

## 替格瑞洛对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

李康博 刘晓坤 张琦 韩全乐

**摘要 目的** 观察替格瑞洛对大鼠心肌缺血再灌注的影响,探讨其可能的作用机制。**方法** 成年健康雄性SD大鼠32只,采用随机区组法将其分为假手术组(SO组)、心肌缺血再灌注组(I/R组)、替格瑞洛组、替格瑞洛合并腺苷拮抗剂(CGS15943)组(替格瑞洛+CGS15943组)。制作大鼠缺血/再灌注损伤模型,SO组只穿线不结扎,替格瑞洛组术前连续强饲替格瑞洛,替格瑞洛+CGS15943组术前连续强饲替格瑞洛,术前腹腔内注射CGS15943。计算心肌梗死面积百分比,观察再灌注心律失常发生情况,检测血清中磷酸肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)水平及心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)含量。**结果** 替格瑞洛组大鼠心肌梗死面积小于I/R组( $P < 0.01$ );而替格瑞洛+CGS15943组则大于替格瑞洛( $P < 0.01$ );替格瑞洛组大鼠心律失常发生率、心律失常评分均低于I/R组( $P$ 均 $< 0.05$ );而替格瑞洛+CGS15943组大鼠心律失常发生率、心律失常评分均高于替格瑞洛组( $P$ 均 $< 0.05$ )。替格瑞洛组CK、LDH水平低于I/R组( $P < 0.05$ );而替格瑞洛+CGS15943组CK、LDH水平高于替格瑞洛组( $P < 0.05$ )。替格瑞洛组SOD活力高于I/R组( $P < 0.05$ ),MDA含量低于I/R组( $P < 0.05$ );而替格瑞洛+CGS15943组SOD活力低于替格瑞洛组( $P < 0.05$ ),MDA含量高于替格瑞洛组( $P < 0.05$ )。**结论** 替格瑞洛具有抗大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用,可能与其抑制腺苷代谢,从而减少氧自由基的产生有关。

**关键词** 替格瑞洛 腺苷 再灌注损伤

**中图分类号** R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.021

**Protective Effects of Ticagrelor on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats.** Li Kangbo, Liu Xiaokun, Zhang Qi, et al. Department of Cardiology, Tangshan Worker's Hospital, North China University of Science and Technology, Hebei 063000, China

**Abstract Objective** To observe the protective effects of pretreatment with ticagrelor on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury and related mechanism in rats. **Methods** Thirty-two healthy SD rats were randomly divided into sham operation (SO), myocardial ischemia and reperfusion (I/R), and ticagrelor, ticagrelor + an adenosine antagonist CGS15943. The infarction size and the incidence of ventricular arrhythmias were observed. The creatine phosphokinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) of serum was detected at the end of the perfusion. The concentration of superoxide dismutase (SOD) and malonaldehyde (MDA) in the left ventricle was determined. **Results** Compared with I/R, ticagrelor significantly attenuated the myocardial infarct sizes and incidence of ventricular arrhythmias and arrhythmia score ( $P < 0.05$ ), and decreased the CK and LDH. The vitality of SOD in ticagrelor group was boosted ( $P < 0.05$ ), and the concentration of MDA in ticagrelor group was lower than that in I/R group ( $P < 0.05$ ), above effects of ticagrelor were partly abolished by co-treatment with CGS15943. **Conclusion** These data provide evidence for the first time that ticagrelor can provide remarkable protection against I/R injury in rat hearts via augmenting adenosine, which related to the anti-oxygen free radicals.

**Key words** Ticagrelor; Adenosine; Ischemia/reperfusion injury

替格瑞洛属于新型P2Y<sub>12</sub>受体拮抗剂,其独特的药理学和药效学特征使更多ACS患者获益。而且其通过抑制非血小板细胞表面的P2Y<sub>12</sub>受体从而产生其他药理学作用:作为ADP受体抑制剂它可以抑制红细胞腺苷转运载体,红细胞通过该转运体从血液中摄取腺苷作为其能量,抑制该转运体即抑制了红细胞对腺苷的摄取,会造成血液中腺苷的浓度在一定时间

内增加<sup>[1,2]</sup>。替格瑞洛促进红细胞释放腺苷、抑制红细胞摄取腺苷的作用可能对内源性腺苷生理反应起放大作用。本实验欲通过大鼠的心肌缺血/再灌注损伤模型,观察替格瑞洛抑制腺苷代谢效应对再灌注损伤的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

