



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101704752 A

(43) 申请公布日 2010. 05. 12

(21) 申请号 200910023273. 7

(22) 申请日 2009. 07. 10

(71) 申请人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市长乐西路 17 号

(72) 发明人 孙晓莉 高峰 程司堃 姜茹

王海波 刘文冲 王平安

(74) 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任

公司 61202

代理人 谢钢

(51) Int. Cl.

C07C 203/04 (2006. 01)

C07D 493/04 (2006. 01)

C07C 201/02 (2006. 01)

A61K 31/216 (2006. 01)

A61K 31/222 (2006. 01)

A61K 31/235 (2006. 01)

A61K 31/34 (2006. 01)

A61P 9/10 (2006. 01)

A61P 39/06 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

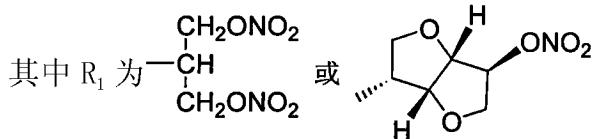
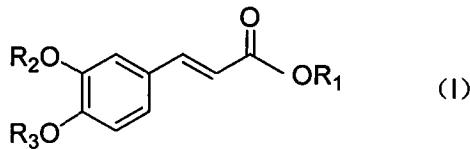
(54) 发明名称

抗缺血 / 再灌注损伤的药物

(57) 摘要

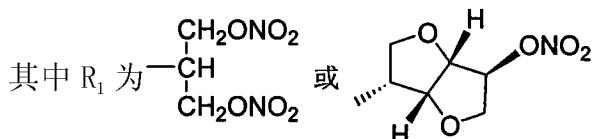
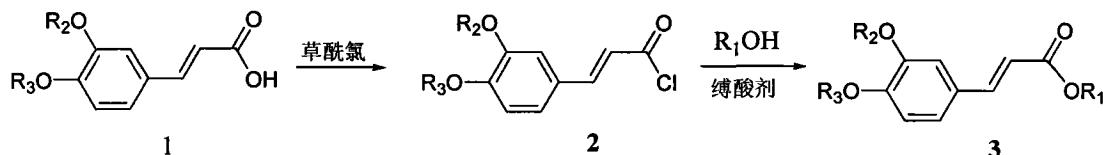
本发明公开了一类防治缺血 / 再灌注损伤的药物结构及合成方法。它们兼具释放 NO 和清除氧自由基的作用, 对缺血心肌有保护作用, 可减少 MI/R 对心肌细胞的损伤, 使心肌的抗氧化能力提高, 对抗缺血 / 再灌注损伤有明显防治作用。本发明提供的制备方法原料易得、反应步骤短、制备工艺简单、产率高, 是一种适合工业化生产的方法。

1. 一种由通式 (I) 表示的化合物,



R_2 、 R_3 相互独立的选自 H、、 $C_2 \sim C_6$ 的酰基、 PhCH_2- 或 $C_1 \sim C_6$ 的烃基。

2. 权利要求 1 所述化合物的合成方法, 其特征在于: 肉桂酸衍生物 1 与草酰氯反应制备酰氯 2, 酰氯 2 与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯在缚酸剂存在下反应得到目标化合物 3; 将目标化合物 3 再进行酚羟基脱保护即可得 $R_2 = R_3 = H$ 的目标产物, 具体合成路线如下,

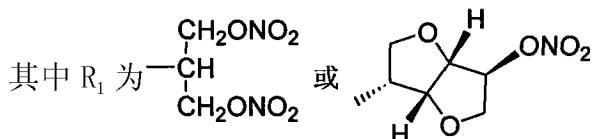


R_2 、 R_3 相互独立的选自 H、、 $C_2 \sim C_6$ 的酰基、

PhCH_2- 或 $C_1 \sim C_6$ 的烃基。

3. 根据权利要求 2 所述化合物的合成方法, 其特征在于: 缚酸剂为三乙胺或吡啶。

4. 权利要求 1 所述化合物的合成方法, 其特征在于: 肉桂酸衍生物 1 与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯在 DMAP 和缩合剂存在下进行缩合反应得到目标化合物 3; 将目标化合物 3 再进行酚羟基脱保护即可得 $R_2 = R_3 = H$ 的目标产物, 具体合成路线如下:



R_2 、 R_3 相互独立的选自 H、、 $C_2 \sim C_6$ 的酰基、

PhCH_2- 或 $C_1 \sim C_6$ 的烃基。

5. 根据权利要求 4 所述化合物的合成方法, 其特征在于: 缩合剂是 1,3-二环己基碳二亚胺, 1,3-二异丙基碳二亚胺或 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺。

6. 权利要求 1 所述化合物在制备预防和治疗缺血 / 再灌注损伤药物中的应用。
7. 根据权利要求 6 所述应用, 其特征在于 : 该药物是由含有有效应用量的权利要求 1 所示化合物和药学上的载体或者赋形剂组成的药物组合物。
8. 根据权利要求 6 所述应用, 其特征在于 : 该药物是片剂、胶囊剂、散剂、丸剂、颗粒剂或乳剂。

