

间尼索地平及尼索地平对兔工作心脏缺血再灌注损伤的保护作用

张海林、傅绍荃、李蕴山 (河北医学院药理教研室, 石家庄 050017)

提要 间尼索地平(*m*-Nis) 4, 8, 16, 尼索地平(Nis) 1, 4及硝苯啶(Nif) 4, 8, 16, 50 nmol/L能明显促进兔工作心脏缺血后再灌注时的功能恢复, 抑制再灌注心肌挛缩的发生及CPK释放。*m*-Nis 8, Nis 1及Nif 8 nmol/L能预防兔心缺血再灌注时心肌 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 及5'-核酸磷酸酶活性降低及膜磷脂降解, 也能预防缺血再灌注时心肌 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性增加及游离脂肪酸水平上升。

关键词 间尼索地平; 尼索地平; 硝苯啶; 工作心脏; 缺血-再灌注; 心肌挛缩; 肌酸激酶; 钠-钾腺苷三磷酸酶; 磷脂

间尼索地平(*m*-nisoldipine, *m*-Nis)是新合成的二氢吡啶类钙拮抗剂, 前文报道了它对麻醉犬的心血管效应⁽¹⁾。近年来, 钙拮抗剂的抗心肌缺血再灌注损伤作用令人瞩目, 已证明多数钙拮抗剂能预防缺血再灌注损伤的发生^(2,3)。

本文用兔离体工作心脏观察*m*-Nis和尼索地平(nisoldipine, Nis)及硝苯啶(nifedipine, Nif)对缺血再灌注损伤的影响, 并探讨其作用机理。

Materials and methods

兔, 体重 $2.5 \pm \text{SD } 0.5 \text{ kg}$, ♀♂兼用, 制备工作心脏标本⁽⁴⁾。

功能指标测定 心脏工作稳定后持续灌流10 min开始实验, 测量以下指标: 压力换能器(MPU-0.5)测主动脉压(AOP)和左心室收缩压(LVSP)及舒张末期压(LVEDP); 将电磁流量计(日本光电MFV-1200)探头置于主动脉插管上段以测定主动脉流量(AF); 左室压经微分器测 $\pm \text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$; 通过纸速10 mm/s测得的心收缩间隔计数心率(HR)。上述各指标同步记录于四道生理记录仪(RM-6000)。收集冠状

血管流出液, 测得冠脉流量(CF), 每5 min记录各指标一次。

实验分组及程序 正常对照组: 心脏于工作状态持续灌流60 min; 缺血对照组、溶剂对照组: 心脏工作10 min后, 换以含有与给药组等容量溶剂的灌流液灌流10 min, 然后关闭主动脉流出道及左心房流入道, 打开逆灌通路, 维持心脏的最低逆灌压(1.1 kPa, 使CF约为缺血前顺灌时的5%), 使心脏于37℃保温罩内全心缺血(global ischemia)1 h, 然后以不含溶剂的灌流液(改良Krebs-Henseleit液, 含 $\text{Na}_2\text{EDTA } 0.5 \text{ mmol/L}$)再灌注。首先逆灌15 min, 再将心脏转入工作状态顺灌30 min, 观察在顺灌30 min内功能恢复情况; 给药组: 分为*m*-Nis 4, 8, 16, 50 nmol/L; Nis 0.5, 1, 4, 8 nmol/L及Nif 4, 8, 16, 50 nmol/L 3组, 在心脏工作10 min后, 分别换以含有上述浓度药物的灌流液灌流10 min, 然后缺血1 h(37℃), 在再灌注开始时换成不含药物的灌流液, 再按缺血对照组的程序依次进行逆灌及顺灌, 以观察缺血前预防性给药对心功能恢复的影响。

实验后将心脏称重, 并剪下右心室称重后, 在100℃下烘干24 h, 称干重。将左心室及室间隔的结缔组织、瓣膜及心内外膜剪除后, 迅速投入液氮保存, 以备生化指标测定。

生化指标测定

1 磷酸肌酸激酶(CPK)分析 分别留取缺血前、缺血30, 60 min和再灌注后1, 3, 5, 10及15 min时的冠脉流出液, 以及再灌注后前15 min冠脉流出液总量, 置-20℃保存, 于12 h内测CPK活性⁽⁵⁾, 结果以IU/(min·g)干重心肌表示。

