Doi: 10.16016/j.1000-5404.201506068

论著

# 对硝基咖啡酸苯乙酯对ISO诱导的心肌损伤保护作用

游 莉[1],路晓钦[2],董 志[1] (400016 重庆,重庆医科大学药学院药理教研室[1];400700 重庆,重庆市第九人民医院药剂科[2])

[摘要] **目的** 研究咖啡酸苯乙酯衍生物对硝基咖啡酸苯乙酯(CAPE-$NO_2$)对ISO诱导的心肌缺血的影响及其可能机制。**方法** 利用简单随机化法将SD大鼠分成5组:空白对照组(Control组),药物对照组(CAPE-$NO_2$组),模型对照组(ISO组),CAPE对照组(CAPE+ISO组),CAPE-$NO_2$实验组(CAPE-$NO_2$+ISO组)。CAPE(50 μg/kg)和CAPE-$NO_2$(50 μg/kg)分别腹腔注射大鼠7 d后,皮下注射异丙肾上腺素(ISO)(85 mg/kg)诱导心肌损伤,用苯巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠,检测心电图,处死大鼠,取心肌组织测定梗死面积和检测生化指标。**结果** ISO诱导大鼠ST-段显著抬高($P>0.05$),QRS段延长($P<0.05$),梗死面积增大($P<0.01$),抗氧化酶(SOD、CAT和GSH-Px)活性明显降低($P<0.01$),NO产生增多($P<0.01$)。与ISO组比较,CAPE和CAPE-$NO_2$均能明显降低由ISO引起的ST段抬高($P<0.05$,$P<0.01$)和QRS段延长($P<0.05$),减少心肌梗死面积($P<0.05$,$P<0.01$)和NO的产生($P<0.05$,$P<0.01$),其中CAPE-$NO_2$对大多数指标的影响比CAPE更显著。CAPE对ISO诱导的抗氧化酶活性降低无显著影响,而CAPE-$NO_2$能够增加这些酶的活性。**结论** CAPE-$NO_2$对ISO诱导的大鼠心肌缺血损伤发挥保护作用优于CAPE,可能是通过提高抗氧化酶活性,阻止氧化应激和硝化应激的发生,减少心肌损伤。

[关键词] 对硝基咖啡酸苯乙酯;心肌损伤;抗氧化
[中图法分类号] R-332;R542.05;R972.6 [文献标志码] A

# Cardioprotective effect of p-nitro caffeic acid phenethyl ester on isoproterenol-induced myocardial injury in rats

You Li[1], Lu Xiaoqin[2], Dong Zhi[1] ([1]Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Pharmacy, Chongqing Ninth People's Hospital, Chongqing, 400700, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the cardioprotective effect of p-nitro caffeic acid phenethyl ester (CAPE-$NO_2$), which is synthesized by coupling nitro group to CAPE, on isoproterenol (ISO)-induced myocardial infarction in rats and its underlying mechanisms. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups: Control group, CAPE-$NO_2$ group, ISO group, CAPE + ISO group and CAPE-$NO_2$ + ISO group. CAPE (50 μg/kg) and CAPE-$NO_2$ (50 μg/kg) were injected intraperitoneally into the rats for 7 d, and then the rats were administered with ISO (85 mg/kg) subcutaneously to induce myocardial injury. After that, the rats were anaesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg) to record electrocardiogram, and then sacrificed to detect the infarct size and biochemical indexes of the heart tissues. **Results** The rats treated with ISO showed marked elevation in ST-segment ($P>0.05$), enlargement in QRS duration ($P<0.05$), significant increase in the infarct size ($P<0.01$) and NO content ($P<0.01$), and significant decrease in the activities of endogenous antioxidants (SOD, CAT and GSH-Px) ($P<0.01$). Compared with the ISO group, both the CAPE + ISO group and the CAPE-$NO_2$ + ISO group could significantly reduce the elevation of ST-segment ($P<0.05$ and $P<0.01$), enlargement of QRS duration ($P<0.05$),

