维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0678-05

别嘌呤醇对心肌梗死后大鼠心室重构和心功能的影响

肖 骏[1],佘 强[1],罗开良[1],黄开顺[2],曹友德[3]

(1. 重庆医科大学附属第二医院心内科,重庆 400010;2. 重庆医科大学基础研究所, 重庆 400016;
3. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨黄嘌呤氧化酶(Xanthine oxidase,XO)抑制剂别嘌呤醇(Allopurinol)对心肌梗死(Myocardial infarction,MI)后大鼠心室重构和心功能的影响。方法:结扎冠脉前降支制作大鼠心肌梗死模型,随机分为假手术组(sham,n=5),心肌梗死组(MI,n=16)和别嘌呤醇组[50mg/(kg·d),n=15],28d 后观察血流动力学和超声心动图的变化,并检测左心室重量指数(LVWI),心肌梗死面积,清除活性氧(Reactive oxygen species,ROS)活力,XO 活力和蛋白表达。结果:与 sham 组比较,MI 组 LVWI,XO 蛋白表达和活力升高,清除活性氧活力和心功能降低(P<0.01)。别嘌呤醇组与 MI 组比较,LVWI 和 XO 活力降低,清除活性氧活力和心功能升高(P<0.05 或 P<0.01),但心率,动脉血压,梗死面积和 XO 蛋白表达在两组间差异无显著性(P>0.05)。结论:别嘌呤醇能够抑制心肌梗死后心室重构,改善心功能。其机制可能与抑制黄嘌呤氧化酶活性,减少活性氧的生成有关。

【关键词】别嘌呤醇;黄嘌呤氧化酶;活性氧;心室重构;心肌梗死

【中国图书分类法分类号】R542 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-09

Effect of allopurinol on left ventricular remodeling and heart function in rats with myocardial infarction

XIAO Jun, et al

(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of xanthine oxidase inhibitor allopurinol on left ventricular remodeling and function in rats with myocardial infarction(MI). *Methods*: MI models were produced by ligation of anterior descending coronary artery. The survivals were randomly divided into 3 groups: sham operation group, MI group and allopurinol group[50mg/(kg·d), n=15]. After 28 days, the parameters of echocardiogram and hemodynamics were investigated. The infarct size, LV weight index were detected, too. In addition, the activities of xanthine oxidase(XO) and $\cdot O_2^-$, ·OH-scavenging were examined; the expression of XO was detected by Western blot. *Results*: Compared with sham group, the LV weight index and expression of XO were increased; the activity of XO was boosted but the heart function and activities of $\cdot O_2^-$, ·OH-scavenging were decreased (P<0.01). Compared with MI group, the LV weight index were decreased; the activity of XO was depressed but the heart function and activities of $\cdot O_2^-$, ·OH-scavenging were increased(P<0.05 or P<0.01). There were no significant difference in heart rate, arterial blood pressure, infarct size and XO expression between allopurinol and MI group. *Conclusion*: Allopurinol could improve LV remodeling and function in rats with MI. The protective mechanism could be related to its ability to depress the activity of XO and reduce reactive oxygen species.

【Key words】 Allopurinol; Xanthine oxidase; Reactive oxygen species; Left ventricular remodeling; Myocardial infarction

MI 后心室重构包括心肌细胞重构和间质重构,主要表现为梗死区扩展,非梗死区心肌肥厚和室腔的扩张,引起各种严重的并发症[1]。既往实验表明,缺血心肌中 ROS 大量生成,通过细胞内氧化还原信号通路介导心肌细胞肥厚和室腔的扩张,最终导致心室重构和功能紊乱[2]。XO 作为心肌细胞中催化产生 ROS 的主要酶源之一,在心衰进程中大量表达和激活[3,4]。据此,本研究拟观察 XO 的竞争抑制剂别嘌呤醇对心肌梗死后大鼠心肌 XO 的活性、ROS 的产生、心室重构和心功能的影响。

