心血管疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001078

急性心肌梗死心肌黏弹性实验研究

李进嵩[1]，张春晓[2]，邓辉胜[3]，江永红[3]，朱　虑[3]，袁侨英[3]，黄　晶[3]
（1. 四川省医学科学院、四川省人民医院心内科，成都　610072；2. 重庆交通大学土木建筑学院，重庆　400074；
3. 重庆医科大学超声影像学研究所、重庆医科大学附属第二医院心内科，重庆　400010）

【摘　要】目的：活体检测急性梗死后梗死心肌黏弹性的改变并探讨其病理机制。**方法**：通过应用介入超声印压检测系统（intervention ultrasound indentation system，IUIS）分别在 6 只健康成年杂种犬梗死前、急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI）后 1 h、3 h 用印压法检测舒张心肌蠕变试验，以三参量黏弹性模型提取梗死前（NAMI 组）、急性心肌梗死 1 h（AMI-1 组）、急性心肌梗死 3 h（AMI-3 组）黏弹性参数。随后对梗死心肌的微管蛋白、结蛋白进行免疫组织化学检测，并分析其与黏弹性参数的关系。**结果**：AMI 后 1 h、3 h 表征心肌硬度参数 E_∞ 较梗死前显著增加（$P<0.05$），分别为（5.30 ± 0.48）kPa、（5.73 ± 0.32）kPa vs.（4.31 ± 0.40）kPa，同样参数 E_1 较梗死前也明显增加（$P<0.05$），分别为（6.78 ± 0.41）kPa、（11.67 ± 0.39）kPa vs.（5.05 ± 0.29）kPa；AMI后 1 h、3 h 与黏性形变相关参数 E_2 较梗死前明显降低（$P<0.05$），分别为（23.07 ± 0.28）kPa、（10.94 ± 0.64）kPa vs.（29.67 ± 0.63）kPa，同样参数 η 较梗死前也明显降低（$P<0.05$），分别为（0.60 ± 0.04）Pa·s、（0.65 ± 0.05）Pa·s vs.（0.74 ± 0.07）Pa·s；AMI 后 3 h 松弛时间常数 τ 较梗死前明显增加（$P<0.05$），分别为（58.91 ± 4.52）ms vs.（23.34 ± 0.43）ms。与梗死前比较急性心肌梗死后 3 h 结蛋白和微管蛋白明显减少（$P<0.05$）。反映舒张心肌持续形变能力参数 E_2、τ 与微管改变相关程度高。**结论**：在急性心肌梗死早期，梗死心肌硬度增加，黏性组分降低，心肌持续形变依赖更长舒张期。心肌舒张能力降低原因之一是微管蛋白减少。

【关键词】急性心肌梗死；蠕变试验；黏弹性参数；病理机制
【中图分类号】R318.01　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-09-01

Experimental study of myocardial viscoelasticity in mongrels with acute myocardial infarction

Li Jinsong[1], Zhan Chunxiao[2], Deng Huisheng[3], Jiang Yonghong[3], Zhu Que[3], Yuan Qiaoying[3], Huang Jing[3]
(1. Department of Cardiology, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital; 2. School of Civil Engineering and Architecture, Chongqing Jiaotong University; 3. Institute of Ultrasound Imaging, Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To study the changes of myocardial viscoelasticity and its pathological mechanism after acute myocardial infarction (AMI) in mongrels with AMI. ***Methods***: IUIS was used to detect creep tests in six healthy mongrels before myocardial infarction (NAMI group), at 1 hour after AMI (AMI-1 group), and 3 hour after AMI (AMI-3 group) in diastole in vivo. Viscoelastic parameters were extracted through the three-parameter Viscoelastic model. Immunohistochemistry of microtubulin and desmin were carried out with myocardium samples. Correlation analyses were carried out in the detection results. ***Results***: The parameters of E_∞ increased obviously after AMI than before AMI ($P<0.05$), they were as follows: (5.30 ± 0.48) kPa, (5.73 ± 0.32) kPa vs. (4.31 ± 0.40) kPa, also the parameters of E_1, they were as follows: (6.78 ± 0.41) kPa, (11.67 ± 0.39) kPa vs. (5.05 ± 0.29) kPa. The parameters of E_2 both decreased obviously after AMI than before AMI ($P<0.05$), they were as follows: (23.07 ± 0.28) kPa, (10.94 ± 0.64) kPa vs. (29.67 ± 0.63) kPa, also the parameters of η, they were as follows: (0.60 ± 0.04) Pa·s, (0.65 ± 0.05) Pa·s vs. (0.74 ± 0.07) Pa·s. The parameters of τ in AMI-3 group increased obviously ($P<0.05$), they were as follows: (58.91 ± 4.52) ms vs. (23.34 ± 0.43) ms. Desmin and microtubulin decreased obviously after AMI for 3 hours ($P<0.05$). The decrease of intracellular microtubule related with E_2、τ at 3 hours after AMI. ***Conclusion***: Elastic hardness increases, viscous component reduces, but rely on longer relaxation and the ability of myocardial relaxation decreases in 3 hours after AMI. The decrease of diastolic capacity partly is attributed to decrease of myocardium intracellular microtubule.

