

脳卒中時の心筋障害について — ラット脳虚血再灌流モデルを用いた検討 —

文 娟・渡辺 賢一・水戸沙耶佳・Prakash Paras・馬 梅蕾
Gurusamy Narasimman・Palaniyandi S. Suresh・Fadia A. Kamal
Veeraveedu T. Punniyakoti・国崎 恵・Reyad A. Elbarbary
新潟薬科大学・薬学部・臨床薬理学

太刀川 仁・小玉 誠・相澤 義房
新潟大学大学院医歯学総合研究科・循環器学分野
(医学部第一内科)

Myocardial Damage in Rats with Stroke

Juan WEN, Kenichi WATANABE, Sayaka MITO, Paras PRAKASH,
Meilei MA, Narasimman GURUSAMY, Suresh S PALANIYANDI,
Fadia K ALL, Thanikachalam V PUNNIYAKOTI,
Megumi KUNIZAKI and Reyad A ELBARBARY

*Department of Clinical Pharmacology,
Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences*

Hitoshi TACHIKAWA, Makoto KODAMA and Yoshifusa AIZAWA

*Division of Cardiology, Niigata University
Graduate School of Medicinal and Dental Sciences*

要 旨

脳卒中時には自律神経系の変化がおこり、心筋へも影響することが推定される。今回の研究目的は、ラット両総頸動脈閉塞による脳虚血再灌流（IR）時心筋障害の分子メカニズムを検討することである。SD ラットを用いて IR モデルを作成し、脳虚血再灌流群（Group-IR）と偽手術群（Group-N）とで比較検討した。平均血圧（mBP）を測定し、高速液体クロマトグラフィーを用いて血中・心筋組織中ノルエピネフリン（NE）濃度を測定した。更に、酸化ストレスを検討するためグルタチオンペルオキシダーゼ（GSHPx）・たん白カルボニル基及び誘導性一酸化窒素合成酵素（iNOS）・p38 分裂誘発物質活性型たん白キナーゼ（MAPK）活性を測定した。心筋組織細胞死を検討するため Terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling（TUNEL）染色を行った。Group-IR では血圧・NE 濃度が上昇し、2, 3, 5-triphenyletrazoli-

Reprint requests to: Kenichi WATANABE
Clinical Pharmacology
Niigata University of Pharmacy and
Applied Life Sciences
265-1 Higashizima,
Niigata 956-8603 Japan

別刷請求先：〒956-8603 新潟市東島 265-1
新潟薬科大学・薬学部・臨床薬理学

渡辺 賢一

um chloride (TTC) 染色における非染色範囲の増加がみられ、さらに GSHPx の減少・たん白カルボニル基及び誘導性 iNOS 活性反応の増加が見られた。また、心筋組織中の細胞死と p38 MAPK 活性は著しく上昇した。

以上の結果より、脳虚血再灌流モデルでは心障害がみられ、交感神経系・酸化ストレス誘導・p38 MAPK シグナルなどが関連すると推定された。

キーワード：脳卒中、心臓障害、酸化ストレス、p38 分裂誘発物質活性型たん白キナーゼ、ノルエピネフリン

Abstract

Stroke has been shown to alter autonomic and cardiovascular function. The purpose of this study was to reveal the molecular mechanism involved in brain-to-heart signaling triggered by ischemia reperfusion (IR) injury in rats after bilateral carotid artery occlusion (BCAO). Differential effect of stroke on cardiac damage was accompanied by a marked increase in blood pressure during BCAO-IR, followed by a modest increase in % non-stained area after 2, 3, 5-triphenyletrazolum chloride staining (TTC). In addition, increased plasma and myocardial nor-epinephrine levels corresponded with a mild decrease in glutathione peroxidase (GSHPx) and significantly increased protein carbonyl and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression after IR injury. p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) activity was significantly elevated and positively correlated with terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling (TUNEL) in the myocardium after IR injury. We conclude that BCAO induced IR injury leads to sympathetic hyperinnervation and oxidative stress induced myocardial damage through p38 MAPK signaling.

