

· 论 著 ·

缺血后处理对减小猪急性心肌梗死面积的作用*

孙海梅¹, 郭涛², 喻卓², 许汪斌¹, 窦兴葵³, 孟照辉²

(昆明医学院: 1. 第一附属医院 ICU; 2. 第一附属医院心内科, 昆明 650032; 3. 第二附属医院麻醉科, 昆明 650101)

摘要:目的 探讨缺血后处理限制猪心肌梗死范围的作用。方法 滇南小耳猪 10 只, 随机分为 2 个组。实验组($n=5$): 在 X 线的监控下, 经右股动脉置入冠状动脉球囊导管至左前降支, 球囊扩张阻断血流 60 min, 予 8 次球囊放气 30 s、充气 30 s 短暂缺血再灌注即缺血后处理; 对照组($n=5$): 不行缺血后处理, 直接撤除球囊。测定缺血前、再灌注 2 h 及 24 h 心肌酶学指标。再灌注 72 h 采用 2, 3, 5 氯化三苯基氯四氮唑(TTC)染色确定心肌梗死面积。结果 再灌注后 2 h, 两组的磷酸肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)较缺血前明显增高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 再灌注后 24 h, 实验组的 CK、LDH 较对照组明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。病理学检查显示缺血后处理组梗死面积明显小于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 缺血后处理有缩小猪急性心肌梗死面积的保护作用。

关键词: 缺血后处理; 心肌梗死; 猪

中图分类号: R542.22; R-332

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)05-0522-02

Effects of ischemic postcondition on reduction of infarction size in swine model of acute myocardial infarction*

SUN Hai-mei¹, GUO Tao², YU Zhuo², et al.

(1. Department of ICU, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China;

2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China;

3. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ischemic postcondition on the reduction of infarction size in the swine model of acute myocardial infarction. **Methods** Ten Diannan small-ear pigs were divided into study group($n=5$) and control group($n=5$) randomly. A balloon catheter was positioned in the mid-distal left anterior descending (LAD) via right femoral artery under fluoroscopic guidance. The balloon was inflated and occluded LAD for 60 min. In study group, ischemic postconditioning was elicited by eight cycles of 30-s reperfusion, followed by 30-s reocclusion. Serum myocardial enzyme were assessed before ischemia, after 2 h of reperfusion, and after 24 h of reperfusion. After 72 h of reperfusion, infarction size was measured by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) staining. **Results** After 2 h of reperfusion, the values of CK and LDH were higher than that before operation($P<0.05$), after 24 h of reperfusion, the values of CK and LDH were lower than those in control group($P<0.05$). In the study group, infarction size was smaller than that in control group($P<0.05$). **Conclusion** Ischemic postcondition can reduce infarction size in the swine model of acute myocardial infarction.

Key words: ischemic postconditioning; myocardial infarction; swine

缺血后处理通过启动机体内源性的保护机制, 减轻心肌梗死再灌注损伤。目前国内外的研究证实, 缺血后处理可减轻体型较小的动物种类如小鼠、大鼠、家兔、犬等的心肌缺血再灌注损伤, 而对猪的心肌保护作用却尚无定论^[1-4]。猪是体型较大且和人类冠状动脉血液循环最为相似的实验动物, 本研究采用猪作为实验动物, 观察缺血后处理是否同样对猪也存在心肌保护作用, 为缺血后处理进一步临床应用提供理论依据。本研究探讨缺血后处理对猪闭胸式急性心肌梗死模型中心肌梗死范围的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物及实验材料 10 只 8~11 个月健康滇南小耳猪, 雌雄不拘, 体质量 19~24.5 kg, 由昆明医学院动物实验室提供。各种导丝(长、短导丝及球囊导丝), 动脉鞘、各种穿刺针、导管及压力泵等均为德国贝朗公司产品, 均为临床使用过

的废旧材料, 并在术前 12 h 用 2% 戊二醛消毒液浸泡消毒。数字减影血管造影机(飞利浦公司, FD10 机型); 心电监护仪及有创动脉测压仪(美国公司, Dash3000 机型); 全自动生化检测仪(Olympus, Au5400 机型); 戊巴比妥钠(杭州赛诺菲公司); 利多卡因(上海禾丰有限公司生产); 青霉素(山东鲁抗药业生产); 2, 3, 5 氯化三苯基氯四氮唑(TTC)购自 SIGMA 公司。

