

高氧液预处理对兔心肌缺血再灌注损伤的影响*

徐瑞芬¹ 张国良¹ 徐浩¹ 徐礼鲜¹ 冯旭阳^{2△}

(1 第四军医大学口腔医院麻醉科 陕西 西安 710032 2 西京医院心脏内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究高氧液预处理对兔心肌缺血再灌注损伤的影响。方法 雄性新西兰白兔 32 只,随机分为 4 组 (n=8), 结扎 - 开放冠状动脉左前降支 (LAD) 建立心肌缺血再灌注模型。假手术组 (Sham 组) 只穿线环绕 LAD 不结扎, 吸氧组 (OX 组) 结扎前 30 min 经鼻吸纯氧 2L/min, 在结扎 LAD 前 30 min 分别静脉注射 HO 10 ml/kg (HO₁ 组)、20 ml/kg (HO₂ 组)。于结扎 LAD 前即刻 (T₀, 基础值)、开放 LAD 前即刻 (T₁)、再灌注 60 min (T₂) 及再灌注 120 min (T₃) 时记录 HR 和 MAP, 于 T₃ 时抽取动脉血样 3 ml, 测定血清肌酸激酶 (CK)、肌钙蛋白 I (cTNI) 的活性和 IL-6 和 TNF- α 的浓度, 并测定心肌梗死范围。结果 1/S 组与 T₀ 时比较, T₁₋₃ 时各组 HR、MAP 进行性下降 (P<0.05); 三组间 HR、MAP 比较差异无统计学意义 (P>0.05)。与 Sham 组比较, 1/S 组血清 CK、cTNI、IL-6 和 TNF- α 含量明显升高 (P<0.01); 与 OX 组比较, HO₂ 组上述酶及炎症因子浓度显著下降 (P<0.01), 心肌梗死范围减小 (P<0.05)。结论 高氧液预处理可减轻兔心肌缺血再灌注损伤, 机制可能与其抑制炎症反应有关。

关键词 高氧液; 心肌; 缺血预处理; 再灌注损伤

中图分类号 Q95-3, R54 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 01-23-04

Protective Effects of Hyperoxia Solution Preconditioning on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits*

XU Rui-fen, ZHANG Guo-liang, XU Hao, XU Li-xian, FENG Xu-yang[△]

(Department of Anesthesiology, College of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of hyperoxia solution preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in rabbits. **Methods:** Thirty-two adult male rabbits weighing 2-3 kg were randomly divided into 4 groups (n=8 each): sham operation (group S), myocardial (I/R) (group OX), group HO₁, HO₂ (received hyperoxia solution 10, 20 ml/kg respectively at 30 min before myocardial ischemia). Myocardial I/R was produced by temporary ligation of anterior descending branch of left coronary artery (LAD) for 30 min followed by 120 min reperfusion. Myocardial ischemia was confirmed by S-T segment elevation and change in color of myocardium. HR and BP were monitored and recorded immediately before ligation of LAD (T₀), immediately before LAD ligation was untied (T₁), 60 (T₂) and 120 (T₃) min after LAD was untied. Blood samples were obtained at T₃ for determination of serum CK, cTNI, IL-6 and TNF- α concentration. **Results:** In group OX, HO₁, HO₂, HR and MAP decreased during T₁₋₃ (P<0.05), but there was no significant difference among the 3 groups. In I/R group, the s CK, cTNI, IL-6 and TNF- α were significantly higher than that in Sham group (P<0.01); The above parameters in group HO₂ were significantly lower and the infarct size was significantly smaller than that in group OX. **Conclusion:** Hyperoxia solution preconditioning can attenuate myocardial I/R injury by inhibiting inflammatory response.

