

间硝苯啶与硝苯啶对豚鼠工作心脏缺血再灌注损伤的保护作用¹

陈念航、饶曼人 (南京医学院心血管药理研究室, 南京 210005)

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Mar; 10(2): 156-161

Protective effects of *m*-nifedipine and nifedipine on ischemic-reperfused injury in working guinea pig hearts¹

CHEN Nian-Hang, RAO Man-Ren

(Department of Cardiovascular Pharmacology, Nanjing Medical College, Nanjing 210005)

Abstract The effects of *m*-nifedipine (*m*-Nif) on global myocardial ischemia and reperfusion have been compared with those of nifedipine (Nif) in the isolated working guinea pig hearts. Stronger coronary vasodilatation and less prominent cardiac depression were observed in the nonischemic hearts treated with *m*-Nif (8 and 25 nmol/L) than in those treated with the same doses of Nif. Hearts treated with *m*-Nif or Nif before and during low-flow ischemia, which lasted 50 min followed by 35 min reperfusion, showed significant preservation of contractility and relaxation, especially relaxation. These treatments resulted in a greater recovery of coronary flow and cardiac output, improvement of left ventricular work and efficiency, a reduction in creatine kinase release, and attenuation of myocardial edema. The treatments (*m*-Nif 25 and Nif 8 nmol/L), which were equiactive in nonis-

chemic hearts, provided equivalent myocardial protection in reperfused ischemic hearts.

Key words *m*-nifedipine; nifedipine; isolated working heart; ischemia; reperfusion; hemodynamics; creatine kinase

¹Project supported by National Natural Science Foundation of China, No 395

提要 离体豚鼠工作心脏正常灌注时, 间硝苯啶(*m*-Nif)增加CF强于等量硝苯啶(Nif), 抑制心脏弱于等量Nif. 缺血前和缺血期给予*m*-Nif, 使缺血再灌注心脏的收缩舒张性能改善, 尤以舒张性能改善明显; 促进CF, CO和LVPW恢复; 改善心脏工作效率; 减轻心肌水肿; 减少CK释放. 其保护作用程度在等效量时与Nif相近.

关键词 间硝苯啶; 硝苯啶; 离体工作心脏; 缺血; 再灌注; 血液动力学; 肌酸激酶

间硝苯啶(*m*-nifedipine, *m*-Nif)系我国研制的二氢吡啶类钙拮抗剂. 其扩张血管与抑制心脏作用的比值较硝苯啶(nifedipine, Nif)

大⁽¹⁾，在麻醉犬，*m*-Nif 增加心脏泵血功能：降低心肌氧摄取率和外周阻力均比 Nif 强，用于心肌缺血，心力衰竭及高血压的治疗有望取代 Nif⁽²⁾。但该药对心脏直接作用的分析研究尚未见报道。本文拟在离体豚鼠工作心脏上观察 *m*-Nif 对正常灌注及缺血再灌注心脏的血液动力学影响及保护作用，并与等量或等效量的 Nif 进行比较。

Materials and methods

m-Nif 和 Nif 系天津医药工业研究所提供，用含 30% 无水乙醇和 70% 丙二醇的溶剂配成 1 mmol/L 的母液，于 4℃ 避光保存，使用期限不超过 1 wk。实验时取适量母液于缺血前 10 min 加入灌注液，溶剂对照组则加入相当于最大剂量组容量的溶剂 (2.5 μl/L)。Nif 的灌注在避光条件下进行。

豚鼠 48 只，体重 344 ± SD 43 g，♀♂ 兼用。击头处死，制备离体工作心脏⁽³⁾。左房充盈压 2.0 kPa，主动脉静水压 9.3 kPa。灌注液为改良的 Krebs-Henseleit (KH) 液⁽⁴⁾，持续通入 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体，pH 7.45 ± 0.05，温度 36 ± 0.5℃。将聚乙烯管分别由主动脉插管侧管和心尖部插入主动脉和左心室，于左房和右室安放心电图电极。在 SJ-42 型四道生理记录仪 (上海医用电子仪器厂) 上同步记录左室收缩压 (LVSP)，左室内压最大变化速率 (± dP/dt_{max})，心电图 II 导联和左室舒张末期压 (LVEDP)。随后，转换压力换能器上三通开关，记录主动脉压 (AP)。定时收集 1 min 冠脉流出液 (CF) 和主动脉流出液 (AF)，将两者相加得到心输出量 (CO)。同时，用 DH-100 型血气酸碱分析仪 (南京分析仪器厂) 监测灌注液和冠脉流出液中的 pH 和 Po₂。推算等容舒张期心室内压下降的时间常数 (*T* 值)，心肌耗氧量 (MVO₂)，左室压力容积功 (LVPW) 和效率^(5,6)。

