

外源性硫化氢对异丙肾上腺素诱导的大鼠急性心肌缺血的保护作用

郭一尘 程东升 刘颖璐 周 荣 鲁 彦

摘 要 **目的** 观察静脉注射外源性硫化氢(H_2S)对异丙肾上腺素(ISO)诱导的大鼠急性心肌缺血的保护作用。**方法** SD 雄性大鼠 18 只,体重 200~250g,随机分为 3 组($n=6$):正常对照组,模型组和 NaHS 治疗组。模型组和 NaHS 治疗组采用皮下多点注射 ISO 方法制作大鼠急性心肌缺血模型。对照组大鼠皮下注射等剂量生理盐水(0.1ml/100g)。NaHS 组静脉注射 NaHS (50mmol/L,0.1ml/100g),模型组静脉注射等容积生理盐水(0.1ml/100g)。给药后,记录 3 组大鼠 70min 内心电图。实验结束后,各组大鼠取血测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、磷酸肌酸激酶(CK)、磷酸肌酸激酶同工酶(CK-MB)。**结果** 模型组大鼠记录 10min 后,大鼠心电图 ST 段明显下降(模型组: $-0.21 \pm 0.20mV$ 比对照组: $0.04 \pm 0.04mV$, $P < 0.05$)。静脉注射 NaHS 能明显改善 ISO 诱导的大鼠心肌缺血,大鼠心电图 ST 段在给药后 30min 开始恢复(模型组: $-0.18 \pm 0.16mV$ 比 NaHS 治疗组: $-0.09 \pm 0.06mV$, $P > 0.05$),50min 内基本恢复正常(NaHS 治疗组: $-0.01 \pm 0.06mV$ 比对照组: $0.01 \pm 0.05mV$, $P > 0.05$),和模型组比较有显著性差异(模型组: $-0.19 \pm 0.17mV$ 比 NaHS 治疗组: $-0.01 \pm 0.06mV$, $P < 0.05$)。NaHS 治疗组血清 ALT、AST、CK、CK-MB 与模型组比较显著降低。**结论** 外源性硫化氢对异丙肾上腺素诱导的大鼠急性心肌缺血有显著的保护作用。

关键词 硫化氢 急性心肌缺血 大鼠 异丙肾上腺素 血清

The Protective Effects of Hydrogen Sulfide on Rats of Acute Myocardial Ischemia Induced by Isoprenaline. Guo Yichen, Cheng Dongsheng, Liu Yinglu, Zhou Rong, Lu Yan. Department of Emergency Medicine, The First Hospital of Lanzhou University, Gansu 730000, China

Abstract **Objective** To observe the protective effect of hydrogen sulfide on the acute myocardial ischemia induced by isoprenaline (ISO) in rats. **Methods** Eighteen male SD rats, weighing 200–250g, were randomized into 3 groups ($n=6$): control group, model group and NaHS treatment group. Acute myocardial ischemia was induced by multi-point subcutaneously injection of ISO in rats of model and NaHS group. Saline (0.1ml/100g) or NaHS (50mmol/L, 0.1ml/100g) was administrated comparatively in control group or NaHS group. Electrocardiogram (ECG) was recorded in 70min. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB) were determined. **Results** After injection of ISO 10mins, ST segment of rats decreased obviously in model group than that in control group ($P < 0.05$). ST segment began to rise after 30min and recovered in 50min ($P < 0.05$, compared with model group). The serum levels ALT, AST, CK and CK-MB were lower in NaHS treatment group than those in model group. **Conclusion** Hydrogen sulfide effectively ameliorates acute myocardial ischemia induced by ISO of rats.

