

·基础研究·

低氧习服对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的影响

龙超良 尹昭云 汪海

【摘要】 目的 研究急性低氧和间断低氧习服对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的影响。方法 经间断低氧习服(模拟海拔3000 m, 5000 m低氧2周, 每天4 h, 最后8000 m低氧4 h)和急性低氧(模拟海拔8000 m低氧4 h)的大鼠, 麻醉后开胸, 迅速取出心脏, 观察其离体心脏缺血/再灌注损伤情况。结果 离体心脏缺血/再灌注时的心率在第3 min时最低, 以后逐渐恢复, 低氧习服组和急性低氧组的心率可恢复至缺血前水平, 显著高于常氧对照组。反映心脏收缩功能的指标左心室收缩压(LVSP)和 $+dp/dt_{\max}$ 及反映心脏舒张功能的指标 $-dp/dt_{\max}$ 在复灌的第3~5 min时降至最低, 心脏功能损伤较重, 以后逐渐恢复。其中低氧习服组大鼠离体心脏的LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 和 $-dp/dt_{\max}$ 显著高于常氧对照组和急性低氧组。冠脉流出液中的肌酸磷酸激酶(CPK)亦在缺血/再灌注后显著升高, 且有不断升高的趋势, 低氧习服组的CPK含量显著低于常氧对照组和急性低氧组。结论 低氧习服可减轻大鼠离体心脏的缺血/再灌注损伤。

【关键词】 低氧; 低氧习服; 缺血再灌注; 肌酸磷酸激酶

Effects of hypoxic acclimatization on ischemia/reperfusion injury in isolated working hearts of rats

LONG Chaoliang, YIN Zhaoyun, WANG Hai

Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 Objective To study the effects of acute hypoxia and intermittent hypoxic acclimatization(HA) on ischemia/reperfusion(I/R) injury in isolated working hearts of rats. Methods The contractive and diastolic functions of isolated working hearts during ischemia and reperfusion were investigated in rats after intermittent hypoxic acclimatization(HA) (3000 m and 5000 m, 2 weeks respectively, 4 h/d) and in normoxic rats(NXR) exposed to hypoxia (8000 m) for 4 h(AHR). Results The heart rates(HR) of isolated working hearts were reduced to the minimum at the third minute after reperfusion and restored gradually later. The HR of acute hypoxic rats(AHR) and HA rats could be restored to the levels before ischemia and were higher than that of NXR significantly. Generally, the parameters of cardiac contracting function LVSP and $+dp/dt_{\max}$ and parameter of diastolic function $-dp/dt_{\max}$ were reduced to the minimum at the third or fifth minute after reperfusion and restored gradually later. The LVSP, $+dp/dt_{\max}$ and $-dp/dt_{\max}$ of isolated working hearts derived from HA rats were higher than those of NXR and AHR. The activity of creatine phosphokinase (CPK) in coronary effluent was increased significantly after ischemia/reperfusion and had the gradual increasing tendency. The activity of CPK in HA rats was lower than that in NXR and AHR. Conclusion These results suggest that HA can alleviate the ischemia/reperfusion injury of isolated working hearts.

【Key words】 hypoxia; hypoxic acclimatization; ischemia/reperfusion; CPK

心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)是指遭受缺血而仍可能存活的心肌细胞,因再灌注而诱导的损伤加重,常表现为

心脏射血功能不全,再灌注心律失常等^[1]。1986年Murry等^[2]在犬心实验中首次发现多次短暂缺血和复灌后,心肌可以耐受长时间缺血,梗死面积减少,并据此首先提出了缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)的概念,即预先短暂缺血可减轻后续长期缺血所造成的心肌损伤,增强心肌对较长时间缺血/再灌注损伤的耐受性或适应性。作为机体内源性保护现象,预处理不仅存在于完整器官的缺血/再灌注过程,也存在于离体细胞的缺氧/复氧过程^[3,4]。近几年来,研究发现不同种类的动物如家

收稿日期:2003-05-06

基金项目:国家自然科学基金重点项目(N039730190);全军医药卫生科研基金课题(01Z025)

作者单位:100850北京市,军事医学科学院毒物药物研究所(龙超良、汪海);300050天津市,军事医学科学院卫生学环境医学研究所(尹昭云)

