DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.006
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
1230 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)14-1230-03

不同逆灌方法对兔离体心脏心肌细胞膜脂流动性及膜功能的影响

李福平[1],肖颖彬[1],高凌云[2] (第三军医大学附属新桥医院:[1]心血管外科,[2]心血管内科,重庆 400037)

提 要:目的 本实验探讨兔离体心脏经冠状静脉窦不同逆灌方法对心肌细胞膜脂流动性及膜功能的影响。方法 健康成年家兔32只,体质量3.0~3.5 kg,随机分为4组:A组(常温氧合血逆灌心脏不停跳),B组(温血心脏麻痹液持续逆灌),C组(冷血心脏麻痹液持续逆灌),D组(冷晶体麻痹液持续逆灌)。兔离体心脏顺灌左心做功20 min,持续逆灌60 min,左心做功60 min。比较各组心肌细胞膜脂流动性、心肌细胞膜丙二醛(MDA)含量、心肌细胞膜ATP酶活性、心肌细胞内钙离子浓度的变化。结果 逆灌后恢复顺灌左心做功第60分钟B、C、D 3组心肌细胞膜ATP酶活性和心肌细胞膜脂流动性均明显低于A组($P<0.05$),心肌细胞膜MDA含量和心肌细胞内钙离子浓度较A组高($P<0.01$)。B组心肌细胞膜ATP酶活性和心肌细胞膜脂流动性优于C、D组($P<0.01$),B组心肌细胞膜MDA含量和心肌细胞内钙离子浓度明显较C、D组高($P<0.01$),C、D两组间差异不明显。结论 常温氧合血逆灌心脏不停跳在减轻心肌细胞膜自由基损伤,维持膜脂流动性和膜ATP酶功能,减轻细胞内钙超载方面优于心脏麻痹液逆灌停搏,温血逆灌优于冷血和冷晶体液。

关键词:逆灌;心肌细胞膜;膜功能
中图法分类号:R322.1+1;R329.2+7;R654.1 文献标识码:A

Function of myocardial cellular membrane after retrograde sinus coronary perfusion in isolated rabbit hearts

LI Fu-ping, XIAO Ying-bin, GAO Ling-yun (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of retrograde sinus coronary perfusion on the function of myocardial cell membrane following retrograde sinus coronary perfusion. Methods Thirty-two isolated rabbit hearts were randomized into 4 groups: Group A, hearts were kept beating by retrograde perfusion with normothermic oxygenated blood; Group B, hearts received retrograde coronary sinus perfusion with warm blood cardioplegia; Group C, hearts received retrograde coronary sinus perfusion with cold blood cardioplegia; Group D, hearts received retrograde coronary sinus perfusion with cold crystalloid cardioplegia. After 60 min retrograde perfusion, the hearts were switched on Langendorff-Neely antegrade perfused working heart model for other 60 min. Free calcium in myocardial cell, myocardial membrane MDA, ATPase and myocardial cell membrane fluidity were measured. Results After retrograde coronary sinus perfusion, activity of ATPase and fluidity of the myocardial cell membrane in group A were higher than those in groups B, C and D. The contents of myocardial cell membrane MDA and calcium in myocardial cell following retrograde perfusion were much lower in group A than those in groups B and C. There was no remarkable difference between group C and group D. Conclusion Retrograde perfusion of beating heart is superior to those perfused with warm blood cardioplegia in reducing free radical production, ameliorating paradoxical calcium accumulation in myocardial cell and maintaining activity of ATPase and fluidity of the myocardial cell membrane. Warm blood cardioplegia is superior to cold blood cardioplegia.

Key words: retrograde; myocardial membrane; membrane function

生物膜是维持细胞整体性和内环境稳定的主要成分,一旦生物膜遭到破坏,势必导致细胞结构和功能的改变。膜损伤是缺血、缺氧心肌细胞不可逆损伤的早期特征[1]。目前认为,膜损伤在心肌缺血损伤的发生机制中占有重要地位。无论采用何种心肌保护方法,心脏外科手术后心肌细胞功能受到不同程度损害,膜结构改变可能是原因之一。如何减轻心肌细胞膜的损伤是心肌保护的重要课题,本研究观察了不同心脏灌注液逆灌后心肌细胞膜脂流动性、膜酶、膜脂质过氧化

