

# 依替巴肽对急性心肌梗死模型大鼠心肌一氧化氮、过氧化物及核转录因子的影响

刘嘉\*(中国医科大学附属盛京医院, 沈阳 110022)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1949-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.10

**摘要** 目的:研究依替巴肽对急性心肌梗死模型大鼠心肌一氧化氮(NO)、过氧化物及核转录因子的影响。方法:将大鼠随机分为假手术组、模型组和依替巴肽低、中、高剂量(30、60、90 μg/kg)组,除假手术组外其余各组大鼠建立无复流急性心肌梗死模型,于再灌注前30 min股静脉注射相应药物。检测各组大鼠心肌NO、总一氧化氮合酶(tNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)水平和核转录因子-κB p65(NF-κB p65)的阳性表达。结果:与假手术组比较,模型组和依替巴肽低、中、高剂量组大鼠的NO、tNOS、iNOS、MPO、MDA水平与NF-κB p65表达均明显升高( $P<0.05$ ),eNOS活性降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,依替巴肽低、中、高剂量组大鼠的NO、iNOS、MPO、MDA水平与NF-κB p65表达均明显降低( $P<0.05$ ),依替巴肽中、高剂量组大鼠的tNOS水平明显降低( $P<0.05$ ),eNOS水平明显升高( $P<0.05$ ),且与剂量呈正相关。结论:依替巴肽可通过保护血管内皮、减少中性粒细胞浸润及氧自由基释放、抑制NF-κB p65激活,从而减少急性心肌梗死模型大鼠的无复流现象。

**关键词** 依替巴肽;血小板膜糖蛋白GP II b/III a受体拮抗药;一氧化氮;过氧化物;核转录因子

## Effects of Eptifibatide on Myocardial NO, Peroxide and Nuclear Transcription Factors in Rats with Acute Myocardial Infarction

LIU Jia(Shengjing Hospital of China Medical University, Shengyang 110022, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of eptifibatide on myocardial NO, peroxide and nuclear transcription factors (NTF) in acute myocardial infarction model rats. METHODS: Rats were randomized into sham operation group, model group and eptifibatide high-dose, middle-dose and low-dose (30, 60, 90 μg/kg) groups. Acute myocardial infarction no-reflow models were established in those groups except sham operation group and given relevant drugs via femoral vein 30 min before reperfusion. The levels of NO, tNOS, eNOS, iNOS, MPO and MDA and the positive expression of NF-κB p65 were determined in each group. RESULTS: Compared with sham operation group, the levels of NO, tNOS, iNOS, MPO and MDA and the expression of NF-κB p65 were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the activity of eNOS was decreased significantly ( $P<0.05$ ). Compared with model group, the levels of NO, iNOS, MPO and MDA and the expression of NF-κB p65 were decreased significantly in eptifibatide low-dose, medium-dose and high-dose groups ( $P<0.05$ ), and the level of tNOS was decreased while that of eNOS was increased significantly in eptifibatide medium-dose and high-dose groups ( $P<0.05$ ), which was positively related to drug dosage. CONCLUSIONS: Eptifibatide could reduce no-reflow in acute myocardial infarction model rats through protecting vascular endothelial cell, reducing neutrophil infiltration and releasing oxygen free radical and inhibiting the activation of NF-κB p65.

**KEYWORDS** Eptifibatide; Platelet glycoprotein GP II b/III a receptor inhibitor; NO; Peroxide; Nuclear transcription factors

急性心肌梗死(Acute myocardial infarction, AMI)是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死。再灌注治疗是主要抢救措施之一,在发病12 h内开通闭塞冠状动脉恢复血流,可缩小梗死面积并减少死亡。越早使冠状动脉再通,患者获益越大。但是,部分患者即使消除了血栓、血肿等机械性阻塞,心肌组织的血流灌注仍然无法完全恢复,这种现象被称为“无复流”(No-reflow, NR),研究显示其发生率高达37%<sup>[1]</sup>,因此寻找解决NR现象的有效药物具有重要的临床意义。近年来,血小板膜糖蛋白GP II b/III a受体拮抗药受到科研人员的广泛关注,其代表药物依替巴肽减少NR发生的作用较为明确,但是其机制尚未完全明了。因此,笔者采用冠状动脉结扎法建立急性心肌梗死大鼠模型,观察依替巴肽对其一氧化氮(NO)含量、一氧化氮合酶(NOS)活性、心肌髓过氧化物酶

