维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0438－04

极化停搏液用于离体大鼠心脏保存的实验研究

杨双强, 谭松涛, 杨朝坤, 汪 斌, 陈 力

(重庆医科大学临床学院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 Na^+ 通道阻滞剂河豚毒素(tetrodotoxin,TTX)极化停搏液对离体大鼠心脏的保护作用。方法:20 只 Wistar 大鼠随机均分入 St. Thomas 去极化停搏组(对照组,Ⅰ组),TTX 极化停搏组(Ⅱ组)。建立离体心脏 Langendorff 和 Neely 灌注模型,搏动稳定后,灌注 30min 后停搏。将鼠心置于相应配伍的停搏液中,7℃保存 5h 后重新灌注心脏 30min。观察各组心脏保存前后左心室收缩末压力(LVESP)和压力变化速率(±dp/dt)的恢复率、心肌酶漏出量、ATP 含量和心肌超微结构等方面的改变。结果:恢复灌注后,TTX 极化停搏组血流动力学各项指标恢复率明显高于去极化组($P<0.01$),CPK 和 LDH 漏出量($P<0.05$)明显低于去极化组,ATP 含量维持在较高的水平($P<0.01$),心肌超微结构得到较好保护。结论:极化停搏心脏保存液对离体大鼠心脏的保护作用优于去极化停搏液,在长时间供体心脏保存中显示出明显的优势。

【关键词】极化停搏;Na^+ 通道阻滞剂;心肌保护;心脏保存

【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－11－24

Protective effects of polarizing cardioplegia with Na^+ channel inhibitor tetrodotoxin (TTX) on isolated rat hearts

YANG Shuangqiang, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective effects of polarizing cardioplegia with Na^+ channel inhibitor tetrodotoxin (TTX) on isolated rat hearts. *Methods*: While Langendorff and Neely perfusion model were steadily established, the rat hearts(10 hearts in each group)were respectively arrested by depolarizing cardioplegia (St. Thomas No. 2 solution, STH－2)in Group Ⅰ (control group), and by polarizing cardioplegia(TTX)in Group Ⅱ. These arrested hearts were preserved in corresponding cardioplegia solution respectively at 7℃ for 5 hours and then underwent 30 minute reperfusion. Pre－ischemia and post－ischemia indexes of the rat hearts were studied, including hemodynamic parameters, myocardial enzymology, ATP content, and ultrastructural changes. *Results*: There were no differences between two groups before myocardial ischemia. But the recovery of myocardial hemodynamic parameters during reperfusoin in Group Ⅱ was better than that in Group Ⅰ ($P<0.01$). The leakage of CPK and LDH in Group Ⅱ was less than that in Group Ⅰ ($P<0.05$). The content of ATP in Group Ⅱ kept relatively higher level after reperfusion. Myocardial ultrastructures were better protected in polarizing cardioplegia group. *Conclusion*: Na^+ channel inhibitor TTX could prevent myocardial ischemia/reperfusion injuries caused by intracellular Na^+－overload and Ca^{2+}－overload, and reduce the consumption of energy by arresting heart under polarizing condition. Polarizing cardioplegia(TTX) plays more effective role than depolarizing cardioplegia(STH－2) in long－term myocardial preservation of donor rat hearts.

【Key words】Polarizing cardioplegia; Na^+ channel inhibitor; Myocardial protection; Myocardial preservation

心脏移植常采用传统去极化停搏液进行供体心脏停搏与保存。近年研究发现心肌细胞去极化停搏后存在 Na^+ 超载现象,进而引发 Ca^{2+} 超载,导致心肌缺血/再灌注损伤[1~3]。本研究应用 Na^+ 通道阻滞剂河豚毒素(tetrodotoxin,TTX)直接阻断心肌细胞 Na^+ 通道,使离体大鼠心脏停搏于接近静息电位的极化状态,探讨极化停搏液对离体大鼠缺血心肌保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和实验分组

体重 250～300g 健康雄性 Wistar 大鼠 20 只,随机分为

作者介绍:杨双强(1958－),男,主任医师,硕士,主要研究方向:胸心外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