抗缺血 / 再灌注损伤的药物

技术领域

[0001] 本发明涉及既能释放 NO 又能清除氧自由基的抗缺血 / 再灌注损伤的一类药物，属于医药技术领域。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织统计，心脏病是排名首位的死亡原因，每年死亡人数达 1750 万人，占所有死亡人数的 30%，成为人类头号杀手。

[0003] 在美国，死于心脏病的人数占每年死亡人数的 1/3。在中国，心脏病的发病率和死亡率呈迅速上升趋势，1998 年至 2008 年间，中国男性冠心病发病率较以往同期增加 26.1%，女性增加 19.0%。而缺血性心脏病 (IHD) 是其中的罪魁祸首之一。阐明其发病机制并寻找有效的防治药物是当今医学界亟待攻克的重要课题，发明人经过十几年系统研究，发现：

[0004] 1、首次发现硝酰基阴离子 (NO^-) 在心肌缺血 / 再灌注 (MI/R) 中具有与 NO 相反的作用：NO 本身是一个保护因子，而其在生物体内转化为 NO^- 后，则成为心肌“致伤因子”，诺贝尔奖获得者 L.J. Ignarro 教授评价该发现“进一步丰富了 NO 生物分子功能多样性观点”，并亲自推荐发表于《美国科学院学报 (PNAS)》。

[0005] 2、在 MI/R 早期冠脉血管内皮细胞 NO 的基础生成量即出现降低，进而诱发中性白细胞粘附、聚集，加重心肌损伤；应用 NO 供体和有效抑制白细胞 - 内皮细胞间的相互作用，显著减轻了再灌注心肌损伤。

[0006] 3、发现 NO 与超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的反应产物过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-) 对 I/R 心肌即有直接损伤作用。由于缺血心脏再灌注时会爆发产生大量活性氧自由基，其中超氧阴离子自由基 (O_2^-) 可与 NO 反应迅速生成过氧亚硝基阴离子 (ONOO^-)，基于这一发现发明人对再灌注心肌损伤的防治进行了探索。利用含酚羟基化合物清除 ONOO^- 的氧化毒性作用，有效减轻了再灌注心肌损伤。

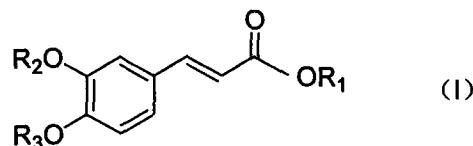
发明内容

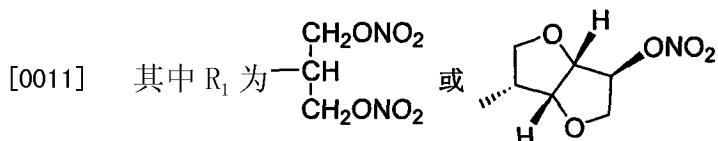
[0007] 本发明的目的是提供一种抗缺血 / 再灌注损伤的药物及其合成方法，该药物既能释放 NO 又能清除氧自由基，对缺血 / 再灌注损伤有明显防治作用。

[0008] 本发明实现过程如下：

[0009] 通式 (I) 表示的化合物，

[0010]





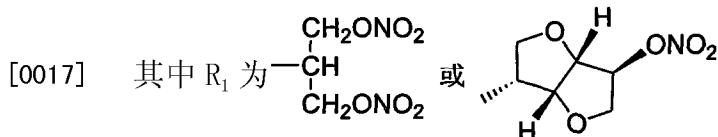
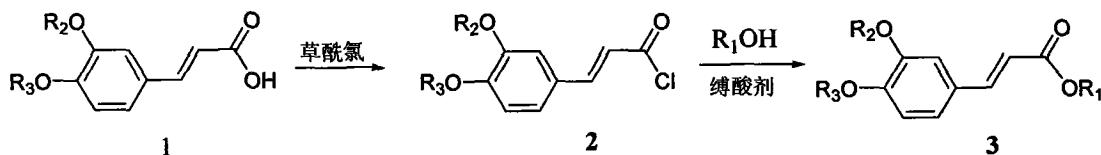
[0012] R₂、R₃ 相互独立的选自 H、、C₂ ~ C₆ 的酰基、PhCH₂- 或 C₁ ~ C₆ 的烃基。

[0013] 上述药物的合成方法：

[0014] 方法 1：

[0015] 肉桂酸衍生物 1 与草酰氯反应制备酰氯 2, 酰氯 2 与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯在缚酸剂存在下反应得到目标化合物 3; 将目标化合物 3 再进行酚羟基脱保护即可得 R₂ = R₃ = H 的目标产物, 具体合成路线如下,

[0016]

