

- healthy american men. *Am J Cardiol* 1982, 49 : 529-32.
- 11 Chaffman M, Brogden RN. Diltiazem: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1985; 29 : 387-454.
- 12 Kleinbloesem CH, van Brummelen P, van de Linde JA, Voogd PJ, Breimer DD. Nifedipine: Kinetics and dynamics in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1984; 35 : 742-9.
- 13 Shi MD, Gao RX, Hou HM, Yao ZY, Xu JQ. Preliminary observation of retention of hydrodynamically balanced system in stomach. *Chin J Pharm* 1990; 21 : 162-4.
- 14 Reid JL, Meredith PA. Concentration-effect analysis of antihypertensive drug responses. *Hypertension* 1990; 16 : 12-8.

531-534

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Nov; 13 (6) : 531-534

苯妥英钠抗脂质过氧化作用与对小鼠缺血心肌的保护作用

王晓雯、张建林、周承明、王雪飞、刘文杰¹、张克锦
(新疆医学院药理教研室、电镜室¹、乌鲁木齐 830054, 中国)

R 972.2

Anti-lipid peroxidation and protective effects of phenytoin sodium on ischemic myocardium of mice

WANG Xiao-Wen, ZHANG Jian-Lin, ZHOU Cheng-Ming, WANG Xue-Fei, LIU Wen-Jie¹, ZHANG Ke-Jin (Department of Pharmacology, ¹Department of Electron Microscope, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT Isoproterenol (Iso, 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ × 2 d) induced widespread and severe myocardial damages at ultrastructural level, decreased the myocardial Se-glutathione peroxidase (Se-GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activities, increased the serum creatine phosphokinase (CPK) concentration and myocardial malonaldehyde (MDA) content. Phenytoin sodium (Phe) 15 or 30 mg · kg⁻¹ ip pretreatment diminished the CPK release and MDA production, protected the Se-GSH-Px activity in the Iso-induced damage of mouse heart. The pretreatment with 30 mg · kg⁻¹ abated the reduction of SOD activity. However, Phe 15 mg · kg⁻¹ did not show such an effect. Phe (15 or 30 mg · kg⁻¹) reduced the ultrastructural cardiotoxicity of Iso, and the membrane structure of ischemic myocardium was protected. The protective effects of verapamil

pretreatment 3 mg · kg⁻¹ ip were weaker than those of Phe on ultrastructural changes, but biochemical changes were similar to those of Phe. The results suggested that Phe possessed anti-lipid peroxidation and protective effects on ischemic myocardium.

KEY WORDS phenytoin; isoproterenol; verapamil; myocardium; ischemia; glutathione peroxidase; superoxide dismutase; creatine kinase; electron microscopy

提要 异丙肾上腺素诱发小鼠急性心肌缺血期, 血清 CPK 浓度升高, 心肌 Se-GSH-Px、SOD 活性均降低, MDA 含量增加, 心肌超微结构广泛而严重的损伤。苯妥英钠(Phe) 30、15 mg · kg⁻¹ 及维拉帕米 3 mg · kg⁻¹ 均显著抑制急性心肌缺血时 CPK 释放, 并降低脂质过氧化反应, 明显减轻缺血心肌超微结构损伤。提示 Phe 具有抗脂质过氧化及保护缺血心肌作用。

关键词 苯妥英; 异丙肾上腺素; 维拉帕米; 心肌; 局部缺血; 谷胱甘肽过氧化酶类; 超氧化物歧化酶; 肌酸激酶类; 电子显微镜检查

苯妥英钠(phenytoin sodium, Phe)为抗癫痫及抗心律失常药^{1,2}, 我室发现 Phe 有抗肾上腺素及预防心肌缺血作用^{3,4}, 本文用异丙

Received 1990-09-07

Accepted 1992-07-01

肾上腺素(isoprenaline, Iso)诱发小鼠急性心肌缺血模型,以维拉帕米(verapamil, Ver)为阳性对照,以血清肌酸磷酸激酶(creatine phosphokinase, CPK)及心肌超微结构的变化为指标,观察心肌缺血的损伤程度,并测定硒谷胱甘肽过氧化物酶(Se-glutathione peroxidase, Se-GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,观察心肌缺血时氧自由基的产生,研究 Phe 抗脂质过氧化及对缺血心肌的保护作用。