Key words: Hyperoxia solution; Myocardium; Ischemic preconditioning; Reperfusion injury

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-23-04

前言

对急性心肌梗死早期心肌再灌注可挽救濒死心肌, 但再灌注本身也会造成心肌细胞损伤, 即缺血再灌注损伤^[1-3]。缺血再灌注时心肌的保护是目前心血管领域研究的热点, 其病理生理过程复杂, 氧自由基、钙超载、粒细胞浸润等都可能参与。氧自由基通过脂质过氧化反应, 破坏生物膜结构, 包括细胞膜及具有膜结构的线粒体、内质网、溶酶体系统。为了减轻缺血再灌注损伤, 人们进行了很多尝试, 包括短暂缺血、药物、热应激等的预处理, 但目前尚无有效的药物和治疗方法。本课题组以往

的动物实验表明, 高氧液 (hyperoxia solution, HO) 对小肠、脊髓、脑等缺血再灌注损伤有良好的保护作用^[4]。本研究拟评价高氧液预处理对兔心肌缺血再灌注损伤的影响, 为临床应用提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性新西兰白兔由第四军医大学动物实验中心提供, 高氧液用西安高氧医疗设备有限公司研制的高氧医用液体治疗仪制备。血清肌酸激酶 (CK) 试剂盒、肌钙蛋白 I (cTNI) 的活性

* 基金项目 陕西省自然科学基金 (2009JM4023) 陕西省社发攻关项目 (2010k16-04-05) 国家自然科学基金 (81000597) 和 (81070248)

作者简介 徐瑞芬 (1975), 女, 博士研究生。研究方向 高氧液的应用研究。Email: xurufen@gmail.com

△ 通讯作者 冯旭阳, 主治医师, 医学博士。研究方向 冠心病的预防和治疗。Email: fengxuyang001@gmail.com

(收稿日期 2011-06-09 接受日期: 2011-07-03)

和 IL-6 和 TNF-α 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。伊文氏蓝、2,3,5- 三苯基四氮唑购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 健康成年雄性新西兰白兔 32 只, 体重 2~3 kg,随机分为 4 组 (n=8),假手术组 (Sham 组) 只穿线环绕冠状动脉左前降支 (LAD) 不结扎 吸氧组 (OX 组) 结扎前 30 min 经鼻吸纯氧 2L/min 不同剂量 HO 组在结扎 LAD 前 30 min 分别静脉注射 HO10 ml / kg(HO₁ 组)、20 ml / kg(HO₂ 组)。

1.2.2 HO 的制备 以 500ml 生理盐水为基液, 氧气瓶为气源, 以 3 L/min 氧流量通过连接管道输入高氧医用液体治疗仪, 氧气经过反应室输出端通入基液进行溶氧活化处理, 经 15min 溶氧后制备成 HO。

1.2.3 心肌缺血再灌注模型的制备 术前禁食 12 h, 静脉注射 20 % 乌拉坦 1g / kg 麻醉后固定于手术台。气管切开后插管, 连接 TKR-200C 型小动物呼吸机 (江西特力麻醉呼吸设备公司) 行机械通气。经左颈动脉切开置管至左心室, 右股动脉切开置管, 采用 BL-410 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司) 监测血液动力学。双前肢及右后肢接心电图 (ECG) 电极, 监测 II 导联 ECG。开胸后剪开心包暴露心脏, 在 LAD 发出分支上方, 用无创小圆针经 LAD 下方的心肌表层穿线包绕。待心脏恢复规律跳到后 15 min 时, 静脉注射肝素 400U / kg。穿线结扎 LAD 造成心肌缺血 30 min 后松开结扎线, 再灌注 120 min。左室前壁发绀并向外膨出, ECG 示 ST 段抬高即为成功结扎 LAD 的标准^[5]。

1.2.4 血液动力学指标的测定 于结扎 LAD 前即刻 (T₀, 基础

值)、开放 LAD 前即刻 (T₁)、再灌注 60 min (T₂) 及再灌注 120 min (T₃) 时记录 HR 和 MAP。

1.2.5 心肌酶活性和炎症因子的测定 于 T₃ 时抽取动脉血样 3 ml, 分离血清, 放入 -70℃ 冰箱保存。测定血清肌酸激酶 (CK)、肌钙蛋白 I (cTNI) 的活性和 IL-6 和 TNF-α 的浓度。

