维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0407－03

缺血预处理联合 St. Thomas Ⅱ心麻痹液对兔未成熟心脏功能和病理学影响

朱 斌[1],闵 苏[1],龙 村[2]

(1.重庆医科大学临床学院麻醉科 重庆 400016;2.中国医学科学院阜外医院麻醉体外循环研究室 北京 100037)

【摘 要】目的:研究缺血预处理(IPC)对兔未成熟心肌缺血再灌注损伤的影响,并探讨其可能机制。方法:利用 Langendorff 模型灌注幼兔(14～21 天)离体心脏。18 只幼兔心随机分为 2 组,每组 9 只,IPC 组经历 5min 缺血、10min 再灌的 IPC 处理后,使用 St. Thomas Ⅱ心麻痹液(STH)使心脏停跳;对照组只用 STH 停跳心脏。两组兔心均在生理体温(39℃)下接受 45min 缺血、40min 灌注。观察复灌后的心肌酶释放、心肌能量、心脏功能及病理学变化。结果:与对照组相比,IPC 组肌酸磷酸激酶同工酶(CK－MB)漏出量明显减少($P<0.01$),心肌 ATP 含量以保存($P<0.05$),再灌注末心脏左室发展压(LVDP)显著改善($P<0.05$);光、电镜显示经过缺血预处理的心肌细胞损伤轻。结论:缺血预处理能明显减轻兔未成熟心肌缺血再灌注损伤,改善再灌注后心脏功能的恢复,其机制可能与保存再灌注后心肌细胞中 ATP 含量有关。

【关键词】缺血预处理;未成熟;心麻痹液

【中国图书分类法分类号】R322.1+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2000－1－29

Effect of ischemic preconditioning plus cardioplegic solutions on immature rabbit heart function and morphology

ZHU Bin, et al

(Department of Anesthesiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To investigate whether immature hearts experiencing global ischemia and reperfusion injury could be protected by ischemic preconditioning(IPC) and probe the possible mechanism. ***Methods***: Aerobically perfused in Langendorff mode at 39℃, isolated immature rabbit hearts(14－21 days old)were subjected to a IPC stimulus consisting of 5 minutes of global ischenmia plus 10 minutes of reperfusion. This was followed by 45 minutes of global ischemia and 40 minutes of reperfusion. Left ventricular developed pressure(LVDP), change of myocardial enzyme (CK－MB) in the coronary effluent, myocardial energy metabolism and morphology were determined. Cold crystalloid cardioplegia was used to cause the hearts to arrest before the prolonged global I/R. ***Results***: The LVDP value in IPC group was significantly higher than that in control. The CK－MB leakage in IPC group was decreased significantly (24.58±5.09 U/L versus 32.80±5.32 U/L in controls $P<0.01$). The myocardial levels of ATP in preconditioned group at the end of the reperfusion was significantly preserved(208.14±24.2μg/g versus 174.52±15.69μg/g in controls $P<0.05$). Light and electron microscopic findings of myocardium showed the preconditioned hearts were less severely damaged. ***Conclusion***: IPC has a protective effect on the immature rabbit hearts suffering from global I/R injury, which is possibly connected with the preservation of ATP level in myocardium tissue.

【Key words】 Ischemic preconditioning; Immature; Cardioplegic solutions

缺血预处理(Ischemic Preconditioning, IPC)对心脏保护,虽然最早是在成年实验犬心梗模型上提出的,但近年的研究表明这种强大的内源性保护现象具有动物种属和器官的普遍性。目前 IPC 对未

作者介绍:朱 斌(1972－),男,住院医师,硕士,四川营山人。主要研究方向:体外循环与心肌保护。

维普资讯 http://www.cqvip.com

成熟心肌缺血再灌注损伤的研究还刚处于起步阶段。在我们以前的实验表明:单纯的 IPC 并不能保护遭受全心缺血再灌注损伤的兔未成熟心脏[1]。因此,本实验旨在研究当与心麻痹液(St. Thomas Ⅱ停搏液)合用时,IPC 是否能实现对兔未成熟心脏缺血再灌注损伤的保护。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂 多导生理记录仪(Macintosh, Quadra610;Maclab charts 3.6v/s),恒温循环器(HX-10555,北京四环科学仪器厂),改良 Langendorff 装置,Stockert 血泵(Gemany),混合气(O_2:CO_2 = 95%:5%,北京普莱克斯公司),超纯水(SZ-93 自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂)。Krebs-Henseleit 重碳酸盐缓冲液及 St. Thomas Ⅱ号心麻痹液成分见表 1。

