

## • 基础研究 •

# 不同时期无创肢体缺血预适应对急性心肌梗死大鼠的保护作用

洪小剑 寇俊杰 傅世英 李为民 王旭红 武英彪 梁克纪

**〔摘要〕** 目的: 探讨急性心肌梗死前、再灌注前及再灌注时等不同时期, 无创性肢体缺血预适应在减轻大鼠缺血/再灌注损伤中的作用。方法: 所有大鼠随机分为 4 组( 每组 10 只): 心肌缺血/再灌注损伤组(A 组)、急性心肌梗死前肢体缺血预适应组(B 组)、再灌注前肢体缺血预适应组(C 组) 和再灌注初期肢体缺血预适应组(D 组)。观察各组心电图、心肌缺血范围(AAR)、心肌梗死范围(IA)、心肌梗死部位质量与左心室质量(LV) 的比值(IA/LV)、梗死范围与缺血范围的比值(IA/AAR)、CK-MB 值。结果: 与 A 组相比, B、C、D 3 组 ST 段抬高幅度、CK-MB 值、IA/LV 和 IA/AAR 比值均显著降低( $P < 0.01$ )。结论: 无创性肢体缺血预适应在急性心肌梗死前、再灌注前及再灌注时的各个时期应用, 都能明显降低大鼠心肌缺血/再灌注时的 ST 段抬高幅度, 明显降低心肌酶水平, 明显缩小心肌坏死面积。

**〔关键词〕** 心肌梗死; 缺血/再灌注损伤; 缺血预适应; 远程缺血预适应

**〔中图分类号〕** R54 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1007-5062(2012)01-076-03

**Protection of noninvasive limb ischemic preconditioning in different time windows of acute myocardial infarction Rats** HONG Xiaojian, KOU Junjie, FU Shiyong, LI Weimin, WANG Xuhong, WU Yingbiao, LIANG Keji. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

**〔Abstract〕 Objective:** To observe the protective effects of noninvasive limb ischemic conditioning on the myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in different time windows of acute myocardial infarction (AMI) rats. **Methods:** All wistar rats were randomly divided into four groups ( $n = 10$  in each group): (1) Myocardial ischemia/reperfusion group (group A), limb ischemic preconditioning before AMI group (group B), limb ischemic preconditioning before reperfusion group (group C), limb ischemic preconditioning during reperfusion group (group D). We recorded the ST-segment during AMI and reperfusion, and measured myocardial area at risk (AAR), myocardial infarcted area (IA), IA/LV, IA/AAR, MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB) after 3 h of reperfusion. **Result:** The elevation of ST-segment is decreased and IA, IA/AAR, CK-MB are significantly less in group B, C and D as compared to group A ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The noninvasive limb ischemic conditioning in different time windows of AMI rats can prevent myocardial ischemia-reperfusion injury.

**〔Key words〕** Myocardial infarction; Ischemia/Reperfusion injury; Ischemic preconditioning; Remote ischemic preconditioning

急性心肌梗死及其后的血管开通过程, 可导致心肌细胞超微结构、功能、代谢及电生理方面发生损伤, 即缺血/再灌注损伤。目前临床对心肌缺血/再灌注损伤的保护方法都是外源性的, 如增加心肌氧气和能量供应、优化心肌氧气的利用及减少心脏能量消耗, 但每一种方法均有其不足和不良反应。研究发现, 缺血预适应是重要的缺血/再灌注损伤内源性保护机

制, 其实质是提高了心肌细胞对继发缺血损伤的耐受性<sup>[1]</sup>。特别近年来无创性肢体远程缺血预适应及缺血后适应的发现和深入研究, 为上述这些强大的内源性保护机制在临床上的开发利用, 提供了大量的理论依据。不过, 目前还不明确无创性肢体缺血处理在急性心肌梗死前、再灌注前及再灌注时的哪个时期应用, 能最大程度地减轻大鼠缺血/再灌注损伤。

## 资料与方法

动物 雄性健康 Wistar 大鼠 40 只, 体质量 200 ~

基金项目: 黑龙江省教育厅科技研究项目( 编号: 10543023)

作者单位: 150001 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第一医院 心内六科

通信作者: 寇俊杰, E-mail: heitudi0451@sohu.com

300g 由哈尔滨医科大学第一附属医院实验动物中心提供及饲养 随机分为 A、B、C、D 4 组(每组 10 只)。

试剂 Evans blue( Sigma ),红四氮唑( TTC) 染色剂(上海化学试剂公司),肌酸激酶同工酶试剂盒、PBS 缓冲液、10% 水合氯醛(北京中杉金桥生物技术公司)。

设备 小动物呼吸机(江西实验器械厂)、多功能电生理仪(华南医电公司)、超低温高速离心机( BACKMAN COULTER)、电热恒温振荡水浴箱(上海一恒科技公司)、心脏彩超机( GE 公司)、-20℃ 冰箱(新飞电器)、电子分析天平( METTLER TOLEDO)。