1.2.6 心肌梗死范围的测定 T₃ 时再次阻断左冠状动脉前降支, 左颈静脉注射 1 % 伊文氏蓝 3 ml 染色, 取出心脏, PBS 冲洗心腔至流出液变清, 分离出左心室 (LV), 并称重, 蓝染部分为有血供区, 未染色部分为缺血区 (AAR)。速冻后将心脏横断面切成 2 mm 厚切片, 置于 37℃ 1 % 2,3,5- 三苯基四氮唑中染色 20 min, 然后置于 4℃ 10 % 甲醛溶液中固定过夜, 仔细分离出蓝色区、砖红色区和白色区并分别称重 (砖红色区为未梗死心肌, 白色区为梗死心肌)。以 AAR 质量占 IJV 质量的百分比 (AAR / LV) 表示缺血区范围, 以梗死区 (IS) 质量占 AAR 质量的百分比 (IS / AAR) 表示心肌梗死范围。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行分析, 计量资料以均数 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内比较采用重复测量数据的方差分析, 组间比较采用单因素方差分析, P<0.05 者为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时间点血液动力学的比较

I/R 各组与 T₀ 时比较, T₁₋₃ 时各组 HR、MAP 呈进行性下降 (P<0.05) 组间比较差异无统计学意义 (P>0.05), 见表 1。

表 1 各组不同时间点血液动力学的比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of hemodynamic in different time

Group		T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
HR	Sham	258± 24	253± 22	267± 21	268± 18
	OX	261± 21	230± 19*	215± 16*	198± 16*
	HO ₁	252± 25	226± 24*	209± 19 *	192± 20*
	HO ₂	264± 18	244± 18*	223± 17*	204± 19*
MAP (mmHg)	Sham	90 ± 11	90± 12	93± 13	89± 10
	OX	89± 10	78± 13*	69± 8 *	64± 9*
	HO ₁	94± 14	75± 10*	71± 7*	61± 8*
	HO ₂	87± 8	77± 12*	68± 10*	66± 7 *

注 与 T₀ 时比较, *P<0.05

Note: Compared with the T0, *P<0.05

2.2 各组心肌酶活性和炎症因子浓度的比较

与 Sham 组比较, 各组血清 CK、cTNI、IL-6 和 TNF-α 浓度明显升高 (P<0.01) 与 OX 组比较, HO₂ 组上述酶及炎症因子浓度显著下降 (P<0.01), 见表 2。

2.3 各组心肌缺血范围和心肌梗死范围的比较

与 OX 组比较, 高氧液治疗组心肌缺血范围差异无统计学意义 (P>0.05), HO₂ 组心肌梗死范围减小 (P<0.05), 见表 3。

3 讨论

溶栓治疗、心脏导管技术及心脏直视下手术等, 在心肌缺血后疏通血管、恢复血流过程中可出现明显的再灌注损伤, 随之带来心肌舒缩功能障碍、再灌注心律失常、代谢异常及心肌超微结构的改变, 其机制与氧自由基、炎症细胞激活等因素有关^[6-8]。在正常生物体内, 氧自由基处于生成和清除的动态平衡, 维持在较低的正常水平。而心肌缺血缺氧时, 大量的氧自由基导致膜的通透性及流动性发生改变, 完整性遭到破坏, 引起线粒体结构破坏, 心肌细胞水肿。同时, 膜结合酶受体和离子的脂

质微环境发生改变,从而改变这些蛋白酶的正常功能,引起细胞内钙超载,促进膜蛋白和磷脂交联,引起蛋白酶不可逆变性,最终导致心肌细胞结构和功能破坏^[9,10]。我们研制的HO经溶氧后可使液体氧分压由20.5±0.4kPa上升到106±7.8kPa,溶解氧的含量是动脉血的9-10倍,静脉血的25-27倍,同时含有对机体有多种治疗作用的臭氧(O₃,13.4±2.6μg/ml)。动物实验表明对心肌、脊髓、脑等缺血再灌注损伤有良好的保护作用^[11]。诸

