DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.023

兔缺血再灌注心肌总钙、氧自由基和中性粒细胞浸润的变化规律

司良毅 张远慧 赵 学 王国超 (第三军医大学西南医院心血管内科) 630038

提 要 兔缺血心肌中Ca^{2+}、丙二醛(MDA)和中性粒细胞(PMN)浸润数在心肌缺血期即明显增加,再灌注时增高更显著。Ca^{2+}升高于再灌注0.5 h达峰值,MDA于再灌注1.5 h达峰值,而PMN浸润则于再灌注6 h仍未下降。提示上述三种致损因素对再灌注损伤的作用高峰时间是不同的,它们不但参与心肌再灌注性损伤,也参与了缺血性损伤。

关键词 再灌注损伤;钙超载*;游离基类;超氧化物歧化酶类;嗜中性白细胞

中图法分类号 R541.2

心肌缺血再灌注损伤(RI)的机制仍未阐明,目前多认为其发生与心肌钙超载,氧自由基(OFR)产生和中性粒细胞(PMN)浸润有关[1~3]。既往的实验多为单一致伤因素与RI关系之间的研究,缺少多因素多时相的动态观察。本实验利用兔急性心肌缺血模型同步动态观察了心肌缺血再灌注时心肌钙、丙二醛(MDA)、超氧化歧化酶(SOD)及PMN浸润数的变化规律,以探讨心肌RI的发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验分组及动物模型制作

实验家兔30只,体重2.0~2.5 kg,雌雄不拘,随机分为心肌缺血再灌注组和假手术对照组;缺血再灌组分设缺血0.5 h,再灌注0.5 h、1.5 h和6 h 4个时相点,对照组只设再灌注6 h时相点作总体对照。兔心肌缺血再灌注模型参照Simpson[4]方法加以改进;静注戊巴比妥钠25 mg/kg麻醉后,于胸骨左缘第3~6肋骨处开胸暴露冠状动脉,于左前降支起点0.5 cm处穿线环绕动脉,将线的两端均从一长约4~5 cm的硅胶管孔中穿出,收紧结扎线以造成心肌缺血,放松后即行再灌注。以收紧结扎线后心电图Ⅰ或左前胸导联出现S-T段上抬、T波高耸,放松结扎线后抬高的S-T段下降1/2以上为模型成功。于各相应时相点活杀动物取心脏,从结扎水平起每3 mm环切心肌为A、B、C片分别于各片心肌缺血边缘区取组织以测定各项指标。

1.2 指标测定

(1)心肌钙含量测定参照张英民[5]方法,将A片组织100 mg用浓硝酸2 ml消化24 h,离心3 000 rpm×10 min,取上清液0.1 ml加适量1%$LaCl_3$稀释后用IL-951型原子吸收分光光度计测定Ca^{2+}浓度。(2)心肌SOD和MDA测定:取缺血心肌组织200 mg,制作组织匀浆并行蛋白定量。SOD测定参照Oyanagui[6]方法进行;MDA用硫代巴比妥酸比色法进行测定。(3)心肌PMN测定:参照Bradley[7]方法进行。取C片心肌组织100 mg,用0.5% HTAB液制作匀浆,然后用UR-200P型超声细胞粉碎仪粉碎亚细胞成份,0~4℃ 40 000 g离心15 min,取上清液0.1 ml,用分光光度计于460 nm处测定髓过氧化物酶(MPO)含量,并利用每个PMN中含MPO量是固定的这一特性,从而计算出心肌中PMN的数量。测定试剂:O-dianisidine,HTAB为Sigma产品;SOD、MDA测定试剂盒由南京铁道医学院病生教研室提供,其它试剂均为分析纯级。数据资料以$\bar{x} \pm s$表示,用单因素方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 缺血再灌注时心肌Ca^{2+}变化规律

本实验所观察6 h中,缺血半小时心肌Ca^{2+}即明显增加,再灌注后增加更显著,于再灌0.5 h达峰值,持续至1.5 h后渐降。各时相点与对照组比较,$P<0.01$;再灌注后各组Ca^{2+}含量与缺血组比较,$P<0.05\sim0.01$(图1)。

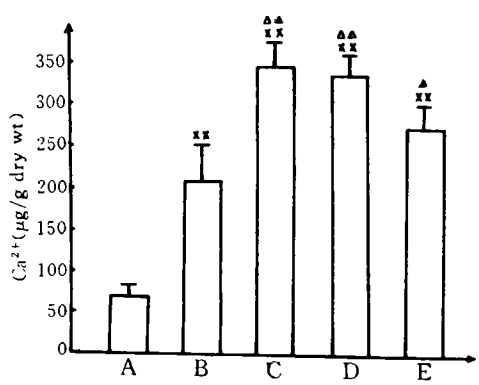


图1 缺血再灌注心肌Ca^{2+}的变化

Fig 1 Changes of myocardial Ca^{2+} content in the global ischemic and reperfused rabbit heart. $n=5\sim7$, $\bar{x} \pm s$, $\times\times P<0.01$ *vs* control (A); $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ *vs* ischemia 0.5 h (B); C. D. E=reperfusion 0.5 h, 1.5 h, and 6 h.