作者简介:李福平(1970-),男,山西省大同市人,硕士,医师,主要从事体外循环心肌保护方面的研究。电话:(023)68774607

收稿日期:2002-05-09;修回日期:2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

产物的变化, 以探讨不同逆灌液对心肌细胞膜的影响。

1　材料与方法

1.1　逆灌模型与实验分组

1.1.1　逆灌装置及灌注液　　参照文献[2]的离体心脏灌注装置组建左心做功装置及冠状静脉窦逆灌装置。左心做功灌注液为改良的 KH 液(PO_2 67~80 kPa, PCO_2 4.7~6.0 kPa)。稀释血灌注液(PO_2 16~26.7 kPa, PCO_2 7~6.0 kPa), 配制方法为兔血与 KH 液按 4∶1 混合, 红细胞压积 20%以上, pH 7.25~7.45, K^+ 4.4 mmol/L, Na^+ 135 mmol/L, Ca^{2+} 1.32 mmol/L。血温调至 34 ℃。稀释血心脏麻痹液(PO_2 16-26.7 kPa, PCO_2 7~6.0 kPa), 配制方法为兔血与 St. Thomas 液按 4∶1 混合, 红细胞压积 20%以上, pH 7.3~7.5, K^+ 15 mmol/L, Na^+ 135 mmol/L, Ca^{2+} 1.8 mmol/L。温血心脏麻痹液血温调至 34 ℃, 冷血心脏麻痹液血温调至 4 ℃。

1.1.2　灌注技术　　兔耳缘静脉麻醉, 静脉肝素化, 开胸取出心脏, 浸入预冷的 KH 液中, 轻柔挤压心脏, 排出心腔内积血, 然后剪开心包膜, 在肺动脉根部剪一小口以利冠脉液流出, 修剪好主动脉断端, 以备插管, 结扎肺门及前、后腔静脉, 剪除多余组织。将主动脉套入主动脉插管上, 固定。先行 Langendorff 灌注, 灌注液为 KH 液, 灌注压为 60 cmH_2O(5.88 kPa)。期间行左房插管和肺动脉插管。心跳平稳后, 关闭 Langendorff 灌注, 开始顺灌左心做功, 前负荷为 17 cmH_2O(1.67 kPa), 后负荷 80 cmH_2O(7.84 kPa)。左房灌注顺灌左心做功 20 min 后, 逆灌管进入右房继而插入静脉窦, 停左室做功开始逆灌, 逆灌压 50 cmH_2O(4.9 kPa), 逆灌流量 3 ml/min。持续逆灌 60 min 后, 拔除逆灌管, 关闭右房切口, 恢复顺灌左心做功 60 min。

1.1.3　实验分组　　实验分为 4 组, 每组 8 枚心脏。于逆灌前顺灌和逆灌后第 60 min 进行各指标测定。

常温氧合血逆灌不停跳组(A 组): 顺灌左心做功 20 min 后, 用 34 ℃的温血稀释液持续逆灌, 使心脏平稳跳动 60 min, 然后恢复顺灌左心做功 60 min。

温血心脏麻痹液逆灌停搏组(B 组): 顺灌左心做功 20 min 后, 诱导停搏, 用 34 ℃的温血心脏麻痹液持续逆灌, 60 min 后复跳左心做功 60 min。

冷血心脏麻痹液逆灌停搏组(C 组): 顺灌左心做功 20 min 后, 诱导停搏, 用 4 ℃的冷血心脏麻痹液持续逆灌, 60 min 后复跳左心做功 60 min。

冷血心脏麻痹液逆灌停搏组(D 组): 顺灌左心做功 20 min 后, 诱导停搏, 用 4 ℃的冷晶体心脏麻痹液持续逆灌, 60 min 后复跳左心做功 60 min。

1.2　研究内容与方法

1.2.1　心肌细胞膜制备　　心肌细胞膜提取采用改良的差速离心法[3], Lowry 法心肌细胞膜悬液蛋白定量。

1.2.2　心肌细胞膜指标检测　　荧光偏振法测定心肌细胞膜脂流动性(Flu)。膜 Na^+-K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase、Mg^{2+}-ATPase 活性测定: 参照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行。单位用 $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$ 表示。

TBA 法进行心肌细胞膜丙二醛(MDA)测定(荧光法), 单位用 nmol/ml 表示。

1.2.3　心肌细胞[Ca^{2+}]i 测定　　分离心肌细胞, 钙敏染料负载法测定心肌细胞内钙离子([Ca^{2+}]i)浓度。单位 nmol/L。

1.3　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析进行统计学处理。

2　结果

2.1　心肌细胞膜脂流动性

B 组心肌细胞膜脂流动性与 A 组无显著性差异($P > 0.05$)。C、D 组膜脂流动性与 A 组相比明显较低($P < 0.01$)。B、C、D 组膜脂流动性呈递减趋势, 见表 1。

表 1　心肌细胞膜脂流动性(Flu)、丙二醛(MDA)含量和心肌细胞内钙离子浓度[Ca^{2+}]i 比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Comparison of fluidity of the myocardial cell membrane(Flu), MDA content and [Ca^{2+}]i concentration($\bar{x} \pm s$)