多研究表明给予O₃能够通过阻断黄嘌呤氧化途径,降低氧自由基生成,减少氧自由基聚集,同时保护内源性抗氧化酶系统而减轻肝脏及心脏缺血再灌注损伤。HO进入机体后,为急需氧供的组织提供氧气,改善线粒体的能量代谢,增加ATP生成,减少了氧自由基的产生,减轻了心肌及血管内皮细胞的损伤^[12,13]。

表 2 各组心肌酶活性和炎症因子浓度的比较(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	CK	cTNI	IL-6	TNF-α
	(p/ ng·L ⁻¹)	(p/ ng·L ⁻¹)	(p/ pg·L ⁻¹)	(p/ pg·L ⁻¹)
Sham	0.92± 0.35	0.04± 0.02	1.90± 0.22	29.54± 3.26
OX	15.60± 4.11 *	6.21± 3.09*	5.82± 0.36 *	113.21± 22.31 *
HO ₁	14.85± 3.93 *	5.98± 3.85 *	6.11± 0.29*	108.76± 23.55 *
HO ₂	10.84± 3.58 * [#]	3.55± 2.23* [#]	3.01± 1.23 * [#]	76.48± 12.68 * [#]

注 与 Sham 组比较, *P<0.01 与 OX 组比较, [#]P<0.01
Note: Compared with the group Sham, *P<0.01; Compared with the group OX, [#]P<0.01

表 3 各组心肌缺血范围和心肌梗死范围的比较 (% ,n=8, $\bar{x} \pm s$)

	Sham	OX	HO ₁	HO ₂
Myocardial schemia scope	0	41± 2	39± 4	37± 3
Myocardial infarction range	0	44± 6	37± 4	24± 5*

注 与 OX 组比较, *P<0.05
Note: Compared with the group OX, *P<0.05

缺血再灌注时细胞膜损伤,细胞内CK、cTNI释放入血,故测定其血清含量有助于心肌缺血损伤程度的诊断^[14]。本研究结果显示,缺血再灌注损伤后CK、cTNI均显著升高,心肌梗死面积显著增大,;而随高氧液注射剂量的增加,CK、cTNI浓度显著降低,说明高氧液可减轻心肌细胞膜的损伤,降低心肌酶的释放。

研究显示,心肌缺血再灌注时伴随血浆炎症细胞因子及抗炎细胞因子水平的升高(其增高程度和心肌微循环的损伤程度有关),心肌组织水泡灌注不良越严重^[15-17]。TNF-α是缺血再灌注损伤连锁反应中的关键性递质,能诱导白细胞聚集和释放IL-6、IL-8、血小板活化因子、白三烯等炎症递质,诱发缺血再灌注损伤。IL-6大量产生可诱导白细胞进入缺血区,刺激黏附分子CO11b/CD18和心肌细胞间黏附分子-1的表达,介导多形核中性粒细胞与心肌细胞结合,加重心肌缺血损伤^[18-20]。本研究结果显示,与OX组比较,HO₂组IL-6和TNF-α浓度显著下降,提示一定剂量的高氧液预处理可能通过抑制炎症反应减轻兔心肌缺血再灌注损伤。

综上所述,预先静脉注射HO可减轻兔心肌缺血再灌注损伤,HO 20 ml / kg 效果最好。

参 考 文 献(References)

[1] Gokulakrishnan S, Jay CS, Milton B, et al. The delivery of superoxide dismutase encapsulated in polyketal microparticles to rat myocardium

and protection from myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Bio-materials, 2010, 31 (6): 1372-1379
[2] Nie J, Jiang K, Cheng G, et al. The Protective Effect of Ischemic Pre-conditioning Associated with Altered Gene Expression Profiles in Rat Lung after Reperfusion[J]. Journal of Surgical Research, 2011,168(2): 281-293
[3] Staat P, Rioufol G, Piot C. Postconditioning the human heart[J]. Circulation 2005,112:2143-2148
[4] Gao CJ, Xu LX, Chai W, et al. Amelioration of intestinal ischemia reperfusion injury with intraluminal hyper-oxygenated solution: studies on structural and functional changes of enterocyte mitochondria [J]. J Surg Res, 2005, 129(2): 298-305
[5] Swaminathan JK, Khan M, Mohan IK, et al. Cardioprotective properties of Crataegus oxyacantha extract against ischemia-reperfusion injury [J]. Phytomedicine, 2010, 17(10): 744-752
[6] Hu XR, Jiang H, Ma F, et al .Similarities between ischemic preconditioning and postconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. International Journal of Cardiology, 2010, 144(1): 135-136
[7] Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning[J]. Cardiovasc Res 2006,70:240-253
[8] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. Int J Biochem Cell Biol 2007,39:44-84
[9] Coats AJ. Ethical authorship and publishing[J]. Int J Cardiol 2009,131:

