

尼可地尔对缺血性心力衰竭大鼠 心功能的保护作用及机制

邢晓娜, 刘利君, 何元军

(四川省广元市中心医院 心脏血管中心, 四川 广元, 628017)

摘要: **目的** 探讨尼可地尔对缺血性心力衰竭大鼠心功能和左室重构的保护作用及相关机制。**方法** 将40只大鼠随机分为空白对照组(Con组)、尼可地尔组(NIC组)、生理盐水组(NS组)及假手术组(Sham组),每组10只,分别采取不同处理方式。记录各组大鼠体重、呼吸模式、活动量和毛色差异。术后8周所有大鼠行超声心动图检查。实验结束后对大鼠左室前壁组织进行HE染色及电镜观察。检测心肌组织中p-Akt、Bcl-2、Bax蛋白的相对表达量。**结果** 与Con组及Sham组相比,NS组及NIC组左心室射血分数(LVEF)、速度最大值(E)/心房收缩心室充盈速度最大值(A)(E/A)降低,NS组LVEF下降最多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。左心室舒张末期容积(LVEDV)则呈相反趋势,3组间存在差异,NS组LVEDV最高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NS组左心室收缩末期容积(LVESV)、左室舒张末期内径(LVIDd)和左室收缩末期内径(LVIDs)高于NIC组和Sham组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Sham组大鼠心肌细胞排列规则,横纹清晰;NS组心肌细胞排列紊乱,形状不规则,同时还表现出明显的纤维组织增生。Sham组、NIC组的左心室/体重比值(LVW/BW)和肺脏重量指数(Lungw/Bw)均低于NS组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与Con组及Sham组相比,NS组p-Akt、Bcl-2及Bax蛋白相对表达量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NIC组p-Akt、Bcl-2蛋白相对表达量高于NS组,但Bax蛋白表达量下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 尼可地尔可通过改善心功能和左室重塑对缺血性心力衰竭大鼠起到保护作用,这可能与抑制Bax蛋白表达有关。

关键词: 尼可地尔; 缺血性心力衰竭; 左室重构; 心功能

中图分类号: R 541.6; R 972 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)03-094-05 DOI: 10.7619/jcmp.20201334

Protective effects of nicorandil on cardiac function in rats with ischemic heart failure and its mechanism

XING Xiaona, LIU Lijun, HE Yuanjun

(Cardiovascular Center, Guangyuan Central Hospital in Sichuan Province, Guangyuan, Sichuan, 628017)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of nicodil on cardiac function and left ventricular remodeling in ischemic heart failure rats and its related mechanism. **Methods** Forty rats were randomly divided into blank control group (Con group), nicodil group (NIC group), normal saline group (NS group) and Sham operation group (Sham group), with 10 rats in each group, and different treatment methods were adopted. The differences of body weight, respiratory pattern, activity and hair color were recorded. Echocardiography was performed in all rats 8 weeks after operation. After the experiment, the anterior wall tissue of the left ventricle of rats was observed by HE staining and electron microscopy. The relative expression levels of p-Akt, Bcl-2 protein and Bax in myocardial tissue were detected. **Results** Compared with Con group and Sham group, left ventricular ejection fraction (LVEF) and ratio of maximum velocity (E) to atrial contraction maximum ventricular filling velocity (A) (E/A) in NS group and NIC group were significantly decreased, and LVEF in NS group had the most decrease ($P < 0.05$). The left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) showed an opposite trend, with significant differences among the three groups, and the NS group had the highest LVEDV ($P < 0.05$). Left ventricular end-systolic volume (LVESV), left ventricular end-diastolic diameter (LVIDd) and left ventricular end-systolic diameter (LVIDs) in NS group were significantly higher than those in NIC group and Sham group ($P < 0.05$). In the Sham group, the myocardial cells

were arranged regularly and the transverse lines were clear; in the NS group, the myocardial cells were disordered and irregular in shape, and obvious fibrous tissue proliferation was also observed. However, compared with NS group, these abnormalities in NIC group were significantly reduced and myocardial fiber structure tended to be normal. The ratio of left ventricular weight (LVW) to body weight (LVW/BW) and lung mass index (Lungw/Bw) in Sham group and NIC group were significantly lower than those in NS group ($P < 0.05$). Compared with Con group and Sham group, the relative expression levels of p-Akt protein, Bcl-2 protein and Bax protein in NS group were significantly increased ($P < 0.05$). The relative expression levels of p-Akt protein and Bcl-2 protein in NIC group were significantly higher than those in NS group, but the expression level of Bax protein was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Nicorandil can protect rats with ischemic heart failure by improving cardiac function and left ventricular remodeling, which may be related to the inhibition of Bax protein expression.