### 材料与方 法

1. 实验动物:成年健康雄性SD大鼠,体质量250~300g,由华北理工大学动物试验中心提供。

2. 药品和试剂:替格瑞洛片:阿斯利康制药有限公司。腺苷抑制剂(CGS15943)购自上海嵘崑达实业有限公司。磷酸肌酸激酶(creatine phosphokinase,

基金项目:唐山市科技计划项目(13130258a)

作者单位:063000 华北理工大学附属唐山工人医院心血管科

通讯作者:刘晓坤,主任医师,电子信箱:lxiaokun@sohu.com

CK)测定试剂盒,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒购自北京长征公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

3. 心肌缺血再灌注(ischemia /reperfusion, I/R)模型的建立:30g/L戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(1.5ml/kg),气管插管,微型动物呼吸机辅助呼吸,将电极贴于四肢,记录心电图。在胸骨左缘3、4肋间开胸暴露心脏。5/0缝线的3/8弯针于左冠状动脉前降支(left anterior descending coronary artery, LAD)起始2mm处穿线,在肺动脉圆锥旁出针,将细小乳胶管穿过结扎线,结扎前降支15min,剪断缝线,再灌注120min。结扎成功即心电图II导联ST段抬高,局部心肌明显变苍白。再灌注成功心肌恢复红润,出现再灌注心律失常。

4. 实验分组:采用随机区组法将大鼠分为4组,每组8只。①假手术组(sham operation, SO):只穿线不结扎;②I/R组:结扎LAD30min,再灌注120min;③替格瑞洛组:结扎术前7天连续强饲替格瑞洛120mg/(kg·d)(按AUC计算,相当于60kg最大推荐人用剂量90mg,每天2次时暴露量15倍);④替格瑞洛+CGS15943组:结扎术前7天连续强饲替格瑞洛120mg/(kg·d),术前1h腹腔内注射CGS15943 10mg/kg。

5. 心肌梗死面积检测:再灌注120min后结扎LAD,经颈动脉将1ml的20%伊文思蓝注入大鼠心脏,摘除心脏冷冻后切成2mm薄片,浸于1% TTC缓冲液15min。未发生缺血心肌部分被染红,被伊文思蓝掩盖呈蓝色;心肌缺血的部分被TTC染色呈红色;梗死心肌均不能被TTC和伊文思蓝染色呈苍白色。浸入甲醛溶液中,固定1~2h,拍照后用计算机分析图像。用刀片在显微镜下将大鼠左心室心肌各区分开,计算心肌梗死面积百分比,即心肌梗死区(INF)/心肌缺血区(AAR)×100%(INF/AAR%)。

6. 再灌注心律失常观察及评分:心律失常的判定按照Lambeth会议标准<sup>[2]</sup>。心律失常评分参考Curtis等<sup>[3]</sup>的评分规则。

7. CK、LDH及SOD、MDA测定:再灌注末经颈内动脉置管处采血5ml,加入促凝管4℃下3000r/min离心10min,取血清置于-8℃低温保存,根据试剂盒分别测定CK、LDH水平;再灌注120min后,剪取心脏缺血区组织0.1g漂洗、吸干后放入1.5ml离心管中,置于-70℃低温保存,根据试剂盒分别测定SOD活力及MDA含量。

8. 统计学方法:采用SPSS 17.0软件进行统计学分析处理。数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示采用单因素方差分析进行组间差异的比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 各组大鼠心肌梗死面积检测结果:替格瑞洛组缺血再灌注后心肌梗死的面积显著减少。替格瑞洛组(38.0±1.9)与I/R组(45.0±1.4)比较,心肌梗死面积差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。合并腺苷抑制CGS15943后这种腺苷保护作用被屏蔽。替格瑞洛组(38.0±1.9)与替格瑞洛+CGS15943组(39.0±1.3)比较,心肌梗死面积( $P < 0.01$ ,图1)。

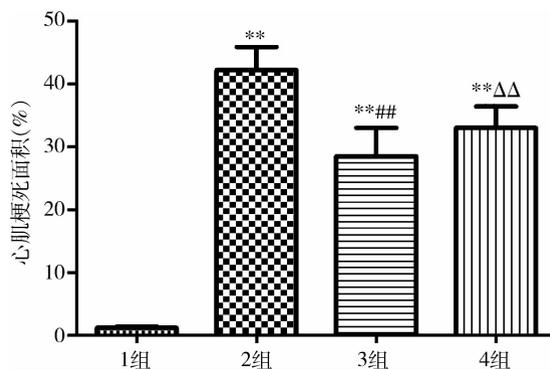


图1 各组大鼠心肌梗死面积的检测结果

1组.SO组;2组.I/R组;3组.替格瑞洛组;4组.替格瑞洛+CGS15943组。与SO组相比,\*\* $P < 0.01$ ;与I/R组相比,### $P < 0.01$ ;与替格瑞洛组相比,ΔΔ $P < 0.01$