149-150

- [10] Lamiaa A. Ahmed, Hesham A, et al. Pharmacological preconditioning with nicorandil and pioglitazone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2011, 663, (1-3), 51-58
- [11] Xu RF, Li TT, Feng X, et al. Therapeutic effect of hyperoxygenated solution on acute lung injury induced by oleic acid [J]. *J Eur Surg Res*, 2008, 41(1):37-43
- [12] Vivek S, Derek J. Hausenloy S. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009, 46, (5) : 758-764
- [13] Shu JL, Yan NW, Yi K. Noninvasive Limb Ischemic Preconditioning Protects Against Myocardial I/R Injury in Rats[J]. *Journal of Surgical Research*, 2010, 164(1):162-168
- [14] Margarita AS, Carlos AV, Gina S, et al. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010, 48(6): 1298-1306
- [15] Bolli R, Becker L, Gross G, et al. Myocardial protection at a cross-roads: The need for translation into clinical therapy. *Circ Res* 2004; 95:125
- [16] Massion PB, Pelat M, Belge C, et al. Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2005;142:144
- [17] Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: An overview of a decade of research[J]. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33: 1897
- [18] Corey DA, Sepideh HH, Katja SL, et al. The Role of Cytoprotective Cytokines in Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury [J]. *Journal of Surgical Research*, 2008, 148(2): 164-171
- [19] Vivek S, Derek JH. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2009, 46 (5): 758-764
- [20] Seubert, Darryl C, Zeldin, Kasem ,et al. Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2007, 82(1-4): 50-59

(上接第 19 页)

- [6] Okunieff P, Swarts S, Keng P, et al. Antioxidants reduce consequences of radiation exposure [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 614:165-178
- [7] Notas G, Nilli AP, Kampa M, et al. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells by inducing cell cycle arrest and NOS activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760 (11):1657-1666
- [8] Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3): 169-177
- [9] Li J, Wang WL, Yang XK, et al. Inducible overexpression of Bak sensitizes HCC-9204 cells to apoptosis induced by doxorubicin [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(9):769-776
- [10] 李江, 王文亮, 于欣欣, 等. Bak 基因诱导 p27KIP1 基因的过表达使 HCC-9204 细胞在 G1 期停滞 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9 (Suppl): 27-29
- Li Jiang, Wang Wenliang, Yu Xinxin, et al. Overexpression of p27KIP1 induced by Bak gene leads to the arrest in G₁ phase of HCC-9204 cell line[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2001, 9(Suppl) : 27-29
- [11] Koyanagi M, Fukada K, Uchiyama T, et al. Long-term exposure to superantigen induces p27Kip1 and Bcl-2 expression in effector memory CD4⁺ T cells [J]. *Cell Immunol*, 2007, 248(2): 77-85
- [12] Basu A, DuBois G, Haldar S. Posttranslational modifications of Bcl2 family members--a potential therapeutic target for human malignancy [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 1508-1521
- [13] Vantieghem A, Xu Y, Assefa Z, et al. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(40): 37718-37731
- [14] Susan J. Zunino, David H. Storms. Resveratrol Alters Proliferative Responses and Apoptosis in Human Activated B Lymphocytes in Vitro [J]. *The Journal of Nutrition*, 2009, 139(8): 1603-1608
- [15] Donna H. Wong, Jesus A. Villanueva, Amanda B. Cress, Antoni J. Duleba. Molecular Human Reproduction[J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(4): 251-259