临床研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0081-04

酸处理对老龄大鼠心肌缺血再灌注后血流动力学的影响

乔 欣,刘新伟

(重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察短暂延迟性酸处理对老龄大鼠心肌缺血再灌注后血流动力学的影响。方法:60 只 SD 老龄大鼠(≥18 个月),随机分为 6 组(n=10):(1)空白对照(C 组)组;(2)缺血再灌注(I/R)组;(3)缺血后处理(IPO)组;(4)酸处理(H^+)组;(5)缺血后处理 + 碱处理(IPO+OH^-)组;(6)碱处理(OH^-)对照组。采用 Langendorff 离体心脏灌流方法,以心率(HR)、左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大上升速率(+dp/dtmax)和左室内压最大下降速率(-dp/dtmax)5 项血流动力学参数为指标,观察短暂延迟性酸处理对老龄大鼠心肌缺血再灌注后收缩和舒张能力的影响。结果:与 C 组比较,再灌注期间 I/R 组、IPO 组、H^+ 组、IPO+OH^- 组和 OH^- 组的 LVEDP 升高,HR、LVSP、± dp/dtmax 降低(P<0.05);与 I/R 组比较,IPO 组和 H^+ 组 LVEDP 降低,HR、LVSP、± dp/dtmax 升高(P<0.05)。结论:短暂延迟性酸处理能模拟缺血后处理对离体心脏血流动力学的保护作用,且这种保护作用对老龄大鼠同样有效。

【关键词】酸中毒;缺血后处理;血流动力学;心肌再灌注损伤

【中国图书分类法分类号】R654.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-16

Effects of acidosis on cardiac hemodynamics in aged rat heart after reperfusion injury

QIAO Xin, et al

(*Department of Anaesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of prolonged transient acidosis on cardiac hemodynamics in aged rat heart after reperfusion injury. *Methods*: 60 isolated SD rats hearts(≥18 months) perfused by Langendorff were randomly divided into 6 groups (n=10):(1)normal control(C)group;(2) reperfusion injury(I/R) group;(3)ischemic postconditioning(IPO) group;(4)acidosis(H^+) group;(5)postconditioning+alkalotic(IPO+OH^-) group;(6)alkalotic(OH^-) group. The direct effects of prolonged transient acidosis on myocardiac contractility were observed by a langendorff apparatus through the hemodynamics parameters including heart rate(HR), left ventricular systolic pressure(LVSP), left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP), and ± dp/dtmax. Results:The LVEDP were increased and HR, LVSP, ± dp/dtmax were decreased in I/R group, IPO group, H+ group, IPO+OH- group and OH^- group compared with those in C group (P<0.05). The LVEDP were decreased and HR, LVSP, ± dp/dtmax were increased in IPO group and H^+ group compared with those in I/R group(P<0.05). *Conclusion*: By comparsion with hemodynamics parameters, prolonged transient acidosis can protect isolated rat heart as well as postconditioning, and it has the same role on aged rat.

【Key words】 Acidosis; Ischemic postconditioning; Hemodynamics; Myocardial repefusion injury

2003 年 Zhao 等[1]首次正式提出了“缺血后处理(Ischemic postconditioning, IPO)”的概念,即持续缺血一段时间后在再灌注初对缺血心肌进行反复、短暂的预再灌/缺血干预,以减轻再灌注损伤的方法。由于缺血后处理的实施需要缺血心肌在复灌初进行反复阻断循环,将之直接用于心脏外科手术或介入治疗人们还保持谨慎的态度。近年来有学者发现缺血后处理在缺血心肌再灌注初呈现一种延迟性的暂时性酸中毒状态,于是提出缺血后处理是通过造成酸中毒的滞后而发挥保护作用的假说[2,3]。本文探讨短暂延迟性酸处理对老龄大鼠离体心脏血流动力学的影响,为减轻缺血心肌再灌注损伤提供实验依据。