2. 各组大鼠心律失常发生情况的检测结果:SO组大鼠偶见室性期前收缩,未发生室性心动过速和心室颤动。I/R组大鼠心肌缺血时心电图ST段抬高,可见室性期前收缩、室性心动过速和心室颤动。替格瑞洛组大鼠再灌注,出现室性期前收缩、室性心动过速和心室颤动,但持续时间短于I/R组( $P$ 均 $< 0.05$ ),发生率均低于I/R组( $P$ 均 $< 0.05$ ),心律失常评分低于I/R组( $P < 0.01$ )。而替格瑞洛+CGS15943组大鼠室性心动过速和心室颤动持续时间均长于替格瑞洛组( $P$ 均 $< 0.05$ ),发生率高于替格瑞洛组( $P$ 均 $< 0.05$ ),心律失常评分高于替格瑞洛组( $P < 0.05$ ,表1)。

3. 血清CK、LDH检测结果:与SO组相比,I/R组、替格瑞洛+CGS15943组CK、LDH均升高( $P < 0.01$ ),替格瑞洛组CK、LDH也升高( $P < 0.05$ );与I/R组相比,替格瑞洛组CK、LDH降低( $P < 0.05$ ),替格瑞洛+CGS15943组差异无统计学意义( $P >$

表 1 各组大鼠心律失常发生情况的检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	室性期前收缩(次)	VT持续时间(s)	VF持续时间(s)	VT发生率(%)	VF发生率(%)	病死率(%)	心律失常评分
SO组	19 ± 6	0	0	0	0	0	0.9 ± 0.4
L/R组	771 ± 162 <sup>*</sup>	61.2 ± 17.4	17.1 ± 6.8	89	67	25	4.5 ± 1.0 <sup>*</sup>
替格瑞洛组	487 ± 131 <sup>*#</sup>	35.2 ± 12.3 <sup>#</sup>	7.4 ± 3.6 <sup>#</sup>	50 <sup>#</sup>	36 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	3.0 ± 0.5 <sup>*##</sup>
替格瑞洛 + CGS15943组	734 ± 155 <sup>*Δ</sup>	57.4 ± 14.1 <sup>Δ</sup>	17.5 ± 5.3 <sup>Δ</sup>	81 <sup>Δ</sup>	63 <sup>Δ</sup>	25 <sup>Δ</sup>	4.7 ± 0.8 <sup>*Δ</sup>

VT. 室性心动过速;VF. 心室颤动;1组. SO组;2组. L/R组;3组. 替格瑞洛组;4组. 替格瑞洛 + CGS15943组。与SO组相比, \* $P < 0.01$ ;与L/R组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与替格瑞洛组相比, Δ $P < 0.05$

0.05);与替格瑞洛组相比,替格瑞洛 + CGS15943组CK、LDH均升高( $P < 0.05$ ,图2)。

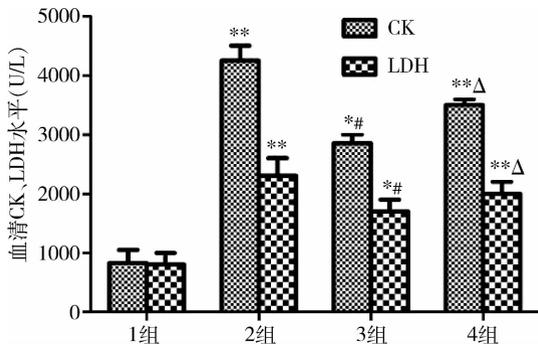


图 2 各组血清 CK、LDH 水平检测结果

1组. SO组;2组. L/R组;3组. 替格瑞洛组;4组. 替格瑞洛 + CGS15943组。与SO组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与L/R组相比, # $P < 0.05$ ;与替格瑞洛组相比, Δ $P < 0.05$

