论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0046-03

缺氧新生豚鼠心肌缺血再灌注时 β_1 肾上腺能受体的变化及与心功能的关系

钟前进[1],汪曾炜[2],肖颖彬[1] ([1]第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037;[2]沈阳军区总医院心血管外科,沈阳 110016)

提 要:目的 研究缺氧新生豚鼠心肌缺血再灌注时 β_1 肾上腺能受体(β_1-AR)的变化及其与心功能的关系,以及St.Thomas Hospital cardioplegic solution Ⅱ(Thomas Ⅱ号液)和冷血心停搏液对 β_1-AR 和心功能的影响。**方法** 建立新生豚鼠常压缺氧模型和离体心脏左心做功模型,运用多导生物信号分析系统测定心功能指标,采用放射配基结合法测定心肌 β_1-AR 的密度和亲和力。**结果** 缺氧新生豚鼠心肌 20℃缺血再灌注后心肌 β_1-AR 的密度显著降低($P<0.01$)。Thomas Ⅱ号液使其降低更为显著,而冷血心停搏液则可促进 β_1-AR 密度的恢复。Thomas Ⅱ号液对缺氧新生豚鼠心脏缺血再灌注后的心功能无保护作用,而冷血心停搏液具有较好的保护作用。β_1-AR 的亲和力无明显变化($P>0.05$)。**结论** 缺氧新生豚鼠心肌缺血再灌注后心功能的下降与 β_1-AR 密度的降低有关,与其亲和力关系不明显。Thomas Ⅱ号液和冷血心停搏液对缺氧新生豚鼠心肌缺血再灌注损伤的不同影响可能与它们对 β_1-AR 密度变化的作用不同有关。

关键词: 缺氧;心肌再灌注损伤;β_1-肾上腺能受体;心停搏液

中图法分类号: R392.11; R654.1; R654.2 **文献标识码:** A

Relationship between β_1-aderenergic receptor and cardiac function in hypoxic newborn guinea-pig myocardia subjected to ischemic reperfusion

ZHONG Qian-jin[1], WANG Zeng-wei[2], XIAO Ying-bin[1] ([1]Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Cardiovascular Surgery, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyan 110016, Liaoning Province, China)

Abstract: Objective To study the relationship between β_1-aderenergic receptor (β_1-AR) and cardiac function in hypoxic newborn guinea-pig myocardia undergoing ischemic reperfusion, and the effects of St. Thomas Hospital cardioplegic solution Ⅱ (STS) and cold blood cardioplegia (CBC) on the β_1-AR and cardiac function. **Methods** Normobaric hypoxic guenia-pig model and isolated perfused working heart preparation were established. Cardiac functions were recorded by a multichannel biologic signal analyzer. Myocardial β_1-AR density (B_{max}) and affinity (K_d) were investigated by radial ligand binding. **Results** Significant decrease of B_{max} was found in hypoxic newborn guinea-pig myocardia suffering from hypothermic (20 ℃)-ishemic reperfusion ($P<0.01$). More pronounced fall of B_{max} was produced by STS, while significant recovery of B_{max} was improved by CBC. CBC but not STS could effectively protect cardiac function of hypoxic newborn guinea-pig subjected to myocardial ischemic reperfusion. No change of K_d was observed ($P>0.05$). **Conclusion** The impairment of cardiac function in hypoxic newborn guinea-pig undergoing myocardial ischemic reperfusion might be associated with the decline of B_{max}, but not with K_d. Different effects of STS and CBC on cardiac function may result from their different influences on B_{max}.

Key words: hypoxia; myocardial reperfusion injury; β_1-aderenergic receptor; cardioplegic solution

基金项目: 重庆市应用基础研究资助项目(2002104)

Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2002104)

作者简介: 钟前进(1967-),男,湖南省永州市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事心血管疾病的外科治疗和相关基础方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)65232828

收稿日期: 2004-07-10; **修回日期:** 2004-10-12

随着先天性心脏病外科治疗的幼龄化，对未成熟心肌尤其是缺氧（紫绀）未成熟心肌缺血再灌注损伤的特点及其保护的研究日趋重要。心肌 β_1-肾上腺能受体（β_1-AR）与心脏功能有着密切的关系。有关缺氧未成熟心肌缺血再灌注时 β_1-AR 的变化及其与心功能的关系的问题值得探索。

1　材料与方法

1.1　动物和模型

新生豚鼠，0～2 d，30 只，雌雄不拘，体质量 50～80 g，由第二军医大学实验动物中心提供。采用随机数字表法随机分为 3 组，每组 10 只。Ⅰ组：低温组，新生豚鼠心脏 20 ℃缺血 90 min，再灌注 60 min；Ⅱ组：Thomas 组，缺血时予 St.Thomas Hospital cardioplegic solution Ⅱ（Thomas Ⅱ号液），再灌注 60 min；Ⅲ组：冷血组，缺血时予冷血心停搏液，再灌注 60 min。