【Key words】acute myocardial infarction; creep test; viscoelastic parameters; pathomechanism

作者介绍：李进嵩，Email：doctorljs@163.com，
研究方向：介入心脏病学、心脏生物力学。
通信作者：黄　晶，Email：huangjing2@vip.163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30371361、30527001）；
四川省卫生厅应用基础研究资助项目（编号：110210）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20161215.1133.022.html（2016-12-15）

急性心肌梗死由于舒张期心肌顺应性降低等原因有 15%~20%的患者存在肺瘀血或肺毛细血管楔压增高。心肌舒张期被动生物力学特性简称心肌顺应性。心肌被动舒张能力降低，心室充盈明显下降，回心血量不足，从而导致心脏收缩功能降低[1-2]。那么，评估和深刻认识急性心肌梗死舒张心肌生物力学特性对改善心脏舒张功能和心肌梗死预后有重要临床意义。既往通过离体试验检测心肌力学特性，随后有创监测左室压力-容积曲线，检测左室单位时间压力变化等研究心室顺应性改变的技术得到发展[3-4]，然而这些技术应用复杂且难以在活体精确定量检测心肌黏弹性组分，对局部缺血心肌力学特性也无法评估。

本项目组之前的心肌弹性检测[5]和高频超声消融导管研制[6-7]，为在活体应用印压方法检测舒张心肌黏弹性属性提供了技术条件和方法。印压导管顶端有液体球囊和实时压力传感器，导管中有超声探头。印压导管触压样品时，印压力和样品形变可被同时获取用以研究其力学属性。本研究构建急性心肌梗死犬模型，利用介入超声印压检测系统（intervention ultrasound indentation system，IUIS）以介入微创模式进行梗死心肌被动力学属性检测研究，同时通过病理检测探讨引起其黏弹性改变的部分影响因素。

1 材料与方法

1.1 舒张心肌黏弹性生物力学模型构建

心肌作为生物组织，具有黏弹性属性，弹性属性是指组织像刚性材料一样在力的作用下形变立即发生。黏性属性是指生物组织具有某些流体属性，在力的作用下形变逐渐发生，直到达到某一稳态，又称为蠕变。心肌的被动力学属性可被分解为弹性组分和黏性组分，线性三参量黏弹性模型（图 1）是能够有效表征心肌被动力学属性的方法[8-9]，故本实验采用该模型拟合蠕变试验数据。

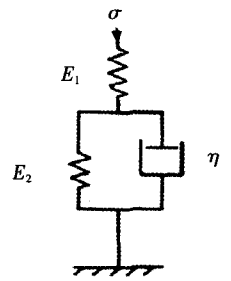


图 1 线性黏弹性模型

Fig.1 Linear viscoelastic model

对于上述模型，E_1、E_2 分别表征即刻形变需克服弹性阻力和持续形变需克服弹性阻力，η 为黏性阻尼系数（单位：Pa·s）。在一定应力（σ）下形变（ε）与时间（t）的关系可用以下方程表示为：

$$\varepsilon=\frac{\sigma}{E_\infty}\left(1-\exp\left(-\frac{E_2}{\eta}t\right)\right)+\varepsilon_0\exp\left(-\frac{E_2}{\eta}t\right)$$

$$E_\infty=\frac{E_1E_2}{E_1+E_2}$$

其中，E_∞ 表征心肌弹性杨氏模量，η 反映持续形变需克服的黏性阻力大小，$\tau=\frac{\eta}{E_2}$，为延滞时间常数，反映心肌形变对时间的依赖程度，τ 增加表明舒张期单位心肌形变需要更多时间[10]。