模型制备 A 组:大鼠以 10% 水合氯醛按 0.3 g/kg 的剂量腹腔注射麻醉后,连接肢体导联心电图,气管切开并呼吸机辅助呼吸(潮气量 1 mL,呼吸频率 90 次/min)。在左锁骨中线作纵形切口(约 3cm)再逐层分离胸肌至肋间肌。将左侧第 3、4 肋间的肋间肌切开(约 2 cm),以小型开胸器暴露胸腔。避开肺脏,切开心包,暴露心脏,休息 20 min。在心脏冠状动脉左前降支中、上 1/3 交界处以丝线结扎 60 min,之后松开丝线使冠状动脉开通至 180 min。B 组:从麻醉到暴露心脏、冠状动脉的结扎和再过程同 A 组,但在冠状动脉结扎前以橡皮筋捆绑大鼠左后肢根部,至超声示左膈动脉血流消失持续 5 min,再松开 5 min,如此捆绑/松开共 2 次。C 组:除将上述后肢缺血处理在再灌注前 20 min 施行外,余同 B 组。D 组:除将上述后肢缺血处理在再灌注初期 20 min 施行外,余同 B 组。

心电图 ST 段抬高程度 分别在心肌梗死前、心肌梗死 30 min、心肌梗死 60 min、再灌注 30 min、再灌注 1 h、再灌注 2 h 及再灌注 3 h 测心电图 ST 段抬高程度。

CK-MB 再灌注后,穿刺右心室,取血 1.5 mL,凝固,离心,取血清检 CK-MB 值。

心肌梗死面积的测量 右心室取血后,再次结扎冠状动脉左前降支,摘取心脏(主动脉留 0.5 cm 以上),以 0.9% 氯化钠液冲洗心脏,再以 2 mL 注射器抽取 0.5% Evans blue 染色剂,从主动脉逆行灌注心脏,非缺血部位将染成蓝色,缺血部位不染色。用 0.9% 氯化钠液冲洗干净,将其放入 -20℃ 冰箱中冷冻 20 min 至心脏组织僵硬。垂直心脏长轴方向切片,每片厚约 1 mm。剔取左心室,滤纸干燥,电子天平称重测左心室质量(LV)。再剔取左心室缺血部位( area at risk, AAR) 秤质量,并计算缺血部位

质量占左心室质量的百分比( AAR / LV)。将左心室缺血部位切片放入 1% TTC 中 37℃ 水浴 30 min,非梗死部位将呈深红色,梗死部位( infarcted area, IA) 则苍白色,剔取梗死区域的心肌,滤纸干燥后再秤质量,并计算梗死部位质量占左心室质量的百分比( IA / LV),最后计算梗死范围质量与缺血范围质量的百分比( IA/AAR)。

统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件分析。计量数据以均数 ± 标准差表示,多组间均数比较用方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结果

1. 心电图 ST 段抬高幅度 4 组大鼠心肌梗死前心电图 ST 段抬高幅度无明显差别(表 1)。与 A 组相比, B、C、D 3 组心肌梗死时, ST 段抬高幅度较低( P < 0.01); 其中 B 组幅度最低,其次是 C 组,但 BCD 3 组之间的差异无统计学意义。与 A 组相比, B、C、D 3 组再灌注时 ST 段回落较快( P < 0.01); 其中 B 组最快,其次是 C 组,但 BCD 3 组之间的差异无统计学意义。

表 1 各组大鼠心电图 ST 段抬高幅度( mV,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 心肌梗死前 | 心肌梗死 30 min | 心肌梗死 60 min | 再灌注 30 min | 再灌注 1 h | 再灌注 2 h | 再灌注 3 h |
|-----|-------|-------------|-------------|------------|---------|---------|---------|
| A 组 | 0.02  | 0.87        | 0.86        | 0.78       | 0.61    | 0.34    | 0.05    |
| B 组 | 0.03  | 0.51*       | 0.62*       | 0.43*      | 0.12*   | 0.05*   | 0.03    |
| C 组 | 0.03  | 0.64*       | 0.67*       | 0.51*      | 0.24*   | 0.07*   | 0.03    |
| D 组 | 0.02  | 0.67*       | 0.69*       | 0.55*      | 0.29*   | 0.08*   | 0.03    |

注:与 A 组相比, \* P < 0.01

2. CK-MB 与 A 组相比, B、C、D 3 组 CK-MB 明显降低( P < 0.01, 图 1)。其中 B 组最低,其次是 C 组,但 BCD 3 组之间差异无统计学意义。

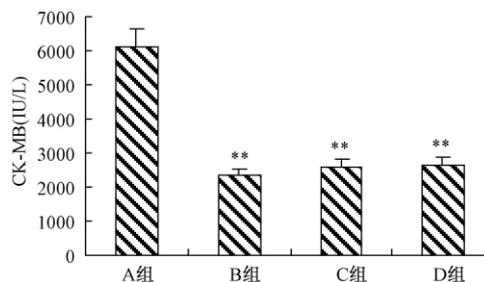


图 1 各实验组 CK-MB 水平

注:与 A 组相比, \*\* P < 0.01

3. 心肌梗死范围 4 组大鼠之间缺血部位质量与左心室质量之比( AAR/LV) 差异无统计学意义(表 2)。与 A 组相比, B、C、D 3 组的 IA/LV 和 IA/AAR 比值明显降低( P < 0.01), 其中 B 组最小,其

