论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2258-04

高血脂对大鼠血液流变特性和心肌肌钙蛋白的影响

滕丽新[1],刘胜学[2],何作云[1] (第三军医大学:[1]新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037,[2]军事预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察高血脂大鼠早期血液流变特性的变化特点,探讨心肌缺血性损伤的发生机制。**方法** 给予72只SD大鼠高胆固醇+猪油+猪胆盐饲喂,建立高血脂大鼠模型即高脂组(HC),与普通饲料饲喂的36只SD大鼠即正常对照组(NC)相比较,饲喂10~90 d,每间隔10天为一取样时相点,测定9组高血脂大鼠的血脂、心肌肌钙蛋白Ⅰ(cTnI)和血液流变特性指标,并观察心肌及冠脉血管的病理变化。**结果** 本实验模型主要表现为高胆固醇、高低密度脂蛋白血症(LDL),随高脂饲喂时间延长,血浆粘度逐渐升高,红细胞变形性下降。饲喂50 d后cTnI升高,病理提示大鼠心肌出现局灶性缺血性损伤,相关分析表明高血脂大鼠心肌缺血性损伤的发生与血高胆固醇、高LDL密切相关。**结论** 高胆固醇血症血液流变特性的异常改变,是早期心肌缺血性损伤发生的原因之一。

关键词:胆固醇;心肌缺血;红细胞变形性;血浆粘度
中图法分类号: R322.11;R331.1;R589.2 **文献标识码:** A

Effects of hypercholesterolemia on hemorrheology and cTn-I in rats

TENG Li-xin[1], LIU Sheng-xue[2], HE Zuo-yun[1] ([1]Department of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Military Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the characteristics of hemorheologic changes of hyperlipidemia rats at an early stage and to explore the mechanism of myocardial ischemic injury. **Methods** Seventy-two SD rats which were fed with high cholesterol diet (cholesterol + lard + pig bile salt) to result in hyperlipidemia model fell into HC group. Thirty-six SD rats which were fed with common diet fell into control group. The rats were fed for 10 to 90 d. At an interval of 10 d, 9 time points were set. Therefore the 2 groups were randomly divided into 9 subgroups. At each time point, the changes of plasma lipids, cTnI, hemorheologic parameters, and pathological change of the rats' myocardium and coronary vessel were assayed. **Results** The main characteristic of our models was hypercholesterolemia and high low-density-lipoproteins (LDL). With the extension of feeding time, plasma viscosity of HC group increased significantly, and erythrocyte deformability decreased. After fed with cholesterol for 50 d, myocardial ischemic injury occurred in the HC group. Correlation analysis revealed that the incidence of myocardial ischemic injury in hyperlipidemia rats was closely related with hypercholesterolemia and high low-density-lipoproteins. **Conclusion** The abnormal change of hemorheologic characteristics of hypercholesterolemia is a cause of myocardial ischemic injury.

Key words: cholesterol; myocardial ischemia; erythrocyte deformability; plasma viscosity

高血脂作为冠心病(coronary heart disease, CHD)发病的最危险因素之一,一直是国内外研究的重点。血脂代谢异常不仅与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发生和发展有密切的关系,而且对冠心病急性事件(不稳定性心绞痛、急性心肌梗死和猝死)的发作也起到重要作用。心肌发生缺血性改变时,其血液流变学特征性改变主要表现有全血粘度升高,红细胞聚集性增强和变形能力降低等,这些异常改变同时可增加冠状动脉侧支血管的血流阻力,而且使流经缺血区末梢血管的有效侧支血流量进一步明显减少,加重心

作者简介:滕丽新,女,河北省冀县人,博士,主治医师,主要从事老年心血管疾病方面的研究,发表论文6篇。现在解放军324医院干部病房。电话:(023)68762193,E-mail:tlxin@163.com
通信作者:何作云,E-mail:hzuoyun@yahoo.com.cn
收稿日期:2009-03-10;修回日期:2009-05-10

