

# 白藜芦醇预适应对心脏骤停后大鼠心脏功能的影响\*

张海宏<sup>1</sup>, 曹钰<sup>1</sup>, 曾智<sup>2</sup>

1. 四川大学华西医院 急诊科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 心脏内科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 通过研究心脏骤停后自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC)后大鼠血流动力学和心肌组织硝化应激,探讨白藜芦醇预适应对 ROSC 后大鼠心脏功能的影响及其可能的机制。方法 SD 大鼠采用经食道交流电刺激致颤的方法诱发心脏骤停,诱发前 15 min 给予干预。获得 ROSC 的大鼠分为溶剂对照组(不给予药物干预,只给予等体积溶剂),白藜芦醇 2.3 mg/kg、0.23 mg/kg、0.023 mg/kg 干预组,并设假手术组(不诱发心脏骤停),分别于 ROSC 后 0.5 h、1.0 h、2.0 h、3.0 h 和 4.0 h 监测血流动力学指标,于 ROSC 后 4 h 处死实验动物,测定心肌组织诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)蛋白表达、心肌组织过氧化亚硝酸盐水平和心肌组织硝基酪氨酸含量。结果 ①采用经食道交流电刺激法诱发心脏骤停成功率 100%,总的 ROSC 率 72.7%。白藜芦醇组大鼠 ROSC 率无显著提高。②各干预组 ROSC 后早期心率、血压下降,随后心率逐渐上升,接近基线值,血压仍进行性下降。白藜芦醇对血压、心率无显著影响。③ROSC 后各组心功能呈下降趋势,白藜芦醇可明显改善心脏功能,其中白藜芦醇 0.23 mg/kg 和 0.023 mg/kg 组改善最显著。④ROSC 后心肌 iNOS 表达、过氧化亚硝酸盐含量、硝基酪氨酸含量明显升高,白藜芦醇组明显下降,低浓度组较高浓度组更明显。结论 ROSC 后大鼠心脏功能下降,白藜芦醇干预后心脏功能明显改善,此效应可能与其抑制心肌硝化应激有关。

**【关键词】** 心脏骤停 肺复苏 白藜芦醇 硝化应激

**Effect of Resveratrol Preconditioning on Myocardial Dysfunction after Cardiac Arrest in Rats** ZHANG Hai-hong<sup>1</sup>, CAO Yu<sup>1</sup>, ZENG Zhi<sup>2</sup>. 1. Department of Emergency, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the protective effects and its potential mechanism of resveratrol preconditioning on rat cardiac arrest after return of spontaneous circulation (ROSC) with the study of hemodynamic parameters and nitrative stress in myocardium. **Methods** Cardiac arrest SPF SD rat model was established by transoesophageal cardiac alternating current stimulation. Intervention was implemented 15 min before cardiac arrest. Twenty four rats with ROSC after cardiac arrest were randomly assigned into five groups: vehicle, sham, resveratrol 2.3 mg/kg (A group), resveratrol 0.23 mg/kg (B group) and resveratrol 0.023 mg/kg (C group). Heart rate, mean arterial pressure, and left ventricular variables (+dp/dtmax and -dp/dtmin) were recorded in 0.5 h, 1.0 h, 2.0 h, 3.0 h, and 4.0 h respectively. Rats were sacrificed at 4 h after ROSC, and hearts were removed for determining expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein, myocardial peroxynitrite, and nitrotyrosine. **Results** Global ROSC rate was 72.7% after the induction of cardiac arrest. Resveratrol preconditioning did not improve ROSC rate significantly. Heart rate and blood pressure declined at early phase of ROSC, then heart rate recovered to the baseline value, but blood pressure still declined progressively. There were no significant differences between resveratrol groups and vehicle group. Myocardial function worsened progressively even after ROSC. Resveratrol improved cardiac function significantly, especially in lower concentration groups. Myocardial iNOS expression, peroxynitrite, and nitrotyrosine content increased significantly after ROSC. Resveratrol decreased these products significantly, and lower concentration groups did better. **Conclusion** Resveratrol preconditioning could improve cardiac dysfunction after ROSC, which may be associated with its inhibitory effect on nitrative stress.

**【Key words】** Cardiac arrest Cardiopulmonary resuscitation Resveratrol Nitrative stress

心脏骤停是严重威胁人类健康的社会事件,每

年我国高达 544 000 人出现心脏骤停<sup>[1]</sup>。心肺复苏技术不断完善,初次自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC)率不断提高,但

\* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2013SZ0061)资助

ROSC 后总的死亡率仍高达 70%, 不到 10% 的患者可生存出院<sup>[2]</sup>。如何提高复苏后患者的生存率, 改善长期预后是一个临床难题, 也是目前研究的热点。ROSC 后机体发生复杂的病理生理过程, 即心脏骤停后综合征 (post cardiac arrest syndrome, PCAS), 其中心脏骤停后心功能不全是 PCAS 的重要组成部分, 与 ROSC 后早期高死亡率密切相关<sup>[3]</sup>。目前多数研究认为, 心脏骤停后心功能不全涉及儿茶酚胺暴发、氧自由基生成、炎症反应等许多机制, 但具体病理生理机制尚不清楚。