1.2 介入超声印压检测系统

介入超声印压检测系统（IUIS）头端装载有微型超声换能器，可检测心肌形变，同时集成压力传感器能检测作用于心肌应力，并将心电信号整合进系统内，加上精确时间分辨率，能满足心肌组织应力-应变-时间关系检测需求，从而用于舒张心肌黏弹性检测[10]，如图 2、图 3 所示。

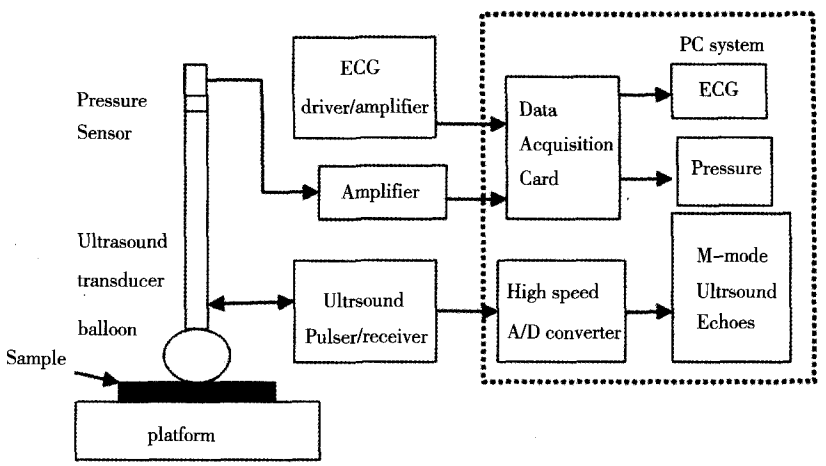


图 2 IUIS 结构示意图

Fig.2 Schematic diagram of IUIS

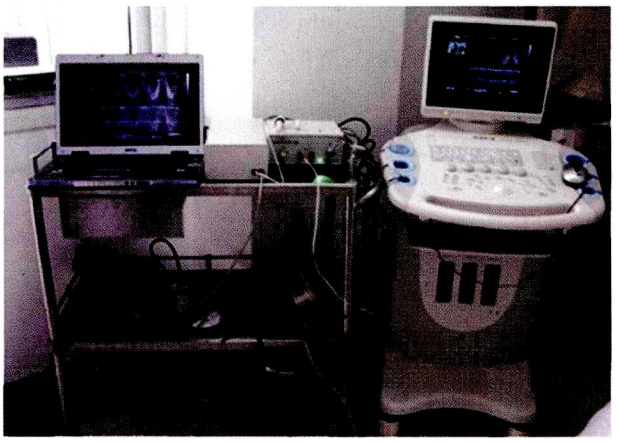


图 3 IUIS 主机系统

Fig.3 IUIS host system

1.3 研究对象

健康成年杂种犬 6 只（由重庆医科大学动物中心提供），雌雄不拘，平均体质量（12.00 ± 2.30）kg。

1.4 急性心肌梗死舒张心肌黏弹性检测

通过颈动脉或股动脉路径将超声导管放入左心室，前端球囊保持 1 atm，使其充盈。保持导管头部与左室前壁垂直，可心脏超声协助定位。系统检测到左室内心肌形变-心电-压力图，然后施加一定印压力，并检测心肌厚度随时间改变，将所得图像储存以供分析。检测完毕行胸骨正中切口，制作心包吊床，于左冠脉前降支上、中交界处以带线缝针缝扎，制作急性心肌梗死模型。在梗死后 1 h 和 3 h 分别进行上述检测。根据获得的一定应力下随时间发生改变心肌形变数值代入上述模型蠕变方程可获得黏弹性各组分参数值。

1.5 微管蛋白和结蛋白免疫组化检测

在检测完毕后处死实验犬，据心脏超声定位分别将 6 只犬正常（Normal 组）和梗死区心肌（AMI 组）标本 6 份进行微管和结蛋白免疫组化检测。主要试剂：SP-9002 Histostain™-Plus Kits（美国 ZYMED 公司）。主要设备：光学显微镜、组织切片机（重庆医科大学基础研究学院免疫组化室提供）。检测按照实验试剂盒的方法和步骤进行。