肌缺血[1]。而在冠状动脉粥样硬化发生的早期,在未出现明显的冠脉血管狭窄的情况下,高血脂致血液流变学的改变是否可使心肌发生缺血性损伤? 本实验选用 Sprague-Dawley (SD)大鼠作为研究对象,饲喂高胆固醇饲料,以研究高血脂大鼠早期血液流变特性,及其诱导心肌缺血性损伤的发生机制,为冠心病早期发病的预防和治疗提供一定的理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验大鼠的分组和饲喂

1.1.1　大鼠的分组　　6 周龄 SD 大鼠,体质量(120 ± 10)g,共 108 只,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。普通基础饲料饲喂 1 周后,分成 2 组:高脂组(HC 组)72 只,高脂饲料饲喂时间为 10 ~ 90 d,分别记为 HC10、HC20、HC30、HC40、HC50、HC60、HC70、HC80、HC90 共 9 个时相点,每个时相点 8 只;正常对照组(NC 组)36 只,饲料喂养时间同 HC 组,每个时相点 4 只。上述各组均雌雄各半。

1.1.2　大鼠的饲喂　　HC 组饲以高脂饲料(胆固醇 2% + 猪油 10% + 猪胆盐 1% + 普通基础饲料 87%;胆固醇,购自北京鼎国生物技术有限责任公司,编号 DH061-2;猪油及普通基础饲料由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供;猪胆盐购自四川省成都科龙化工试剂厂。以上各成分均由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心混合制成高脂饲料),自由进食进水;NC 组饲以普通基础饲料,自由进食进水。饲喂 10、20、30、40、50、60、70、80、90 d 后,进行相关指标的检测。术前大鼠禁食,空腹时间约 12 h。

1.2　血液指标的检测

颈总动脉抽血分别注入无抗凝剂的干燥管、肝素抗凝管和 3.8% 枸橼酸钠抗凝管,用第三军医大学西南医院检验科的全自动生化分析仪 7000 型(美国贝克曼库尔特公司产品)、免疫荧光分析仪(德国贝克曼公司产品)及配套试剂盒,小鼠抗大鼠 cTnI 单克隆抗体(美国 Cedarlane 公司),FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(美国 Jackson ImmunoResearch 公司)分别检测血脂、心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin-I, cTnI);采用 DCU-3B 型锥板式粘度计(日本)测定血液流变学指标,分别测量高、中、低切变率200 s^{-1}、30 s^{-1}、3 s^{-1}下的全血粘度(η_b),200 s^{-1}切变率下的血浆粘度(η_P),红细胞压积(HCT),红细胞聚集指数与红细胞变形指数。

1.3　心肌及血管组织病理学观察

1.3.1　标本制取　　取血完毕后,暴露心脏,结扎心脏的大血管,在右心室剪一小口,将 4 ℃预冷的 D-Hanks 液注入左心室腔,逆行灌注 4 ~ 5 min,取出心脏,横切取中部心肌,取出主动脉段(包含升主动脉、降主动脉段和胸主动脉段),生理盐水清洗干净,以 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定 24 h,常规石蜡包理、切片,苏木精 - 伊红(HE)染色,光镜下观察并照相。

1.3.2　血管管径的测定　　应用 Q550 LW 图像处理与分析系统对主动脉弓部和冠状动脉进行分析,运用 Leica Qwin 软件测量血管的如下指标:过血管轴心的内弹力层之间的最长内径(d1)和最短内径(d2),血管平均内径(d) = (d1 + d2)/2。

1.4　统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件,血液指标的组间差异用单向方差分析(NC 组组内差异经单向方差分析,$P > 0.05$,故将 NC 各时相点合并为 NC 组,与 HC 各时相点分别进行比较),并采用双变量相关分析法包括积矩相关系数法(Pearson 相关系数,对于双变量正态分布资料),或等级相关系数非参数法(Spearman 相关系数,对于非双变量正态分布资料)进行两两变量之间的相关分析。

