253-257

BIBLID: ISSN 0253-9756 Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报 1994 May; 15 (3): 253—257

# 赛庚啶对离体大鼠心肌再灌注损伤的保护作用

辛洪波，张宝恒，沈华杰[1]（北京医科大学基础医学院药理教研室，北京100083，中国）

## Protective effects of cyproheptadine on myocardial reperfusion injury in isolated rat hearts

XIN Hong-Bo, ZHANG Bao-Heng, SHEN Hua-Jie[1] (*Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*)

**ABSTRACT** The protective effects of cyproheptadine (Cyp), an antiserotonin-antihistaminic agent with calcium channel blocker activity, on myocardial reperfusion injury in isolated Langendorff heart of rats were studied. After a low perfusion [0.17 ml·min$^{-1}$, standard Krebs-Henseleit (K-H) buffer without glucose, gassed with 95 % $O_2$ + 5 % $CO_2$] of 60 min followed by a normal K-H buffer perfusion of 20 min, an extensive and severe myocardial injury appeared: a release of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK), a decrease of superoxide dismutase (SOD) and glutathion peroxidase (GSH-Px) activities, and an increase of malondialdehyde (MDA) content. Serious inhibition of cardiac functions and appearence of arrhythmia, even asystole, were also elicited in the injuried hearts. Cyp (2.5 and 5 μmol·L$^{-1}$) effectively antagonized the damage. The results suggested that the protective effects of Cyp on the ischemia-reperfusion injury may be related to its actions of blocking the calcium channel, scavenging the oxygen free radicals, protecting the antioxygen free radical enzymes, and inhibiting the lipid peroxidation in the myocardium.

**KEY WORDS** cyproheptadine; myocardial reperfusion injury; creatine kinase; lactate dehydrogenase; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; malondialdehyde

**摘要** 离体大鼠心脏经低灌(0.17 ml·min$^{-1}$) 60 min 后，用正常K-H 液复灌20 min，可导致严重的心肌损伤. 赛庚啶(2.5和5 μmol·L$^{-1}$)对上述心肌损伤有明显的保护作用，表现为明显改善心脏复灌时的心功能，抑制心律失常的发生和降低心脏停搏的发生率，减少心肌细胞内 CK 和 LDH 的漏出，提高心肌组织 SOD 和 GSH-Px 活性，抑制 MDA 的升高.

**关键词** 赛庚啶；心肌再灌注损伤；磷酸肌酸激酶；乳酸脱氢酶；超氧化物歧化酶；谷胱甘肽过氧化物酶；丙二醛

心脏缺血再灌注损伤是临床上一种严重的心肌损伤类型，氧自由基在心脏缺血/再灌注及缺钙/复钙损伤过程中起着极其重要的作用，而心肌细胞内 $Ca^{2+}$ 超负荷则是最终导致细胞坏死的共同途径[1]. 钙通道阻断剂对心脏缺血再灌注损伤具有明显的保护作用[2]. 钙调蛋白拮抗剂对心脏钙反常有明显的保护作用[3]. 赛庚啶(cyproheptadine, Cyp)为一哌啶类抗5-羟色胺和抗组织胺药，具有较强的 $Ca^{2+}$ 通道阻滞作用[4]. 该药对多种氧自由基具有明显的清除作用，并对异丙肾上腺素诱发的整体大鼠心肌损伤及离体大鼠心脏缺钙复钙损伤(钙反常)均有明显的保护作用[5-7]. 本文报道 Cyp 对离体大鼠心脏缺血再灌注损伤的保护作用，并探讨其可能的作用机制.

Received 1992-04-04 Accepted 1993-07-08

[1] *Department of Pharmacology, Datong Hygienics School, Datong 037008, China.*

## MATERIALS AND METHODS

盐酸赛庚啶(Cyp)为白色粉末结晶，由江苏省常州市第四制药厂生产并惠赠. 肌酸(美国 Merck 公司)；黄嘌呤氧化酶(北京海军总医院分子生物学研究室)；还原性谷胱甘肽(Serva 公司)；丙酮酸钠(北京化工厂)；四乙氧基丙烷(TEP，瑞士 Fluka 公司)；其它试剂均为进口或国产 AR. 高速冷冻离心机(RC5C，美国 Du Pont)；双波长双光束 uv 分光光度计(UV-3000，日本岛津)；八导生理记录仪(RM-6000，日本光电).

