

温血停跳液再灌注对大鼠热缺血供心的心肌保护作用

刘欢 郑佳予 宋凯 洪涛[△]

(复旦大学附属中山医院心脏外科 上海 200032)

【摘要】 目的 研究温血停跳液再灌注对大鼠热缺血供心的心肌保护作用。方法 24只SD大鼠随机分为对照组(A组, $n=8$, 无热缺血, 冷缺血4h, 常规心肌保护)、热缺血组(B组, $n=8$, 热缺血10min, 冷缺血4h, 常规心肌保护)、温血停跳液再灌注组(C组, $n=8$, 热缺血10min, 冷缺血4h, 常规心肌保护后添加温血停跳液再灌注)。保存结束后建立Langendorff模型; 观察复苏情况, 检测冠状静脉窦溢液(C组检测冠状静脉窦回血)内心肌酶水平, 测定平均冠脉流量, 描记左室内压波形, 计算相应血流动力学指标, 测定心肌组织含水量, 行组织学检查。结果 A组、C组心脏复苏显著优于B组, 前者在复灌初始即全部恢复窦性心律, 后者复灌初始全部为室颤, 须经历15~20min恢复窦性心律, 其中一只经反复按压至实验结束仍未复律。B组、C组心肌酶漏出水平分别如下。CK: (2191.25 ± 1408.08)U/L, (2918.63 ± 1194.55)U/L; CK-MB: (82.13 ± 37.08)U/L, (472.25 ± 133.74)U/L; AST: (71.25 ± 27.91)U/L, (323.38 ± 102.98)U/L; LDH: (189.50 ± 71.34)U/L, (1548.38 ± 943.62)U/L, 均显著高于A组; A组[CK: (94.00 ± 99.42)U/L; CK-MB: (14.75 ± 9.33)U/L; AST: (12.13 ± 8.59)U/L; LDH: (35.75 ± 28.95)U/L] ($P < 0.01$)。A组平均冠脉流量为(8.71 ± 1.42)mL/min显著大于B组流量(6.56 ± 1.54)mL/min ($P < 0.05$), C组平均冠脉流量为(7.96 ± 1.17)mL/min, 与A组无统计学差异 ($P > 0.05$)。A组和C组心率(HR)、左室内压上升支最大斜率(+dp/dt max)、左室内压下降支最大斜率(-dp/dt max)分别为HR: (248.22 ± 36.56)bpm, (266.07 ± 27.75)bpm, +dp/dt max: (144.32 ± 32.89)kPa/s, (147.04 ± 27.04)kPa/s, -dp/dt max: (126.81 ± 35.07)kPa/s, (141.96 ± 31.83)kPa/s, 两组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。B组HR、+dp/dt max、-dp/dt max分别为(177.88 ± 83.96)bpm, (41.33 ± 42.13)kPa/s, (31.77 ± 31.14)kPa/s, 显著低于A组 ($P < 0.05$)。B组、C组心肌含水量分别为(81.10 ± 1.24)%和(80.52 ± 0.90)%, 均显著高于A组(78.90 ± 1.33)% ($P < 0.05$)。B组较A组、C组心肌及冠脉内皮组织学损伤严重。结论 温血停跳液再灌注显著减少大鼠热缺血供心缺血再灌注损伤, 改善复苏及复苏后血流动力学。

【关键词】 心脏移植; 热缺血; 心肌保护; 温血停跳液再灌注; 大鼠

【中图分类号】 R 654.2 **【文献标志码】** A

Myocardial protection effect of warm blood cardioplegia reperfusion on warm ischemic rat heart grafts

LIU Huan, ZHENG Jia-yu, SONG Kai, HONG Tao[△]

(Department of Cardiac Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the myocardial protection effect of warm blood cardioplegia reperfusion on warm ischemic rat heart grafts. **Methods** Twenty-four SD rats were divided into 3 groups randomly: The control group (A, $n=8$, WI[Warm Ischemia] = 0, CI[Cold Ischemia] = 4 h, routine protect procedure); The warm ischemia group (B, $n=8$, WI = 10 min, CI = 4 h, routine protect procedure); The warm blood cardioplegia reperfusion group (C, $n=8$, WI = 10 min, CI = 4 h, routine protect procedure followed by continuous warm blood cardioplegia reperfusion). After the preservation, Langendorff model was settled, resuscitation of the hearts were observed, the coronary extravasations (blood flow from the coronary sinus in C group) were collected to detect cardiac enzymes. The coronary flow was measured. The intra-left ventricular pressure curve was record and hemodynamic values were calculated. The hearts were harvested for histopathologic study and to determine the percentage of water content. **Results** The resuscitation was