2 膜微粒体(microsomal fraction)制备 将除去心内外膜及瓣膜的左心室及室间隔心肌

2.5 g 剪碎, 加入 50 ml 冷的匀浆液 (mmol/L: 蔗糖 320, EDTA 5, 去氧胆酸钠 2.4), 置细胞破碎机中, 以 1300 r/min, 20 s (先破碎 15 s, 间隔 30 s 后再破碎 5 s) 制成匀浆, 将此匀浆以 4 层纱布过滤, 进行高速及超速离心分离⁽⁶⁾, 将制得的微粒体部分用 0.25 mol/L 的蔗糖 (含 EDTA 1 mmol/L, pH 7.4) 3 ml 制成悬液, -20℃ 保存。

3 Na⁺-K⁺-ATPase 活性测定 反应液总容量 400 μl, 含 (mmol/L) Tris-HCl 50, NaCl 100, KCl 10, MgCl₂ 5, EDTA 1, ATP 5, pH 7.4. 测定释放的无机磷⁽⁷⁾. 哇巴因敏感性 Na⁺-K⁺-ATPase 活性以哇巴因 1 mmol/L 所抑制的 ATP 酶活性来表示。

4 5'-核酸磷酸酶 (5'-nucleotidase) 活性测定 反应液总容量 400 μl, 含 (mmol/L) Tris-HCl 50, MgCl₂ 3.5, ATP 3, 测释放的无机磷⁽⁷⁾.

5 Ca²⁺-ATP 酶 (Ca²⁺-ATPase) 活性测定 反应液总容量 400 μl, 含 (mmol/L) Tris-HCl 25, NaCl 75, MgCl₂ 1, EGTA 0.1, ATP 3, pH 7.4. Ca²⁺-ATP 酶活性以含有及不含有 CaCl₂ 0.15 mmol/L 的反应介质中 ATP 酶活性之差来表示。

6 磷脂测定 用氯仿、甲醇提取脂类⁽⁸⁾, 提取的脂类在 50℃ 下干燥后, 用高氯酸于 190℃ 消化 15 min, 依抗坏血酸法⁽⁹⁾测释放的无机磷。

7 蛋白测定 依 Folin 酚试剂法⁽¹⁰⁾测定蛋白, 以结晶牛血清蛋白做标准。

8 游离脂肪酸测定 以铜试剂比色法⁽¹¹⁾测匀浆液中的游离脂肪酸。

药品 *m*-Nis 及 Nis 均为我院药学系有机化学教研室合成并提供, Nif (上海第十七制药厂), 上述 3 种药物在临用前用二甲基亚砜新鲜配制, 二甲基亚砜在灌流液中的最终浓度小于 0.006 ml/L⁽¹²⁾. 将配药容器及灌流系统用黑纸包裹, 以使药物避光. ATP-Na₂ (Fluka). 哇巴因为卫生部药品生物制品检定所标定。其

它药品均为 AR 级以上。

Results

缺血前药物灌流对兔工作心脏 +dP/dt_{max} 及 HR 的影响 溶剂对 +dP/dt_{max} 及 HR 无明显影响。Tab 1 为经 *m*-Nis、Nis 及 Nif 灌流后 10 min 内, +dP/dt_{max} 及 HR 的最大改变值。*m*-Nis 及 Nis 的作用在给药后即刻出现, 10 min 内无任何恢复; Nif 的作用在给药后 5 min 最强, 10 min 时有部分恢复。

Tab 1. Effects of *m*-nisoldipine (*m*-Nis), nisoldipine (Nis) and nifedipine (Nif) on +dP/dt_{max} and HR of rabbit working hearts. n=5, $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, **P<0.05, *P<0.01 vs before drug.**