作者介绍:乔 欣(1979-),女,硕士,研究方向:心肌保护方向。

通讯作者:刘新伟,男,副教授,E-mail:xxwwliu@yahoo.com.cn。

1　材料与方法

1.1　实验动物及动物模型制备

清洁级 SD 老龄大鼠 60 只（≥18 个月），由重庆医科大学实验动物中心提供，雌雄不分，体重 450～550 g，随机分为 6 组（每组 n=10）：（1）空白对照（C 组）组；（2）缺血再灌注（I/R）组；（3）缺血后处理（IPO）组；（4）酸处理（H^+）组；（5）缺血后处理＋碱处理（IPO+OH^-）组；6）碱处理（OH^-）对照组。大鼠腹腔注射肝素液（1 000 U/kg）20 min 后，腹腔注射乌拉坦 0.7 g/kg，麻醉后迅速打开胸腔，剪断腔静脉、主动脉及心脏周围组织，将心脏连同一段主动脉取出，置于预先充氧的 4℃左右 Krbs-Hensenleit 液（K-H 液，mmol/L:115.0 NaCl、5.0 KCl、1.2 $MgSO_4$、1.2 KH_2PO_4、1.25 $CaCl_2$、25.0 $NaHCO_3$、11.0 Glucose，pH 值 7.35～7.45）中，剪去心脏周围组织，采用 Langendorff 逆行灌注法，用 95%O_2 和 5%CO_2 饱合的温 K-H 液 37℃逆行灌注。灌注压力 90 cmH_2O，稳定 5 min 后，切开左心耳，在左心室内放置带水囊的导管连接于多导生理记录仪上，用压力换能器对心脏舒缩功能，心率进行记录。纳入标准：（1）冠脉流出率＞15 ml/100 g·min；（2）心率＞170 beats/min；（3）心脏功能稳定 5 min，无严重心律失常者。

1.2　分组及其实验方法

（1）空白对照（C）组：心脏于 Langendorff 灌注架上 K-H 液灌注 180 min；（2）缺血再灌注（I/R）组：用中性 K-H 液（用 95%O_2 和 5%CO_2 灌充，测 pH 值稳定在 7.4[3]）灌注，心脏搏动稳定后，结扎冠状动脉左前降支，主动脉逆灌 4℃St.Thomas 停跳液（mmol/L:110.0 NaCl、1.2 $CaCl_2$、10.0 $NaHCO_3$、16.0 KCl、16.0 $MgCl_2$。停跳率 100%，复跳率 88%），关闭灌注系统，心肌缺血 30 min。开放冠状动脉左前降支，重新开启灌注系统，37℃ K-H 液灌注 120 min；（3）缺血后处理（IPO）组：在复灌初进行缺血后处理（即灌注 15 S，停灌 15 S，重复 3 次）；（4）酸处理（H^+）组：在复灌初期用酸性 K-H 液（用 80%O_2 和 20%CO_2 灌充，测 pH 值稳定在 6.8[3]）灌注 5 min[4]；（5）缺血后处理＋碱处理（IPO+OH^-）组：在复灌初用碱性 K-H 液（用 100%O_2 灌充，测 pH 值稳定在 7.8[3]）进行缺血后处理；（6）碱处理（OH^-）对照组：在复灌初用碱性 K-H 液灌注 5 min。其余步骤同 I/R 组，复灌初期各组经不同处理后皆用 95%O_2 和 5%CO_2 灌充的中性 K-H 液灌注 120 min。

1.3　观察指标

通过 BL-410 生物机能实验系统监测复灌过程中的心率（Heart rate，HR）、左心室收缩压（Left ventricular systolic pressure，LVSP）、左心室舒张末期压（Left ventricular end-diastolic pressure，LVEDP）、左室压力最大上升速率（+dp/dt_{max}）和左室压力最大下降速率（-dp/dt_{max}）等指标的变化。

1.4　统计学处理

运用 SPSS 13.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 Dunnett-t 检验，组间比较用单因素方差分析，P<0.05 为差异有显著性。

表 1　各组心率的比较结果（beats/min，n=10，$\bar{x} \pm s$）

分组	缺血前	再灌注 5 min	再灌注 15 min	再灌注 30 min
C 组	208 ± 13	196 ± 13	194 ± 12	192 ± 12
I/R 组	211 ± 10	174 ± 7**	170 ± 7**	164 ± 7**
IPO 组	217 ± 8	184 ± 7*△	183 ± 7*△	181 ± 7*△△
H^+ 组	221 ± 22	184 ± 9*	182 ± 9*△	180 ± 9*△△
IPO+OH^- 组	214 ± 9	176 ± 9**	170 ± 9**	162 ± 10**
OH^- 组	217 ± 10	180 ± 11*	174 ± 10**	168 ± 10**

与正常对照组比较，* P <0.05，** P< 0.01；与缺血再灌注组比较，△ P< 0.05，△△ P<0.01

表 2　各组左室收缩压的比较结果（mmHg，n=10，$\bar{x} \pm s$）

分组	缺血前	再灌注 5 min	再灌注 15 min	再灌注 30 min
C 组	120.88 ± 3.28	113.68 ± 4.38	112.92 ± 4.42	111.91 ± 4.11
I/R 组	123.34 ± 7.24	100.67 ± 6.36**	93.15 ± 6.16**	85.27 ± 6.24**
IPO 组	125.88 ± 5.94	102.14 ± 3.90*	99.42 ± 4.25**	95.45 ± 4.06**△
H^+ 组	127.71 ± 7.31	102.14 ± 7.60*	99.42 ± 4.25**	95.04 ± 7.20**△
IPO+OH^- 组	117.93 ± 7.43	97.72 ± 9.33**	93.94 ± 9.28**	88.86 ± 8.64**
OH^- 组	116.99 ± 6.95	92.10 ± 8.07**△	88.17 ± 7.41**	83.56 ± 7.66**