实验分为 6 组：KH 液组，溶剂对照组，*m*-Nif 组和 Nif 组，用药组又各分为 8 和

25 nmol/L 两个剂量组。工作心脏灌注 15 min 后，记录各指标作为给药前和缺血前对照值。凡 LVEDP 大于 1 kPa 的心脏 (心功能欠佳) 弃之不用。接着，以含药或溶剂的灌注液灌注 10 min，记录各指标变化后，夹闭左房流入道和主动脉流出道，用 ROB-IV 型蠕动泵 (沙洲仪表仪器总厂) 控制冠脉流量，经主动脉对各组进行逆灌。以 KH 液组为非缺血对照组，即灌注程序对照组，以排除心脏自然衰竭对实验的影响，其 CF 为顺灌时的 61.1 ± 2.0% (该流量已能满足逆灌心脏需要，增高流量易加速心衰)，逆灌 50 min；其它 5 组均为缺血组，CF 为缺血前对照值的 4.2 ± 0.3%，持续 50 min，缺血期的前 30 min 内，灌注液中含有药或溶剂，后 20 min 换正常灌注液。此后，开始再灌注，关闭蠕动泵，先以 9.3 kPa 的灌注压对所有 6 组逆灌 15 min，再转工作心脏方式，顺灌 20 min。实验结束后，取心，剪去大血管，心房和结缔组织，吸干水分，称心脏湿重。置 60℃ 烘 24 h，称取心脏干重并计算心脏干重与湿重比值 (dry-wet wt ratio)。

肌酸激酶 (CK) 测定：分别留取给药前，给药后 10 min，再灌注 1, 3, 5, 10, 15, 25, 35 min 冠脉流出液标本及前 15 min 逆行再灌注的全部冠脉流出液，置冰浴中保存，于 6 h 内用肌酸显色法⁽⁷⁾测定 CK 含量。

除注明者外，缺血后心功能指标均为再灌注 35 min 后所测，并以缺血前对照值的 % 表示。结果用方差分析处理。

Results

对正常灌注心脏的影响 (Tab 1) 以 AP, LVSP 和 + dP/dt_{max} 作为反映心肌收缩性能的指标，以 - dP/dt_{max}, LVEDP 和 *T* 值作为反映心肌舒张性能的指标。*m*-Nif 和 Nif 抑制心肌的收缩舒张性能均依赖于剂量，但前者抑制作用弱。*m*-Nif 8 和 25 nmol/L 使 + dP/dt_{max} 分别减少 8 ± 6 和 16 ± 10%，使 - dP/dt_{max} 分别减少 8 ± 9 和 15 ± 7%；而同样两个剂量

Tab 1. Effects of *m*-nifedipine (*m*-Nif) and nifedipine (Nif) upon cardiac function in nonischemic isolated working guinea pig hearts. B=before medication, A=10 min after medication. n=8 hearts, $\bar{x}\pm SD$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs B.