Drug (nmol/L)	+dP/dt _{max} (kPa/s)		HR (bpm)	
	Before	Change (%)	Before	Change (%)
<i>m</i>-Nisoldipine				
4	546 ± 140	-4 ± 6*	138 ± 5	-8 ± 14*
8	476 ± 48	-15 ± 6**	120 ± 17	-10 ± 11*
16	490 ± 121	-24 ± 8***	122 ± 14	-22 ± 8**
50	437 ± 60	-51 ± 11***	131 ± 13	-35 ± 20***
Nisoldipine				
0.5	486 ± 47	-4 ± 5*	122 ± 16	-4 ± 6*
1	453 ± 91	-15 ± 8**	126 ± 4	-14 ± 12*
4	466 ± 131	-28 ± 4***	126 ± 16	-19 ± 3**
8	475 ± 51	-55 ± 13***	120 ± 18	-32 ± 13***
Nifedipine				
4	431 ± 20	-10 ± 8*	134 ± 27	-3 ± 4*
8	465 ± 73	-17 ± 8**	130 ± 9	-1 ± 5*
16	480 ± 27	-19 ± 7***	135 ± 15	-5 ± 5*
50	510 ± 101	-50 ± 17***	126 ± 9	-14 ± 8*

缺血后再灌注时的心功能恢复 置心脏于 37℃ 缺血 1 h, 继之以工作状态再灌注 30 min 期间, 溶剂对照组心功能的恢复很差 (Fig 1), 15 个心脏中只 2 个的 AF 有部分恢复。Fig 1 为经不同浓度 *m*-Nis、Nis 及 Nif 预处理后心功能的恢复情况, 以缺血前 (给药前) 数值为 100%, 计算各组在 30 min 工作状态的再灌注时, 各参数最大恢复%。由 Fig 1 可见: *m*-Nis 4, 8 及 16 nmol/L 均能明显促进心功能恢复, 而以 8 nmol/L 时最有效, 50 nmol/L 时则无效。Nis 1 及 4 nmol/L 也能促进心功能恢复,

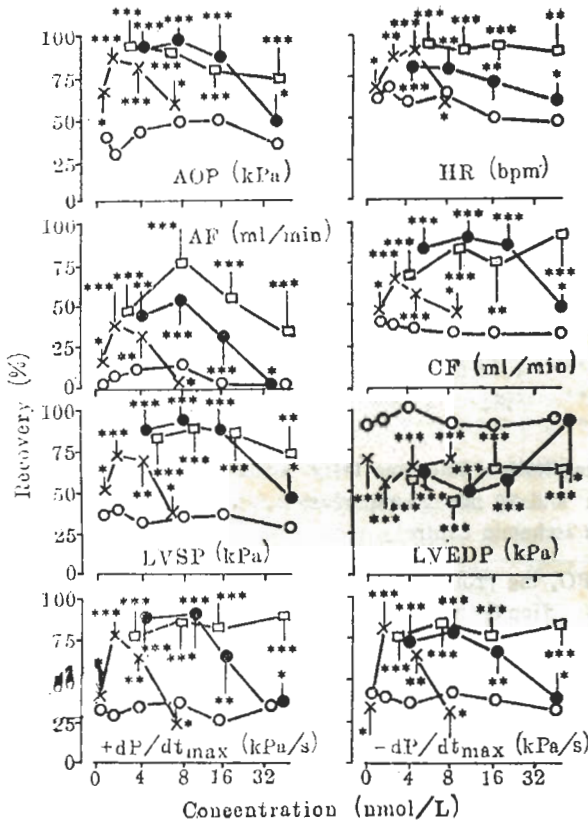


Fig 1. Effects of *m*-Nis, Nis and Nif on the percent recovery of functional parameters of rabbit working hearts during 30-min reperfusion following 60-min global ischemia at 37°C. $n=15$ for solvent (\circ), $n=5$ for *m*-Nis (\bullet), Nis (\times), Nif (\square). $\bar{x}\pm SD$. $*P>0.05$, $**P<0.05$, $***P<0.01$ vs solvent control.

