经验交流

文章编号:1000-5404(2010)21-2358-02

缺血后处理对培养乳鼠心肌细胞模拟缺血再灌注损伤的作用

沈 诚,范士志,陈建明,李志平,廖祥丽 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管外科)

【关键词】 缺血后处理;缺血再灌注;心肌细胞
【中图法分类号】 R541.4 【文献标志码】 B

随着溶栓疗法、经皮腔内冠脉血管成形术、冠脉搭桥术等方法的临床应用,急性心梗后缺血心肌能够重新获得血液供应,心肌缺血性损伤明显减轻。然而随之带来的再灌注损伤,直接影响到患者的预后。如何保护缺血心肌免于再灌注损伤已成为现今研究的重要内容。近年研究发现在再灌注前进行反复短暂的心肌缺血再灌注能对抗心肌缺血再灌注损伤,进而提出缺血后处理的概念[1]。从心肌缺血不可预知的角度讲,缺血后处理较预处理有更大的临床应用前景。为排除体内神经、体液及局部不同类型细胞间的相互影响,本研究采用纯化培养的心肌细胞建立缺血再灌注损伤模型,从细胞水平观察缺血后处理对体外培养的心肌细胞缺血再灌注损伤的直接保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TUNEL 试剂盒、噻唑蓝(MTT)、细胞用矿物油为 Sigma 公司产品,DMEM(Gibco 公司),胰蛋白酶(Difco 公司),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(Olympus 公司),丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒为南京建成公司产品,胎牛血清为中科院天津血研所产品。其他常用试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 乳鼠心肌细胞的培养

取出生后 1~2 d 的健康雄性 Wistar 大鼠 24 只,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。参照文献[2]采用胰蛋白酶组织消化法分离、乳鼠心肌细胞。

1.3 动物分组

将乳鼠心室肌细胞在无血清的 DMEM 培养基中常压培养 1 h 后,随机分为 4 组:对照组(A 组)、模拟缺血再灌注组(B 组)、缺血后处理组(C 组)、缺血预处理组(D 组)。模拟缺血再灌注模型的建立,参照文献[3]方法,并结合本实验室改造:模拟缺血,即把心肌细胞离心 5 min,弃去大部分上清液,余留约占细胞体积 1/3 的液体,然后加盖矿物油 0.2 ml 以隔绝氧气,37 ℃培养。模拟再灌注即去掉细胞沉淀上的盖矿物油,吸取细胞沉淀,加入到用 95% O_2 ~5% CO_2 氧合好的无血清 DMEM 培养基中培养。

模拟缺血再灌注组:模拟缺血 60 min,再灌注 30 min;缺血预处理组则先行 3 个循环的缺血 1 min,再灌注 1 min,再模拟缺血 60 min,再灌注 30 min。缺血后处理组心肌细胞模拟缺血 60 min 后行 3 个循环的再灌注 1 min,缺血 1 min,再灌注 30 min。对照组无血清培养相应时间。

1.4 检测指标及方法

(1)噻唑蓝比色法(MTT)检测心肌细胞活性:把模拟缺血后的各组(含对照组)细胞沉淀加入到 96 孔板,每孔 3 ml 细胞沉淀(约 1×10^5 细胞),重悬细胞于 200 ml 氧合的无血清 DEME 培养基中,每组 8 孔;培养 30 min 后每孔加入 MTT(5 mg/ml)20 ml,37 ℃培养 4 h;60 r/min 离心 5 min,弃上清;每孔加入 DMSO 150 ml,振荡 20 min 使蓝色结晶充分溶解;在酶联检测仪上检测其 D(490)值,以此结果计算心肌细胞活性。计算公式为:细胞存活率 = 实验组 D(490)/对照组 D(490) ×100%。(2)取各组上清液行乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测。其 LDH 活力用全自动生化仪检测,MDA 含量、SOD 活力分别用试剂盒测定。(3)心肌细胞凋亡检测:取各组心肌细胞爬片,按 TUNEL 试剂盒说明书方法原位检测凋亡细胞,阴性对照为不加末端脱氧核苷酰转移酶(TDT)。TUNEL 阳性反应为细胞核呈棕褐色或棕黄色颗粒,细胞核呈 TUNEL 阳性反应且具备细胞凋亡的形态学特征者被判定为凋亡细胞。每张切片随机取 5 个高倍镜(×400)视野,计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数,两者比值 ×100% 为凋亡百分率,即凋亡指数(AI)。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组心肌细胞活性的变化