[通信作者] 董 志,E-mail:zhidong073@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150910.1106.016.html(2015-09-10)

infarct size ($P<0.05$ and $P<0.01$) and NO content ($P<0.05$ and $P<0.01$), however, the effect of CAPE-$NO_2$ was more significant than that of CAPE. CAPE had no effect on the antioxidants, but the administration of CAPE-$NO_2$ resulted in significant rise of the antioxidants activities. **Conclusion** The cardioprotective effect of CAPE-$NO_2$ on ISO-induced myocardial infarction is better than that of CAPE in the rats. The mechanism might be associated with the elevation of antioxidant activity to inhibit oxidative stress and nitrative stress.

[**Key words**] p-nitro caffeic acid phenethyl ester; myocardial injury; antioxidation

Corresponding author: Dong Zhi, E-mail: zhidong073@hotmail.com

咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester,CAPE)是蜂胶[1]和红景天[2]中提取的一种黄酮类活性物质。近年来研究表明,CAPE具有保护缺血/再灌注或异丙肾上腺素(ISO)诱导引起的心肌损伤作用[3-4]。本课题组设计合成了一系列CAPE衍生物,研究发现CAPE对硝基衍生物对硝基咖啡酸苯乙酯(CAPE-$NO_2$)是这些衍生物中免疫调节作用和抗血小板凝集活性最强的化合物[5-6]。CAPE-$NO_2$与很多治疗心脏疾病的药物,如硝苯地平、尼莫地平结构相似,都具有对硝基、苯环和不饱和基团。目前,CAPE-$NO_2$心肌保护作用的研究少见文献报道,本课题利用ISO诱导大鼠心肌缺血损伤,研究CAPE-$NO_2$对心肌的保护作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF级SD雄性大鼠,体质量(200±20)g,购于重庆医科大学实验动物中心。动物合格证号:SCXK(渝)2012-0001。

### 1.2 药物、试剂与仪器

对硝基咖啡酸苯乙酯(参照文献[5]合成);TTC染液(碧云天生物技术研究所)。超氧化物歧化酶试剂盒(A001-2)、过氧化氢酶试剂盒(A007-1)、谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒(A005)(南京建成生物工程研究所);苯巴比妥钠(sigma);异丙肾上腺素(ISO)(上海梯希爱化成工业发展有限公司)。TGL-16台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);生物机能实验系统BL-420F(成都泰盟科技有限公司);酶标仪TECAN(Infinite 200 PRO)。

### 1.3 方法

1.3.1 心肌缺血模型制作与给药 健康雄性SD大鼠30只,利用简单随机分组法分成5组。

空白对照组(Control组):腹腔注射溶剂(二甲基亚砜的0.9% NaCl溶液,体积比=1∶104)1.0 mL/kg,每日1次,连续7 d。第7天腹腔注射后2 h,皮下注射生理盐水,第8天重复给生理盐水1次。

药物对照组(CAPE-$NO_2$组):腹腔注射CAPE-$NO_2$ 50 μg/kg,每日1次,连续7 d。第7天腹腔注射后2 h,皮下注射生理盐水,第8天重复给生理盐水1次。

模型对照组(ISO组):腹腔注射溶剂1.0 mL/kg,每日1次,连续7 d。第7天腹腔注射后2 h,皮下注射1次ISO 85 mg/kg,第8天重复给ISO 1次。

CAPE对照组(CAPE+ISO组):腹腔注射CAPE 50 μg/kg,每日1次,连续7 d。第7天腹腔注射后2 h,皮下注射1次ISO 85 mg/kg,第8天重复给ISO 1次。

CAPE-$NO_2$实验组(CAPE-$NO_2$+ ISO组):腹腔注射CAPE-$NO_2$ 50 μg/kg,每日1次,连续7 d。第7天腹腔注射后2 h,皮下注射1次ISO 85 mg/kg,第8天重复给ISO 1次。