**心肌再灌注损伤**[9] Wistar ♀大鼠21只，体重274±s 24 g，用20 %乌拉坦麻醉(1 g·kg$^{-1}$，ip)，并同时给予0.4 %肝素(1 ml/只，ip). 麻醉后取心，置于冰冷的 Krebs-Henseleit (K-H)液中，使心脏立即停止跳动. K-H 液的组成：NaCl 118，KCl 4.7，$KH_2PO_4$ 1.2，$MgSO_4$ 1.2，$NaHCO_3$ 25，$CaCl_2$ 2.5，glucose 11.1 mmol·L$^{-1}$，pH 7.4，通以95 % $O_2$ + 5 % $CO_2$. 洗净残存血液，剪断肺动脉以便冠脉液流出，然后行主动脉插管进行非循环的 Langendorff 逆行灌流，灌流压为8.33 kPa，灌流温度为37 C. 并于左心房行左心室插管记录心功能指标.

心脏先用正常 K-H 液进行灌流，同时记录心功能指标及冠脉流量，待心功能稳定后(约10 min)，换不含葡萄糖的 K-H 液作缺血灌流(流速为 0.17 ml·min$^{-1}$) 60 min. 然后恢复正常 K-H 液灌流(复灌) 20 min，同时留取正常灌流第10 min，整个缺血灌流期和复灌后第1，3，5，10，20 min 以及其余复灌期的冠脉流出液，且于12 h 内用于磷酸肌酸激酶(creatine kinase，CK)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)活性测定，并同步记录心功能指标. 给药组在正常灌流10 min 后换含药液灌流.

**心功能**[1] 心脏基本稳定后即可经左心房行左心室插管，然后经压力传感器连接到八导生理记录仪，描记左心室收缩压(LVSP)、左心室内压变化速率(±$dp/dt$)和心率. 同时，由左室压(LVP)电信号输入载波放大器，再从后者输入直流放大器放大10倍，描记 LVP 曲线的基部，以读取左室舒张末压(LVEDP). 以 $dp/dt$ 与 LVSP 之比，求出心肌纤维收缩成分的缩短速度($V_{CE}$).

**心肌组织** 心脏灌流完毕，剪去心房等组织，用滤纸吸去水份，称重，然后置−80 C保存. 实验时称取大鼠左心室肌组织250−300 mg，用 Tris-HCl 缓冲液20 mmol·L$^{-1}$，pH 7.0，制备10 %的组织匀浆. 取0.2 ml 匀浆组织供丙二醛(malondialdehyde，MDA)含量测定，其余组织匀浆再离心8000×$g$，20 min，取上清液1 ml 供谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase，GSH-Px)活性测定，其余上清液再离心45 000×$g$，30 min，其上清液用于超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)活性测定.

**生化指标** 冠脉流出液 CK 和 LDH 活性分别采用肌酸显示法[10]和比色法[11]测定；心肌组织 SOD 和 GSH-Px 活性分别采用亚硝酸盐形成法[12]和 DTNB [5,5'-dithionbis-(2-nitrobenzoic acid)，二硫代双硝基苯甲酸]直接法[13]测定；心肌组织 MDA 含量采用 TBA (硫代巴比妥酸)显色法[14]测定；蛋白含量采用考马斯亮蓝法[15]测定，牛血清白蛋白作标准.

## RESULTS

**Cyp 对离体大鼠心脏正常灌流时心功能的影响** Cyp 2.5 μmol·L$^{-1}$灌流大鼠心脏5 min 后，除左室内压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)和心率降低外，其它心功能指标无明显改变. Cyp 5 μmol·L$^{-1}$时，$dp/dt_{max}$，$-dp/dt_{max}$ 和 $V_{CE}$降低，心率减慢(Tab 1).

**Cyp 对心肌再灌注时心律失常或心跳停搏的影响** 在对照组7只心脏中，复灌后全部出现心律失常，其中有2只出现停跳. Cyp I 组(2.5 μmol·L$^{-1}$)的7只心脏中均未出现心律失常，但 Cyp II (5 μmol·L$^{-1}$)的7只心脏中有4只出现心律失常其中2只停跳. 由于对照组复灌后出现明显的心律失常，无法测量有关心功能指标. Cyp II 组也仅有3只可测量心功能指标. 以致 Cyp I 组的心功能指标无法进行比较.