2　结果

2.1　实验大鼠血脂和 cTnI 的测定

随高脂饲喂时间的延长,大鼠血总胆固醇(Tch)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、载脂蛋白(APO-B)和 cTnI 水平有逐渐上升的趋势,其中 HC 组各时相点的 Tch 与 NC 组相比,具有统计学差异($P < 0.05$),HC 组中各时相点之间,高脂饲料喂养后期 LDL-C、APO-B、cTnI 较早期升高显著($P < 0.05$);HC80、HC90 组 APO-B 与 NC 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);HC50、HC70、HC80、HC90 组 cTnI 与 NC 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1　实验大鼠血脂和心肌肌钙蛋白的测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Tch (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	APO-B (g/L)	cTnI (ng/ml)
NC 组	36	1.59 ± 0.47	0.60 ± 0.21	0.31 ± 0.09	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02
HC10 组	8	2.52 ± 0.31[a]	0.65 ± 0.24	0.55 ± 0.11[a]	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
HC20 组	8	2.72 ± 0.38[a]	0.74 ± 0.23	0.56 ± 0.18	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02
HC30 组	8	2.40 ± 0.17[a]	0.67 ± 0.13	0.44 ± 0.13	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
HC40 组	8	3.77 ± 0.85[a]	0.73 ± 0.14	0.79 ± 0.17[ac]	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.14
HC50 组	8	3.85 ± 1.34[a]	0.73 ± 0.27	0.90 ± 0.36[ac]	0.06 ± 0.05	0.39 ± 0.44[a]
HC60 组	8	4.51 ± 2.48[a]	0.58 ± 0.17	0.81 ± 0.55	0.06 ± 0.09	0.07 ± 0.06
HC70 组	8	3.24 ± 0.88[a]	0.82 ± 0.33[ad]	0.68 ± 0.18	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.02[ab]
HC80 组	8	4.94 ± 1.66[a]	0.73 ± 0.14	0.91 ± 0.36[ac]	0.05 ± 0.01[ac]	0.24 ± 0.07[ab]
HC90 组	8	4.70 ± 1.50[a]	0.72 ± 0.11	0.85 ± 0.29[ac]	0.05 ± 0.01[ac]	0.39 ± 0.41[ac]

a:$P < 0.05$,与 NC 组比较;b:$P < 0.05$,与 HC10 组比较;c:$P < 0.05$,与 HC30 组比较;d:$P < 0.05$,与 HC60 组比较

2.2　实验大鼠血液流变特性的测定

在高、中、低剪切率条件下,血液粘度的改变在各组之间比较无统计学差异($P > 0.05$);随高脂饲喂时间的延长,血浆粘度有上升的趋势,HC80、HC90 组血浆粘度与 NC 组比较有统计学差异($P < 0.05$);HC 组红细胞压积(HCT)与 NC 组相比较无统计学差异($P > 0.05$);HC80 组红细胞聚集指数与 NC 组相比较有统计学差异($P < 0.05$),HC30 ~ HC90 组红细胞变形指数与 NC 组相比,有统计学差异($P < 0.05$)。见表 2。

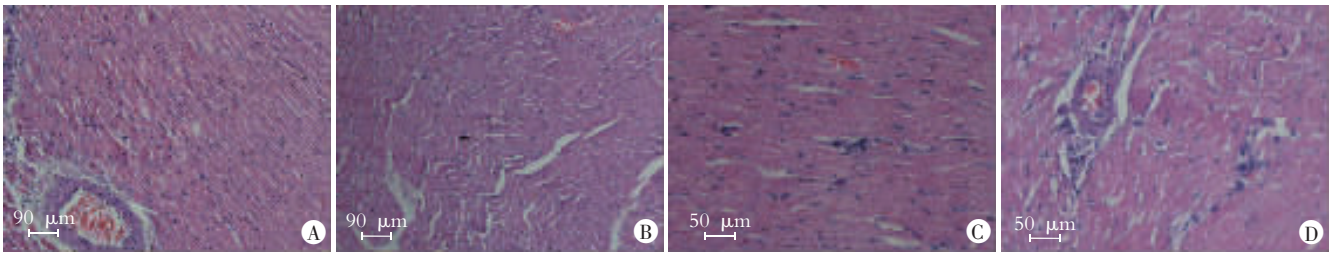
2.3　实验大鼠主动脉、冠状动脉及心肌病理学观察

病理学观察结果显示,随着高脂饲喂时间的延长,HC 组主动脉和冠状动脉管径与 NC 组相比较无明显差异($P > 0.05$),未见有明显的粥样硬化性斑块形成;高脂饲喂 70 d 后,HC 组大鼠心肌出现局灶性缺氧性损伤,表现为局部心肌细胞变性(嗜伊红染色增强,心肌呈波浪样)、心肌间质出血、心肌小动脉周围有少量慢性炎性细胞浸润,主要有淋巴细胞和浆细胞(图 1)。

