

· 基础研究 ·

远隔缺血后处理对兔心肌缺血/再灌注损伤保护作用的时效关系

魏江涛, 陈 聪, 方正旭, 李 进, 官 亮, 刘海江

(南昌大学第四附属医院干部病区 330003)

摘要:目的 探讨远隔缺血后处理时间长短对大白兔心肌缺血/再灌注损伤保护作用的影响。方法 将 54 只大白兔随机分为 6 组,假手术组和 A 组、2 次缺血 5 min/灌注 5 min 组(B 组)、3 次缺血 10 min/灌注 5 min 组(C 组)、4 次缺血 5 min/灌注 5 min 组(D 组)、4 次缺血 10 min/灌注 5 min 组(E 组)。假手术组只穿线,其他 5 组均接受冠状动脉左前降支闭塞 30 min 后再灌注 6 h 的处理。B、C 组分别同时双侧股动脉实施 2 次缺血 5 min 再灌注 5 min、3 次缺血 10 min 再灌注 5 min 远端缺血后处理,D、E 组分别同时双侧股动脉实施 4 次缺血 5 min 再灌注 5 min、缺血 10 min 再灌注 5 min 远端缺血后处理,并全程记录心电图(室性心律失常),分别在缺血前后和再灌注后 3、6 h 获取血浆标本检测肌钙蛋白(cTnT),利用 cTnT 总释放量曲线下面积量化评估心肌梗死面积。结果 6 组 0~30 min 室性心律失常评分差值组间比较:假手术组实验前后无变化;B、D 组与 A 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),C、E 组与 A、B、D 组比较差异有统计学意义($P<0.01$);且与缺血后处理时间长短呈负相关($r=-0.892$)。cTnT 水平:假手术组实验前后无变化;B、C、D、E 组较 A 组下降显著($P<0.05$),E 组较 B、C、D 组下降显著($P<0.05$)。且与缺血后处理时间长短呈负相关($r=-0.833$);心肌梗死面积:假手术组无心肌梗死。与 A 组比较,B 组下降 32.3%,C 组下降 32.8%,D 组下降 31.0%,E 组下降 35.8%;且与缺血后处理时间长短呈负相关($r=-0.782$)。结论 远隔缺血后处理可减少心肌缺血/再灌注损伤,且其作用与后处理时间明显相关。

关键词: 心肌缺血;心肌再灌注损伤;肌钙蛋白 T;心律失常;兔

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.25.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)25-2621-03

Time-effect relationships of remote ischemia postconditioning on protection of myocardial ischemia/reperfusion injury of rabbit

Wei Jiangtao, Chen Cong, Fang Zhengxu, Li Jin, Guan Liang, Liu Haijiang

(Disease Area of Cadres, Fourth Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330003, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the time length of remote ischemia postconditioning on the protection role of ischemia/reperfusion injury of rabbit. **Methods** 54 rabbits were randomly divided into 6 groups. Sham group, the control group (group A), 2 episodes of postconditioning 5 min/5 min reperfusion group (group B), 3 episodes of postconditioning 10 min/5 min reperfusion group (group C), 4 episodes of postconditioning 5 min/5 min reperfusion group (group D), 4 episodes of postconditioning 10 min/5 min reperfusion groups (group E). The sham group only were threaded a silk, the other five groups underwent 30 min coronary artery anterior descending branch occlusion and then with 6 h perfusion treatment. The group B and C underwent simultaneously 2 circulation ischemia with 5 min in bilateral femoral artery, 3 circulation ischemia with 10 min in bilateral femoral artery, and then with 5 min post treatment of remote ischemia. The group D and E underwent simultaneously 4 circulation ischemia of 5 and 10 min in bilateral femoral artery and with 5 min post treatment of remote ischemia. Full record of ECG (ventricular arrhythmias) was performed during the whole process. To collect the plasma samples for detecting troponin (cTnT) before and after ischemic conditioning, and at 3, 6 h after reperfusion respectively, and to assess the size of myocardial infarct. **Results** Comparing differences in scores of ventricular arrhythmias at 0~30 min among 6 groups; no change in the sham group was found before and after experiment, there was no difference in the comparison between the group B, D with the group A ($P>0.05$); and significant differences existed between group C, E with A, B, D ($P<0.01$). And its action was negatively correlated with the time of postconditioning (relevant coefficient = -0.892). In the cTnT level; there was a significant decrease in the group B, C, D and E in comparison with the group A ($P<0.01$), and in comparison with group B, C and D, there was significant decrease in the group E ($P<0.05$). And its action was negatively correlated with the time of postconditioning (relevant coefficient = -0.833). In myocardial infarct size; in comparison with the group A, the group B dropped by 32.3%, the group C dropped by 32.8%, the group D dropped by 31.0% and the group E by 35.8%. And its action was negatively relevant with the time of postconditioning (relevant coefficient = -0.782). **Conclusion** Remote ischemia postconditioning can reduce myocardial ischemia and ischemia/reperfusion injury, and its action is relevant with the time of postconditioning.

