

for the Behavioral Sciences. Belmont, California: Brooks / Cole Publishing Co, 1982 : 489 & 90
14 de Jonge A, Timmermans PBMWM, van Zwieten PA. Quantitative aspects of alpha adrenergic ef-

fects induced by clonidine-like imidazolidines. II. Central and peripheral bradycardic activities. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 222 : 712

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Sep; 11 (5) : 435-438

猪缺血心肌嗜中性白细胞浸润及维拉帕米的保护作用¹

罗武生、郭兆贵²、汤显良 (湖南医科大学药理研究室, 长沙 410078, 中国)

Neutrophil infiltration in ischemic porcine myocardium and protective effect of verapamil¹

LUO Wu-Sheng, GUO Zhao-Gui², TANG Xian-Liang (Research Section of Pharmacology, Hu-nan Medical University, Changsha 410078, China)

ABSTRACT Neutrophil infiltration in the ischemic porcine hearts was analyzed by spectrophotometrical assay of the neutrophil specific enzyme-myeloperoxidase (MPO). The results showed that neutrophil infiltration in the ischemic myocardium was increased with time. An increase of MPO activity per 1 g tissue from 1.3 ± 0.8 to 4 ± 3 IU was observed as early as 10 min after occlusion of the coronary artery. Three h after occlusion MPO activity increased to 8.4 ± 1.3 IU, 7 times greater than that of normal tissue. one-h occlusion followed by 2-h reperfusion caused even higher neutrophil accumulation. MPO activity increased to 14 ± 3 IU, 11 times greater than normal tissue. Pretreatment with verapamil to reperfusion hearts decreased MPO activity to 4.7 ± 0.7 IU. In addition, verapamil completely eliminated the first episode of arrhythmia 5-10 min after occlusion. Our studies demonstrate that neutrophils can rapidly accumulate into the ischemic myocardium and suggest that the protective action of verapamil may in part due to its inhibition of neutrophil infiltration in the ischemic myocardium.

KEY WORDS myocardium; ischemia; myocardial

reperfusion injury; myeloperoxidase; neutrophils; calcium channel blockers; verapamil; swine

摘要 结扎猪冠脉左前降支造成心肌缺血再灌模型, 以髓过氧化物酶法定量测定浸润于缺血和再灌注组织中的中性白细胞。结果表明在心肌缺血 10 min 即可见白细胞浸润, 缺血 3h 心肌中浸润的白细胞为正常的 7 倍, 缺血 1 h 再灌 2 h 白细胞的浸润更多。维拉帕米明显降低白细胞的浸润, 推测其抗心肌缺血作用, 部分与降低白细胞的浸润有关。

关键词 心肌; 缺血; 心肌再灌注损伤; 髓过氧化物酶类; 嗜中性白细胞; 钙通道阻滞剂; 维拉帕米; 猪

中性白细胞的浸润可直接影响缺血再灌时注心肌组织损伤和修复⁽¹⁾。白细胞一方面具有吞噬和清除坏死组织的能力, 另一方面在吞噬过程中释放蛋白溶酶、氧自由基和花生四烯酸代谢产物使缺血和再灌损伤加重。应用抗炎药和降低白细胞数可使损伤减轻⁽²⁾, 但也有人认为, 白细胞浸润与缺血再灌注损伤关系不大⁽³⁾。钙拮抗剂抗心肌缺血再灌损伤可归因于抑制细胞的 Ca^{2+} 内流从而防止 Ca^{2+} 超载⁽⁴⁾。它还有降低白细胞活性的作用⁽⁵⁾, 后者可能与抗缺血再灌损伤有关。本工作选用猪造成缺血再灌损伤, 应用髓过氧化物酶法来观察白细胞的浸润及钙拮抗剂的作用。

MATERIALS AND METHODS

猪心肌缺血再灌模型的建立 猪, 体重

Received 1989 Nov 25 Accepted 1990 May 18

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 0387007

² To whom correspondence should be addressed.