1 材料和方法

作者介绍:肖 骏(1973-),男,博士,主治医师,研究方向:冠心病。

通讯作者:佘 强,男,教授,E-mail:qshe98@hotmail.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 55 只(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供),体重 180～230g。

1.1.2 药物与主要试剂 别嘌呤醇(批号:050104),重庆青阳药业有限公司生产;抑制与产生超氧阴离子自由基测试盒、羟自由基测试盒和黄嘌呤氧化酶测试盒(南京建成生物工程研究所);黄嘌呤氧化酶兔抗鼠多克隆抗体(sc-20991,Santa Cruz 公司,美国);β-actin 兔抗鼠多克隆抗体(BA2305,武汉博士德生物工程有限公司);Prestained Protein Ladder (SM0671,Fermentas 公司,立陶宛);辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(北京中杉生物技术有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 GE Vivid 7 彩色多普勒超声诊断仪(美国),BL-410 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),752 型紫外分光光度仪(上海青华科技仪器公司);电泳仪、转印仪、垂直电泳槽、凝胶图像分析系统(BIO-RAD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及分组 参照文献介绍的方法[4],取 50 只大鼠于肺动脉圆锥与左心耳之间距主动脉根部 3 mm 处用无创缝合线(7-0)结扎冠脉前降支制作 MI 模型,术后共存活 31 只,随机分为心肌梗死组(MI,蒸馏水 2ml/d 灌胃)16 只,别嘌呤醇治疗组[allo,50mg/(kg·d)灌胃]15 只;另设假手术组(sham)5 只,仅在前降支上留一松结,不结扎。术后 24h 开始药物干预,连续 28d。

1.2.2 超声心动图检测 腹腔内注射 2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)全麻大鼠,仰卧位固定后胸部备皮,用 GE Vivid 7 彩色多普勒超声诊断仪进行心脏超声检测,探头频率为 13MHz,深度 3.5cm,速度 200mm/s。在取得满意的胸骨旁左心室短轴二维图像后,于乳头肌水平将 M 型取样线垂直于室间隔和左心室后壁获得 M 型超声心动图,测定室间隔(IVS)、左心室后壁(LVPW)厚度、左心室舒张末期内径(LVEDD)、短轴缩短分数(FS)及射血分数(EF),取连续 3 个心动周期的平均值。超声检查的操作及分析均由不知道大鼠分组情况的专科医生完成。

1.2.3 血流动力学检测 腹腔内注射 2%戊巴比妥钠全麻大鼠,分离右颈总动脉并插入聚苯乙烯 PE-20 导管,稳定 10 min 后用 BL-410 生物机能实验系统测定动脉收缩压(ASP)和动脉舒张压(ADP),然后将导管逆行送入左心室,测定心率(HR)、左室舒张末压(LVEDP)、左室收缩压(LVSP)、左室压力曲线上升/下降最大速率(±dp/dtmax)。

1.2.4 左室重量指数及梗死面积的测定 大鼠称重后处死,剔除心房、血管组织和右心室后称取左心室重量(LVW)并除以体重获得左室重量指数(LVWI)。沿梗死区中部垂直于左心室长轴的方向制作石蜡组织切片(5μm 厚),HE 染色后用 Image pro plus 4.5 图像分析软件测定左心室心外、内膜周长和梗死区心外、内膜长度,取平均值后按以下公式计算[5]:梗死面积(Infarction size)=(梗死区心外膜长度+梗死区心内膜长度)/(左心室心外膜周长+左心室心内膜周长)。剩余心肌组织经液氮速冻后存于 -80℃冰箱。

1.2.5 心肌组织清除超氧阴离子($\cdot O_2^-$)、羟自由基($\cdot OH$)活力和 XO 活力检测 以心肌组织清除 $\cdot O_2^-$ 活力(activity of $\cdot O_2^-$-scavenging)、清除·OH 活力(activity of ·OH-scavenging)来反映心肌组织中 $\cdot O_2^-$ 和·OH 的含量。参照抑制与产生超氧阴离子自由基测试盒、羟自由基测试盒和黄嘌呤氧化酶测试盒说明书操作,取冻存心肌组织 100mg 制备成 10%的冰浴组织匀浆,3 000r/min 离心 10min 吸取上清液,加入试剂混匀,终止反应后用紫外分光光度计测定吸光度值,分别计算出清除·OH、清除 $\cdot O_2^-$ 和 XO 活力单位。