2.2 心肌SOD活性变化规律

缺血0.5 h心肌SOD活性明显下降,再灌注后这种下降更显著,至再灌注1.5 h达最低点,以后有所回升。各时相点与对照组比较$P<0.01$,再灌注各时相点与缺血组比较$P<0.05\sim$

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

0.01(图2)。

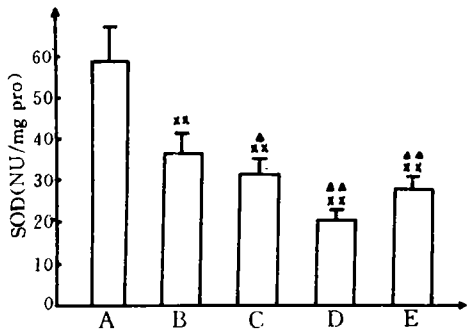


图2　缺血再灌注时心肌 SOD 活性变化

Fig 2　Changes of myocardial SOD activity in the global ischemic and reperfused rabbit heart. $n=5\sim7$, $\bar{x}\pm s$, $\times\times P<0.01$ *vs* control (A); $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ *vs* ischemia 0.5 h (B); C. D. E=reperfusion 0.5 h, 1.5 h, and 6 h.

2.3　心肌 MDA 含量变化规律

与心肌 SOD 变化相反，MDA 于缺血后即进行性增高，至再灌注1.5 h 达峰值，以后渐降，与对照组 MDA 含量相比，$P<0.01$，再灌注各组与缺血组相比较 $P<0.05\sim0.01$(图3)。

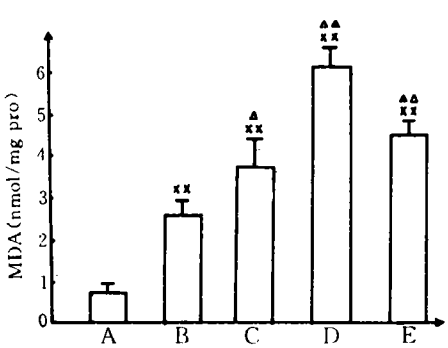


图3　缺血再灌注时心肌 MDA 含量变化

Fig 3　Changes of myocardial MDA production in the global ischemic and reperfused rabbit heart. $n=5\sim7$, $\bar{x}\pm s$, $\times\times P<0.01$ *vs* control (A); $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ *vs* ischemia 0.5 h (B); C. D. E=reperfusion 0.5 h, 1.5 h, and 6 h.

2.4　心肌 PMN 浸润数变化规律

心肌 PMN 数随缺血及再灌注时间的推移而呈进行性增高，至再灌注6h仍未见下降趋势，各组与对照组比较$P<0.01$；再灌注各组与缺血组比较 $P<0.01$(图4)。

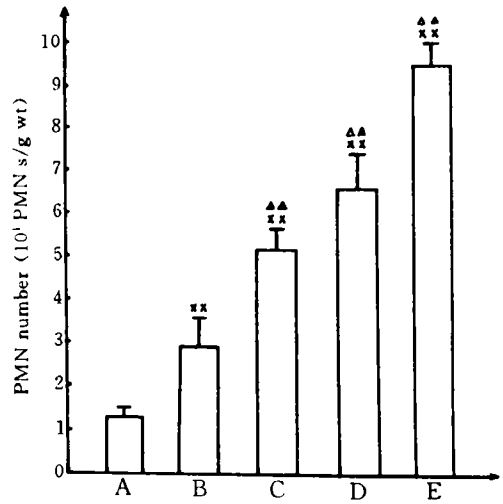


图4　缺血再灌注时心肌 PMN 浸润数变化

Fig 4　Changes of myocardial infiltration of PMN in the global ischemic and reperfused rabbit heart. $n=5\sim7$, $\bar{x}\pm s$, $\times\times P<0.01$ *vs* control (A); $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ *vs* ischemia 0.5 h (B); C. D. E=reperfusion 0.5 h, 1.5 h, and 6 h.

3　讨论

本实验显示心肌缺血后，心肌 Ca^{2+}，脂质过氧化代谢产物 MDA 和 PMN 浸润数均明显增加，而 OFR 的内源性清除剂 SOD 活性则明显下降；当心肌再灌后，这种改变更显著。提示心肌细胞 Ca^{2+} 超载、OFR 产生和 PMN 浸润不但共同参与了心肌 RI，而且也参与了心肌缺血性损伤。这点近来已被一些学者所关注[1,8,9]。既往的实验多认为 Ca^{2+} 超载、OFR 产生和 PMN 浸润是 RI 的特异性致伤因素；而本实验结果提示这些致伤因素其实在心肌缺血期就已开始对心肌细胞起损伤作用，当再灌注后因血液和氧的重新进入缺血组织，使这些致伤因子数量急剧增加，致使细胞损害明显加重。故我们认为再灌注损伤的始动因素是于缺血期就开始产生的；可能心肌 RI 是缺血性损伤在特定环境和阶段的延续和扩展；预防性治疗在缺血期有显效而再灌注后给予治疗则效果不佳也支持这一推断。