表 1 Krebs-Henseleit 重碳酸盐缓冲液(KH)与 St. Thomas Ⅱ停搏液(STH)成分

成分(mmol/L)	KH	STH
NaCl	118.5	100.0
$NaHCO_3$	25.0	10.0
KH_2PO_4	1.2	-
KCl	4.8	16.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.2	-
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	-	16.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.8	1.2
Glucose	11.0	-
pH	7.4±0.5	7.8±0.02

Krebs-Henseleit 重碳酸盐缓冲液的 pH 值在 37℃,通以混合气时 7.4。

1.2 动物模型的建立 纯种新西兰幼兔体重 220~280g,兔龄 14~21 d。以氨基甲酸乙酯腹腔麻醉(1.5g/kg),经股静脉肝素化(1501U/kg),快速开胸取出心脏,浸入 4℃ Krebs-Henseleit 缓冲液,30s 内主动脉插管行 Langendorff 灌注,用 39℃ 经混合气(O_2:CO_2 = 95%:5%)平衡的 Krebs-Henseleit 液灌注,灌注压 60cm H_2O(1cm H_2O = 0.098kPa)。剪开肺动脉以通畅冠脉流出道。剪开左心耳,向左室插入与多导生理检测仪相连的带球囊导管,并将心脏移入保温(39℃)缸内。30min 后,向球囊缓慢注入生理盐水,调整至左室舒张末压(LVEDP)为 10mmHg(1mmHg = 0.133kPa)。

1.3 实验分组 18 只幼兔随机分为 2 组,每组 9 只。IPC 组(IPC)平稳后灌注至 35min,全心缺血 5min,灌注 10min 行 IPC,STH 停跳。对照组(Con)平稳后灌注至 50min,STH 停跳。各组 STH 停跳后,都在 39℃ 下接受 45min 停灌、40min 复灌。

1.4 测定指标 于再灌注末利用生理记录仪测定左室发展压(LVDP),收集再灌后前 10min 冠脉流出液,以自动生化分析仪(Beckman, X9,美国)测定肌酸磷酸激酶同工酶(CK-MB)含量。再灌注毕,快速取下心脏,滤纸吸净心脏表面水分,剪取心尖部位约 200mg 组织置于液氮保存,用以 ATP 测定。分别在预处理组与对照组随机取一例左室心肌作光镜和电镜观察。

ATP 的测定方法:采用高效液相色谱技术。仪器与试剂:采用美国 Waters 公司高效液相色谱仪,510 泵,490E 型紫外检测器,4.6mmX250mm Spherisorb ODS_2 柱;5'-ATP 钠盐和 CP 均为美国 Sigama 公司产品,甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯,用水为超纯水。测定方法:称取适量心肌组织(150mg),加入 1ml 0.4M $HClO_4$ 溶液沉淀,匀浆,冰浴中提取。4000r/min 离心 10min,上清液用碱调 pH 为中性,10000r/min 离心 10min。取上清液 20μl 进高效液相色谱仪(HPLC)分析。色谱条件:ODS 反相分离柱,流动相为甲醇-KH_2PO_4 缓冲液,流速 1.2ml/min,检测波长 259nm。单位 μg/g.(湿重)。

1.5 数据表达与统计分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间均数比较用 t 检验,以 SPSS 9.0 软件进行统计分析。$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 左室功能变化

见表 2,再灌注末 IPC 组左室发展压显著高于对照组($P<0.05$)。

2.2 心肌酶学变化

见表 2,缺血预处理组肌酸磷酸激酶同工酶(CK-MB)漏出量显著低于对照组($P<0.01$)。

2.3 心肌 ATP 变化

见表 2,同对照组相比缺血预处理明显保存了心肌细胞 ATP 含量($P<0.05$)。

表 2 两组动物之间的 LVDP、CK-MB 及 ATP 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	LVDP(mmHg)	CK-MB(UL)	ATP(μg/g 湿重)
IPC	57.51±11.09*	24.58±5.09#	208.14±24.4*
Con	41.61±10.57	32.80±5.32	174.52±15.69