1.3.2 心电图监测 于最后1次给ISO 12 h后用苯巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉大鼠,用生物机能实验系统监测大鼠二导联心电图。

1.3.3 心脏梗死面积的测定[7] 监测心电图后摘取心脏,置-20 ℃冰箱1 h,自心尖向心底将心脏横切成1.5 mm厚度的组织切片,将切片置pH 7.4的1% TTC缓冲染液中,37 ℃恒温下避光染色10 min,随后转入10%甲醛溶液中固定,用Image-Pro Plus 8.0图像处理软件计算梗死面积。

1.3.4 酶活性的测定 取心脏组织适量,制成10%的组织匀浆,3 500 r/min离心10 min,取上清液,按照试剂盒说明书操作测定SOD、CAT、GSH-Px酶活性。

1.3.5 NO含量的测定 采用Griess方法[8]测定NO含量。取心脏组织适量进行匀浆,制成10%的组织匀浆,3 500 r/min离心10 min,取上清液,依次与Griess试剂A、B水浴反应,测其光密度值,计算$NO_2^-$浓度。

### 1.4 统计学分析

所得数据采用PASW statistics 18统计软件进行分析,所有数据均用$\bar{x}\pm s$表示,组间显著性由One-way ANOVA中的Tukey检测。

## 2 结果

### 2.1 心电图的变化

$CAPE\text{-}NO_2$ 组心电图与 Control 组相比，几乎无变化，表明 $CAPE\text{-}NO_2$ 本身对心电不产生显著影响；模型对照组出现 ST 段显著抬高（$P<0.01$），表明 ISO 造模成功；CAPE + ISO 组和 $CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组与 ISO 组比较，ST 段出现下降，$CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组 ST 段下降更显著（$P<0.05$）。结果表明 $CAPE\text{-}NO_2$ 能部分恢复 ISO 引起的大鼠心电图紊乱，且效果优于 CAPE。见图 1。

### 2.2 心肌梗死面积

经 TTC 染色后，梗死心肌组织呈白色，正常组织呈红色。Control 组（图 2A）和药物对照（图 2B）色泽鲜红均匀，无梗死灶出现，ISO 组（图 2C）梗死灶明显，与 Control 组比较差异显著（$P<0.01$）。CAPE + ISO 组（图 2D）和 $CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组（图 2E）梗死面积与 ISO 组比较有不同程度的减小，且 $CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组的梗死面积明显小于 CAPE + ISO 组（$P<0.01$，表 1）。

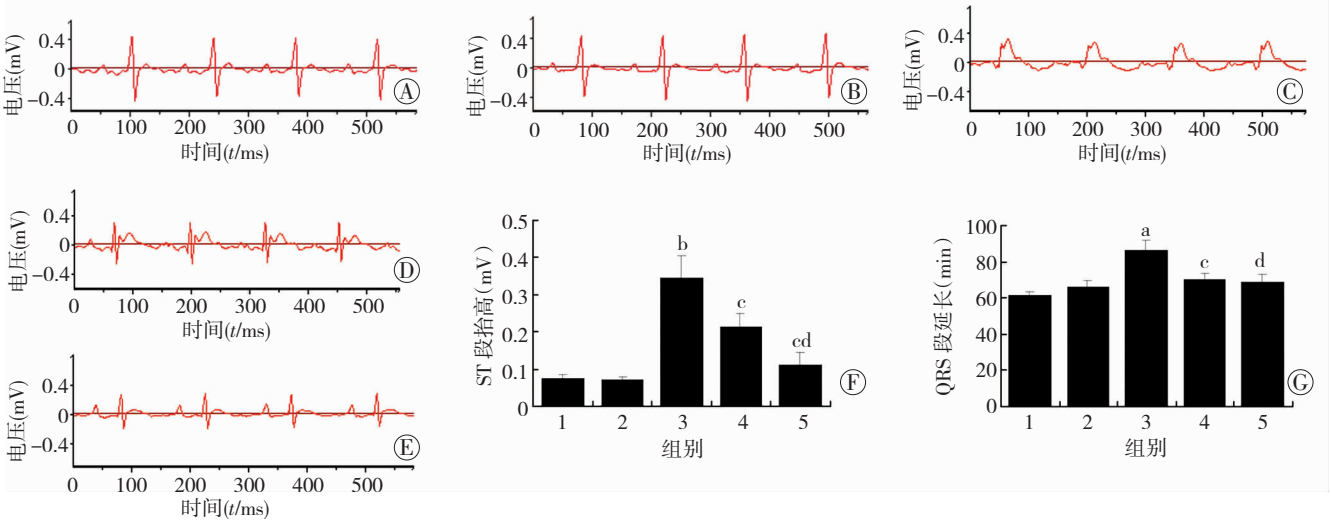
**表 1 各组大鼠心肌梗死面积比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）**