(MPO)、丙二醛(MDA)以及核转录因子-κB p65(NF-κB p65)的影响,现报道如下。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

紫外分光光度计(上海分析仪器总厂);显微镜(日本Olympus公司)。

#### 1.2 药品与试剂

依替巴肽注射液(江苏豪森药业股份有限公司,批号:20110215,规格:10 ml:20 mg);MPO、MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20100520、20100730);NF-κB p65单克隆抗体和氧化物酶复合物SP超敏试剂盒(美国Santa Cruz公司,批号:AN365-1、XIT9710);二喹啉甲酸(BCA,试剂,美国Sigma公司,批号:F0291)。

#### 1.3 动物

Wistar大鼠90只,♂,体质量250~300 g,由沈阳药科大学

\*药师。研究方向:药剂学。电话:024-96615-71140。E-mail:33307589@qq.com

生命科学与生物工程学院药理实验室提供,合格证号:SCXK(辽)2002-0011。

## 2 方法

### 2.1 无复流急性心肌梗死模型的建立

取大鼠腹腔注射20%乌拉坦(5 ml/kg)进行麻醉,沿颈部中线切开,气管插管后机械通气(呼吸比1:2,呼吸频率60次/min,潮气量14 ml/kg),在心脏搏动最明显处即第3肋间隙水平开胸,撑开肋骨,暴露心脏,在左冠状动脉前降支距左心耳下缘2~3 mm处穿线结扎冠状动脉。结扎成功后可见室壁运动减弱、心肌变为暗红色,心电图示ST段明显抬高。结扎90 min后,剪断结扎线使冠状动脉血管再通,120 min后处死。

### 2.2 分组与给药

将大鼠随机分为假手术组、模型组和依替巴肽低、中、高剂量(30、60、90 μg/kg)组,假手术组大鼠10只,其余各组20只。除假手术组大鼠只穿线不接扎外,其余各组大鼠建立无复流急性心肌梗死模型,于再灌注前30 min股静脉注射相应药物,假手术组和模型组大鼠给予相同剂量的0.9%氯化钠溶液。依替巴肽给药剂量按照临床用量、预实验以及文献报道<sup>[2]</sup>制订。

### 2.3 检测指标

2.3.1 心肌组织中NO含量及NOS活性的测定。将各组大鼠左室游离壁心尖组织剪碎,配成心肌组织匀浆,紫外分光光度法测定心肌组织中NO含量和总一氧化氮合酶(tNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性(eNOS活性=tNOS活性-iNOS活性)。

2.3.2 心肌组织中MPO活性及MDA含量的测定。取各组大鼠心肌组织匀浆,按MPO、MDA试剂盒说明进行操作,比色法测定心肌组织中MPO活性和MDA含量。

2.3.3 缺血区心肌细胞及微动脉中NF-κB p65表达的测定。取各组大鼠心尖以上左室缺血梗死区心肌组织,10%甲醛固定,常规石蜡包埋,切片,脱蜡,采用SP法进行免疫组化染色。每只大鼠选取2张切片,每张切片随机选取4个视野,400倍光镜下观察,分析心肌细胞及微动脉中NF-κB p65的表达。光镜下可见棕黄色即为NF-κB p65阳性产物,用Image Pro Plus 6.0图像分析软件计算细胞核中NF-κB p65阳性细胞数(PI):PI=(细胞核中NF-κB p65阳性细胞数/视野内总细胞数)×100%。