二组，每组 10 只。Ⅰ组为对照组：用去极化停搏液 St. Thomas No 2(STH－2)停搏；Ⅱ组为实验组，用极化停搏液[质量浓度为 20μmol/L 的 TTX 加入 K－H 缓冲液(Krebs－Henseleit buffer)]停搏。

1.2 试剂、灌注液成分

TTX，ATP，ADP 和 AMP 均购自 Sigma 公司；肌酸磷酸激酶(creatine phosphokinase，CPK)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

K－H 缓冲液成分(质量浓度为 mmol/L)：NaCl 119，$NaHCO_3$ 25，KCl 4.75．$MgSO_4$ 1.2，KH_2PO_4 1.18，$CaCl_2$ 1.4，Glucose 11，pH 7.8。STH－2 心脏停搏液成分(质量浓度为 mmol/L)：NaCl 110，KCl 16，$MgCl_2$ 16，$CaCl_2$ 2.0，Glucose 11，pH 7.8。

1.3 实验模型的建立和血流动力学指标测定

腹腔注射肝素钠 200U，20min 后脱颈处死大鼠，迅速取下心脏。建立离体鼠心 Langendorff 灌注模型，主动脉根部灌注 37℃，体积分数 95%O_2＋体积分数 5%CO_2 混合气持续氧合的 K－H 缓冲液，压力 60mmHg(1mmHg＝0.133kPa)。稳定后经左心耳插管，灌注液转流建立 Neely 左心室工作灌注模型，灌注压 15mmHg，后负荷 50mmHg，稳定 15min，采用 PowerLab/8_{SP}ML785 型 8 通道生理记录仪(ADInstruments，澳大利亚)测定左心室压(left ventricular pressure，LVP)及左心室压力变化速率(±dp/dt)。连续收集冠状静脉窦溢出液 2ml，用于测定肌酸磷酸激酶(CPK)和乳酸脱氢酶(LDH)漏出量。分别用各组配伍的停搏液 2ml 从主动脉根部缓慢注入(30s)使心脏停搏，记录停搏时间(s)。停搏后取下心脏，置于相应配伍的心脏保存液中，维持 7℃保存。5h 后重置于 Langendorff 装置上复温、复氧，记录复搏时间，其余指标测定同上，血流动力学各参数表示为恢复率。工作 30min 后停止实验，取左心室肌 100mg 低温(－80℃)保存，用于测定 ATP，ADP 和 AMP，同时采集并制备电镜观察标本。

1.4 CPK，LDH 和腺嘌呤核苷酸的测定

按试剂盒说明，用 UV8500 紫外分光光度计(Techcomp，香港)测定冠状静脉溢出液中 CPK，LDH 含量。测定波长分别为：CPK，660nm；LDH，440nm。

离子对反向高效液相色谱法测定心肌细胞腺嘌呤核苷酸(ATP，ADP 和 AMP)含量。Waters 高效液相色谱系统(Waters. Co，美国)，C_{18}柱(150mm×3.8mm，4μm)；流动相为质量浓度 0.2mol/L 磷酸缓冲液(pH＝6.0)，其中含质量浓度 3mmol/L 的硫代巴比士酸(thtiobarbiiuric acid TBA)，体积分数 12%的甲醇；流速：0.5ml/min；紫外检测波长：254nm。心肌标本解冻后称重。按 1mg 组织加 20μl 的比例加入 4℃质量浓度 0.1mol/L 高氯酸，冰浴中磨成匀浆，4℃ 15000r/min 离心 20min，取上清液 20μl 进样。

1.5 统计学处理

结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，SAS6.12 软件进行统计学分析，用成组配伍资料 t 检验，$P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结 果

2.1 停搏时间和复搏时间(见表 1)

与Ⅰ组去极化停搏比较，极化停搏Ⅱ组停搏时间明显缩短，差异有显著性($P<0.05$)。两组复搏时间比较，Ⅱ组复搏较迅速，与Ⅰ组比较差异有显著性($P<0.01$)。

表 1 去极化停搏和极化停搏组之间停搏时间、复搏时间比较($\bar{x}\pm s$，s)