11 ± SD 2 kg, ♀ ♂ 兼用. 3%戊巴比妥钠 20 mg/kg iv 麻醉, 仰位固定. 右侧股静脉插管建立输液途径以作实验时 iv, 左颈总动脉插管记录动脉血压, 气管插管进行人工呼吸 (Harvard respiratory pump 613A) 以血气分析值 (pH, P_{CO_2} , P_{O_2}) 为准调整呼吸频率 (15–20 次/min). 紧靠胸骨左缘开胸, 暴露心脏, 打开心包并作心包篮. 在分离冠状动脉以前 iv 利多卡因 2 mg/kg, 并以 100 mg/100 ml 浓度维持滴注 (0.5–1 ml/min). 于心尖处插一直径为 1 mm 的插管到左心室, 记录左室内压 (LVP) 及其一级导数 (dP/dt), 并作 II 导联心电图. 待各项心功能指标稳定以后, 在左前降支下 1/3 处分离冠状动脉, 先以零号丝线使冠脉狭窄 75% 左右 30 min, 然后分为结扎组和再灌组. 结扎组当冠脉已狭窄 30 min 后进行连续 3 h 的缺血, 而再灌组则先结扎 1 h, 然后松解结扎再灌流 2 h. 当冠脉结扎后结扎区域心脏表面有分界明显的紫绀区. 为证实心肌梗塞的区域和程度, 部分心脏作 TTC 染色, 但为防止 TTC 对髓过氧化酶测定的干扰, 其他心脏组织不作 TTC 染色, 而仅根据紫绀区的界线取心肌组织. 实验后迅速取缺血和再灌区域及正常左室心肌组织固定于液氮中作髓过氧化酶测定和 CPK 测定. 在早期 (0.5 h 内) 缺血过程中发生室颤死亡的猪, 同样取组织作酶活性的测定, 以观察缺血早期有无白细胞的浸润.

维拉帕米 (verapamil, Ver) 对心肌缺血再灌损伤和白细胞浸润的影响 在作狭窄冠脉之前, 先 iv Ver 0.2 mg/kg, 以后同再灌组一样处理. 实验后取组织作酶活力分析.

心肌组织中髓过氧化酶活力 (myeloperoxidase, MPO) 的测定 中性白细胞的嗜苯胺兰颗粒中含有 MPO, 其含量约占整个细胞干重的 5%⁽⁶⁾, 测定该酶的活力可以定量测定白细胞的数目. 此法最先用于测定大鼠皮肤组织中的中性白细胞, 这里加以改进

用以间接定量测定猪心肌组织中中性白细胞的数目⁽⁶⁾. 简述如下: 分别取正常或病变区域的心肌组织 (100 mg) 加入 2 ml PBS 50 mmol/L 液 (含 0.5% HTAB, pH 6) 中做成匀浆, 所得匀浆用超声粉碎 10 s, 3 次 (MSE Sonoprep 150), 之后以 43000 × g 离心 15 min (Tomy RS-III). 取上清 0.1 ml 与 2.9 ml 反应液混合. 以分光光度计 (UV-2000 HITACHI) 在 460 nm 下测定 2 min 内光密度的变化值. 反应液为: 磷酸邻联茴香胺 16.7 mg, PBS (50 mmol/L) 10 ml, 蒸馏水 90 ml 加入 30% H₂O₂ 使 H₂O₂ 终浓度为 0.0005%. 1 IU 的 MPO 活力以 25℃ 时 1 min 分解 H₂O₂ 1 mol 表示. 为了研究猪白细胞数和 MPO 活力的关系, 取猪外周肝素抗凝血 (肝素 15–20 IU/ml) 10 ml, 加 6% 葡萄糖生理盐水 2 ml, 静置 0.5–1 h, 使红细胞聚集沉降, 吸取富含白细胞的上层血浆, 以 240 × g 离心 10 min. 弃上清, 以低渗法溶解红细胞, 所得白细胞以 Hank's 液洗 2 次, 制成白细胞悬液, 为得到高纯度的中性白细胞, 将上述白细胞悬液置淋巴细胞分离液上, 以 400 × g 离心 20 min, 弃上清和淋巴细胞后, 剩余的白细胞用 Hank's 液洗 2 次. 最后加 Hank's 液, 制成高纯度的中性白细胞悬液 (纯度 95%). 测定时, 先将白细胞稀释成 $1 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 个/ml, 然后分别取 1 ml 与上述 0.5% HTAB 液混合, 同上法测定 MPO 活力.

资料统计 以 *t* 检验衡量各组均数与对照组之间的显著性.

