基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0016-03

体外循环下低 pH 液复灌对兔心肌缺血再灌注损伤的影响

杨海燕,刘新伟,王群英,马亚飞,刘 柳
(重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨体外循环(Cardiopulmonary bypass,CPB)下再灌注初短暂低 pH 液复灌对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用并确定灌注液的最佳 pH 值。方法:选择健康成年新西兰大白兔 30 只,雌雄不拘,体重 2.5~3.0 kg,随机分为 5 组(n=6),对照组不阻断主动脉,单纯转机 180 min;其余各组心脏停搏缺血 40 min,再灌注 120 min,再灌注前 2 min 分别给予 pH 值为 7.4、7.1、6.9、6.7 的 Krebs-Henseleit 液(K-H 液)持续灌注至主动脉开放。实验结束后,比色法测定心肌组织中乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)活力及 ELISA 测定肌钙蛋白 I(Cardiac troponin I ,cTnI)浓度;光镜观察心肌组织形态学改变;透射电镜下观察心肌组织超微结构。结果:与对照组比较,各组 LDH 、cTnI 均增加(P<0.05),与 pH7.4 组比较,低 pH 液复灌各组 LDH、cTnI 均降低(P<0.05),其中 pH6.9 组 LDH、cTnI 最低;病理学检查示 pH7.4 组损伤最严重,低 pH 液复灌各组中 pH6.9 组损伤最轻。结论:体外循环下再灌注初短暂低 pH 液复灌产生心肌保护作用,且 pH6.9 的 K-H 液灌注产生的效果最好。

【关键词】心肺转流术;氢离子浓度;再灌注损伤
【中国图书分类法分类号】R614;R654.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-06

Effect of acidic reperfusion on myocardial ischemia/reperfusion injury by cardiopulmonary bypass in rabbits

YANG Hai-yan, et al
(*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the effect of acidic reperfusion on myocardial ischemia/reperfusion injury by cardiopulmonary bypass (CPB) and choose the optimum pH of perfusion fluid. *Methods*: thirty adult New Zealand white rabbits of both sexes weighing 2.5~3.0 kg were randomly divided into 5 groups (n=6 each). In control group, CPB was executed for 180 min without aortic clamping. In the other groups, hearts were subjected to ischemia for 40 min followed by 120 min of reperfusion, and were respectively perfused with Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution at pH 7.4, 7.1, 6.9 and 6.7 in the first 2 min of referfusion. After 2 h reperfusion, the lactate dehydrogenase (LDH) activity was tested with colorimetric method, cardiac troponin I (cTnI) concentration was determined with ELISA and myocardial tissues were observed by light microscopy and transmission electron microscope. *Results*: In the other groups, the LDH activity and cTnI concentration were significantly increased as compared with in the control group (P<0.05). Compared with pH 7.4 group, the LDH activity and cTnI concentration were significantly lower in acidic reperfusion groups (P<0.05), and were lowest in pH 6.9 group. The pH 7.4 group showed the most serious injury while the pH 6.9 group showed the least damage in the acidic reperfusion groups by pathological examination. *Conclusion*: Acidic reperfusion can attenuate the myocardial ischemia/reperfusion injury by CPB in rabbits and the reperfusion of Krebs-Henseleit bicarbonate buffer solution of pH 6.9 provides best protective effect.

【Key words】cardiopulmonary bypass; pH; reperfusion injury

体外循环心脏手术中,心脏在停跳、复跳后,发生的缺血再灌注损伤一直受到高度的重视。2003 年 Zhao 等[1]提出的缺血后处理,其防治心肌缺血再灌注损伤的有效性及作用机制已进行了大量的研究,有学者研究发现,缺血后处理是通过造成缺血再灌注初期的一种延迟的暂时性的酸性环境,从而保护缺血心肌,减轻再灌注损伤[2-4]。那么缺血心肌再灌初予以低 pH 液复灌是否可以达到后处理相似的心肌保护效应?国内外的研究和我们[5]的离体心脏灌注实验均证实了低 pH 液复灌的减轻心肌缺血再灌注损伤的作用,但离体实验缺乏在体心脏的冠脉血管侧支循环,体外循环下低 pH 液复灌是否具有心肌保护作用还需要进一步研究。本研究拟探讨体外循环下再灌注初短暂低 pH 液复灌的心肌保护作用及确定产生最佳保护作用的 pH 值,为在体低 pH 液复灌减轻心肌缺血再灌注损伤提供实验依据。

