, $P < 0.01$], SF + ISMN [(13.1 ± 1.1) kPa, $n = 8$, $P < 0.01$] 和 AFI [(15.7 ± 1.6) kPa, $n = 8$, $P < 0.01$] 均使 LVDP 较 I/R 组有显著升高, AFI 组较 SF + ISMN 组也有明显升高 ($P < 0.05$); 左室内压微分也有相似趋势, 正常对

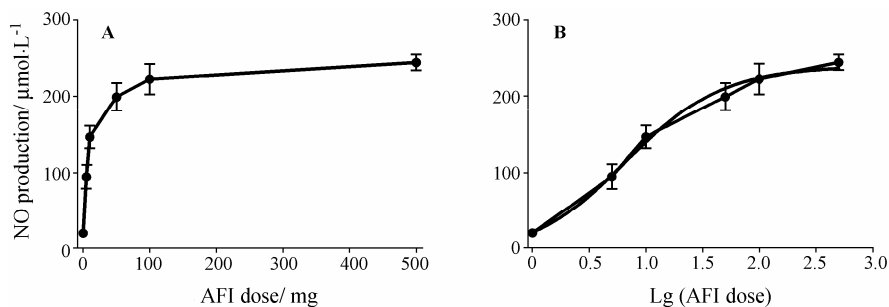


Figure 2 Concentration-effect relationship of AFI. $\bar{x} \pm s, n = 6$. The right curve is the regression curve of using Log function on Dose of AFI. The concentration for 50% of maximum effect (EC_{50}) coming from regression equation is 7.02 mg

对照组 $+dP/dt_{max}$ 值为 $(545 \pm 40) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}$, $-dP/dt_{max}$ 值为 $(-551 \pm 33) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}$, MI/R 组 $+dP/dt_{max}$ 较 SHAM 组显著降低 $[(140 \pm 38) \text{ vs } (533 \pm 35) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}, n = 8, P < 0.01]$, $-dP/dt_{max}$ $[(-171 \pm 42) \text{ vs } (-536 \pm 25) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}, n = 8, P < 0.01]$, SF $[(256 \pm 64) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}, (-298 \pm 40) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}]$ 、ISMN $[(249 \pm 46) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}, (-307 \pm 32) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}]$ 、SF + ISMN $[(327 \pm 25) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}, (-336 \pm 39) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}]$ 和 AFI $[(404 \pm 33) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}, (-418 \pm 30) \text{ kPa}\cdot\text{s}^{-1}]$ 均使 $\pm dP/dt_{max}$ 较 I/R 组有显著升高 ($n = 8, P$ 均小于 0.01), AFI 组较 SF + ISMN 组也有明显升高 ($P < 0.05$)。可见, AFI 可以改善缺血心肌的心功能, 而且保护作用强于联合使用 SF 与 ISMN。

3 心肌梗死范围

从减小心肌梗死范围方面, 进一步观察 AFI 对缺血心肌的保护作用。SHAM、MI/R、SF、ISMN 及 AFI 五组间总缺血范围 (AAR/LV %) 无明显差异。缺血 30 min 再灌 3 h 造成大鼠明显心肌梗死 (心肌切片白色非染色区, 图 3), SF、ISMN、SF + ISMN 及 AFI 组较 I/R 组有明显缩小 $[(39 \pm 5)\%、(36 \pm 7)\%、(36 \pm 5)\% \text{ 和 } (21 \pm 8)\% \text{ vs. } (56 \pm 6)\%, n = 8, P < 0.01]$, 而 AFI 组心肌梗死范围较 SF + ISMN 组也有明显缩小 ($P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 后心肌梗死情况见图 3。上述结果表明, AFI 还可以减少缺血损伤心肌的梗死, 并且这种作用强于联合使用 SF 与 ISMN。

4 血清 CK、LDH 活性

为进一步探讨 AFI 这种新化合物对缺血心肌保护作用, 还检测了大鼠缺血 30 min 再灌 3 h 血清中 LDH、CK 活性。当心肌细胞膜损伤, 细胞膜完整性遭到破坏, 导致膜通透性增加, 心肌细胞内 CK 和 LDH 大量外漏。结果显示, MI/R 使血清中 CK 活性较 SHAM 组明显增加 ($n = 8, P < 0.01$), 与 MI/R 组比, SF 组、ISMN 组、SF + ISMN 组和 AFI 组血清中 CK 活性都明显降低 ($n = 8, P < 0.01$), SF + ISMN