Key words: myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; troponin T; arrhythmia; rabbits

心肌梗死对人类健康危害即可产生于缺血过程,也可出现于再灌注过程。近年来,有研究证实,心肌缺血期进行短暂肢体缺血/再灌注处理同样可以达到保护心肌的目的^[1-2]。由于缺血/再灌注方案不同,其结果也大不相同。本文旨在研究远隔(下肢)缺血后处理时间长短对兔心肌缺血/再灌注损伤保护作用的影响,并探讨其相关性,为临床心肌缺血事件发生后心肌保护提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)实验动物:健康的新西兰兔 54 只,体质量 3.0~3.5 kg,由江西中医学院动物实验中心提供。(2)主要实验仪器、试剂盒:LANDMARK AG-II 全自动生化分析仪,心电图监测仪购自华南医电公司;离心机(TGL-168)购自上海安亭科学仪器厂,生化检测试剂盒购自美国 R&D 公司。麻醉用相关药品为氯胺酮、甲苯塞酮、硫喷妥钠、阿托品。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 采用 Selye 法结扎兔心脏冠状动脉左前降支(LAD),制作急性心肌梗死(AMI)模型。以结扎冠状动脉远端心肌心电图在 30 min 内 ST 段、T 段进行性抬高,结扎以下的心肌颜色变暗、心肌运动减弱为 LAD 成功结扎标志。

1.2.2 动物分组及处理 实验动物分 6 组:假手术组($n=4$)和 A 组、2 次缺血 5 min/灌注 5 min 组(B 组)、3 次缺血 10 min/灌注 5 min 组(C 组)、4 次缺血 5 min/灌注 5 min 组(D 组)、4 次缺血 10 min/灌注 5 min 组(E 组)5 组各 10 只。处理措施如下:假手术组只穿线,不夹闭 LAD;A 组在夹闭 LAD 30 min 后,开放 LAD 实施再灌注 6 h;B 组在夹闭 LAD 30 min 后,开放 LAD 同时夹闭双下肢动脉 5 min,然后开放 5 min,重复缺血/再灌注,共 2 个循环,实施再灌注 6 h;C 夹闭双下肢动脉时间为 10 min,3 个循环缺血/再灌注;D 组夹闭双下肢动脉时间分别为 5 min、4 个循环缺血/再灌注;E 组夹闭双下肢动脉时间分别为 10 min、4 个循环缺血/再灌注。