硝化应激是一种蛋白质的氧化修饰, 由体内活性氮族 (reactive nitrogen species, RNS) 与活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 发生的生物化学反应。近年来研究发现硝化应激在多种心血管疾病如动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤、心力衰竭等的发生发展中发挥重要的作用。ROSC 后大量的氧自由基生成, 易与局部产生的 NO 发生硝化应激反应<sup>[4]</sup>。ROSC 早期诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达逐渐升高, 引起 NO 病理性增加, 为硝化应激创造了有利的基础<sup>[5]</sup>。ROSC 后心脏功能不全是否有心肌硝化应激的参与, 是否可通过减轻硝化应激来改善心脏功能, 目前尚不清楚。

心肺复苏后的治疗是目前的研究热点之一。虽然一些药物初期试验中得到了满意的结果, 但缺少临床研究的证实, 尚无一种药物有明确的临床疗效。白藜芦醇是一种非黄酮类的酚类物质。目前研究发现白藜芦醇在多种心血管疾病中有保护作用, 如心力衰竭、心肌缺血、动脉粥样硬化等, 同时白藜芦醇具有多种有益的生物效应, 包括改善心肌缺血再灌注损伤, 具有缺血预适应的心脏保护作用, 但都限于局部心肌缺血的研究, 尚无在心脏骤停中的研究<sup>[6,7]</sup>。本实验旨在通过观察白藜芦醇预适应对 ROSC 后大鼠心脏功能的影响, 初步探讨其作用机制, 预测白藜芦醇在心肺复苏后治疗中的价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 (12~14 周龄, 体质量 350~400 g), 由四川达硕生物科技有限公司提供 [合格证号: SCXK(川)2013-24], 实验通过四川大学动物伦理委员会审核。动物饲养于四川大学实验动物中心, 分笼饲养, 每笼 5 只, 室温为 (20±2) °C, 相对湿度 40%~60%, 实验前适应性饲养 1 周, 明暗周期 12 h, 自由进食、水。实验前夜不

喂食, 但是不限制饮水。

**1.1.2 药品、主要试剂和仪器** 白藜芦醇 (Sigma) 100 mg 溶解于 1 mL DMSO 溶液中, 形成白藜芦醇储存液 (100 mg/mL), 锡箔纸封装后 -20 °C 避光保存备用, 使用前用无菌注射用水稀释, 最终 DMSO 注射量 ≤ 100 μL/kg。羊抗兔 IgG 抗体, 羊抗鼠 IgG 抗体 (北京中杉生物技术有限公司); Anti-iNOS 抗体 (Abcam); Nitrotyrosine ELISA 试剂盒 (Chemiluminescence Detection kit, Millipore); Anti-Nitrotyrosine 抗体 (Bioworld)。其他试剂为分析纯试剂。Olympus 倒置相差显微镜、Leica 石蜡包埋机和组织切片机、小动物呼吸机 HX-100E、BL-420F 生物机能实验系统/生物信号采集与分析系统/多道生理记录仪 (成都泰盟软件有限公司), 酶标仪 (BioTek Quant TM), 电泳仪 (Bio-Rad) 等。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 心脏骤停后心肺复苏动物模型的建立** 采用经食道交流电刺激致颤的方法诱发心脏骤停。腹腔内注射戊巴比妥 45 mg/kg 进行麻醉, 之后每小时给予 15 mg/kg 维持麻醉。麻醉满意后固定大鼠于鼠板上, 白炽加热灯照射保持操作面温度 (38±0.5) °C。行气管切开, 小动物呼吸机进行辅助通气, 潮气量为 6.0 mL/kg, 呼吸频率为 80 次/min, 给氧浓度为 21%, 上肢及左下肢皮下插入探针记录标准 II 导联心电图。右侧股动脉置管监测血压, 右侧股静脉置管用于注射药物, 右颈总动脉置入 PE-50 导管, 观察换能器动脉波形, 如出现典型的左室内压力波形时, 固定导管稳妥。将双极起搏电极导线经口插入大鼠食管, 深约 5 cm, 无明显呼吸急促、喘憋为置入成功, 将电极导线与换能器相连。动物稳定 30 min, 电刺激前 15 min 静脉注射白藜芦醇溶液或相同体积的溶剂。电刺激参数为频率 50 Hz、能量 6 mA、波宽 10 ms, 电刺激开始时停止机械通气, 持续电刺激 180 s 后停止电刺激, 维持心脏骤停 6 min, 动脉收缩压下降至 25 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) 以下, 开始心肺复苏。小动物自动胸外按压器进行持续心脏按压, 同时动物呼吸机辅助通气, 给氧浓度 100%。如为室颤心律, 给予 4 J/kg 电击除颤。如 60 s 内未恢复自主心律, 肾上腺素 (20 μg/kg) 静脉注射, 每 3 min 1 次, 直至复苏成功或终止为止。ROSC 的标准为: 恢复自主心律, 平均动脉压 (MAP) ≥ 60 mmHg, 并维持 10 min 以上。如心肺复苏 10 min 未获得 ROSC, 或 ROSC 不能维持 30 min 以上者, 视动物死亡, 不纳入本研