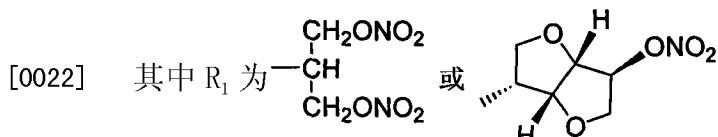


[0018] R₂、R₃ 相互独立的选自 H、、C₂ ~ C₆ 的酰基、PhCH₂- 或 C₁ ~ C₆ 的烃基。

[0019] 方法 2：

[0020] 肉桂酸衍生物 1 与单硝酸异山梨醇酯或甘油 1,3-二硝酸酯在 DMAP (N, N-二甲氨基吡啶) 和缩合剂 (可以是 1,3-二环己基碳二亚胺 DCC, 1,3-二异丙基碳二亚胺 DIC, 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 EDC) 存在下与发生缩合反应得到目标化合物 3; 将目标化合物 3 再进行酚羟基脱保护即可得 R₂ = R₃ = H 的目标产物, 具体合成路线如下:

[0021]



[0023] R₂、R₃ 相互独立的选自 H、、C₂ ~ C₆ 的酰基、PhCH₂- 或 C₁ ~ C₆ 的烃基。

[0024] 本发明合成出的系列化合物, 通过初步的药理学试验证明: 该类药物对缺血心肌有保护作用, 可减少 MI/R 对心肌细胞的损伤, 使心肌的抗氧化能力提高, 对抗缺血 / 再灌注损伤有明显防治作用。

附图说明

[0025] 图 1 为 AcCF-ISMN 剂量与一氧化氮生成量的量效曲线. $\bar{x} \pm s$, n = 6. Hill 方程拟合得半最大有效浓度 (EC50) 为 7.02mg.

[0026] 图 2 为不同处理对大鼠缺血 / 再灌注心脏功能的影响. A : 左室发展压 (LVDP) ; B and C : 左室收缩舒张速率 ($\pm dP/dt_{max}$) ; 模型组 : 缺血 / 再灌注 (30min/3h) ; CF : 咖啡酸 ; ISMN : 单硝酸异山梨醇酯 ; AcCF-ISMN : 3,4- 二乙酰肉桂酸单硝酸异山梨醇酯. $\bar{x} \pm s$, n = 8. *P < 0.05, **P < 0.01 vs 模型组 ; †P < 0.01 vs CF ; △△P < 0.01 vs ISMN ; #P < 0.05 vs CF+ISMN.

[0027] 图 3 为不同处理对大鼠缺血 / 再灌注血清中肌酸激酶 (CK) 活力的影响. 模型组 : 缺血 / 再灌注 (30min/3h) ; CF : 咖啡酸 ; ISMN : 单硝酸异山梨醇酯 ; AcCF-ISMN : 3,4- 二乙酰肉桂酸单硝酸异山梨醇酯. $\bar{x} \pm s$, n = 8. **P < 0.01 vs 模型组 ; †P < 0.01 vs CF ; △△P < 0.01 vs ISMN ; #P < 0.05 vs CF+ISMN.

[0028] 图 4 为不同处理对大鼠缺血 / 再灌注血清中乳酸脱氢酶 (LDH) 活力的影响. 模型组 : 缺血 / 再灌注 (30min/3h) ; CF : 咖啡酸 ; ISMN : 单硝酸异山梨醇酯 ; AcCF-ISMN : 3,4- 二乙酰肉桂酸单硝酸异山梨醇酯. $\bar{x} \pm s$, n = 8. *P < 0.05, **P < 0.01 vs 模型组 ; †P < 0.01 vs CF ; △△P < 0.01 vs ISMN.

[0029] 图 5 为不同处理对大鼠缺血 / 再灌注造成心肌梗死范围的影响. 模型组 : 缺血 / 再灌注 (30min/3h) ; CF : 咖啡酸 ; ISMN : 单硝酸异山梨醇酯 ; AcCF-ISMN : 3,4- 二乙酰肉桂酸单硝酸异山梨醇酯. $\bar{x} \pm s$, n = 8. **P < 0.01 vs 模型组 ; †P < 0.01 vs CF ; △△P < 0.01 vs ISMN ; #P < 0.01 vs CF+ISMN.

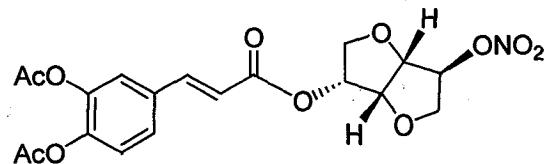
[0030] 图 6 为不同处理对大鼠缺血 / 再灌注血清中一氧化氮 (NO) 生成量的影响. 模型组 : 缺血 / 再灌注 (30min/3h) ; CF : 咖啡酸 ; ISMN : 单硝酸异山梨醇酯 ; AcCF-ISMN : 3,4- 二乙酰肉桂酸单硝酸异山梨醇酯. $\bar{x} \pm s$, n = 8. *P < 0.05, **P < 0.01 vs 模型组 ; †P < 0.01 vs CF ; △△P < 0.01 vs ISMN.

[0031] 图 7 为不同处理对大鼠缺血 / 再灌注血清中丙二醛 (MDA) 含量的影响. 模型组 : 缺血 / 再灌注 (30min/3h) ; CF : 咖啡酸 ; ISMN : 单硝酸异山梨醇酯 ; AcCF-ISMN : 3,4- 二乙酰肉桂酸单硝酸异山梨醇酯. $\bar{x} \pm s$, n = 8. **P < 0.01 vs 模型组 ; †P < 0.05 vs CF ; △△P < 0.01 vs ISMN ; #P < 0.05 vs CF+ISMN.