**Cyp 对心肌再灌注损伤时冠脉流出液 CK，LDH 活性的影响** 正常灌流及低灌期，心脏组织释出的 CK 和 LDH 均很少，当复灌开始时，立即出现大量的组织内酶释放(Fig 1). CK 和 LDH 释放的峰值分别在复灌期的第5 min 和第3 min，且持续到复灌期第20 min

**Tab 1. Effects of cyproheptadine (Cyp) on cardiac functions in isolated rat heart. $n=7$, $\bar{x}\pm s$.**
**$^aP>0.05$, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$ vs 0 min (paired $t$ test).**

| | Cyp 2.5 μmol·L$^{-1}$ | | Cyp 5.0 μmol·L$^{-1}$ | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 5 min | 0 | 5 min |
| $+dp/dt_{max}$ = maximal rate of rise of left ventricular pressure, kPa·s$^{-1}$ | 298±49 | 242±48$^a$ | 332±80 | 234±71$^b$ |
| $+dp/dt_{max}$ = maximal rate of fall of left ventricular pressure, kPa·s$^{-1}$ | 214±39 | 126±35$^c$ | 236±31 | 135±36$^c$ |
| LVSP = left ventricular systolic pressure, kPa | 10.2±1.7 | 8.5±2.7$^a$ | 10.4±1.3 | 9.3±3.2$^a$ |
| LVEDP = left ventricular end diastolic pressure, kPa | −0.47±0.36 | −0.32±0.19$^a$ | −0.45±0.44 | −0.12±0.47$^a$ |
| $V_{CE}$ = velocity of contraction of ventricular contractile elements, s$^{-1}$ | 29±5 | 28±4$^a$ | 32±6 | 26±5$^b$ |
| HR = heart rate, beats·min$^{-1}$ | 271±39 | 218±59$^b$ | 279±45 | 151±55$^c$ |
| CF = coronary flow, ml·min$^{-1}$ | 10.0±0.8 | 10.3±0.4$^a$ | 10.8±1.2 | 10.8±2.6$^a$ |

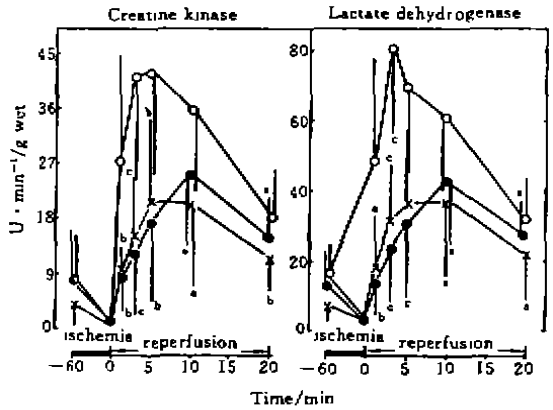


**Fig 1. Effects of cyproheptadine 0 (○), 2.5 (●), 5.0 (×) μmol·L$^{-1}$ on CK and LDH leakage from isolated rat heart of ischemia-reperfusion. $n=7$, $\bar{x}\pm s$. $^aP>0.05$, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$ vs control.**

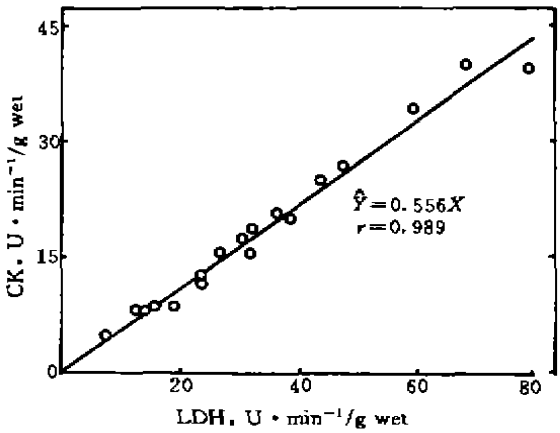


**Fig 2. Relationship between creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) leakage from isolated rat heart of ischemia-reperfusion ($n=8$).**

仍有一定量的组织内酶释放. Cyp 能明显减少组织酶的释放且可使酶释放峰值明显延迟. Cyp 也可使整个复灌期酶释放总量减少(Tab 2). 心肌 CK 和 LDH 的释放量之间有很好的相关性(Fig 2).