究。各组 ROSC 率(%)=获得 ROSC 动物数/诱发心脏骤停动物总数 $\times$ 100%。

**1.2.2 实验分组** 假手术组(sham 组):大鼠不诱发心脏骤停,只进行相关外科操作( $n=3$ )。获得 ROSC 大鼠 24 只,随机分为 4 组,分别为溶剂对照组(不给予药物干预,只给予等体积溶剂)(vehicle 组)、白藜芦醇 2.3 mg/kg(A)、0.23 mg/kg(B)、0.023 mg/kg(C)组,每组 6 只大鼠。各组大鼠分别在 ROSC 后 0.5 h、1.0 h、2.0 h、3.0 h、4.0 h 进行血流动力学监测[包括心率、MAP、左心室功能参数即左室内压最大上升速率(+dp/dtmax)、左室内压最大下降速率(-dp/dtmin)],于 ROSC 后 4 h 处死动物,取出心脏,选择左心室心肌组织,进行免疫组化检测的组织用 4%(体积分数)多聚甲醛固定,室温保存,其余组织冻存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱以备后续试验。

**1.2.3 心肌组织 iNOS 蛋白表达检测** 采用常规 Western blot 法检测心肌组织 iNOS 的表达水平。取 $-80^{\circ}\text{C}$ 蛋白样品适量,在电泳槽中进行电泳,每泳道上总蛋白质量为 30  $\mu\text{g}$ ,其余泳道用标准蛋白质分子量 marker 填充。依据凝胶的大小剪取 PVDF 膜。PVDF 膜、转膜用滤纸在转膜缓冲液中浸泡数分钟后组装转膜“三明治”。转膜结束后取出 PVDF 膜,剪掉右上角以标记正反面。置于 5%脱脂奶粉的封闭液中, $37^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h。加入一抗于 $4^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。再加入带有辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。按显色试剂盒说明 1:1 混匀 A 液和 B 液,避光均匀覆盖在 PVDF 膜上。采用凝胶成像分析仪采集图像,使用 Quantity One 软件对蛋白条带进行半定量分析。以目的蛋白与内参蛋白光密度的比值作为目的蛋白的相对表达量。

**1.2.4 心肌组织过氧化亚硝酸盐含量检测** 分离 30 mg 左心室心肌组织,将心肌组织匀浆,离心收集上清,并用 BCA 法进行蛋白定量,用竞争性 ELISA 化学发光法检测心肌组织过氧化亚硝酸盐水平。具体方法依照厂家说明书进行。在酶标仪上测定各孔发光强度(用相对发光单位 RLU 表示)。绘制标准曲线,计算各孔过氧化亚硝酸盐( $\text{ONOO}^-$ )水平,结果以 nmol/g 蛋白表示。

**1.2.5 心肌组织硝基酪氨酸检测** 采用免疫组织化学检测心肌组织硝基酪氨酸。简要步骤:程序性脱蜡、水化后封闭内源性过氧化物酶,切片放入 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲溶液(pH6.0)后,在微波炉里高火至沸腾后,再低火加热约 6 min,室温下冷却。组织滴入 5%羊血清(与二抗来源一致)后放入

湿盒中,室温 30 min。甩去切片上的羊血清,加入已稀释的一抗(1:250、1:500、1:1000)后,放入湿盒中室温下 1 h,然后 $4^{\circ}\text{C}$ 过夜。 $37^{\circ}\text{C}$ 复温 45 min,将一抗倒掉后加入已稀释的二抗, $37^{\circ}\text{C}$ 下 30 min(回收)。加入 DAPI(快速滴入),显色时间控制在约 10 min。最后用甘油封片。倒置相差显微镜下观察,中心肌细胞核呈蓝色,绿色代表心肌细胞胞浆里硝基酪氨酸。

### 1.3 统计学方法

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组之间比较采用单因素方差分析,LSD、SNK 法进行两两比较。计数资料采用率或构成比表示,采用卡方检验、确切概率法进行组间比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 白藜芦醇对大鼠 ROSC 率的影响

采用经食道交流电刺激法诱发心脏骤停成功率 100%,总的 ROSC 率 72.7%。Vehicle 组,白藜芦醇 2.3 mg/kg、0.23 mg/kg、0.023 mg/kg 组 ROSC 率分别为 54.5%(6/11)、60%(6/10)、85%(6/7)、75%(6/8),白藜芦醇各组与 vehicle 组比较,大鼠 ROSC 率有提高,但差异无统计学意义,白藜芦醇各浓度组间差异也无统计学意义。