1.2.6 Western blot 检测 XO 蛋白表达 取 100mg 冻存心肌组织加入 1 ml 去垢剂裂解液中冰浴研磨后孵育 30min,4℃离心机以 12 000×g,离心 20min,取上清液用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取 40μg 蛋白量经 sds-PAGE 电泳后电转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2h,将膜与 XO 抗体(1∶400)4℃孵育过夜,β-actin(1∶200)作为内标,加辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (1∶1 500)37℃孵育 2h,DAB 显色,以凝胶成像系统扫描后用 Quantity one 4.4.0 图像分析软件进行半定量灰度分析,计算 XO 与 β-actin 光密度值比值代表相对表达量。

1.3 统计学处理

用 Sas8.0 统计软件分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey-Kramer 多重比较法。

2 结 果

2.1 超声心动图结果

28d 后大鼠 MI 组死亡 6 只,allo 组死亡 1 只,sham 组全部存活。与 sham 组比较,MI 组 IVS 和 LVPW 增厚,LVEDD 增宽,FS 和 EF 降低($P<0.01$);allo 组与 MI 组比较,IVS、LVPW、LVEDD 显著降低,FS 和 EF 明显升高($P<0.01$),结果见表 1,图 1。

2.2 血流动力学结果

如表 2 所示,与 sham 组比较,MI 组 HR、ASP、ADP、LVSP、±dp/dtmax 显著降低,LVEDP 明显升高($P<0.01$);allo 组与 MI 组比较,LVSP、±dp/dtmax 明显升高,LVEDP 降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),HR、ASP 和 ADP 虽有所升高,但两组间差异无显著性($P>0.05$)。

2.3 左心室重量指数和心肌梗死面积

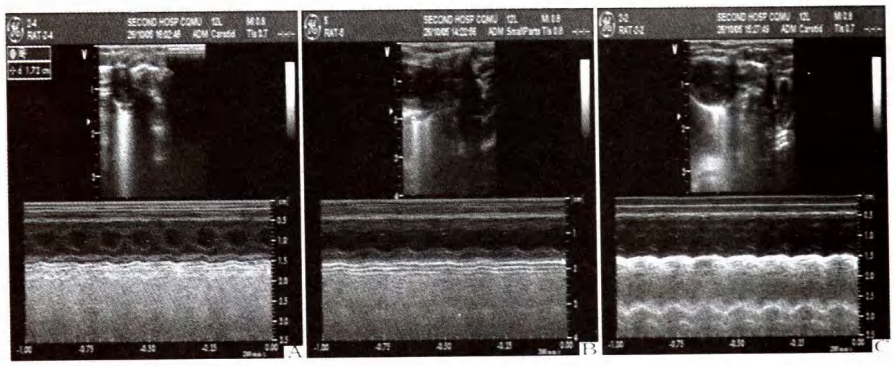
与 sham 组比较,MI 组 LVW、LVWI 显著升高($P<0.01$);allo 组与 MI 组比较,LVW、LVWI 明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),其梗死面积虽有所降低,但

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 大鼠心肌梗死后 28d 超声心动图结果的比较

	sham(n=5)	MI(n=10)	allo(n=14)
IVS(mm)	1.2 ± 0.2	2.5 ± 0.3**	1.6 ± 0.2**##
LVPW(mm)	1.3 ± 0.2	2.6 ± 0.2**	1.7 ± 0.2**##
LVEDD(mm)	5.8 ± 0.9	7.2 ± 0.8**	6.2 ± 0.5##
FS(%)	53.9 ± 8.4	32.0 ± 5.9**	46.5 ± 7.8##
EF(%)	74.9 ± 5.7	35.5 ± 2.3**	56.4 ± 5.5**##