Key words: nicorandil; ischemic heart failure; left ventricular remodeling; cardiac function

尼可地尔是具有硝酸盐性质的 ATP 敏感性钾离子通道开放剂,适用于各类型心绞痛^[1],能显著降低心血管事件的发生风险,可对心脏病患者的的心脏起保护作用^[2]。研究^[3]认为,尼可地尔可减少冠心病患者心脏重构的发生发展,降低缺血性心力衰竭患者的死亡率^[4]。心室重构是指各种损伤使心脏原来存在的物质和心脏形态学发生变化,是机体的一种适应性反应,也是病变修复和心室整体代偿继发的病理生理反应过程^[5]。但是,关于尼可地尔是否能抑制缺血性心力衰竭的左室重构及其机制尚未明确。本研究探讨尼可地尔对缺血性心力衰竭大鼠心功能和左室重构的影响和机制,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 实验动物

40 只雄性 SD 大鼠,体质量 160 ~ 200 g,购于中国食品药品检定研究院[(生产许可证号: SCXK(京)2019-0017)]。尼可地尔购于长春大政药业科技有限公司(国药准字 H22024008)。将 40 只大鼠随机分为 4 组,每组 10 只。①空白对照组(Con 组):不进行任何手术干预,仅给予等体积、等时间生理盐水灌胃。②尼可地尔组(NIC 组):麻醉满意后,采用 Johns 法建立大鼠缺血性心力衰竭模型。麻醉大鼠后,打开胸腔,在无菌手术条件下分离心包,然后抬起左耳廓,心脏被挤出。在大约 1/3 的下端结扎左冠状动脉前降支。从尾部记录每只大鼠的收缩压、舒张压和心率,对每个参数进行 3 次测量。术后 3 d 至 8 周末,给予尼可地尔 3 mg/kg · d 灌胃。③生理盐水组(NS 组):手术方式同 NIC 组,但给予等体

积、等时间生理盐水灌胃。④假手术组(Sham 组):在不结扎冠状动脉的情况下行开胸手术,灌胃生理盐水。术后 8 周对各项指标进行评估,记录体重、呼吸模式、活动量和毛色。

1.2 超声心动图

术后 8 周所有大鼠均行超声心动图检查。麻醉满意后,仰卧位固定,胸部备皮,测量室间隔收缩末期厚度(IVSS)、室间隔舒张末期厚度(IVSd)、左室收缩末期内径(LVIDs)、左室舒张末期内径(LVIDd)、左室收缩末期后壁厚度(LVPWs)和左室舒张末期后壁厚度(LVPWd)。用 Teichholtz 方程计算左心室射血分数(LVEF)和左心室短轴收缩分数(LVFS),并计算左心室舒张末期容积(LVEDV)和左心室收缩末期容积(LVESV)。大鼠手术后 LVEF 均低于 50%,提示心力衰竭。

1.3 左心室重量和肺重的测定

实验结束后,测量心脏和左心室重量,计算左心室/体重比值(LVW/BW),评价左心室肥厚程度。取肺称重,计算肺脏重量指数(LUNGW/BW)作为充血指标。

1.4 组织病理学检查

处死大鼠后,提取左心室前壁组织。部分组织在液氮中快速冷冻,然后保存在 -80 ℃ 以备分析。甲醛固定和石蜡包埋,切成 4 μm 的切片,烤片,冷却后低温冻存。经二甲苯脱蜡,乙醇梯度水化。苏木精染色 30 ~ 60 s,冲洗 5 min,伊红染色 30 s,冲洗 5 min;乙醇梯度脱水,干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,晾干,光学显微镜下观察。其余组织采用戊二醛-锇酸双重固定,脱水,使用前置于 -80 ℃ 中保存。在电镜下进行心肌超微结构观察。

1.5 Western blot 检测

在组织裂解缓冲液中提取蛋白并测定蛋白浓度。从每个样品中分离等量的蛋白质(40 μg),并将其电转移到 PVDF 膜上。5%的 BSA 封闭,与一抗在 4 ℃ 孵育过夜。洗膜 3 次后,将膜与 HRP 偶联二抗孵育。使用标准 ECL 检测条带,并使用 Image J 软件通过密度分析进行定量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计数资料以($\bar{x} \pm s$)差表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 尼可地尔改善缺血性心力衰竭大鼠的一般情况

