

2-[对-(二甲氨基)苯乙烯]碘化甲基吡啶对缺血心肌的保护及抗氧化作用¹

张建林, 王晓雯, 周承明, 王雪飞, 潘秀琴, 张克锦

(新疆医学院基础部药理教研室, 乌鲁木齐 830054, 中国)

R 972

Cardioprotection of 2-[p-(dimethylamino)styryl]pyridine methiodide against ischemic damage and myocardial lipid peroxidation¹ZHANG Jian-Lin, WANG Xiao-Wen, ZHOU Cheng-Ming, WANG Xue-Fei, PAN Xiu-Qin², ZHANG Ke-Jin (Department of Pharmacology, Faculty of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT Mice were injected ip DSPM 1 or 3 mg·kg⁻¹ 3 h prior to a subcutaneous injection of isoproterenol (Iso) 20 mg·kg⁻¹ once daily for 2 d. Iso induced reductions of Se-glutathione peroxidase (Se-GSH-PX), superoxide dismutase (SOD) activities, and an increase of malondialdehyde (MDA) content in myocardium. DSPM 1 or 3 mg·kg⁻¹ significantly abated reduction of Se-GSH-PX activity and decreased MDA production and DSPM 3 mg·kg⁻¹ also abated reduction of SOD activity in the hearts from Iso-treated mice. The changes of above indices were in accordance with those of myocardial ultrastructure and creatine phosphokinase (CPK) concentration in serum. The results indicate that DSPM has a protective effect on myocardial ischemic injury probably by inhibiting oxygen free radicals and subsequent lipid peroxidation.

KEY WORDS pyridines; 2-[p-(dimethylamino)styryl]pyridine methiodide; isoproterenol; myocardium; ischemia; lipid peroxides; electron microscopy; verapamil

摘要 小鼠 ip 2-[对-(二甲氨基)苯乙烯]碘化甲基吡啶 (DSPM), 3 h 后 sc 异丙肾上腺素 (Iso) 20 mg·kg⁻¹ 每日一次, 共 2 d, 发现 DSPM 1, 3

mg·kg⁻¹ 能抑制 Iso 所致的心肌 Se-GSH-PX 活性降低和 MDA 生成, 3 mg·kg⁻¹ 能减轻 SOD 活性的降低, 上述指标与心肌超微结构和血清 CPK 浓度的变化基本一致, 提示 DSPM 可能通过抑制 O₂⁻ 的产生及其脂质过氧化反应而发挥心肌保护作用。

关键词 吡啶类; 2-[对-(二甲氨基)苯乙烯]碘化甲基吡啶; 异丙肾上腺素; 心肌; 缺血; 过氧化脂质类; 电子显微镜检查; 维拉帕米

2-[对-(二甲氨基)苯乙烯]碘化甲基吡啶 (2-[p-(dimethylamino)styryl]pyridine methiodide, DSPM) 系吡啶衍生物。本室曾发现 DSPM 具有钙拮抗剂和保护缺血心肌的作用⁽¹⁻³⁾。过量的 Iso 可引起梗死样心肌细胞损伤⁽⁴⁾。心肌缺血/再灌注损伤的病理过程中氧自由基 (oxygen free radical, OFR) 的产生及其毒性作用是一重要原因⁽⁵⁾。本文探讨了 DSPM 对 Iso 所致心肌缺血的保护及抗氧化作用。

MATERIALS AND METHODS

药品与试剂 DSPM, 上海试剂总厂产; 维拉帕米 (verapamil, Ver) 为 Orion (Finland) 产, CPK 试剂为美国 Baker 公司产品; 1,1,3,3-四乙氧基丙烷 (1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP) 为 Sigma 产品; 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 和考马斯亮蓝 (Coomassie brilliant blue, CBB) G 250 为 Fluka 产品。其余试剂均为国产 AR 级。

C₅₇BL/6J 小鼠 93 只, 雌雄兼用, 体重 22±2 g 随机分为 5 组。(1) 正常组 (n=17), 生理盐水 (NS) 40 ml·kg⁻¹ sc; (2) 缺血组 (n=20), NS 3 ml·kg⁻¹ ip, 3 h 后 sc Iso 20 mg·kg⁻¹; (3) Ver 组 (n=20), Ver 3 mg·kg⁻¹ ip, 2 h 后 sc Iso 20 mg·kg⁻¹; (4) 小剂量 DSPM 组 (n=17) 和 (5) 大剂量 DSPM 组

Received 1991-01-14 Accepted 1992-08-28

¹ Project supported by National Natural Science Foundation of China, No 85-605.² Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, China.