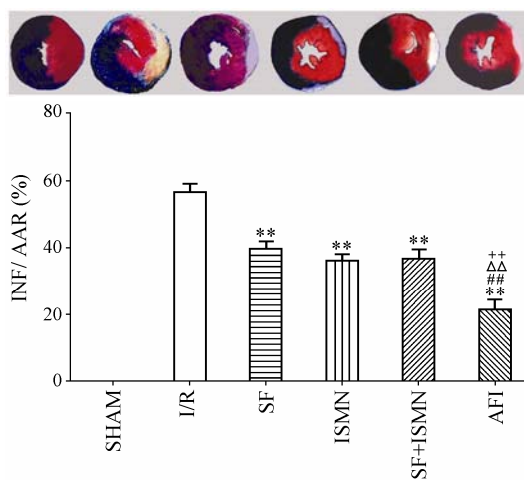


Figure 3 Myocardial infarction in myocardial ischemic/reperfused rats with different treatments. Myocardial infarction expressed as tissue wet weight of the infarcted tissue as a percentage of area-at-risk (AAR). I/R: myocardial ischemia and reperfusion (30 min/3 h); SF: sodium ferulate; ISMN: isosorbide mononitrate; AFI: acetyl ferulaic isosorbide. $\bar{x} \pm s, n = 8$. ** $P < 0.01$ vs I/R; ++ $P < 0.01$ vs SF; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISMN; ## $P < 0.01$ vs SF + ISMN

组与 SF 组或 ISMN 组比较有显著性减少 ($n = 8, P$ 均小于 0.05), AFI 组也明显低于 SF + ISMN 组 ($n = 8, P < 0.05$)。血清中 LDH 活性也有相似趋势: MI/R 使血清中 LDH 活性较 SHAM 组明显增加 ($n = 8, P < 0.01$), 与 I/R 组比, SF 组 ($n = 8, P < 0.05$)、ISMN 组 ($n = 8, P < 0.01$)、SF + ISMN 组 ($n = 8, P < 0.01$) 和 AFI 组 ($n = 8, P < 0.01$) 都明显降低, SF + ISMN 组血清中 LDH 活性也明显低于 SF ($P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 血清中 CK 和 LDH 活性见表 1。上述结果提示, AFI 可减少缺血心肌细胞死亡, 且这种作用强于联合使用 SF 与 ISMN。

5 NO 含量

证实 AFI 可有效保护缺血心肌后, 进一步对其机制进行了探讨, 即该效应是否与 AFI 改变 NO 含量及血清 MDA 有关。缺血 30 min 再灌 3 h 造成大鼠

Table 1 Serum creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) in myocardial ischemic/reperfused rats with different treatments

	CK/U·mL ⁻¹	LDH/U·mL ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	H ₂ O ₂ /μmol·L ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
SHAM	1.5 ± 0.6	606 ± 227	7.2 ± 2.1	265 ± 46	21 ± 8	2.5 ± 0.8
I/R	11 ± 1.7	5 677 ± 738	21 ± 3	114 ± 15	204 ± 15	11.9 ± 1.2
SF	7.8 ± 0.9**	4 193 ± 838*	40 ± 13*	156 ± 8*	149 ± 8**	7.2 ± 0.6**
ISMN	7.7 ± 1.0**	3 465 ± 828**	238 ± 45**	131 ± 12	181 ± 7	9.1 ± 1.1**
SF+ISMN	5.7 ± 0.6**	2 405 ± 477**	337.8 ± 55**	166 ± 15*	99 ± 10**	7.1 ± 0.6**
AFI	3.7 ± 0.9***+△△#	2 133 ± 468***+△△	313 ± 58***+△△	216 ± 16***+△△#	74 ± 6***+△△#	5.2 ± 0.8***+△△#

I/R: myocardial ischemia and reperfusion (30 min/3 h); SF: sodium ferulate; ISMN: isosorbide mononitrate; AFI: acetyl ferulaic isosorbide. $\bar{x} \pm s, n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs I/R; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ vs SF; △△ $P < 0.01$ vs ISMN; # $P < 0.05$ vs SF + ISMN

血清中 NO 含量较 SHAM 组升高, SF 组、ISMN 组、SF + ISMN 组及 AFI 组较 MI/R 组也有明显升高 ($n = 8$, SF 组 $P < 0.05$, 其他各组 P 均小于 0.01), AFI 组血清中 NO 含量较 SF 组和 ISMN 组增加, 变化有统计学意义 (P 均小于 0.01)。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 后血清中 NO 含量见表 1。由实验结果可见, 当 AFI 组摩尔用量是 ISMN 的 1/8 时, 血清中 NO 含量即大于 ISMN 组。