Group	Flu	MDA(nmol/ml)	[Ca^{2+}]i (nmol/L)
A	30.10±8.33	4.13±1.54	136.55±25.00
B	19.69±5.18	8.63±2.72 *	210.42±10.3 *
C	10.61±1.84 *#	11.92±1.78 *#	250.14±16.38 *#
D	9.70±1.00 *#	15.08±3.39 *#▲	264.33±12.72 *#

*: $P < 0.01$ *vs* A; #: $P < 0.01$ *vs* B; ▲: $P < 0.01$ *vs* C

2.2　心肌细胞膜 ATPase 活性

逆灌后恢复顺灌左心做功第 60 分钟 B 组 Na^+-K^+-ATPase 活性较 A 组低($P < 0.01$)、C 组心肌细胞膜 ATPase 活性明显较 A 组低($P < 0.05$), B 组心肌细胞膜 ATPase 活性明显优于 C 组($P < 0.05$), C 组 Na^+-K^+-ATPase 和 Mg^{2+}-ATPase 活性高于 D 组($P < 0.05$), 见表 2。

表 2　心肌细胞膜 ATP 酶活性($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Activity of myocardial cell membrane ATPase ($\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Na^+-K^+-ATPase	Ca^{2+}-ATPase	Mg^{2+}-ATPase
A	38.20±3.14	8.86±1.37	7.46±1.44
B	28.20±2.42 *	7.83±1.97	6.93±1.40
C	23.81±2.90 *#	6.07±1.25 *#	4.39±0.72 *#
D 组	21.03±1.32 *#▲	6.28±0.80 *#	3.61±0.58 *#▲

*: $P < 0.05$ *vs* A; #: $P < 0.05$ *vs* B; ▲: $P < 0.05$ *vs* C

2.3　心肌细胞膜丙二醛(MDA)含量

B、C、D 组心肌细胞膜丙二醛含量明显较 A 组高($P < 0.01$), B 组心肌细胞膜丙二醛含量明显低于 C 组($P < 0.01$), C 组低于 D 组($P < 0.01$), 见表 1。

2.4　心肌细胞内钙离子浓度[Ca^{2+}]i

B、C、D 组心肌细胞内钙离子浓度明显高于 A 组($P < 0.01$)。B 组心肌细胞内钙离子浓度较 C 组低($P < 0.01$), C 组心肌细胞内钙离子浓度较 D 组着别不明显($P > 0.05$), 见表 1。

3　讨论

膜脂流动性是生物膜的重要特性, 膜脂流动性的变化可以从许多方面影响生物膜的功能。作为细胞膜

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

基本骨架的膜脂与膜蛋白关系密切。膜脂对载体介导通道、膜结合酶、受体等都有一定的作用。膜磷脂双层分子不仅是生物膜的基本结构成分，而且是结合于膜上的各种酶功能活动的微环境。

膜脂流动性、膜 ATP 酶活性、膜脂质过氧化水平以及钙离子内流是影响心肌功能的重要因素。当心肌细胞膜脂质过氧化增强时，过氧化产物（MDA 等）增多，心肌细胞膜的蛋白与脂质过氧化产物 MDA 交联，使膜流动性下降，膜流动性与膜上内源性 PLA2 呈负相关，即膜的硬化可激活内源性 PLA2，从而对膜产生损伤。心肌细胞膜流动性降低时，膜上 ATP 酶活性降低，钙离子通道的脂质微环境改变，膜通透性增加，钙离子内流增多，排出障碍，影响心肌细胞功能[4]。可见，有效地维持心肌细胞膜功能是心肌保护的目的之一。现有的几种经冠状静脉窦逆灌方法均有心肌保护作用。近年来，有人应用温血逆灌，使心脏跳动中进行心内直视手术，获得了满意的临床效果[5,6]。

在本实验中，尽管冷血心脏麻痹液逆灌使逆灌后的心肌细胞膜 MDA 生成量低于冷晶体心脏麻痹液逆灌，然而在保护心肌细胞膜脂流动性、维持膜 ATP 酶活性和降低细胞内钙超载方面不优于冷晶体组。与冷血心脏麻痹液逆灌组相比，温血心脏麻痹液逆灌后的心肌细胞膜 MDA 含量较低，膜脂流动性和膜 ATP 酶活性得到较好的保护，细胞内钙超载较轻。说明温血心脏麻痹液逆灌在保护心肌细胞膜功能上优于冷血。我们在研究中还发现，不停跳组逆灌后心肌细胞膜脂质过氧化产物 MDA 含量明显低于停跳组，膜酶活性、膜脂流动性高于停跳组，心肌细胞内钙离子浓度低于停跳组。说明离体兔心温血逆灌心脏不停跳对心肌细胞膜的保护优于温血停跳。

参考文献：

[1] 张友云，董传仁，汪长华，等. 大豆磷脂脂质体对培养的缺血心肌细胞膜损伤保护作用的电镜观察[J]. 解剖学报，1995，26(1)：77－80.