**Cyp 对心肌 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响** 缺血/再灌注心肌的 SOD 和 GSH-Px 活性明显低于正常组, 而 MDA 含量则高于正常组. Cyp 可明显对抗离体大鼠心肌再灌注损伤所致的 SOD、GSH-Px 活性下降和 MDA 含量升高(Tab 2).

## DISCUSSION

我们曾观察到 Cyp 具有明显的清除氧自由基、抑制脂质过氧化作用和抗钙调蛋白作用. 本文结果表明具有较强 $Ca^{2+}$ 通道阻滞作用的 Cyp 能有效地抑制心脏缺血/再灌注时心律失常及心脏停搏的发生、抑制细胞内酶的漏出、显著保护心肌组织抗氧自由基酶活性及抑制心肌

**Tab 2. Effects of cyproheptadine (Cyp) on total creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) leakage during the reperfusion phase (20 min) and on superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and malondialdehyde (MDA) content of myocardial tissues in rat hearts of ischemia-reperfusion.** $n=7$, $\bar{x}\pm s$. $^aP>0.05$, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$ *vs* normal; $^dP>0.05$, $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ *vs* control.

| | Concentration μmol·L$^{-1}$ | CK, U/mg wet | LDH, U/mg wet | SOD, NU/mg protein | GSH-Px, U·min$^{-1}$/mg protein | MDA, nmol/g wet |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Normol | | | | 20.3±2.3 | 590±60 | 144±8 |
| Control | | 0.62±0.20 | 1.11±0.23 | 11.1±0.6$^c$ | 224±41$^c$ | 194±27$^c$ |
| Cyp | 2.5 | 0.36±0.18$^e$ | 0.71±0.30$^e$ | 14.7±0.9$^f$ | 294±23$^f$ | 136±23$^f$ |
| Cyp | 5 | 0.33±0.16$^f$ | 0.70±0.27$^f$ | 15.0±1.0$^f$ | 299±36$^f$ | 152±22$^f$ |

组织脂质过氧化产物的生成等. 这与我们曾在离体大鼠心脏缺钙复钙损伤模型上观察到的结果[7]一致. 上述结果提示, Cyp 对心脏缺血再灌注损伤的保护作用可能与其抑制细胞 $Ca^{2+}$ 内流、清除氧自由基、保护心肌组织抗氧自由基酶活性、抑制脂质过氧化及抗钙调蛋白等作用有关.

目前有关心肌损伤的动物实验研究及临床观察多以 CK 作为损伤指标. 本文结果表明, 在离体大鼠心脏灌流标本上 LDH 与 CK 的释出具有很好的平行关系, 提示可用 LDH 代替 CK 作为心肌损伤的观察指标, 前者具有检测简便、试剂价廉等优点.

## REFERENCES


1 Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend or foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury.
J Mol Cell Cardiol 1984; 16: 969—85.

2 Nayler WG, Ferrari R, Williams A. Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. Am J Cardiol 1980; 46: 242—48.

3 Sanrgent CA, Sleph PG, Dzwonczyk S, Smith MA, Grover GJ. Effect of calmodulin and protein kinase C inhibitors on globally ischemic rat hearts.
J Cardiovascular Pharmacol 1992; 20: 251—60.

4 Winquist RJ, Siegl PKS, Baskin EP, Bohn DL, Morgan G, Wallace AA. Calcium entry blocker activity of cyproheptadine in isolated cardiovascular preparations.
J Pharmacol Exp Ther 1984; 230: 103—9.

5 Xin HB, Zhang BH. Scavenging effects of cyproheptadine on oxygen free radicals.
Acta Pharm Sin 1993; 28: 161—5.

6 Xin HB, Zhang BH, Shen HJ. Protective effects of cyproheptadine on calcium paradox in isolated rat hearts.
Acta Pharm Sin 1992; 27: 806—11.

7 Xin XB, Zhang BH, Liu YW, Fan JS. Protective effects of cyproheptadine on isoproterenol-induced myocardial injury in rats *in vivo*.
Chin J Pharmacol Toxicol 1993; 7: 176—9.

8 Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and calcium paradox: two facets of the same problem? J Mol Cell Cardiol 1978; 10: 641—68.

9 Li MX. Evaluation and measuring methods of some parameters of myocardial contractile functions *in situ*. In: Zhou YJ, Zhao YQ, Wang YR, editors. Methods and techniques of physiology: vol 1. 1st ed. Beijing: Science Press, 1984: 34—6.

