异氟醚和卡托普利联合预处理对兔心肌缺血再灌注心肌酶学的影响

田 毅[1],柳培雨[2],田国刚[1] (1. 海口市人民医院麻醉科,海南 海口 570208;2. 武警海南总队医院麻醉科,海南 海口 570203)

[摘 要] **目的** 通过心肌酶学等检测指标评估异氟醚、卡托普利联合预处理对缺血再灌注的心肌保护作用。**方法** 新西兰大白兔 48 只随机分成 6 组($n=8$),假手术组(S 组)仅开胸分离冠状动脉左前降支;缺血组(I/R 组):缺血 30 min 后再灌注 120 min;缺血预处理组(IPC 组):缺血 5 min、再灌注 5 min 循环 3 次后处理同缺血组;异氟醚组(I 组):给予 1.1% 异氟醚吸入 30 min 洗脱 15 min 后处理同 I/R 组;卡托普利组(C 组)24 h 给予卡托普利片 25 mg/kg 后处理同 I/R 组;联合预处理组(I + C 组)24 h 给予卡托普利片 25 mg/kg 后处理同 I 组。各实验组分别检测不同时点的心肌酶和心肌肌钙蛋白 I(cTnI)的变化,在再灌注结束即刻取血检测丙二醛(MDA)浓度及超氧化物歧化酶(SOD)活性。**结果** 各处理组心肌酶学指标均高于 S 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但增高程度低于 I/R 组($P<0.05$),IPC 组和 I + C 组又较 I 组和 C 组低($P<0.05$)。各组 MDA 均增高,SOD 降低($P<0.01$),但与 I/R 组比,各药物处理组 MDA 降低,SOD 较高($P<0.01$)。IPC 组和 I + C 组 MDA 和 SOD 分别较 I 组和 C 组降低和升高($P<0.05$)。**结论** 异氟醚、卡托普利联合预处理明显减轻兔心肌缺血再灌注心肌酶学改变,较单独应用异氟醚、卡托普利预处理的心肌保护作用增强,其效果与缺血预处理相似。

[关键词] 异氟醚;卡托普利;缺血再灌注;心肌酶

[中图分类号] R542.2;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)05-0466-03

Effect of the combination of isoflurane and captopril preconditioning on myocardial enzymes of myocardial ischemia and reperfusion injury in rabbit

TIAN Yi, LIU Pei-yu, TIAN Guo-gang (Department of Anesthiology, Haikou Municipal Hospital, Haikou Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of combination of isoflurane and captopril preconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury in rabbit. **Methods** 48 healthy New Zealand white rabbits were equally divided into the sham-operated group (group S), the ischemia/reperfusion group (group I/R), the ischemic preconditioning group (group IPC), the isoflurane group (group I), the captopril group (group C), and the combination of isoflurane and captopril preconditioning group (group I + C). Rabbits were opened chest without ligating the left anterior descending coronary artery (LAD). Blood samples were taken from arterial line for examination of plasma CK, CK-MB, LDH, cTnI, MDA and SOD levels. **Results** The levels of CK, CK-MB, LDH and cTnI of group IPC and group I + C were significantly lower than that of group I, group C and group I/R ($P<0.05$), but they were higher than group S ($P<0.05$). Levels of MDA increased while levels of SOD decreased in all the groups ($P<0.01$). But compared with group I/R, all the group of medication have a lower level of MDA and a higher level of SOD ($P<0.01$). Group IPC and group I + C had lower levels of MDA and SOD compared with group I and higher levels of MDA and SOD compared with group C ($P<0.05$). **Conclusion** The combination of isoflurane and captopril preconditioning induces cardioprotection against ischemia reperfusion injury in rabbits, and the cardioprotection which has a similar effects with ischemic preconditioning was better than that of isoflurane or captopril preconditioning alone.

Keywords: isoflurane; captopril; ischemia reperfusion; myocardial enzymes

心肌缺血 - 再灌注损伤(MIRI)伴随心脏外科手术和心肺脑复苏等治疗的进步越来越为医疗工作者所重视。MIRI 在再灌注即刻即可发生,并且可能持续到再灌注后的数小时甚至数天,严重影响患者心脏功能的恢复。当发生 MIRI 时,心肌酶和心肌肌钙蛋白(cTnI)大量溢出,使其在血液中水平升高,故血清心肌酶学和 cTnI 水平越高,反映心肌损伤程度越重。本实验在前期研究的基础上通过在体兔心肌缺血再灌注模型,以心肌酶学、cTnI、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)为检测指标,评估异氟醚、卡托普利联合预处理对兔缺血再灌注的心肌保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康新西兰大白兔(由湖南省实验动物科技服务中心提供)48 只,体质量 1.8 ~ 2.5 kg,适应性喂养 7 d 后随机分为 6 组($n=8$):假手术组(S 组)、单纯缺血再灌注组(I/R)、缺血预