1.2.3 检测指标 (1)室性心律失常:记录缺血期及再灌注期室性心律失常发生类型,并对其评分^[3]。0 分,无心律失常;1 分,偶发室性早搏(1 min < 3 次);2 分,频发室性早搏(1 min ≥ 3 次);3 分,偶发室性心动过速(1 min < 3 次);4 分,频发室性心动过速(1 min ≥ 3 次);5 分,频发室性颤动(1 min ≥ 3 次)或死亡。(2)生化指标:分别于缺血期及再灌注后 3、6 h 抽取动脉血 5 mL,4 °C 下 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-80 °C 保存,采用全自动生化分析仪测定血浆肌钙蛋白(cTnT)的水平。(3)心肌梗死面积:以 cTnT 总释放量曲线下面积作为心肌梗死面积的代指标。(4)远隔缺血后处理时间(即每次时间×次数)与室性心律失常、cTnT 的水平、心肌梗死面积相关性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析,多组间均数比较用方差分析, q 检验法;用多元回归方法分析相关性,相关系数用 r 表示。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 室性心律失常评分 室性心律失常主要发生于缺血及再灌注后前 30 min 内,其评分结果见图 1。假手术组实验前后无变化;在再灌注后 0~30 min,B、D 组与 A 组比较,再灌注室性心律失常评分差异无统计学意义($P > 0.05$);C、E 组与 A、B、D 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。再灌注 31~60 min,E 组与 A、B、C、D 组比较,再灌注室性心律失常评分差异有统计学意义($P < 0.01$),A、B、C、D 组无差异。此后各组间室性心律失常评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。且心律失常评分与缺血后处理时间呈负相关($r = -0.892$)。

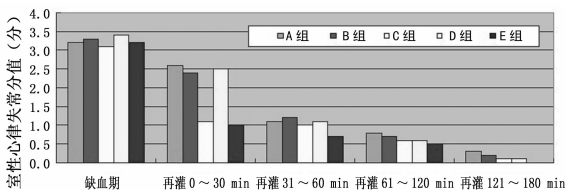


图 1 室性心律失常评分情况

2.2 血浆 cTnT 水平比较 假手术组实验前后无变化;与 A 组比较,B、C、D、E 组下降显著($P < 0.05$)。与 B、C、D 组比较,E 组下降显著($P < 0.05$),见表 1。且 cTnT 水平与缺血后处理时间呈负相关($r = -0.833$)。

2.3 心肌梗死面积 以 cTnT 总释放量曲线表示,见图 2。假手术组无心肌梗死;与 A 组比较,B 组下降 32.3%,C 组下降

32.8%,D 组下降 31.0%,E 组下降 35.8%。且心肌梗死面积与缺血后处理时间呈负相关($r = -0.782$)。

表 1 5 组血浆 cTnT 水平比较($\bar{x} \pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

组别	缺血前	缺血后	再灌注 3 h	再灌注 6 h
A 组	0.012±0.002	0.027±0.005	0.512±0.083	0.427±0.058
B 组	0.011±0.002	0.028±0.007	0.407±0.048*	0.316±0.047**
C 组	0.012±0.002	0.029±0.006	0.398±0.053*	0.307±0.049**
D 组	0.012±0.003	0.028±0.005	0.402±0.048*	0.305±0.055**
E 组	0.011±0.003	0.027±0.006	0.411±0.057*	0.288±0.039** [△]

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$,与 A 组比较;[△]: $P < 0.05$,与 B、C、D 组比较。

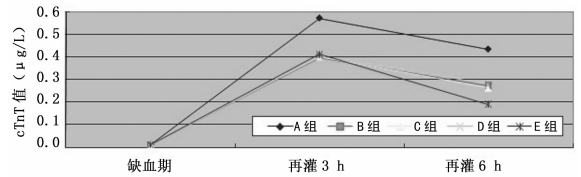


图 1 5 组 cTnT 总释放量曲线

3 讨论

随着冠状动脉再血管化介入(PCI)治疗方法、冠状动脉搭桥术(CABG)、瓣膜置换术等技术推广应用,再灌注损伤造成心肌损伤已被临床医生所认识和关注。探索激发机体内源性保护机制减轻缺血及再灌注损伤成为心血管领域的研究热点。