次是 C 组,但 BCD 3 组之间差异无统计学意义。

表 2 各组心肌梗死范围指标( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | AAR/LV(%)   | IA/LV(%)    | IA/AAR(%)   |
|----|-------------|-------------|-------------|
| A  | 52.3 ± 11.7 | 37.5 ± 10.4 | 71.7 ± 17.8 |
| B  | 53.1 ± 12.3 | 11.8 ± 5.7* | 22.2 ± 7.5* |
| C  | 50.8 ± 12.6 | 12.5 ± 5.3* | 24.6 ± 7.7* |
| D  | 52.1 ± 10.8 | 12.9 ± 6.1* | 24.8 ± 6.9* |

注:与 A 组相比,\* $P < 0.01$

## 讨论

急性心肌梗死后,常会出现心力衰竭(心衰)、心律失常、心脏破裂及猝死等情况而危及生命<sup>[2,3]</sup>。随着溶栓、经皮穿刺冠状动脉成形术及支架植入术、冠状动脉旁路移植术等技术的发展,目前急性心肌梗死的血管再通率已有很大提高,但是闭塞血管再通时,也常出现恶性心律失常、冠状动脉无复流或慢血流、心肌顿抑、加重心肌坏死面积、甚至导致死亡等再灌注损伤。因此,如何有效减少急性心肌梗死坏死面积及冠状动脉开通前后心肌的缺血/再灌注损伤,一直以来都是医学界的重点课题。

1986 年, Murry 等<sup>[1]</sup>发现缺血预适应可以使心肌梗死后心肌坏死面积减少 75%,从而开辟了保护缺血/再灌注损伤的新纪元。研究还发现,缺血预适应会产生 2 个保护窗:一个是早期保护窗,其在预适应后即刻产生保护作用,能持续 3 h 左右;另一个是晚期保护窗,在预适应 24 h 后出现,能持续达 72 h 左右<sup>[4]</sup>。然而,尽管其后多年的研究证明,这些局部缺血预适应是一种强大的内源性保护机制<sup>[5]</sup>,但是由于这些方法操作复杂、有创、及耗时等缺点而在临床上的应用受到限制。远程缺血预适应<sup>[6-7]</sup>和远程缺血后适应的发现<sup>[8]</sup>为缺血适应方法在临床上的应用奠定了基础。不过,目前仍需比较无创性肢体缺血处理在急性心肌梗死前、再灌注前或再灌注时减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤的效果。

本实验证实:无创性肢体缺血适应,在急性心肌梗死前、再灌注前及再灌注时的各个时期应用,都能明显降低大鼠心肌缺血/再灌注时的 ST 段抬高幅度、明显降低心肌酶水平、明显缩小心肌坏死面积。由于急性心肌梗死前应用缺血适应的保护作用能覆盖心肌梗死和再灌注的各个阶段,所以效果最好,提

示无创性肢体缺血处理越早应用效果越好。其产生保护作用的机制目前尚未有定论,可能是通过诱导触发因子(如内源性腺苷)释放,经多条细胞内信号转导途径(如蛋白激酶 C)的介导,作用于多种效应器(如线粒体 ATP 敏感性钾通道)而发挥心肌细胞保护作用<sup>[9-12]</sup>。

## 参考文献

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74: 1124-1136.
- [2] 吴小滢, 周玉杰, 李艳芳, 等. 急性心肌梗死并发心脏破裂 30 例临床分析. *心肺血管病杂志*, 2011, 30: 277-279.
- [3] 祖晓磷, 刘晶晶, 朱小玲, 等. 601 例急性心肌梗死患者冠状动脉病变特点. *心肺血管病杂志*, 2011, 30: 152-154.
- [4] Kharbanda RK. Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury. *Heart*, 2010, 96: 1179-1186.
- [5] Magill P, Murphy T, Bouchier-Hayes DJ, et al. Preconditioning and its clinical potential. *Ir J Med Sci*, 2009, 178: 129-134.
- [6] Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 1993, 87: 893-899.
- [7] Bötter HE, Kharbanda R, Schmidt MR, et al. Remote ischemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*, 2010, 375: 727-734.
- [8] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285: H579-588.
- [9] Saxena P, Newman MA, Shehatha JS, et al. Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms, and clinical application. *J Card Surg*, 2010, 25: 127-134.
- [10] Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Rho-rho kinase pathway is involved in the protective effect of early ischemic preconditioning in the rat heart. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34: 156-159.
- [11] 殷忠, 高好考, 王海昌, 等. 老年大鼠心肌缺血再灌注损伤的缺血后处理保护. *心肺血管病杂志*, 2011, 30: 58-66.
- [12] 李淑娟, 吴艳娜, 康毅, 等. 无创性肢体缺血预适应对大鼠心肌缺血/再灌注损伤后心肌凋亡的影响. *中国药理学通报*, 2009, 25: 100-104.

(2011-05-16 收稿)