1.6 统计分析

应用 SPSS 22.0 软件，所得数据符合正态分布，两组间比较采用 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 LSD-t 检验。采用 Pearson 线性相关分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 AMI 前后黏弹性参数结果比较

获得蠕变试验数据，制作数据图，以 Microcal Origin 6.0 软件按照上述方程拟合，获得黏弹性参数。AMI 前后心肌黏弹性特征参数结果比较见表 1。

从表中可知，E_∞ 在 AMI 后 1 h、3 h 比 AMI 前增加 23%、33%，E_1 增加更明显，达 34%、131%，E_2 则减少 22%、63%，η 也减少 19%、12%，τ 增加 14%、152%。心肌梗死急性期心肌硬度明显增加，黏性阻力降低。舒张心肌形变需要更长时间，单位时间内心肌形变减少，心肌舒张能力减低，心肌顺应性下降。

2.2 微管蛋白和结蛋白免疫组化检测结果及分析

急性心肌梗死 3 h 后检测完毕，以 10%氯化钾注射处死检测对象，制作标本，分析时切片各取 5 个视野，病理影像图文分析系统（Image-Pro Plus 5.1，重庆医科大学传染病国家重点实验室）进行微管蛋白和结蛋白半定量分析得到积分光密度（IOD）平均值，如图 4~7 所示。Normal 组和 AMI 组结蛋白和微管蛋白 IOD 值比较结果见表 2。

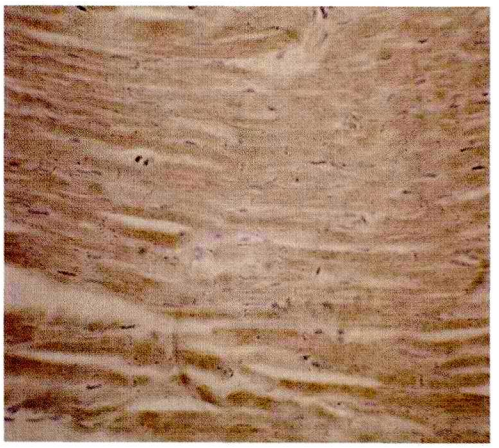


图 4 Normal 组结蛋白分布（LM，400×）

Fig.4 Distribution of desmin in normal group（LM，400×）

表 1 AMI 前后黏弹性特征参数比较

Tab.1 Comparison on viscoelastic parameteres among three groups

参数	NAMI（n=6）	AMI-1（n=6）	AMI-3（n=6）	F 值	P 值
E_∞（kPa）	4.31 ± 0.40	5.30 ± 0.48[a]	5.73 ± 0.32[ad]	19.290	0.000
E_1（kPa）	5.05 ± 0.29	6.78 ± 0.41[a]	11.67 ± 0.39[ac]	523.249	0.000
E_2（kPa）	29.67 ± 0.63	23.07 ± 0.28[a]	10.94 ± 0.64[ac]	1 840.002	0.000
η（Pa·s）	0.74 ± 0.07	0.60 ± 0.04[a]	0.65 ± 0.05[ad]	10.231	0.000
τ（ms）	23.34 ± 0.43	26.50 ± 1.26[b]	58.91 ± 4.52[ac]	314.694	0.000

注：a，与 NAMI 组比较，P<0.05；b：与 NAMI 组比较，P>0.05；c：AMI-1 组与 AMI-3 组比较，P<0.05；d：AMI-1 组与 AMI-3 组比较，P>0.05