具体实施方式

[0032] 实施例 1 : 3,4- 二乙酰基肉桂酸单硝酸异山梨醇酯 (AcCF-ISMN) 的合成 (方法 1)

[0033]



[0034] 将 1.80g (10mmol) 3,4- 二羟基肉桂酸 (咖啡酸, CF) 加入到 20mL 乙酸酐中, 室温搅拌下, 滴加 2 ~ 3 滴浓 H₂SO₄, 搅拌下 15min。将反应液倒入 20mL 冰水中, 慢慢析出白色固体。过滤, 并用少量水洗滤饼, 将所得固体用乙酸乙酯重结晶, 即得 3,4- 二乙酰基肉桂酸。将上述乙酰化产物溶于 20mL 二氯甲烷, 缓慢加入草酰氯 10 ~ 15mL, 室温反应 3h。

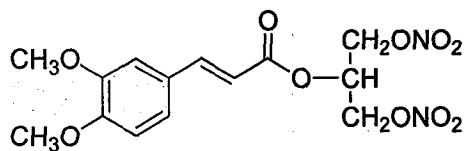
减压除去溶剂及残余的草酰氯，即得 3,4-二乙酰基肉桂酰氯。称取单硝酸异山梨醇酯 (ISMN) 2.02g (10.6mmol) 溶于 THF 100mL，加入 4.2mL 三乙胺。将 2.82g 酰氯 (10mmol) 溶解于 10mL THF 中，缓慢滴入上述溶液中，室温反应 8 ~ 12h，TLC 检测反应完毕后，过滤，将滤液减压蒸去溶剂，柱层析分离得目标产物 3.19g，总产率 73%。

[0035] 实施例 2 :3,4-二乙酰肉桂酸单硝酸异山梨醇酯 (AcCF-ISMN) 的合成 (方法 2)

[0036] 将 3.82g (20mmol) ISMN 溶于 150mL CH_2Cl_2 中，加入按上述方法制备的 3,4-二乙酰基肉桂酸 5.28g (20mmol)，室温搅拌下加入二环己基碳二亚胺 4.91g (DCC, 23mmol)，0.24g 二甲氨基吡啶 (DMAP, 2.0mmol)，室温反应 10h，TLC 监测反应结束后，滤除不溶物，滤液浓缩，用乙酸乙酯 / 石油醚重结晶得产物无色透明蜡状物 3.83g，真空干燥后得目标产物 3.71g，总产率为 85%。

[0037] 实施例 3 :3,4-二甲氧基肉桂酸 1',3' - 二硝酸甘油酯的合成 (方法 1)

[0038]



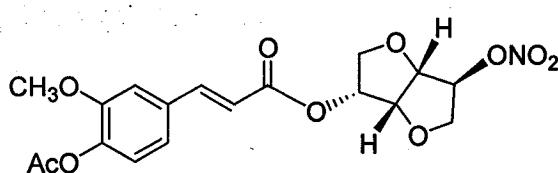
[0039] 将 2.08g (10mmol) 3,4-二甲氧基肉桂酸溶于 20mL 二氯甲烷，缓慢加入草酰氯 10 ~ 15mL，室温反应 3h。减压除去溶剂及残余的草酰氯，得 3,4-二甲氧基肉桂酰氯。将 1.93g (10.6mmol) 甘油 1,3-二硝酸酯溶于 100mL THF 中，并加入 4.2mL 三乙胺。将 2.26g 酰氯 (10mmol) 溶解于 10mL THF 中，缓慢滴入上述溶液中，室温反应，TLC 检测反应完毕后，过滤，将滤液减压蒸去溶剂，柱层析分离得目标产物 2.60g，总产率 70%。

[0040] 实施例 4 :3,4-二甲氧基肉桂酸 1',3' - 二硝酸甘油酯的合成 (方法 2)

[0041] 将 2.08g (10mmol) 3,4-二甲氧基肉桂酸和 1.82g (10mmol) 甘油 1,3-二硝酸酯溶于 150mL CH_2Cl_2 中，室温搅拌下加入 2.46g (12mmol) DCC 和 0.12g (1.0mmol) DMAP，室温搅拌 1.5h，TLC 监控反应。待反应结束后，滤除不溶物，滤液浓缩，快速柱层析得目标产物 2.83g，产率为 76%。

[0042] 实施例 5 :乙酰阿魏酸单硝酸异山梨醇酯的合成 (方法 1)

[0043]



