



失血预适应对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用

自从1986年Murry等[1]在犬模型中首先发现缺血预适应对心肌损伤具有显著的保护作用以来,人们对缺血预适应的心肌保护机制进行了深入研究,发现内源性保护物质(如降钙素基因相关肽等)在其中起重要作用[2][3]。近年来,有关其他有害刺激预适应对心肌的保护作用也有报道,但失血所致的低血容量预适应对心肌的保护作用目前尚不清楚。本研究旨在通过大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型,评价失血所致的低血容量预适应对心肌的保护作用,并探索降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠,体质量(287.5 ± 10.6) ($265 \sim 309$) g,由第一军医大学动物中心提供。

1.1.2 试剂 CGRP放射免疫试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供;硝基四唑氮蓝(NBT)为Serva产品;CGRP多克隆抗体(polyclonal antibody, PcAb)由第一军医大学珠江医院心内科实验室制备[4];伊文思蓝为Sigma产品。

1.1.3 设备 DH-140B动物人工呼吸机由浙江医大医学仪器实验厂提供;LH-662型传感器调理仪由南京隆海科技实业公司提供;NSA-III型生理信号处理系统由海军神经生物学研究中心提供。

1.2 动物模型的复制

将SD大鼠用3%戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉,行气管插管,室内空气通气,频率 $65 \sim 70$ 次/min,潮气量 $3 \sim 4 \text{ ml}$ 。实验期间维持血pH、 PO_2 、 PCO_2 在正常范围。从颈动脉插管监测血压。从颈静脉插管以补液和给药。持续记录心电变化。于左侧第三、四肋间距正线外 0.5 cm 处切开皮肤,开胸剪开心包暴露心脏。从位于肺动脉圆锥与左心耳之间的左冠状静脉为标志,用穿有3-0缝合线的 $3/8$ 弯针跨腔钩绕左冠状动脉前降支主支。线两端共穿过一根聚乙烯小管以形成闭环,拉紧闭环并用止血钳固定即产生缺血,放松闭环即发生再灌注。结扎前1 min给予肝素($250 \text{ U/kg} \cdot \text{b.w.}$)。缺血的标志为:(1)左室前壁发绀;(2)ST段抬高和R波增高。再灌注的标志:(1)发绀区充血发红;(2)抬高的ST段和增高的R波恢复正常。

1.3 实验分组

将60只SD大鼠随机分为3组,每组20只。失血组:每只先放血 $3 \sim 4 \text{ ml}$,持续15 min;抗体组:每只放血前先注射PcAb($2.5 \text{ mg/kg} \cdot \text{b.w.}$),随后放血 $3 \sim 4 \text{ ml}$,持续15 min;对照组:只插管不放血。3组均接受30 min缺血-2 h再灌注,其中8只缺血前时间抽血测血浆CGRP浓度。血浆CGRP浓度用放射免疫法测定。

1.4 梗死大小的测定

用伊文思蓝+NBT双重染色,称质量来测量心肌梗死区域大小[5]。

再灌注2 h后,重新拉紧闭环使冠状动脉阻塞,用止血钳固定。从静脉导管中注入5%伊文思蓝 1 ml ,待大鼠眼球变蓝后,用10%的KCl 0.5 ml 迅速杀死大鼠。小心切除心脏,用敷料吸干心脏表面的水,放置 $-4 \text{ }^\circ\text{C}$

冰箱, 30 min后取出。趁未解冻前从心尖向心底方向将心脏均匀切为7~8片, 灌注区染为蓝色, 非灌注区不染色。在解剖显微镜下小心将蓝色区与未染色区分离。将未染色区置于pH7.4 0.5 mg/ml的NBT溶液中, 并放于37 °C水箱孵化20 min。坏死区因无脱氢酶故不被染色, 未坏死区因含有完整脱氢酶故染为紫蓝色。在解剖显微镜下, 小心将染色区与未染色区分离。将蓝色区、紫蓝色区和未染色区用电子天平称质量。紫蓝色区和未染色区之和为危险区(AAR), 染色区为坏死区(IS)。梗死大小用IS在AAR中所占的百分比表示。

1.5 统计学处理

多个均值的比较用方差分析, 各组间的两两比较用SNK或Dunnett。所有数据均用SPSS10.0统计软件处理。

2 结果

从表1可以看出, 失血组的血浆CGRP浓度均较对照组和多抗组显著为高($F=12.4, P=0.032\sim 0.005$)。多抗组的血浆CGRP浓度与对照组无显著差别($P=0.206$)。