### 2.4 统计学方法

采用SPSS 15.0统计软件处理,计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较在方差齐时用LSD法,不齐时采用秩和检验。以*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 心肌组织中NO含量及NOS活性比较

与假手术组比较,模型组和依替巴肽各剂量组大鼠心肌组织中NO含量和tNOS、iNOS活性均升高,eNOS活性降低,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。与模型组比较,依替巴肽中、高剂量组大鼠心肌组织中NO含量和tNOS、iNOS活性均降低,eNOS活性升高,差异具有统计学意义(*P*<0.05),且呈剂量依赖性。各组大鼠心肌中NO含量及NOS活性比较见表1。

### 3.2 心肌组织中MPO活性及MDA含量比较

与假手术组比较,模型组和依替巴肽各剂量组大鼠心肌组织中MPO活性及MDA含量均升高,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。与模型组比较,依替巴肽各剂量组大鼠心肌组织

中MPO活性及MDA含量均降低,差异具有统计学意义(*P*<0.05),且呈剂量依赖性。各组大鼠心肌组织中MPO活性及MDA含量比较见表2。

表1 各组大鼠心肌组织中NO含量及NOS活性比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Comparison of NO content and NOS activity in myocardium of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	NO, nmol/g	tNOS, U/mg	iNOS, U/mg	eNOS, U/mg
假手术组	10	309.76 ± 57.17	8.18 ± 1.54	6.04 ± 1.37	2.21 ± 1.05
模型组	20	758.69 ± 138.32*	13.17 ± 2.65*	11.95 ± 2.32*	1.31 ± 0.33*
依替巴肽低剂量组	20	638.27 ± 93.25**	12.07 ± 2.79*	9.74 ± 2.58**	1.43 ± 0.63*
依替巴肽中剂量组	20	512.23 ± 81.77**	11.31 ± 2.04**	8.89 ± 1.53**	1.62 ± 0.27**
依替巴肽高剂量组	20	464.92 ± 106.43**	10.73 ± 2.73**	8.12 ± 2.03**	1.73 ± 0.13**

与假手术组比较: \**P*<0.05;与模型组比较: \*\**P*<0.05

vs. sham operation: \**P*<0.05; vs. model group: \*\**P*<0.05

表2 各组大鼠心肌组织中MPO活性及MDA含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Comparison of MPO activity and MDA content of myocardium of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	MPO, U/g	MDA, nmol/g
假手术组	10	132.26 ± 17.15	28.37 ± 6.08
模型组	20	387.25 ± 41.69*	114.74 ± 37.99*
依替巴肽低剂量组	20	307.28 ± 48.93**	97.42 ± 26.61**
依替巴肽中剂量组	20	204.55 ± 38.62**	69.44 ± 21.83**
依替巴肽高剂量组	20	175.87 ± 26.39**	53.29 ± 16.75**

与假手术组比较: \**P*<0.05;与模型组比较: \*\**P*<0.05

vs. sham operation: \**P*<0.05; vs. model group: \*\**P*<0.05

### 3.3 心肌及微动脉中NF-κB p65阳性表达

NF-κB p65阳性细胞定位于细胞质,少数转移于细胞核。与假手术组比较,模型组和依替巴肽各剂量组大鼠心肌细胞及微动脉中NF-κB p65表达均升高,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。与模型组比较,依替巴肽各剂量组大鼠心肌细胞及微动脉中NF-κB p65表达均降低,差异具有统计学意义(*P*<0.05)。各组大鼠心肌细胞及微动脉中NF-κB p65表达的阳性细胞核数见表3,显微镜图见图1。

表3 各组大鼠心肌细胞及微动脉中NF-κB p65表达的阳性细胞比例( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 The proportion of positive nucleus of the expression of NF-κB p65 in myocardium cells and arteriole of rats among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	心肌细胞, %	微动脉, %
假手术组	10	3.92 ± 1.07	6.85 ± 2.40
模型组	20	34.52 ± 8.45*	45.33 ± 9.17*
依替巴肽低剂量组	20	22.41 ± 7.92**	35.48 ± 8.72**
依替巴肽中剂量组	20	18.29 ± 7.06**	18.55 ± 7.08**
依替巴肽高剂量组	20	15.86 ± 6.37**	12.39 ± 5.49**