[2] 李 靖，肖家思. 小哺乳动物心脏顺行性离体灌流技术[J]. 第三军医大学学报，1990，12(5)：424－426.

[3] Hall N C，Carney J M，Chen M S，*et al*. Ischemia/reperfusion-induced changes in membrane proteins and lipids of gerbil cortical synaptosomes[J]. Neuroscience，1995，64(1)：81－89.

[4] 李福平，肖颖彬，高凌云，等. 逆行灌注心脏不停跳心肌保护的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1208－1210.

[5] 肖颖彬，陈 林，王学锋，等. 浅低温体外循环心脏跳动中心内直视手术1 032例临床分析[J]. 第三军医大学学报，2001，23(5)：502－504.

[6] 陈 林，肖颖彬，王学锋，等. 先天性心脏病心脏停跳与不停跳心内直视手术的临床分析[J]. 第三军医大学学报，2000，22(11)：1056－1058.

（编辑 薛国文）

（上接1226页）

稳的情况，因麻药致死率达21%，因此增加了教学成本。而且猪的呼吸道短直，分泌物也少，麻醉起效后呼吸道较为通畅，容易管理。猪的耳静脉分布以耳中央一条静脉为主干，耳两边耳缘各有两条分支静脉，其耳静脉穿刺可选择余地比兔耳静脉大。

要提高小型猪麻醉成功率还必须注意以下几个方面：①猪脂肪组织多，用药量大。全麻药进入脑组织除取决于脑/血分布系数外，在更大程度上受到脂肪组织多少的影响，戊巴比妥钠稳定的血药浓度只有在脂肪组织饱和后才能达到，需要较长时间[1]。戊巴比妥钠脂溶性高，用于猪麻醉，由于猪皮下脂肪较厚，部分麻药进入脂肪组织，用量大，起效晚，维持时间长。3%戊巴比妥钠静脉注射，犬用量1 ml/kg，而猪要1 3 ml/kg，本组有3例因麻醉过深死亡，是因用药量掌握不当，未考虑其部分麻药进入脂肪组织，起效慢的特点。②猪的用药量与是否进食有关。猪极贪食，常是给多少吃多少，吃量一般为体质量的2%～3%[2]。对于进食前的猪，3%巴比妥钠的用量为1.3 ml/kg，但对于进食后的猪，考虑到猪此时体质量有进食量的成分，用药量降为1 ml/kg，若是忽略进食量引起的误差，则极易造成麻醉过深而导致动物死亡。③麻药注射速度影响猪麻醉效果。因戊巴比妥钠对呼吸有抑制作用，且抑制过程不但与剂量有关，而且与推药速度有关，注射速度越快，呼吸抑制、停止的发生率越高[3]，3%戊巴比妥钠静脉注射速度一般为5 ml/min。本组有1例在10 ml/min内推完，猪的呼吸由＜30次/min减慢至潮式呼吸，最后呼吸停止。④总剂量严格掌握。遵循麻醉"宜浅勿深"的原则[4]，戊巴比妥钠是一类中效催眠药，由于猪脂肪组织多，稳定的血药浓度必须等脂肪组织饱和后才能达到，所以麻醉起效有一段时间。这个过程表现为浅麻醉，中麻醉和深麻醉。当猪表现为呼吸不规则、心率快、眼球向内下方、肌肉紧张、流涎、分泌物增多时，即进入浅麻醉，继续注射3%戊巴比妥钠3～5 ml，让猪麻醉进入中麻醉期，其表现为腹肌松弛，内脏牵拉收缩反射消失，是手术的最佳时间。补充药量多少的原则是要看手术多少时间内完成来决定[5]。在手术的最后40 min内不宜作静脉注射补充麻药，宜从腹腔静脉注射麻药，便于动物及早清醒，防止猪麻醉进入深麻醉状态昏迷而死亡。

关键词：小型猪；麻醉；手术学教学
中图法分类号：R614 文献标识码：B

参考文献：

[1] 江明性. 药理学[M]. 第3版. 北京：人民卫生出版社，1989. 103－105.

[2] 魏 泓. 医学实验动物学[M]. 成都：四川科学技术出版社，1998. 211－213.

[3] 刘秋菊，董为人，王元占，等. 实验动物麻醉期的呼吸障碍及处理[J]. 实验动物科学与管理，1995，12(3)：42－44.

[4] 叶惠贞，李斯明，陆瑞意. 戊巴比妥钠与利多卡因在实验兔麻醉中的应用[J]. 广州医药，2000，31(1)：50－51.

[5] 施新猷. 医学实验动物学[M]. 西安：陕西科学技术出版社，1989. 421－434.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net