文章编号:1000-5404(2006)20-2077-03

论著

低温停搏液灌注压力对猪冠状动脉内皮及平滑肌功能的影响

张 新[1],乔晨晖[1],张伟华[1],廖秋明[2],Steen Stig[2] ([1]郑州大学附属第一医院心血管外科,郑州 450052;[2]Affiliated Hospital to Lund University, Lund SE-22185, Sweden)

提 要:目的 探讨心脏停搏液灌注压力高低对猪冠状动脉血管平滑肌功能及内皮依赖性舒张反应的影响。**方法** 用改良的St. Thomas' hospital液分别在40、60、80 mmHg的灌注压下灌注猪冠状动脉后,取2 cm长的猪冠状动脉前降支(left anterior descending branch, LAD)远端血管,外径1.0~1.5 mm,截成1 mm长的血管环。将所取血管环直接置入器官浴槽内测定内皮及平滑肌功能。通过蓄积方式加入浓度增递的P物质测定血管内皮依赖性舒张(endothelium dependent relaxation, EDR)功能。**结果** 在本实验灌注压力下,冠状动脉平滑肌的舒缩功能均不受影响($P>0.05$)。与新鲜对照组血管[(98.0±1.2)%]相比,40 mmHg和60 mmHg组冠状动脉的最大EDR值无显著下降[分别为(96.7±1.5)%、(96.6±1.9)%、($P>0.05$)],80 mmHg组血管的最大EDR值则显著降低[(90.8±2.2)%, ($P<0.01$)]。在血管内皮对P物质的敏感性(用50%最大舒张时的浓度值表示,pEC_{50})方面,与新鲜对照组对比,40 mmHg组血管环pEC_{50}值无显著降低($P>0.05$),60 mmHg组和80 mmHg组血管环的pEC_{50}值则显著降低($P<0.05$)、($P<0.01$)。**结论** 用改良的St. Thomas' hospital溶液灌注猪心时,60 mmHg的压力即可以造成冠状动脉内皮功能的损害,而且灌注压力越高,损伤越重。

关键词:猪;冠状动脉;内皮依赖性舒张;灌注压力
中图法分类号:R-322;R322.121;R331.32 **文献标识码**:A

Effects of perfusion pressure with cold cardioplegic solution on porcine coronary arterial endothelial and smooth muscle function

ZHANG Xin[1], QIAO Chen-hui[1], ZHANG Wei-hua[1], LIAO Qiu-ming[2], STEEN Stig[2] ([1]Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; [2]Affiliated Hospital to Lund University, Lund SE-22185, Sweden)

Abstract: Objective To investigate the effects of perfusion pressure with a cardioplegic solution on endothelium-dependent relaxation and smooth muscle function of porcine coronary artery. **Methods** The hearts were infused with a modified St. Thomas' hospital solution at the pressures of 40, 60 and 80 mmHg. The distal part of porcine left anterior descending coronary artery (LAD) having a diameter of 1.0 – 1.5 mm, was dissected free from the surrounding tissue, cut into 1 mm long segments, immediately transferred to organ baths for the evaluation of endothelial and smooth muscle function. **Results** Smooth muscle function was not affected after cardioplegic flushing at the pressures used in this study. The maximal endothelium-dependent relaxations of the vessels in 40 and 60 mmHg groups were not reduced compared to fresh segments. The maximal EDR was significantly reduced to (90.8±2.2)% ($P<0.01$) in 80 mmHg group. The sensitivity of coronary artery segments to substance P (expressed as the pEC50 value) was not decreased significantly after cardioplegic flushing at the pressure of 40 mmHg. Significant decrease in the sensitivity of coronary vessels was detected in 60 and 80 mmHg groups. The pEC50 values were (9.84±0.34), (9.83±0.32), (9.60±0.22) and (9.51±0.16) in fresh control, 40, 60, 80 mmHg groups. **Conclusion** Flushing the heart with the modified St. Thomas' hospital solution and using a perfusion pressure of 60mmHg, significantly reduce endothelium-dependent relaxation.