表2 血液流变特性指标的检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	η_b200 s^{-1}(mPa·s)	η_b30 s^{-1}(mPa·s)	η_b3 s^{-1}(mPa·s)	η_P(mPa·s)	HCT(%)	红细胞聚集指数	红细胞变形指数
NC 组	36	5.24±0.60	6.36±0.76	11.53±1.53	1.13±0.06	43.06±5.71	10.98±2.04	1.09±0.10
HC10 组	8	4.55±0.60	5.47±0.73	10.67±1.73	1.19±0.09	39.63±3.46	9.09±2.10	1.04±0.08
HC20 组	8	4.16±0.52[a]	5.02±0.65[a]	9.87±2.09	1.15±0.07	35.50±3.56	8.66±2.11	1.13±0.04
HC30 组	8	4.05±0.69	4.89±0.86	10.01±2.57	1.21±0.14	38.86±4.67	8.45±2.69	0.98±0.09[ab]
HC40 组	8	4.25±0.39[a]	5.10±0.46[a]	10.14±1.22	1.18±0.02	40.80±3.19	8.60±1.18	0.98±0.04[ab]
HC50 组	8	4.18±0.48[a]	4.87±0.35[a]	9.60±1.14	1.19±0.10	39.43±3.16	8.42±1.39	0.99±0.06[ab]
HC60 组	8	4.33±0.38[a]	5.22±0.47[a]	10.34±1.18	1.14±0.09	41.88±3.14	9.15±1.58	0.99±0.05[ab]
HC70 组	8	4.77±0.55	5.89±0.80	11.04±1.09	1.19±0.09	42.75±5.23	8.60±1.31	1.01±0.13[ab]
HC80 组	8	5.24±1.03	6.45±1.45	11.47±1.52	1.25±0.07[a]	43.25±6.04	7.85±0.46[a]	1.00±0.09[ab]
HC90 组	8	4.71±0.82	5.87±1.22	11.00±1.26	1.23±0.06[a]	41.50±6.28	8.56±0.96	1.00±0.10[ab]

a:$P<0.05$, 与 NC 组比较; b:$P<0.05$, 与 HC20 组比较



A:局部心肌细胞嗜伊红染色增强;B:局部心肌间质少量血细胞渗出,心肌呈波浪样改变;C:心肌间质少量血细胞渗出,有少量淋巴细胞和浆细胞浸润;D:局部心肌细胞嗜伊红染色增强,心肌间质少量血细胞渗出,有少量慢性炎性细胞浸润,主要有淋巴细胞和浆细胞

图1 HC90 组大鼠心肌组织病理学观察 (HE)

2.4 实验大鼠血脂、cTnI 和血液流变特性等各指标之间的相关性分析

大鼠体质量增加与血清 Tch、LDL-C 呈正相关($r=0.155$, $r=0.222$, $P<0.01$),说明大鼠的体质量增加与高脂饲喂及时间长短有关;Tch、LDL-C 与 cTnI、η_P 呈正相关($r=0.42$, $r=0.255$, $r=0.296$, $r=0.301$, $P<0.01$, $P<0.05$),与 DI 呈负相关($r=-0.334$, $r=-0.323$, $P<0.01$, $P<0.05$),表明血液 Tch、LDL-C 浓度升高与血浆粘度增加、红细胞的变形能力降低密切相关,心肌损伤的发生与高胆固醇血症也密切相关,高血脂和血液流变特性的改变参与心肌缺血的发病机制。