NS 组大鼠除了呼吸急促甚至喘息外,还表现出活动减少和神经松懈,体重减轻,毛发颜色暗淡。NIC 组大鼠的活动量、体重和整体健康状况明显好于 NS 组。术后 8 周,Con 组、Sham 组、NS 组、NIC 组体重分别为(486.70 ± 29.30) g、(478.40 ± 28.30) g、(369.85 ± 47.26) g、(426.85 ± 51.22) g,NS 组体重最低,NIC 组次之。

2.2 尼可地尔对缺血性心力衰竭大鼠的降压作用

术后 8 周末,NIC 组收缩压和舒张压分别为(126.3 ± 6.9) mmHg、(94.0 ± 6.2) mmHg,均明显低于 NS 组的(141.7 ± 10.1) mmHg、(103.1 ± 5.9) mmHg 的和 Sham 组的(159.6 ± 11.3) mmHg、(113.1 ± 8.5) mmHg,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。NS 组收缩压(141.7 ± 10.1) mmHg 明显低于 Sham 组(159.6 ± 11.3) mmHg 和 Con 组(150.8 ± 10.2) mmHg,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。Sham 组舒张压(113.1 ± 8.5) mmHg 与 NS 组(103.1 ± 5.9) mmHg 相比,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

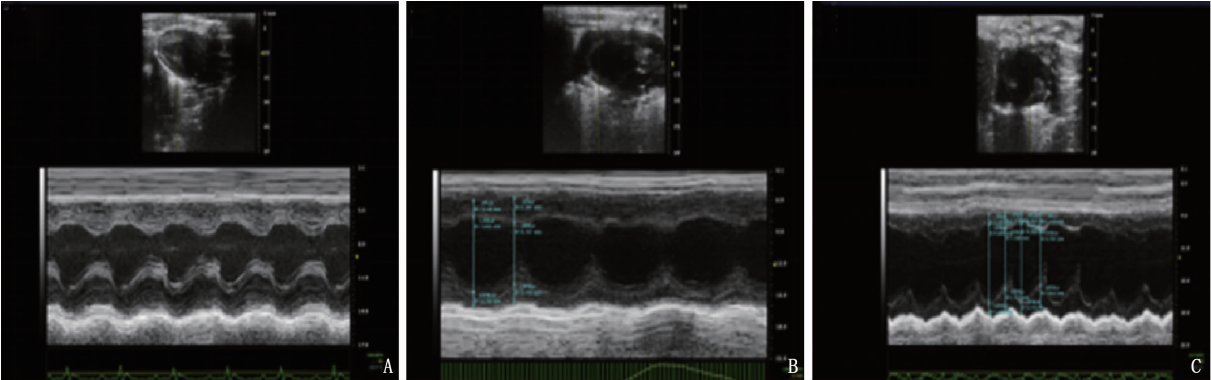
2.3 尼可地尔改善缺血性心力衰竭大鼠的心功能

与 Con 组及 Sham 组相比,NS 组及 NIC 组 LVEF、E/A 均降低,且 NS 组 LVEF 低于 NIC 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。LVEDV 则呈相反趋势,3 组间存在差异,NS 组 LVEDV 最高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。NS 组 LVESV、LVIdd 和 LVIDs 高于 NIC 组和 Sham 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。NIC 组和 Sham 组之间相关指标水平比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。各组大鼠的 IVSd 水平比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1、图 1。

表 1 各组大鼠超声心动图指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

指标	Con 组(<i>n</i> = 10)	Sham 组(<i>n</i> = 10)	NS 组(<i>n</i> = 10)	NIC 组(<i>n</i> = 10)
LVEF	72.60 ± 9.00	68.30 ± 9.40	48.90 ± 7.40* [#] △	59.50 ± 8.40* [#]
LVFS	42.60 ± 7.80	39.50 ± 7.40	26.50 ± 11.90	34.40 ± 6.20
E/A	2.16 ± 0.40	2.02 ± 0.20	0.98 ± 0.21* [#] △	1.33 ± 0.31* [#]
LVEDV	206.50 ± 15.50	223.50 ± 19.20	338.50 ± 19.60* [#] △	262.40 ± 24.50
LVESV	66.90 ± 10.20	72.60 ± 9.70	118.50 ± 28.20* [#] △	90.50 ± 13.30
IVSd	1.32 ± 0.30	1.36 ± 0.20	1.52 ± 0.20	1.38 ± 0.20
LVIdd	6.29 ± 0.80	6.59 ± 0.70	8.04 ± 0.80* [#] △	7.48 ± 0.90
LVIDs	3.94 ± 0.70	4.06 ± 0.80	5.94 ± 0.50* [#] △	4.83 ± 0.30