2003 年 Zhao 等^[2]首次发现后适应在限制梗死范围及保护缺血后的内皮功能方面与缺血预适应有相同效果,并提出缺血后适应(ischemic postconditioning, IPOC)概念。由于 IPOC 实施对心脏具有侵袭性,存在不可预知的风险,后提出远程缺血后适应(remote ischemic postconditioning, RI-PostC)。目前对 IPOC 研究主要集中在实施方案上,包括再灌注/闭塞的循环次数和每次循环的时间。多数学者的共识是循环次数 3~6 次,单次循环的时间 10~30 s 对心脏保护作用可以肯定^[4]。对 RI-PostC 的实施方案还不明确,Andreka 等^[5]发现对猪心肌梗死模型采用肢体 RI-PostC(缺血 5 min 再灌注 5 min,4 个循环)心肌梗死面积减少约 22%,肌酸激酶(CK)的释放减少约 26%。Mei 等^[6]研究发现,早期给予无创肢体缺血后适应(RPOC)能减少梗死面积,而反复肢体 RI-PostC(每天 1 次或每 3 天 1 次)减轻左室重塑,且 1 次单项后处理可提高生存率。甚至还有研究表明,RI-PostC 给予 3 轮上肢缺血 5 min,再灌注 5 min 可减少 PCI 术后 24 h cTnI 中位数值,且降低 6 个月不良心脑血管事件发生率^[7]。也有研究揭示远隔缺血后处理和预处理对人体血管内皮功能保护作用与远隔缺血刺激强度相关^[8]。本研究发现,双侧股动脉实施 3 次缺血 10 min 再灌注 5 min 及 4 次缺血 10 min 再灌注 5 min,明显减少再灌注前 30 min 心律失常发生,且 4 次缺血 10 min 再灌注 5 min 优于 3 次缺血 10 min 再灌注 5 min 及 4 次缺血 5 min 再灌注 5 min。不同的是,双侧股动脉实施 2 个循环缺血 5 min 再灌注及 4 次缺血 5 min 再灌注对室性心律失常发生无明显抑制作用,且室性心律失常发生与后处理时间长短呈负相关。也有报道,在冠状动脉开放同时实施短暂肢体缺血触发远隔缺血后处理未能对再灌注期室性心律失常产生显著抑制作用^[9]。产生这种不同结果的解释是,再灌注心律失常主要发生再灌注前 30 min,而远隔缺血时间过短(缺血再灌注循环次数少)或强度不够(每次阻断血流时间过短)不足以诱导保护作用。

心肌梗死患者的预后与心功能明显相关,梗死面积决定心功能分级。Han 等^[10]研究表明,RI-PostC(再灌注同时,立即

在后肢双侧动脉行缺血 5 min 再灌注 5 min, 3 个循环), 可降低 CK、cTnI, 降低左室舒张末压 (LVEDP) 和左室收缩压 (LVSP)。Xin 等^[11] 研究提示, 给予 4 次缺血 5 min 再灌注 5 min 后处理使梗死面积降至 $(29.39 \pm 3.66)\%$, 而预处理则使梗死面积降至 $(33.49 \pm 5.81)\%$ 。但也有研究发现远隔缺血预处理不能减少 cTnI 下降, 也不能提高血流动力学^[12]。本研究发现, 双侧股动脉实施缺血再灌注者均有 cTnT 血浆浓度较对照组显著下降, 且实施 4 个循环缺血 10 min 再灌注, 优于 2 个循环缺血 5 min、10 min 再灌注及 3 个循环缺血 10 min 再灌注者。心肌梗死面积, 与 A 组比较, B 组下降 32.3%, C 组下降 32.8%, D 组下降 31.0%, E 组下降 35.8%, 且与后处理时间长短呈负相关。但与既往研究结果相比有差异, Kerendi 等^[13] 报道在鼠心肌缺血再灌注前结扎肾动脉 5 min, 心肌梗死面积减少 50%; RI-PostC 对心肌保护作用的差异可能与动物种属和实验方案及参考标准不同有关, 其作用机制还不太明确, 根据国内外的研究报告, 目前主要包括以下几个方面: (1) 内源性腺苷释放及腺苷受体激活^[14]; (2) 短暂感受器电位胡椒素 1 (TRPV1)、心脏及循环中主要神经肽、降钙素相关肽 (CGRP) 和 P 物质 (SP) 释放增加^[15]; (3) 抑制羧基自由基释放^[16]、开放 ATP 敏感性钾通道及抑制线粒体通透性转换孔^[17], 通过再灌注损伤补救激酶 (RISK) 信号通路激活丝氨酸/苏氨酸激酶 (AKT) 及存活刺激因子提高 (SAFE) 通路激活信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 等^[11]。最近有研究表明, 阿片受体在远隔缺血预处理的心肌保护作用机制中占有重要地位^[18]。但具体作用机制还有待于进一步研究。