3 讨论

正常情况下,冠状动脉阻力的大部分(95%)来自心肌壁内的小动脉和微动脉[2],即使大血管无明显狭窄,由于微循环阻力增加亦可以引起心肌灌注不足,而导致缺血性心脏病事件的发生。微血管性心绞痛(X综合征)患者的冠状动脉造影是正常的,但却有明显的心肌缺血表现(心绞痛症状和心电图运动试验阳性等),冠状动脉血流储备能力的降低是其重要的发病机制,包括冠状动脉微循环功能性和器质性的改变。

CHD 为一多因性疾病,高血脂是其重要的致病因子。高水平的 Tch 和 LDL 引起冠状动脉粥样硬化及再狭窄的机制主要在以下 3 个方面[3]:①Tch 升高可激活血浆中补体,进而激活白细胞,活化的白细胞产生呼吸爆发,释放大量超氧阴离子(O_2^-)自由基及蛋白酶,可引起血脂氧化修饰,将 LDL 转变成氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL),ox-LDL 与机体内产生的 ox-LDL 抗体结合后形成免疫复合物,可通过免疫性炎症使血管壁受损;②ox-LDL 可以通过 Fcγ 受体介导的径路,促进单核细胞衍生的巨噬细胞摄取 ox-LDL,向泡沫细胞转化,活化并分泌多种细胞因子,促进平滑肌细胞增殖,形成原发粥样硬化病灶或狭窄;③O_2 还可以灭活 NO,使血管内皮依赖性舒张功能减退。随之产生的问题是冠状动脉粥样硬化发生早期,未有明显血管狭窄形成时,高血脂是否已经可以造成局部心肌缺血性损伤?

本实验结果提示,血清中 Tch 浓度升高可引起血细胞结构和功能的变化,对组织和器官缺血、缺氧的发生发展起着重要作用。有研究认为,高水平的 Tch 和 LDL 可以改变血液细胞的形态和膜流动性,进而增加微血管结构和功能损伤的危险性[4]。①血清高浓度 Tch 可引起红细胞膜脂中 Cho/Pl 值升高,使膜微粘度增加,变形性下降,从而使血流阻力增加;②Tch 升高可激活血浆中补体和白细胞,大量超氧阴离子(O_2^-)自由基及蛋白酶的释放[3],同样可引起红细胞膜脂质

过氧化损伤,使其变形性降低;而血液粘度主要由血细胞比容、血浆粘度、红细胞聚集性和变形性等内在因素决定的,红细胞的变形性与微循环功能关系密切[5],它可影响微循环的有效灌注,对微循环的正常血流是个重要的动力学因素。血浆粘度增高与氧的运送率成反比,导致组织缺氧,引发多种因素导致细胞损伤,造成心肌组织结构及功能损害。有研究发现红细胞压积正常的情况下,血浆粘度升高,可使左心室心内膜下氧释放减少 30%[6,7];实验研究也表明,急性心肌梗死或心肌缺血时,血液流变学出现特征性改变,主要表现为全血粘度升高,红细胞聚集性增强和变形能力降低等[8],这些异常改变可增加冠状动脉侧支血管的血流阻力,而且使流经缺血区末梢血管的有效侧支血流量明显减少,加重心肌缺血;实验还观察到,心肌缺血局部血液粘度的变化较体循环静脉血更为明显。

本实验建立的高脂大鼠模型,采用加喂胆固醇 + 猪油并辅以猪胆盐的高脂饲料,饲喂时间长达 90 d,较早(10 d)产生了明显的高脂血症。高脂饲料饲喂 90 d 期间,病理检查均未发现明显的主动脉和冠状动脉的狭窄,但是在饲喂 50 d 后心肌病理学检查表现出缺血性心肌损伤。本实验同时检测血中 cTnI 的含量,以期进一步明确心肌缺血性损伤的发生。