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201305002

[基金项目] 海南省 2010 年度卫生厅科研立项(琼卫 2010-76);海口市科技立项(2008-0000202)

[通讯作者] 柳培雨,副主任医师,E-mail:liupeiyu1974@163.com

[收稿日期] 2013-05-06 [修回日期] 2013-06-27

处理组(IPC 组)、异氟醚组(I 组)、卡托普利组(C 组)和异氟醚、卡托普利联合预处理组(I + C 组)。

1.2 方法

1.2.1 药物预处理与心肌缺血再灌注模型的建立 卡托普利组(C 组)和异氟醚、卡托普利联合预处理组(I + C 组)均在实验前 24 h 喂饲卡托普利片(上海旭东海普药业)25 mg/kg,其余各组自由饮食。所有实验动物术前均禁食 12 h,可自由饮水。戊巴比妥钠麻醉后将实验动物固定于实验台,气管切开后机械控制呼吸。连续监测平均动脉压。于胸骨左缘 3 ~ 4 肋间隙开胸,暴露心脏,剪开心包膜,取少量心包组织作为缝线垫片。确认 LAD,冠状动脉阻断点应在发出 LAD 之后,以 5-0 无损伤线在两端各穿一缝线垫片后绕过 LAD 近端深面并用套以约长 1 cm 的小橡皮管胶管将其套住。稳定 15 min 后,静脉注射肝素 500 U,收紧橡胶管即可阻断 LAD,以心电图出现 ST 段弓背抬高、结扎线以下心肌组织颜色变紫、局部节段性运动不良为结扎成功,将缺血区颜色转红并反应性充血、收缩活动逐渐恢复、ST 段恢复 1/2 以上认定为再灌注成功。S 组仅开胸分离冠状动脉左前降支(LAD),穿线但不阻断血流;I/R 组 LAD 阻断 30 min 后再灌注 120 min;IPC 组 LAD 阻断前给予 3 次 5 min 缺血及 5 min 再灌注循环并稳定 15 min 后重复 I/R 组操作;I 组吸入 1.1% 异氟醚(美国雅培制药有限公司)30 min 及洗脱 15 min 后重复 I/R 组操作;C 组和 I + C 组除术前 1 d 预处理外其他操作分别同 I/R 组和 I 组。

1.2.2 心肌酶、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、血清丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)水平的检测 各组分别于心肌缺血前(T0)、缺血 30 min(T1)、再灌注 60 min(T2)、再灌注 120 min(T3)抽取动脉血 2 mL。4 000 r/min 离心 10 min 后取血清置于 -20 ℃冰箱保存,解冻后用酶联免疫法测定 cTnI 的浓度。肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)在 CX-9 全自动生化分析仪上进行检测。再灌注结束即刻从颈动脉抽取动脉血 1 mL,以 4 500 r/min 分离血清,-20 ℃冰箱保存。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,硫代巴比妥酸盐法测定 MDA 浓度。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,酶学指标以及 cTnI、MDA 及 SOD 水平的比较采用重复测量数据的协方差分析,组间比较采用 SNK-q 检验。$P < 0.05$ 为有统计学差异,$P < 0.01$ 为统计学差异非常显著。

2 结果

2.2 血清 MDA 浓度、SOD 活性的检测

再灌注末 I/R 组 MDA 浓度明显高于 S 组,而 SOD 活性低于 S 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 S 组相比,IPC 组、I 组、C 组、I + C 组 MDA 明显增高,SOD 明显降低($P < 0.01$)。与 I/R 组相比,IPC 组、I 组、C 组和 I + C 组分别给予预处理后,可明显升高 SOD 活性、降低 MDA 的浓度($P < 0.01$)。其中 I + C组 SOD 活性相对高于 I 组和 C 组($P < 0.05$),MDA 浓度低于 I 组和 C 组差异有统计学意义($P < 0.05$),与 IPC 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组血清 MDA、SOD 比较($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA(nmol/mL)	SOD(μ/mL)
S 组	2.32 ± 0.52	165.9 ± 7.9
I/R 组	5.26 ± 0.47 *	99.4 ± 8.7 *
IPC 组	3.90 ± 0.37 *#	126.0 ± 9.3 *#
I 组	4.21 ± 0.36 *#	120.1 ± 7.1 *#
C 组	4.37 ± 0.41 *#	116.3 ± 6.0 *#
I + C 组	3.56 ± 0.50 *#	128.3 ± 9.1 *#