4. 心肌组织 SOD、MDA 测定结果: L/R 组大鼠心肌组织中 SOD 活力明显下降, 而替格瑞洛组 SOD 活力较 L/R 组得到提高 ( $P < 0.05$ ), L/R 组大鼠心肌组织中心肌组织 MDA 生成量明显增加, 而替格瑞洛组心肌组织 MDA 生成量较 L/R 组得到减少 ( $P < 0.05$ ); 替格瑞洛 + CGS15943 组大鼠心肌组织中 SOD 活力明显下降, 而替格瑞洛组 SOD 活力较替格瑞洛 + CGS15943 组得到提高 ( $P < 0.05$ ), 替格瑞洛 + CGS15943 大鼠心肌组织中心肌组织 MDA 生成量明显增加, 而替格瑞洛组心肌组织 MDA 生成量较替格瑞洛 + CGS15943 得到减少 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 各组心肌组织 SOD、MDA 测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	SOD(U/mg · Prot)	MDA(U/mg · Prot)
SO组	18.43 ± 3.41	5.03 ± 0.73
L/R组	16.11 ± 2.34 <sup>*</sup>	6.91 ± 1.21 <sup>*</sup>
替格瑞洛组	17.91 ± 2.61 <sup>#</sup>	5.14 ± 0.81 <sup>#</sup>
替格瑞洛 + CGS15943组	16.59 ± 2.44 <sup>*Δ</sup>	5.93 ± 0.84 <sup>*Δ</sup>

1组. SO组;2组. L/R组;3组. 替格瑞洛组;4组. 替格瑞洛 + CGS15943组。与SO组相比, \* $P < 0.05$ ;与L/R组相比, # $P < 0.05$ ;与替格瑞洛组相比, Δ $P < 0.05$

讨 论

替格瑞洛抑制 P2Y<sub>12</sub>受体和腺苷摄取双重机制

体现在扩张血管、降低梗死面积等效应上<sup>[4]</sup>。Witfeldt 等<sup>[5]</sup>报道入选 40 名成年健康男性随机分为替格瑞洛组及安慰剂组, 结果发现替格瑞洛组使得腺苷加快冠状动脉流速的作用明显加强 ( $P = 0.000$ )。Bonello 等<sup>[6]</sup>报道入选 60 例中高危非 ST 段抬高型心肌梗死(NSTE)患者, 随机给予替格瑞洛或氯吡格雷治疗。结果证实替格瑞洛组较氯吡格雷组增加中高危患者血浆腺苷浓度。Alexopoulos 等<sup>[7]</sup>报道入选 56 例 NSTE 患者, 随机给予替格瑞洛或普拉格雷治疗 15 天; 使用经胸多普勒超声测定输注不同浓度腺苷后的冠脉血流速度(CBFV), 结果证实替格瑞洛组较普拉格雷组增加腺苷诱导的冠脉血流速度。Park 等<sup>[8]</sup>正在进行一项临床试验, 旨在通过检测微循环阻力指数(IMR)及冠脉血流储备分数(FFR), 进而评价替格瑞洛抑制腺苷代谢的效应对急性心梗患者的微循环保护作用。

相关的动物实验同样证实替格瑞洛腺苷抑制作用效应。Giezen 等<sup>[9]</sup>报道替格瑞洛使得腺苷扩张冠状动脉的作用增强。Wang 等<sup>[10]</sup>报道在犬的冠脉血栓模型上, 使用组织型纤溶酶原激活剂(tPA)的基础上联合使用替格瑞洛或氯吡格雷, 结果表明替格瑞洛组较氯吡格雷减少心肌梗死再灌注后坏死面积, 延长再灌注时间。Nanhwan 等<sup>[11]</sup>报道入组 49 例大鼠, 随机接受替格瑞洛[0、75、150、300mg/(kg · d)]或氯吡格雷[30 或 90mg/(kg · d)]治疗 7 天, 并且行 30min 冠脉结扎和 24h 再灌注, 结果表明替格瑞洛组较氯吡格雷组减小心肌坏死的面积更强。

Nylander 等<sup>[1]</sup>报道替格瑞洛通过抑制红细胞上平衡型核苷转运载体(ENT-1)对腺苷再摄取, 加强局部腺苷反应, 达到额外的小血小板聚集/活化抑制作用, 以及血管舒张、心肌保护等作用。Hogber 等<sup>[12]</sup>和 Wihlborg 等<sup>[13]</sup>报道大鼠血管平滑肌细胞上存在 P2Y<sub>12</sub>受体, ADP 激活该受体可导致血管收缩, 从而降低栓塞性血管痉挛, 促进栓塞后心肌的再灌注。本试验结果同样表明替格瑞洛对大鼠心肌缺血再灌注损