| 组别 | 梗死面积（%） |
|---|---|
| Control 组 | 0 |
| $CAPE\text{-}NO_2$ 组 | 0 |
| ISO 组 | $47.90\pm10.11^{a}$ |
| CAPE + ISO 组 | $38.14\pm9.85^{b}$ |
| $CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组 | $8.11\pm2.32^{cd}$ |

a：$P<0.01$，与 Control 组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与 ISO 组比较；d：$P<0.01$，与 CAPE + ISO 组比较

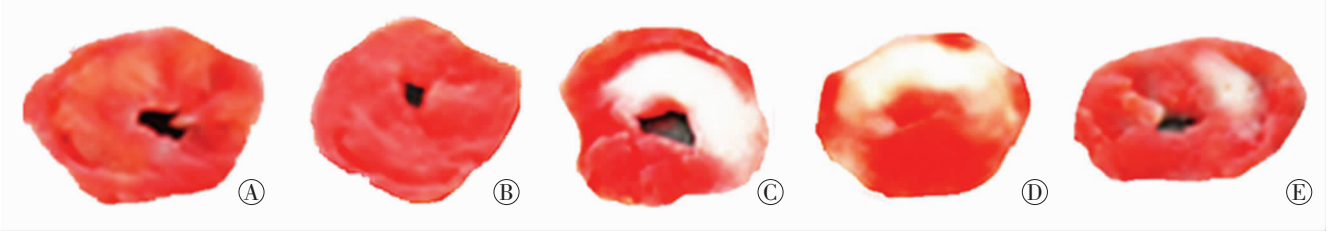
### 2.3 心肌组织抗氧化酶活性

与 Control 组比较，$CAPE\text{-}NO_2$ 组无明显变化，表明 $CAPE\text{-}NO_2$ 对机体抗氧化酶活性未产生影响。ISO 组的抗氧化酶（SOD、CAT 和 GSH-Px）活性显著降低。与 ISO 组比较，CAPE + ISO 组的 3 种抗氧化酶活性无明显变化，而 $CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组显著升高由 ISO 引起的抗氧化酶活性降低。见图 3。