*与 Con 组相比 $P<0.05$ #与 Con 组相比 $P<0.01$

2.4 形态学观察结果

2.4.1 光镜观察显示

IPC 组肌原纤维排列整齐,染色较均匀,可见横纹结构,部分区域可见肌浆凝集节段性胞浆嗜酸性

维普资讯 http://www.cqvip.com

变(见图 1)。对照组节优性胞浆嗜酸性变,肌浆凝集,肌原纤维消失(见图 2)。对照组病变重于实验组。

2.4.2 透射电镜观察显示

IPC 组,心肌结构尚清。肌原纤维排列整齐,肌节结构较清晰,部分肌节缩短,线粒体嵴排列整齐,未见明显肿胀。肌质网扩张。未见糖原蓄积(见图 3)。对照组,心肌结构轮廓尚存,部分心肌肌原纤维排列较散乱,肌节长度不一,有灶状肌丝溶解破坏;少数线粒体空泡变性,部分线粒体基质致密,出现絮状沉淀,肌质网扩张,部分染色质边集(见图 4)。对照组病变重于实验组。



图 1 IPC 组 光镜观察,HE 染色×200



图 2 Con 组 光镜观察,HE 染色×200



图 3 IPC 组电镜观察 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色×14,000



图 4 Con 组电镜观察 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色×14,000

3 讨 论

虽然 IPC 对成熟心肌的保护已经得到了越来越多实验的证明,但鉴于未成熟心肌在形态结构、对缺氧的耐受力等一些生理性能方面与成熟心肌存在明显差异,因此人们对 IPC 能否保护未成熟心肌存有争议。Awad 利用 Langendorff 模型对不同天龄大小的离体鼠心作 IPC 研究,发现小于 14 天的幼鼠不能产生 IPC 保护效应[2]。而 Baker 对 7~10 天兔进行类似研究,发现 IPC 可改善 LVDP 的恢复率[3]。在我们以前的实验显示:单纯的 IPC 并不能保护遭受全心缺血再灌注损伤的兔未成熟离体心脏,反而可能导致心肌细胞损伤,其原因与主动脉停灌后,预处理过的心脏不易停止跳动,心脏缺血跳动时间延长,能量消耗增多有关[1]。本实验利用心麻痹液消除了心脏停灌时自动缺血停跳对 IPC 保护效果的负影响,显示:IPC 对兔未成熟离体灌注心脏功能及缺血再灌注损伤具有强大的保护作用。

本实验再灌注末 IPC 组心肌组织中 ATP 含量明显高于对照组,提示 IPC 保护心肌机制可能与 IPC 保存心肌细胞能量有关。本实验另一对成年大鼠离体心脏的 IPC 研究显示:缺血预处理能保护缺血期心肌细胞膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性,减少心肌无效能量消耗,提高心肌对缺血耐受力,从而使心肌组织中 ATP 含量在再灌注前及再灌注末均处于较高水平[4]。也有文献认为 IPC 保存心肌细胞能量是 IPC 保护心肌的结果而非原因,关键的因素是 IPC 对心肌细胞膜 ATP 敏感性钾通道(K_{ATP} channels)的开放[5]。缺血预处理后(K_{ATP} channels)开放,K^+ 外流,心肌细胞膜超极化,从而缩短动作电位时程,Ca^{2+} 内流减少,减轻心肌细胞机械活动,降低 Ca^{2+} 超载和能量消耗,最终保存了心肌组织中 ATP 含量,保护了心脏功能,减轻了缺血再灌注损伤程度。

究竟是何种机制真正介导了 IPC 对心肌的保护,还有待进一步研究,但本实验中 IPC 对未成熟心肌缺血再灌注损伤所提供的保护却是客观事实。以往心脏外科心肌保护主要注重心麻痹液成分和灌注方法的改进,IPC 则为此提供了一种全新的有效的心肌保护思路和措施。对于那些因心脏结构发育异常,左室肥厚而导致停跳液不能 (下转第 415 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