作者介绍:杨海燕(1983-),女,硕士,
研究方向:心肌保护方向。
通信作者:刘新伟,男,副教授,Email:xxwwliu@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局自然科学基金资助项目(编号:2009-2-344)。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组

健康成年新西兰大白兔（重庆医科大学动物中心提供）30 只，雌雄不拘，体重 2.5~3.0 kg，随机分为 5 组（n=6）：对照组（C 组）、pH7.4 组、pH7.1 组、pH6.9 组、pH6.7 组。C 组仅做体外循环插管，不阻断主动脉，共转流 180 min，其余各组分别于再灌注前给予 37℃的 pH 值为 7.4、7.1、6.9、6.7 的 K-H 液（mmol/L：118.5 NaCl、4.75 KCl、1.2 $MgSO_4$、1.2 KH_2PO_4、2.5 $CaCl_2$、25.0 $NaHCO_3$、11.1 Glucose）以 4.5 ml/kg 经主动脉根部持续灌注 2 min，K-H 液灌注前用 95%O_2 和 5%CO_2 混合气体饱和 30 min，用瑞士 DELTA320 型 pH 计以 HCl 和 NaOH 调节 pH 值。

1.2 体外循环（Cardiopulmonary bypass，CPB）模型的建立

实验动物术前 6 h 禁食水，左耳缘静脉置 24 G 套管针并注射 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉，实验过程中根据情况适当追加。气管切开插管，连接 ALC-V8D 型小动物呼吸机（上海奥尔科特生物科技有限公司）辅助呼吸，吸入纯氧，调节呼吸频率为 45~50 次/min、吸呼比为 1:2、潮气量为 22~25 ml。四肢连接心电图导联进行心电监测，用肛温计进行体温监测，耳缘静脉套管针接微量输液泵，输林格液维持静脉通道。经右股动脉置 20 G 静脉套管针，经压力换能器接 RM6240B 型多道生理信号采集处理系统（成都仪器厂）监测动脉血压。分别游离右侧颈总动、静脉、左侧颈总动脉，并双重过线。680 U/kg 肝素化后，将 18 G 套管针经左颈总动脉逆行插入作为动脉灌注管，经右颈总动脉插入停跳液灌注针至主动脉根部，经右颈总静脉将内径 4 mm 的静脉引流管插入右心房后妥善固定。随后，转流开始。实验采用的 CPB 机为 BT-300E 型蠕动泵（重庆杰恒蠕动泵有限公司），转流量为 70~100 ml/(kg·min)；人工肺采用 D901 婴儿膜肺（Dideco 公司，意大利）。转流过程中，维持平均动脉压在 55~60 mmHg（1 mmHg=0.133 kPa）以上，根据预充液平面适当补充血安定 5 ~10 ml。实验过程中血压下降时，可给予多巴胺 5~10 μg/(kg·min) 泵入。开胸暴露心脏，并行循环 15 min，肛温降至 28~30℃时，阻断主动脉，从阻断线近端以 15~20 ml/kg 灌注 4℃St.Thomas Ⅱ型心脏停搏液（mmol/L：110.0 NaCl、1.2 $CaCl_2$、10.0 $NaHCO_3$、16.0 KCl、16.0 $MgCl_2$），心脏表面常规给予冰泥覆盖，同时停止机械通气。心脏共停跳 40 min，复跳 10 min 前复温，至 34℃后松开套过主动脉根部的线，使心脏复跳，同时开始机械通气。主动脉开放 120 min 处死实验动物。