新生豚鼠常压缺氧（紫绀）模型[1]的建立：将（88%～85%）：（12%～15%）的混合氮氧气灌入常压缺氧密闭舱（上海海军医学研究所研制），调节进气量，使测氧仪所测值维持在（10±0.5）%。检测动脉氧分压（PO_2）和动脉血氧饱和度（SaO_2），分别维持在 20～30 mmHg 和 65%～70%。采用间断缺氧法，从氧浓度降至（10±0.5）%时开始计算，每天缺氧 10 h，共 2 d。

离体心脏顺灌左心做功模型的建立[2]：取豚鼠心脏，将主动脉断端套于主动脉插管上，行 Langendorff 逆灌，灌注液为 K-H 液，心脏复跳。行左房插管，停止逆灌，经左房顺行灌注。停止顺灌，低温组全心缺血 90 min，Thomas 组和冷血组在缺血开始和第 30 分钟和第 60 分钟时经主动脉分别逆灌 10 ℃ Thomas Ⅱ号液和冷血心停搏液。之后，予 37 ℃氧合 K-H 液逆灌，使心脏复跳，尔后顺灌 60 min。

1.2　心功能指标的测定

在缺血前和再灌注时，将左心室测压管连接于 MPA-Ⅳ型多导生物信号分析系统（第二军医大学基础医学部生理学教研室研制），测定各组左室收缩峰压（LVPSP）、左室舒张末压（LVEDP）、左室内压正负相最大变化速率（$\pm dp/dt_{max}$）、心输出量（CO）。

1.3　心肌 β_1-AR 的密度（B_{max}）和亲和力（Kd）的测定

将心肌组织匀浆，制备心肌细胞膜，－40 ℃保存，采用放射配基结合法测定心肌 β_1-AR B_{max} 和 Kd。

1.4　统计学处理

数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用配对和非配对资料 t 检验。

2　结果

2.1　心脏功能的变化

缺血前 3 组间各心功能指标均无显著性差异（$P>0.05$）。再灌注 60 min 时，LVPSP、$+dp/dt_{max}$ 和 CO 恢复率：Ⅱ组＜Ⅰ组＜Ⅲ组，Ⅱ组明显低于缺血前，且显著低于Ⅲ组（$P<0.01$），Ⅰ组亦明显低于Ⅲ组（$P<0.05$）。再灌注时，Ⅰ组和Ⅱ组的 LVEDP 显著上升（$P<0.01$），两组之间无明显差异（$P>0.05$），且明显高于Ⅲ组（$P<0.01$），Ⅲ组的 LVEDP 在再灌注 60 min 时与缺血前相比无显著升高（$P>0.05$）。再灌注时，Ⅰ组和Ⅱ组的 $-dp/dt_{max}$ 显著降低（$P<0.01$），两组之间无明显差异（$P>0.05$），但均明显低于Ⅲ组（$P<0.01$），Ⅲ组的 $-dp/dt_{max}$ 在再灌注 60 min 时与缺血前相比无显著降低（$P>0.05$）（表 1）。

2.2　心肌 β_1-AR B_{max} 和 Kd 的变化

缺血前 3 组 B_{max} 无明显差异（$P>0.05$）。缺血后和再灌注后Ⅱ组 B_{max} 降低最显著，明显低于缺血前（$P<0.01$）及Ⅰ组和Ⅲ组（$P<0.01$）。缺血后和再灌注后 3 组 Kd 无明显变化，3 组间亦无显著性差异（$P>0.05$）（表 2）。

表 1　缺氧新生豚鼠心脏功能的变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Changes of cardiac functions in hypoxic newborn guinea-pig（$\bar{x} \pm s$）