Key words: Brain-to-heart signaling, Bilateral carotid artery occlusion, Mitogen-activated protein kinase, Norepinephrine

緒 言

脳卒中は心臓神経系を活性化させ、不整脈・心障害などを引き起こす¹⁾。更に、自律神経機能変化・心筋障害の発症率上昇・血漿カテコラミン上昇などは突然死を引き起こすことが報告されている^{2) - 5)}。脳-心臓伝達に関与する分子伝達経路についてはまだ明らかになっていない。脳は自律神経系である交感神経系及び副交感神経系を通じ心臓（機能）を調節するが、その障害は心筋に影響を及ぼすことが知られている^{1) 6) 7)}。ノルエピネフリン（NE）の上昇は過感受性不整脈を引き起こす⁸⁾。神経伝達物質であるエピネフリン及びNEによる心臓β-アドレナリン受容体の活性化は心拍数の増大や房室伝導など収縮期収縮と拡張期弛緩の増大といった様々な生理学的作用を引き

起こす⁹⁾。心筋ではアドレナリン受容体がプロテインキナーゼC活性を介して様々なイオンチャネル及びトランスポーターの活性を変化させる。心筋梗塞患者の治療薬として用いられるβ遮断薬は脳卒中後の心臓疾患による突然死に関与する自律神経系に重要な役割をもたらすことが明らかにされている^{9) - 11)}。私達は脳卒中後に自律神経過剰刺激となり分裂誘発物質活性型たん白キナーゼ（MAPK）を介して心筋障害が引き起こされるのではないかという仮説を立てた。

今回の研究の目的は、両総頸動脈閉塞による虚血再灌流障害（IR）時の心筋障害がどのような分子的伝達経路メカニズムによるものかを調べることである。

材料と方法

動物 model

24ヶ月齢, 雄性 Sprague-Dawley ラット (Charles River Japan Inc., Kanagawa, Japan) (500-540g) を用いた. ラットは以下の2群に分けた. Group-N; 偽手術群 (n=5), Group-IR; 両側頸動脈閉塞群 (n=5). IRモデルは Ichikawa らの方法を用いた¹²⁾. 処置中, 動物の体温を温熱パッド (Model: TP-401, Gaymar Industries Inc, NY) を用い, 37.5℃に維持した. 麻酔はペントバルビタール (30mg/kg) で維持した. 動脈クリップを用いて左右頸動脈を結紮し, 85分間虚血した. 脳虚血状態は眼球が赤から白に変化したことで確認した. 虚血終了後, 頸動脈からクリップをはずし, 血流を再開させ45分間再灌流 (IR) した. ラットは麻酔下で断頭, その後心臓を摘出し各実験に用いた.

平均血圧測定と TTC 染色

平均血圧 (mBP) は Power Lab System (AD Instruments Castle Hill, NSW, と Australia) を用い平均血圧 (mBP) を測定した¹³⁾. 心筋は 2, 3, 5-triphenyletrazolum chloride (TTC) 染色法を用いて測定した¹⁴⁾.

組織ホモジネートの作成

心臓を摘出し, 重量を測定後即座に液体窒素で凍結保存した. Lysis buffer (50mM Tris HCl (pH 7.4), 200mM NaCl, 20mM NaF, 1.0mM Na₃VO₄ 及び 1.0mM DTT) にてホモジナイズした心尖部を用いウエスタンブロット法を行った. 試料は使用時まで-80℃で保存した. グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) 活性及びカルボニルたん白の濃度を測定するため, 組織を 0.85% NaCl で洗浄後, 1.15% (w/v) KCl 含有凍結 0.05M Phosphate buffer に懸濁 (湿性組織 1g/9ml) し, Polytron PT 10-35 homogenizer (Kinematica AG, Littau Switzerland) を用いて 0℃でホモジネートを作成した. 試料の総タンパク含量は牛血清アルブミン (BSA) を標準物質として用いた bicin-

chonic acid (BCA) 法を用いて測定した.

NE 含量測定

採取した血漿及び心筋組織は NE 濃度測定まで-80℃で保存した. 血漿 NE 濃度は上記で述べた¹⁵⁾ ように内部標準物質を 3,4-ジヒドロキシベンジルアミンとし, 電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) で測定した.