** 与 sham 组比较，P<0.01；## 与 MI 组比较，P<0.01



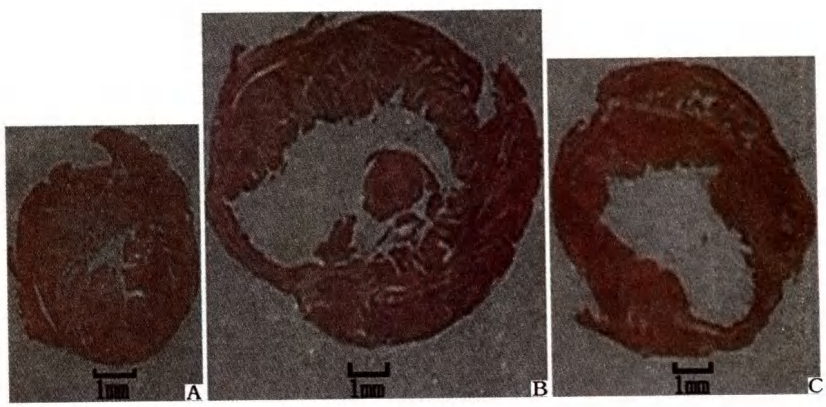
A. sham 组；B. MI 组；C. allo 组

图 1 大鼠心肌梗死后 28d 经胸骨旁左心室短轴切面 M 型超声心动图

表 2 大鼠心肌梗死后 28d 血流动力学结果的比较

	sham(n=5)	MI(n=10)	allo(n=14)
HR(beat/min)	471 ± 25	405 ± 28**	423 ± 19**
ASP(kPa)	20.10 ± 1.69	15.56 ± 1.32**	16.09 ± 1.51**
ADP(kPa)	11.84 ± 0.96	9.09 ± 0.79**	9.45 ± 0.88**
LVSP(kPa)	18.02 ± 1.59	15.21 ± 1.45**	16.84 ± 1.49#
LVEDP(kPa)	0.92 ± 0.12	2.83 ± 0.55**	1.52 ± 0.41*##
+dp/dtmax(kPa/s)	781.87 ± 41.06	531.44 ± 34.13**	667.25 ± 33.26**##
−dp/dtmax(kPa/s)	629.07 ± 29.17	436.88 ± 32.24**	534.93 ± 34.09**##

与 sham 组比较：*P<0.05，**P<0.01；与 MI 组比较：#P<0.05，##P<0.01



A. sham 组；B. MI 组；C. allo 组

图 2 大鼠心肌梗死后 28d 左心室横切面切片（HE 染色，标尺 1mm）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 大鼠心肌梗死后 2dLVW、LVWI、梗死面积、黄嘌呤氧化酶蛋白表达的比较

	sham(n=5)	MI(n=10)	allo(n=14)
LVW(mg)	865.2 ± 107.9	1132.6 ± 129.4**	985.6 ± 113.4#
LVWI(mg/g)	2.2 ± 0.2	2.9 ± 0.2**	2.5 ± 0.1*##
XO/β-actin ratio	1.9 ± 0.2	4.6 ± 0.9**	4.4 ± 0.8**
infarction size(%)		30.6 ± 3.2	28.4 ± 2.9

与 sham 组比较：*P<0.05，**P<0.01；与 MI 组比较：#P<0.05，##P<0.01

表 4 大鼠心肌梗死后 28d 心肌 XO 和清除·O_2^-、·OH 活力的比较

	sham(n=5)	MI(n=10)	allo(n=14)
黄嘌呤氧化酶活力(u/mgpro)	0.21 ± 0.05	1.62 ± 0.19**	0.43 ± 0.13##
清除超氧阴离子活力(u/gpro)	151.38 ± 9.57	64.77 ± 8.50**	97.72 ± 8.99**##
清除羟自由基活力(u/mgpro)	253.03 ± 17.39	91.67 ± 16.21**	177.02 ± 9.56**##