1.2 麻醉及术前准备 选择小型猪, 空腹 6 h 以上, 3% 戊巴比妥钠 20~30 mg/kg 耳缘静脉麻醉后将猪仰卧固定在手术台上施行手术。术中检测猪的生命体征, 据肢体运动情况 20~30 min 重复静脉注射戊巴比妥钠 2~5 mg/kg, 使猪保持麻醉状态。

1.3 猪闭胸式心肌梗死模型制备 实验猪 10 只, 随机分为 2 个组, 实验组($n=5$), 对照组($n=5$)。右腹股沟区皮肤以碘伏消毒后铺无菌单。2% 利多卡因局部麻醉后于腹股沟韧带行股

* 基金项目: 云南省应用基础研究面上项目基金资助(2007C243M)。

表 1 对照组和实验组心肌酶学变化 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	CK(IU/L)			LDH(IU/L)		
	缺血前	再灌注 2 h	再灌注 24 h	缺血前	再灌注 2 h	再灌注 24 h
实验组	2 218.62±248.45	8 337.08±365.16*	17 829.46±1 339.94*#	593.51±26.56	1 136.92±76.37*	1 072.02±25.52*#
对照组	2 318.10±228.93	8 237.08±376.87*	24 015.10±1 366.95*	589.30±28.49	1 246.90±69.49*	1 892.02±27.87*

*: 与缺血前相比, P<0.05; #: 与对照组相比, P<0.05。

动脉穿刺, 置入 6F 动脉鞘, 静脉注入肝素 8 000 u, 每隔 1 h 追加肝素 2 000 u。经动脉鞘置入 6F 猪尾导管至左心室, 行左心室造影。以 6F 3.0 L 左冠状动脉造影导管分别行左、右冠状动脉造影, 观察猪冠状动脉的分布情况。在导丝指引下, 置入 2.0 mm 或 2.5 mm 的球囊至左前降支(LAD)第一对角支的远端, 以 3~4 atm 打开球囊堵住 LAD。心肌梗死模型成功标志: 冠脉造影示球囊远端血流中断, 心电图表现为 V1~V3 导联出现 ST 段抬高, T 波高耸融合。60 min 后撤除球囊并拔除动脉鞘管, 压迫止血。实验组行球囊充气堵住 LAD 60 min 后, 球囊充气 30 s、充气 30 s(循环 8 次); 对照组行球囊充气堵住 LAD 60 min 后直接撤除球囊。肌肉注射青霉素 400 万单位, 在猪清醒之前送回动物中心。手术后约 1 h 猪苏醒, 第 2 天即可进食。

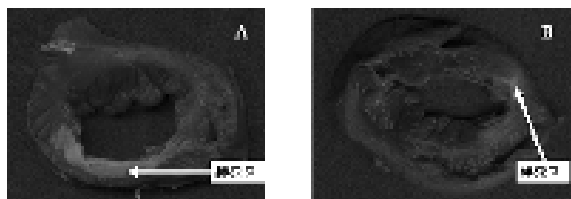
1.4 心肌酶检测 分别于缺血前, 缺血结束, 再灌注 2、24 h 前腔静脉取血, 全血生化分析仪测定血清心肌酶: 磷酸肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)。

1.5 心肌梗死范围测定 心肌缺血再灌注 72 h, 将实验猪麻醉后, 开胸取心脏, 生理盐水冲洗, 沿心脏的基底部短轴方向将左心室连续切成 4~5 mm 的薄片, 对心肌行 TTC 染色, 将心肌放入含有 10 g/L 的 TTC 的 PBS(pH=7.4)溶液中孵育 10 min。根据染色与否定义其梗死灶。TTC 染色区(深红色)示仍存活的心肌组织, 非 TTC 染色区(灰白色)即梗死区。扫描后用图像分析软件计算心肌梗死体积和左室体积, 用梗死体积占左室体积的百分比表示并计算心肌梗死面积。

1.6 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间不同时间点均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌酶学变化 缺血前两组间 CK、LDH 变化差异无统计学意义(P>0.05); 再灌注后 2、24 h 两组的 CK、LDH 较缺血前基础值明显增高, 差异有统计学意义(P<0.05)。组间比较, 再灌注后 24 h 实验组的 CK、LDH 较对照组明显降低, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表 1。



