

失血预适应对大鼠心肌缺血 - 再灌注损伤的保护作用

欧阳伟¹ 钱学贤² 李志梁² 第一军医大学珠江医院¹ 核医学科袁心内科袁广东广州 510282 宛

摘要目的 评价失血预适应对大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤的保护作用并探索降钙素基因相关肽 calcitonin gene-related peptide, CGRP 所起的作用方法 将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为三组对照组 失血组 多抗组每组均行 30min 缺血-2h 再灌注失血组在失血 15min 后行缺血 / 再灌注多抗组在失血前静注 CGRP 多抗 5mg/kg b.w. 坏死区 NBT 染色确定梗死大小用 IS 占危险区 AAR 的百分数表示结果 失血组的血浆 CGRP 浓度均较对照组和多抗组显著为高 $F=12.4, P=0.032-0.005$ 失血组的 IS $F=52.4, P<0.001$ IS/AAR $F=43.7, P<0.001$ 均较对照组和多抗组显著为低 多抗组的 IS $F=0.0001$ IS/AAR $F=0.0001$ 均较对照组显著为低结论 失血预适应对大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤具有显著的保护作用 CGRP 在其中起一定的作用

关键词 缺血 预适应 缺血 / 再灌注损伤 心肌保护

中图分类号 R541.4;R516 文献标识码 A 文章编号 000-28(2003)01-0065-03

Protective effects of preconditioning phlebotomy against myocardial ischemia-reperfusion injury in rat

OUYANGWei¹, QIANXue-xian², LIZhi-liang²

Department of Nuclear Medicine¹ and Cardiology², Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of preconditioning phlebotomy against ischemia-reperfusion injury and the role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in this protection mechanism. Methods Sixty SD rats were randomly assigned in equal number into control, phlebotomy, and CGRP polyclonal antibody (PcAb) groups, all of which were subjected to 30min regional ischemic followed by two-hour reperfusion, initiated 15min after phlebotomy in the latter 2 groups. The rats in CGRP PcAb group were given the antibody (2.5mg/kg) before phlebotomy. After the operations, plasma CGRP level was determined in 8 rats from each group by radioimmunoassay, and the infarct size (IS) by nitro blue tetrazolium, represented as percentage of the area at risk (AAR). Results The mean plasma CGRP level was significantly increased in phlebotomy group compared with the levels in control and PcAb groups ($F=12.4, P=0.032-0.005$), and a significant reduction in IS $F=52.4, P<0.001$ and IS/AAR $F=43.7, P<0.001$) occurred in phlebotomy group. Conclusion Preconditioning phlebotomy has obvious cardioprotective effect against ischemia-reperfusion injury, in the mechanism of which CGRP may play a role.

Key words: phlebotomy; preconditioning; ischemia-reperfusion injury; cardioprotective effect

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^[2-4]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^[5]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

收稿日期 002-07-31

作者简介 欧阳伟 963- 宛男袁江西婺源人袁 998 年毕业于第一军医大学袁 士袁主治医师袁 电话 20-61643477 袁-mail yw88@163.net

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠袁 体重质量 (287.5 依 10.6) 宛 65~309 宛 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 宛为 Serva 产品 CGRP 多克隆抗体 polyclonal antibody, PcAb 宛由第一军医大学珠江医院心内科实验室制备 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 H-662 型传感器调理仪由南京隆海科技实业公司提供 NSA- 芋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 0mg/kg 宛腹腔注射麻醉袁 行气管插管袁 室内空气通气袁 频率 65~70 次/min 袁 潮气量 3~4ml 遥 实验期间维持血 pH 宛 O_2 宛 CO_2 在正

常范围遥从颈动脉插管监测血压遥从颈静脉插管以补液和给药遥持续记录心电图变化遥左侧第三第四肋间距正线外 0.5cm 处切开皮肤袁开胸剪开心包暴露心脏遥从位于肺动脉圆锥与左心耳之间的左冠状静脉为标志袁用穿有 3-0 缝合线的 3/8 弯针跨腔钩绕左冠状动脉前降支主支遥线两端共穿过一根聚乙烯小管以形成闭环袁收紧闭环并用止血钳固定即产生缺血袁放松闭环即发生再灌注遥吉扎前 1min 给予肝素渊 50U/kg b.w. 冤缺血标志为渊冤左室前壁发绀渊冤 T 段抬高和 R 波增高遥再灌注的标志渊冤发绀区充血发红渊冤发高的 ST 段和增高的 R 波恢复正常遥

1.3 实验分组

将 60 只 SD 大鼠随机分为 3 组袁每组 20 只遥失血组渊每只先放血 3~4ml 袁持续 15min 曰抗体组渊每只放血前先注射 PcAb 渊 5mg/kg b.w. 冤袁随后放血 3~4ml 袁持续 15min 曰对照组渊颈插管不放血遥 组均接受 30min 缺血 - 2 h 再灌注袁其中 8 只缺血前时间抽血测血浆 CGRP 浓度遥血浆 CGRP 浓度用放射免疫法测定遥