6 血清 SOD 活性和 H₂O₂、MDA 含量

SOD 的活性可衡量体内酶类抗氧化系统防御自由基损伤的能力; 而 H₂O₂ 是一种氧自由基, MDA 是细胞膜脂质过氧化产物, 其含量增加反映细胞膜经过氧化反应后的破坏程度。MI/R 使血清中 SOD 活性较 SHAM 组明显降低, 与 MI/R 组比, SF 组 ($P < 0.05$)、SF + ISMN 组 ($P < 0.05$) 和 AFI 组 ($P < 0.01$) 血清中 SOD 活性都明显增加, AFI 组也明显高于 SF ($P < 0.01$)、ISMN ($P < 0.01$) 和 SF + ISMN 组 ($P < 0.05$)。MI/R 使血清中 H₂O₂ 含量较 SHAM 组明显增加, 与 MI/R 组比, SF 组、SF + ISMN 组和 AFI 组血清中 H₂O₂ 含量都明显降低 ($n = 8$, P 均小于 0.01), AFI 组也明显低于 SF ($P < 0.05$) 和 SF + ISMN 组 ($P < 0.05$)。MDA 的检测方法与 H₂O₂ 有相似趋势, MI/R 使血清中 MDA 含量较 SHAM 组明显增加, 与 MI/R 组比, SF 组、ISMN 组、SF + ISMN 组和 AFI 组血清中 MDA 含量都明显降低 ($n = 8$, P 均小于 0.01), AFI 组也明显低于 SF ($P < 0.05$)、ISMN ($P < 0.01$) 和 SF + ISMN 组 ($P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3 h 血清中 SOD 活性和 MDA 含量见表 1。NO、SOD 和 MDA 检测结果提示, AFI 保护缺血心肌可能与其释放 NO 并减少 ROS 对细胞损伤有关。

讨论

在 MI/R 过程中由于冠脉内皮细胞损伤导致 eNOS (内皮型一氧化氮合酶) 合成的 NO 减少参与并介导

了心肌 MI/R 损伤^[1, 9, 10], 表现为: 冠脉收缩, 中性粒细胞聚集, 氧自由基暴发形成, 冠脉对聚集血小板呈异常反应, 使闭塞冠脉再通后出现痉挛、再狭窄^[11]。目前研究认为 NO 是一种很强的舒血管物质, 它通过上调 cGMP 而扩张冠脉, 改善微循环, 降低心肌耗氧量而减轻 MI/R 损伤, 起到心肌的保护作用^[12, 13]。本研究给予急性 MI/R 大鼠 NO 供体——ISMN^[14], 证实了 NO 浓度升高, 可改善缺血心脏的左室功能, 减小 MI/R 后的心肌梗死范围。

此外, MI/R 早期的氧自由基 (ROS) 大量生成, 利用其脂质过氧化作用, 破坏心肌细胞膜, 这是造成心脏损伤的最主要原因。而在 MI/R 时, 内源性自由基清除酶系统 (如 SOD) 活性是降低的^[15]。国内外研究均发现 NO 生成过多对 MI/R 产生显著不良作用的原因在于再灌注时暴发产生的 ROS 及其与 NO 反应生成过氧亚硝基阴离子 (ONOO⁻)^[6, 16]。后者是一种氧化性很强、毒性更大的物质, 它可导致细胞膜脂质过氧化及细胞其他成分的氧化损伤, 直接损害心肌和血管组织, 引起心肌细胞凋亡、坏死, 使得心功能受损。本研究给予急性 MI/R 大鼠 ROS 清除剂药物——SF, 证实了清除 ROS 可以改善缺血心脏的左室功能, 减小 MI/R 后的心肌梗死范围。

通过外源 NO 供体生成 NO 及清除 MI/R 诱导的 ROS 均可减轻 MI/R 损伤, 因此设计合成了新化合物 AFI, 并给予急性 MI/R 大鼠 AFI 治疗。结果显示, 给予 AFI 组和 SF、ISMN、SF + ISMN 三组比较, 心肌梗死范围和左室功能都有明显减小和改善, 提示 AFI 对缺血心肌有保护作用, 并且作用大于联合使用 ISMN 与 SF; AFI 组 LDH 和 CK 的活性都较 SF、ISMN、SF + ISMN 三组有显著减少, 表明 AFI 可减少 MI/R 对心肌细胞的损伤, 并且作用大于联合使用 ISMN 与 SF。当 AFI 组摩尔用量是 ISMN 的 1/8 时, 血清中 NO 含量就大于 ISMN 组, 在同等用量