表 1 三组大鼠的血浆 CGRP 浓度变化($n=8, \text{pg/L}$)

Tab.1 Plasma CGRP levels of the 3 groups ($n=8, \text{pg/L}$)

Group	Plasma CGRP levels
Control	139±19*
Phlebotomy	221±48
PcAb	161±27*

* $P<0.05$ vs phlebotomy; PcAb: Ployclonal antibody; CGRP: Calcitonin gene-related peptide

表1 三组大鼠的血浆CGRP浓度变化 ($n=8, \text{pg/L}$)

Tab.1 Plasma CGRP levels of the 3 groups ($n=8, \text{pg/L}$)

* $P<0.05$ vs phlebotomy; PcAb: Ployclonal antibody; CGRP: Calcitonin gene-related peptide

从表2看出, 体质量($F=0.322, P=0.726$)、心脏质量($F=0.735, P=0.487$)和AAR($F=0.154, P=0.858$)在三组大鼠间均无显著性差异。失血组的IS($F=52.4, P<0.001$)和IS/AAR($F=43.7, P<0.001$)均明显低于对照组和多抗组, 差异均有显著性。多抗组的IS($P=0.0001$)和IS/AAR($P=0.0001$)也较对照组显著为低。

表 2 三组大鼠梗死大小的变化 ($n=12$)

Tab.2 Infarct size in the rats of the 3 groups ($n=12$)

	Body weight (g)	Heart weight (g)	AAR (g)	IS (g)	IS/AAR (%)
Control	288±11	0.97±0.11	0.28±0.03	0.13±0.01*	48±4*
Phlebotomy	289±12	0.95±0.10	0.27±0.05	0.05±0.02	17±9
PcAb	286±10	0.91±0.11	0.27±0.03	0.08±0.02**	32±10**

* $P<0.05$ vs phlebotomy; ** $P<0.05$ vs control; AAR: Area at risk; IS: Infarct size

表2 三组大鼠梗死大小的变化 ($n=12$)

Tab.2 Infarct size in the rats of the 3 groups ($n=12$)

* $P<0.05$ vs phlebotomy; ** $P<0.05$ vs control; AAR: Area at risk; IS: Infarct size

3 讨论

Murry等[1]发现预先给犬左冠脉回旋支连续4次5 min缺血-5 min再灌注,可使其后持续缺血40 min产生的心肌梗死范围较对照组明显缩小(7% vs 29%),这表明对短暂缺血的快速适应可减慢随后长时间缺血时心肌细胞死亡速度。以后在犬、兔、猪、大鼠等模型中进行的大量研究均证实了这种现象的存在[3~5]。心肌缺血预适应(ischemia preconditioning, IPC)不仅能有效地降低心肌梗死范围,而且还能减少室性心律失常的发生、减轻室性心律失常的严重程度和改善心功能[5][6]。

我们的研究表明,在大鼠缺血-再灌注模型中,失血组的IS(0.05 ± 0.02) g和IS/AAR($17\% \pm 9\%$)均较对照组(0.13 ± 0.01) g, ($48\% \pm 4\%$)和抗体组(0.08 ± 0.02) g, ($32\% \pm 10\%$)明显降低($P < 0.001$),提示失血预适应能显著缩小心肌坏死的范围,预先用CGRP多抗能部分抵消上述有益作用。另外,我们还发现,失血组的血浆CGRP浓度较对照组($P = 0.005$)和抗体组($P = 0.032$)显著为高,提示失血可引起CGRP的释放,且释放的血中CGRP能被CGRP特异性多抗所中和。这说明失血预适应所致的心肌保护作用与CGRP有关。

失血预适应所致心肌保护作用的机制目前尚不清楚。有研究表明,IPC缩小心肌梗死范围的机制与G蛋白偶联受体($\alpha 1$ 受体、腺苷A1受体、M型乙酰胆碱受体等)激活、蛋白激酶C(PKC)激活及ATP敏感钾通道(KATP)激活有关[7]。而内源性保护物质(如腺苷、去甲肾上腺素、乙酰胆碱、降钙素基因相关肽等)在IPC中起重要作用。另有研究表明,非心肌本身缺血(如肾缺血预适应[8]、四肢缺血预适应[9]等)也能诱发心肌保护作用,说明这种保护作用是全身的而不是局部的。即只要引起内源性保护物质的释放,进而激活心肌保护机制,就能产生保护作用。因此,失血引起的低血容量状态可激活神经-体液系统,导致内源性保护物质(如CGRP)的释放,进而通过上述IPC启动心肌保护机制。但其确切的机制还有等待于今后进一步研究。