($n=19$), 分别 ip DSPM 1 和 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3 h 后 sc Iso $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. 以上各组每日一次, 共 2 d. 各组动物于 d 2 sc Iso 后 2 h 取血和心脏. 用 pH 7.0 磷酸缓冲液制成 10% (wt/vol) 心肌组织匀浆, $3000 \times g$ 离心 30 min, 取上清液备测.

生化指标测定 CPK 用美国 Encore 100 型生化自动分析仪测定; 超氧化物歧化酶(SOD)活性用邻苯三酚自氧化法⁽⁶⁾; 硒谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GSH-PX)活性用 DTNB 直接法⁽⁷⁾; 丙二醛(MDA)含量用 TBA 显色法⁽⁸⁾测定; 蛋白定量系用 CBB-SDS 法⁽⁹⁾.

电镜观察方法 取各组小鼠左心室心尖部 1-2 mm^3 组织块, 根据硝酸镉 $[\text{La}(\text{NO}_3)_3]$ 示踪法⁽¹⁰⁾处理标本, 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.

实验数据用 t 检验处理.

RESULTS

DSPM 对缺血心肌 CPK 释放的影响 缺血组血清 CPK 浓度明显高于正常组. 大剂量和小剂量 DSPM 组与缺血组比较 CPK 浓度均明显降低 ($P < 0.01$), 而两个剂量组间无显著差别 ($P > 0.05$). Ver 组 CPK 浓度也明显低于缺血组 ($P < 0.01$) (Tab 1).

DSPM 对氧自由基清除酶系统和脂质过氧化反应的影响 缺血组与正常组比较, 心肌 SOD 和 Se-GSH-PX 活性明显降低 ($P < 0.01$), MDA 含量显著增高 ($P < 0.01$). DSPM 1, $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均明显减轻缺血心肌 Se-GSH-PX 活性的降低程度和减少 MDA

生成 ($P < 0.01$), 其结果接近正常组 ($P > 0.05$). 大剂量 DSPM 组心肌 SOD 活性明显高于缺血组 ($P < 0.05$), 但低于正常组 ($P < 0.05$). 而小剂量 DSPM 组与缺血组相比, 心肌 SOD 无明显差别 ($P > 0.05$). Ver ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 保护缺血心肌 Se-GSH-PX, SOD 活性和减少 MDA 生成的作用与 DSPM ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 比较均较弱, 但两组间无显著差别 ($P > 0.05$). 各组全血中 Se-GSH-PX 活性改变与心肌组织中基本一致 (Tab 1).

DSPM 对缺血心肌超微结构的影响 正常组肌原纤维明暗带清晰, 肌小节长度均一. 肌质网正常. La 颗粒沉积在细胞膜外. 线粒体完整, 基质均匀, 嵴排列整齐 (Fig 1, Plate 1, A, B).

缺血组心肌细胞水肿, 肌丝排列松散, 肌原纤维溶解, 肌质网扩张. 细胞膜和线粒体膜破裂, La 颗粒进入细胞内或线粒体内, 沉积在嵴上或基质内. 线粒体极度肿胀, 基质密度降低, 空泡化, 嵴断裂, 减少或消失, 可见大脂滴 (Fig 1, Plate 1, C).

Ver 组心肌超微结构改变与缺血组比较损伤明显减轻. 肌原纤维轻度溶解. 细胞膜完整, La 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 (Fig 1, Plate 1, D). DSPM $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌超微结构的损伤明显轻于 Ver 组. 细胞膜完整, La 颗粒未进入细胞内. 线粒体结构正常. 个别线粒体微肿胀, 基质密度轻度降低 (Fig 1, Plate 1, E). DSPM $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组心肌损伤程度介于 Ver 和 DSPM $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组之间. 肌质网轻度扩张. 部分线粒体轻度肿胀, 基质变淡 (Fig 1, Plate 1, F).