GSHPx 活性の測定

GSHPx 活性は Wendell¹⁶⁾ の方法を用いた. 1.15% (w/v) KCl 含有 0.05M Phosphate buffer 中のホモジネートの一部 (0.4mg タンパク) を 230ml カップリング溶液 (EDTA ニナトリウム 33.6mg, NaN₃ 6.5mg, グルタチオン還元剤 30.7mg, NADPH 16.7mg 及びグルタチオン還元剤 100単位/50mM Tris-HCl pH7.6 100ml 混合液) にマイクロプレート中で混合した. その後, 濃度 (量) を 0.05M phosphate buffer を用いて 260ml に調整した. 1mM H₂O₂ を 40ml 加えた後, マイクロプレート分光光度計 (Labsystem Fluoroskan Ascent CF, Japan) を用いて蛍光 (Ex.335nm/Em.465nm) を測定した.

カルボニルタンパクの測定

酵素標識免疫吸着測定法 (ELISA) にて心室ホモジネート中のカルボニルタンパク濃度を測定した¹⁷⁾. CuSO₄/H₂O₂ (3mM/5mM) により酸化した BSA を標準カルボニルタンパクとして用いた. 標準酸化 BSA のカルボニル基濃度を以前報告したように比色法を用いて測定した¹⁸⁾. 組織ホモジネートを 3500rpm で 10分間遠心分離した. 次に上清を PBS で 2倍に希釈し, 10% 硫酸ストレプトマイシン (9:1, v/w) で 4℃・15分間インキュベートした. その後, 10,000rpm で 10分間遠心分離し, 標準物質として BSA を用い, BSA 法にて上清のタンパク濃度を測定し, タンパク濃度を PBS で 1mg/ml に調整した. 試料 (500μl) を 2.5N HCl (100μl) 含有 10mM 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) で室温下 1時間反応

させた。試料中のタンパク及び酸化 BSA を 20 % トリクロロ酢酸 (TCA) で沈殿させ、再度タンパク濃度を測定し、 $4\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ に調整した。ELISA の標準曲線を $40\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA で希釈した酸化 BSA を用い、一定値 (0 - 40 %) に調整した。実験試料の一部 ($100\mu\text{l}$) 及び標準物質 (タンパク $4\mu\text{g}$) を 96-well 免疫プレートに入れ、 4°C で一晩インキュベートした。プレートを 0.1 % Tween20 (PBST) 含有 PBS で洗浄し、室温下 2 時間、blocking buffer (PBST 含有 1 % BSA) でインキュベートした。さらに試料を第一抗体 [mouse anti-dinitrophenyl (DNP) IgE, Sigma, St. Louis, MO] で 37°C 下 4 時間インキュベートし、PBST で洗浄後、第二抗体 (rat anti-mouse IgE, Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) で 37°C 下 1 時間インキュベートした。3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジン (Sigma) $100\mu\text{l}$ を加えてペルオキシダーゼ反応を行い、 0.18M H_2SO_4 で反応を止めた。マイクロプレートリーダー (Model 550, Bio-Rad, Hercules, CA) を用い、 450nm で吸光度を測定した。

ウエスタンブロット法によるタンパク分析

c-Jun NH_2 末端キナーゼ (JNK), 細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2 (ERK1/2), p38 MAPK の活性型リン酸化二次反応及び誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の高特異性抗体を用い、心室ホモジネートのウエスタンブロット法を行った。総 MAPK 発現量に対する phospho-MAPK 発現量を測定することにより (標準化することにより) MAPK 活性を定量し、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を標準として iNOS 発現量を測定した。Group-N の MAPK 活性を 1 とした。各タンパクを 10 % SDS-PAGE (JNK, ERK1/2, p38 MAPK 及び GAPDH) 及び 5 % SDS-PAGE (iNOS) に分けた。その後、電気泳動にてニトロセルロース膜に (タンパクを) 転写した。膜を 5 % 無脂肪ドライミルク含有 TBS-T (20mM Tris, pH7.6 137mM NaCl, 0.5 % Tween 20) で室温下 1 時間ブロッキングし、一次抗体を入れインキュベートさせた。

各抗体；抗 phospho JNK ウサギポリクローナル抗体, 抗 JNK ウサギポリクローナル抗体, 抗 phospho ERK1/2 マウスモノクローナル抗体, 抗 ERK1/2 ウサギポリクローナル抗体, 抗 phospho p38 MAPK ウサギポリクローナル抗体, 抗 p38 MAPK ウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), 抗 iNOS マウスモノクローナル抗体 (Sigma), 抗 GAPDH ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) は 1:1000 に希釈し用いた。一次抗体のインキュベーション終了後、結合抗体を horse-radish peroxidase 結合 (混合) 型二次抗体 (Santa Cruz) と反応させ、化学発光検出液 (ECL Plus, Amersham, Piscataway, NJ) で検出した。