** 与 sham 组比较，P<0.01；## 与 MI 组比较，P<0.01

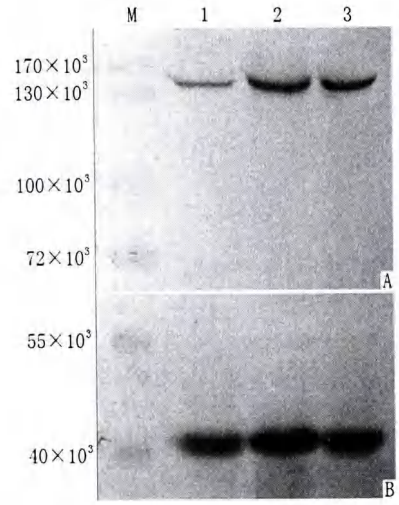
两组间差异无显著性(P>0.05)，结果见表 3，图 2。

2.4 心肌组织黄嘌呤氧化酶活力及蛋白表达

与 sham 组比较，MI 组心肌组织 XO 活力明显升高，Western blot 结果显示 XO 蛋白表达增强(P<0.01)；allo 组与 MI 组比较，XO 活力明显降低(P<0.01)，而 XO 蛋白表达两组间差异无显著性(P>0.05)，结果见图 3，表 3、4。

2.5 心肌组织清除超氧阴离子(·O_2^-)、羟自由基(·OH)活力

如表 4 所示，MI 组与 sham 组比较，心肌组织清除超氧阴离子(·O_2^-)、羟自由基(·OH)活力明显降低(P<0.01)；allo 组上述指标与 MI 组比较均明显升高(P<0.01)。



M. 蛋白 marker；1. sham 组；2. MI 组；3. allo 组；A. 黄嘌呤氧化酶；B. β-actin

图 3 大鼠心肌梗死后左心室非梗死区 XO 蛋白的 Western blot 检测结果

3 讨 论

心肌梗死后心室重构主要包括心肌细胞重构与间质重构，表现为梗死区的扩展、非梗死区失代偿性肥厚和室腔的扩张，最终导致心脏舒缩功能恶化。既往实验表明，缺血心肌中 ROS 大量生成，通过细胞内氧化还原信号通路介导心肌细胞肥厚和室腔的扩张，最终导致心室重构和功能紊乱[2]。XO 作为心肌细胞中催化产生 ROS 的主要酶源之一，在心衰进程中大量表达和激活[3,4]，提示 XO 的竞争抑制剂，别嘌呤醇可能通过减少 ROS 的生成，抑制ROS 介导的心室重构，改善心功能。

本研究用梗死面积来反映梗死区扩展，用 LVW、LVWI、IVS 及 LVPW 厚度来反映非梗死区心肌肥厚，用 LVEDD 反映室腔的扩张，用 FS、EF、LVSP、LVEDP、± dp/dtmax 来代表心功能。结果显示，别嘌呤醇能够降低室壁肥厚和室腔扩张，增强心脏舒缩功能和升高射血分数。但在本研究时限内，别嘌呤醇治疗组与 MI 组比较，其动脉血压和梗死面积虽有所改善，但两组间差异无显著性(P>0.05)，这可能与本研究时限较短和例数较少有关。另外，与 MI 组比较，别嘌呤醇治疗组心率无明显升高(P>0.05)，提示别嘌呤醇没有增加交感神经张力，避免了交感兴