A, 对照组, 缺血再灌注后心肌梗死; B, 实验组, 缺血后处理后心肌梗死面积缩小。

图 1 缺血再灌注后心肌 TTC 染色

2.2 病理学检查 术后 3 d 行 TTC 染色, 存活心肌组织被红染, 而未被染色的区域呈白色或灰白色为梗死区。经图像分析

处理后, 实验组心肌梗死的面积是(10.89±2.02)%, 对照组心肌梗死的面积(23.26±3.13)%, 两者差异有统计学意义(P<0.05)。提示缺血后处理组的心肌梗死范围明显低于对照组, 见图 1。

3 讨论

随着心肌保护研究的不断深入, 心肌的缺血再灌注损伤被认为是心肌保护问题的关键, 已引起人们的广泛关注^[5-7]。目前缺血后处理对实验动物的心肌保护效果虽较为肯定, 但多数国内外的研究均通过一些体型较小的动物如小鼠、大鼠、家兔、犬等的心肌缺血再灌注模型上得到证实, 而对猪的心肌保护作用却无定论^[1-4]。但多数的研究主要从缺血后处理与再灌注早期(24 h 以内)细胞坏死、心肌梗死面积及心功能等方面观察心肌保护作用, 而对缺血后处理是否参与再灌注延迟性损伤的心肌保护作用尚不明确^[8]。本研究采用猪作为实验动物, 猪是体型较大且与人类冠状动脉血液循环相似的动物, 观察缺血后处理对猪闭胸式急性心肌梗死模型的心肌酶学变化及 3 d 后心肌梗死范围的影响, 了解其发挥再灌注延迟性损伤的心肌保护作用。

本课题成功应用介入方法进行球囊封堵冠脉建立猪闭胸式心肌梗死模型, 与传统的开胸结扎心脏冠状动脉建立心肌梗死模型的方法相比, 闭胸式心肌梗死模型可最大程度地模拟临床实际情况; 减少实验动物的创伤提高建模成功率; 并且通过控制球囊的充气-充气, 实现了心肌缺血和后处理的反复短暂缺血再灌注时间的准确控制^[9]。目前研究已证实, 心肌梗死范围的缩小是心肌保护措施发挥作用的主要指标, 同时心肌酶升高与急性心肌梗死面积一致, 心肌酶越高, 表明梗死面积越大。

本研究发现, 再灌注 2 h, 对照组与实验组 LDH 及 CK 较缺血前基础值明显升高, 但两组间比较差异无统计学意义(P>0.05); 再灌注 24 h, 实验组的 LDH 及 CK 明显低于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05); 再灌注 3 d, 对心脏进行 TTC 染色及扫描后用图像分析软件计算, 结果显示缺血后处理组心肌梗死的面积明显小于对照组, 提示缺血后处理限制心肌梗死范围延伸, 发挥再灌注延迟性损伤的心肌保护作用。目前缺血后处理的心肌保护作用的具体机制尚不清楚。可能的机制有以下几方面: (1)抑制再灌注时氧自由基的堆积; (2)抑制中性粒细胞的活化; (3)抑制细胞内及线粒体钙超载; (4)诱导内源性保护性蛋白合成; (5)启动心脏保护信号通路^[10-11]。

本研究初步证实缺血后处理可明显缩小猪急性心肌梗死范围, 发挥再灌注延迟性损伤的心肌保护作用, 对心肌再灌注损伤的治疗进行了有益的探索, 但能否应用于临床尚有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen (下转第 526 页)

肌球蛋白(myosin)及原肌球蛋白(tropomyosin)结合,并能与钙结合蛋白如钙调素、钙调蛋白及 S100 蛋白结合,调宁蛋白能被蛋白激酶 C 及钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 磷酸化,被磷酸酶脱磷酸化。当调宁蛋白磷酸化时,与肌动蛋白丝分离,失去对肌动球蛋白 ATP 酶的抑制作用,使肌肉收缩;调宁蛋白脱磷酸化时表现出抑制肌动球蛋白 ATP 酶活性,使肌肉舒张。调宁蛋白还能抑制肌动蛋白丝相对于肌球蛋白丝的滑行。