### 2.2 白藜芦醇对 ROSC 后大鼠血流动力学的影响

本研究中,各组大鼠电刺激前基线血流动力学参数差异均无统计学意义。

#### 2.2.1 白藜芦醇对 ROSC 后大鼠心率的影响

ROSC 后 0.5 h 各干预组心率值下降,与 sham 组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。ROSC 后 1.0 h 各组心率值开始升高,ROSC 后 2.0 h、3.0 h、4.0 h 各组心率值与同时点 sham 组比较,差异无统计学意义。同组内动态观察,各组在 ROSC 后 0.5 h 心率明显下降,其中 vehicle、B、C 组此时点与基线值比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),A 组此时点绝对值下降,ROSC 后 1.0 h 心率逐渐加快,但这两个时点与基线值比较,差异无统计学意义。见表 1。

#### 2.2.2 白藜芦醇对 ROSC 后大鼠 MAP 的影响

ROSC 后 0.5~3.0 h,各干预组 MAP 呈逐渐下降的趋势,ROSC 后 4 h 有所回升,与同时点 sham 组及同组内基线值比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),但各干预组之间差异无统计学意义,见表 2。

#### 2.2.3 白藜芦醇对 ROSC 后大鼠左心室功能的影响

各干预组左心室功能(+dp/dtmax 和 -dp/dtmin)从 ROSC 后 0.5~4 h 呈逐渐下降趋势。与

vehicle 组比较,白藜芦醇组(A~C组)的+dp/dtmax和-dp/dtmin升高( $P<0.05$ )。A~C组之间比较,B、C组较A组左心室功能(+dp/dtmax和-dp/dtmin)改善较明显,其中+dp/dtmax在

ROSC后1.0~4.0h差异有统计学意义( $P<0.05$ ),-dp/dtmin在ROSC后2.0~4.0h差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而B与C两组间差异无统计学意义,见表3、表4。

表 1 各组大鼠心率比较(次/min)

Table 1 Heart rates of rats in all groups (beats/min)

Time	Sham group (n=3)	Vehicle group (n=6)	A group (n=6)	B group (n=6)	C group (n=6)
Baseline	415.67±18.02	420.67±10.52	410.00±21.24	415.67±37.14	403.67±16.79
ROSC 0.5 h	422.67±11.24	369.17±28.30*△	369.50±47.38*	342.67±30.68*△	345.50±32.08*△
ROSC 1.0 h	418.00±4.94	387.33±41.21	384.17±43.53	363.33±46.91*△	370.83±37.86*
ROSC 2.0 h	415.83±12.38	404.00±35.15	392.00±44.52	378.83±47.37	406.00±50.18
ROSC 3.0 h	411.67±9.56	385.83±41.46	384.00±40.21	383.83±47.15	398.67±46.02
ROSC 4.0 h	419.67±12.63	392.83±22.85	403.33±44.93	387.83±30.28	410.00±48.23

\*  $P<0.05$ , vs. sham group at the same time point; △ $P<0.05$ , vs. baseline in the same group

表 2 各组大鼠平均动脉压比较(mmHg)

Table 2 Mean arterial pressures (MAP) of rats in all groups (mmHg)

Time	Sham group (n=3)	Vehicle group (n=6)	A group (n=6)	B group (n=6)	C group (n=6)
Baseline	139.43±2.88	140.96±6.47	140.53±2.82	141.23±6.15	135.16±5.45
ROSC 0.5 h	139.19±6.71	110.78±9.26*△	116.80±15.32*△	108.04±9.77*△	117.78±8.78*△
ROSC 1.0 h	138.13±7.68	104.20±10.96*△	104.95±8.48*△	103.30±7.64*△	108.88±9.00*△
ROSC 2.0 h	138.01±4.85	104.54±9.90*△	100.11±15.54*△	99.60±10.67*△	102.35±8.75*△
ROSC 3.0 h	138.79±3.11	92.10±8.97*△	97.30±8.97*△	97.28±17.23*△	100.84±8.60*△
ROSC 4.0 h	138.73±2.20	95.16±8.21*△	102.10±10.42*△	101.26±20.62*△	101.26±11.77*△

\*  $P<0.05$ , vs. sham group at the same time point; △ $P<0.05$ , vs. baseline in the same group. 1 mmHg=0.133 kPa

表 3 各组大鼠左心室收缩功能的比较(+dp/dtmax)

Table 3 Left ventricular systolic function of rats in all groups(+dp/dtmax)

Time	Sham group (n=3)	Vehicle group (n=6)	A group (n=6)	B group (n=6)	C group (n=6)
Baseline	6 068.33±417.68	6 063.33±311.49	6 070.00±468.70	6 076.67±186.73	6 086.67±183.16
ROSC 0.5 h	6 053.33±153.58	4 278.33±141.90*△	4 783.33±172.94*§△	4 915.00±166.46*§△	4 833.33±161.95*§△
ROSC 1.0 h	6 071.67±185.30	3 910.00±110.09*△	4 353.33±126.75*§△	4 780.00±138.28*§△#	4 645.00±196.75*§△#
ROSC 2.0 h	6 010.00±262.15	3 340.00±234.86*△	3 808.33±129.06*§△	4 233.33±154.36*§△#	4 143.33±160.21*§△#
ROSC 3.0 h	6 031.67±145.25	3 176.67±84.54*△	3 575.00±158.71*§△	4 013.33±195.11*§△#	3 970.00±139.00*§△#
ROSC 4.0 h	6 095.00±295.96	3 103.33±76.33*△	3 396.67±151.75*§△	3 840.00±160.00*§△#	3 785.00±122.43*§△#