时 AFI 组与 SF + ISMN 组血清中 NO 含量没有差异, 表明 AFI 可在体内释放 NO 或者促使内源性 NO 生成, 并且这一作用强于单独使用 NO 供体药物 ISMN; AFI 组 SOD 活性较 SF、SF + ISMN 两组有显著增强, H_2O_2 和 MDA 含量显著减少, 表明 AFI 使心肌的抗氧化能力提高, 并且这一作用强于单独使用自由基清除剂药物 SF 和联合使用 ISMN 与 SF。上述结果证实, 新化合物 AFI 不仅可以在体内释放 NO 或者促使内源性 NO 生成, 还清除了再灌注时暴发生成的 ROS, 避免 NO 与之结合形成毒性很大的 ONOO⁻, 使 NO 只发挥扩张冠脉, 改善缺血心肌灌注, 增加心肌收缩力, 抗凋亡, 抑制中性粒细胞趋化、聚集、黏附于血管内皮的保护作用。当然, ROS 并不能完全被清除, NO 会与之反应生成少量的 ONOO⁻, 但有资料证明, 后者在微量存在时, 抑制白细胞与内皮细胞的黏附, 具有细胞保护作用^[6, 17]。

综上所述, 由 NO 供体 ISMN 和 ROS 清除剂药物 SF 合成的新化合物乙酰阿魏单硝酸异山梨醇酯, 既可以为 MI/R 心脏提供 NO, 又可以清除再灌注过程中产生的 ROS, 避免了 NO 与 ROS 反应产生氮自由基, 更好地发挥了 NO 的有益方面, 能使其减轻 MI/R 损伤的效果较单独以及联合使用 ISMN 和 SF 治疗得以提高。本课题为有效治疗 IHD 提出了新的路径, 但是这种化合物在体内确切的作用机制还有待于进一步研究。

References

- [1] Ma XL, Weyrich AS, Lefler DJ, et al. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelial [J]. *Circ Res*, 1993, 72: 403–412.
- [2] Johnson G III, Tsao PS, Mulloy D, et al. Cardioprotective effects of acidified sodium nitrite in myocardial ischemia with reperfusion [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990, 252: 35–41.
- [3] Yu QJ, Si R, Zhou N, et al. Insulin inhibits β -adrenergic action in ischemic/reperfused heart: a novel mechanism of insulin in cardioprotection [J]. *Apoptosis*, 2008, 13: 305–317.
- [4] Ma XL, Lefler DJ, Lefler AM, et al. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Circulation*, 1992, 86: 937–946.
- [5] Zhang F, Cao YX, Luo XX, et al. Hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocyte and the protection of nitric oxide [J]. *J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2000, 16: 225–227.
- [6] Ma XL, Gao F, Lopez BL, et al. Peroxynitrite, a two-edged sword in post-ischemic myocardial injury-dichotomy of action in crystalloid-versus blood-perfused heart [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292: 912–920.
- [7] Gao F, Yue TL, Shi DW, et al. p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 53: 414–422.
- [8] Gao F, Yao CL, Gao E, et al. Enhancement of glutathione cardioprotection by ascorbic acid in myocardial reperfusion injury [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301: 543–550.
- [9] Li XS, Uriuda Y, Wang QD, et al. Role of *L*-arginine in preventing myocardial and endothelial injury following ischemia/reperfusion in the rat isolated heart [J]. *Acta Physiol Scand*, 1996, 156: 37.
- [10] Naseem SA, Kontos MC, Rao PS, et al. Sustained inhibition of nitric oxide by NG-nitro-*L*-arginine improves myocardial function following ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27: 419–426.
- [11] Cai JZ, Wang YW. Discussion on optimal content of *L*-arginine in cardiac ischemia-reperfusion [J]. *J Tongji Univ* (同济大学学报), 2005, 26: 13–26.
- [12] Nonami Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Jpn Circ J*, 1997, 61: 119–132.
- [13] Kosaka H, Komamura K, Minamoto T, et al. Plasma nitric oxide end products are increased in the ischemic canine heart [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 211: 370–374.
- [14] Si WX, Lu HG, Ren LM. Effect of isosorbide-5-mononitrate on sympathetic purinergic vasoconstriction of the rabbit saphenous artery [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2007, 42: 833–837.
- [15] Hu CQ, Xu MZ, M Y, et al. Determination of the allergic impurities in the parenteral injection of Chinese traditional medicines containing *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2008, 43: 518–522.
- [16] Brunner F, Maier R, Andrew P, et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57: 55–62.
- [17] Lefler DJ, Scalia R, Campbell B, et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99: 684–691.