MATERIALS AND METHODS

选用 C₅₇BL/6J 小鼠 85 只,体重 22±3 g,♂ 兼用,随机分组,每组 17 只。(1)正常组:生理盐水(NS) 0.04 ml·g⁻¹, sc; (2)缺血组: NS 0.03 ml·g⁻¹, ip 30 min 后 sc Iso (上海天丰药厂) 20 mg·kg⁻¹; (3)Ver 组: ip Ver (Helsinki, Finland) 3 mg·kg⁻¹, 30 min 后 sc Iso 20 mg·kg⁻¹; (4)分别 Phe ip (上海第八制药厂) 30 mg·kg⁻¹ 及 15 mg·kg⁻¹, 30 min 后各 sc Iso 20 mg·kg⁻¹。以上各组每日一次,共 2 d,各组于 d 2 sc Iso 或 NS 后 2 h,摘眼球取血制备血样品及血清。血样品取 10 μl 用双蒸水稀释至 1.0 ml 测 Se-GSH-Px 活性,血清测 CPK 浓度,立即取出心脏用冷冻生理盐水冲洗,制备心肌匀浆。

1 心肌匀浆的制备 取全心,称重,加入叠氮化钠磷酸缓冲液(内含 NaN₃ 2.5 mmol·L⁻¹, EDTA-Na 0.2 mmol·L⁻¹, Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲液 0.2 mol·L⁻¹),研磨制成 10% 匀浆。

2 生化指标测定 除 CPK 外其它指标均用 721 分光光度计(上海第三分析仪器厂),CPK 用美国产 Encore 100 型生化自动分析仪和 Baker 公司进口 CPK 试剂; Se-GSH-Px 活性用 DTNB 直接法⁽¹⁾; SOD 活性用邻苯三酚自氧化法⁽²⁾; MDA 含量用 TBA 显色法⁽³⁾; 蛋白定量用微量蛋白定量的 CBB-SDS 法⁽⁴⁾。

3 电镜观察 每组动物各取左室心尖部 1-2 mm³ 的 3 个组织块,按 Hoffstein 等方法⁽⁵⁾进行特定的 La(NO₃)₃ 示踪法操作,制电镜标本,在 JEM-100 CX 透射电镜下观察心肌细胞膜通透性及超微结构的变化,每块组织观察 10 张切片。

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间进行 *t* 检验处理。

RESULTS

Phe 对急性心肌缺血小鼠血清 CPK 的影响 缺血组血清 CPK 浓度较正常组增加 48.9% ($P < 0.05$), Phe 30 mg·kg⁻¹ 组和 15 mg·kg⁻¹ 组与缺血组相比分别降低 51.4% ($P < 0.01$)及 50.9% ($P < 0.01$),而两个剂量组间无明显差别 ($P > 0.05$)亦都低于正常组 ($P < 0.05$), Ver 组 CPK 浓度明显低于缺血组 ($P < 0.01$),接近正常组 ($P > 0.05$) (Tab 1)。

Phe 对急性心肌缺血小鼠血液及心肌 Se-GSH-Px 活性的影响 血液 Se-GSH-Px 活性(IU·ml⁻¹)缺血组与正常组相比降低 33.3% ($P < 0.05$), Phe 30 mg·kg⁻¹ 组和 15 mg·kg⁻¹ 组分别比缺血组增加 82.9% ($P < 0.01$)及 81.7% ($P < 0.01$),并高于正常组 ($P < 0.05$),两剂量间无差别 ($P > 0.05$), Ver 组明显高于缺血组 ($P < 0.01$),接近正常组 ($P > 0.05$) (Tab 1)。

心肌 Se-GSH-Px 活性(IU/mg protein)缺血组与正常组比较降低 41.2% ($P < 0.01$), Phe 30 mg·kg⁻¹, 15 mg·kg⁻¹ 剂量组分别比缺血组增加 70% ($P < 0.01$)及 60% ($P < 0.01$),接近正常组 ($P > 0.05$), Ver 组比缺血组增加 60% ($P < 0.01$),亦接近正常组 ($P > 0.05$)。

Phe 对急性心肌缺血小鼠的心肌 SOD 活性的影响 缺血心肌 SOD 活性与正常组相比降低 17% ($P < 0.05$), Phe 30 mg·kg⁻¹ 组和 Ver 组 SOD 活性比缺血组分别增加 18.8% 及 14.2% ($P < 0.05$),接近正常组 ($P > 0.05$),而 Phe 15 mg·kg⁻¹ 组与缺血组相比 $P > 0.05$,与 Phe 30 mg·kg⁻¹ 组相比 $P < 0.05$ (Tab 1)。