以 1 nmol/L 时最有效, 而 0.5 及 8 nmol/L 时无效。Nif 在所用的各个浓度均明显地促进缺血后再灌注时的功能恢复, 而以 8 nmol/L 时最有效。

挛缩的发生 按 Weishaar 等⁽³⁾评价挛缩发生的标准, 即心脏无收缩(LVSP = LVEDP), 伴有 LVEDP 至少提高 150%。溶剂对照组在缺血 60 min 继之以再灌注 30 min 期内, 挛缩发生率为 26.7%。在钙拮抗剂预处理后的各组中, 除 *m*-Nis 50 nmol/L 组再灌注时有一例发生典型挛缩外, 其它剂量的 3 种钙拮抗剂均能明显预防挛缩的发生。

磷酸肌酸激酶释放 正常兔工作心脏冠脉

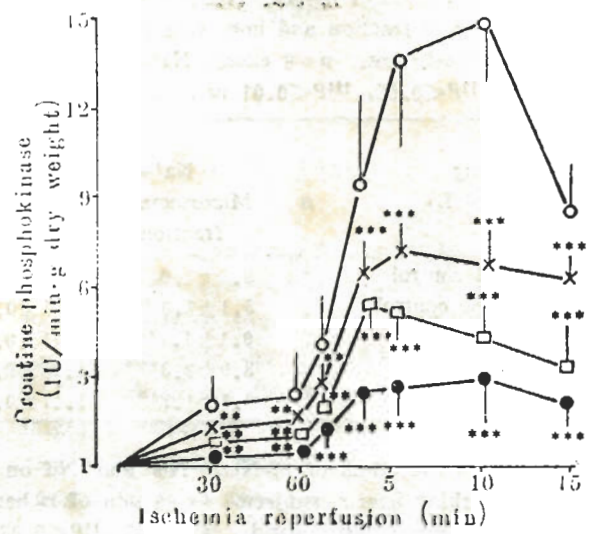


Fig 2. Myocardial creatine phosphokinase (CPK) release from ischemic and reperfused rabbit working hearts in the presence or absence (\circ) of calcium antagonists. (\bullet) *m*-Nis 8 nmol/L, (\times) Nis 1 nmol/L, (\square) Nif 8 nmol/L. Hearts were subjected to 60-min global ischemia at 37°C and reperfused for 30 min. $n=5$, $\bar{x}\pm SD$. $**P<0.05$, $***P<0.01$ vs solvent control.

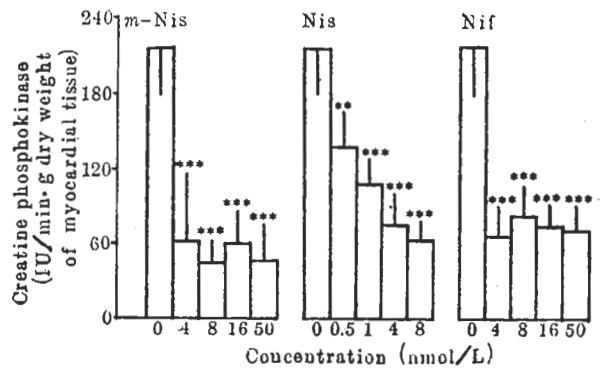


Fig 3. Leakage of CPK of rabbit working hearts into perfusate during the first 15 min of reperfusion following 60-min global ischemia. $n=5$, $\bar{x}\pm SD$. $**P<0.05$, $***P<0.01$ vs solvent control (0).

流出液中未测出 CPK 活性; 缺血 30 min 后 CPK 少量释放, 60 min 时稍有增加; 再灌注则引起 CPK 大量释放 (Fig 2)。3 种钙拮抗剂的各种浓度均有效地抑制缺血再灌注时 CPK 释放 (Fig 2, 3)。3 种药物的作用无显著性差异。

Tab 2. Effects of *m*-Nis, Nis and Nif on activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, 5'-nucleotidase, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ of microsomal fraction and homogenate of rabbit working hearts subjected to 60 min of ischemia and 30 min of reperfusion. $n=6$ except $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ group, $\bar{x} \pm \text{SD}$. $**P < 0.05$, $***P < 0.01$ vs ischemic control, $^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs normal control.