Key words: pigs; coronary artery; endothelium-dependent relaxation; perfusion pressure

作者简介:张 新(1969-),男,河南省郑州市人,博士,主治医师,主要从事心肌保护方面的研究。电话:(023)66862142
通讯作者:乔晨晖,电话:(0371)65167352, E-mail: qchenhui@hotmail.com
收稿日期:2006-06-29;**修回日期**:2006-09-06

在临床心脏移植中，供体心脏的保护通常是用低温(4 ℃) St. Thomas' hospital 心脏停搏液灌洗冠状动脉，停搏并迅速制冷心脏，然后低温浸泡保存。在停搏灌注时，冠状动脉内皮细胞直接受到灌注压力的机械刺激。实验研究表明，心脏停搏灌注可以引起猪冠状动脉内皮细胞功能的损害，甚至造成内皮细胞的丧失[1]。还有资料显示，过高的心脏停搏液灌注压力以及冠脉外科中动静脉移植物的过度扩张都可以直接引起血管内皮及平滑肌的损害，并影响术后心脏功能的恢复[2]；如果灌注压力过低，则冠状血管内的血液清除及停搏液的灌注不充分，亦影响冠状动脉内皮及心肌的保存效果[3]。因此，心脏停搏液灌注压力的高低对冠状动脉内皮及心肌的保护至关重要。

目前，临床上常用的停搏灌注压力不尽相同，约在40～80 mmHg 之间。本研究利用一种改良的 St. Thomas' hospital 溶液经主动脉根部灌注猪冠状动脉，旨在调查灌注压力高低对其冠状动脉前降支远端血管平滑肌功能及内皮依赖性舒张反应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康瑞典家猪40头，雌雄不拘，体质量(24.7±1.9) kg。所有实验动物由瑞典隆德大学医院心胸外科实验中心提供。

1.1.2 溶液和试剂 改良 St. Thomas' hospital 溶液，含 NaCl 120 mmol/L，KCl 25 mmol/L，$MgCl_2$ 16 mmol/L，$CaCl_2$ 1.2 mmol/L，Dextran 40 35 g/L；Krebs 溶液，含 NaCl 119 mmol/L，$NaHCO_3$ 15 mmol/L，KCl 4.6 mmol/L，NaH_2PO_4 1.2 mmol/L，$MgCl_2$ 1.2 mmol/L，$CaCl_2$ 1.5 mmol/L，葡萄糖 11 mmol/L。溶液均为新鲜配制，所有化学药品均购自德国 Merck Darmstadt 公司，达分析纯等级。U-46619(美国 Cayman 化学药品公司)溶解于乙醇，P 物质(美国 Sigma 化学药品公司)溶解于蒸馏水作为原液，二者均－20 ℃保存。

1.1.3 主要仪器 7E 型 Grass polygraph (Grass instrument Co, Quincy, Mass, USA)，张力传感器(Model FT03 D, Grass Instrument Co, Quincy, Mass, USA)，肌动描记器，由瑞典隆德大学医院医疗器械科定制。

1.2 冠状动脉的灌注及血管环的制备

实验动物麻醉前12 h禁食，但不禁水。麻醉及全身肝素化后，正中开胸暴露心脏，主动脉根部置停搏液灌注管，升主动脉阻断，用4 ℃的上述改良 St. Thomas' hospital 溶液灌注心脏，灌注时间3 min，并经主动脉根部记录灌注压力。停搏灌注后，取出心脏，在手术显微镜下，取出约2 cm长的冠状动脉前降支(left anterior descending branch, LAD)远端血管，外径1.0～1.5 mm，将其截成1 mm长的血管环。然后，将血管环直接置入器官浴槽中行 EDR 及平滑肌功能测定。

1.3 实验分组

将实验动物分为4组：新鲜对照组($n=10$)，心脏未经停搏灌注，被直接取出，剪取前降支及其周围心肌组织，滴注4 ℃的氧合 Krebs 溶液去除血管腔内血液，然后用于血管环制备；40 mmHg压力组($n=10$)，用4 ℃的改良 St. Thomas' hospital 溶液灌注停搏心脏，灌注压力为40、60、80 mmHg 压力组(每组 $n=10$)，同样方法灌注停搏心脏，灌注压力分别为60、80 mmHg。