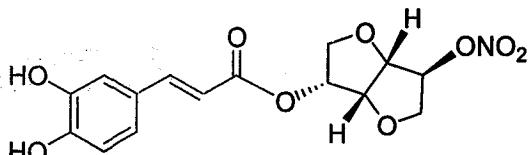
[0044] 将 1.94g (10mmol) 阿魏酸加入到 10mL 乙酸酐中，室温搅拌下，滴加一滴浓 H_2SO_4 ，搅拌下 15min，将反应液倒入 20mL 冰水中，慢慢析出白色固体。用少量水洗白色固体，乙酸乙酯重结晶，可得乙酰阿魏酸。将 2.36g (10mmol) 乙酰阿魏酸溶于 20mL 二氯甲烷，缓慢加入草酰氯 10 ~ 15mL，室温反应 3h。减压除去溶剂及残余的草酰氯，得乙酰阿魏酰氯。将 2.02g (10.6mmol) ISMN 溶于 THF 100mL，并加入 4.2mL 三乙胺。将上述酰氯 3.02g (10mmol) 溶解于 10mL THF 中，缓慢滴入上述溶液中，室温反应 8 ~ 12h，TLC 检测反应完毕后，将反应液过滤并浓缩，快速柱层析得目标产物 2.86g，总产率 70%。

[0045] 实施例 6 :乙酰阿魏酸单硝酸异山梨醇酯的合成 (方法 2)

[0046] 将 1.91g(10mmol) ISMN 溶于 150mL 干 CH_2Cl_2 中, 加入按上述方法制备的乙酰阿魏酸 2.36g(10mmol), 室温搅拌下加入 2.46g(12mmol) DCC 和 0.12g(1.0mmol) DMAP, 室温搅拌 1.5h, TLC 监控反应。待反应结束后, 滤除不溶物, 浓缩上样快速柱层析得白色至无色透明蜡状物 3.8g, 真空干燥后得产物 3.6g, 产率为 89%。

[0047] 实施例 7 :咖啡酸单硝酸异山梨醇酯的合成 (方法 1)

[0048]



[0049] 将 3.60g(10mmol) 3,4-二羟基肉桂酸置于 100mL 圆底烧瓶中, 缓慢加入草酰氯 10 ~ 15mL, 室温反应 3h。减压除去溶剂及残余的草酰氯, 得 3,4-二羟基苯基丙烯酰氯。将 2.02g(10.6mmol) ISMN 溶于 100mL THF 中, 并加入 4.2mL 三乙胺。将 3,4-二羟基肉桂酰氯 3.78g(10mmol) 溶解于 10mL THF 中, 缓慢滴到入上述溶液中, 室温反应 8 ~ 12h, TLC 检测反应完毕后, 将反应液过滤后旋转蒸干, 柱层析分离得 3,4-二羟基肉桂酸单硝酸异山梨醇酯 3.62g, 产率 68%。

[0050] 将 3,4-二羟基肉桂酸单硝酸异山梨醇酯 3.20g(6mmol) 溶于 500mL 甲醇, 加入 2.0g 10% Pd-C 催化剂, 以 N_2 置换体系中的空气, 再以氢气置换 N_2 。剧烈搅拌下氢解脱约 4h, 滤去催化剂, 减压除溶剂得目标产物 1.95g, 产率 92%。

[0051] 实施例 8 :咖啡酸单硝酸异山梨醇酯的合成 (方法 2)

[0052] 将 3.60g(10mmol) 3,4-二羟基肉桂酸和 2.02g(10mmol) ISMN 溶于 150mL 干 CH_2Cl_2 中, 室温搅拌下加入 2.46g(12mmol) DCC 和 0.12g(1.0mmol) DMAP, 室温搅拌 1.5h, TLC 监控反应。待反应结束后, 滤除不溶物, 浓缩上样快速柱层析得 3,4-二羟基肉桂酸单硝酸异山梨醇酯 4.26g, 产率 80%。将产物按实施例 7 中的方法氢解脱保护得产物 2.60g, 总产率 74%。

[0053] 实施例 9 :3,4-二乙酰咖啡酸单硝酸异山梨醇酯 (AcCF-ISMN) 的药效学实验

[0054] (1) 试验材料

[0055] Sprague-Dawley 雄性大鼠, 体质量 200 ~ 250g, 由第四军医大学实验动物中心提供; 肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA)、NO 试剂盒为南京建成公司产品; RM-6280 多道生理记录和分析处理系统, 成都仪器厂产品。

[0056] (2) 试验方案及结果

[0057] ①心肌缺血模型的制备

[0058] 将 SD 大鼠以 30g/L 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 经腹腔注射麻醉后, 按常规方法制备大鼠 MI/R(30min/3h) 模型: 颈正中切口气管插管, 连接呼吸机行正压人工呼吸。经右颈总动脉插管至左心室记录左室压及其微分。开胸暴露心脏, 5-0 丝线结扎左冠状动脉前降支中上 1/3 处, 心电图 ST 段抬高为结扎成功指标。缺血 30 分钟后松开丝线, 再灌注 3 小时。将大鼠随机分为以下 6 组:(1) 假手术组 (SHAM); (2) 心肌缺血 / 再灌注 (MI/R) 组 (I/R); (3) MI/R+CF 组 (CF, 40mg/kg); (4) MI/R+ISMN 组 (ISMN, 30mg/kg); (5) MI/R+CF+ISMN 组 (CF, 40mg/kg; ISMN, 30mg/kg); (6) MI/R+AcCF-ISMN 组 (AcCF-ISMN, 10mg/kg)。AcCF-ISMN 治疗组手术