伤具有保护作用。其机制可能为替格瑞洛作为 ADP 受体抑制剂,由于 ENT-1 对腺苷再摄取,造成血液中腺苷的浓度增加。腺苷通过抑制再灌注引起的  $Ca^{2+}$  超载,限制动作电位时程,减少动作电位平台期  $Ca^{2+}$  内流,延长  $Na^+ - Ca^{2+}$  交换时间,从而抑制再灌注时心律失常的触发活动<sup>[14]</sup>。同时腺苷可以兴奋  $A_1$  受体拮抗儿茶酚胺,抑制神经末梢释放去甲肾上腺素,降低心肌细胞氧需求量,增强心肌细胞对缺血、缺氧耐受力,提高心肌组织中 SOD 活性,抑制中性粒细胞黏附,减少自由基产物生成、减少氧自由基引起的损伤<sup>[15]</sup>。SOD 是重要的抗氧化酶,机体内氧自由基生成增加可导致 SOD 消耗增加。MDA 是氧自由基作用于不饱和脂肪酸所产生的脂质过氧化产物。SOD 活性的降低和 MDA 的增加,可以表明氧自由基增加,从而反映了细胞损伤的程度。腺苷亦可增加糖原和葡萄糖摄取的量,保存细胞内 ATP,从而减少缺血时的心肌坏死面积。而大鼠心肌再灌注模型术前注射腺苷拮抗剂 CGS15943 后保护作用被屏蔽,进一步印证了大鼠的心肌缺血再灌注保护作用是由于替格瑞洛抑制腺苷代谢效应引起的。

综上所述,替格瑞洛具有保护心肌再灌注损伤的作用,可能与其抑制腺苷代谢,从而减少缺血再灌注氧自由基的产生有关。但关于其心肌保护效应的受体后机制及信号转导途径还需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Nylander S, Femia EA, Scavone M, *et al.* Ticagrelor inhibits human platelet aggregation via adenosine in addition to P2Y12 antagonism [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11 (10): 1867 - 1876
- 2 Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, *et al.* The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22: 447 - 455
- 3 Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22: 656 - 665
- 4 Armstrong D, Summers C, Ewart L, *et al.* Characterization of the adenosine pharmacology of ticagrelor reveals therapeutically relevant inhibition of equilibrative nucleoside transporter 1 [J]. *J Cardiovasc*

- 5 Wittfeldt A, Emanuelsson H, Brandrup - Wognsen G, *et al.* Ticagrelor enhances adenosine - induced coronary vasodilatory responses in humans [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2013, 61(7): 723 - 727
- 6 Bonello L, Laine M, Kipson N, *et al.* Ticagrelor increases adenosine plasma concentration in patients with an acute coronary syndrome [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2014, 63(9): 872 - 877
- 7 Alexopoulos D, Moulialis A, Koutsogiannis N, *et al.* Differential effect of ticagrelor versus prasugrel on coronary blood flow velocity in patients with non - ST - elevation acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention: an exploratory study [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2013, 6(3): 277 - 283
- 8 Park SD, Baek YS, Woo SI, *et al.* Comparing the effect of clopidogrel versus ticagrelor on coronary microvascular dysfunction in acute coronary syndrome patients (TIME trial): study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2014, 15(151): 1 - 7
- 9 Giezen JJJ, Sidaway J, Graves P, *et al.* Ticagrelor inhibits adenosine uptake in vitro and enhances adenosine - mediated hyperemia responses in a canine model [J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2012, 17(2): 164 - 172
- 10 Wang K, Zhou X, Huang Y, *et al.* Adjunctive treatment with ticagrelor, but not clopidogrel, added to tPA enables sustained coronary artery recanalisation with recovery of myocardium perfusion in a canine coronary thrombosis model [J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(3): 609 - 617
- 11 Nanhwan MK, Ling S, Kodakandla M, *et al.* Chronic treatment with ticagrelor limits myocardial infarct size [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(9): 2078 - 2085
- 12 Hogberg C, Svensson H, Gustafsson R, *et al.* The reversible oral P2Y12 antagonist AZD6140 inhibits ADP - induced contractions in murine and human vasculature [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 142(2): 187 - 192
- 13 Wihlborg AK, Wang L, Braun OO, Eyjolfsson A, *et al.* ADP receptor P2Y12 is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(10): 1810 - 1815
- 14 Finegan BA, Lopaschuk GD, *et al.* Adenosine alters glucose use during ischemia and reperfusion in isolated rat hearts [J]. *Circulation*, 1993, 87: 900 - 908
- 15 Vlokovova K, Chorvathova V, Jurcovicova M, *et al.* Antioxidative state of the myocardium and kidneys in acute diabetic rats [J]. *Physiol Res*, 1993, 42(2): 251 - 254

(收稿日期: 2015 - 05 - 12)

(修回日期: 2015 - 05 - 26)

## 《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统的启事

《医学研究杂志》已经启用远程稿件处理系统,请各位作者登录《医学研究杂志》网站: <http://www.yxyjzz.cn>,注册登陆投稿系统,填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话: 010 - 52328677(路编辑)。

《医学研究杂志》编辑部