参考文献:

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 75: 1124-36.
- [2] 欧阳伟, 钱学贤, 李志梁, 等. 降钙素基因相关肽在整体大鼠心肌缺血预适应的作用及ATP敏感钾通道的关系[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(1): 25-8.
- [3] OuYang W, Qian XX, Li ZL, et al. Role of calcitonin gene-related peptide in myocardial ischemic preconditioning and its relation with ATP-sensitive K⁺ channel in intact rats[J]. *J First Mil Med Univ*, 2001, 21(1): 25-8.
- [4] James RP. Protection of the heart by ischemia preconditioning mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1994, 15(1): 19-25.
- [5] 欧阳伟, 钱学贤, 李志梁, 等. 降钙素基因相关肽抗血清的制备和纯化[J]. *第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ)*, 1998, 18(1): 64.
- [6] 欧阳伟, 钱学贤, 付向阳, 等. 缺血预适应对整体大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及ATP敏感钾通道在其中的作用[J]. *第一军医大学学报*, 1999, 19(4): 318-20.
- [7] OuYang W, Qian XX, Fu XY, et al. Protective effects of cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury and role of ATP-sensitive potassium channels in the effect in rat[J]. *J First Mil Med Univ*, 1999, 19(4): 318-20.
- [8] Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits[J]. *Circulation*, 1991, 84: 341-9.
- [9] 欧阳伟. 人心肌缺血预适应的研究进展[J]. *国外医学·心血管疾病分册*, 1997, 24(6): 6.

[8] 冯志强, 冉兵, 张春来, 等. 肾缺血预处理增强心脏的电稳定性[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(5): 444-5.

Feng ZC, Ran B, Zhang CL, et al. The increase in electrocardiac stability by kidney ischemic preconditioning[J]. Chin J Pathophysiol, 1999, 15(5): 444-5.

[9] 卢彦珍, 董传仁, 张友云, 等. 非创伤缺血预处理对大鼠缺血再灌注心脏的作用[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(3): 252-4.

Lu YZ, Dong CR, Zhang YY, et al. Effects of non-wounded ischemic preconditioning on myocardium ischemic reperfusion injury in rats[J]. Chin J Pathophysiol, 1999, 15(3): 252-4.

参考文献:

[1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 75: 1124-36.

[2] 欧阳伟, 钱学贤, 李志梁, 等. 降钙素基因相关肽在整体大鼠心肌缺血预适应的作用及ATP敏感钾通道的关系[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 25-8.

OuYang W, Qian XX, Li ZL, et al. Role of calcitonin gene-related peptide in myocardial ischemic preconditioning and its relation with ATP-sensitive K⁺ channel in intact rats[J]. J First Mil Med Univ, 2001, 21(1): 25-8.

[3] James RP. Protection of the heart by ischemia preconditioning mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation[J]. Trends Pharmacol Sci, 1994, 15(1): 19-25.

[4] 欧阳伟, 钱学贤, 李志梁, 等. 降钙素基因相关肽抗血清的制备和纯化[J]. 第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ), 1998, 18(1): 64.

[5] 欧阳伟, 钱学贤, 付向阳, 等. 缺血预适应对整体大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及ATP敏感钾通道在其中的作用[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 318-20.

OuYang W, Qian XX, Fu XY, et al. Protective effects of cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury and role of ATP-sensitive potassium channels in the effect in rat[J]. J First Mil Med Univ, 1999, 19(4): 318-20.

[6] Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits[J]. Circulation, 1991, 84: 341-9.

[7] 欧阳伟. 人心肌缺血预适应的研究进展[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 1997, 24(6): 6.

[8] 冯志强, 冉兵, 张春来, 等. 肾缺血预处理增强心脏的电稳定性[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(5): 444-5.

Feng ZC, Ran B, Zhang CL, et al. The increase in electrocardiac stability by kidney ischemic preconditioning[J]. Chin J Pathophysiol, 1999, 15(5): 444-5.

[9] 卢彦珍, 董传仁, 张友云, 等. 非创伤缺血预处理对大鼠缺血再灌注心脏的作用[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(3): 252-4.

Lu YZ, Dong CR, Zhang YY, et al. Effects of non-wounded ischemic preconditioning on myocardium ischemic reperfusion injury in rats[J]. Chin J Pathophysiol, 1999, 15(3): 252-4.