1.4 梗死大小的测定

用伊文思蓝 +NBT 双重染色袁称质量来测量心肌梗死区域大小遥

再灌注 2 h 后袁重新拉紧闭环使冠状动脉阻塞袁用止血钳固定遥从静脉导管中注入 5% 伊文思蓝 1ml 袁待大鼠眼球变蓝后袁用 10% 的 KCl 0.5ml 迅速杀死大鼠遥小心切除心脏袁用敷料吸干心脏表面的水袁放置 -4 益水箱袁 0min 后取出遥趁未解冻前从心尖向心底方向将心脏均匀切为 7~8 片袁灌注区染为蓝色袁非灌注区不染色遥在解剖显微镜下小心将蓝色区与未染色区分离遥将未染色区置于 pH7.4 0.5 mg/ml 的 NBT 溶液中袁并放于 37 益水箱孵化 20min 遥不死区因无脱氢酶故不被染色袁坏死区因含有完整脱氢酶故染为紫蓝色遥在解剖显微镜下袁小心将染色区与未染色区分离遥将蓝色区尧紫蓝色区和未染色区用电子天平称质量遥紫蓝色区和未染色区之和为危险区渊 AAR 冤袁染色区为坏死区渊 IS 冤遥梗死大小用 IS 在 AAR 中所占的百分比表示遥

1.5 统计学处理

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

2 结果

从表 1 可以看出袁失血组血浆 CGRP 浓度均较

对照组和多抗组显著为高渊 =12.4, P=0.032~ 0.005 冤遥多抗组血浆 CGRP 浓度与对照组无显著差别渊 =0.206 冤遥

表 1 三组大鼠的血浆 CGRP 浓度变化(n=8,pg/L)
Tab.1 Plasma CGRP levels of the 3 groups (n=8,pg/L)

Group	Plasma CGRP levels
Control	139 依 9*
Phlebotomy	221 依 8
PcAb	161 依 7*

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

从表 2 看出袁体质量渊 =0.322, P=0.726 冤袁心脏质量渊 =0.735, P=0.487 冤和 AAR 渊 =0.154, P=0.858 冤在三组大鼠间均无显著性差异遥失血组的 IS 渊 =52.4, P<0.001 冤和 IS/AAR 渊 =43.7, P<0.001 冤均明显低于对照组和多抗组袁差异均有显著性遥多抗组的 IS 渊 =0.0001 冤和 IS/AAR 渊 =0.0001 冤也较对照组显著为低遥

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)

	Bodyweight(g)	Heartweight(g)	AAR(g)	IS(g)	IS/AAR(%)
Control	288 依 1	0.97 依 .11	0.28 依 .03	0.13 依 .01*	48 依 *
Phlebotomy	289 依 2	0.95 依 .10	0.27 依 .05	0.05 依 .02	17 依
PcAb	286 依 0	0.91 依 .11	0.27 依 .03	0.08 依 .02**	32 依 0**

*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 5min 缺血 -5min 再灌注袁使其后持续缺血 40min 产生的心肌梗死范围较对照组明显缩小渊 % vs 29% 冤袁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遥以后在犬冤猪冤鼠等模型中进行的大量研究均证实了这种现象的存在遥^[2]遥心肌缺血预适应渊 chemi preconditioning, IPC 冤不仅能有效地降低心肌梗死范围袁还能减少室性心律失常的发生袁减轻室性心律失常的严重程度和改善心功能遥^[3]

我们的研究表明袁在大鼠缺血 - 再灌注模型中袁失血组的 IS 渊 .05 依 .02 冤和 IS/AAR 渊 7% 依 % 冤均较对照组渊 .13 依 .01 冤渊 g 袁 48% 依 % 冤和抗体组渊 .08 依 .02 冤渊 g 袁 32% 依 0% 冤明显降低渊 <0.001 冤遥提示失血预适应能显著缩小心肌坏死的范围遥预先用 CGRP 多抗能部分抵消上述有益作用遥另外袁我们还发现袁失血组血浆 CGRP 浓度较对照组 渊 =0.005 冤和抗体组 渊 =0.032 冤显著为高袁提示失血可引起 CGRP 的释放袁且释放的血中 CGRP 能被 CGRP 特异性多抗所中