cTnI 是心肌的特异性抗原,仅存于心肌收缩蛋白的细肌丝上,仅分布于心房肌和心室肌中,与骨骼肌无交叉反应,具有高度的心肌特异性[9]。正常情况下,cTnI 不能通过完整细胞膜释放入血,只有当心肌细胞因缺血、缺氧发生变性、坏死等心肌损伤时,cTnI 方可透过破损的细胞膜释放入血,3 ~ 4 h 即可明显升高,而且在血液中持续时间较长,其释放量与心肌损伤程度呈正比[10]。目前国内外研究对于以 cTnI 作为心肌损伤的标记物已得到公认[11]。本实验以超过正常对照组测定值的单侧第 95 百分位值为损伤标准,以了解心肌损伤在高脂血症中的发生和损伤程度。本实验通过对 cTnI 的测定,发现高脂饲喂 50 d 后,发生心肌损伤,高脂饲喂 70 d 后,结合病理学检查,结果显示 HC 组大鼠心肌出现局灶性典型的缺血性损伤的改变,肯定了高胆固醇血症可在冠脉血管发生狭窄之前即可导致局部心肌缺血性损伤的发生。本实验相关分析结果可见,血脂与 cTnI 之间存在显著相关性($P < 0.01$, $P < 0.05$),血清 Tch、LDL-C 与 cTnI 呈高度正相关,表明 cTnI 随着 Tch、LDL-C 水平的上升而升高,提示高脂血症大鼠局部心肌发生缺血性损伤,与高胆固醇、高 LDL 密切相关。本实验结果也表明,高胆固醇饮食可以使血浆粘度升高,红细胞变形性降低,HC 组饲喂后期血浆粘度与 NC 组相比较显著性升高,而红细胞变性指数显著下降。血浆粘度和 Tch、LDL-C 呈高度正相关,红细胞变形性与 Tch、LDL-C 呈高度负相关 。

本实验证实在高胆固醇血症,冠状动脉粥样硬化发生的早期,高血脂即可导致血浆粘度升高,红细胞变形能力下降,可使局部心肌发生缺血性损伤,究其原因为:血液流变特性的改变降低了红细胞的携氧能力;ox-LDL 对内皮细胞的损伤作用,可能导致冠脉微循环功能障碍。血液流变性变化对心肌缺血性损伤的作用机制十分复杂,其确切机制有待进一步研究。

综上,红细胞变形能力的下降,可以作为心肌微循环功能障碍的早期信号之一,临床医师需高度重视,对高血脂患者有效降低血脂和血浆粘度有助于避免或减轻早期心肌缺血性损伤的发生。

参考文献:

[1] Cecchi E, Liotta A A, Gori A M, *et al*. Comparison of hemorheological variables in ST-elevation myocardial infarction versus those in non-ST-elevation myocardial infarction or unstable angina pectoris[J]. Am J Cardiol, 2008, 102(2): 125 - 128.

[2] Bradley A T, Alpert J S. Coronary flow reserve[J]. Am Heart J, 1991, 122(4 Pt 1): 1116 - 1128.

[3] Chang R R, Chien N T, Chen C H, *et al*. Spontaneous activation of circulating granulocytes in patients with acute myocardial and cerebral diseases[J]. Biorheology, 1992, 29(5 - 6): 549 - 561.

[4] Lee C Y, Kim K C, Park H W, *et al*. Rheological properties of erythrocytes from male hypercholesterolemia[J]. Microvasc Res, 2004, 67(2): 133 - 138.

[5] 何作云, 王瑞兴. 临床细胞流变学[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1997:221.

[6] 刘久波, 欧阳静萍, 王　霞, 等. 急性肾功能衰竭兔血液流变性改变致心肌缺血性损伤的研究[J]. 微循环学杂志, 2005, 15(1): 54 - 55.

[7] 谭华炳. 绞股蓝对兔高脂血症与血液流变学影响的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15): 1497 - 1499.

[8] 刘　军, 张利华. 急性心肌梗死患者溶栓治疗后血液流变性及甲襞微循环变化[J]. 中国血液流变学杂志, 2007, 17(2): 242 - 244.

[9] Babuin L, Jaffe A S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury[J]. CMAJ, 2005, 173(10): 1191 - 1202.

[10] Parmacek M S, Solaro R J. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes[J]. Prog Cardlovasc Dis, 2004, 47(3): 159 - 176.

[11] 赵慧辉, 王　伟. 冠心病血浆主要标志物研究现状[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(4): 335 - 336.

(编辑　王小寒)