Key words Hydrogen sulfide; Acute myocardial ischemia; Rats; Isoprenaline; Serum

心血管疾病是全世界危害人类生命健康最严重、最普遍的疾病,其患病率占各类疾病之首,病死率仅居于恶性肿瘤之后,成为影响人类健康和制约社会和

经济发展的重要因素之一。内源性硫化氢(H_2S)是新近发现的继一氧化氮和一氧化碳的第三类气体信号分子,具有舒张血管、降低血压、抑制血管平滑肌细胞增殖、心肌负性肌力等多种心血管效应,并在动脉粥样硬化、高血压、心肌缺血等多种心血管疾病的发生发展中具有重要的病理生理意义^[1-5]。Geng 等^[6-8]研究者已通过体在体和离体实验,通过结扎大鼠冠状动脉左前降支,证实硫化氢对局部缺血再灌注损伤大鼠心脏有明确的保护作用,而硫化氢对异丙肾上腺素(ISO)诱导的大鼠急性全心缺血损伤是否也具有同样显著的保护作用,目前国内外相关研究文献报

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700266);陕西省卫生厅资助项目(06E05)

作者单位:730000 兰州大学第一医院急诊科(郭一尘、周荣); 730030 兰州,中国人民解放军第一医院检验科(程东升、鲁彦); 250100 济南,山东大学医学院(刘颖璐)

通讯作者:周荣,主任医师,硕士生导师,电子信箱:sherilang@163.com;鲁彦,副主任医师,电子信箱:lu73free@yahoo.com.cn.

道很少,故笔者采用 ISO 制备大鼠急性心肌缺血模型,观察外源性硫化氢对急性心肌缺血大鼠心电图和心脏血清酶学的影响,为进一步探讨硫化氢在心肌缺血疾病中的作用机制提供理论和实验依据。

材料与方法

1. 实验药品:NaHS(外源性 H₂S 供体,购自 Sigma 公司),实验时用生理盐水制成 50mmol/L 浓度^[9]。ISO 由上海禾丰制药有限公司生产,批号:100501,规格:2ml:1mg。乌拉坦购自 BIO BASIC INC 公司。

2. 实验动物与分组:清洁级雄性 SD 大鼠 18 只,体质量 200~250g,购自兰州大学医学实验动物中心(动物合格证 SCXR(甘)(2005-0007))。

3. 实验方法:(1)造模:参考文献[10]方法,采用皮下多点注 ISO(10mg/kg)方法制备大鼠急性心肌缺血模型。皮下注射 ISO 40min 后,将实验大鼠用质量分数为 20% 的乌拉坦(50mg/kg)腹腔麻醉后,仰卧固定于手术台,分离大鼠任意一侧股静脉,置入股静脉导管。四肢安插针状电极,标定增益 1000、滤波 100Hz、电压 50V,描记 II 导联心电图。(2)实验方法:将大鼠随机分为 3 组:正常对照组,模型组,NaHS 组,每组 6 只大鼠。皮下注射 ISO 后 1h,正常对照组与模型组均通过股静脉导管注射生理盐水(0.1ml/100g),NaHS 组注射 NaHS 50mmol/L(0.1ml/100g)^[9]。各组大鼠在实验结束后经颈总

动脉取血,离心后测血清中 ALT、AST、CK 及 CK-MB。(3)检测方法:实验中大鼠 II 导联心电图由 RM6240BD 型多道生理信号采集处理系统记录(成都仪器厂)。各组大鼠在实验结束后经颈总动脉取血,3000r/min 离心 20min 后分离血清。(4)观察指标及统计分析:连续记录并观察给药后 70min 大鼠心电图变化。同时,检测各组血清中 ALT、AST、CK 及 CK-MB。所有数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 16.0 版统计软件进行统计,多组间两两比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著的统计学意义。

结 果

1. 静脉注射 NaHS 对急性心肌缺血大鼠心电图的影响:皮下注射 ISO 10min 后,大鼠心电图 ST 段开始明显下降,和对照组大鼠比较有显著性差异($P < 0.05$),提示造模成功。皮下注射 ISO 后对大鼠心电图 P、QRS 波和 T 波无明显影响。股静脉注射 NaHS 溶液(50mmol/L)能明显改善大鼠心肌缺血。静脉注射 NaHS 10min 后大鼠心电图开始抬高,70min 基本恢复正常,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$)。皮下注射生理盐水不影响大鼠心电图。静脉注射等容积生理盐水也不影响模型组大鼠心电图(表 1)。