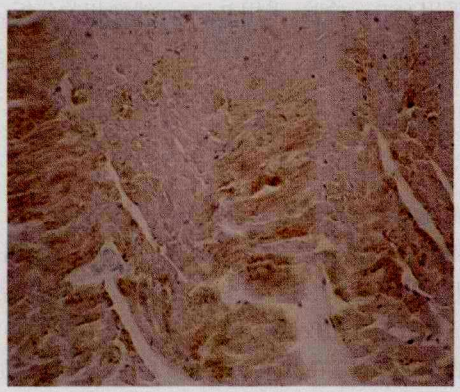


图 5　AMI 组结蛋白分布（LM，400×）

Fig.5　Distribution of desmin in AMI group（LM，400×）



图 6　Normal 组微管蛋白分布（LM，400×）

Fig.6　Distribution of microtubulin in normal group（LM，400×）

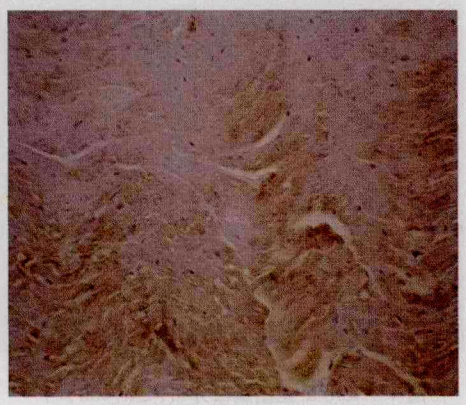


图 7　AMI 组微管蛋白分布（LM，400×）

Fig.7　Distribution of microtubulin in AMI group（LM，400×）

表 2　Normal 和 AMI 结蛋白、微管蛋白 IOD 值比较

Tab.2　Comparison of IOD volume IN desmin and microtubulin in normal and AMI groups

组别	结蛋白（$\times10^3$）	微管蛋白（$\times10^3$）
Normal组（n=6）	330.24 ± 76.56	426.76 ± 45.68
AMI 组（n=6）	93.65 ± 30.32	219.49 ± 76.41
t 值	7.037	5.703
P 值	0.000	0.000

Normal组和 AMI 组结蛋白和微管蛋白 IOD 值比较差异皆有统计学意义（P<0.05），两者在 AMI 后都呈现明显减少。

Normal 组和 AMI 组结蛋白 IOD 和黏弹性参数无相关关系（P>0.05）；微管蛋白 IOD 值与 E_2、τ 相关，r 为 0.882（P<0.05）、−0.868（P<0.05），与 E_1、E_∞、η 无相关（P>0.05）。

3　讨　论

本研究首次以微创模式在活体动物梗死心肌研究局部心肌的黏弹性属性。结果表明，犬急性心肌梗死 3 h 舒张心肌总硬度增加，心肌变得僵硬（钙超载、心肌细胞水肿等多种因素可能影响），黏性阻尼系数减低（心肌正常细胞结构破坏等因素所致），心肌梗死 3 h 心肌发生同样形变对时间的依赖增加明显，故舒张心肌单位时间总的形变减少，表现为顺应性和持续形变能力下降，舒张能力减低，以至于单位时间内回心血量减少，心肌初长度减低，心肌收缩效能相应下降。

AMI 后 3 h，心肌的弹性阻力明显增加，心肌总弹性模量增加约 30%，心肌硬度增加，而黏性阻力却呈现减少，延滞时间常数增加明显。换言之，虽然黏性阻力有一定下降，但不足以抵消弹性阻力增加。同时，在相同应力下蠕变依赖于时间的延长，单位应变需要耗时更多，这可能与心肌细胞的改变和间质水肿、细胞间隙液体渗透有关[11]。当心率较慢时，舒张期延长，黏性阻力的降低可发挥作用；心率较快时，舒张阻力增加显得更为明显。因而，由于急性心肌梗死舒张心肌顺应性下降，心肌舒张能力减低，心率依赖的心脏舒张功能下降更为明显。

研究表明，细胞外基质影响心肌黏弹性主要决定因素是心肌胶原[12]，而心肌胶原溶解往往在心肌梗死发生后几小时[13]，组织水平结构和心肌细胞内成分改变可能引起急性期梗死心肌生物力学变化。有研究证实[14]，在严重心肌缺血导致不可逆损伤前作为维持肌纤维和细胞器完整的微管即出现明显破坏。进一步研究表明[15]，心肌骨架蛋白变化发生在心肌缺血超微结构改变之前。Fuchs 等[16]证实，结蛋白缺乏或功能障碍可导致心肌细胞变性。本项研究显示，急性心肌梗死 3 h 内结蛋白明显减少，与心肌黏弹性没有明显相关。结蛋白减少在急性心肌梗死期并未影响到心肌黏弹性，可能更多是在后期心肌