\*  $P<0.05$ , vs. sham group at the same time point; § $P<0.05$ , vs. vehicle group at the same time point; # $P<0.05$ , vs. A group at the same time point; △ $P<0.05$ , vs. baseline in the same group

表 4 各组大鼠左心室舒张功能的比较(-dp/dtmin)

Table 4 Left ventricular diastolic function of rats in all groups(-dp/dtmin)

Time	Sham group (n=3)	Vehicle group (n=6)	A group (n=6)	B group (n=6)	C group (n=6)
Baseline	4 770.00±182.98	4 761.67±154.07	4 806.67±278.90	4 805.00±198.47	4 788.33±183.78
ROSC 0.5 h	4 795.00±391.80	3 318.33±110.53*△	3 711.67±181.70*§△	3 733.33±132.01*§△	3 761.67±135.71*§△
ROSC 1.0 h	4 700.00±287.82	3 268.33±128.28*△	3 481.67±147.70*§△	3 678.33±125.76*§△	3 685.00±130.04*§△
ROSC 2.0 h	4 723.33±171.66	2 955.00±104.26*△	3 205.00±134.87*§△	3 413.33±85.24*§△#	3 418.33±116.18*§△#
ROSC 3.0 h	4 856.67±343.55	2 690.00±89.22*△	2 911.67±160.80*§△	3 143.33±96.68*§△#	3 121.67±65.24*§△#
ROSC 4.0 h	4 810.00±262.68	2 496.67±91.58*△	2 715.00±163.55*§△	2 935.00±120.46*§△#	2 946.67±99.33*§△#

\*  $P<0.05$ , vs. sham group at the same time point; § $P<0.05$ , vs. vehicle group at the same time point; # $P<0.05$ , vs. A group; △ $P<0.05$ , vs. baseline in the same group

### 2.3 白藜芦醇对 ROSC 后大鼠心肌组织 iNOS 表达的影响

Vehicle 组心肌组织 iNOS 表达较 sham 组升高( $P<0.05$ ),白藜芦醇干预后 iNOS 表达较 vehicle 组减少( $P<0.05$ ),与 sham 组比较,差异无统计学意义。其中 B、C 组减少更显著,与 A 组比较,差异

均有统计学意义( $P<0.05$ ),但 B、C 组间差异无统计学意义。见图 1。

### 2.4 白藜芦醇对 ROSC 后心肌组织 ONOO<sup>-</sup>含量的影响

Vehicle 组心肌组织 ONOO<sup>-</sup>含量较 sham 组升高( $P<0.05$ )。白藜芦醇干预后心肌组织 ONOO<sup>-</sup>

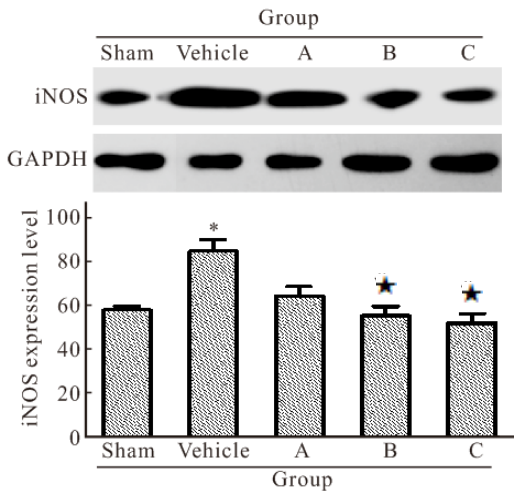


图 1 心肌组织 iNOS 表达量

Fig 1 Expression of iNOS levels in myocardial tissues

\*  $P < 0.05$ , vs. other groups; ★  $P < 0.05$ , vs. A group

含量较 vehicle 组减少 ( $P < 0.05$ ),但仍高于 sham 组 ( $P < 0.05$ )。在各干预组之间,B、C 组  $\text{ONOO}^-$  含量减少更显著,与 A 组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),但 B、C 组之间差异无统计学意义。见图 2。

## 2.5 白藜芦醇对 ROSC 后心肌组织硝基酪氨酸含量的影响

Sham 组心肌组织硝基酪氨酸含量很少,vehicle 组的硝基酪氨酸含量较 sham 组明显增加。白藜芦醇干预后硝基酪氨酸含量较 vehicle 组明显下降,B、C 组较 A 组硝基酪氨酸含量较少,但 B、C 组之间无明显差别,见图 3。