与正常对照组比较，* P <0.05，** P< 0.01；与缺血再灌注组比较，△ P< 0.05，△△ P<0.01

2 结 果

与 C 组比较，再灌注期间 I/R 组、IPO+OH⁻ 组和 OH⁻ 组 LVEDP 升高，HR、LVSP、+dp/dt$_{max}$、-dp/dt$_{max}$ 降低（$P<0.01$），IPO 组和 H⁺组有同样趋势（$P<0.05$）；与 I/R 组比较，IPO 组和 H⁺组 LVEDP 降低，HR、LVSP、+dp/dt$_{max}$、-dp/dt$_{max}$ 升高（$P<0.05$），见表 1。

3 讨 论

缺血后处理对缺血再灌注心肌的具体保护作用机制还有待进一步证实，但由于其实施需对缺血心肌在复灌初进行数次阻断循环，因此人们在对其做进一步研究的同时也在积极探索取代缺血后处理的措施。近年来一些学者对缺血后处理的作用机制提出 pH 假说，认为后处理是通过造成再灌注初期的一种短暂延迟性酸中毒状态，从而保护缺血心肌免受再灌注损伤。

在心肌再灌注时乳酸浓度下降、钠-氢交换蛋白和钠-碳酸氢盐同向转运蛋白激活之后，pH 值迅速恢复导致致死性再灌注损伤，这一现象称为 pH 反常[5]。实验研究显示，在新生大鼠心肌细胞内，用酸性缓冲液复氧有心脏保护作用。但临床研究中，在再灌注期间使用钠-氢交换抑制剂延缓 pH 的恢复，

表 3 各组左室舒张末压的比较结果（mmHg，n=10，$\bar{x}\pm s$）

分组	缺血前	再灌注 5 min	再灌注 15 min	再灌注 30 min
C 组	5.29 ± 0.79	6.68 ± 1.07	6.72 ± 1.06	6.77 ± 1.06
I/R 组	5.06 ± 1.02	52.64 ± 7.91**	53.56 ± 10.09**	56.98 ± 9.46**
IPO 组	7.25 ± 1.17	39.34 ± 5.05**△△	40.73 ± 5.04**△	43.18 ± 4.62**△△
H⁺组	7.19 ± 0.75	30.62 ± 6.31**△△	33.00 ± 6.11**△△	36.34 ± 6.30**△△
IPO+OH⁻组	6.16 ± 1.29	40.69 ± 7.27**△	43.85 ± 7.32**△	48.45 ± 7.15**△
OH⁻组	6.52 ± 1.21	48.82 ± 5.37**	52.04 ± 5.30**	56.46 ± 5.29**

与正常对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与缺血再灌注组比较，△ $P<0.05$，△△ $P<0.01$

表 4 各组左室内压最大上升速率的比较结果（mmHg/s，n=10，$\bar{x}\pm s$）

分组	缺血前	再灌注 5 min	再灌注 15 min	再灌注 30 min
C 组	2787 ± 156	2584 ± 165	2560 ± 160	2538 ± 162
I/R 组	2703 ± 135	2161 ± 94**	2110 ± 87**	2051 ± 81**
IPO 组	2811 ± 116	2350 ± 81*△	2326 ± 76*△	2297 ± 82*△
H⁺组	2803 ± 179	2339 ± 126*△	2305 ± 128*△	2274 ± 135*△
IPO+OH⁻组	2768 ± 222	2188 ± 228**	2123 ± 238**	2057 ± 246**
OH⁻组	2759 ± 237	2213 ± 238**	2162 ± 241**	2121 ± 248**

与正常对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与缺血再灌注组比较，△ $P<0.05$，△△ $P<0.01$

表 5 各组左室内压最大下降速率的比较结果（mmHg/s，n=10，$\bar{x}\pm s$）

分组	缺血前	再灌注 5 min	再灌注 15 min	再灌注 30 min
C 组	2648 ± 167	2536 ± 185	2524 ± 176	2503 ± 175
I/R 组	2637 ± 124	2135 ± 84**	2085 ± 78**	2004 ± 67**
IPO 组	2798 ± 136	2340 ± 81*△	2313 ± 74*△	2282 ± 87*△
H⁺组	2801 ± 171	2337 ± 129*△	2293 ± 140*△	2250 ± 148*△
IPO+OH⁻组	2686 ± 149	2122 ± 240**	2068 ± 257**	1996 ± 296**
OH⁻组	2690 ± 240	2186 ± 227**	2145 ± 235**	2101 ± 243**