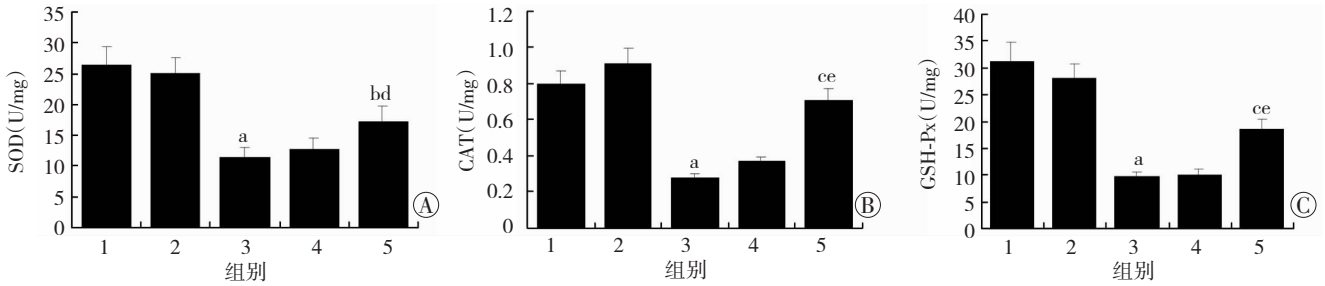

A：Control 组心电图；B：$CAPE\text{-}NO_2$ 组心电图；C：ISO 组心电图；D：CAPE + ISO 组心电图；E：$CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组心电图；F：各组 ST 段抬高比较；G：各组 QRS 段延长比较；1：Control 组；2：$CAPE\text{-}NO_2$ 组；3：ISO 组；4：CAPE + ISO 组；5：$CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 Control 组比较；c：$P<0.05$，与 ISO 组比较；d：$P<0.05$，与 CAPE + ISO 组比较

**图 1 各组大鼠二导联心电图**




A：Control 组；B：$CAPE\text{-}NO_2$ 组；C：ISO 组；D：CAPE + ISO 组；E：$CAPE\text{-}NO_2$ + ISO 组

**图 2 各组大鼠心脏横切的 TTC 染色观察**

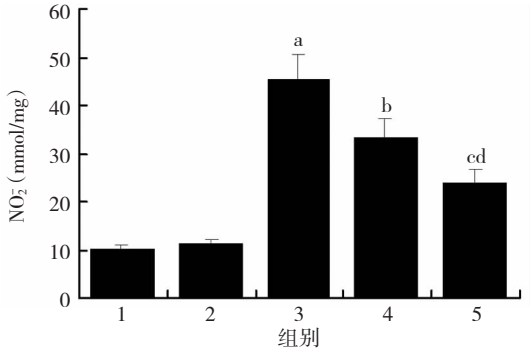



A:各组血清中 SOD 值;B:各组血清中 CAT 值;C:各组血清中 GSH-Px 值;1:Control 组;2:CAPE-$NO_2$ 组;3:ISO 组;4:CAPE + ISO 组;5:CAPE-$NO_2$ + ISO 组;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 ISO 组比较;d:$P<0.05$,e:$P<0.01$,与 CAPE + ISO 组比较

**图3 各组大鼠心肌组织抗氧化酶活性比较**

### 2.4 心脏组织 NO 含量

与 Control 组比较,CAPE-$NO_2$ 组 $NO_2^-$ 浓度无显著变化,ISO 组显著升高($P<0.01$);与 ISO 组比较,CAPE + ISO 组和 CAPE-$NO_2$ + ISO 组的 $NO_2^-$ 浓度均下降,后者下降的更加显著。见图4。




1:Control 组;2:CAPE-$NO_2$ 组;3:ISO 组;4:CAPE + ISO 组;5:CAPE-$NO_2$ + ISO 组;a:$P<0.01$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 ISO 组比较;d:$P<0.05$,与 CAPE + ISO 组比较

**图4 各组大鼠心肌组织中 $NO_2^-$ 浓度变化**

## 3 讨论

异丙肾上腺素(ISO)是β受体激动剂,能引起心肌严重的应激反应导致心脏肌肉损伤性坏死[9]。注射高剂量的 ISO 诱导的心肌缺血,抑制左心室功能,与人类心肌梗死病理变化非常接近[10]。ECG 异常抬高是确切诊断 MI 的主要标准,细胞膜功能损伤引起 ST 段抬高,表示了缺血和非缺血潜在的不同,这种变化可在急性心肌缺血患者或 ISO 诱导的心肌损伤大鼠中观察到[7]。ISO 诱导的大鼠 ECG 中 ST-段明显抬高可能是由于 ISO 加速了心肌坏死。连续 2 d 注射 ISO 使心电图 QRS 期延长,这也是心肌损伤的预兆之一[11]。本实验中,用 CAPE 和 CAPE-$NO_2$ 预处理显著抑制了 ISO 诱导的 ST-段抬高、QRS 段时间的延长,其中 CAPE-$NO_2$ 降低 ISO 诱导的 ST-段抬高较 CAPE 明显,表明 CAPE-$NO_2$ 能够改善心肌缺血,且效果可能优于 CAPE。