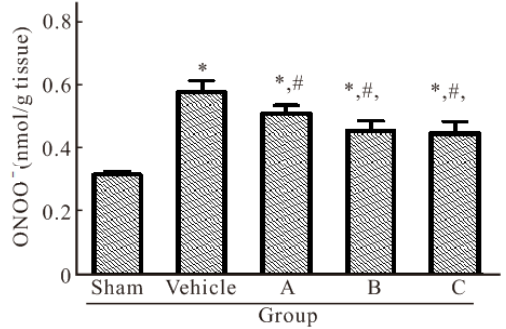


图 2 心肌组织过氧化亚硝酸盐 ( $\text{ONOO}^-$ ) 含量

Fig 2 Peroxidenitrite levels in myocardial tissues

\*  $P < 0.05$ , vs. sham group; #  $P < 0.05$ , vs. vehicle group; ★  $P < 0.05$ , vs. A group

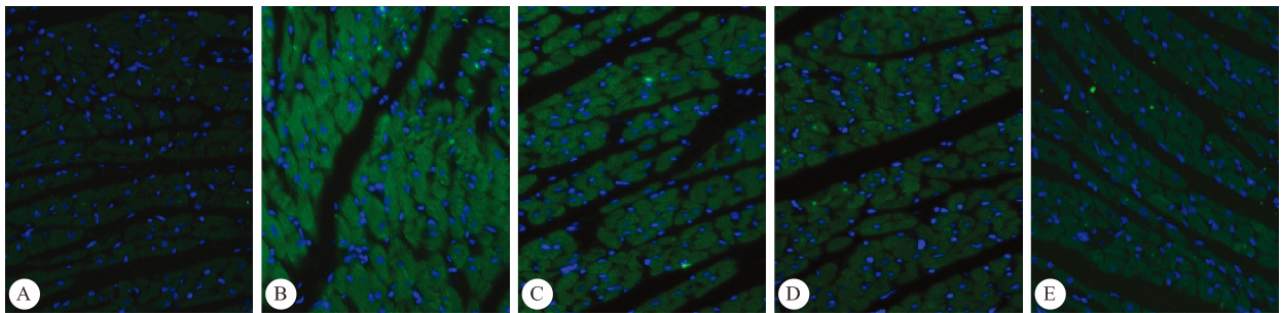


图 3 各组心肌组织硝基酪氨酸表达。倒置相差显微镜  $\times 400$

Fig 3 Expression of nitrotyrosine in myocardial tissues. Inverted phase contrast microscope  $\times 400$

In these pictures myocardial cell nucleuses are blue, and nitrotyrosine in the myocardium is green. A: Sham group; B: Vehicle group; C: Resveratrol 2.3 mg/kg group; D: Resveratrol 0.23 mg/kg; E: Rev 0.023 mg/kg group

## 3 讨论

本实验中 ROSC 后早期心率、血压下降,随后心率逐渐恢复,而血压进行性下降,与以往一些研究不尽一致。有的研究中 ROSC 后早期心率加快、血压正常或升高,随后心率逐渐回归至基线,血压迅速下降至基线以下<sup>[8,9]</sup>;而有的研究中,ROSC 后早期心率、平均动脉压下降,随后心率逐渐回升,平均动脉压逐渐回升或持续性下降<sup>[10]</sup>。造成结果不一致的原因可能与研究对象、动物模型等不同有关。ROSC 后早期细胞内外  $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  的重分布,

引起窦房结细胞膜动作电位的变化,细胞膜超极化,可导致兴奋细胞自律性的改变,后期随着促炎因子逐渐下降,心率逐渐回归基线。而血压的变化受心肌收缩力、外周血管阻力和循环容量等多因素的影响,本研究中复苏后动物的心脏功能持续下降,是导致血压进行性下降的主要原因,此外本研究中未给予持续液体支持也可能是原因之一。

本实验中白藜芦醇对心肺复苏后心率和血压的影响较小。既往研究中白藜芦醇对血压的影响,大多为慢性口服药物干预,且至少 10 mg/kg 使用 4 周才会看到血压的明显变化,白藜芦醇急性给药时

的血压影响并无专门报道,也无白藜芦醇对心肺复苏后血流动力学影响的研究。Hung等<sup>[6]</sup>在心肌梗死动物模型中,静脉注射 $2.3 \times 10^{-5}$  g/kg白藜芦醇,在再灌注后血压和心率无明显变化,该浓度与本实验中B组一致。既往研究发现白藜芦醇可增加NO生物利用度,同时抑制血管收缩的因子(如内皮素-1等)表达<sup>[11]</sup>,但药物半衰期较短,静脉弹丸式注射对血压影响较小。