在此次实验中,结石组 16 只(16/20)出现胆囊结石,19 只(19/20)出现胆固醇结晶,对照组无结石及结晶出现;结石组胆囊平滑肌 Calponin 和 VIP 阳性产物与对照组相比较明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),从而抑制胆囊平滑肌收缩。Oddi 括约肌 Calponin 和 VIP 阳性物与对照组相比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。从而使两者抑制 Oddi 括约肌收缩的功能减弱,导致 Oddi 括约肌痉挛。所以可以导致胆汁排放受阻,促进胆囊胆固醇结石的形成。本实验结果认为,胆囊排空功能在胆囊结石形成中起重要作用,而胆囊结石家兔胆囊排空障碍与 Calponin、VIP 明显相关。本实验研究,从胆囊平滑肌及 Oddi 括约肌协调运动入路,旨在进一步明了胆囊结石形成病因,实验证实 Calponin 阳性表达与调宁蛋白呈正相关,表明二者协同参与平滑肌的收缩,但具体信号传导机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 别平,孟宪均,杨可祯,等. 前列腺素环磷酸腺苷在胆囊结石形成中的作用[J]. 中华外科杂志,1987,25(6):339.
 - [2] Juniper K. Biliary tract studies 2: the significance of biliary crystals[J]. Gastroenterol,1957,32(6):175.
 - [3] 厉红民,李前伟,刘广元,等. 胆囊动力学变化对胆囊结石形成影响的实验观察[J]. 重庆医学,2003,32(9):1222.
 - [4] Strah KM, Melendez RL, Pappas TN, et al. Interaction of vasoactive intestinal polypeptide and cholecystokinin octapeptide on the control of gallbladder contraction[J]. Surgery,1986,99(4):469.
 - [5] Chen Q, Amaral J, Oh S, et al. Gallbladder relaxation in patients with pigment and cholesterolstones[J]. Gastroenterology,1997,113(3):930.
 - [6] Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle Biochem[J]. Biochem Biophys Res Commun,1986,141(1):20.
 - [7] Takahashi K, Nadal-Ginard B. Molecular Cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin[J]. J Biol Chem,1991,266(20):13284.
 - [8] Jin JP, Wu D, Gao J, et al. Expression and purification of the h1 and h2 isoforms of calponin[J]. Protein Exp Purif, 2003,31(2):231.
 - [9] Matthew JD, Khromov AS, McDuffie MJ, et al. Contractile properties and proteins of smooth muscles of a calponin knockout mouse[J]. J Physiol,2000,529(Pt3):811.
 - [10] Strasser P, Gimona M, Moessler H, et al. Mammalian calponin. Identification and expression of genenic variants[J]. FEBS Lett,1993,330(1):13.
- (收稿日期:2009-08-15 修回日期:2009-09-10)
-
- (上接第 523 页)
- MV, et al. Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs[J]. Basic Res Cardiol,2006,101(6):502.
 - [2] Schwartz LM, Lagranha CJ. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2006,290(3):H1011.
 - [3] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion; comparison with ischemic preconditioning[J]. Am J Physiol(Heart Circ Physiol),2003,285:579.
 - [4] Philipp S, Yang XM, Cui L, et al. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein receptor cascade C-adenosine A2b receptor cascade[J]. Cardiovasc Res, 2006,70:308.
 - [5] 洪李萍,陈玉培. 镁对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医学,2007,36(2):176.
 - [6] Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist[J]. Circulation,2002,105(20):2332.
 - [7] Girm HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AL, et al. Reperfusion Syndrome: Cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies[J]. Vasc Endovascular Surg,2007,4(4):277.
 - [8] Mykytenko J, Kerendi F, Reeves JG, et al. Long-term inhibition of myocardial infarction by postconditioning during reperfusion[J]. Basic Res Cardiol,2007,102(1):90.
 - [9] Krombach GA, Kinzel S, Mahnken AH, et al. Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine[J]. Invest Radiol, 2005,40(1):14.
 - [10] Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury[J]. Cardiovasc Res, 2006,70(2):200.
 - [11] Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, et al. preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials[J]. J Am Coll Surg,2006,202(5):797.
- (收稿日期:2009-07-23 修回日期:2009-09-10)