作者简介:龙超良,男,1972年10月生,湖南省湘乡市人,医学博士,副研究员

通讯作者:汪海, Tel:86-10-66932651

兔、大鼠、狗、猪、甚至人体上均存在着这种现象,IP的提出为缺血心肌的保护及其机制探讨开辟了崭新的领域。一些研究者用不同的预处理方法,在不同种属的动物上,从整体到离体器官及细胞水平进行了广泛深入的研究,但IP的机制目前仍未完全阐明。整体动物急性低氧和低氧习服之后,对于其离体心脏的缺血/再灌注损伤有何影响,未见文献报道。为此,本实验研究了急性低氧和低氧习服对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 低氧动物模型制备 21只雄性Wistar大鼠,体重250~300g,由军事医学科学院实验动物中心提供。动物随机分为3组,常氧对照组($n=7$),呼吸室内空气;急性低氧组($n=7$),动物置于低压氧舱内,模拟海拔8000m高度低氧4h;间断低氧习服组($n=7$),其低氧方式为:首先将动物置于模拟海拔3000m高度的低压氧舱内,每天4h,持续14d,再置于模拟海拔5000m高度,每天4h,持续14d,最后与急性低氧组动物一同置于模拟海拔8000m高度低氧4h。

1.2 离体心脏缺血/再灌注损伤实验^[5] 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉,固定在手术台上,迅速开胸,由下腔静脉注入肝素(500 U/kg)抗凝,剪开心包作主动脉和左心房插管,结扎两侧肺根部,然后取出心脏置于37℃的恒温灌流装置,先逆灌平衡15 min(灌速7 ml/min,用蠕动泵控制流速),随后改为工作心脏。前负荷为1.2 kPa,后负荷为6.9 kPa,平衡15 min,等各项指标达稳态后开始实验。连接换能器的小导管经主动脉插管插入左心室,用SMUP-PC软件记录各心功能指标,用电磁流量计记录ABF。灌流液条件(mmol/L):NaCl 117, KCl 5.4, NaHCO₃ 25, NaH₂PO₄·2H₂O 0.92, MgSO₄·7H₂O 0.80, CaCl₂ 2.2, 葡萄糖 11, EDTA 0.5, 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,维持pH值在7.4±0.2。全心停灌25 min(37℃下心脏旷置),接着复灌30 min,记录停灌前和再灌3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min时各心功能指标。

1.3 冠脉流出液中肌酸磷酸激酶活性的测定 肌酸磷酸激酶(creatine phosphokinase, CPK)试剂盒,购自北京中生生物工程高科技公司。按试剂盒说明操作,在ISP-II型半自动生化仪(荷兰VITAL SCIENTIFIC公司)上测定。

1.4 数据处理 实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用ANOVA方差分析。

2 结果

2.1 低氧习服对大鼠离体心脏缺血/再灌前后心率的影响 如表1所示,缺血/再灌前正常对照组、急性低氧组和低氧习服组大鼠离体心脏的心率接近,无明显差别。缺血/再灌后,与缺血前相比,正常对照组离体心脏的心率在复灌第3 min降至最低,第5 min有所恢复,但仍显著低于缺血前水平;急性低氧组和低氧习服组大鼠离体心脏心率亦在复灌的第3 min降至最低,第5 min基本恢复至缺血前水平。与常氧对照组相比,急性低氧组大鼠离体心脏心率在复灌后5~30 min均显著增高($P<0.01$);低氧习服组在再灌注的整个过程中心率均显著高于常氧对照组。

2.2 低氧习服对大鼠离体心脏缺血/再灌前后收缩功能的影响 如表2和表3所示,常氧对照组大鼠离体心脏缺血/再灌前后左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)有增加趋势,但无显著性差别, $+dp/dt_{\max}$ 在复灌的第3 min时,较缺血前有下降趋势,第5 min时即恢复,以后随着复灌时间的延长, $+dp/dt_{\max}$ 有上升趋势。急性低氧组大鼠离体心脏LVSP和 $+dp/dt_{\max}$ 在复灌的第3和第5 min较缺血前显著降低,到第10~15 min时,基本恢复到缺血前水平。低氧习服组大鼠离体心脏缺血前, LVSP和 $+dp/dt_{\max}$ 显著高于常氧对照组和急性低氧组,再灌注后, LVSP和 $+dp/dt_{\max}$ 在第5 min时达最低点,与缺血前相比有显著差别($P<0.05$),以后随复灌时间的延长逐渐恢复。整个再灌注过程,低氧习服组LVSP和 $+dp/dt_{\max}$ 均显著高于常氧对照组和急性低氧组。

2.3 低氧习服对大鼠离体心脏缺血/再灌前后舒张功能的影响 表4所示,常氧对照组大鼠离体工作心脏 $-dp/dt_{\max}$ 在复灌的第3和5 min时有下降趋势,以后逐渐恢复至缺血前水平。急性低氧组大鼠的 $-dp/dt_{\max}$ 在复灌的第3和5 min显著低于缺血前水平($P<0.05$),到第10 min时基本恢复至缺血前水平,且随着时间的延长, $-dp/dt_{\max}$ 有上升的趋势。低氧习服组大鼠离体心脏的 $-dp/dt_{\max}$ 在缺血前显著高于常氧对照组和急性低氧组($P<0.01$, $P<0.05$),在复灌的第3 min开始下降,到第5 min时降至最低,显著低于缺血前水平($P<0.01$),随着复灌时间的延长, $-dp/dt_{\max}$ 逐渐恢复,到第15 min时基本恢复至缺血前水平。在整个缺血/再灌过程前后,低氧习服组 $-dp/dt_{\max}$ 显著高于常氧对照组和