表 1 静脉注射 NaHS(50 mmol/L)对 ISO 诱导的急性缺血大鼠心电图 ST 段的影响 ($\bar{x} \pm s$, mV)

组别	n	大鼠心电图 ST 段			
		10min	30min	50min	70min
正常对照组	6	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.04	0.01 ± 0.05	0.01 ± 0.05
模型组	6	-0.21 ± 0.20 *	-0.18 ± 0.16 *	-0.19 ± 0.17 *	-0.20 ± 0.18 *
NaHS 组	6	-0.19 ± 0.11 *	-0.09 ± 0.06	-0.01 ± 0.06 [#]	-0.04 ± 0.08 [#]

与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

2. NaHS 对急性心肌缺血大鼠血清酶的影响:模型组大鼠血清中 ALT、AST、CK 及 CK-MB 显著高于正常对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

NaHS 组大鼠血清中 ALT、AST、CK 及 CK-MB 与模型组比较显著降低($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 各组大鼠血清酶测定结果(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT	AST	CK	CK-MB
正常对照组	6	54.3 ± 7.6	164.2 ± 22.5	5044.4 ± 758.3	1516.3 ± 214.8
模型组	6	120.1 ± 11.0 *	306.4 ± 57.7 *	10076.2 ± 2672.6 *	2688.4 ± 477.5 *
NaHS 组	6	61.9 ± 10.7 [#]	172.3 ± 37.4 [#]	6872.7 ± 1517.8 [#]	1773.3 ± 397.2 [#]

与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

讨 论

冠心病的病理发展过程早期,致冠心病危险因素造成血管内皮功能损害,不仅 NO 产生减少,内源性 H₂S 的产生也明显减少;在冠心病病理发展的晚期,

不稳定型心绞痛和急性心肌梗死患者中,一方面冠状动脉粥样硬化程度更加严重,内皮分泌功能进一步紊乱,另外冠状动脉严重痉挛、血栓形成,使心肌细胞处于缺氧状况,两者均可能导致血浆 H₂S 的浓度进一

步降低^[11]。H₂S 作为气体信号分子在生理或病理状态下调节血管平滑肌的张力和心脏的收缩功能,当内源性 H₂S 不足时则出现血管平滑肌舒张功能下降,平滑肌细胞增殖凋亡,心脏肌力升高,从而导致冠心病的发生^[5]。

最近有研究发现,在 ISO 诱发的大鼠心肌缺血模型中,血浆 H₂S 水平明显下降,心肌胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)活性下调,CSE 基因表达显著增多。而外源性给予 H₂S 供体 NaHS 后,不仅可降低心肌缺血大鼠的病死率,改善左室功能,而且可减少白细胞的黏附、心肌纤维原细胞的增生和肥大以及脂质过氧化作用,这些均表明 H₂S 在冠心病的发病过程中可能起重要保护作用^[11-13]。

大剂量 ISO 可诱导大鼠发生急性心肌缺血,其致心肌缺血性损伤的渐进性,心电图和酶学变化均类似于人类心肌急性缺血或心肌梗死^[12,13]。本实验模型组大鼠经皮下多点注射 ISO 1h 后,心电图 II 导联 ST 段较正常对照组明显降低,说明急性心肌缺血模型成功。大鼠在给予外源性硫化氢供体 NaHS 后,明显减轻 ISO 诱发的大鼠心肌缺血程度,大鼠心电图 ST 段逐渐抬高,给药 30min 后 ST 段基本恢复至正常水平,并一直持续到实验结束。经外源性硫化氢(NaHS)治疗的大鼠血清中 ALT、AST、CK 和 CK-MB 水平明显低于未经治疗的模型组大鼠。心电图 ST 段的恢复和血清中 ALT、AST、CK 和 CK-MB 含量的显著降低,均提示外源性硫化氢对急性心肌缺血大鼠心脏有较好的保护作用。