		Pre-ischemia	Intra-reperfusion (%#)			
			15 min	30 min	45 min	60 min
LVPSP (p/kPa)	Ⅰ	6.33±0.51	$48.83 \pm 3.98^{\Delta\Delta *}$	$54.19 \pm 4.83^{\Delta\Delta}$	$64.27 \pm 4.76^{\Delta\Delta *}$	$74.54 \pm 5.35^{\Delta *}$
	Ⅱ	6.51±0.47	$35.26 \pm 3.43^{\Delta\Delta **}$	$42.17 \pm 3.76^{\Delta\Delta **}$	$44.86 \pm 3.94^{\Delta\Delta **}$	$47.35 \pm 4.05^{\Delta\Delta **}$
	Ⅲ	6.28±0.49	$65.28 \pm 4.82^{\Delta\Delta}$	$75.41 \pm 5.03^{\Delta}$	87.16±5.96	90.37±6.27
LVEDP (p/kPa)	Ⅰ	0.14±0.05	$205.78 \pm 9.43^{\Delta\Delta **}$	$200.16 \pm 9.22^{\Delta\Delta **}$	$197.43 \pm 8.87^{\Delta\Delta **}$	$195.25 \pm 8.05^{\Delta\Delta **}$
	Ⅱ	0.15±0.03	$199.76 \pm 7.99^{\Delta\Delta **}$	$198.24 \pm 8.04^{\Delta\Delta **}$	$198.33 \pm 7.85^{\Delta\Delta **}$	$197.85 \pm 7.94^{\Delta\Delta **}$
	Ⅲ	0.16±0.06	$156.37 \pm 4.38^{\Delta\Delta}$	$128.56 \pm 4.06^{\Delta}$	109.71±3.51	103.16±3.22
$+dp/dt_{max}$ (kPa/s)	Ⅰ	110.42±8.27	$51.24 \pm 3.49^{\Delta\Delta *}$	$58.49 \pm 3.82^{\Delta\Delta *}$	$63.74 \pm 4.20^{\Delta\Delta *}$	$74.26 \pm 4.65^{\Delta *}$
	Ⅱ	107.48±8.33	$34.34 \pm 2.37^{\Delta\Delta **}$	$37.15 \pm 3.09^{\Delta\Delta **}$	$43.83 \pm 3.24^{\Delta\Delta **}$	$46.29 \pm 3.17^{\Delta\Delta **}$
	Ⅲ	106.25±8.46	$67.43 \pm 4.35^{\Delta\Delta}$	$75.94 \pm 4.72^{\Delta}$	83.57±5.35	92.31±6.07
$-dp/dt_{max}$ (kPa/s)	Ⅰ	69.35±4.73	$32.42 \pm 2.24^{\Delta\Delta **}$	$35.10 \pm 3.05^{\Delta\Delta **}$	$39.14 \pm 3.54^{\Delta\Delta **}$	$44.73 \pm 3.86^{\Delta\Delta **}$
	Ⅱ	70.44±4.69	$29.79 \pm 2.33^{\Delta\Delta **}$	$31.58 \pm 2.28^{\Delta\Delta **}$	$38.25 \pm 3.61^{\Delta\Delta **}$	$43.22 \pm 3.27^{\Delta\Delta **}$
	Ⅲ	68.67±4.87	$73.60 \pm 4.71^{\Delta}$	$78.55 \pm 4.82^{\Delta}$	86.46±5.54	93.81±6.13
CO (ml/min)	Ⅰ	9.05±0.85	$50.36 \pm 1.32^{\Delta\Delta *}$	$57.38 \pm 1.29^{\Delta\Delta *}$	$67.25 \pm 1.49^{\Delta\Delta *}$	$76.49 \pm 1.90^{\Delta *}$
	Ⅱ	8.92±0.79	$32.45 \pm 1.03^{\Delta\Delta **}$	$35.33 \pm 0.97^{\Delta\Delta **}$	$41.61 \pm 0.87^{\Delta\Delta **}$	$48.76 \pm 1.28^{\Delta\Delta **}$
	Ⅲ	8.57±0.81	$74.49 \pm 1.57^{\Delta}$	81.66±1.80	87.35±1.88	94.58±1.99

#: Ratios of intra-reperfusion data to pre-ischemia data; Δ: $P<0.05$, ΔΔ: $P<0.01$, *vs* pre-ischemia; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* group Ⅲ

表 2 缺氧新生豚鼠心肌 β_1-AR B_{max}和 K_d 的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Changes of myocardial β_1-AR B_{max} and K_d in hypoxic newborn guinea-pig ($\bar{x} \pm s$)

Group	Pre-ischemia		Post-ischemia#		Post-reperfusion##	
	B_{max}(mol/mg)	Kd(mol/L)	B_{max}(%)	Kd(%)	B_{max}(%)	Kd(%)
Ⅰ	8.86±0.48	74.53±4.58	65.34±5.16$^{\Delta *}$	97.25±5.07	75.90±5.62$^{\Delta *}$	95.46±6.07
Ⅱ	6.34±0.50	72.19±4.13	37.47±3.24$^{\Delta\Delta **}$	93.18±4.90	43.55±3.27$^{\Delta\Delta **}$	97.13±4.81
Ⅲ	7.75±0.43	73.06±4.99	79.52±6.05$^{\Delta}$	99.07±4.01	89.23±5.10	96.65±4.97

#: Ratios of post-ischemia data to pre-ischemia data; ##: Ratios of post-reperfusion data to pre-ischemia data; Δ: $P<0.05$, ΔΔ: $P<0.01$, *vs* pre-ischemia; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* group Ⅲ