Drug (nmol/L)	n	Enzyme activity ($\mu\text{mol Pi/mg protein}\cdot\text{h}$)				
		$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$		5'-nucleotidase	$\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$	
		Microsomal fraction	Homogenate	Microsomal fraction	Microsomal fraction	Homogenate
Normal control	8	9.5 ± 1.9	1.2 ± 0.3	5.1 ± 0.5	5.4 ± 1.0	3.0 ± 0.6
Ischemic control	15	$5.1 \pm 1.0^{\dagger\dagger}$	$0.81 \pm 0.20^{\dagger\dagger}$	$3.2 \pm 0.5^{\dagger\dagger}$	$8.3 \pm 1.3^{\dagger\dagger}$	$4.3 \pm 0.9^{\dagger\dagger}$
<i>m</i> -Nis (8)	7	$9.1 \pm 1.4^{***}$	$1.41 \pm 0.29^{**}$	$5.0 \pm 0.7^{***}$	$5.3 \pm 1.7^{**}$	$2.7 \pm 0.6^{**}$
Nis (1)	6	$8.0 \pm 2.3^{***}$	$1.15 \pm 0.27^{**}$	$4.9 \pm 0.6^{***}$	$5.4 \pm 0.9^{**}$	$2.8 \pm 0.8^{**}$
Nif (8)	7	$8.3 \pm 1.7^{***}$	$1.17 \pm 0.28^{**}$	$5.2 \pm 0.7^{***}$	$5.7 \pm 1.5^{**}$	$3.1 \pm 1.0^{**}$

Tab 3. The effect of *m*-Nis, Nis and Nif on phospholipid and free fatty acids (FFA) content of rabbit working hearts subjected to 60 min of ischemia and 30 min of reperfusion. $\bar{x} \pm \text{SD}$. $*P > 0.05$, $**P < 0.05$ vs normal control, $^{\dagger}P > 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.05$ vs ischemic control.

Drug (nmol/L)	n	Phospholipid ($\mu\text{mol PO}_4/\text{mg protein}$)		n	FFA ($\mu\text{mol/g}$)
		Microsomal fraction	Homogenate		Homogenate
Normal control	9	0.70 ± 0.16	0.28 ± 0.10	4	6.9 ± 0.5
Ischemic control	9	$0.54 \pm 0.12^{**}$	$0.25 \pm 0.40^*$	7	$8.0 \pm 0.4^{**}$
<i>m</i> -Nis (8)	6	$0.70 \pm 0.12^{\dagger\dagger}$	$0.29 \pm 0.04^{\dagger}$	5	$5.7 \pm 0.7^{\dagger\dagger}$
Nis (1)	6	$0.66 \pm 0.06^{\dagger\dagger}$	$0.29 \pm 0.02^{\dagger}$	5	$6.2 \pm 0.5^{\dagger\dagger}$
Nif (8)	6	$0.69 \pm 0.11^{\dagger\dagger}$	$0.28 \pm 0.06^{\dagger}$	5	$6.6 \pm 0.4^{\dagger\dagger}$

膜酶活性 缺血再灌注使心肌微粒体部分及匀浆的哇巴因敏感性 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性明显降低,同时也抑制微粒体部分的5'-核酸磷酸酶活性,而使微粒体部分及匀浆的 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 酶活性提高 (Tab 2)。3种钙拮抗剂均显著抑制缺血再灌注对膜酶的上述作用 (Tab 2)。

磷脂及游离脂肪酸 缺血及再灌注使心肌微粒体部分总磷脂明显减少,而使心肌游离脂肪酸明显上升,3种钙拮抗剂均有效地抑制这些改变 (Tab 3)。

缺血再灌注及钙拮抗剂预处理对微粒体部分及匀浆的蛋白产量无明显影响。

Discussion

本文结果表明 *m*-Nis, Nis 及 Nif 均具有抗心肌缺血再灌注损伤的作用,三者促进缺血后心功能恢复的量效关系呈钟形 (bell-shaped),这与文献报道 Nif 抗心肌缺血损伤具有

钟形量效特性⁽²⁾是一致的。由 Fig 1 可见, Nis 的作用强于 *m*-Nis 及 Nif, 这可能与 Nis 负性肌力及负性频率作用较强有关 (Tab 1)。

m-Nis 50 nmol/L 不能促进心功能恢复,而与之有相近负性肌力作用的等浓度的 Nif 则能促进心功能恢复 (Fig 1),其原因可能与 *m*-Nis 作用时间较长有关,当用较大剂量 *m*-Nis 及 Nis 预处理心脏后,再灌注时心脏仍受抑制而较少恢复,但心肌挛缩及 CPK 释放却明显减少,表明较大剂量 *m*-Nis 及 Nis 仍有抗心肌缺血再灌注损伤的作用。因此,3种钙拮抗剂抗缺血再灌注损伤的作用无质的差别。但是,与 Nis 相比, *m*-Nis 合成原料易得、价廉,合成工艺简单,对光稳定,因此,有必要对它开发研究。