[△]Corresponding author E-mail: hong.tao@zs-hospital.sh.cn

better in group A and C than in group B. The hearts in group A and C got sinus rhythms as soon as reperfusion initiated while all hearts in group B ventricular fibrillated (VF). Seven out of eight hearts in group B could have a sinus rhythm 15 to 20 min after reperfusion started while a heart in this group kept a VF rhythm in one hour of reperfusion with continuous compression. Cardiac enzymes were significantly higher in group B and C [CK: (2 191.25 ± 1 408.08) U/L, (2 918.63 ± 1 194.55) U/L, CK-MB: (82.13 ± 37.08) U/L, (472.25 ± 133.74) U/L, AST: (71.25 ± 27.91) U/L, (323.38 ± 102.98) U/L, LDH: (189.50 ± 71.34) U/L, (1 548.38 ± 943.62) U/L] than in group A [CK: (94.00 ± 99.42) U/L, CK-MB: (14.75 ± 9.33) U/L, AST: (12.13 ± 8.59) U/L, LDH: (35.75 ± 28.95) U/L] ($P < 0.01$). Coronary flow in group A was (8.71 ± 1.42) mL/min, which was significantly higher than that in group B [(6.56 ± 1.54) mL/min] ($P < 0.05$). The coronary flow in group C was (7.96 ± 1.17) mL/min without significant difference from group A ($P > 0.05$). The hemodynamic values of heart rate (HR), the biggest positive and negative slope of intra-left ventricle pressure curve (+ dp/dt max and - dp/dt max) in group A and C were HR: (248.22 ± 36.56) bpm and (266.07 ± 27.75) bpm, + dp/dt max: (144.32 ± 32.89) kPa/s and (147.04 ± 27.04) kPa/s, - dp/dt max: (126.81 ± 35.07) kPa/s and (141.96 ± 31.83) kPa/s respectively without significant difference between these two groups ($P > 0.05$). The HR, + dp/dt max, - dp/dt max in group B were (177.88 ± 83.96) bpm, (41.33 ± 42.13) kPa/s, (31.77 ± 31.14) kPa/s which were significant lower than group A ($P < 0.05$). The water content in group B and C were (81.10 ± 1.24)% and (80.52 ± 0.90)% which were significantly higher than group A (78.90 ± 1.33)% ($P < 0.05$). Histopathologic damage was more severe in group B than in group A and C. **Conclusions** Warm blood cardioplegia reperfusion can reduce the ischemia-reperfusion damage in rat heart grafts from NHBDs and improve the resuscitation and hemodynamic performance after reperfusion.

【Key words】 heart transplantation; warm ischemia; myocardial preservation; warm blood cardioplegia reperfusion; rats

热缺血供心的应用可显著缓解目前心脏移植供心严重短缺的局面^[1]。心脏较肝、肾等其他器官对热缺血损伤更加易感,以传统的单纯保护液浸泡式保存的热缺血供心复苏后心功能显著受损,若在保存期间持续灌注保护液可显著改善移植植物功能^[2]。文献报道持续灌注保存热缺血供心的方法种类繁多^[2-5],但操作复杂,目前均处于动物实验阶段。另一方面,心脏手术中对心脏复苏困难者使用重新阻断并灌注温血停跳液可以帮助心脏复苏^[6],此方法在技术操作上简便,易于推广。我们认为,心脏外科手术中的心肌保护与心脏移植供心保护本质相同,即采取各种方法尽量减少缺血-再灌注带来的损伤,因此重新阻断并灌注温血停跳液这一方法可能对减少热缺血供心的缺血-再灌注损伤亦有所帮助。为探索此方法的可行性我们设计了本实验进行初步研究。本实验采用常规心肌保护结合复苏前温血停跳液持续灌注的办法保存热缺血供心,这在国内外尚无报道,与无热缺血供心和单纯常规心肌保护的热缺血供心比较,现报告结果如下。

材料和方 法

动物和分组 24只健康雄性SD大鼠,体重

200~230g,由复旦大学上海医学院实验动物部提供,均饲养在清洁级动物房中。随机分为对照组(A组, $n = 8$)、热缺血组(B组, $n = 8$)、温血停跳液再灌注组(C组, $n = 8$)。各组大鼠体重无统计学差异。