ターミナルトランスフェラーゼ (TdT) (TUNEL) 染色法

心室のパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、アルコール類で再水和させその後 20mg/mL プロテイナーゼ K にてインキュベーションした。PBS で洗浄後、3 % H_2O_2 で 5 分間インキュベーションし、再度 PBS で洗浄した。TUNEL 染色は専用キット (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて行った。切片を封入し、光学顕微鏡で観察した。

統計処理

数値は平均±標準誤差 (SEM) で表し、各群の統計学的検討は Tukey 法を用いた一元分散分析法で行った。Group 間の値の相互関係は回帰分析及び相互係数 (r) によって決定した。P 値が 0.05 未満のものを有意とした。

結 果

mBP, NE 濃度と TTC 染色

mBP は虚血及び再灌流時に変化した。mBP は虚血時に上昇し、再灌流時に下降した (図 1A)。虚血-再灌流誘発心筋障害における自律神経調節機能を検討するため、血漿及び心筋 NE レベルを測定した。血漿と心筋間で NE 濃度の有意な上昇が見られた。血漿 NE レベルは図 1B に示すよう

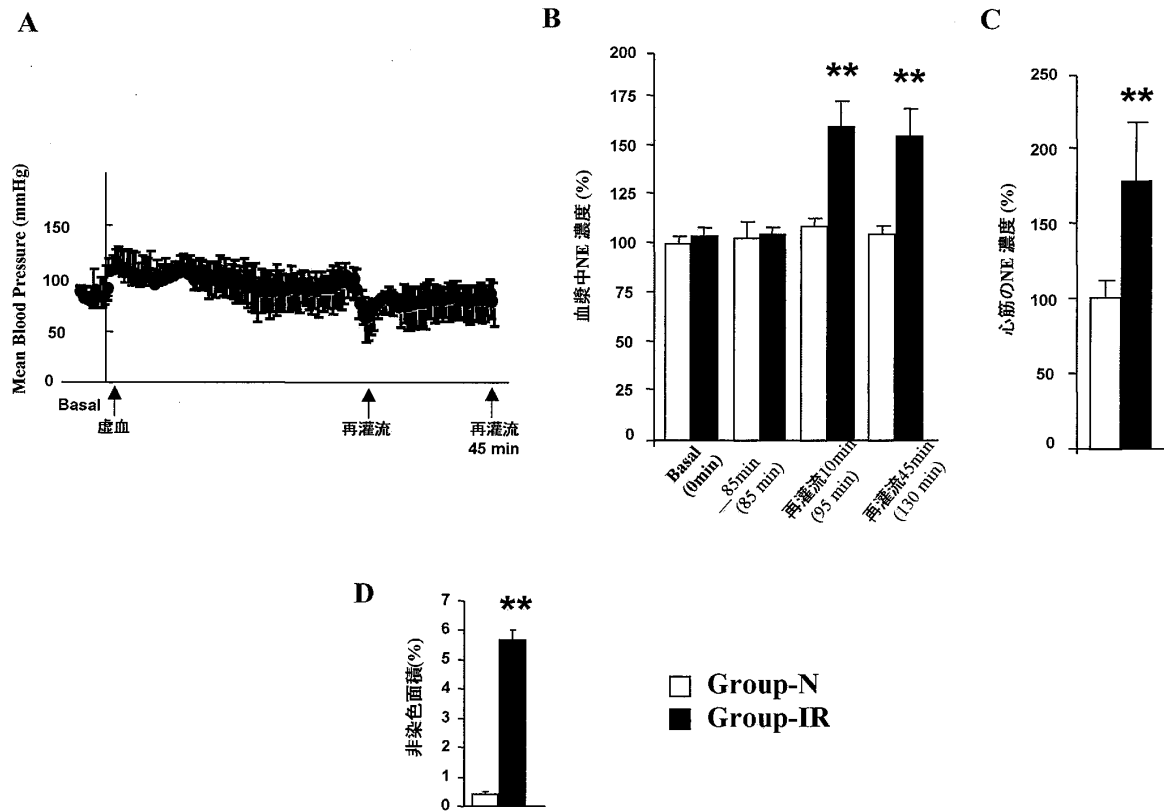


図1 血圧とNE

A ; 虚血再灌流中の血圧変動

B, C ; 虚血再灌流中の血中及び心筋組織中ノルエピネフリン濃度

D ; TTC 染色における非染色面積 (P < 0.01 VS Group - N)