1.4 血管收缩性及内皮依赖性舒张功能的测定

将血管环悬挂于器官浴槽内的2个金属挂钩上，一端挂钩连接张力传感器，并与7E型 Grass Polygraph 连接用于持续测定血管等长张力；另一端与一可移动装置相连，以此反复牵拉血管将其张力调节至生理状态10 mN，为基础张力。当血管环达到基础张力后，测量2个金属挂钩之间的距离，并以此计算血管的直径。器官浴槽中盛有5 ml的37 ℃ Krebs 溶液，并持续充以95 % O_2和5 % CO_2的混合气，pH 7.4。血管张力稳定后，用浓度为 5.7×10^{-7} mol/L 血栓烷 A_2受体激动剂 U-46619 诱导血管平滑肌收缩达坪值。用 Krebs 溶液反复冲洗血管以至恢复基础张力后，再用相同浓度的 U-46619 诱导第2次收缩，称作预收缩。当预收缩达到坪值时，向器官浴槽内累积加入浓度递增的 P 物质观察其诱导的 EDR，并计算每个浓度 P 物质诱导的血管舒张值占预收缩值的百分数、最大舒张反应值、50% 最大舒张时 P 物质的浓度(pEC_{50}，代表血管对药物的敏感性)。另外，随机选一血管环，不加入 P 物质，作为对照以证实没有自发性舒张发生。与对照组血管相比，若 P 物质没有诱导保存后的血管发生完全舒张，加入罂粟碱(10^{-4} mmol/L)以证实能否获得完全舒张。

1.5 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 冠状动脉环的直径

在基础张力下，各组血管内径分别为新鲜对照组：(1.32±0.09) mm；40 mmHg 组：(1.26±0.09) mm；60 mmHg 组：(1.28±0.09) mm；80 mmHg 组：(1.27±0.08) mm，3组血管环内径无显著差异($F=0.923$，$P=0.44$)。

2.2 低温灌洗后血管平滑肌的收缩能力

在3组之间，由 U-46619 诱导的最大收缩反应(预收缩)值不存在统计学上的显著差异($P>0.05$)，提示各组血管平滑肌的收缩能力没有变化。见表1。

表1 4组之间预收缩值、最大舒张值及 pEC_{50} 值比较 ($n=10$)

组别	预收缩值(mN)	最大舒张值(%)	pEC_{50}(-lgmol/L)#
新鲜对照组	17.0±4.2	98.0±1.2	9.84±0.34
40 mmHg 组	17.9±4.0	96.7±1.5[c]	9.83±0.32[c]
60 mmHg 组	17.3±2.6	96.6±1.9[c]	9.60±0.22[a]
80 mmHg 组	17.4±2.4	90.8±2.2[b]	9.51±0.16[b]

#：50% 最大舒张时的 P 物质浓度。a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与新鲜对照组比较；c：$P<0.05$，与80 mmHg 组比较

2.3 低温灌洗后血管内皮依赖性舒张功能

用舒张百分数表示不同浓度诱导的舒张效应，看不到标准

差符号时，可能被曲线图标所掩盖。

在新鲜对照组，P 物质能够诱导（98.0 ± 1.2）% 的最大舒张。与其对比，40、60 mmHg 组血管环段由 P 物质诱导的最大 EDR 值无显著下降（$P > 0.05$）。然而，80 mmHg 组血管环的最大 EDR 值却显著降低（$P < 0.01$）。见表 1。

在各组血管环段对 P 物质的敏感性方面，与新鲜对照组对比，40 mmHg 组血管环 pEC_{50} 值无显著降低（$P > 0.05$），60 mmHg组和 80 mmHg 组血管环的 pEC_{50} 值则显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。从 P 物质的浓度反应曲线来看，40 mmHg 组的曲线几乎与对照组重叠，这表明利用 40 mmHg 的灌注压力灌洗血管后血管对 P 物质敏感性与新鲜对照组比较无显著差异；60 mmHg 组和 80 mmHg 组的曲线均显著右移，提示血管对 P 物质敏感性显著下降。