急性低氧组。

2.4 低氧习服对大鼠离体心脏缺血/再灌前后冠脉流出液中肌酸磷酸激酶活性的影响 如表5所示,常氧对照组、急性低氧组和低氧习服组大鼠离体心脏缺血前冠脉流出液中CPK的活性无显著差别。缺血/再灌注后,三组大鼠离体心脏冠脉流出液中CPK的活性均较缺血前显著增高,且随着复灌时间

的延长,有不断上升的趋势。急性低氧组复灌各时间点上,冠脉流出液中CPK的活性与相同条件下的常氧对照组相比差别不显著;而低氧习服组在复灌第3,5,10,15,20,25,30 min时冠脉流出液中CPK的活性,显著低于相同时间点的急性低氧组和常氧对照组的冠脉流出液中的CPK活性。

表1 三组大鼠离体心脏缺血/再灌前后心率的变化

组别	缺血前心率 (次/min)	缺血/再灌后心率(次/min)						
		3	5	10	15	20	25	30(min)
常氧对照组	166±8	90±18*	128±9*	127±7**	127±9**	125±9*	118±11**	120±9**
急性低氧组	208±27	136±25*	185±16**	201±16**	208±19**	195±11**	203±16**	199±13**
低氧习服组	194±15	146±14**	192±21**	190±18**	178±22	181±23*	193±19**	184±23*

注:与缺血前相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与常氧对照组相比* $P<0.05$,** $P<0.01$

表2 三组大鼠离体心脏缺血/再灌前后LVSP的变化

组别	缺血前LVSP (kPa)	缺血/再灌后LVSP(kPa)						
		3	5	10	15	20	25	30(min)
常氧对照组	12.6±0.8	13.4±0.8	13.6±0.6	14.0±0.9	14.3±0.9	14.5±1.0	14.8±0.9	14.9±0.9
急性低氧组	14.2±1.0	11.5±0.8*	12.2±0.8	13.7±1.0	14.1±0.8	14.7±1.0	14.7±0.9	14.8±0.9
低氧习服组	16.4±0.8** [△]	17.7±1.0** ^{△△}	15.2±0.8* [△]	15.8±1.1	16.8±1.0	17.4±1.0	16.8±0.9	17.2±1.0

注:与缺血前相比,* $P<0.05$;与常氧对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与急性低氧组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

表3 三组大鼠离体心脏缺血/再灌前后+dp/dt_{max}的变化

组别	缺血前+dp/ dt _{max} (kPa/s)	缺血/再灌后+dp/dt _{max} (kPa/s)						
		3	5	10	15	20	25	30(min)
常氧对照组	206±22	182±39	217±24	227±26	239±28	244±28	247±26	249±27
急性低氧组	222±29	120±26*	148±19*	211±26	227±19	244±19	249±18	250±16
低氧习服组	297±17** [△]	328±32** ^{△△}	256±14* ^{△△}	280±25	304±29 [△]	328±30** [△]	318±28	325±27 [△]

注:与缺血前相比,* $P<0.05$;与常氧对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与急性低氧组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

表4 三组大鼠离体心脏缺血/再灌前后-dp/dt_{max}的变化

组别	缺血前-dp/ dt _{max} (kPa/s)	缺血/再灌后-dp/dt _{max} (kPa/s)						
		3	5	10	15	20	25	30(min)
常氧对照组	110±15	91±23	93±13	106±15	117±18	126±20	133±21	134±21
急性低氧组	133±21	76±22*	73±15*	125±26	141±23	161±23	168±20	171±20
低氧习服组	179±19** [△]	150±24 [△]	128±10** [△]	157±19	190±19*	218±20**	208±16*	216±20*

注:与缺血前相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与常氧对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与急性低氧组相比,[△] $P<0.05$

表5 三组大鼠离体心脏缺血/再灌前后冠脉流出液中CPK活性的变化

组 别	缺血前 CPK (U/ml)	缺血/再灌后 CPK(U/ml)							
		1	3	5	10	15	20	25	30(min)
常氧对照组	9.2±2.5	21.8±2.9▲	27.8±5.3▲	35.2±4.1▲	54.8±5.3▲	60.5±7.0▲	70.2±6.0▲	76.0±5.5▲	86.5±6.7▲
急性低氧组	12.3±3.4	25.8±5.4▲	26.5±6.4▲	42.3±11.1▲	55.5±7.3▲	64.7±12.2▲	72.2±7.6▲	76.3±5.0▲	92.7±6.5▲
低氧习服组	10.8±5.2	24.5±6.0▲	18.5±4.5* #△	22.7±10.2* #△△	34.0±5.1▲* #△△	49.3±7.2▲* #△	60.2±5.7▲* #△	64.7±4.3▲* #△△	64.0±16.2▲* #△△