跃,细胞密集,间质少,癌细胞界清,核大染色深,核质比(N/P)增大,核异型性明显及核分裂像多。实验组:癌细胞边界不清,胞质融合,核固缩、核碎裂、核溶解,肿瘤血管变性坏死,血栓形成,在一些切片中发现残留癌细胞现象。



图 6 HE×40

图 6:胃粘液腺癌实验组:见腺管的轮廓存在,但核固缩、核碎裂、核溶解现象非常明显。

3 讨 论

电化学治疗肿瘤技术自 Nordenstrom[1]开创以来受到国内外学者的广泛关注。本实验装置产生的能量可控陡脉冲信号作用于离体肿瘤组织,发现对不同组织学来源及病理类型的肿瘤均具有确切的杀灭肿瘤细胞作用。杀伤肿瘤细胞的机制可能如下:(1)肿瘤生存环境的变化:肿瘤组织比正常组织对环境的改变更为敏感,这是放疗、化疗及电化学治疗肿瘤的理论基础。我们在实验中发现能量可控陡脉冲作用下,肿瘤细胞及周围组织的 pH 值发生明显改变,阳极区为强酸性(pH 为 1～2),阴极区为强碱性(pH 为 12～14),至致使肿瘤细胞的生存环境发生剧变,DNA、酶、蛋白质构象发生变化,功能丧失,最终导致肿瘤细胞死亡[3];(2)血管效应:Ramirez 等[4]及 Cemazar 等[5]在各自的实验模型中发现脉冲作用区域有暂时的血流低灌注现象,血管内皮细胞改变,管腔内血栓形成。发现陡脉冲作用于离体肿瘤组织后,肿瘤血管变性坏死及血栓形成,影响肿瘤的血供,导致细胞死亡;(3)本实验证实温度变化不明显,可能热效应在陡脉冲杀伤肿瘤细胞过程中不起主要作用,证明它与肿瘤热疗不同。阳极区温度高于阴极区,与阴极区液化性坏死而阳极区凝固性坏死有关;(4)同时试验证明,脉冲作用时间短,针距宽,或电压低作用的肿瘤组织有残存癌细胞现象,说明疗效与治疗参数有关。总之,陡脉冲对离体肿瘤组织具有确切的杀伤作用,值得进一步研究探索其杀伤机制,为进一步的临床应用打下基础。

参 考 文 献

[1] Nordenstrom BEW. Biologically closed electric Circuit [M]. Uppsala: Sweden Nordic Medical publication, 1983; 269－274.

[2] Mir LM, Orlowski S, Belehradek J, et al. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses[J]. Eur J Cancer, 1991; 27(1): 68－72.

[3] 辛育龄,徐帮宁. 癌症的电化学治疗[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995; 2－7.

[4] Ramirez LH, Orlowski S, Bindoula G, et al. Electrochemotherapy on liver tumors in rabbits[J]. Br J Cancer, 1998; 77(12): 2104－2111.

[5] Cemazar M, Miklavcv D, Scancar J, et al. Increased platinum accumulation in SA－1 tumor cells after in vivo electrochemotherapy with cisplatin[J]. Br J Cancer, 1999; 79(9/10): 1386－1391.

(上接第 409 页)理想地到达心脏各个部位而失去良好心肌保护的先心病患儿,IPC 则更有可能成为一种补充或替代选择。同时由于本实验的心肌保护效果是在心麻痹液参与下获得的,这将有利于 IPC 和传统心肌保护措施的结合。

参 考 文 献

[1] Zhubin, Minsu, Longcun, et al. Single ischemic preconditioning in immature rabbit hearts[C]. Fifth China International Congress on TCVS(ABSTRACT). 2000; 306.

[2] Awad WI, Shattock MJ, Chambers DJ. Ischemic preconditioning in immature myocardium[J]. Circulation, 1998; 98: 206－213.

[3] Baker JE, Holman P, Gross GJ. Preconditioning in immature rabbit hearts: role of K_{ATP} channels[J]. Circulation, 1999; 99: 1249－1254.

[4] 潘楚雄,张炳熙,赵 延,等. 缺血预处理对心肌不同缺血方式下保护作用的实验研究[C]. 2000 年中华麻醉学术年会论文摘要汇编. 2000; 9; 52－53.

[5] 龙 村. 体外循环研究与实践[M]. 第 1 版. 北京:北京医科大学出版社, 2000; 178－182.