LVEF: 左心室射血分数; LVFS: 左心室短轴收缩分数; E/A: 速度最大值(E)/心房收缩心室充盈速度最大值(A); LVEDV: 左心室舒张末期容积; LVESV: 左心室收缩末期容积; IVSd: 室间隔舒张末期厚度; LVIdd: 左室舒张末期内径; LVIDs: 左室收缩末期内径。与 Con 组比较,**P* < 0.05; 与 Sham 组比较,#*P* < 0.05; 与 NIC 组比较,△*P* < 0.05。



A: Sham 组; B: NS 组; C: NIC 组
图 1 各组大鼠超声心动图检查

2.4 尼可地尔对缺血性心力衰竭大鼠左心室肥厚、纤维化和肺充血的影响

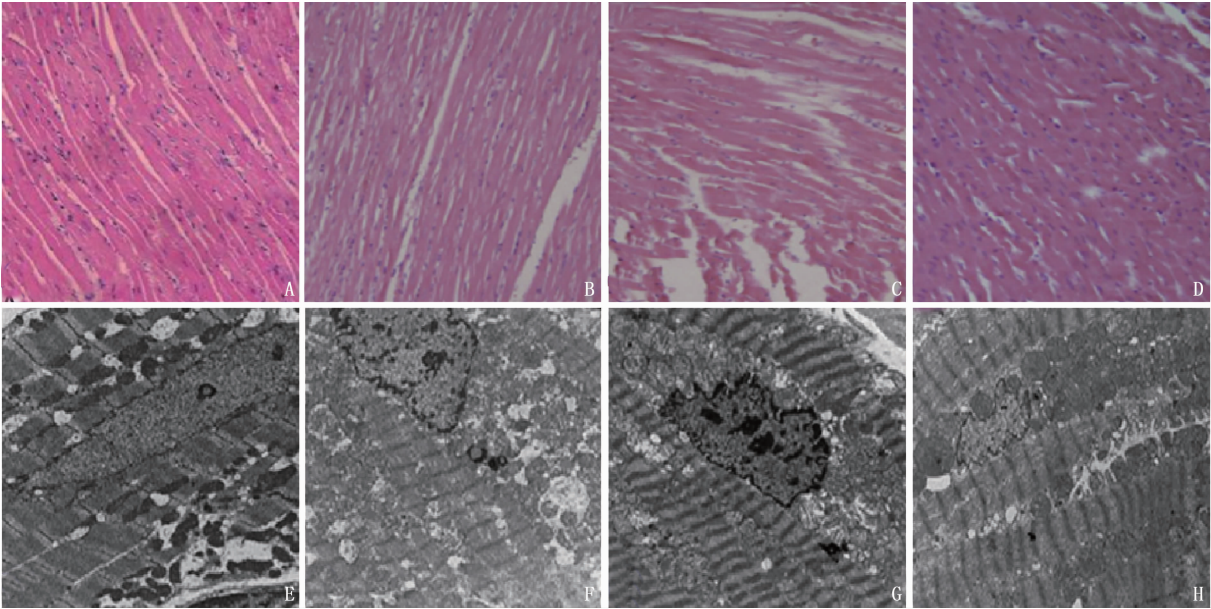
HE 染色及电镜下观察结果均显示, Sham 组大鼠心肌细胞排列规则, 横纹清晰; NS 组心肌细胞排列紊乱, 形状不规则, 还表现出明显的纤维组

织增生。与 NS 组相比, NIC 组的这些异常明显减弱, 心肌纤维结构趋于正常。Sham 组和 NIC 组 LVW/BW 和 LUNGW/BW 均明显低于 NS 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 各组大鼠 LVW/BW 和 LUNGW/BW 比较

指标	Con 组 (n = 10)	Sham 组 (n = 10)	NS 组 (n = 10)	NIC 组 (n = 10)
LVW/BW	0.0028 ± 0.005	0.0028 ± 0.004*	0.003 6 ± 0.002	0.002 7 ± 0.005*
LUNGW/BW	0.0041 ± 0.008	0.0042 ± 0.006*	0.006 4 ± 0.003	0.004 0 ± 0.002*