** p < 0.01 vs Group - N. Group - N: 偽手術群, Group - IR: 虚血再灌流群

に再灌流後10分で最大となった ($161 \pm 21\%$, $P < 0.01$ vs. Group - N). Group - IRにおける心筋のNEレベルはGroup - Nと比較し1.67倍と有意に上昇した ($P < 0.01$) (図1C). さらに, TTC染色法において, Group - IR群での非染色部分はGroup - N群と比較してGroup - IR群 ($5.7 \pm 0.3\%$) で上昇していた (図1D).

酸化ストレスとMAPK活性

GSHPxは生体内抗酸化酵素である. Group - N群と虚血再灌流群と比較し有意差は見られなかった (図2A). タンパクの酸化はカルボニルタンパク誘導体の生成を介し起こる. 酸化タンパクの指標であるカルボニルタンパクは図2Bに示すよう

にIR後の心臓組織で有意に上昇した ($135.3 \pm 3.8\%$, $P < 0.05$ vs. Group - N). 一酸化窒素 (NO) の発現量を測定するため, NOフリーラジカル誘導により生成されるiNOS酵素を測定した. 内部標準物質としてGAPDHを用い, ウェスタンブロット法にて濃度を測定した結果, IR後iNOS発現量は 1.47 ± 0.05 倍 ($P < 0.05$, vs. Group - N) と有意に上昇した (図2C). ラットにおけるIR後のp38 MAPK, JNK及びERK1/2活性については, 心筋p38 MAPK活性はGroup - Group - N)と有意に誘発し (図2D), JNK活性も 1.10 ± 0.023 倍に上昇したが (図2E), ERK1/2活性はGroup - Nと比較し 0.96 ± 0.029 倍と減少した (図2F).