Tab 1. Effects of phenytoin sodium (Phe) on myocardial superoxide dismutase (SOD), Se-glutathione peroxidase (Se-GSH-Px), malondialdehyde (MDA), blood Se-GSH-Px activity, and serum creatine phosphokinase (CPK) during isoproterenol-induced myocardial ischemia in 17 mice. $\bar{x} \pm s$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs Iso.

mg · kg ⁻¹	CPK, U · L ⁻¹	Se-GSH-Px, U · ml ⁻¹	Se-GSH-Px, U / mg protein	SOD, U / mg protein	MDA, nmol / mg protein
Control	464 ± 140**	12.3 ± 2.9**	1.7 ± 0.3**	10.7 ± 1.7*	0.21 ± 0.06**
Iso	691 ± 157	8.2 ± 2.5	1.0 ± 0.3	8.8 ± 1.8	0.32 ± 0.05
Ver 3	475 ± 110**	13.8 ± 2.4**	1.6 ± 0.3**	10.0 ± 1.5**	0.20 ± 0.06**
Phe 30	336 ± 76**	15 ± 3**	1.7 ± 0.3**	10.4 ± 2.1*	0.18 ± 0.04**
Phe 15	339 ± 81**	14.9 ± 2.4**	1.6 ± 0.3**	8.8 ± 2.1*	0.21 ± 0.05**

Phe 对急性心肌缺血小鼠心肌组织脂质过氧化物含量的影响 缺血组心肌组织脂质过氧化物 MDA 含量高于正常组 1.5 倍 ($P < 0.01$)。Phe 不同剂量组及 Ver 组比缺血组分别降低 37.5%、43.8% 及 34.4% ($P < 0.01$)，接近正常组 ($P > 0.05$)。组间无明显差异 ($P > 0.05$) (Tab 1)。

Phe 对急性心肌缺血小鼠心肌超微结构的影响 正常组心肌细胞膜完整，铜颗粒沉积在细胞膜外，肌原纤维明暗带清晰，肌节大小一致，线粒体膜完整，基质均匀，嵴排列整齐，肌质网正常 (Plate 1, A)。缺血组心肌细胞水肿，肌丝排列松散，肌原纤维溶解，细胞膜及线粒体膜破裂，铜颗粒进入细胞内或线粒体内，沉积在后者的嵴上，线粒体极度肿胀，空泡化，嵴断裂、减少或消失，可见大脂滴，脂质网扩大，溶酶体增多及膜破裂 (Plate 1, B, C)。

Ver 组心肌超微结构改变比缺血组明显减轻，肌原纤维轻度溶解，细胞膜完整，铜颗粒沉积在细胞膜外，部分线粒体肿胀，嵴断裂，溶解，基质变淡 (Plate 2, D)。Phe 大剂量及小剂量组心肌超微结构改变比缺血组显著减轻，细胞膜完整，铜颗粒未进入细胞内，肌原纤维排列整齐，线粒体结构正常，基质均匀，嵴清楚，排列整齐，溶酶体膜完整，数量不多，肌质网正常 (Plate 2, E, F)。

DISCUSSION

本实验观察到 Ver 3 mg · kg⁻¹ 保护 Iso 引

起小鼠急性心肌缺血性损伤及抗脂质过氧化反应，降低缺血心肌 MDA 含量和保护 SOD 活性与文献^[10]相符。此外还发现 Ver 对 Se-GSH-Px 活性有较强保护作用。Phe 30 mg · kg⁻¹ 显著减轻 Iso 引起小鼠的心肌超微结构损伤，保护膜性结构，减少 CPK 释放，并保护缺血心肌 SOD、Se-GSH-Px 活性和抗脂质过氧化反应。提示 Phe 可防止自由基 (oxygen free radical, OFR) 的产生。Phe 15 mg · kg⁻¹ 虽对缺血心肌 SOD 活性无保护作用，但对 Se-GSH-Px 活性、MDA 含量及超微结构的影响与大剂量 Phe 相似。可能 Phe 主要通过保护 Se-GSH-Px 活性而防止膜结构发生脂质过氧化反应。按临床用量相比，Ver 是临床用量的 1/3，而 Phe 是临床用量的 1/8-1/6，其抗 OFR 作用与 Ver 相似，而对心肌超微结构的保护作用优于 Ver。

Iso 所致心肌细胞损伤的发病机制中，OFR 形成可能起决定作用^[11]。同时缺血心肌细胞内 Na⁺ 浓度明显升高^[12]，导致 Ca²⁺ 超负荷，并损伤心肌及功能^[13]。