分组	停搏时间	复搏时间
Ⅰ组(去极化停搏组)	6.4±0.7	7.8±0.9
Ⅱ组(极化停搏组)	4.1±0.6	5.7±0.7

表 2 两组心脏血流动力学指标再灌注后恢复率比较($\bar{x}\pm s$，%)

分组	LVESP	$+dp/dt_{max}$	$-dp/dt_{min}$
Ⅰ组(去极化停搏组)	77.5±8.9	70.1±5.6	66.8±7.5
Ⅱ组(极化停搏组)	93.5±5.4	93.8±3.4	87.5±5.4

表 3 两组心脏停搏前、再灌注后 LVEDP 的变化比较($\bar{x}\pm s$，mmHg)

分组	停搏前	再灌注后
Ⅰ组(去极化停搏组)	5.4±1.5	15.9±5.4
Ⅱ组(极化停搏组)	5.5±2.0	12.7±6.1

表 4 CPK，LDH 漏出量的测定结果($\bar{x}\pm s$)

组别(n＝10/组)	CPK 漏出量(U/ml)		LDH 漏出量(U/ml)	
	停搏前	再灌注后	停搏前	再灌注后
Ⅰ组(去极化停搏组)	33.7±4.6	49.6±8.9	1.71±0.15	2.70±0.36
Ⅱ组(极化停搏组)	35.1±5.2	46.7±4.9	1.78±0.17	2.46±0.39

表 5 ATP，ADP，AMP，TAN 和 EC 测定结果($\bar{x}\pm s$，μg/g 湿重组织)

分 组	ATP	ADP	AMP	TAN	EC(%)
Ⅰ组(去极化停搏组)	67±7	55±4	40±4	162±8	59±3
Ⅱ组(极化停搏组)	86±5	77±3	43±8	205±5	61±2

维普资讯 http://www.cqvip.com

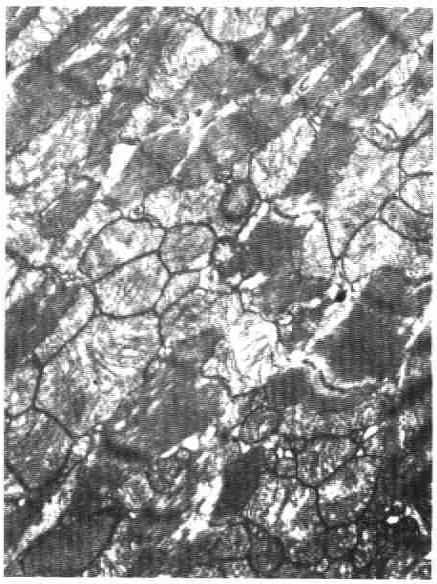


图 1 Ⅰ组(去极化停搏组)心肌超微结构改变 ×10000

肌原纤维排列紊乱、松散,Z 线模糊,呈波流状;可见肌纤维挛缩,肌丝溶解,T 管和肌浆网明显扩张;线粒体肿胀程度较重,嵴断裂,数量减少,有灶性空泡变,线粒体外膜尚完整。

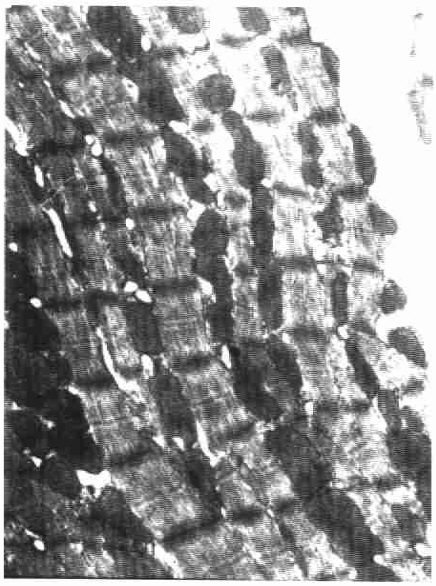


图 2 Ⅱ组(极化停搏组)心肌超微结构改变 ×10000

肌原纤维排列尚整齐,Z 线清晰,少量肌丝溶解,留下的空白区域为扩张的肌浆网;线粒体电子密度降低,有轻微肿胀,嵴略增宽、融合,空泡样变性不明显。

2.2 血流动力学指标的变化(见表 2,3)