实验方法和步骤

麻醉及放血停跳模型 腹腔注射1%戊巴比妥钠40mg/kg,经股静脉注射肝素250U,U字形切口开腹,横断腹主动脉及下腔静脉放血。

供心获取和心肌保护 A组,放血后立即开胸,迅速经主动脉根部灌注4℃我院自制心脏停跳液5mL(改良ST THOMAS液,灌注压力80cm-H₂O, 1cm-H₂O=0.098kPa),心表及胸腔内置冰屑降温。然后以4℃UW液10mL经主动脉根部冲洗冠脉床(灌注压力80cm-H₂O),取下心脏浸泡于4℃UW液内保存4h^[7,8]。B组,放血后原位放置10min再行心肌保护,方法同对照组。C组,横断下腔静脉,并以无菌注射器穿刺腹主动脉轻轻抽吸,即在放血的同时将动脉血收集在注射器内,将动脉血与我院自制停跳液按4:1配制成含血停跳液(K⁺10mmol/L)备用。大鼠心脏原位放置10min再行心肌保护,心肌保护第一阶段方法同对照组。冷保存4h结束后以37℃含血停跳液10mL经主动脉根部持续灌注供心(流量为

500 mL·h⁻¹·kg⁻¹),灌注期间供心置于塑料袋内,塑料袋浸泡于37℃生理盐水中。

Langendorff 模型 心脏保存结束后,利用Langendorff装置进行离体灌注。灌流液为37℃KH缓冲液充以95% O₂及5% CO₂(K⁺ 5.9 mmol/L,pH = 7.4)。灌注压力设定为85 mmHg(115.6 cmH₂O, 1 mmHg = 0.133 kPa)^[9]。灌注时间为1 h。

观察指标

复苏情况 复灌后,观察心脏复跳的情况。

心肌酶 收集最初10 mL冠脉溢出液(C组取冠脉回血)检测CK、CK-MB、AST、LDH;

平均冠脉流量 收集复灌1 h期间的灌流液测定平均冠脉流量;

血流动力学 复灌30 min后,心脏表现稳定时,经二尖瓣口向左室内置入测压球囊,经压力传感器与生物信号放大器相连(SMUP-PC型生物信号处理系统,原上海医科大学生理学教研室设计,上海嘉龙教学仪器厂出品),调整球囊体积,将左室舒张末压(EDP)控制在1.0~2.0 kPa之间,描记左室压力波形,利用计算机程序(Cardio Version 2.0,原上海医科大学生理学教研室提供)分析,得出心率(HR)、左室舒张末压(EDP)、左室内压峰值(Peak)、左室内压上升支最大斜率(+ dp/dt max)、

左室内压下降支最大斜率(- dp/dt max)。

心肌含水率 灌流1 h后,切取部分心肌测定湿重,置入60℃烘箱内,24 h后测定干重,按公式计算心肌含水率,心肌含水率 = 湿重-干重/湿重 × 100%。

组织学检查 灌流结束后取部分心肌制作石蜡切片行伊红-苏木精染色,另取部分心肌及冠脉行透射电镜检查。

统计分析 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以SPSS13.0行数据分析,组间行 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

复苏情况 A组和C组8只心脏均自动恢复窦性节律,偶有室早,B组8只心脏初始心律全部为室颤。A组和C组在10 min之内恢复规则心跳,A组灌流期间心律规则,C组部分心脏出现心律失常如短阵室速或室颤,但可自动复律或经按压后容易复律。B组一般在15 min至20 min恢复窦性心律,有1只持续室颤,经反复按压至实验结束仍未复律。

心肌酶 收集A组及B组各心脏最初10 mL灌流液、C组各心脏10 mL冠脉回血检测CK、CK-MB、AST、LDH(表1)。

表1 各组心脏心肌酶漏出检测结果、平均冠脉流量、复灌后血流动力学指标、心肌含水率

Tab 1 The cardiac enzymes, coronary flow, hemodynamic values after reperfusion and water content of myocardial in each groups