前 2h 给药 (ig), 手术前 15min 给药 (ig), 剂量根据药品说明书和新药的药效曲线 (如图 1 所示) 确定。

[0059] ②心脏功能检测

[0060] 通过多导生理记录仪 (RM-4200) 持续监测大鼠心电及血流动力学各指标。心电图、左室收缩压 (LVSP)、左室等容收缩 / 舒张期压力上升或下降最大速率 ($\pm dP/dt_{max}$) 等均通过数据分析系统由计算机自动采集、记录并计算。

[0061] 为观察 AcCF-ISMN 对缺血心肌是否具有保护作用, 我们监测了大鼠血流动力学指标。缺血前各指标 Baseline 值无明显差异。再灌注后, 各组间心率 (HR) 无统计学差异; LVDP 值正常对照组为 22 ± 3 kPa, MI/R 组比 SHAM 组有显著降低 ($n = 8, P < 0.01$), CF ($n = 8, P < 0.05$)、ISMN ($n = 8, P < 0.01$)、CF+ISMN ($n = 8, P < 0.01$) 和 AcCF-ISMN ($n = 8, P < 0.01$) 均使 LVDP 较 I/R 组有显著升高, AcCF-ISMN 组较 CF+ISMN 组也有明显升高 (15.7 ± 1.6 vs. 13.1 ± 1.1 kPa, $n = 8, P < 0.05$) ; 左室内压微分也有相似趋势, 正常对照组 $+dP/dt_{max}$ 值为 545 ± 40 kPa $\cdot s^{-1}$, $-dP/dt_{max}$ 值为 -551 ± 33 kPa/s, MI/R 组 $+dP/dt_{max}$ 较 SHAM 组有显著降 ($n = 8, P < 0.01$), $-dP/dt_{max}$ ($n = 8, P < 0.01$), CF、ISMN、CF+ISMN 和 AcCF-ISMN 均使 $\pm dP/dt_{max}$ 较 I/R 组有显著升高 ($n = 8, P$ 均小于 0.01), AcCF-ISMN 组较 CF+ISMN 组也有明显升高 (327 ± 25 vs. 404 ± 33 kPa/s, -3360 ± 39 vs. -418 ± 30 kPa/s, $P < 0.05$)。不同处理组大鼠心肌缺血再灌注 3h 心功能恢复情况见图 2。可见, AcCF-ISMN 可以改善缺血心肌的心功能, 而且保护作用强于联合使用 CF 与 ISMN。

[0062] ③血清 CK、LDH 活性

[0063] 于再灌注 3h 后由颈动脉取血 2mL, 常温静置 30min 后, 3000r/min 离心 20min, 取血清严格按照试剂盒说明书操作检测 CK、LDH 的活性。

[0064] 为进一步探讨 AcCF-ISMN 这种新化合物对缺血心肌保护作用, 我们还检测了大鼠缺血 30min 再灌 3h 血清中 LDH、CK 活性。当心肌细胞膜损伤, 细胞膜完整性遭到破坏, 导致膜通透性增加, 心肌细胞内 CK 和 LDH 大量外漏。结果显示, MI/R 使血清中 CK 活性较 SHAM 组明显增加 ($n = 8, P < 0.01$), 与 MI/R 组比, CF 组、ISMN 组、CF+ISMN 组和 AcCF-ISMN 组血清中 CK 活性都明显降低 ($n = 8, P < 0.01$), CF+ISMN 组与 CF 组或 ISMN 组比较有显著性减少 (5.7 ± 0.6 vs. 3.7 ± 0.9 U/ml, $n = 8, P$ 均小于 0.05), AcCF-ISMN 组也明显低于 CF+ISMN 组 ($n = 8, P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3h 血清中 CK 活性见图 3。血清中 LDH 活性也有相似趋势: MI/R 使血清中 LDH 活性较 SHAM 组明显增加 ($n = 8, P < 0.01$), 与 I/R 组比, CF 组 ($n = 8, P < 0.05$)、ISMN 组 ($n = 8, P < 0.01$)、CF+ISMN 组 ($n = 8, P < 0.01$) 和 AcCF-ISMN 组 ($n = 8, P < 0.01$) 都明显降低, AcCF-ISMN 组血清中 LDH 活性也明显低于 CF (2133 ± 468 vs. 4193 ± 838 U/ml, $n = 8, P < 0.05$) 和 ISMN (2133 ± 468 vs. 3465 ± 828 U/ml, $n = 8, P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3h 血清中 LDH 活性见图 4。上述结果提示, AcCF-ISMN 可减少缺血心肌细胞死亡, 且这种作用强于联合使用 CF 与 ISMN。

[0065] ④心肌梗死范围测定

[0066] 再灌注 3h 结束后, 再次结扎冠脉, 向左心室腔注入 2% 伊文蓝 (1~2mL)。速取出心脏, 冻存于 -20°C。用心脏切片器垂直于心脏长轴将其切成 1mm 厚的薄片, 分片置于含 2mL 1% TTC (pH7.4) 的 12 孔培养皿中, 37°C 孵育 15min。用数码相机拍照并输入计算机。采用单盲法分别将伊文蓝染色区 (非缺血区)、TTC 染色区 (红染, 缺血但仍存活组织) 以及非