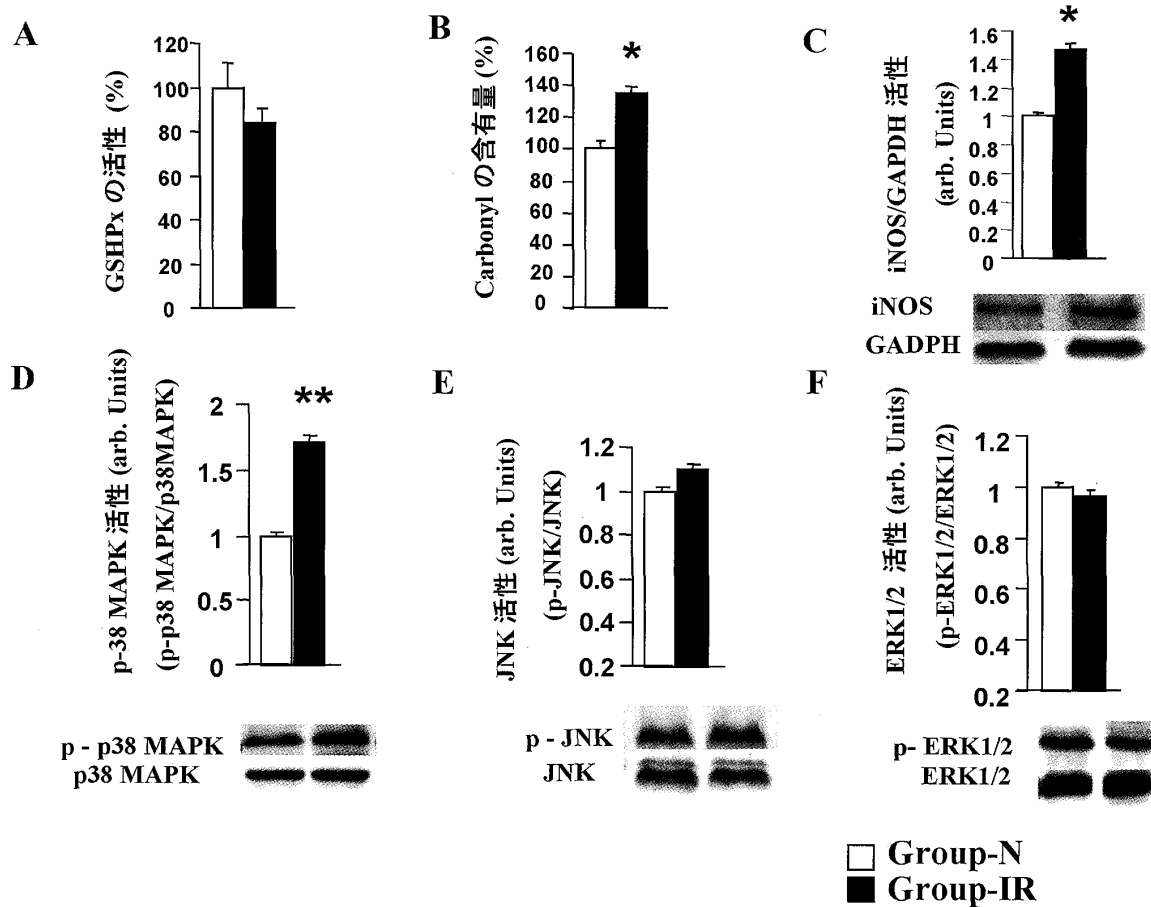


図2 酸化ストレスと MAPK

偽手術群 (Group-N) と虚血再灌流群 (Group-IR) における各データの比較

** $p < 0.01$ vs Group-N, * $p < 0.05$ vs Group-N

TUNEL 染色

各群の心室切片由来 TUNEL 染色陽性細胞の顕微鏡写真を図 3A に示した. Group-IR では TUNEL 染色陽性細胞が有意に増加した ($0.1 \pm 0.04\%$, $P < 0.01$ vs. Group-N) (図 3B). p38 MAPK 活性及び総 TUNEL 染色陽性細胞間に有意な相互関係があることが分かった (図 3C).

考 察

脳卒中は自律神経機能に変化をもたらし, 心筋壊死や不整脈さらに関連機能による突然死を引き起こすことが分かっている¹⁾. 大脳皮質は心血管

系調節に参与する副交感神経系及び交感神経系を調節する最も重要な部位だと考えられており, また虚血性脳卒中に冒されやすいと考えられている¹⁹⁾. 両総頸動脈閉塞時の心臓血管の反応は, 主に末梢交感神経から放出される NE によって伝達され则认为られている²⁰⁾. 我々は虚血時に mBP が有意に上昇することを観察した. ラットにおける局所脳虚血が大脳皮質に発生する場合, 血圧が一時的に上昇し²¹⁾, さらに心筋と血漿中の NE レベルが上昇したことから, 虚血再灌流後に自律神経興奮システムが過剰に活性化されたことが示された. 交感神経除神経は交感神経応答性カテコラミンを相乗させ, その過程で過敏性除神