		Control		<i>m</i> -Nif (nmol/L)		Nif (nmol/L)	
		KH-solution	Solvent	8	25	8	25
AP kPa	B	8.6±1.2	10.4±0.8	9.1±0.5	9.8±1.3	9.8±1.5	9.7±1.2
	A	8.8±1.2*	10.7±0.7*	9.2±0.6*	9.3±1.3*	9.4±1.2*	8.7±1.0***
LVSP kPa	B	9.2±1.2	11.2±0.6	9.6±0.8	10.7±1.4	10.1±1.4	10.1±0.9
	A	9.4±1.2*	11.5±0.7*	9.9±0.8*	10.2±1.4*	9.6±1.2*	9.0±1.3***
+dP/dt _{max} kPa/s	B	170±30	146±19	150±34	184±35	165±23	163±23
	A	172±30*	150±20*	139±40*	152±24***	122±19***	115±18***
-dP/dt _{max} kPa/s	B	193±27	159±24	179±45	183±33	173±13	179±42
	A	195±25*	173±29*	167±56*	156±32***	144±11***	131±22***
LVEDP kPa	B	0.0±0.3	0.23±0.22	0.3±0.3	-0.03±0.22	0.0±0.3	0.4±0.4
	A	0.01±0.29*	0.19±0.19*	0.4±0.3*	0.2±0.4**	0.3±0.4***	0.7±0.5***
T ms	B	9.4±2.0	17±4	14±6	12±5	14±4	15±5
	A	9.6±1.6*	16.0±1.3*	15±7*	14±4*	16±4***	22±6***
CF ml/min	B	10.4±2.2	13±3	12.2±2.8	10.2±1.2	10.5±1.6	9.2±1.2
	A	10.3±2.2*	13±3*	14±3***	14.2±1.5***	11.6±1.8**	10.8±1.4***
CO ml/min	B	50±7	57±8	54±8	51±5	51±5	46±5
	A	51±7*	59±9*	52±10*	42±5***	42±4***	32±6***
HR bpm	B	202±14	175±14	180±8	186±16	184±22	184±15
	A	197±12*	174±9*	174±10*	184±27*	173±22*	181±17*
MVO ₂ ml/ (min·g dry wt)	B	0.47±0.05	0.43±0.06	0.49±0.09	0.53±0.08	0.48±0.07	0.47±0.07
	A	0.46±0.06*	0.42±0.05*	0.54±0.09**	0.60±0.08**	0.48±0.07*	0.51±0.08*
LVPW kg·m/ (min·g dry wt)	B	0.27±0.05	0.26±0.03	0.28±0.05	0.33±0.06	0.31±0.05	0.30±0.03
	A	0.28±0.05*	0.28±0.03***	0.28±0.06*	0.26±0.06***	0.24±0.05***	0.19±0.04***
Efficiency %	B	28±5	30±4	29±5	30±5	32±6	32±4
	A	30±5*	33±4**	25±4*	21±4***	25±5**	18±4***

AP: Aortic pressure. LVSP: Left ventricular systolic pressure. +dP/dt_{max}: The maximum rate of rise of left ventricular pressure. -dP/dt_{max}: The maximum rate of fall of left ventricular pressure. LVEDP: Left ventricular end diastolic pressure. T: Time constant of isovolumic diastolic pressure decay. CF: Coronary flow. CO: Cardiac output. HR: Heart rate. MVO₂: Myocardial oxygen consumption. LVPW: Left ventricular pressure-volume work.

的 Nif 使 +dP/dt_{max} 分别减少 26±6 和 28±13%，使 -dP/dt_{max} 分别减少 17±3 和 26±10%。*m*-Nif 虽使 *T* 值增高但无显著差异，而 Nif 使 *T* 值显著增高。

m-Nif 增加 CF 的作用大于其减少 CO 的作用，Nif 则反之。*m*-Nif 8 和 25 nmol/L 使 CF 分别增加 16±3 和 40±15%，使 CO 分别减少 5±8 和 18±6%；而等量 Nif 使 CF 分别

增加 10±4 和 18±6%，使 CO 分别减少 17±1 和 33±12%。

m-Nif 使 MVO₂ 增加，减少 LVPW 比等量 Nif 轻；Nif 不明显增加 MVO₂，但明显减少 LVPW。结果是两药均使心脏的工作效率降低。

两药对心率(HR)均无明显影响。溶剂本身对心功能无明显作用。

对缺血再灌注心脏的影响 考虑到两药在等量时对缺血前心脏的抑制强度不同,在观察它们对缺血再灌注心脏的作用时,不仅进行了等量的比较,也进行了等效量的比较。CO是判断离体工作心脏心功能的一个敏感指标,故在本实验中,以给药后药物对缺血前CO的抑制程度来衡量其对心脏的抑制作用。*m*-Nif 25和Nif 8 nmol/L对CO的减少程度相近(Tab 1)为等效剂量。