既往研究发现ROSC后30 min心功能不全已出现,8 h达到最低点,24 h左右开始恢复<sup>[12,13]</sup>,与本实验中发现一致。本实验中白藜芦醇干预后,ROSC后大鼠的心脏功能较vehicle组明显改善,此结果以往尚无报道。既往研究发现白藜芦醇具有预适应效应,但只是针对局部心肌缺血再灌注损伤的动物模型,本实验结果提示白藜芦醇在整体缺血再灌注损伤中也具备类似的保护效应。本实验中较低浓度白藜芦醇(0.23 mg/kg、0.023 mg/kg)与较高浓度(2.3 mg/kg)比较,对心脏的保护效应更明显。白藜芦醇的生物学效应与研究的器官、给药方式等有关,尤其与剂量或浓度关系很大,具有毒物兴奋性(hormesis),即低剂量(5~20  $\mu$ mol/L)时改善心脏功能,发挥心脏保护作用;而高剂量时(10~40 mmol/L)则表现为促凋亡效应,诱导肿瘤细胞的凋亡,同时也抑制细胞增殖和心脏功能。但目前具体的界限并不明确,口服和静脉用药的剂量对比也不一致。白藜芦醇具有这种毒物兴奋性的具体机制尚不清楚,可能与其存在差别化的氧化还原反应循环有关<sup>[14]</sup>。本实验中较低浓度0.23 mg/kg、0.023 mg/kg,如果考虑动物的血容量100 mL/kg,血药浓度分别为10  $\mu$ mol/L、1  $\mu$ mol/L,这与以往研究多采用10  $\mu$ mol/L作为有效保护浓度一致<sup>[15,16]</sup>。本实验未纳入更低浓度进行研究,但在Hung等<sup>[6]</sup>研究中 $2.3 \times 10^{-7}$  g/kg白藜芦醇仍能改善心肌梗死后心脏功能,可能其体内分布有心肌选择性,血药浓度不能完全反映心肌组织中的药物浓度,在心脏骤停动物模型是否有类似效应尚需今后进一步证实。

本实验发现,ROSC后心肌组织iNOS、过氧化亚硝酸盐及硝基酪氨酸盐含量明显升高,这与Han等<sup>[17]</sup>研究一致,在其研究中,心脏骤停中和复苏后早期即有NO和 $O_2^-$ 的明显升高,伴随过氧化亚硝酸盐的生成增加,以及线粒体蛋白的硝基酪氨酸盐含量增加。本实验中白藜芦醇干预后,心肌组织iNOS、过氧化亚硝酸盐及硝基酪氨酸盐含量均明显

下降,且低浓度保护效应更强,提示白藜芦醇对ROSC后心肌硝化应激反应有明显抑制效应。

目前认为内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)对保护心肌缺血再灌注损伤有益,而iNOS合成的过量NO有损害心脏功能效应<sup>[18]</sup>。有研究发现心脏骤停时eNOS明显下降,而iNOS呈逐渐升高的趋势<sup>[5]</sup>,与本实验发现一致。Maréchal等<sup>[19]</sup>研究发现,iNOS氧化域浓度与过氧亚硝酸盐的沉积率呈线性正相关,且pH越低,此效应越明显,与本研究中iNOS和过氧化亚硝酸盐变化趋势一致的结果相吻合。本研究中iNOS及硝化产物表达较高的心脏功能较差,表达较低的则心脏功能较好,这与以往研究成果一致<sup>[20]</sup>。Tao等<sup>[21]</sup>发现在局部心肌缺血再灌注模型中,再灌注后心肌组织iNOS、过氧亚硝酸盐浓度升高,心脏功能下降,脂联素干预后iNOS表达降低,改善了再灌注后心脏功能。提示心肌硝化应激是ROSC后心脏功能不全的重要机制之一。

本研究发现白藜芦醇干预措施可明显减轻ROSC后心肌组织硝化应激,这在以往研究尚无报道。Hung等<sup>[22]</sup>发现在局部心肌缺血再灌注损伤模型中,再灌注后iNOS明显升高,白藜芦醇干预后iNOS表达下降,加入非特异性NOS抑制剂(L-NAME)可抵消白藜芦醇的保护效应,而加入iNOS抑制剂后无影响。Mokni等<sup>[23]</sup>在离体心脏缺血再灌注损伤模型中,腹腔注射白藜芦醇后发现NO并无明显升高,认为与腹腔注射吸收率低(1/500~1/1 000),药物半衰期短(10~15 min),药物利用度较低;白藜芦醇上调eNOS,同时下调iNOS表达,导致NO的总量未出现明显变化有关。无论白藜芦醇是否影响NO总量的表达,这些研究都提示白藜芦醇有抑制NO过度表达以及双向调节eNOS和iNOS的作用。也有一些研究与前述存在争议。Hattori等<sup>[24]</sup>研究中,iNOS抑制剂可阻断白藜芦醇介导的心脏保护效应。在iNOS基因敲除小鼠离体心脏模型中,白藜芦醇预适应不能发挥心脏保护作用,而在野生型动物中则可发挥保护效应<sup>[25]</sup>,提示白藜芦醇的心脏保护作用需要iNOS表达。这些争议的存在,可能与采用的动物模型、实验方案、研究对象不同有关,这些研究强调了iNOS的表达对于白藜芦醇发挥保护效应的重要性,但未说明iNOS表达水平的高低,也可能白藜芦醇发挥保护效应需要iNOS有限度的表达,而不是iNOS的过度表达。基于之前心肌硝化应激与心脏功能关系的分析,推