1.3 标本采集与指标测定

实验结束后，取 3 份左室心肌组织，一份制备 10%的心肌组织匀浆，3 000 r/min 离心 20 min，仔细收集上清，BCA 法蛋白定量试剂盒（北京百泰克生物技术有限公司）测定蛋白浓度，然后按照 LDH 试剂盒（南京建成生物工程研究所）说明书用 722 分光光度计（上海菁华科技仪器有限公司）测定 LDH 活性及根据兔肌钙蛋白 I（Cardiac troponin I，cTnI）ELISA 试剂盒（RD 公司进口分装）说明书用 SpectraMaxM2 型多功能酶标仪（MD 公司，美国）测定 cTnI 浓度；1 份于 4%多聚甲醛固定 24 h，常规石蜡包埋，切片，HE 染色后，行光镜检查；1 份切成 1mm×1mm×1mm 的小块，于 2.5%的戊二醛中固定，丙酮梯度脱水，Epon812 包埋，LKB-V 型超薄切片机切片，铅铀双重染色，日立 H7500 型透射电镜下观察心肌组织超微结构。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间比较采用多组间单因素方差分析（One-way ANOAY），两两比较采用 SNK-q 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌组织 LDH 活力、cTnI 浓度的比较

与 C 组比较，各组 LDH 活力均增加（$P<0.05$），与 pH7.4 组比较，低 pH 液复灌各组 LDH 活力均降低（$P<0.05$），其中 pH6.9 组 LDH 活力最低，见表 1。

与 C 组比较，各组 cTnI 浓度均增加（$P<0.05$），与 pH7.4 组比较，低 pH 液复灌各组 cTnI 浓度均降低（$P<0.05$），其中 pH6.9 组 cTnI 浓度最低，见表 1。

表 1 各组兔心肌组织 LDH 活力、cTnI 浓度的比较（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	LDH(U/gprot)	cTnI(ng/L)
C 组	5 485 ± 289	155 ± 9
pH7.4 组	7 789 ± 349*	214 ± 12*
pH7.1 组	7 122 ± 392*△	196 ± 12*△
pH6.9 组	6 468 ± 317*△	177 ± 10*△
pH6.7 组	6 979 ± 378*△	194 ± 10*△

与 C 组比较，*$P<0.05$；与 pH 7.4 组比较，△$P<0.05$

2.2 光镜检查

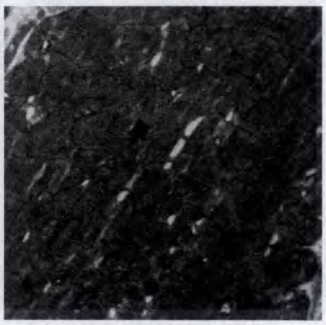
对照组心肌细胞着色均匀，细胞界限清楚，包膜完整，无变性坏死；pH7.4 组心肌细胞广泛空泡变性、溶解坏死，细胞边缘不清，胞浆染色淡，心肌间质水肿明显；pH7.1 组及 pH 6.7 组心肌细胞部分空泡变性、坏死，胞浆染色较浅，间质水肿较轻；pH6.9 组心肌细胞质着色较均匀，包膜比较完整，变性坏死范围较小，未见明显间质水肿。

2.3 电镜检查

C 组心肌细胞结构基本正常；pH7.4 组心肌细胞损伤最为严重；pH7.1、6.9、6.7 组心肌细胞损伤程度较 pH7.4 组有所减轻，pH6.9 组心肌细胞损伤最轻，见图 1~5。

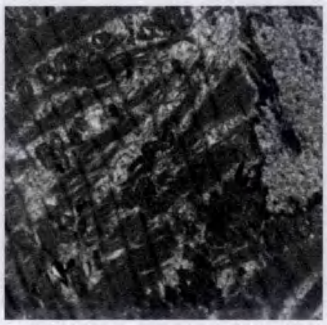
3 讨 论

心肌在缺血再灌注过程中，存在的 pH 反常[6]现象引起细胞的一系列损伤。Cohen 等[7]在新西兰大白兔离体心脏实验中发现再灌注初持续 2 min 的酸性灌注与缺血后处理产生的心肌保护效应和作用机制相似，而再灌注初 1 min 的酸性灌