TTC 染色区(梗死心肌),用 SigmaScan 面积测算软件进行计算处理。心肌梗死范围以每一心脏总梗死面积 (INF) 占总缺血区面积 (AAR) 的百分比表示。

[0067] 从减小心肌梗死范围 MIS 方面,进一步观察 AcCF-ISMN 对缺血心肌的保护作用。SHAM、MI/R、CF、ISMN 及 AcCF-ISMN 五组间总缺血范围 (AAR/LV %) 无明显差异。缺血 30min 再灌 3h 造成大鼠明显心肌梗死, CF、ISMN、CF+ISMN 及 AcCF-ISMN 组较 I/R 组有明显缩小 ($n = 8, P < 0.01$), 而 AcCF-ISMN 组 MIS 较 CF+ISMN 组也有明显缩小 ((36±5) % vs. (21±8) %, $n = 8, P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3h 后心肌梗死情况见图 5。上述结果表明, AcCF-ISMN 还可以减少缺血损伤心肌的梗死, 并且这种作用强于联合使用 CF 与 ISMN。

[0068] ⑤ NO 水平检测和 MDA 含量

[0069] 利用硝酸还原酶法检测 NO 含量。NO 在生物体内经历一系列化学反应, 最终形成相对稳定的氧化产物亚硝酸盐 NO_2^- 和硝酸盐 NO_3^- , 利用硝酸还原酶法先把血清 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 在 pH7.5~8.1 条件下, NO_2^- 与对氨基苯磺酸发生重氮化, 再与 N-(1-萘基)-乙二胺偶联生成一深紫红色的偶氮化合物, 用酶标仪 (Molecular Devices 公司 SpectraMAX190) 测定其吸光度以确定 NO 浓度。MDA 的含量用硫代巴比妥酸比色法测得 (过氧化脂质主要降解产物 MDA 在酸性条件下与二分子硫代巴比妥缩合生成红色物质)。

[0070] 证实 AcCF-ISMN 可有效保护缺血心肌后, 我们进一步探讨其机制, 即该效应是否与 AcCF-ISMN 改变 NO 含量及血清 MDA 有关。缺血 30min 再灌 3h 造成大鼠血清中 NO 含量较 SHAM 组有升高 ($n = 8, P < 0.01$), CF 组 (40±13 μ mol/L)、ISMN 组 (238±45 μ mol/L)、CF+ISMN 组 (337.8±55 μ mol/L) 及 AcCF-ISMN 组 (313±58 μ mol/L) 较 MI/R 组也有明显升高 ($n = 8, CF$ 组 $P < 0.05$, 其它各组 P 均小于 0.01), AcCF-ISMN 组血清中 NO 含量较 CF 组和 ISMN 组增加, 变化有统计学意义 (P 均小于 0.01)。不同处理组大鼠 MI/R 3h 后血清中 NO 含量见图 6。由结果可见, 当 AcCF-ISMN 组摩尔用药量是 ISMN 的八分之一时, 血清中 NO 含量即大于 ISMN 组。

[0071] MDA 是细胞膜脂质过氧化产物, 其含量增加反应细胞膜经过氧化反应后的破坏程度。MI/R 使血清中 MDA 含量较 SHAM 组明显增加 ($n = 8, P < 0.01$), 与 MI/R 组比, CF 组 (7.2±0.6 nmol/ml)、ISMN 组 (9.1±1.1 nmol/ml)、CF+ISMN 组 (7.1±0.6 nmol/ml) 和 AcCF-ISMN 组 (5.2±0.8 nmol/ml) 血清中 MDA 含量都明显降低 ($n = 8, P$ 均小于 0.01), AcCF-ISMN 组也明显低于 CF ($P < 0.05$)、ISMN ($P < 0.01$) 和 CF+ISMN 组 ($P < 0.05$)。不同处理组大鼠 MI/R 3h 血清中 MDA 含量见图 7。NO 与 MDA 检测结果提示, AcCF-ISMN 保护缺血心肌可能与其释放 NO 并减少 ROS 对细胞损伤有关。