Tab 1. Effects of DSPM on myocardial SOD, Se-GSH-PX, MDA, blood Se-GSH-PX, and serum CPK during isoproterenol-induced myocardial ischemia in mice. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs ischemia group.

	n	Se-GSH-PX, U / mg protein	SOD, U / mg protein	MDA, nmol / mg protein	Se-GSH-PX, U · ml ⁻¹	CPK, U · L ⁻¹
Normal	17	$1.75 \pm 0.04^{***}$	$11.6 \pm 1.63^{***}$	$0.16 \pm 0.04^{***}$	$12.7 \pm 2.11^{***}$	$428 \pm 108^{***}$
Ischemia	20	1.0 ± 0.32	8.6 ± 1.77	0.27 ± 0.08	9.4 ± 2.16	632 ± 109
Verapamil	20	$1.6 \pm 0.32^{***}$	$9.9 \pm 1.43^{**}$	$0.19 \pm 0.06^{***}$	$13.1 \pm 2.60^{***}$	$483 \pm 101^{***}$
DSPM ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	17	$1.7 \pm 0.37^{**}$	$9.4 \pm 2.08^*$	$0.18 \pm 0.05^{***}$	$13.8 \pm 2.06^{***}$	$462 \pm 88^{**}$
DSPM ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	19	$1.7 \pm 0.44^{***}$	$10.4 \pm 1.78^{**}$	$0.16 \pm 0.05^{***}$	$14.2 \pm 2.40^{***}$	$441 \pm 94^{**}$

DISCUSSION

本文观察到过量的 Iso 引起心肌严重损伤。La 颗粒进入细胞或线粒体内, 表明细胞膜和线粒体膜有损伤⁽¹⁰⁾。同时发现 Iso 引起内源性 OFR 清除剂 SOD、Se-GSH-PX 活性降低, 心肌 MDA 含量增加, 表明 Iso 所致的心肌损伤与 OFR 有关。

DSPM 可明显减轻 Iso 引起的心肌超微结构损伤, 减少 CPK 释放, 并具有保护缺血心肌 OFR 清除酶活性和抗脂质过氧化的作用。提示 DSPM 可防止 OFR 对心肌的损害。DSPM 对缺血心肌 Se-GSH-PX 活性的保护作用明显强于对 SOD 活性的保护作用。因此认为 DSPM 主要是通过保护缺血心肌 Se-GSH-PX 活性而阻止细胞膜性结构发生脂质过氧化反应。

本文结果显示 Ver 可降低缺血心肌 MDA 含量和保护 SOD、Se-GSH-PX 活性。在超微结构和生化指标上, DSPM 对缺血心肌的保护作用较同等剂量的 Ver 强。电镜结果显示 Ver 与 DSPM 对细胞膜作用相似, 但对线粒体的保护作用后者较强。

最近研究表明⁽¹¹⁾, Iso 的心肌细胞毒性作用主要是由于 Iso 自动氧化过程中所产生的 OFR 而造成的。本文有关 OFR 的指标与心肌超微结构、血清 CPK 浓度的变化基本一致, 推测 DSPM 保护 OFR 清除酶的活性, 阻止膜脂质过氧化可能是其抗心肌缺血损伤的重要因素。

REFERENCES

- 1 Zhou CM, Zhang KJ, Wang XW, Bai L, Mao XM. Effects of 2-[p-(dimethylamino)styryl]pyridine methiodide on mouse and rabbit hearts. *Acta Pharmacol Sin* 1980; 10 : 239-41.
- 2 Li DM, Zhou CM, Wang XW, Zhang KJ. Effects of

2-[p-(dimethylamino)styryl]pyridine methiodide on action potentials of sinoatrial node cells of rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 336-9.

- 3 Wei Y, Zhou CM, Wang XW, Wang XF, Zhang KJ. Protective effect of 2-[p-(dimethylamino)styryl]pyridine methiodide on acute experimental myocardial ischemia. *Acta Pharm Sin* 1990; 25 : 807-10.
- 4 Kim H-D, Rah B-J. Effects of diltiazem on isoproterenol- or Ca²⁺-induced ventricular myocardial cell injuries in isolated perfused rabbit heart: An electron microscopic study. *Anat Rec* 1988; 222 : 260-71.
- 5 Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: Friend and 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.
- 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 夏奕明, 朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法: I. DTNB 直接法. *卫生研究* 1987; 16 (4) : 29-33.
- 8 Yagi K. Determination of lipid peroxides. *Rinsho Kensa* 1979; 23(2) : 115-20.
- 9 Macart M, Gerbaut L. An improvement of the coomassie blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins: application to cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 1982; 122 : 93-101.
- 10 Hoffstein S, Gennaro DE, Fox AC, Hirsch J, STreuli F, Weissmann G. Colloidal Lanthanum as a marker for impaired plasma membrane permeability in ischemic dog myocardium. *Am J Pathol* 1975; 79 : 207-18.
- 11 Persoon-Rothert M, van der Valk-Kokshoorn EJM, Egas-Kenniphaas JM, Mauve I, van der Laarse A. Isoproterenol-induced cytotoxicity in neonatal rat heart cell cultures is mediated by free radical formation. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21 : 1285-91.