目前研究认为内源性硫化氢参与心肌缺血的保护机制可能主要与抑制炎症反应,减轻心肌细胞损伤;调节血管张力,舒张血管,改善心肌供血;减慢机体代谢,减少氧耗,降低心肌做功^[14];促进血管生成和内皮再生以及抑制血小板聚集等机制有关^[15,16]。Cai 等^[17]研究表明,内源性 H₂S 是血液系统稳态的调节因子。同 NO 相似,外源性 NaHS(H₂S 供体)能抑制胶原、二磷酸腺苷(ADP)、肾上腺素、花生四烯酸、凝血酶诱导的人类血小板聚集,降低血液黏度。

近年的研究已表明,内源性 H₂S 能够通过抑制炎症反应、减轻钙超载、减少细胞凋亡、保护线粒体等多种途径减少心肌缺血梗死面积,挽救存活心肌,恢复心肌功能,且能抑制血管平滑肌细胞增生,逆转血管重构,促进受损内皮细胞修复。本实验给予外源性硫化氢(NaHS)治疗 ISO 诱发的大鼠急性心肌缺血,所得到的显著心肌保护作用与其在局部缺血再灌注

损伤中的保护作用一致,这说明外源性硫化氢不仅对大鼠局部心肌缺血有明确的保护作用,而且对由 ISO 诱导的大鼠急性全心缺血同样具有明显的保护作用。

参考文献

- Wang R. Two's company, three's a crowd; can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB*, 2002, 16(13): 1792-1798
- Xiao L, Wu YM, Zhang H, *et al.* Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus bar reflex in anesthetized rats. *Acts Pharmacia Sin*, 2006, 27(3): 294-298
- Xiao L, Wu YM, Wang R, *et al.* Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus bar receptor activity in anesthetized male rats. *Chimed J*, 2007, 120(15): 1343-1347
- Du J, Hui Y, Cheng Y, *et al.* The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibition in rat cultured cells. *Heart Vessels*, 2004, 19(2): 75-80
- 耿彬, 杜军保, 唐朝枢. 内源性 H₂S 一种新的气体信号. *分子生理科学进展*, 2002, 33: 255
- Geng B, Chang I, Pan C, *et al.* Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(3): 756-763
- 徐刚, 季永, 汪莉. 内源性硫化氢参与缺血后处理减轻离体大鼠心脏缺血/再灌注损伤. *中国药理学通报*, 2008, 24(7): 910-914
- Wang X, Zeng XJ, Zheng SP, *et al.* Effect of hydrogen sulfide on myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of rats. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, 22(12): 1447-1451
- 黄晓伟. 外源性 H₂S 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究. 复旦大学; 2007
- 高海成, 孙波, 苗春生, 等. 大剂量盐酸 ISO 诱发大鼠心肌缺血性坏死模型的建立. *中国生物制品学杂志*, 2009, (3): 33-35
- Geng B, Yang J, Qi Y, *et al.* H₂S generated by heart in rat and effects on cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 362-368
- Geng B, Chang L, Pan CS, *et al.* Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(3): 756-763
- Heather LC, Catchpole AF, Stuckey DJ, *et al.* Isoproterenol induces in vivo functional and metabolic abnormalities; similar to those found in the infarcted rat heart. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(3): 31-39
- Volpato GP, Searles R, Yu B, *et al.* Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic functions in the mouse. *Anesthesiology*, 2008, 108(4): 659-668
- Cai WJ, Wang MJ, Moore PK, *et al.* The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt phosphorylation. *Cardiovasc Res*, 2007, 76(1): 29-40
- Meng QH, Yang G, Yang W, *et al.* Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury-induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries. *Am J Pathol*, 2007, 170(4): 1406-1414
- Zagli G, Patacchini R, Trevisani M, *et al.* Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation. *Err J Pharmacol*, 2007, 559(1): 65-68

(收稿: 2010-12-08)