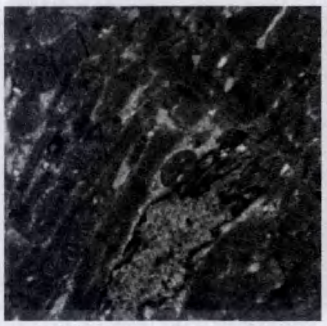
肌原纤维排列整齐，线粒体基本无肿胀，结构完整

图 1　C 组（铅铀双重染色，×6 000）



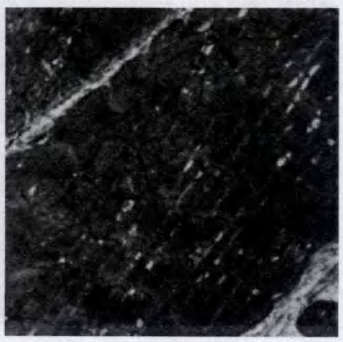
肌原纤维大面积溶解、断裂，线粒体肿胀，呈空泡样改变

图 2　pH7.4 组（铅铀双重染色，×6 000）



肌原纤维排列紊乱，肌丝溶解较明显，局部线粒体呈空泡样改变

图 3　pH7.1 组（铅铀双重染色，×6 000）



肌原纤维排列尚整齐，有局部肌丝溶解，线粒体略有肿胀

图 4　pH6.9 组（铅铀双重染色，×6 000）



肌原纤维溶解较明显，局部线粒体呈空泡样改变

图 5　pH6.7 组（铅铀双重染色，×6 000）

注和延迟 1 min 后再行 2 min 酸性灌注则无保护作用。Inserte 等[7]对离体大鼠心脏行缺血 40 min 再灌 60 min 而再灌注初 3 min 分别灌注 pH 值为 7.4、7.0、6.7、6.4 的灌流液，发现 pH 为 6.4 的灌流组效果最好，可以促进心功能的恢复，减少心率失常的发生率和细胞死亡；其运用 31P- 核磁共振监测心肌细胞内 pH 值的动态变化，直观的反映了通过再灌注初短暂延迟细胞内的酸性环境可以达到心肌保护作用[4]。近有研究直接在猪冠脉内持续灌注 pH6.4 的 K-H 液，能够减少心肌梗死面积，产生心肌保护作用，但同时心律失常的发生率比较高[8]。分析原因可能由于 pH6.4 是在离体心脏水平的最佳 pH 值，而在体心肌有冠脉血管侧支循环，缺血再灌注初心肌细胞内的 pH 值比离体心脏水平的 pH 值要高，因此，本研究在 CPB 实验动物模型上探讨心肌缺血再灌注初灌注不同 pH 值的 K-H 液产生的心肌保护作用及其最佳 pH 值，更接近于临床运用。本实验的低 pH 液灌注方式借鉴离体灌流心脏的灌注方式，以不同 pH 值的 K-H 缓冲液灌注，灌流量参考文献[8]根据不同种属实验动物体表面积等效剂量比做适当调整。本实验设立对照组，排除了实验操作、CPB 转机的影响。

实验结果显示，实验各组 LDH 活力、cTnI 浓度较对照组均增加，心肌组织产生了病理学改变，表明心肌缺血再灌注导致心肌损伤。与 pH7.4 组比较，低 pH 液复灌各组 LDH 活力降低、肌钙蛋白 I 浓度降低，心肌组织病理学损伤减轻，说明体外循环下再灌注初给予 2 min 的低 pH 液复灌能减轻心肌损伤，产生心肌保护作用，这与细胞和离体心脏水平上酸处理的心肌保护作用一致。而 pH6.9 组的 LDH 活力（6 468 ± 317）U/gprot、cTnI 浓度（177 ± 10）ng/L 最低，心肌组织病理损伤程度最轻，提示再灌注初给予 pH6.9 的 K-H 液灌注产生的心肌保护作用最好。

低 pH 液复灌减轻心肌缺血再灌注损伤的机制尚未完全弄清，目前已知与减轻钙超载；作用于腺苷，引起冠脉血管内皮细胞释放一氧化氮（NO）[9]；适当浓度的活性氧的存在及作用于蛋白激酶 C 与激活线粒体 ATP 敏感性钾通道[2]；活化 PI3K-Akt 通路[5]；抑制线粒体通透性转运孔的形成等有关。

综上所述，体外循环下再灌注初短暂低 pH 液复灌产生心肌保护作用，并且 pH6.9 的 K-H 液灌注产生的效果最好，这为进一步探讨在体低 pH 液复灌的心肌保护作用机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Zhao Z Q, Corvera J S, Halkos M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(2): 579-588.