模拟缺血再灌注损伤后各组心肌细胞成活率明显降低,与对照组(100%)相差非常显著($P<0.01$)。各处理组心肌细胞活性较高,与 B 组[(33.13±4.31)%]比较,C 组[(71.05±12.46)%]、D 组[(68.38±9.55)%]差异有统计学意义($P<0.01$);其中 C 组心肌细胞成活率比 D 组稍高,但无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组细胞上清液 LDH、MDA 和 SOD 含量比较

缺血再灌组的 LDH 和 MDA 均高于正常对照组,而 SOD 含量则低于对照组($P<0.01$)。在缺血后处理组(C 组),LDH、MDA 均显著低于 B 组,而 SOD 高于 B 组($P<0.01$)。与 A 组相比较,仅有少许变化,但无统计学意义($P>0.05$)。在缺血预处理组(D 组),LDH、MDA 均显著高于 A 组,而 SOD 低于 A 组($P<0.01$)。与 B 组相比较,仅有少许变化,但无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

【基金项目】 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 2009 年开放基金(SKLKF 200915)
【通信作者】 沈 诚,电话:(023)68757823,E-mail:sc941@sina.com

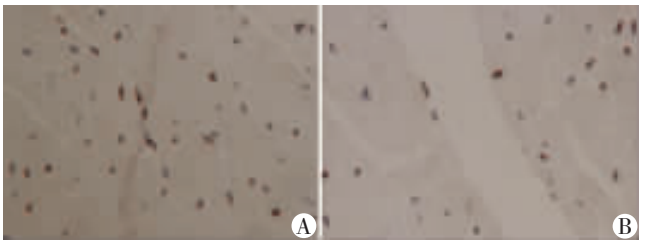
表 1 各组心肌细胞上清液 LDH、MDA 及 SOD 的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	LDH(IU/L)	MDA(nmol/ml)	SOD(U/ml)
A	21.35 ± 1.63	8.17 ± 0.76	25.27 ± 1.14
B	49.52 ± 1.33[a]	19.24 ± 1.69[a]	11.41 ± 0.68[a]
C	23.27 ± 1.26[b]	9.13 ± 0.54[b]	22.24 ± 0.83[b]
D	47.12 ± 1.51[a]	18.83 ± 0.69[a]	12.18 ± 0.73[a]

a:$P<0.01$,与正常对照组(A 组)比较;b:$P<0.01$,与缺血再灌注组(B 组)比较

2.3 细胞凋亡检查

A 组[(1.41 ± 0.27)%]未见明显凋亡,而缺血再灌注后 B 组[(17.03 ± 3.32) %]可见到心肌细胞明显凋亡($P<0.01$)。C 组[(6.11 ± 1.46)%]与 D 组[(7.39 ± 1.63)%]心肌 AI 较 B 组也有明显降低($P<0.01$),但仍明显高于正常。见图 1。



A:缺血再灌注组;B:缺血后处理组

图 1 免疫组化检测心肌细胞凋亡情况 (TUNEL ×400)

3 讨论

长期以来,人们都认为任何方式的缺血都会对心肌造成伤害。近年研究发现,冠状动脉反复多次的短暂的缺血可以使心肌在后续更长时间的缺血中得到保护,这一现象即缺血预处理[4]。它是减轻缺血再灌注损伤最有效的方法。但在临床上,患者往往在出现严重心绞痛或发生心肌梗死后才到医院就诊,缺血预处理虽然具有减轻心肌缺血损伤、保护心肌的作用,但必须在心肌缺血发生之前实施,因此限制了预处理保护心肌作用在临床上的应用范围。