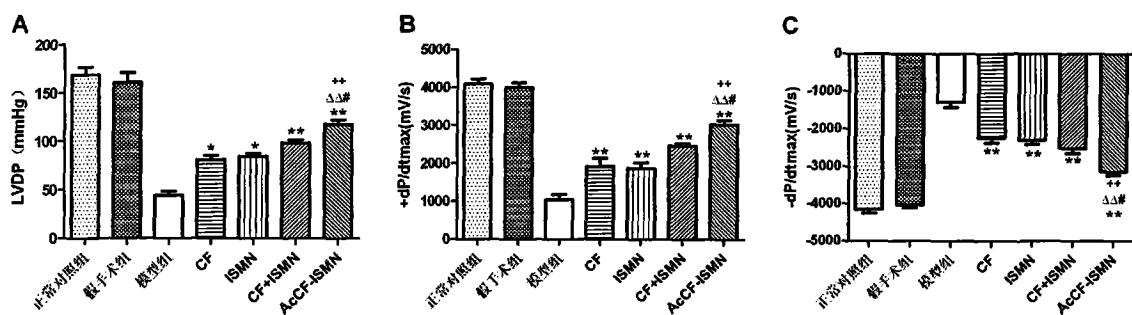
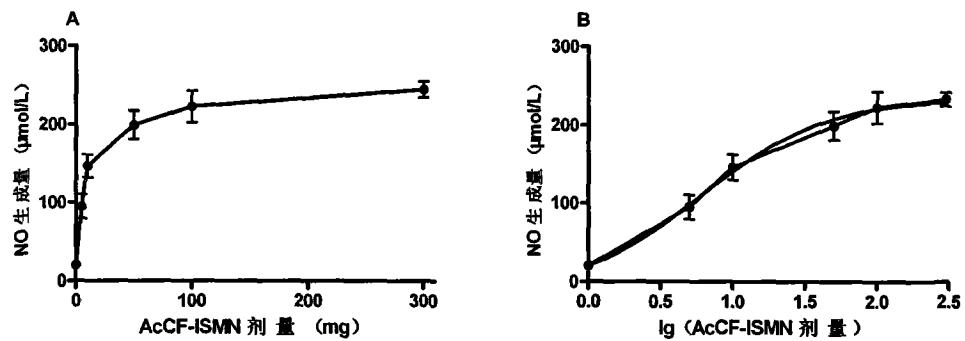


图 2

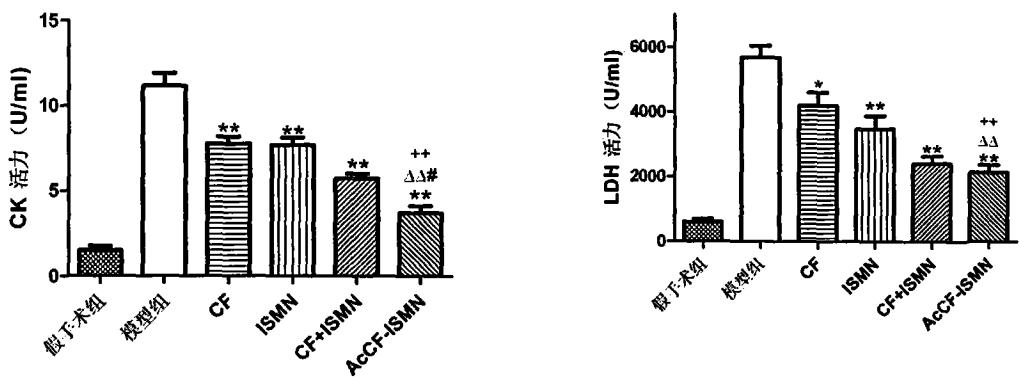


图 4

图 3

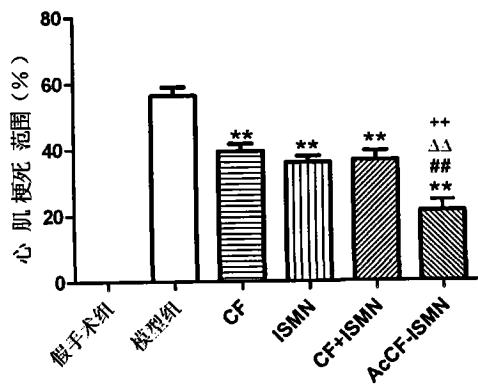


图 5

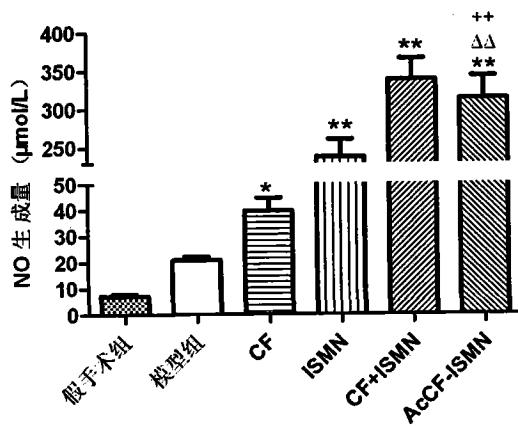


图 6

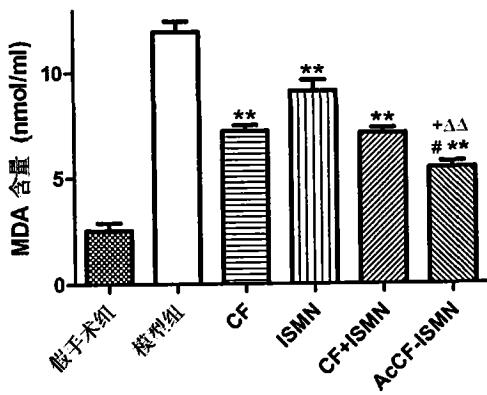


图 7