LVW/BW: 左心室/体重比值; LUNGW/BW: 肺脏重量指数。与 NS 组比较, * $P < 0.05$ 。



A、E: Con 组; B、F: Sham 组; C、G: NS 组; D、H: NIC 组。

A、B、C、D 为光镜图, 放大倍数为 100 倍; E、F、G、H 为电镜图, 放大倍数为 15 600 倍。

图 2 各组大鼠心肌组织 HE 染色

2.5 尼可地尔对大鼠心肌 Akt/Bcl-2/Bax 信号通路的影响

Western blot 检测显示, 与 Con 组及 Sham 组相比, NS 组 p-Akt、Bcl-2 及 Bax 蛋白相对表达量

增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 NS 组相比, NIC 组 p-Akt、Bcl-2 蛋白相对表达量更高, 但 Bax 蛋白表达量下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

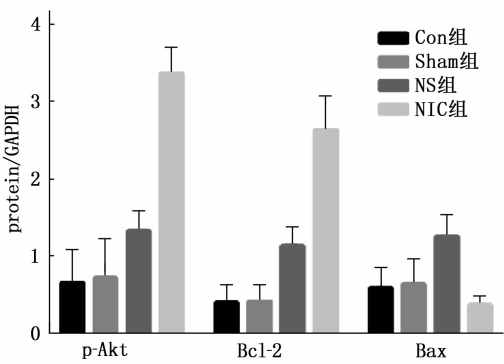
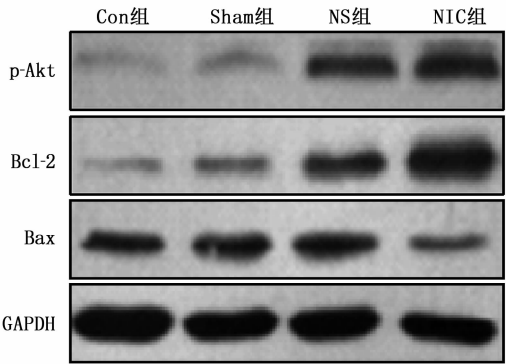


图 3 4 组 p-Akt/Bcl-2/Bax 蛋白水平表达图

3 讨论

尼可地尔是第一种 ATP 依赖性钾通道开放

剂, 作为一种新型血管扩张剂在临床实践中表现出独特的优势。尼可地尔具有双重的血管扩张机制^[6], 通过刺激血管平滑肌细胞中的鸟苷酸环化

酶起到硝酸酯类的作用,导致冠状动脉血流量增加和静脉扩张^[7]。此外,尼可地尔是一种 ATP 敏感性钾通道开放剂,可引起血管平滑肌和线粒体钾离子外流,使细胞电位超极化,诱导电压门控钙通道失活,减少细胞内游离钙离子^[8],松弛冠状动脉和阻力血管,增加流向心肌的血流量。尼可地尔还可扩张全身阻力和容量血管,降低心脏前负荷和后负荷以及心肌耗氧量,缓解冠状动脉痉挛,增加侧支循环和心内膜下血供^[9]。本研究发现尼可地尔可改善缺血性心力衰竭大鼠的心功能,并在正常范围内降低血压。

研究^[10]表明,尼可地尔不仅能缓解缺血性心脏病的症状,还能抑制冠心病患者的心肌肥大和重塑。心力衰竭是最常见的心源性死亡原因,心脏重构在其发生发展中起重要作用^[11]。本研究结果发现,尼可地尔改善了缺血性心力衰竭大鼠的一般情况,且提高了 LVEF、LVFS 和 E/A,降低了 LVEDV、LVESV、LVIDd 和 LVIDs 水平,改善了缺血性心力衰竭大鼠的左室收缩功能。尼可地尔干预后大鼠 LVW/BW 和 LUNGW/BW 比值也显著低于 NS 组大鼠。本研究组织学观察结果显示,Sham 组心肌细胞排列规则,横纹清晰;Con 组排列紊乱,形状不规则,左心室心肌组织呈明显的纤维组织增生;NIC 组心肌细胞的这些病理改变不那么明显,而且较少出现增生。这提示尼可地尔可改善缺血性心力衰竭时的心功能和左室重构。