Items	Group A	Group B	Group C
Myocardial enzyme			
CK(U/L)	94.00 ± 99.42	2 191.25 ± 1 408.08 ⁽¹⁾	2 918.63 ± 1 194.55 ⁽¹⁾
CK-MB(U/L)	14.75 ± 9.33	82.13 ± 37.08 ⁽¹⁾	472.25 ± 133.74 ⁽¹⁾⁽²⁾
AST(U/L)	12.13 ± 8.59	71.25 ± 27.91 ⁽¹⁾	323.38 ± 102.98 ⁽¹⁾⁽²⁾
LDH(U/L)	35.75 ± 28.95	189.50 ± 71.34 ⁽¹⁾	1 548.38 ± 943.62 ⁽¹⁾⁽²⁾
Coronary flow(mL/min)	8.71 ± 1.42	6.56 ± 1.54 ⁽¹⁾	7.96 ± 1.17
Hemodynamic factors			
HR(bpm)	248.22 ± 36.56	177.88 ± 83.96 ⁽¹⁾	266.07 ± 27.75
EDP(kPa)	1.62 ± 0.14	1.46 ± 0.62 ⁽³⁾	1.53 ± 0.39 ⁽³⁾
Peak(kPa)	9.11 ± 1.93	3.29 ± 2.35 ⁽¹⁾	8.73 ± 1.48
+ dp/dt max(kPa/s)	144.32 ± 32.89	41.33 ± 42.13 ⁽¹⁾	147.04 ± 27.04
- dp/dt max(kPa/s)	126.81 ± 35.07	31.77 ± 31.14 ⁽¹⁾	141.96 ± 31.83
Myocardial water content(%)	78.90 ± 1.33	81.10 ± 1.24 ⁽¹⁾	80.52 ± 0.90 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $P < 0.05$, significant difference compared with group A; ⁽²⁾ $P < 0.05$, significant difference compared with group B;

⁽³⁾ $P > 0.05$, no significant difference compared with group A

平均冠脉流量 收集各只心脏复灌后1 h冠脉回流液,测定平均冠脉流量(mL/min)(表1)。

血流动力学 依前述方法测定心率(HR)、左室舒张末压(EDP)、左室内压峰值(Peak)、左室内压上升支最大斜率(+ dp/dt max)、左室内压下降支最大斜率(- dp/dt max)。B组中1只心脏在实验的1 h

内始终室颤,故将此组其他7只心脏血流动力学参数的平均值计算结果代替全组平均值(表1)。

心肌含水量 灌流1 h后,切取部分心肌测定湿重,置入60℃烘箱内,24 h后测定干重,按公式计算心肌含水率,心肌含水率 = 湿重 - 干重/湿重 × 100%(表1)。

组织学检查

伊红-苏木精染色 图1显示A组和C组心肌细胞排列规则(A1,C1),B组心肌细胞排列紊乱,间

质明显水肿(B1)。A组和C组冠脉内皮层结构完整(A2,C2),B组冠脉内皮细胞大量脱落(B2)。

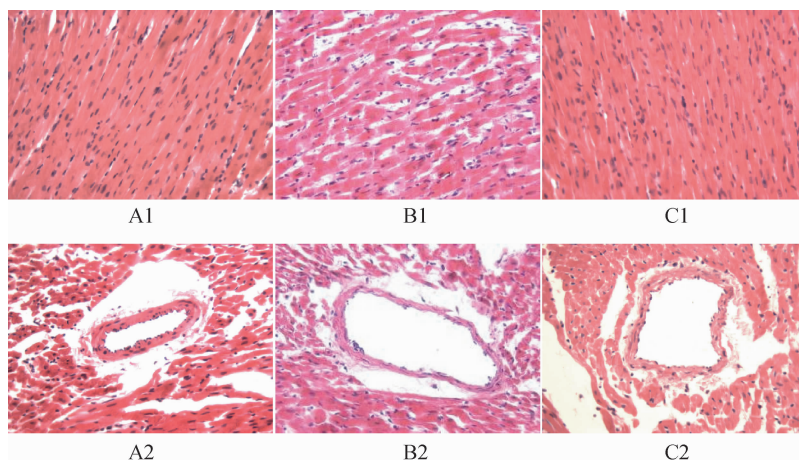


图1 各组复灌后1h心肌细胞及冠脉组织学改变($\times 400$)

Fig 1 The histopathologic findings of myocytes and coronary arteries in group A,B and C one hour after reperfusion ($\times 400$)