*:与 S 组比较,$P < 0.01$;#:与 I/R 组比较,$P < 0.01$

2.1 心肌酶学及心肌肌钙蛋白

T0 时各组 CK、CK-MB、LDH、cTnI 差异无统计学意义($P > 0.05$)。T0 ~ 3 除 S 组外各组上述检测指标逐渐升高,各时间点与 T0 相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。T1 ~ 3 时各组心肌酶和 cTnI 等检测指标与 S 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);同时,以上时点 IPC 组、I 组、C 组和 I + C 组与 I/R 组的各项指标之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。I 组、C 组在 T2、T3 时的各检测指标均高于 IPC 组和 I + C 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);I + C 组与 IPC 组相比($P > 0.05$)差异无统计学意义(见表 2)。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤(MIRI)严重影响缺血后心脏功能的恢复,甚至危及患者的生命。MIRI 在再灌注即刻即可发生,并且可能持续到再灌注后的数小时甚至数天。研究发现很多药物预处理能减轻 MIRI 的程度,起到心肌保护的作用。血管紧张素转换酶抑制剂卡托普利对很多心脏疾病的治疗特别是拟行心脏手术患者的治疗都取得了良好的效果[1-3]。同样研究发现异氟醚预处理早期相和延迟相均对心肌缺血再灌注损伤具有不同程度的保护作用[4-5]。本课题的前期研究提示异氟醚、卡托普利联合预处理能够明显减轻心肌超微结构的改变[6],因此本研究通过检测心肌酶学(CK、CK-MB、LDH)、cTnI 以及抗氧化效应等指标,来进一步评估异氟醚和卡托普利联合预处理对心肌缺血 - 再灌注损伤的保护作用。

cTnI 具有高度的心肌特异性,在心肌损伤程度检测中具有重要的意义,被认为是反映心肌损伤的“金标准”。心脏在缺血 - 再灌注所致心肌细胞损伤过程中,因细胞膜通透性增高,心肌细胞浆膜中 CK、CK-MB、LDH 等心肌酶大量溢出,导致血液中上述浓度相应升高,并且浓度越高表明心肌损伤程度越重[7-8]。本研究中从 T0 到 T4,除 S 组外各组上述检测指标逐渐升高,各时间点与 T0,与 S 组相比差异具有统计学意义,提示结扎左冠脉引起心肌缺血,造成心肌损伤,开

表 2 各组心肌酶学指标的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

指标	组别	T0	T1	T2	T3
CK(U/L)	S 组	355 ± 51	362 ± 36	387 ± 54	379 ± 48
	I/R 组	403 ± 46	1 166 ± 167**	1 583 ± 131**	1 857 ± 62**
	IPC 组	419 ± 56	602 ± 58*#	1 024 ± 111**#	1 284 ± 150**#
	I 组	376 ± 45	616 ± 61*#	1 231 ± 159**#Δ	1 462 ± 167**#Δ
	C 组	417 ± 27	574 ± 72*#	1 275 ± 155**#Δ	1 487 ± 102**Δ
	I + C 组	386 ± 53	566 ± 63*#	1 092 ± 81**#	1 307 ± 103**#
CK-MB (U/L)	S 组	438 ± 56	417 ± 43	427 ± 47	435 ± 51
	I/R 组	415 ± 37	871 ± 64**	969 ± 70**	1 785 ± 142**
	IPC 组	452 ± 38	576 ± 42*#	699 ± 75**#	1 141 ± 122**#
	I 组	421 ± 52	600 ± 35*#	855 ± 63**#Δ	1 309 ± 115**#Δ
	C 组	473 ± 30	621 ± 65*#	909 ± 77**#Δ	1 343 ± 125**#Δ
	I + C 组	424 ± 41	567 ± 67*#	734 ± 73**#	1 206 ± 73**#
LDH(U/L)	S 组	74.0 ± 4.4	72.1 ± 4.8	73.8 ± 4.6	73.5 ± 4.8
	I/R 组	70.5 ± 5.5	87.3 ± 4.5*	167.3 ± 8.4**	208.5 ± 8.3**
	IPC 组	68.8 ± 3.6	83.3 ± 4.9*#	122.5 ± 5.2**#	129.6 ± 6.3**#
	I 组	75.6 ± 3.4	82.6 ± 4.0*#	138.3 ± 5.8**#Δ	159.2 ± 8.3**#Δ
	C 组	70.9 ± 4.5	80.2 ± 5.8*#	141.7 ± 7.4**#Δ	167.2 ± 8.7**#Δ
	I + C 组	71.1 ± 2.9	82.3 ± 7.1*#	127.6 ± 6.7**#	136.3 ± 8.8**#
cTnI(ng/mL)	S 组	3.88 ± 1.04	3.97 ± 1.03	4.00 ± 1.03	4.01 ± 1.03
	I/R 组	4.22 ± 1.02	15.28 ± 4.40**	24.98 ± 6.31**	35.10 ± 7.97**
	IPC 组	4.37 ± 1.56	14.96 ± 3.32**	17.01 ± 2.75**#	21.73 ± 4.43**#
	I 组	4.04 ± 1.05	15.69 ± 2.31**	20.84 ± 3.46**#Δ	25.63 ± 4.15**#Δ
	C 组	4.46 ± 1.07	15.75 ± 2.52**	21.23 ± 4.01**#Δ	26.58 ± 4.67**#Δ
	I + C 组	4.09 ± 1.01	15.63 ± 2.69*	17.80 ± 2.31**#	22.14 ± 5.53**#