RESULTS

心肌缺血再灌组织的形态变化 在结扎冠脉左前降支下 1/3 时, 心脏表面可见分界明显的紫绀区, 此区域约占整个左心室面积的 20%, 且各猪之间差异较小. TTC 染色证明在紫绀区的中央区域为梗塞区, 光镜下具有一般心肌梗塞的表现. 电镜下可见胞质中明带

Tab 1. Cardiac hemodynamics during ischemia and reperfusion in the porcine heart. $n=3$, $\bar{x} \pm SD$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control.

Cardiac function	Control	During myocardial ischemia				During reperfusion		
		5 min	1 h	2 h	3 h	5 min	1 h	2 h
HR (bpm)	111 ± 16	103 ± 15*	110 ± 10*	116 ± 8*	117 ± 16*			
	140 ± 30	140 ± 40*	140 ± 50*			150 ± 50*	140 ± 40*	130 ± 30*
LVP (kPa)	11.6 ± 0.8	10.2 ± 0.4**	9.7 ± 0.8**	11.0 ± 2.0*	10.2 ± 2.0*			
	16 ± 4	14 ± 4*	16 ± 4*			12.0 ± 0.9**	15.7 ± 2.5*	14.0 ± 0.7*
dP/dt _{max} (kPa/s)	452 ± 15	310 ± 55*	350 ± 70*	420 ± 110*	440 ± 110*			
	750 ± 100	640 ± 60*	740 ± 70*			470 ± 100**	730 ± 40*	580 ± 70*
BP (kPa)	10.6 ± 0.9	10.0 ± 0.4*	9.6 ± 0.4**	10.6 ± 1.3*	10.2 ± 2.0*			
	13 ± 3	12 ± 4*	13 ± 4*			9.6 ± 1.6*	12 ± 4*	17 ± 4*

细丝融合断裂，暗带肌丝不整齐，H带，M带消失，线粒体肿胀，肌质膜破坏，并能见到核固缩的坏死心肌细胞。单纯缺血组核的变化明显，表现为多形性，大多皱缩，而缺血再灌组以线粒体改变及间质水肿更明显。

心功能变化及 Ver 对心功能的影响 缺血或再灌时心功能的变化见 Tab 1。由此可见，在结扎时有明显的心肌收缩力降低，再灌组除此以外在恢复灌流后也有类似的心功能降低，这两个时间的心功能变化均是由严重的心律失常所引起的。当心律失常恢复正常以后，心功能则无明显的变化，在结扎阶段可见两次心律失常。第一次发生在扎后的 5-10 min 内，第二次发生在扎后的 20-30 min，均持续约 5 min，两次心律失常均以室性心动过速多见，易发展到室颤。在再灌组，除了发生结扎阶段的两次心律失常以外，在再灌的 1-20 min 内又出现一次室性心律失常，持续时间 18 ± 10 min，但此次心律失常不发展到室颤，也不导致猪死亡。用 Ver 后，最早一次(5-10 min)心律失常被取消，因此心功能无扎后立即出现的下降，但对 20-30 min 后出现的及再灌所致的心律失常无明显抑制作用。

心肌组织中 CPK 含量的变化 以 Sigma CPK 药盒测定缺血心肌组织 CPK 的活性，并与正常区域对照，结果显示缺血区域 CPK 活性较正常区明显降低(591 ± 179 IU/g vs 774 ± 160 IU/g, $P < 0.01$)。

心肌组织 MPO 活力的改变及 Ver 的影响 猪外周血白细胞在 1×10^5 至 2×10^6 个范围内与 MPO 有很好的线性关系。这一测定范围包括了缺血及再灌时 MPO 活力改变的范围，能够说明病变时白细胞浸润的情况。正常左心室心肌组织有少量的 MPO 活力(1.3 ± 0.8 IU/g 组织)，约相当于白细胞 $1.8 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ 个/g，缺血早期即可见 MPO 活力明显增高(4 ± 3 IU/g vs 1.3 ± 0.8 IU/g, $P < 0.05$)，缺血 3h 约相当于正常心肌组织的 7 倍(8.4 ± 1.3 IU/g vs 1.3 ± 0.8 IU/g, $P < 0.01$)，缺血 1h，再灌 2h MPO 活力更高，约相当于正常组织的 11 倍(14 ± 3 IU/g vs 1.3 ± 0.8 IU/g, $P < 0.01$)，每 1g 组织达 $1.9 \times 10^7 \pm 0.46 \times 10^7$ 个白细胞。Ver 使缺血再灌组织的 MPO 活力明显降低(4.7 ± 0.7 IU/g vs 8.4 ± 1.3 IU/g, $P < 0.01$)。