1 对心肌收缩舒张性能的影响(Fig 1) 正常流量灌注的心脏经过同样时程的灌注后,其 $\pm dP/dt_{max}$ 减少,*T*值增高。以 $-dP/dt_{max}$ 和*T*值改变明显,分别为15 min对照值的 82 ± 7 和 $126 \pm 27\%$ ($P < 0.05$),表明在心脏自然衰竭过程中,舒张性能最易受影响。低流缺血开始后,各缺血组的AP, LVSP和 $\pm dP/dt_{max}$ 均在5 min内降至接近零。再灌注后,溶剂对照组的AP和LVSP分别恢复 77 ± 7 和 $76 \pm 9\%$, $+dP/dt_{max}$ 恢复 $63 \pm 8\%$, $-dP/dt_{max}$ 仅恢复 $49 \pm 10\%$,*T*值为缺血前对照值的 $310 \pm 88\%$,LVEDP增加 1.23 ± 0.15 kPa。提示缺血对心肌舒张性能的损伤尤其严重。

等效量时,*m*-Nif和Nif使心肌的收缩舒张性能均得到良好恢复:分别使AP恢复到 105 ± 14 和 $97 \pm 13\%$ ($P < 0.01$),LVSP, $\pm dP/dt_{max}$ 和*T*值显著改善,LVEDP仅分别增加了 0.8 ± 0.5 和 0.4 ± 0.6 kPa($P < 0.01$)。其中, $-dP/dt_{max}$ 和*T*值接近非缺血组水平。而且,药物对 $-dP/dt_{max}$ 和*T*值的恢复幅度大于对 $+dP/dt_{max}$ 的恢复幅度。

m-Nif 8和Nif 25 nmol/L对心肌收缩性能无明显改善,却明显恢复心肌舒张性能。前者使*T*值和 $-dP/dt_{max}$ 改善,后者部份防止*T*值升高。在左房充盈压和后负荷恒定情况下,由于药物作用或缺血,心肌收缩力减弱,将使左室容积和压力增大。LVEDP和 $-dP/dt_{max}$ 的变化受心室容积和压力的影响较大,而*T*值作为舒张早期舒张性能的指标,较为敏感,不受前、后负荷影响⁽⁵⁾。

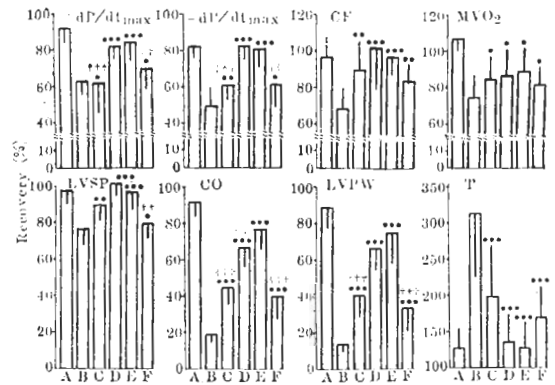


Fig 1. Effects of *m*-nifedipine (*m*-Nif) and nifedipine (Nif) upon the recovery of cardiac function in isolated working guinea pig hearts subjected to ischemia and reperfusion. A = nonischemia, B = solvent, C = *m*-Nif 8 nmol/L, D = *m*-Nif 25 nmol/L, E = Nif 8 nmol/L, F = Nif 25 nmol/L. $n = 8$ hearts, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs B. † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs E.