10 Zhang LL. Measurement of creatine phosphokinase activity. In: Shanghai Medical Laboratory, editor. Clinical biochemical analysis: vol 1. 1st ed. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1982: 337—40.

11 Xu SK. Measurement of lactic dehydrogenase activity. In: Shanghai Medical Laboratory, editor. Clinical biochemical analysis: vol 1. 1st ed. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1982: 314—16.

12 Elstner EF, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium-chloride: a simple assay for superoxide dismutase.
Anal Biochem 1976; 70: 616—20.

13 Xia YM, Zhu LZ. Measurement of glutathione peroxidase activity in blood and tissues. 1. The method of DTNB analysis. Health Res 1987; 16: 29—33.

14 Asakawa T, Matsushita S. Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. Lipid 1979; 14: 401—6.

15 Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248—54.

257-259

BIBLID: ISSN 0253-9756 Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报 1994 May; 15 (3): 257—259

# 卡马西平对小鼠缺氧及脑缺血损害的影响

董丽萍，王天佑，朱 [illegible][1]（北京市神经外科研究所，北京100050，中国）

R971.6

## Effects of carbamazepine on hypoxic and ischemic brain damage in mice

DONG Li-Ping, WANG Tian-You, ZHU Jie[1]
(*Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China*)

**ABSTRACT** When carbamazepine (Car) was injected ip 13.0—50.0 mg·kg$^{-1}$ 30 min before inhaling 96 % $N_2$ + 4 % $O_2$, the survival time of mice was prolonged (from 54±8 s in control group to 119±35 s). The survival time of mice subjected to bilateral carotid artery ligation was markedly prolonged by Car (25.0—50.0 mg·kg$^{-1}$), medians were 4, 6, and 15 min, respectively. Car (25.5 — 70.0 mg·kg$^{-1}$) alleviated the reduction of ATP (from 1.0±0.3 μmol·g$^{-1}$ in control group to 1.9±0.5 μmol·g$^{-1}$) and phosphocreatine (PC) contents (from 0.8±0.2 μmol·g$^{-1}$ in control group to 1.2±0.3 μmol·g$^{-1}$) and the accumulation of lactic acid (LA) (from 9.6±1.3 μmol·g$^{-1}$ in control group to 6.7±0.7 μmol·g$^{-1}$) in mouse brain 30 s after decapitation. These results indicated that Car was effective against hypoxia and brain ischemia in mice.

**KEY WORDS** carbamazepine; anoxia; cerebral ischemia; adenosine triphosphate; phosphocreatine; lactates

Received 1992-08-03 Accepted 1993-06-08

[1] Undergraduate of Beijing Normal University.

**摘要** 实验前30 min ip 卡马西平(Car，13.0—50.0 mg·kg$^{-1}$)，能明显延长吸入 96% $N_2$+4% $O_2$小鼠的存活时间；Car 25.0 和 50.0 mg·kg$^{-1}$能明显延长双侧颈动脉结扎引起脑缺血小鼠的存活时间. 25.0—70.0 mg·kg$^{-1}$能减轻小鼠断头缺血30 s 后脑 ATP，磷酸肌酸(PC)的减少和乳酸(LA)的增高. 结果表明，Car 可对抗小鼠缺氧和缺血性脑损害.

**关键词** 卡马西平；缺氧症；脑缺血；腺苷三磷酸；磷酸肌酸；乳酸盐类

抗惊厥药苯妥英钠、美西律对缺氧缺血性脑损害有保护作用，能延长缺氧小鼠的存活时间和改善缺血小鼠脑能量代谢[1,2]. 苯妥英钠还能减少大鼠缺血脑游离脂肪酸含量[3]和减轻兔缺氧缺血引起的脑损害[4]. 苯妥英钠、美西律均能阻滞兴奋性细胞钠、钙内流，稳定细胞膜. 卡马西平(carbamazepine，Car)是另一种常用抗惊厥药，其作用机制与上述两药相似. 但未见 Car 对脑缺血、缺氧作用的报道. 本文观察 Car 对缺氧、缺血小鼠生存时间和缺血时脑能量代谢的影响.

## MATERIALS AND METHODS

Car上海第二制药厂赠送，批号：S890037. 用 10 %吐温-80研磨溶解. 小鼠♀，昆明种属，体重20±s 1 g. 实验前0.5 h ip Car 20 ml·kg$^{-1}$. 缺氧、缺血对照组同上法给等量10 %吐温-80.