停搏前两组心脏血流动力学指标差异无显著性($P>0.05$);恢复灌注后,Ⅱ组心脏左心室收缩末期压(left ventricuklar end - systolic pressure, LVESP)和± dp/dt 等指标的恢复率明显高于Ⅰ组,差异有显著性($P<0.01$)。再灌注后,两组心脏左室舒张末压(left ventricular end - diastolic pressure, LVEDP)均较停搏前高,差异有显著性($P<0.01$)。组间比较,Ⅰ组明显高于极化停搏Ⅱ组,差异有显著性($P<0.01$)。

2.3 CPK, LDH 测定(见表 4)

心肌停搏前各组冠状静脉窦溢出液中 CPK, LDH 的漏出量没有明显差别($P>0.05$);再灌注后各组 CPK, LDH 漏出量均比缺血前高,差别有显著意义($P<0.01$)。Ⅱ组 CPK, LDH 漏出量明显低于Ⅰ组,差别有显著性意义($P<0.01$)。

2.4 再灌注后心肌细胞 ATP, ADP, AMP, 总腺苷酸(total adenine nucleotides, TAN)和能荷(energy charge, EC)测定(见表 5)

再灌注后,极化停搏Ⅱ组 ATP, ADP, AMP 和 TAN(ATP + ADP + AMP)含量高于Ⅰ组,差异有显著性意义($P<0.01$)。EC($EC=\frac{ATP+0.5ADP}{TNA}$)两组间比较差异无显著性意义($P>0.05$)。

2.5 心肌超微结构的改变

标本均取自左心室(再灌注后 20min),透射电子显微镜(TEM)观察。提示极化停搏Ⅱ组心肌超微结构保护效果较佳(图 1、2)。

3 讨 论

心脏移植时供体心脏从切取、运送、修剪直至移植完成后主动脉开放,心脏经历缺血时间较长,因此供心的保存效果直接影响手术成败。目前供心保存主要是采取高 K^+ 去极化停搏法结合低温,常用停搏液(或称心脏保存液)有 St. Thomas 液, UW 液等。近年研究发现去极化停搏存在以下不足:(1)去极化在 -65mV ~ -15mV 之间时,心肌细胞存在内向性稳态 Na^+ 窗口电流(Na^+ window currents),容易导致"Na^+ 超载"[1];(2)去极化在 -40mV ~ -15mV 之间时,存在 Ca^{2+} 的内流,且肌浆网中 Ca^{2+} 更倾于外渗,加重了缺血/再灌注时的 Ca^{2+} 负荷[4];(3)Na^+ 和 Ca^{2+} 跨膜流动会进一步增加能耗,不利于心功能恢复;(4)随着缺血时间延长心肌细胞内 H^+ 浓度将增加,激活 $H^+ - Na^+ - Ca^{2+}$ 交换轴,进一步导致 Ca^{2+} 超载[3]。细胞内 Na^+ 超载、Ca^{2+} 超载可引起细胞和线粒体水肿,加重再灌注损伤[5]。因此有学者认为去极化停搏液在进行供体心脏时冷缺血时间不宜超过 3h,否则心肌很难保持良好的组织结构,并有可能对心脏造成损害[6]。心肌细胞膜电

维普资讯 http://www.cqvip.com

位的去极化和复极由 Na^+ 通道功能状态决定，去极化后 Na^+ 通道开放是引起一系列跨膜离子流的启动因子，因此用 Na^+ 通道阻滞剂 TTX 阻断 Na^+ 通道就可以阻止跨膜离子流，使心肌停搏在极化状态。Snabaitis 等实验证实 TTX 可使膜电位维持在 -70mV 左右，接近于正常时的静息电位 (-80mV)[7]。Chambers 和 Hearse 将此种停搏方式称作"极化停搏(polarizing arrest)"[8]。