2 对心脏工作状况的影响(Fig 1) 等效量时,两药均明显促进CO恢复,Nif作用较强。MVO₁均较缺血前减少($P < 0.05$),但与溶剂对照组比较无显著差异。均非常显著地促进LVPW恢复,故而也大大改善了工作效率:*m*-Nif 25和Nif 8 nmol/L,效率分别为 24 ± 5 和 $26 \pm 6\%$ (溶剂对照组为 $6 \pm 1\%$, $P < 0.01$),甚至略超过非缺血组水平($23 \pm 4\%$)。*m*-Nif 8和Nif 25 nmol/L增加缺血再灌注心脏的CO和LVPW,效率也明显提高,分别为 13 ± 3 和 $13 \pm 5\%$ ($P < 0.01$),但上述作用均较Nif 8 nmol/L组弱。

3 对冠脉流量的影响 再灌注早期,溶剂对照组的CF迅速减少,于5 min达最低点,为缺血前的 $52 \pm 11\%$ 。随后逐渐增加,再灌注期末仅恢复了 $69 \pm 11\%$ 。等效量的*m*-Nif和Nif均防止了CF的急剧减少。再灌注5 min,CF分别为缺血前的 90 ± 26 和 $82 \pm 12\%$ ($P < 0.01$)。再灌注期末,各用药组的CF均恢复或接近正常水平(Fig 1)。

4 对心率的影响 缺血再灌注后,两药对HR的影响似有区别。溶剂对照,*m*-Nif 8和

25 nmol/L, Nif 8 和 25 nmol/L, HR 分别为缺血前的 96 ± 4 , 93 ± 5 , 92 ± 4 , 99 ± 9 和 $100 \pm 9\%$, 但组间比较未见显著差异, 与例数略有关系。若与缺血前比较, 则用 *m*-Nif 的两组显示 HR 减慢 ($P < 0.01$)。

5 对心脏干重与湿重比值的影响 非缺血对照, 溶剂对照, *m*-Nif 8 和 25 nmol/L, Nif 8 和 25 nmol/L, 该比值分别为 15.8 ± 0.4 , 12.6 ± 0.4 , 14.1 ± 0.7 , 15.1 ± 0.8 , 14.4 ± 0.7 和 $13.4 \pm 0.5\%$ 。两药均使该比值显著增高 ($P < 0.01$), 提示心肌含水量减少。

6 对心肌 CK 释放的影响 (Fig 2) 缺血前, 冠脉流出液中可测得少量 CK, 其值均小于 $4 \text{ IU}/(\text{min} \cdot \text{g dry wt})$ 。药物对非缺血心脏的 CK 释放没有明显影响。在缺血期, 由于冠脉流出液极少, 测到的 CK 释放量低于缺血前, 各组间无明显差异(预试验结果)。在再灌

注期, 心肌释放 CK 明显增加, 约在第 10 min 达到高峰, 其持续时间与心功能状态有关。在溶剂对照组, 35 min 再灌注后, CK 释放仍高达 $20 \pm 6 \text{ IU}/(\text{min} \cdot \text{g dry wt})$; 前 15 min 逆行再灌注期 CK 释放总量为 $389 \pm 36 \text{ IU}/(15 \text{ min} \cdot \text{g dry wt})$ 。各剂量的 *m*-Nif 和 Nif 均使 CK 释放显著减少, 等效量时, 作用更为明显。

Discussion

对正常灌注的豚鼠工作心脏, Nif 的作用类似对大鼠工作心脏的作用⁽⁸⁾, 但前者更为敏感, 故所需剂量较小。与同量 Nif 比较, *m*-Nif 抑制心脏作用弱, 扩张冠脉作用强, 虽增加 MVO_2 , 降低效率作用却较小。 *m*-Nif 增加 MVO_2 可能与其较强的扩冠脉作用以及实验条件有关。

Nif 可保护离体大鼠工作心脏缺血再灌注损伤^(9,10), 本文在豚鼠心脏上也证明了这一点。但豚鼠心脏耐受性较差, 不易控制缺血程度, 给药剂量和给药时间是其难点。

缺血前和缺血期给予 *m*-Nif 对缺血再灌注心脏产生程度不同的直接保护作用。突出地表现在保存缺血心肌的舒张性能及顺应性, 改善冠脉循环, 提高心脏工作效率和减少 CK 释放。在等效量时, 其保护作用强度与 Nif 相近。本文结果与其它钙拮抗剂的比较性研究^(10,11)有相似之处。