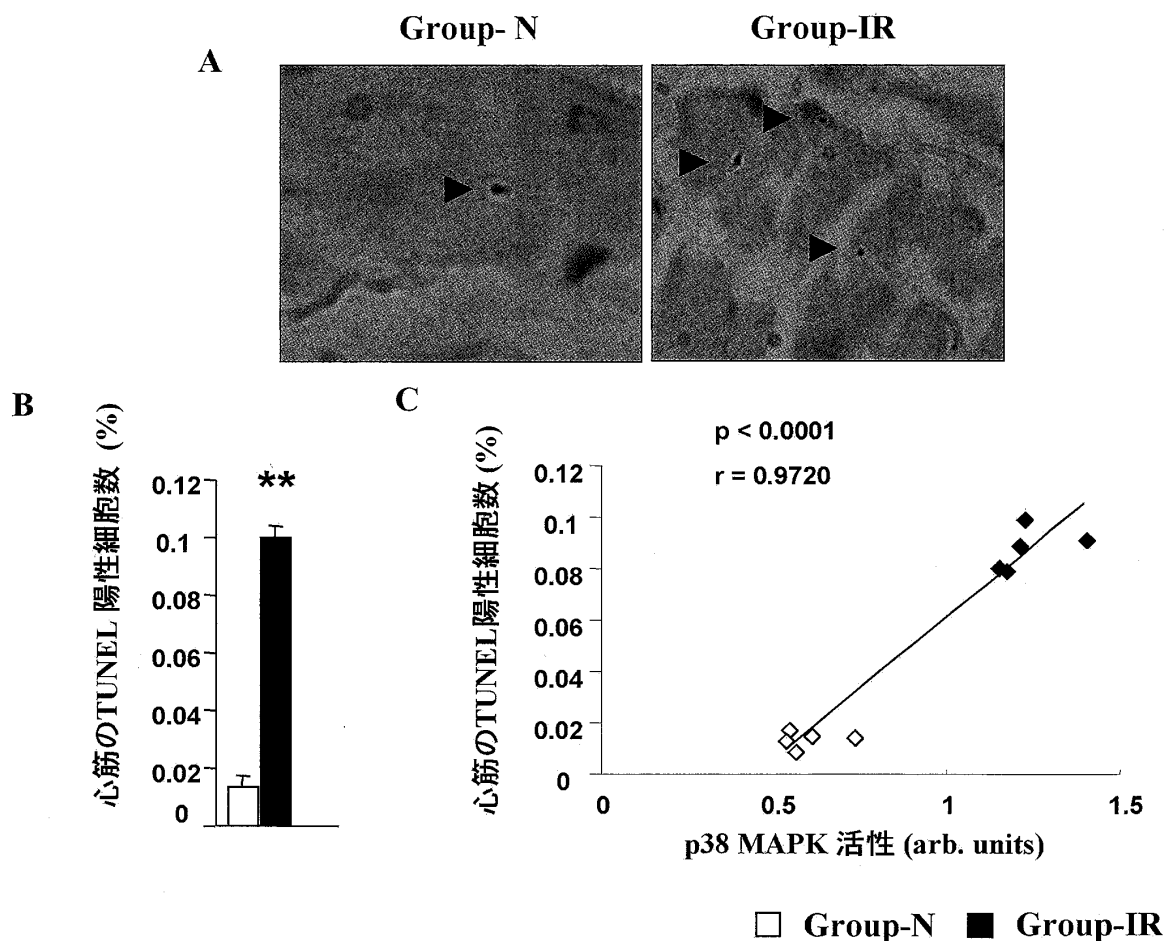


図3 心筋組織像とTUNEL染色

A ; 各群における心筋組織像 (×400)

B ; 各群における心筋のTUNEL染色陽性細胞数

C ; 心筋のTUNEL染色陽性細胞数とp38 MAPK活性の相関性グラフ

** $p < 0.01$ vs Group - N

経を引き起こしている²²⁾⁻²⁴⁾。

我々はGroup-IRにおいて心臓組織のGSHPxレベルが減少するのに伴いカルボニルタンパク含有量及びiNOSタンパク発現の増加が起こることを証明した。脳卒中後心筋障害と酸化ストレスとの関わりを否定したOndrejickovaらの論文²⁵⁾と対照的である。この違いは我々の実験法が他の報告と比較し酸化ストレスをより高度におきるように変更し、虚血時間を延長したIRモデルのためと考えられる。

本実験でp38 MAPK活性化上昇がJNK及び

ERK1/2と比較しTUNEL染色陽性細胞核の増加と密接な関係をもつことが分かった。今回の研究でNEが酸化ストレスの増大やMAPK活性の増大を引き起こし²⁶⁾、活性化誘発物質を増やし、さらに心筋細胞死の発生が観察されたことを証明した。

本研究でMAPKは脳-心臓伝達に対し重要な役割を果たしており、MAPK遮断療法は臨床現場において脳卒中患者の予後改善に有効な方法であることを示した。IR誘発脳障害後の交感神経過剰活性と酸化ストレスが引き起こされ、心臓でも