膜磷脂降解及游离脂肪酸聚集可能在心肌缺血损伤中起着重要作用,前者导致膜结构破坏及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性降低,后者抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性,使细胞膜对 Ca^{2+} 的

通透性增加,而使 Ca^{2+} -ATP酶活性提高⁽¹³⁾。由Tab 3可见,3种钙拮抗剂均能预防缺血心肌膜磷脂的降解及游离脂肪酸水平上升,从而保护了缺血心肌膜酶功能(Tab 2),这可能是其抗缺血再灌注损伤的重要分子学基础之一。

致谢 符云峰副研究员、方丁教授指导并协助本文工作。武占军、宋建徽协助技术工作。

References

- 1 Fu SX, Li YS, Jin CJ, Ren LM. Effects of *m*-nisoldipine and nisoldipine on hemodynamics in anesthetized dogs. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 43
- 2 Fukunami M, Hearse DJ. Temperature-dependency of nifedipine as a protective agent during cardioplegia in the rat. *Cardiovasc Res* 1985; 19 : 95
- 3 Weishaar RE, Bing RJ. The beneficial effect of a calcium channel blocker, diltiazem, on the ischemic-reperfused heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980; 12 : 993
- 4 Michio F, Hideo I, Tetsuya A. *In vitro* assessment of myocardial function using a working rabbit heart. *J Pharmacol Methods* 1985; 14 : 49
- 5 张丽丽. 磷酸肌酸激酶测定. 见: 上海市医学化验所主编. 临床生化检验, 上册. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1982 : 337-40
- 6 Hendler ED, Torretti J, Epstein FH. The distribution of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase in medulla and cortex of the kidney. *J Clin Invest* 1971; 50 : 1329
- 7 赵铁林. 磷的测定. 见: 上海市医学化验所主编. 临床生化检验, 上册. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1982 : 224-6
- 8 Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 1978; 253 : 4809
- 9 张龙翔、张庭芳、李令媛, 主编. 生化实验方法和技术. 第1版. 北京: 人民教育出版社, 1982 : 221-3
- 10 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 11 Itaya K, Ui M. Colorimetric determination to free fatty acids in biological fluids. *J Lipid Res* 1965; 6 : 16
- 12 Thomas G, GroB R, Schramm M. Calcium channel modulation ability to inhibit or promote calcium influx resides in the same dihydropyridine molecule. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6 : 1170
- 13 Lamers JMJ, Stinis HT, Montfoort A, Hülsmann WC. The effect of lipid intermediates on Ca^{2+} and Na^{+} permeability and $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ -ATPase of cardiac sarcolemma. *Biochim Biophys Acta* 1984; 774 : 127

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Jan, 10 (1) : 49-53

Protective effects of *m*-nisoldipine and nisoldipine on myocardial damage in working rabbit hearts after ischemia-reperfusion

ZHANG Hai-Lin, FU Shao-Xuan, LI Yun-Shan

(Department of Pharmacology, Hebei Medical College, Shi jiazhuang 050017)

ABSTRACT *m*-Nisoldipine 4, 8, 16 nmol/L, nisoldipine 1, 4 nmol/L and nifedipine 4, 8, 16, 50 nmol/L enhanced the recoveries of functional parameters of working rabbit hearts after ischemia-reperfusion, as well as prevented the development of contracture and the release of CPK from the reperfused hearts. *m*-Nisoldipine 8 nmol/L, nisoldipine 1 nmol/L and nifedipine 8 nmol/L attenuated the reduction of myocardial

Na^{+} - K^{+} -ATPase and 5'-nucleotidase activity induced by ischemia-reperfusion. The breakdown of membrane phospholipids and elevation of the myocardial Ca^{2+} -ATPase activity and the free fatty acids level were also prevented.

KEY WORDS *m*-nisoldipine; nisoldipine; nifedipine; working heart; ischemia-reperfusion; myocardial contracture; creatine kinase; Na^{+} - K^{+} -ATPase; phospholipids