收缩中起作用。Tagawa 等[17]研究表明，心肌黏性增加与微管高聚合有关。本研究发现，梗死早期梗死区微管明显减少，而与 E_2 呈正相关，与呈负相关，表明微管减少可能导致心肌弹性阻力下降，但心肌黏性阻力下降使得单位心肌形变需要依赖更长时间。

综上，本研究表明在心脏舒张的快速充盈、减慢充盈和左房收缩期，由于心肌硬度增加和单位时间心肌形变下降，回心血量减低，从而表现为心肌被动舒张能力降低，而控制心率、延长心脏舒张期则带来了时间依赖的心肌形变量增加，舒张心肌形变能力改善，从而获得更多的回心血量，进一步改善了心脏收缩功能。急性心肌梗死后如需改善心肌顺应性，以增加心肌舒张时间为目标的治疗将是有益的，这也为急性心肌梗死早期 β 受体阻滞剂治疗降低心率增加心脏舒张期时间，从而为改善心肌舒张能力提供了心肌生物力学特性层面的实验依据。同时以改善心肌黏性、修复心肌细胞内结构损伤为目标的方法和药物，可为改善心肌舒张能力及心脏舒张功能治疗提供新的靶点。然而，活体舒张心肌黏弹性是较为复杂的，受多种因素影响，还需要提高 IUIS 检测精度和时间分辨力，并进行多种病理状态下的随机对照研究，了解心肌生物力学特性。

参 考 文 献

[1] Pulignano G, Sindaco DD, Tavazzi L, et al. Clinical feature and outcomes of elderly outpatients with heart failure followed up in hosipital cardiology units: data from a large nationwide cardiology database[J]. Am Heart J, 2002, 143(1): 45-55.

[2] Kumada T, Karliner JS, Pouleur H, et al. Effects of coronary occlusion on early ventricular diastolic events in conscious dogs[J]. Am J Physiol, 1979, 237(5): H542-H549.

[3] Mirsky I, Parmley WW. Assessment of passive elastic stiffness for isolated heart muscle and the intact heart[J]. Circ Res, 1973, 33(2): 233-243.

[4] Hess OM, Grimm J, Krayenbuehl HP. Diastolic simple elastic and viscoelastic properties of the left ventricle in man[J]. Circulation, 1979, 59(6): 1178-1187.

[5] 苟怀宇，黄 晶，张春晓，等. 正常和肥厚兔离体心肌僵硬度的比较[J]. 重庆医科大学学报，2005，30(2)：173-177.

[6] 董 军，罗开良，黄 晶，等. 超声导管心室肌消融的实验研究[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2000，14(3)：195-198.

[7] 黄 晶，王志刚，李增高，等. 高频超声导管消融活体犬心肌的实验研究[J]. 中国超声医学杂志，1999，5(6)：407-409.

[8] 冯元桢. 生物力学[M]. 北京：科学出版社，1983：57.

[9] Katsnelson LB, Sulman T, Solovyova O, et al. Role of myocardial viscoelasticity in disturbances of electrical and mechanical activity in calcium overloaded cardiomyocytes: mathematical modeling[J]. J Theor Biol, 2011, 272(1): 83-95.

[10] 李进嵩. 舒张心肌粘弹性特性检测和分析研究[J]. 重庆：重庆医科大学博士学位论文，2007.

[11] Tsaturyan AK, Izacov VJ, Zhelamsky SV, et al. Extracellular fluid filtration as the reason for the viscoelastic behaviour of the passive myocardium[J]. J Biomech, 1984, 17(10): 749-755.

[12] Stroud JD, Baicu CF, Barnes MA, et al. Viscoelastic properties of pressure overload hypertrophied myocardium: effect of serine protease treatment[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(6): H2324-H2335.

[13] Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network[J]. J Am Coll Cardiol, 1989, 13(7): 1637-1652.

[14] Iwai K, Hori M, Kurihara H, et al. Disruption of microtubules as an early sign of irreversible ischemia injury: immunohistochemical study of in situ canine hearts[J]. Circ Res, 1990, 67(3): 694-706.

[15] Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995, 110(1): 89-98.

[16] Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease[J]. Science, 1998, 279(5350): 514-519.

[17] Tagawa H, Wang N, Narishige T, et al. Cytoskeletal mechanics in pressure-overload cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 1997, 80(2): 281-289.

（责任编辑：冉明会）