与假手术组比较: \**P*<0.05;与模型组比较: \*\**P*<0.05

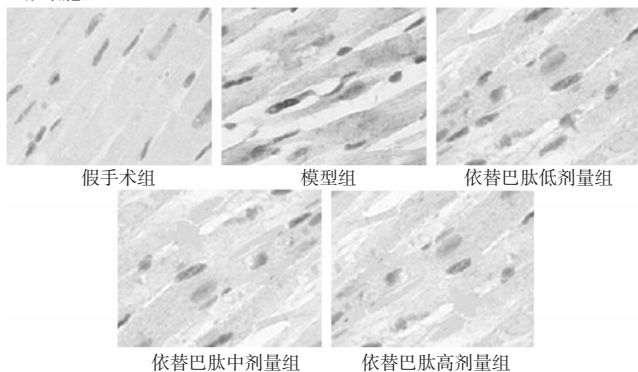
vs. sham operation: \**P*<0.05; vs. model group: \*\**P*<0.05

## 4 讨论

无复流是急性心肌梗死患者常见的症状,会延长组织损伤缺血时间,造成梗死面积扩大、恶性心律失常、早期心力衰竭更多、恢复期心室扩大和重构更明显。有报道显示,冠状动脉无复流患者病死率高达31%,比未发生无复流者高10倍<sup>[3]</sup>。因此寻找有效的药物以防止或减少无复流现象的发生,对急性心肌梗死的治疗及改善预后具有十分重要的临床意义。

有研究证明,无复流现象的产生与血小板-内皮细胞-中性

心肌细胞:



微动脉:

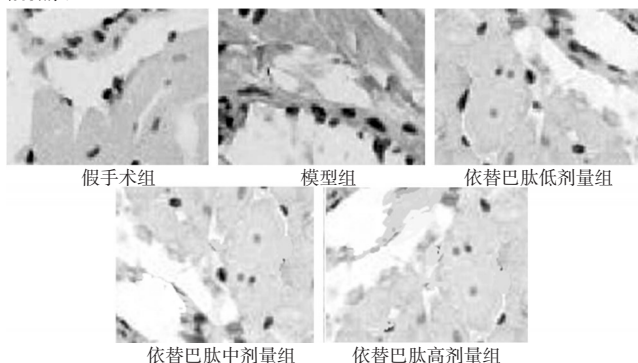


图1 各组大鼠心肌细胞和微动脉中NF-κB p65表达的显微镜图(SP,×400)

Fig 1 Microscopic graph of the expression of NF-κB p65 in myocardium cells and arteriole of rats among different groups(SP,×400)

粒细胞之间的相互作用密切相关<sup>[4]</sup>。而血小板膜糖蛋白GP II b/III a受体拮抗药依替巴肽可竞争性抑制纤维蛋白原和血小板GP II b/III a受体的结合,阻止血小板聚集、减少血栓形成,从而显著减少梗死面积、改善心肌微循环、缩小无复流的范围<sup>[5]</sup>。但是,依替巴肽是否能影响无复流形成的其他环节,通过减轻微血管内皮结构功能的破坏和中性粒细胞浸润发挥对急性心肌梗死模型大鼠的保护作用尚不十分清楚,笔者就此展开了一系列研究。

NO是存在于内皮上的信使分子,过量会损伤心肌、促使细胞凋亡。NOS是体内催化NO生成的主要酶,测定NOS活性可反映其代谢情况。NOS包括eNOS和iNOS两种亚型,eNOS存在于血管内皮细胞,可调节平滑肌张力、减轻氧化应激反应,保护血管结构和功能的完整性;iNOS在受到刺激后爆发性产生,则会引起内皮功能失调<sup>[6-7]</sup>。本研究中,模型组和依替巴肽各剂量组大鼠的NO含量显著高于假手术组,eNOS活性降低,iNOS活性升高,但依替巴肽各剂量组各项指标的变化幅度小于模型组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),提示依替巴肽可改善血管内皮功能。