本文 Phe 有关 OFR 的生化指标及心肌超微结构、血清 CPK 浓度变化基本一致，提示 Phe 可能通过膜稳定作用，抑制 Na⁺ 内流^[4]，抑制 Na⁺-Ca²⁺ 交换，降低细胞内 Ca²⁺ 负荷，或通过阻滞 Ca²⁺ 通道^[14] 而抑制 OFR 形成。保护 OFR 清除酶，防止脂质过氧化反应是保护缺血心肌损伤的机制。本文为临床治疗心

肌缺血合并心律失常提供了依据。

REFERENCES

1 Bigger JT Jr, Bassett AL, Hoffman BF. The electrophysiological effects of dipheylhydantoin on canine Purkinje fibers. *Circ Res* 1968; 22: 221-36.

2 Ekins BR, Watanabe AS. Acute digoxin poisonings, review of therapy. *Am J Hosp Pharm* 1978; 35: 268-77.

3 新疆医学院药理教研室. 氟氟与其它抗心律失常药对抗肾上腺素所致心律失常作用. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1976; 56: 561.

4 王晓雯, 郑慧琴, 周承明, 张克伟. 苯妥英钠对实验性心律失常和心肌缺血的预防作用. *Xinjiang Yixueyuan Xuebao* 1979; 1: 1-4.

5 Xia YM, Zhu LZ. The determination of glutathione peroxidase in blood and tissue-DTNB direct method. *J Hyg Res* 1987; 16(4): 29-33.

6 Zou GL, Gui XF, Zhong XL, Zhu RF. Improvements in pyrogallol autoxidation method for the determination of SOD activity. *Biochem Biophys* 1986; 4: 71-3.

7 陈顺志, 金有余, 李常博, 张增权. 过氧化脂质TBA显色的三种方法学比较. *J Clin Lab Tech* 1984; 2(4): 8-10.

8 Ye QL, Li WZ, Yang LL, Lin DX, Lin S, Chen Y, et al. The CBB-SDS method for quantitative micro-analysis of protein. *J Clin Lab Tech* 1986; 4: 120-1.

9 Hoffstein S, Gennaro DE, Fox AC, Hirsch J, Streuh F, Weissmann G. Colloidal lanthanum as a marker for impaired plasma membrane permeability in ischemic dog myocardium. *Am J Pathol* 1975; 79: 207-18.

10 Li YJ, Deng HW, Chen X. Prevention of lipid peroxidation and promotion of prostacyclin synthesis by verapamil in ischemic myocardium of rat. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1988; 2: 161-5.

11 Singal PK, Kapur N, Dhullon KS, Beamish RE, Dhalla NS. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60: 1390-7.

12 Grinwald PM. Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: Influence of extracellular sodium. *J Mol Cell Cardiol* 1982; 14: 359-65.

13 Tam M, Neely JR. Na⁺ Accumulation increases Ca²⁺ overload and impairs function in anoxic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 57-72.

14 Yatani A, Hamilton SL, Brown AM. Diphenylhydantoin blocks cardiac calcium channels and binds to the dihydropyridine receptor. *Circ Res* 1986; 59: 356-61.

《中国药理学报》1993年征订启事

《中国药理学报》由中国药理学会主办，国内外公开发行。本刊主要报道药理学研究原著，包括防治各种疾病的药物、计划生育药物、毒物和具有生物活性物质的疗效、毒性、代谢、作用原理、临床应用等。读者对象主要为药理学、毒理学、药学、医学和生物基础科学工作者。

本刊已成为美国科学引文索引 Science Citation Index 仅选录的中国九种期刊之一。美国 Current Contents / Life Sciences 仅选录了两种中国科技期刊——《中国科学》和《中国药理学报》。由于已被十几种著名检索系统收录，本刊信息反馈快，国际化程度高，本刊已被评为中国科协优秀学术期刊一等奖，中国科学院优秀学术期刊一等奖和1990—1991年度上海市优秀自然科学技术期刊。

本刊为双月刊，每期96页，用道林纸印刷。每期定价8.10元。国内读者请到当地邮局订阅，国内邮发代号：4-295；国外读者请向中国国际图书贸易公司（中国国际书店，北京339信箱）订阅，国外期刊代号：BM-388。本刊尚有1980年以来各期少数余本，欲购者可直接向编辑部函购，编辑部地址：200031上海市太原路294号。