本实验所观察6 h 中发现缺血再灌注时虽然心肌 Ca^{2+}、MDA 和 PMN 数均明显增加，但各自的高峰时间不同；Ca^{2+} 超载最早，OFR 次之，而 PMN 最晚，于再灌注6 h 仍未见下降趋势，说明三者的致伤作用时间是不同的，心肌 RI 可能是一种不同时间内多因素共同作用所致的复合损伤。

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

参考文献

1 Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. Am J CLin Nutr, 1991, 53: 215S

2 Ambrosio G, Chiariello M. Myocardial reperfusion injury: mechanisms and management: a review. Am J Med, 1991, 91(suppl 3c): 86S

3 Dreyer WJ, Michael LH, West MS, et al. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. Circulation, 1991, 84: 400

4 Simpson PJ, Fantone JC, Mickelson JK, et al. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. Circ Res, 1988, 63: 1070

5 张英民，赵德化，盛宝恒. 尼可地尔对缺血再灌注心肌线粒体功能的保护作用. 药学学报, 1991, 26(2): 144

6 Oyanagjui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxides dismutase activity. Anal Biochem, 1984, 142: 290

7 Bradley PP, Priebat DA. Christensen RD, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol, 1982, 78: 206

8 Nayler WG. Calcium, calcium antagonism, atherosclerosis, and ischemia. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 19(suppl 2): S17

9 罗武生，郭兆贵，汤显良. 猪缺血心肌嗜中性白细胞浸润及维拉帕米的保护作用. 中国药理学报, 1990, 11(5): 435

(收稿：1994-02-03；修回：1994-11-16)

Canges of myocardial calcium, oxygen free radicales and neutrophil infliration of ischemic and reperfused heart in rabbits

Si Liangyi, Zhang Yuanhui, Zhao Xue, Wang Guochao (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The content of myocardial calcium (Ca^{++}) and malodialdehyde (MDA) and the density of neutrophil infiltration were increased in the ischemic period of the heart and became more severe in the reperfusion period. The content of Ca^{++} and MDA reached the peak in the first half hour to 1.5 hours after reperfusion but neutrophil infiltration was increased gradually and no decrease was observed even in the 6th hour after reperfusion. These findings suggest that the damages of the myocardium resulting from the 3 harmful factors occur in different time intervals after reperfusion and they can injure the myocardium not only in the ischemic period but also in the reperfusion period.

Key words reperfusion injury; calcium overloading ; free radicals; superoxide dismutase; neutrophils;

(上接 23 页)

因不一样，其 P^{53} 基因249位密码子突变率也不一样。主要病因为HBV的我国西北地区肝癌，该位点的突变率极低(2.2%)[16]，受同样病因作用的日本肝癌 P^{53} 基因的突变分散于基因序列高度保守区，而无突变热点所在[7]。本实验病例均来自西南地区，以往的实验表明该地区肝癌的发生多与 HBV 和 HCV 感染有关，尚无 AFB_1 的资料。本实验发现20%的原发性肝细胞癌 P^{53} 基因249位密码子突变，较 AFB_1 高污染区的西北地区明显增高。形成该特点的原因是否与西南地区肝癌受 HBV，HCV 和 AFB_1 双重因素的作用有关，尚需进一步扩大研究的样本量和对 AFB_1 在西南地区污染的流行病学调查。

关键词 肝肿瘤；肿瘤基因；突变

中图法分类号 R394

参考文献

1 王俊茹，刘为纹，吕有勇，等. 胃癌及癌旁组织中 P^{53} 基因和 RB 基因的研究. 第三军医大学学报, 1993, 15(3): 198～202

2 Harris AL. Mutant P^{53} —— the commonest genetic abnormality in human cancer. J Pathol, 1990, 162: 5～6

3 Hsu IC, Metealf RA, Sun T, et al. Mutational hot spot in the P^{53} gene in human hepatocellular carcinoma. Nature, 1991, 350: 427～428

4 Breshac B, Kem M, Wands J, et al. Selective G to T mutation of P^{53} gene in hepatocellular carcinoma. Nature, 1991, 350: 429～431

5 Aguilar F, Stephen L, Brown T, et al. Aflatoxin B_1 induces the transversion of G to T in codon 249 of the P^{53} tumour suppressor gene in human hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 8586～8590

6 朱明华，王文亮. 肿瘤抑制基因 P^{53} 突变与原发性肝癌的关系. 中华肿瘤杂志, 1993, 15(4): 245～247

7 Nishiba N, Fukuba Y, Kokuryu H, et al. Role and mutation hetergeneity of the P^{53} gene in primary hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 1993, 53: 368～372

(收稿：1994-04-01)；修回：1994-10-05)

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