2.4　低温灌洗后血管非内皮依赖性舒张功能

当 P 物质没有诱导完全舒张时（与对照组比较），向器官浴槽中加入 10^{-4} mol/L 的罂粟碱后，均能获得完全舒张，证明各组血管平滑肌舒张功能的完整性。

3　讨论

在心脏移植中，对供体心脏冠状动脉内皮的保护如同心肌保护一样至关重要。如果冠状血管内皮受到损害，将直接影响术后早期心脏功能的恢复，并显著促进术后心脏移植物血管病变 CAV 的发展，从而严重影响手术患者早期和远期的存活率[4]。研究表明，心脏停搏灌注时，灌注压力对冠状动脉内皮功能的影响甚大，过高或过低的灌注压力将损伤冠状动脉内皮或影响心肌保护的效果[2,3]。目前，关于灌注压力的高低对冠状动脉内皮及平滑肌功能的影响尚存争议。血管内皮功能的完整性能够通过测定血管内皮依赖性舒张反应（EDR）来评价，平滑肌的功能也能够测定其缩舒能力来评价[4]。我们利用 St. Thomas' hospital 溶液在不同压力下灌注猪心，测定其冠状动脉血管 CAV 的 EDR 和平滑肌的缩舒反应，考察了不同的灌注压力对冠状动脉内皮及平滑肌功能的影响，对心脏移植中供心停搏灌注压力的选择有一定指导意义。

本实验结果显示，当用 40 mmHg 的压力灌注冠状动脉时，冠状动脉血管的最大 EDR 值和内皮对 P 物质的敏感性与对照组相比无差异（$P > 0.05$），表明内皮及平滑肌功能均未受到损害；虽然 60 mmHg 组血管的最大 EDR 值与对照组相比无差异（$P > 0.05$），然而，血管内皮对 P 物质的敏感性显著降低（$P < 0.05$），表明内皮功能已受到损害；80 mmHg 组血管的最大 EDR 值和对 P 物质的敏感性均显著降低（$P < 0.01$），内皮功能损害较重。研究表明，缺血缺氧、低温、保存液的高钾成分（≥20 mmol/L）和灌注压力都会降低血管 EDR 和损害平滑肌的舒缩功能[4-6]。本研究中，各组血管暴露于缺血缺氧、低温、保存液的时间甚短，显然这些不是造成内皮功能损害的原因；虽然还有研究表明，钾离子浓度大于 20 mmol/L 的停搏液可以选择性地损害内皮源性的超级化因子（EDHF）介导的舒张反应[7]，但是在其他内皮依赖性舒张反应通路（NO 和前列环素通路）未受损时，EDR 应保持完整；况且，如果暴露于高钾时间较短时，EDHF 通路并不受损[4]。因此，我们认为在较高压力组（60、80 mmHg 组）出现的 EDR 功能损害与灌注压力有关，较高的灌注压力自身造成了内皮功能的损害。而且，灌注压力越高，内皮功能损伤越重。另外，本实验中，60、80 mmHg 的灌注压力并没有造成血管平滑肌的舒缩功能障碍，但这并非有利，因为一旦血管内皮损伤而平滑肌功能保持完整，易引起术后早期冠状血管痉挛，影响心肌血供，导致术后早期移植物衰竭。所以对内皮保护异常重要，内皮功能障碍可能造成术后移植物衰竭（冠脉血流障碍）和 CAV 的发生。

总之，停搏灌注压力自身可以造成冠状动脉内皮功能的损害，压力越高，损伤越重。因此，用此种改良的 St. Thomas' hospital 溶液停搏灌注心脏时，为保护血管内皮功能，主动脉根部灌注压力最好小于 60 mmHg。

参考文献：

[1] HARJULA A, MATTILA S, MATTILA I, *et al*. Coronary endothelial damage after crystalloid cardioplegia[J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 1984, 25(2): 147 - 152.

[2] KATAYAMA O, AMRANI M, LEDINGHAM S, *et al*. Effect of cardioplegia infusion pressure on coronary artery endothelium and cardiac mechanical function[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1997, 11(4): 751 - 762.

[3] MOHARA J, TSUTSUMI H, TAKEYOSHI I, *et al*. The optimal pressure for initial flush with UW solution in heart procurement[J]. J Heart Lung Transplant, 2002, 21(3): 383 - 390.

[4] KEVELAITIS E, NYBORG N C, MENASCHE P. Coronary endothelial dysfunction of isolated hearts subjected to prolonged cold storage: patterns and contributing factors[J]. J Heart Lung Transplant, 1999, 18(3): 239 - 247.

[5] PAROLARI A, RUBINI P, CANNATA A, *et al*. Endothelial damage during myocardial preservation and storage[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(2): 682 - 690.

[6] 法宪恩，权晓强. 体外循环术中去白细胞常温血心脏停搏液灌注对心肌的保护作用[J]. 郑州大学学报：医学版，2003，38(2)：208 - 210.

[7] HE G W, YANG C Q. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in coronary arteries by cold storage with University of Wisconsin solution[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(1): 122 - 130.

（编辑　陈聪连）