与正常对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与缺血再灌注组比较，△ $P<0.05$，△△ $P<0.01$

对心脏无保护作用[6]。Qian 等[7]在大鼠肝细胞实验中发现缺氧期细胞内 pH 值为 6.3,MPTP 保持关闭状态,用 pH 值为 7.4 的灌注液进行表面灌流时,MPTP 形成并开放,导致大量细胞坏死;而用 pH 值为 6.2 的酸性灌注液进行表面灌注时 MPTP 则保持关闭状态,大于 80%的细胞保持正常活性。Kim 等[8]在成年大鼠离体心肌实验中发现再灌注后 pH 值的恢复启动了 ROS 的产生、MPTP 的形成,导致 ATP 水平下降,钙及其他离子泵的抑制和细胞坏死,用酸性灌注液进行再灌注可能阻止 ROS 的产生和 MPTP 的形成,从而提高心肌收缩和舒张功能。

本研究选用老龄大鼠离体心脏缺血再灌注模型。与在体模型相比,Langendorff 模型的整体干扰因素比较少,便于观察心脏在无神经体液支配下的自主状态,许多在体模型无法控制的条件都可以得到很好的控制[9]。心脏的泵血功能取决于心肌的收缩能力以及前、后负荷的综合因素影响。通过 Langendorff 离体心脏灌流排除了前后负荷的影响和神经体液的作用,灌注期间 K-H 液维持在 37℃,排除了温度对心肌功能的影响。反映心脏收缩性能的参数 HR、LVSP、LVEDP 和±dp/dtmax 在一定程度上反映心室肌张力变化,从而反映心肌收缩和舒张能力。本实验排除了血压调节机制的作用,在心脏收缩功能减弱的情况下,必然导致 HR 减慢、LVSP 下降、LVEDP 升高以及±dp/dtmax 下降。

本实验的结果显示,与 I/R 组比较,IPO 组和 H^+ 组 LVEDP 降低,HR、LVSP、$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$ 升高,说明缺血后处理对老龄大鼠离体心肌的收缩和舒张功能有保护作用,酸处理对离体心肌缺血缺血再灌注后血流动力学的影响作用与之相似,提示人为的短暂延迟性酸中毒状态可以模拟缺血后处理对缺血心肌再灌注后收缩和舒张功能的保护作用。

另外,IPO+OH^-组和 OH^-组与 I/R 组比较,其差异无统计学意义,OH^-组的结果说明缺血再灌注损伤后单纯的碱处理措施组对离体心肌的影响与缺血再灌注损伤组的作用相似,可以排除碱处理对 IPO+OH^-组结果的影响,而 IPO+OH^-组的结果显示缺血后处理的心肌保护作用被碱处理的措施减弱,提示缺血后处理可能是通过反复阻断循环形成一种延迟性的酸中毒状态而产生对缺血心肌的保护作用,这种保护作用可以被相应的碱处理所减弱。

短暂延迟性酸处理可以模拟缺血后处理对老龄大鼠缺血心肌的保护作用,改善缺血心肌再灌注后收缩和舒张功能,维持心脏作功,从而达到缺血心肌的保护作用。但短暂延迟性酸处理的具体作用机制仍有待进一步的研究。

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:comparision with ischemic preconditioning[J]. AM J Physiol Heart Cire Physiol,2003,285:H579-H588.

[2] Masashi F,Hiroshi A,Akio H, et al.Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning[J]. AM J Physiol Heart Cire Physiol,2007,292:H2004-H2008.

[3] Cohen M V,Yang X M,Downey, et al. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis[J]. circulation,2007,115:1895-1903.

[4] Javier I, Ignasi B, Victor H,et al.Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage[J].Cardiovascular Research,2008,77:782-790.

[5] 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.

[6] Avkiran M, Marber M S. $Na(^+)/H(^+)$ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects[J]. J Am Coll Cardiol, 2002,39:747-753.

[7] Qian T,Nieminen A L,Herman B,et al. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes[J]. Am J Physiol,1997,273:C1783-C1792.

[8] Kim J S,Jin Y,Lemasters J J,et al. Reactive oxygen species,but not Ca^{2+} overloading,trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adul trat myocytes after ischemia-reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2006,290: H2024-H2034.

[9] 许兰文,乔伟伟,陈绍亮,等.离体灌流心动物模型的制备和应用[J]. 上海实验动物科学,2002,22(2):112-114.

(责任编辑:冉明会)