本研究用 TTX 加入 K-H 缓冲液(离子浓度同细胞外液)来停搏离体大鼠心脏。与 STH-2 去极化停搏组比较，TTX 停搏心脏更为迅速；低温保存 5 小时恢复灌注后心脏复搏也较迅速。高 K^+ 去极化停搏对心肌细胞 Na^+ 通道的作用间接，它是通过提供细胞外高 K^+ 环境使膜电位逐渐去极化至 -55mV 时致 Na^+ 通道失活心脏停搏，再灌注后膜电位必须复极到 -80mV 时心肌才重新具有兴奋性。而极化停搏液的主要成分 TTX 阻断 Na^+ 通道作用直接且过程可逆[9]。因此 TTX 对 Na^+ 通道阻断更迅速，再灌注后 Na^+ 通道功能恢复更快，停搏和复跳时间均明显短于去极化停搏。同时消除了稳态 Na^+ 窗口电流，减轻了因糖酵解供能所致细胞内酸中毒引起的 Na^+/H^+ 交换，使心肌缺血时发生 Na^+ 超载和 Ca^{2+} 超载的主要途径被抑制，因而有效地防止了心肌缺血/再灌注损伤[2]。恢复灌注后细胞和线粒体水肿不明显，心肌超微结构得到较好的保护；CPK 和 LDH 漏出量也相对较少；再灌注后 LVEDP 增高不明显，LVESP 及 ± dp/dt 的恢复率明显高于去极化停搏的对照组。

心肌缺血时能量代谢发生障碍，使 Na^+-K^+-ATP 酶(Na^+ 泵)主动转运 Na^+ 到细胞外的能力大为降低，TTX 极化停搏液能迅速阻断 Na^+ 通道，停搏后细胞内外离子浓度接近静息时的水平，从而使维持细胞离子内稳态的离子泵耗能降到最低限度，节省能量物质，各种离子泵也保持较高活性，利于再灌注后迅速恢复其调节离子平衡的功能。本研究提示用 TTX 极化停搏液低温保存离体大鼠心脏 5h 后，ATP，ADP，AMP 和 TAN 含量高于去极化停搏组。

与经典的去极化停搏液 STH-2 比较，以 TTX 阻断 Na^+ 通道为特点的极化停搏液在维持离体大鼠心脏血流动力学功能、保护心肌酶、减少能量消耗以及保护心肌的超微结构等方面均显示出明显的优势，对长时间(5hrs)低温心脏保存的效果亦较好。极化停搏有望成为一种有效的心脏保存方法。

参 考 文 献

[1] Attwell D, Cohen I, Eisner D, et al. The steady state TTX-sensitive("window")sodium current in cardiac Purkinje fibres [J]. Pflugers Arch, 1979; 379(2): 137-142.

[2] Eng S, Maddaford TG, Kardami E, et al. Protection against myocardial ischemic/reperfusion injury by inhibitors of two separate pathways of Na^+ entry [J]. Mol Cell Cardiol, 1998; 30: 829-835.

[3] Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts: possible involvement of H^+-Na^+ and Na^+-Ca^{2+} exchange[J]. Circ Res, 1989; 65: 1045-1056.

[4] Snabaitis AK, Chambers D. Long-term myocardial preservation: beneficial and additive effects of polarized arrest(Na^+-channel blockade), Na^+/H^+-exchange inhibition, and $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransport inhibition combined with calcium desensitization [J]. Transplantation, 1999; 68(10): 1444-1453.

[5] Askenasy N, Navon G. Volume-related activities of sodium ion transporters: multinuclear NMR studies of isolated rat hrarts[J]. Am J Physiol, 1996; 271(1 Pt 2): H94-102.

[6] 孙衍庆，主编. 现代胸心外科学[M]. 第 1 版，北京：人民军医出版社，2000; 1593-1595.

[7] Snabaitis AK, Shattock MJ, Chambers DJ. A comparison of polarized and depolarized arrest in the isolated rat heart for long-term preservation[J]. Circulation, 1997; 96(9): 3148-3156.

[8] Chambers DJ, Hearse DJ. Developments in cardioprotection: "polarized" arrest as an alternative to "depolarized" arrest [J]. Ann Thorac Surg, 1999; 68(5): 1960-1966.

[9] 贾宏钧，王钟林，杨期东. 主编. 离子通道与心脑血管疾病—基础与临床[M]. 第 1 版，北京：人民卫生出版社，2001; 113-118.