DISCUSSION

由于猪冠脉基本上无侧枝循环，结扎冠脉以后建立的缺血梗塞区域比较恒定，所以我们选用猪进行研究。结扎 1h 后，心肌细胞基本上受到不可逆损伤，难以通过再灌而使缺血区域的心肌细胞复活，便于比较缺血与再灌组织中酶活性的差别。

MPO 法测定中性白细胞的方法，我们直接取家猪外周血白细胞进行校正。结果显示，猪外周血中性白细胞数在一定范围内与

MPO 活力呈直线关系。测定心肌组织的结果表明, 在心肌缺血的早期(10-30 min)就有白细胞浸润。缺血到 3 h 后, 白细胞浸润更多。缺血 1 h 再灌 2 h 比单纯缺血浸润为多。大量的中性白细胞浸润于缺血与再灌组织, 引起急性炎症反应和释放氧自由基等可能加速心肌组织的损伤。

钙拮抗剂对心肌缺血再灌时白细胞浸润的影响尚未见报道。我们的实验结果显示 Ver 对心肌缺血所致的早期心律失常 (10 min 内) 有明显的对抗作用。值得注意的是 Ver 可以减少中性白细胞的浸润, 表现为缺血再灌时心肌组织中 MPO 活力降低, 这一作用是否与其抗心律失常作用有关尚不清楚。有资料表明钙拮抗剂可以降低 FMLP 所致的白细胞趋化作用、超氧化物阴离子和细胞内酶的释放⁽⁷⁾。因此 Ver 的抗心肌缺血的作用可能部分还与它减少白细胞浸润有关。

REFERENCES

1 Chatelain P, Latour J-G, Tran D, de Lorgeril M,

Dupras G, Bourassa M. Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation* 1987; 75 : 1083

2 Mullane KM, Read N, Salmon JA, Moncada S. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228 : 510

3 Allan G, Bhattacharjee P, Brook CD, Read NG, Parke AJ. Myeloperoxidase activity as a quantitative marker of polymorphonuclear leukocyte accumulation into an experimental myocardial infarct—The effect of ibuprofen on infarct size and polymorphonuclear leukocyte accumulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 : 1154

4 Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol* 1981; 102 : 262

5 何凤慈 唐汝愚. 钙与中性粒细胞功能的关系. *Chin Pharmacol Bull* 1989; 5 : 85

6 Schultz J, Kaminker K. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch Biochem Biophys* 1962; 96: 465

7 Azuma Y, Tokunaga T, Takeda Y, Ogawa T, Takagi N. The effect of calcium antagonists on the activation of guinea pig neutrophils. *Jpn J Pharmacol* 1986; 42 : 243

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Sep; 11 (5) : 438-441

肾性高血压犬交感神经末梢去甲肾上腺素的释放调节¹

徐 标、陈日新、陈达光²、张 林、秉建民 (南京铁道医学院心血管病研究室, 南京 210009, 中国)

Modulation of norepinephrine release in sympathetic nerve endings in renal hypertensive dogs

XU Biao, Chen Ri-Xin, CHEN Da-Guang, ZHANG Lin, LI Jian-Min (Cardiovascular Research Unit, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT Experimental renal hypertensive and normal dogs with femoral arteries constantly perfused were studied. Cocaine was used to block the presynaptic norepinephrine (NE) reuptake and tyramine to initiate the release of NE in sympathetic nerve endings. NE spillover and infusion pressure were measured under basic conditions and during intraarterial infusion of cocaine, tyramine and in combination with α_1 and α_2 adrenoceptor antagonists. The extent of NE spillover increase induced by infusion of tyramine, the increased infusion pressure by cocaine and tyramine, and the reduced infusion pressure by prazosin were all greater in hypertensive dogs than those in normal dogs, but adrenoceptor antago-

Received 1989 Apr 5 Accepted 1990 May 31
¹ Project supported by the Fund for the 7th Five-Year Plan Key Projects, No 75-062-02-05
² Now in Fujian Medical College, Fuzhou 350005, China