注:与缺血前相比,* $P<0.05$,[▲] $P<0.01$;与常氧对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与急性低氧组相比,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

3 讨论

以往的研究工作表明,大鼠经低氧习服后,可以减轻严重低氧引起的心功能损伤^[6,7]。但整体动物急性低氧和低氧习服之后,对于其离体工作心脏的缺血/再灌注损伤有何影响,未见文献报道。缺血预处理的观念一经提出,即成为研究缺血心肌的保护作用及其机制探讨的热点^[3]。低氧习服是否会类似于缺血预处理,对心脏的缺血/再灌注损伤起保护作用。在此前提下,本研究比较了急性低氧和低氧习服对大鼠离体工作心脏缺血/再灌注前后功能的影响。

本研究结果表明,离体心脏缺血/再灌注时,心功能一般在复灌的第3和第5 min时损伤最重,以后逐渐恢复,这与文献报道的结果基本一致^[8]。在缺血前及整个再灌注过程中,低氧习服组大鼠离体工作心脏的心率均显著高于常氧对照组;反映心脏收缩功能的指标LVSP和 $+dp/dt_{\max}$ 显著高于常氧对照组和急性低氧组;反映心脏舒张功能的指标 $-dp/dt_{\max}$ 也显著高于相同实验条件下的常氧对照组和急性低氧组。提示整体动物在3000 m和5000 m各2周的间断性阶梯低氧习服后,可以减轻离体工作心脏缺血/再灌注的损伤,低氧习服起到了类似于缺血预处理的作用。

缺血/再灌注对离体工作心脏的功能损伤及低氧习服的保护作用还可通过测定冠脉流出液中的某些生化指标如CPK水平来反映^[9]。CPK为一种存在于细胞内的蛋白酶,当细胞坏死、损伤时,CPK可以从细胞内释放出来。因而冠脉流出液中CPK含量可以作为反映心肌损伤坏死程度的指标^[10]。本研究结果表明,离体心脏经缺血/再灌注后,冠脉流出液中CPK的活性均较缺血前显著增高,且随着复灌时间的延长有不断上升的趋势。其原因可能是心肌细胞随着复灌时间的延长,损伤逐渐加重,故CPK含量逐渐升高^[11]。低氧习服组冠脉流出液中CPK含量显著低于相同条件下的常氧对照组和急性低氧组,提示低氧习服可显著减轻缺血/再灌注对离体工

作心脏心肌细胞的损伤程度。

参考文献

- 1 Granville DJ, Tashakkor B, Takeuchi C, et al. Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 1321-1326.
- 2 Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74: 1124-1136.
- 3 Muscari C, Bonafe F, Gamberini C, et al. Early preconditioning prevents the loss of endothelial nitric oxide synthase and enhances its activity in the ischemic/reperfused rat heart. *Life Sci*, 2004, 74: 1127-1137.
- 4 Eguchi M, Fujiwara M, Mizukami Y, et al. Cytoprotection by pro-vitamin C against ischemic injuries in perfused rat heart together with differential activation of MAP kinase family. *J Cell Biochem*, 2003, 89: 863-867.
- 5 龙超良,汪海,肖文彬.吡那地尔对老年自发性高血压大鼠心血管作用的特征. *中国应用生理学杂志*, 1996, 12: 336-339.
- 6 龙超良,周智,尹昭云,等.急性缺氧对大鼠心功能的影响. *航天医学与医学工程*, 1999, 12: 267-269.
- 7 龙超良,尹昭云,汪海.低氧习服对大鼠心肌总蛋白、丙二醛和一氧化氮含量的影响. *航天医学与医学工程*, 2004, 17: 114-116.
- 8 Margreiter J, Mittermayr M, Mair J, et al. Influence of antithrombin on ischemia/reperfusion injury in the isolated blood-free perfused rat heart. *Thromb Res*, 2002, 108: 249-255.
- 9 Mullenheim J, Molojavsky A, Preckel B, et al. Thiopentone does not block ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Can J Anaesth*, 2001, 48: 784-789.
- 10 Di Napoli P, Antonio Taccardi A, Grilli A, et al. Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an *ex vivo* study in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res*, 2001, 51: 283-293.
- 11 Sharma A, Singh M. Protein kinase C activation and cardioprotective effect of preconditioning with oxidative stress in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem*, 2001, 219: 1-6.