电镜检查 图2显示:A组和C组心肌损伤较轻(A1,C1),B组线粒体严重肿胀,心肌纤维排列紊乱,Z带排列不规则(B1)。A组及C组冠脉内皮细

胞完整(A2,C2),B组冠脉内皮细胞大量脱落,基底膜甚至弹力层裸露(B2)。

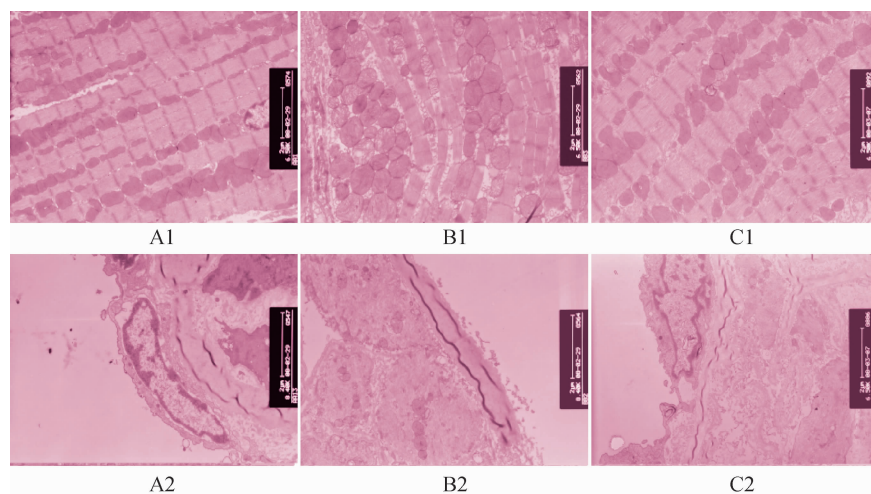


图2 各组复灌后1h透射电镜下的心肌细胞及冠脉情况($\times 5\ 000$)

Fig 2 Transmission electron microscopic findings of myocytes and coronary arteries in group A,B and C one hour after reperfusion ($\times 5\ 000$)

讨 论

心脏移植是治疗各种终末期心脏病的有效方法,但供体的供不应求严重地限制了心脏移植的开展。传统的心脏移植采用脑死亡的无热缺血供心,但其来源有限,如能使用已停跳的心脏扩大供心来源,则能有效缓解供心短缺^[1]。

心脏是高度依赖有氧代谢的器官,对热缺血的损害远较肝、肾等器官敏感。短时间热缺血即可

造成心肌能量底物耗竭、心肌间质酸中毒、心肌细胞及间质水肿。传统的心肌保护技术采用晶体停跳液和UW液(或其他心肌保护液)依次自主动脉根部单次灌注心脏,并行低温保存。心脏移植手术主动脉开放后,供心直接接受受体血液灌注,此方法虽可以在很大程度上减少心脏冷缺血期间的能量代谢,但无法补充心肌已耗竭的能量底物,不能逆转心肌间质酸中毒。本实验中热缺血组采取以上方法保存10min热缺血大鼠供心,结果心脏复苏不理想,血流动力学结果较差,组织学检查也显示缺血-再灌注

损伤显著较对照组和温血停跳液再灌注组严重。以上结果说明,传统的心肌保护技术用于保存热缺血供心不具备可行性,可以推测按照此方法保存的供心临床不能使用。

文献报道,持续灌注保护液的方法用于保存热缺血供心或长时间冷缺血供心效果良好。此方法在心脏缺血期间可持续向心肌输送能量底物及氧,并不断冲走代谢产物如乳酸、NADH、 H^+ ,从而增加心肌的能量储备,改善心肌间质内环境,帮助心脏复苏^[10]。持续灌注的条件如灌注时间、流量、压力、温度等虽报道不一,但原则相同,即灌注时间长、流量小、压力低、初始温度低^[10,11]。相反,若再灌注的液体氧分压和灌注压均较高(氧分压在 400 mmHg 以上,灌注压在 80 mmHg 以上),将加重供心缺血-再灌注损伤^[12]。

Martin 等^[4,5]曾报道了含血心脏停跳液持续灌注热缺血猪心的实验研究。他们以去白细胞的含血心脏停跳液添加 HOE642(钠氢交换抑制剂)在热缺血结束后及供心吻合时分别间断灌注供心,此法保存热缺血 30 min 供心收到了良好效果。