维普资讯 http://www.cqvip.com

奋对梗死后心肌的毒性作用。

别嘌呤醇改善胶原重塑的细胞与分子生物学机制至今未明,可能与抑制缺血心肌产生大量 ROS 有关,包括超氧阴离子(·O_2^-)、羟自由基(·OH)、过氧化氢(H_2O_2)、单线态氧($^1O_2$)等,形成级联反应大量生成 ROS,可通过细胞内多条氧化还原信号通路[6],激活细胞炎症因子网络如 MAPKs,调节氧化还原敏感的转录因子如 NF-κB,激活基质金属蛋白酶,一方面刺激心肌细胞增殖肥大,另一方面大量溶解胶原,造成局部室壁变薄和室腔扩张。业已证实,直接清除·OH 可以改善心室重构和功能紊乱[2]。黄嘌呤氧化酶(XO)是心肌组织中产生 ROS 的主要酶源之一,在缺血心肌中表达增加和活性增强[3,4],而别嘌呤醇及其活性代谢物羟嘌呤醇(Oxypurinol)作为竞争性抑制剂能有效抑制黄嘌呤氧化酶活性,从而减少 ROS 的生成[7]。本研究用清除·O_2^- 和·OH 活力反映 ROS 的生成量,清除活力高则表明心肌组织中·O_2^- 和·OH 含量低;另测定 XO 活力及蛋白表达。结果别嘌呤醇治疗组心肌组织清除·O_2^- 和·OH 活力明显升高,XO 活性降低,蛋白表达与 MI 组比较无统计学差异。据此推测别嘌呤醇可能通过抑制 XO 活性,减少 ROS 的生成,从而抑制氧化应激介导的心室重构而发挥作用,而对 XO 蛋白的表达无明显影响。

别嘌呤醇作为降尿酸药物广泛应用于临床,其安全性已经得到认可,目前已用于治疗心衰伴高尿酸血症的患者[8]。本研究表明,心肌梗死应用别嘌呤醇治疗有利于改善心室重构,延缓心力衰竭。这种额外的药理机制将为临床治疗心肌梗死提供一条新思路。

参 考 文 献

[1] Pfeffer MA,Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction:experimental observations and clinical implications[J]. Circulation,1990;81(4):1161-1172.

[2] Kinugawa S,Tsutsui H, Hayashidani S,et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice:role of oxidative stress[J]. Circ Res,2000;87(5):392-398.

[3] Cappola TP,Kass DA,Nelson GS,et al. Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Circulation,2001;104(20):2407-2411.

[4] Mellin V,Isabelle M,Oudot A,et al. Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure[J]. European Heart Journal, 2005;26(15):1544-1550.

[5] Delyani JA,Robinson EL,Rudolph AE. Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2001;281(2):H647-H654.

[6] Shah AM,Channon KM. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease[J]. Heart,2004;90(5):486-487.

[7] Minhas KM,Saraiva RM,Schuleri KH,et al. Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy[J]. Circ Res,2006;98(2):271-279.

[8] Doehner W,Schoene N,Rauchhaus M,et al. Effects of Xanthine oxidase inhibition with allopurinol on endothelial function and peripheral blood flow in hyperuricemic patients with chronic heart failure:results from 2 placebo-controlled studies[J]. Circulation,2002; 105(22):2619-2624.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 648 页)

[2] Jose B.Why the epidermal growth factor receptor? The rational for cancer therapy[J]. Oncologist,2002;7(S4):2-8.

[3] Josep T. The role of VEGF and EGFR inhibition:implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents[J]. Molecular Cancer Research,2007;5(33):203-220.

[4] Press MF,Lenz HJ. EGFR,HER2 and VEGF pathways:validated targets for cancer treatment[J]. Drugs,2007;67(14):2045-2075.

[5] 王 恺,马光辉.白蛋白纳米球药物载体制备及表征[J]. 过程工程学报,2004;4(2):155-159.

[6] Muller BG,Leuenberger H,Kissel T.Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting:an optimized manufacturing technique[J]. PharmRes,1996;13(1):32-37.

[7] Aboubraker M,Puisieux F,Couvreur,et al.Physicochemical characterization of insulin loaded poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization[J]. Int J Pharm,1999;183(1): 63.

[8] Davis SS.Biomedical application of nanotechnology-implications for drug targeting and gene therapy[J]. Trends of Biotechnol,1997;15 (6):217-224.

(责任编辑:冉明会)