*:与 T0 比较,$P < 0.05$,**:与 T0 比较,$P < 0.01$;#:与 I/R 组比较,$P < 0.05$,Δ:与 IPC 组比较,$P < 0.01$

放后再灌注使心肌损伤加重;另外 IPC 组、I 组、C 组、I + C 组与 IR 差异有统计学意义,说明缺血预处理和药物预处理均能减轻心肌缺血再灌注对心肌细胞的损伤。

缺血再灌注后产生大量氧自由基(OFR)。OFR 及其与生物膜磷脂作用产生的 MDA 等脂质过氧化产物增多是心肌缺血再灌注损伤的主要机制之一。SOD 作为体内重要的抗氧化酶,通过氧自由基清除作用保护细胞,可特异性反映机体抗的氧化能力[9-10]。因此可以通过检测 MDA 和 SOD 的变化反应药物预处理的心肌保护作用。本研究发现再灌注末 I/R 组 MDA 浓度明显高于 S 组,而 SOD 活性低于 S 组,说明了 I/R 后氧化损伤的存在;同时结果也显示 IPC 组、I 组、C 组和 I + C 组均能增强 I/R 后 SOD 的活性,降低 MDA 的含量,并且 I + C 组预处理抗氧化作用更佳。这也提示异氟醚、卡托普利通过减轻自由基损伤的机制发挥抗缺血再灌注损伤的作用,从 SOD 和 MDA 两个指标来看可能异氟醚,卡托普利联合预处理在抗氧化损伤方面产生了协同作用,因此其保护作用相对更好。

综上,异氟醚、卡托普利、异氟醚和卡托普利联合预处理可降低心肌缺血再灌注后血清心肌酶活性,产生抗氧化效应。异氟醚和卡托普利两种药物联合预处理对心肌缺血再灌注损伤较单独应用异氟醚或卡托普利预处理的保护作用增强,其效果与缺血预处理相似。推测两种药物可能产生了协同心肌保护作用。

[参考文献]

[1] 张 红,张 蓓,汤伯瑜,等. 一氧化氮和线粒体 ATP 敏感性钾通道介导血管紧张素转换酶抑制剂加强阈下预处理的作用[J]. 生理学报,2005,57(4):453 - 460.

[2] Luca MC, Liuni A, DiFabio J, et al. The acute administration of either amiloride or captopril does not prevent endothelial dysfunction induced

(下转第 471 页)

目前关于附睾酸性微环境的研究大多在细胞离体水平进行,在体动物的研究很少,针对附睾管腔酸性微环境的动物模型也未见有明确报道。为此本研究采用输精管切除术对能否成功建立附睾管腔酸性微环境动物模型进行了探索,结果表明输精管切除 8 周后可在整个附睾宫腔检测到 pH 升高,表明实验动物附睾管腔酸性微环境被破坏、该方法可以成功制作附睾管腔酸性微环境破坏的动物模型。在实验过程中我们也注意到术后需要较长时间才可以检测到 pH 的升高,其原因可能是术后短期附睾管腔的酸性改变是一个缓慢的过程,而在 8 周之后附睾管腔液的微环境才会因失代偿而紊乱的。因此术后所有大鼠在同种条件下需要正常饲养 8 周。在输精管切除术后附睾酸性微环境破坏大鼠模型过程中,需要注意以下问题:①首先是动物的麻醉不要过深,注意选择复苏时间较短的麻醉剂;术后注意保暖。②在打开腹部操作过程中要注意无菌操作,探查输精管时操作要轻柔,总的操作时间宜在 30 min 之间,以便尽可能将每个模型的破坏轻重程度控制在同一水平;③与输精管伴行的血管一定要分离开,否则会引起较大的出血。