和遥这说明失血预适应所致的心肌保护作用与 CGRP 有关遥

失血预适应所致心肌保护作用的机制目前尚不清楚遥有研究表明袁PC 缩小心肌梗死范围的机制与 G 蛋白偶联受体 渊 受体 腺苷 A1 受体 尧I 型乙酰胆碱受体等 尧激活 尧蛋白激酶 C 渊KC 尧激活及 ATP 敏感钾通道 渊ATP 尧激活有关 尧遥而内源性保护物质 渊腺苷 尧去甲肾上腺素 尧乙酰胆碱 尧降钙素基因相关肽等 尧在 IPC 中起重要作用 尧另有研究表明袁非心肌本身缺血 渊肾缺血预适应 尧四肢缺血预适应 尧等 尧也能诱发心肌保护作用 尧说明这种保护作用是全身的而不是局部的 尧即只要引起内源性保护物质的释放 尧进而激活心肌保护机制 尧就能产生保护作用 尧因此 尧失血引起的低血容量状态可激活神经 - 体液系统 尧导致内源性保护物质 渊CGRP 尧的释放 尧并通过上述 IPC 启动心肌保护机制 尧但其确切的机制还有等待于今后进一步研究 尧

参考文献院

咱暂 MurryCE, JenningsRB, ReimerKA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium 咱暂 Circulation, 1986, 75: 1124-36.

咱暂 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 咱暂 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 25-8.

Ou Yang 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 咱暂 J First Mil Med Univ, 2001, 21(1): 25-8.

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

咱暂 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 咱暂 第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ), 1998, 18(1): 64.

咱暂 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 咱暂 第一军医大学学报, 1999, 19 渊冤 318-20.

Ou Yang 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 咱暂 J First Mil Med Univ, 1999, 19(4): 318-20.

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

咱暂 欧阳伟. 人心肌缺血预适应的研究进展 咱暂 国外医学 心血管病分册, 1997, 24(6): 6.

咱暂 冯志强, 冉兵, 张春来, 等. 肾缺血预处理增强心脏的电稳定性 咱暂 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 咱暂 Chin J Pathophysiol, 1999, 15(5): 444-5.

咱暂 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 咱暂 中国病理生理杂志, 1999, 15(3): 252-4.

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

渊接 64 页冤

后袁无论在 SE T₂WI 上还是在 GRE T₂WI 上袁正常淋巴结和转移性淋巴结的 MRI 表现都明显不同 尧因此袁 SPIO 增强 SE T₂WI 和 GRE T₂WI 可对转移性淋巴结作出特异性诊断 尧甚至可以发现早期的转移性淋巴结 尧此外袁 GRE T₂WI 上正常淋巴结的信号强度降低程度要比 SE T₂WI 明显 尧即在检测转移性淋巴结时袁 GRE T₂WI 有可能优于 SE T₂WI 遥简言之袁 SPIO 增强的 MRI 可以提供更丰富的诊断信息 尧有望使 MRI 对转移性淋巴结的诊断特异性和准确性均得以提高 尧所以袁我们认为袁 SPIO 增强的 MRI 是一种很有潜力的诊断转移性淋巴结的新技术 尧袁争取及早投入临床应用 尧

参考文献院

咱暂 Som PM. Detection of metastasis in cervical lymph nodes: CT and MRI criteria and differential diagnosis 咱暂 AJR Am J Roentgenol, 1992, 158(5): 961-5.

咱暂 Wagner S. Benign lymph node hyperplasia and lymph node metastases in rabbits: animal models for magnetic resonance lympho-

graphy 咱暂 Invest Radiol, 1994, 29(2): 364-9.

咱暂 许乙凯, 程天明, 刘杏元, 等. SPIO 增强磁共振成像区分肝腺瘤样增生和早期肝癌的实验研究 咱暂 临床放射学杂志, 1999, 18(6): 371-3.

Xu YK, Cheng TM, Liu XY, et al. Differentiation of adenomatous hyperplasia from early hepatocellular carcinoma with SPIO-enhanced MR imaging 咱暂 Clin Radiol, 1999, 18(6): 371-3.

咱暂 陈峰, Ward J, Robinson PJ. 超顺磁性氧化铁 (SPIO) 对比剂肝脾 MR 成像的比较研究 咱暂 临床放射学杂志, 2001, 20(2): 191-5.

Chen F, Ward J, Robinson PJ. A comparative study of the relaxation effects of two superparamagnetic iron oxide agents in MR of the liver and spleen 咱暂 Clin Radiol, 2001, 20(2): 191-5.

咱暂 Weissleder R, Elizondo G, Wittener J, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging 咱暂 Radiology, 1990, 175(3): 494-8.

咱暂 Mack MG, Blazer JO, Straub R, et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging of head and neck lymph nodes 咱暂 Radiology, 2002, 222(2): 239-45.

咱暂 Berlin MF, Roy C, Kinkel K, et al. Lymph node metastases: safety and effectiveness of MR imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles 袁 initial clinical experience 咱暂 Radiology, 1998, 207(5): 799-808.