3 讨论

缺氧后,心脏在形态、功能和代谢等方面均可能发生变化。Corno 等[3]将大鼠分别放置在空气常氧(吸入氧分数 0.21%)和低氧(吸入氧分数 0.10%)环境中 2 周,尔后进行离体心脏缺氧/复氧灌注。研究发现,低氧组大鼠红细胞明显高于常氧组大鼠,而摄水和进食量以及体质量和心脏重量明显低于常氧组大鼠,缺氧/复氧灌注后,低氧组大鼠心脏的收缩和舒张功能明显低于常氧组大鼠,组织摄氧能力亦明显降低。Forkel 等[4]的研究显示,慢性缺氧的成年大鼠心脏缺血再灌注后右室功能的恢复优于正常成年大鼠。Jezkova 等[5]认为慢性缺氧可改变左右心肌磷脂的脂肪酸构成。另有研究表明,慢性缺氧后,心功能可无明显变化,但在经受缺血后,紫绀心脏的心输出量明显低于正常心脏[1]。缺氧后,心肌 β-AR 及其介导的信号传递系统出现变化。Janelle 等[6]报道,将磷酸二酯酶Ⅲ抑制剂应用于冠心病患者的体外循环手术中,可减少环腺苷酸(cAMP)的消耗,但使左室射血分数降低,这可能提示并非由于 β_1-AR 介导的信号传导系统中的较后环节的变化导致心功能的降低。另有研究显示[7],结扎犬冠状动脉前降支后,缺血区的心肌 G 蛋白偶联受体激酶(GRK)Ⅱ的活性减弱,对 β_1-AR 脱敏作用丧失,提示缺血可抑制 GRK 对 β_1-AR 介导的信号转导的调节作用。有关缺氧未成熟心肌缺血再灌注后 β_1-AR 的变化及其与心功能的关系的研究鲜见报道。

本实验的结果显示,缺氧新生豚鼠在经历低温缺血再灌注后,β_1-AR 密度明显下降,各项心功能指标均显著降低,两者呈现出平行的变化趋势。Thomas Ⅱ号液对成熟心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,但由于未成熟心肌在形态、功能、代谢和对缺血再灌注的反应性有别于成熟心肌,故 Thomas Ⅱ号液对未成熟心肌缺血再灌注损伤的作用尚存争议[8]。含血心停搏液具有携氧、缓冲和对代谢产物的冲刷作用等优势,因此,对成熟和未成熟心肌缺血再灌注损伤均有良好的保护作用。本研究提示在缺氧后 Thomas Ⅱ号液不能保护甚至加重新生豚鼠心肌的缺血再灌注后心功能的损害,冷血心停搏液能有效地改善缺氧新生豚鼠心肌缺血再灌注后的心功能,减轻缺氧新生豚鼠心肌缺血再灌注损伤。两种心停搏液引起的心功能变化亦与 β_1-AR 密度的变化相平行。但是,缺氧新生豚鼠缺血再灌注后心功能的变化,Thomas Ⅱ号液和冷血心停搏液对缺氧新生豚鼠缺血再灌注损伤的不同作用,是由于 β_1-AR 密度明显下降所致,还是受体水平后的改变所致尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Nakanishi K, Inoue M, Sugawara E, *et al*. Ischemic and reperfusion injury of cyanotic myocardium in chronic hypoxic rat model: changes in cyanotic myocardial antioxidant system[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1997, 114(6): 1089-1096.

[2] 钟前进, 刘欲团, 曹新来, 等. 新生豚鼠离体心脏顺灌左心做功模型的建立[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(2): 191-192.

[3] Corno A F, Milano G, Samaja M, *et al*. Chronic hypoxia: a model for cyanotic congenital heart defects[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 124(1): 105-112.

[4] Forkel J, Chen X, Wandinger S, *et al*. Responses of chronically hypoxic rat hearts to ischemia: KATP channel blockade does not abolish increased RV tolerance to ischemia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(2): H545-551.

[5] Jezkova J, Novakova O, Kolar F, *et al*. Chronic hypoxia alters fatty acid composition of phospholipids in right and left ventricular myocardium[J]. Mol Cell Biochem, 2002, 232(1-2): 49-56.

[6] Janelle G M, Urdaneta F, Blas M L, *et al*. Inhibition of phosphodiesterase type Ⅲ before aortic cross-clamping preserves intramyocardial cyclic adenosine monophosphate during cardiopulmonary bypass[J]. Anesth Analg, 2001, 92(6): 1377-1383.

[7] Yu X, Zhang M, Kyker K, *et al*. Ischemic inactivation of G protein-coupled receptor kinase and altered desensitization of canine cardiac beta-adrenergic receptors[J]. Circulation, 2000, 102(20): 2535-2540.

[8] Wang J, Zhou X, Zhao Y, *et al*. Myocardial protection of immature rabbits: polarizing versus depolarizing[J]. J Surg Res, 2003, 111(1): 1-7.

(编辑 薛国文)