本组实验结果表明模型组大鼠附睾管腔 pH 值明显增高。正常大鼠附睾起始段近端 pH 值为(7.20 ± 0.06)、远端为(6.79 ±0.03)、头部 pH 值最低达(6.64 ±0.03),尾部的 pH 值(6.85 ± 0.03),相对于头部呈梯度增加的趋势[11]。而输精管切除术后 8 周,大鼠附睾各节段的 pH 均有所升高。本文通过多样本的模型与对照来建立附睾酸性微环境破坏大鼠模型,相比其他方法如精索静脉曲张等更简单、经济快速,可重复性强,不需要特别控制实验条件,适合于推广与普及。

[参考文献]

[1] Skakkebaek NE, Jørgensen N, Main KM, et al. Is human fecundity declining? [J]. Int J Androl, 2006, 29(1): 2 – 11.

[2] Aitken RJ. Sperm function tests and fertility[J]. Int J Androl, 2006, 29(1): 69 – 75, 105 – 108.

[3] Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, et al. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility[J]. Hum Reprod, 2002, 17(11): 2904 – 2911.

[4] Cornwall G A. New insights into epididymal biology and function[J]. Hum Reprod Update, 2009, 15(2): 213 – 227.

[5] Zuo WL, Li S, Huang JH, et al. Sodium coupled bicarbonate influx regulates intracellular and apical pH in cultured rat caput epididymal epithelium[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22283.

[6] Acott TS, Carr DW. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor[J]. Biol Reprod, 1984, 30(4): 926 – 935.

[7] Carr DW, Usselman MC, Acott TS. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison[J]. Biol Reprod, 1985, 33(3): 588 – 595.

[8] Pastor-Soler N, Piétrement C, Breton S. Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction[J]. Physiology (Bethesda), 2005, 20: 417 – 428.

[9] Joseph A, Hess RA, Schaeffer DJ, et al. Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function[J]. Biol Reprod, 2010, 82(5): 948 – 957.

[10] Yeung CH, Breton S, Setiawan I, et al. Increased luminal pH in the epididymis of infertile c-ros knockout mice and the expression of sodium - hydrogen exchangers and vacuolar proton pump H+ -ATPase[J]. Mol Reprod Dev 2004, 68(2): 159 – 168.

[11] 冯 潇, 肖 岚, 李 臻. 附睾管腔酸性微环境的调节机制[J]. 生殖与避孕, 2013, 33(1): 36 – 41.

(编辑:左艳芳)

(上接第 468 页)

by ischemia and reperfusion in the human forearm vasculature[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(10): 996 – 1001.

[3] Penna C, Tullio F, Moro F, et al. Effects of a protocol of ischemic postconditioning and/or captopril in hearts of normotensive and hypertensive rats[J]. Basic Res Cardiol, 2010, 105(2): 181 – 192.

[4] Chiari PC, Pagel PS, Tanaka K, et al. Intravenous emulsified halogenated anesthetics produce acute and delayed preconditioning against myocardial infarction in rabbits[J]. Anesthesiology, 2004, 101(5): 1160 – 1166.

[5] Liu L, Ran K, Chang Y, et al. Effect of isoflurane delayed preconditioning on the expression of Bcl-2 and caspase-3 in myocardium during ischemia reperfusion in rabbits[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010, 35(4): 346 – 350.

[6] 田 毅, 柳培雨, 田国刚, 等. 异氟醚和卡托普利联合预处理对兔心肌缺血 – 再灌注细胞超微结构的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(6): 602 – 604.

[7] Karlsson LO, Zhou AX, Larsson E, et al. Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2010, 15(2): 182 – 189.

[8] Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, et al. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160 (2): 220 – 232.

[9] Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, et al. Isoflurane attenuates myoglobin release during ischemic and/or reperfusion periods[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2008, 52(5): 650 – 657.

[10] Lucchinetti E, Jamnicki M, Fischer G, et al. Preconditioning by isoflurane retains its protection against ischemia-reperfusion injury in postinfarct remodeled rat hearts[J]. Anesth Analg, 2008, 106(1): 17 – 23.

(编辑:左艳芳)