[2] Cohen M V, Yang X M, Downey J M. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis[J]. Circulation, 2007, 115(14): 1895-1903.

[3] Fujita M, Asanuma H, Hirata A, et al. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(4): 2004-

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0019-04

雷米普利通过干预瞬时感受器阳离子通道 C3 的表达对心肌纤维化的影响

余冬梅,陈 明
(重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究雷米普利(Ramipril,RAM)对自发性高血压大鼠(Spontaneously hypertensive rats,SHR)心肌纤维化时心脏瞬时感受器阳离子通道 C3 亚族表达的影响。方法:12 周龄 SHR 大鼠随机分为安慰剂组、RAM 组,同龄 Wistar Kyoto rats(WKY)为正常对照组,RAM 给药 4 周后测左室质量指数、心肌胶原容积分数和心脏组织中瞬时感受器阳离子通道 C 3(Canonical transient potential receptor channel 3, TRPC 3)的 mRNA 的表达和蛋白的表达。结果:安慰剂组左室质量指数,Ⅰ、Ⅲ型胶原容积分数显著高于 WKY 组;RAM 组上述指标较安慰剂组明显降低。3 组心脏均有 TRPC3 的表达,但安慰剂组 TRPC3 mRNA 及蛋白表达显著高于 WKY 组,RAM 组 TRPC3 表达则明显少于 SHR 组($P<0.05$)。结论:SHR 及 WKY 大鼠存在 TRPC3 蛋白的表达,心脏 TRPC3 蛋白可能参与了心肌纤维化发生发展的过程,RAM 可能通过下调心脏 TRPC3 mRNA 及蛋白的表达发挥抗心肌纤维化的作用。

【关键词】雷米普利;心肌纤维化;瞬时感受器阳离子通道 C3;钙离子
【中国图书分类法分类号】R542.2+3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-08-29

The effect of ramipril on the cardiac fibrosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats through intervening the expression of TRPC3

YU Dong-mei, et al
(*Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of ramipril on the expression of TRPC3 in the overload induced cardiac fibrosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Methods*: 12-week-old SHRs were divided into two groups: the placebo group (SHRs) and the Ramipril group (Ram-SHR), the same aged Wistar Kyoto rats (WKYs) were used as control group (WKY). Four weeks after drug intervention, the left ventricle mass index (LVMI), the cardiac collagen volume fraction (CVF) and the expression of TRPC3 mRNA and protein were detected. *Results*: The expression of TRPC3 mRNA and protein were detected in each group. Compared with the WKYs, the LVMI, CVF) and the expression of TRPC3 mRNA and protein were significantly increased in SHRs. These data mentioned above were decreased obviously in Ramipril group. *Conclusion*: Expression of TRPC3 mRNA and protein TRPC3 were found in both SHRs and WKYs. TRPC3 could have play an important role in the development of cardiac fibrosis. Rmipril could inhibit the cardiac fibrosis through down-regulating the expression of TRPC3 mRNA and protein.

作者介绍:余冬梅(1984-),女,硕士,
研究方向:高血压的发病机制、治疗及研究进展。
通信作者:陈 明,男,教授,Email:chenmingcq@126.com。

【Key words】ramipril; cardiac fibrosis; canonical transient potential receptor channel 3; calciumion

2008.

[4] Inserte J, Barba I, Hernando V, et al. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(1): 116-122.

[5] 乔 欣,刘新伟.酸处理对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的影响及心肌 PI3K 信号通路在其中的作用[J].中华麻醉学杂志,2009,29(3):272-275.

[6] Lemasters J J, Bond J M, Chacon E, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes[J]. EXS, 1996, 76: 99-114.

[7] Inserte J, Barba I, Hernando V, et al. Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage[J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(4): 782-790.

[8] Rodríguez-Sinovas A, Cabestrero A, García del Blanco B, et al. Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs[J]. Basic Res Cardiol, 2009, 104(6): 761-771.

[9] Heintz A, Koch T, Deussen A. Intact nitric oxide production is obligatory for the sustained flow response during hypercapnic acidosis in guinea pig heart[J]. Cardiovasc Res, 2005, 66(1): 55-63.

(责任编辑:张学颖)