我们认为持续灌注中起主要作用的是含血心脏停跳液,且临床应用必须采用简便可行的办法。我们设想临床心脏移植中,在主动脉开放之前以温血心脏停跳液单次灌注供心,将帮助心脏复苏,因此设计本动物实验模拟主动脉开放前对大鼠热缺血供心灌注温血心脏停跳液,观察其对心脏复苏造成的影响。

本实验为每只大鼠配制 8 mL 含血心脏停跳液用作持续再灌注,灌注总量按体重计算约为 35 mL/kg,持续灌注速度通过微量泵设定为 100 mL/h,按体重计算灌注流量约为 $450 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$,计算得灌注时间为 4.5 min,压力平均为 95 mmHg,温度为 37°C ,灌注液氧分压测定值均在 100~120 mmHg 之间,灌注条件符合文献报道的原则。

温血停跳液再灌注使热缺血供心的复苏明显改善,自动恢复窦性心律达 100%。我们推测这是由于:温血停跳液再灌注期间,心脏的温度基本恢复至 37°C ;再灌注的温血心脏停跳液冲洗了冠状动脉床,带走了心脏无氧代谢的酸性产物,血液中的各种缓冲对纠正了心肌间质内的酸碱失衡;我们检测的冠脉回血中氧分压均在 60~80 mmHg 之间,表明大量氧已被心肌组织提取,这提示,再灌注期间温血心脏停跳液向心肌组织释放了大量的氧,偿还了低温无氧保存期间的氧债;温血停跳液内约 10 mmol/L 的钾离子浓度使得心脏保持电机械活动停止,不额外增加氧耗。

总之,我们认为温血停跳液再灌注可以显著减轻大鼠热缺血供心的缺血再灌注损伤,帮助热缺血供心复苏,改善复苏后血流动力学。临床心脏移植手术中可在主动脉开放前经主动脉根部灌注温血停跳液,操作简单易于实现。我们认为此方法在临床热缺血供心心脏移植中具备一定的实用价值。

参 考 文 献

- [1] Singhal K, Abrams D, Mohara J, et al. Potential suitability for transplantation of hearts from human non-heart-beating donors data review from the Gift of Life Donor Program[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2005, 24(10): 1 657-1 664.
- [2] Koike N, Takeyoshi I, Ohki S, et al. The effect of short-term coronary perfusion using a perfusion apparatus on canine heart transplantation from non-heart-beating donors[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2003, 22(7): 810-817.
- [3] Martin J, Sarai K, Yoshitake M, et al. Orthotopic transplantation of pig hearts harvested from non-heart-beating donors[J]. *Transplant Proc*, 1999, 31(1-2): 153-154.
- [4] Martin J, Lutter G, Ihling C, et al. Contractility, myocardial blood flow, and metabolic activity 24 hours after orthotopic heart transplantation from non-heart-beating donors: *in vivo* investigations in the pig model[J]. *Transplant Proc*, 2001, 33(7-8): 3 739-3 740.
- [5] Martin J, Lutter G, Ihling C, et al. Myocardial viability twenty-four hours after orthotopic heart transplantation from non-heart-beating donors[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 125(6): 1 217-1 228.
- [6] 李春华. 心脏手术复苏困难与再次温血停跳的处理[J]. *中国体外循环杂志*, 2003, 1(1): 48-49.
- [7] 郑佳予, 王春生, 洪涛. 自制心脏保存液保存离体兔心的研究[J]. *中国临床医学*, 2005, 12(3): 380-382.
- [8] 林宗武, 洪涛, 宋凯, 等. 经静脉注射高钾溶液对心脏功能和心肌结构的影响[J]. *复旦学报:医学版*, 2006, 33(3): 320-323.
- [9] Huang J, Nakamura K, Ito Y, et al. Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats[J]. *Circulation*, 2005, 112(1): 76-83.
- [10] Koike N, Takeyoshi I, Ohki S, et al. The effect of short-term coronary perfusion using a perfusion apparatus on canine heart transplantation from non-heart-beating donors[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2003, 22(7): 810-817.
- [11] Hasegawa Y, Suzuki M, Ohtaki A, et al. The effect of short-term coronary perfusion using oxygenated diluted blood following cold storage for long-term heart preservation[J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2000, 41(3): 363-370.
- [12] Cope T, Mauney C, Banks D, et al. Controlled reperfusion of cardiac grafts from non-heart-beating donors[J]. *Ann Thorac Surg*, 1996, 62(5): 1 418-1 423.