本实验显示, 肢体远隔缺血后处理对心脏的保护作用与缺血再灌注的时间呈负相关, 选择兔下肢作为远隔缺血处理对象, 操作简单且安全, 为在临床中的应用提供一些依据。

参考文献:

- [1] Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(4): H1883-1890.
- [2] 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(2): H579-588.
- [3] Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischemia[J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22(9): 656-665.
- [4] Penna C, Mancardi D, Raimondo S, et al. The paradigm of postconditioning to protect the heart[J]. *Cell Mol Med*, 2008, 12(4): 435-458.
- [5] Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, et al. Remote ischemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs[J]. *Heart*, 2007, 93(6): 749-758.
- [6] Wei M, Xin P, Li S, et al. Repeated remote ischemic postconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2011, 108(10): 1220-1225.
- [7] Hoole SP, Heck PM, Sharples L, et al. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP) study: a prospective, randomized control trial[J]. *Circulation*, 2009, 119(6): 820-827.
- [8] Loukogerakakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, et al. Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism[J]. *Circulation*, 2007, 116(12): 1386-1395.
- [9] 宋书波, 张伟华, 乔晨晖, 等. 远隔缺血后处理对猪心肌急性缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2011, 46(3): 445-450.
- [10] Han GP, Song JX, Ren JY, et al. Dual activation of AKT kinase and STAT-3 kinase is involved in the cardio protection by remote limb ischemia postconditioning in rats[J]. *Heart*, 2011, 97(3): A81-82.
- [11] Xin P, Zhu W, Li J, et al. Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic postconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(6): H1819-1831.
- [12] Ishtiaq A, Rahman Jorge G, Mascaro Rick P, et al. Remote ischemic postconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment? [J]. *Circulation*, 2010, 122(10): S53-59.
- [13] Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning brief renal ischemic and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors[J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(5): 404-412.
- [14] Tsubota H, Marui M, Esaki J, et al. Remote postconditioning may attenuate ischemic reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2010, 40(6): 804-810.
- [15] Song JX, Ren JY, Han GP, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 is involved in the transfer of cardio protection by remote limb ischemic postconditioning in rats[J]. *Heart*, 2011, 97(3): A81-87.
- [16] Shahid M, Tauseef M, Sharman KK, et al. Brief femoral artery ischemic drovides protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats: the possible mechanisms[J]. *Exp Physiol*, 2008, 93(8): 954-968.
- [17] Michael IO, Deepash DB, Deborah R. Postconditioning protects against human endothelial ischemia-reperfusion injury via subtype-specific KATP channel activation and is mimicked by inhibition of the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(10): 1266-1274.
- [18] Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, et al. Transient limb ischemia remotely preconditionings through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: evidence suggesting cross-species protection[J]. *Clin Sci*, 2009, 117(5): 191-200.