在 *m*-Nif 8 和 Nif 25 nmol/L 组, 虽然心肌收缩力恢复不佳, 但心肌舒张性能相对改善, CO 和 CF 也比溶剂对照组恢复好。显示了心肌舒张性能影响心脏泵功能和心肌供血的重要性。 *m*-Nif 和 Nif 这种优先改善缺血再灌注心脏舒张性能及顺应性的作用值得重视。

m-Nif 8 nmol/L 对心脏几无抑制作用, 但有部份保护作用; Nif 25 nmol/L 对心脏抑制作用强, 保护作用却弱。提示: 它们减轻豚鼠心脏缺血再灌注损伤并不单纯依赖剂量, 可能各需一适当的剂量范围; 其负性肌力和节能作用并非唯一可能的保护机理。

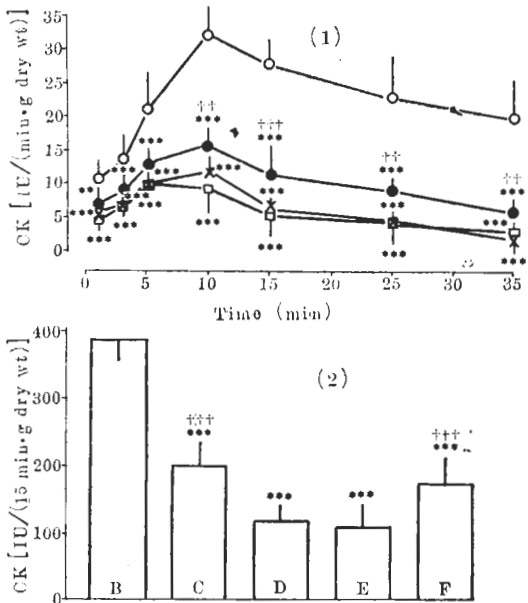


Fig 2. Effects of *m*-Nif and Nif upon creatine kinase (CK) release in isolated working guinea pig hearts subjected to ischemia and reperfusion. (1) The time course of CK released during reperfusion. The groups were solvent (○), *m*-Nif 8 nmol/L (●), *m*-Nif 25 nmol/L (×), and Nif 8 nmol/L (□). (2) The total amount of CK released during the first 15 min retrograde reperfusion. For other explanation cf Fig 1.

References

- 1 Rao MR, Liang MD, Liu F, Shen XH, Zou X. Effects of *m*-nifedipine on contractile responses in the isolated atria and coronary vessels : a comparison with nifedipine. *Acta Pharm Sin* 1986, 21 : 321
- 2 Rao MR, Liang MD, Liu GY, Liu F, Zhang HQ. Effect of *m*-nifedipine, a calcium antagonist, on cardiac performance and oxygen consumption in anesthetized animal: a comparison with nifedipine. *Ibid* 1984, 19 : 101
- 3 Guo ZG, Ma CT, Tang XL, Shen Y, Yang FC. Effects of fluorocarbons perfusion on isolated working guinea pig hearts. *Acta Pharmacol Sin* 1986, 7 : 243
- 4 Neely JR, Rovetto MJ. Techniques for perfusion isolated rat hearts. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*; vol 39. NY: Academic Press, 1975 : 43-60
- 5 Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 1976, 58 : 751
- 6 Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ, Morgan HE. Effects of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* 1967, 212 : 804
- 7 Duma RJ, Siegel AL. Serum creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1965, 115 : 443
- 8 Hamm CW, Opie LH. Protection of infarcting myocardium by slow channel inhibitors. Comparative effects of verapamil, nifedipine, and diltiazem in the coronary-ligated, isolated working rat heart. *Circ Res* 1983, 52 (Suppl I) : 129
- 9 Higgins AJ, Blackburn KJ. Prevention of reperfusion damage in working rat hearts by calcium antagonists and calmodulin antagonists. *J Mol Cell Cardiol* 1984, 16 : 427
- 10 Watts JA, Maiorano LJ, Maiorano PC. Comparison of the protective effects of verapamil, diltiazem, nifedipine, and buffer containing low calcium upon global myocardial ischemic injury. *Ibid* 1986, 18 : 255
- 11 Fitzpatrick DB, Karmazyn M. Comparative effects of calcium channel blocking agents and varying extracellular calcium concentration on hypoxia/reoxygenation and ischemia/reperfusion-induced cardiac injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1984, 228 : 761