氯化三苯基四氮唑(TTC)染色是一种普遍认可的确定心肌损伤面积的方法,能够提供可靠的坏死参数[12]。TTC 与正常组织中的 LDH 反应形成红色的甲瓒,而缺血组织内 LDH 活性下降,不能反应,故不会产生变化呈苍白[13]。ISO 诱导大鼠心脏细胞膜损伤,LDH 大量外漏,对 TTC 反应减少。CAPE 与 CAPE-$NO_2$ 预处理降低了心肌损伤面积,红色区域与 ISO 比较明显增加,表明 LDH 的外漏减少,其中 CAPE-$NO_2$ 具有更强的降低心肌损伤的能力。因此,CAPE-$NO_2$ 阻止细胞膜损伤,并且降低由 ISO 诱导的 MI 心肌损伤面积,保护心脏。

ISO 自动氧化为醌类,与氧发生反应产生超氧阴离子和过氧化氢,导致氧化应激和消耗体内抗氧化系统。自由基清除酶包括 SOD、CAT 和 GPx 等,这些是细胞抗氧化损伤的第一道防线[7]。SOD 催化 $O_2^-$ 转化为 $H_2O_2$,$H_2O_2$ 由 CAT 或 GSH-Px 降解[14]。在 ISO 模型大鼠中,过量产生的超氧阴离子使 SOD 失活,$H_2O_2$ 清除酶 CAT 和 GSH-Px 的活性降低[15]。Cagli 等[16]研究发现 CAPE 对 I/R 诱导的 CAT 和 GSH-Px 活性变化无影响。文献[17]报道,CAPE 对 ISO 诱导的心肌损伤大鼠的 SOD 和 CAT 酶活性无影响。本研究中,CAPE 对 ISO 损伤心肌组织的 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活性无明显改善,而 CAPE 的衍生物 CAPE-$NO_2$ 对这3种抗氧化酶活性有显著提高作用,表明 CAPE-$NO_2$ 提升机体抗过氧化损伤活性强于 CAPE。CAPE-$NO_2$ 增强3种抗氧化酶活性的作用和心肌梗死灶面积降低的结果是一致的,因此有理由认为,这种增强酶活性对抗氧自由基损伤的作用可能是 CAPE-$NO_2$ 改善心肌缺血损伤的原因之一。

MI 急性期诱导一氧化氮合酶(iNOS)表达,心脏

中 NO 产生增加[18]。文献[19]报道,β-受体激动剂刺激 iNOS 上调,显著增加 NO 产生,这导致了硝化应激,产生了具有强氧化性的分子过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)。有研究发现 CAPE 能显著降低由 I/R 诱导的 NO 升高[16]。本实验中,CAPE-$NO_2$ 预处理显著降低 ISO 诱导的心肌损伤组织 NO 的升高,且作用比 CAPE 强,可能是由于 CAPE-$NO_2$ 提高抗氧化酶活性,阻止过氧化物产生和下游过氧亚硝基阴离子形成的原因。

综上所述,CAPE-$NO_2$ 对 ISO 诱导的大鼠心肌缺血损伤发挥保护作用,可能是通过提高抗氧化酶活性,阻止氧化应激和硝化应激的发生来减少心肌损伤。

**参考文献:**

[1] Tolba M F, Azab S S, Khalifa A E, *et al*. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects [J]. IUBMB Life, 2013, 65(8): 699 – 709.