p38MAPK の活性化細胞死がおきていることが証明された。

この論文の要旨は第 245 回新潟循環器談話会にて発表した。

参 考 文 献

- 1) Natelson BH: Neurocardiology: an interdisciplinary area for the 80s. *Arch Neurol* 42: 178 - 184, 1985.
- 2) Mayer SA, Fink ME, Homma S, et al: Cardiac injury associated with neurogenic pulmonary edema following subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 44: 815 - 820, 1994.
- 3) Talman WT: Cardiovascular regulation lesions of the central nervous system. *Ann Neurol* 18: 1 - 12, 1985.
- 4) Oppenheimer SM, Cochetto DF and Hachinski VC: Cerebrogenic cardiac arrhythmias. Cerebral electrocardiographic influences and their role in sudden death. *Arch Neurol* 47: 513 - 519, 1990.
- 5) Silver FI, Norris JW, Lewis AJ and Hachinski VC: Early mortality following stroke: a prospective review. *Stroke* 15: 492 - 496, 1984.
- 6) Xu Y, Zhang Z, Timofeyev V, et al: The effects of intracellular Ca^{2+} on cardiac K^+ channel expression and activity: novel insights from genetically altered mice. *J Physiol* 562: 745 - 758, 2005.
- 7) Zipes DP and Wellens HJ: Sudden cardiac death. *Circulation* 98: 2334 - 2351, 1998.
- 8) Wingo TL, Shah VN, Anderson ME, Lybrand TP, Chazin WJ and Balaser JR: An EF-hand in the sodium channel couples intracellular calcium to cardiac Excitability. *Nat Struct Mol Biol* 11: 219 - 225, 2004.
- 9) Rubart M and Zipes DP: Mechanisms of sudden cardiac death. *J Clin Invest* 115: 2305 - 2315, 2005.
- 10) Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y and Zhou JY: Effect of beta-Blockers on Cardiac Function and Calcium Handling Protein in Postinfarction Heart Failure Rats. *Chest* 128: 1812 - 1821, 2005.
- 11) Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, et al: Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res* 86: 816 - 821, 2000.
- 12) Ichikawa H and Konishi T: In vitro antioxidant potentials of traditional Chinese medicine, Shengmai San and their relation to in vivo protective effect on cerebral oxidative damage in rats. *Biol Pharm Bull* 25: 898 - 903, 2002.
- 13) Watanabe K, Ohta Y, Nakazawa M, Higuchi H, Hasegawa G, Naito M, Fuse K, Ito M, Hirono S, Tanabe N, Hanawa H, Kato K, Kodama M and Aizawa Y: Low dose carvedilol inhibits progression of heart failure in rats with dilated cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 130: 1489 - 1495, 2000.
- 14) Chopra K, Singh M, Kaul N, Andrabhi KI and Ganguly NK: Decrease of myocardial infarct size with desferrioxamine: possible role of oxygen free radicals in its ameliorative effect. *Mol Cell Biochem* 113: 71 - 76, 1992.
- 15) Watanabe K, Hirokawa Y and Shibata A: Determination of catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Bull Coll Biomed Technol Niigata Univ* 3: 30 - 35, 1987.
- 16) Wendel A: Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325 - 333, 1981.
- 17) Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM and Winterbourn CC: Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* 23: 361 - 366, 1997.
- 18) Reznick AZ and Packer L: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233: 357 - 363, 1994.
- 19) Tokgozoglu SL, Batur MK, Topaloglu MA, Saribas O, Kes S and Oto A: Effect of stroke localization on cardiac autonomic balance and sudden death. *Stroke* 30: 1307 - 1311, 1999.
- 20) Brassard M and Yamaguchi N: Evidence that increases in circulating catecholamines of adrenal origin are not involved in pressor response to bilateral carotid occlusion in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16: 147 - 160, 1989.
- 21) Perez-Trepichio AD, Williams JL, Block CH and

- Jones SC: Cardiovascular changes during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24: 691 - 696, 1993.
- 22) Heath BM, Xia J, Dong E, et al: Overexpression of nerve growth factor in the heart alters ion channel activity and beta - adrenergic signalling in an adult transgenic mouse. 512: 779 - 791, 1998.
- 23) Barber MJ, Mueller TM, Henry DP, Felten SY and Zipes DP: Transmural myocardial infarction in the dog produces sympathectomy in noninfarcted myocardium. *Circulation* 67: 787 - 796, 1983.
- 24) Warner MR, Wisler PL, Hodges TD, Watanabe AM and Zipes DP: Mechanisms of denervation supersensitivity in regionally denervated canine hearts. *Am J Physiol* 264: H815 - 820, 1993.
- 25) Ondrejickova O, Horakova L, Juranek I, Ziegelhoeffer A and Stolc S: Effect of stobadine on lipid peroxidation in brain and heart after ischemia and reperfusion of the brain. *Life Sci* 65: 1959 - 1961, 1999.
- 26) Qin F, Shite J and Liang CS: Antioxidants attenuate myocyte apoptosis and improve cardiac function in CHF: association with changes in MAPK pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H822 - 832, 2003.
- (平成17年12月28日受付)
-