尼可地尔的保护机制尚未阐明。RAAS 系统激活、氧化应激和心肌内钙超载在心力衰竭的发生发展中起重要作用,其中钙超载对心功能影响最大^[12]。尼可地尔可以开放线粒体中的钾通道,抑制氧化应激诱导的心肌细胞凋亡。研究^[13]表明,尼可地尔作为 NO 供体,可能通过激活有丝分裂钾通道和 NO/可溶性鸟苷酸环化酶依赖机制来抑制氧化应激或高氧诱导的心肌细胞凋亡。此外,尼可地尔已被证明与凋亡相关蛋白的调节有关。Bcl-2 与 Bax 共属于一个家族,通过控制线粒体膜的通透性来调节凋亡激活物。bax 二聚体在膜上打开通道,增加细胞膜通透性;bcl-2 与 bax 可形成异聚体,降低细胞通透性^[14]。bcl-2 水平的升高和 bax 的降低表明细胞对凋亡的抵抗性增强,为保护药物发挥作用的标志。本研究中,尼可地尔抑制缺血性心力衰竭引起的大鼠心肌 Bax 水平的上调,提示尼可地尔对缺血性心力衰竭大鼠的心脏保护作用可能是通过抑制 Bax 的表达来实现的。鉴于 Bax 的促凋亡作用,推测尼可地尔的

保护作用可能参与控制缺血性心力衰竭大鼠的凋亡过程。

综上所述,本研究发现,尼可地尔通过改善心功能和左室重塑对缺血性心力衰竭大鼠起到保护作用,其机制可能与尼可地尔抑制 Bax 蛋白表达有关。

参考文献

- [1] WANG X, PAN J, LIU D, *et al.* Nicorandil alleviates apoptosis in diabetic cardiomyopathy through PI3K/Akt pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5349–5359.
- [2] XIE J, JIANG M Y, LI L. Effect of nicorandil administration on preventing contrast-induced nephropathy: a meta-analysis [J]. *Angiology*, 2020, 71(5): 472–475.
- [3] GUO C Y, ZHANG Q, ZHU B Q, *et al.* Pharmaceutical co-crystals of nicorandil with enhanced chemical stability and sustained release [J]. *Cryst Growth Des*, 2020, 20(10): 6995–7005.
- [4] HU K Q, WANG X Q, HU H Y, *et al.* Intracoronary application of nicorandil regulates the inflammatory response induced by percutaneous coronary intervention [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(8): 4863–4870.
- [5] IRANIRAD L, HEJAZI S F, SADEGHI M S, *et al.* Efficacy of nicorandil treatment for prevention of contrast-induced nephropathy in high-risk patients undergoing cardiac catheterization: a prospective randomized controlled trial [J]. *Cardiol J*, 2017, 24(5): 502–507.
- [6] LEE T M, LIN S Z, CHANG N C. Nicorandil regulates the macrophage skewing and ameliorates myofibroblasts by inhibition of RhoA/Rho-kinase signalling in infarcted rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2): 1056–1069.
- [7] YOSHIHISA A, SATO Y, WATANABE S, *et al.* Decreased cardiac mortality with nicorandil in patients with ischemic heart failure [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2017, 17(1): 141–145.
- [8] HE W K, SU Q, LIANG J B, *et al.* The protective effect of nicorandil on cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(4): 1296–1301.
- [9] FAN Z Y, LI Y, JI H H, *et al.* Efficacy of oral nicorandil to prevent contrast-induced nephropathy in patients with chronic renal dysfunction undergoing an elective coronary procedure [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2019, 44(6): 1372–1382.
- [10] GUPTA S, SINGH P, SHARMA B. Neuroprotective effects of nicorandil in chronic cerebral hypoperfusion-induced vascular dementia [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(11): 2717–2728.
- [11] BABIC V, PETITPAIN N, GUY C, *et al.* Nicorandil-induced ulcerations: a 10-year observational study of all cases spontaneously reported to the French pharmacovigilance network [J]. *Int Wound J*, 2018, 15(4): 508–518.
- [12] ZHANG X, YANG S C, ZHANG P, *et al.* Efficacy of nicorandil on the prevention of contrast-induced nephropathy in patients with coronary heart disease undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Coron Artery Dis*, 2020, 31(3): 284–288.
- [13] DONG Y F, CHEN Z Z, ZHAO Z, *et al.* Potential role of microRNA-7 in the anti-neuroinflammation effects of nicorandil in astrocytes induced by oxygen-glucose deprivation [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 60–63.
- [14] LEE J M, KATO D, OI M, *et al.* Safety and efficacy of intracoronary nicorandil as hyperaemic agent for invasive physiological assessment: a patient-level pooled analysis [J]. *EuroIntervention*, 2016, 12(2): e208–e215.

(本文编辑:周娟)