断白藜芦醇通过抑制心肌硝化应激来改善心脏功能。

综上所述,本实验通过建立大鼠心脏骤停模型,发现白藜芦醇干预后可明显改善心脏骤停后心脏功能不全,且较低浓度时保护效应更显著,可能与其有效抑制心肌硝化应激有关,为今后进一步研究提供了参考。

### 参 考 文 献

- Hua W, Zhang LF, Wu YF, *et al.* Incidence of sudden cardiac arrest in China: analysis of 4 regional populations. *J Am Coll Cardiol*, 2009; 54(12): 1110-1118.
- Langhelle A, Tyvold SS, Lexow K, *et al.* In-hospital factors associated with improved outcomes after out-of-hospital cardiac arrest. A comparison between four regions in Norway. *Resuscitation*, 2003; 56(3): 247-263.
- Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, *et al.* Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication; a consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation ( American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, Inter American Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. *Circulation*, 2008; 118(23): 2452-2483.
- Moncada S, Higgs A. L-Arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993; 329(27): 2002-2012.
- Kern KB, Berg RA, Hilwig RW, *et al.* Myocardial cytokine IL-8 and nitric oxide synthase activity during and after resuscitation: preliminary observations in regards to post-resuscitation myocardial dysfunction. *Resuscitation*, 2008; 77(3): 401-409.
- Hung LM, Chen JK, Huang SS, *et al.* Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardio Res*, 2000; 47(3): 549-555.
- Belguendouz I, Frémont L, Gozzalino MT. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem Pharmacol*, 1998; 55(6): 811-816.
- Kern KB, Zuercher M, Cragun D, *et al.* Myocardial microcirculatory dysfunction after prolonged ventricular fibrillation and resuscitation. *Crit Care Med*, 2008; 36(11 Suppl): S418-S421.
- Rivers EP, Wortsman J, Rady MY, *et al.* The effect of the total cumulative epinephrine dose administered during human CPR on hemodynamic, oxygen transport, and utilization variables in the postresuscitation period. *Chest*, 1994; 106(5): 1499-1507.
- Youngquist ST, Niemann JT, Shah AP, *et al.* A comparison of etanercept vs. infliximab for the treatment of post-arrest myocardial dysfunction in a swine model of ventricular fibrillation. *Resuscitation*, 2013; 84(7): 999-1003.
- Dolinsky VW, Dyck JR. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 2011; 1812(11): 1477-1489.
- Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, *et al.* Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: an example of global myocardial stunning. *J Am Coll Cardiol*, 1996; 28(1): 232-240.
- Chalkias A, Xanthos T. Pathophysiology and pathogenesis of post-resuscitation myocardial stunning. *Heart Fail Rev*, 2012; 17(1): 117-128.
- Mukherjee S, Dudley JI, Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response*, 2010; 8(4): 478-500.
- Goh SS, Woodman OL, Pepe S, *et al.* The red wine antioxidant resveratrol prevents cardiomyocyte injury following ischemia-reperfusion via multiple sites and mechanisms. *Antioxid Redox Signal*, 2007; 9(1): 101-113.
- Shen M, Jia GL, Wang YM, *et al.* Cardioprotective effect of resveratrol pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Vascul Pharmacol*, 2006; 45(2): 122-126.
- Han F, Da T, Riobo NA, *et al.* Early mitochondrial dysfunction in electron transfer activity and reactive oxygen species generation after cardiac arrest. *Crit Care Med*, 2008; 36(11 Suppl): S447-S453.
- Zia A, Kern KB. Management of postcardiac arrest myocardial dysfunction. *Curr Opin Crit Care*, 2011; 17(3): 241-246.
- Maréchal A, Mattioli TA, Stuehr DJ, *et al.* Activation of peroxynitrite by inducible nitric-oxide synthase: a direct source of nitrative stress. *J Biol Chem*, 2007; 282(19): 14101-14112.
- Wu D, Bassuk J, Arias J, *et al.* Different roles of nitric oxide synthase isoforms in cardiopulmonary resuscitation in pigs. *Resuscitation*, 2007; 73(1): 144-153.
- Tao L, Gao E, Jiao X, *et al.* Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation*, 2007; 115(11): 1408-1416.
- Hung LM, Su MJ, Chen JK. Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 2004; 36(6): 774-781.
- Mokni M, Limam F, Elkahoui S, *et al.* Strong cardioprotective effect of resveratrol, a red wine polyphenol, on isolated rat hearts after ischemia/reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys*, 2007; 457(1): 1-6.
- Hattori R, Otani H, Maulik N, *et al.* Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002; 282(6): H1988-H1995.
- Imamura G, Bertelli AA, Bertelli A, *et al.* Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002; 282(6): H1996-H2003.

(2015 - 05 - 13 收稿, 2015 - 10 - 31 修回)

编辑 沈 进