[2] Jung W K, Lee D Y, Kim J H, *et al*. Anti-inflammatory activity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) extracted from Rhodiola sacra against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mice[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(7): 783 – 787.

[3] Ozer M K, Parlakpinar H, Acet A. Reduction of ischemia—reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)[J]. Clin Biochem, 2004, 37(8): 702 – 705.

[4] Ilhan S, Yilmaz N, Nacar E, *et al*. The effect of caffeic acid phenethyl ester on isoproterenol-induced myocardial injury in hypertensive rats[J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2014, 14(7): 576 – 582.

[5] Liu T L, Deng L, Li X L, *et al*. Novel Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues as Immunoregulatory Agents: Synthesis and SAR Study[J]. Lat Am J Pharm, 2013, 32(3): 329 – 334.

[6] Zhou K, Li X, Du Q, *et al*. A CAPE analogue as novel antiplatelet agent efficiently inhibits collagen-induced platelet aggregation[J]. Pharmazie, 2014, 69(8): 615 – 620.

[7] Li H, Xie Y H, Yang Q, *et al*. Cardioprotective effect of paeonol and danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48872.

[8] Vijayan N A, Thiruchenduran M, Devaraj S N. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of Crataegus oxyacantha on isoproterenol-induced myocardial damage[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 367(1/2): 1 – 8.

[9] Salimeh A, Mohammadi M, Rashidi B. Preconditioning with diosgenin and treadmill exercise preserves the cardiac toxicity of isoproterenol in rats[J]. J Physiol Biochem, 2013, 69(2): 255 – 265.

[10] Li X, Wang X, Guo Y, *et al*. Regulation of endothelial nitric oxide synthase and asymmetric dimethylarginine by matrine attenuates isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats[J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64(8): 1107 – 1118.

[11] Chakraborty M, Asdaq S M. Interaction of Semecarpus anacardium L. with propranolol against isoproterenol induced myocardial damage in rats[J]. Indian J Exp Biol, 2011, 49(3): 200 – 206.

[12] Prabhu S, Jainu M, Sabitha K E, *et al*. Role of mangiferin on biochemical alterations and antioxidant status in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 107(1): 126 – 133.

[13] Donnelly T J, Sievers R E, Vissern F L, *et al*. Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? [J]. Circulation, 1992, 85(2): 769 – 778.

[14] Ramadan G, El-Beih N M, Arafa N M, *et al*. Preventive effects of Egyptian sweet marjoram (Origanum majorana L.) leaves on haematological changes and cardiotoxicity in isoproterenol-treated albino rats [J]. Cardiovasc Toxicol, 2013, 13(2): 100 – 109.

[15] Radhiga T, Rajamanickam C, Sundaresan A, *et al*. Effect of ursolic acid treatment on apoptosis and DNA damage in isoproterenol-induced myocardial infarction[J]. Biochimie, 2012, 94(5): 1135 – 1142.

[16] Cagli K, Bagci C, Gulec M, *et al*. *In vivo* effects of caffeic acid phenethyl ester on myocardial ischemia-reperfusion injury and apoptotic changes in rats [J]. Ann Clin Lab Sci, 2005, 35(4): 440 – 448.

[17] Oktar S, Aydin M, Yonden Z, *et al*. Effects of caffeic acid phenethyl ester on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats[J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2010, 10(4): 298 – 302.

[18] Pinto V D, Cutini G J, Sartorio C L, *et al*. Enhanced beta-adrenergic response in rat papillary muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial infarction [J]. Acta Physiol (Oxf), 2007, 190(2): 111 – 117.

[19] Li D, Qu Y, Tao L, *et al*. Inhibition of iNOS protects the aging heart against beta-adrenergic receptor stimulation-induced cardiac dysfunction and myocardial ischemic injury [J]. J Surg Res, 2006, 131(1): 64 – 72.

(**收稿**:2015-06-13;**修回**:2015-08-01)

(编辑 张 维)