2003 年 Zhao 等[5]首先在犬心模型中发现缺血后处理现象,并认为可以减轻再灌注损伤。即对狗的缺血再灌注模型的研究中[6],在心肌缺血较长时间后,再灌注开始前,对心脏予以重复开通 30 s、再结扎 30 s 的连续 3 个循环,即 30 s 再灌 30 s 再阻断,总时程达 3 min,随后恢复冠状动脉血流,结果表明与对照组相比较可缩小梗死面积,血浆肌酸激酶明显降低,同时可显著减轻细胞水肿,减少缺血区中性粒细胞的聚集,保护缺血区冠状动脉内皮细胞功能,与缺血预处理的保护效应相当。其后,许多学者将该种处理应用于家兔、大鼠心脏、大鼠心肌细胞等,结果均表现出心肌保护作用,是机体另一种内源性心肌保护措施[7]。与缺血预处理比较,缺血后处理方式最大的优点在于保护性的多次短暂复灌/缺血是施加于缺血发生之后。但由于其发现时间较晚,其心肌保护机制尚未明确。本研究发现,与对照组相比较,缺血再灌注组心肌细胞活性明显降低($P<0.01$);而与缺血再灌注组相比较,缺血后处理及缺血预处理组心肌细胞活性明显升高($P<0.01$),这表明缺血后处理能够产生与缺血预处理相类似的心肌保护效应。

LDH 存在于心肌组织中,当心肌缺血损伤时,心肌中 LDH 释放入血中,导致血清 LDH 浓度显著增高。MDA 是氧自由基与脂质发生过氧化反应的主要终末代谢产物,测定其浓度可准确了解机体氧化损伤的程度。SOD 是酶促防御系统,是一种重要的氧自由基清除剂,主要负责清除超氧阴离子。缺血和再灌注时存在明显的氧化损伤,抗氧化活性水平显著下降,血清 SOD 活性下降,MDA 含量增多,氧化损伤产生大量自由基,导致细胞死亡增多。与缺血再灌注组相比,缺血预处理组 MDA 及 SOD 无显著变化,说明减轻自由基损伤不是预处理心肌保护的主要机制,与文献[8]报道相符。缺血后处理组与缺血再灌注组相比,MDA 明显降低,SOD 活力升高,证实缺血后处理对心肌细胞而言的确有较好的抗活性氧损伤的作用。细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤的主要形式[9],抑制细胞过度凋亡可降低缺血再灌注对心肌的损伤[10]。本研究表明,与对照组心肌细胞的凋亡不明显相比,缺血再灌注组心肌细胞凋亡指数明显升高,而缺血后处理及缺血预处理组心肌细胞凋亡指数则明显低于缺血再灌注组,表明两者心肌保护作用有可能与抑制心肌再灌注损伤时细胞凋亡有关。缺血后处理的机制以及如何充分有效地应用于临床有待深入研究。

参考文献:

[1] Sandu N, Schaller B. Postconditioning: a new or old option after ischemic stroke?[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2010, 8(4): 479-482.

[2] 谭兴琴, 陈玉培, 张文胜, 等. 乳化异氟醚对缺氧复氧乳鼠心肌细胞的保护作用及 bcl-2、bax 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(17): 1611-1614.

[3] 谭兴琴, 陈玉培. 乳化异氟醚对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的保护作用及对 caspase-3 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(14): 1341-1344.

[4] Frassdorf J, Borowski A, Ebel D, *et al*. Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 137(6): 1436-1442.

[5] Zhao Z Q, Corvem J S, Halkos M E, *et al*. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemie preconditioning[J]. Am J Physiol, 2003, 285: 579-588.

[6] Gross G J, Gauthier K M, Moore J, *et al*. Evidence for role of epoxyeicosatrienoic acids in mediating ischemic preconditioning and postconditioning in dog[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(1): H47-H52.

[7] Mewton N, Ivanes F, Cour M, *et al*. Postconditioning: from experimental proof to clinical concept[J]. Dis Model Mech, 2010, 3(1/2): 39-44.

[8] Lazaris A M, Maheras A N, Vasdekis S N, *et al*. Protective effect of remote ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury, in a model of thoracoabdominal aorta approach[J]. J Surg Res, 2009, 154(2): 267-273.

[9] Prech M, Marszalek A, Schroder J, *et al*. Apoptosis as a mechanism for the elimination of cardiomyocytes after acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2010, 105(9): 1240-1245.

[10] Song F, Shan Y, Cappello F, *et al*. Apoptosis is not involved in the mechanism of myocardial dysfunction after resuscitation in a rat model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation[J]. Crit Care Med, 2010, 38(5): 1329-1334.

(收稿:2010-06-01 修回:2010-07-22)
(编辑 龙 亮)