中性粒细胞导致无复流的原因与其释放大量的氧自由基有关。MPO是中性粒细胞的标志酶,测定其活性可间接反映中性粒细胞的数目;MDA则是氧自由基的标志物,测定其含量可反映氧自由基的水平<sup>[8-9]</sup>。本研究中,模型组和依替巴肽各剂量组大鼠心肌MPO活性及MDA含量明显高于假手术组,但依替巴肽各剂量组升高幅度较模型组小,差异均有统计

学意义( $P<0.05$ ),提示依替巴肽可抑制中性粒细胞激活,同时减少氧自由基的释放。

NF-κB p65是一种参与调控生长发育、炎症、免疫等多种生理、病理过程的蛋白质。正常心肌中,NF-κB存在于胞浆内,当细胞受到外界因素刺激时,NF-κB p65进入细胞核启动相关基因的转录,使促炎细胞因子、白细胞介素、肿瘤坏死因子等的表达增加。另有报道显示,NF-κB p65可能是iNOS基因的主要转录因子之一,因此抑制NF-κB p65可减少iNOS的表达<sup>[10-11]</sup>。本研究显示,模型组和依替巴肽各剂量组大鼠NF-κB p65的阳性表达显著高于假手术组,但依替巴肽各剂量组升高幅度明显低于模型组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),提示依替巴肽对抑制NF-κB p65的激活有明确的作用。

综上所述,依替巴肽能维持血管内皮功能的完整性,抑制中性粒细胞和炎症关键调节因子NF-κB p65被激活,同时减少氧自由基的释放,从而减少无复流的发生。本研究为依替巴肽防治急性心肌梗死无复流提供了实验依据,其临床应用和安全性等问题值得进一步探讨。

### 参考文献

- [1] Kloner RA, Dai W. Glycoprotein II b/III a inhibitors and no-reflow[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(2):284.
- [2] 杜令,王琳.依替巴肽治疗非ST段抬高急性冠脉综合症的临床研究[J].*实用医学杂志*, 2009, 25(18):3 134.
- [3] 孙菁,沈洪.急性心肌梗死患者冠状动脉再通后无复流相关因素的分析[J].*中国全科医学*, 2009, 12(7):551.
- [4] Massberg S, Schürzinger K, Lorenz M, et al. Platelet adhesion via glycoprotein II b integrin is critical for athero-progression and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein II b[J]. *Circulation*, 2005, 112(8):1 180.
- [5] Huczek Z, Filipiak KJ, Kochman J, et al. Baseline platelet reactivity in acute myocardial infarction treated with primary angioplasty-influence on myocardial reperfusion, left ventricular performance, and clinical events[J]. *Am Heart J*, 2007, 154(1):62.
- [6] 刘启功,李永东.一氧化氮在VEGF介导的内皮细胞增殖与分泌效应中的作用[J].*中国病理生理杂志*, 2004, 20(4):595.
- [7] 任可欣,曲淑兰.运动、一氧化氮与衰老内皮的功能[J].*中国临床康复*, 2006, 10(4):150.
- [8] 余帆,徐彤彤,吕祥威,等.血清SOD、MDA、MPO检测在心肌缺血再灌注损伤治疗中的应用价值[J].*中国老年学杂志*, 2013, 33(1):218.
- [9] 夏舒萌,张德琛,于卫江,等.缺血再灌注期经皮氧分压与MDA、MPO的变化[J].*临床麻醉学杂志*, 2002, 18(11):594.
- [10] Yenari MA, Han HS. Influence of hypothermia on postischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NF-kappaB)[J]. *Neurochem Int*, 2006, 49(2):164.
- [11] Piva R, Belardo G, Santoro MG. NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(3/4):478.

(收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-04-03)