

缺血后处理对猪急性心肌梗死后的抗氧化作用

孙海梅¹⁾, 郭涛²⁾, 唐睿珠³⁾, 付雪³⁾, 王雨平¹⁾

(1) 昆明医学院第一附属医院 ICU; 2) 心内科; 3) 临床医学试验研究中心, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨缺血后处理对猪急性心肌梗死后的抗氧化作用. **方法** 滇南小耳猪 15 只, 随机数字表法分为 3 组, 假手术组 (S 组, n=5), 缺血再灌注组 (IR 组, n=5), 缺血后处理组 (IPC 组, n=5). 用球囊封堵冠脉建立猪闭胸式心肌梗死模型, 术中监测心电图及血压, 测定缺血前、再灌注 2 h 及 24 h 血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活力及丙二醛 (MDA) 含量, 再灌注 72 h 采用 2, 3, 5 氯化三苯基氯四氮唑 (TTC) 染色确定心肌梗死面积. **结果** (1) 与假手术组相比, 缺血再灌注组再灌注 2 h, 24 h MDA 含量明显增加, SOD 活力明显降低 ($P < 0.05$); 与缺血再灌注组相比, 缺血后处理组再灌注 2 h, 24 h MDA 含量明显下降, SOD 活力明显增加 ($P < 0.05$); (2) 假手术组未发生心肌梗死, 缺血再灌注组及缺血后处理组心肌梗死的面积分别是 $(23.26 \pm 3.13)\%$, $(10.89 \pm 2.02)\%$, 缺血后处理组心肌梗死面积较缺血再灌注组明显降低 ($P < 0.05$). **结论** 缺血后处理对猪的心肌保护作用可能与其减少脂质过氧化物 MDA 的含量, 提高抗氧化物质 SOD 活性的抗氧化作用有关.

[关键词] 缺血后处理; 心肌; 猪; 缺血再灌注损伤; 氧自由基

[中图分类号] R542.2*2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 04 - 0013 - 04

Anti-oxidative Effects of Ischemic Postconditioning on the Swine Model of Acute Myocardial Infarction

SUN Hai - mei¹⁾, GUO Tao²⁾, TANG Rui - zhu³⁾, FU Xue¹⁾, WANG Yu - ping¹⁾

(1) Dept. of ICU; 2) Dept. of Cardiology; 3) Dept. of Clinical Medicine Testing Centre, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the anti-oxidative effects of ischemic postconditioning on the swine model of acute myocardial infarction. **Methods** Fifteen Diannan small-ear pigs were randomly divided into three groups: (1) Sham-operated (S, n = 5) group; (2) Ischemia-reperfusion (I/R, n = 5) group; (3) Ischemic postconditioning (IPC, n = 5). The close-chest swine model of acute myocardial infarction was established by coronary occlusion with balloon angioplasty. ECG and blood pressure were monitored during the process. Serum biomarkers malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were assessed before ischemia, 2 h after reperfusion and 24 h after reperfusion. After 72h of reperfusion, infarction size was measured by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. **Results** (1) Levels of serum MDA were all significantly reduced in IPC group compared with IR group ($P < 0.05$), and the activities of SOD were enhanced ($P < 0.05$); (2) In the IPC group, infarction size was smaller than that in IR group ($P < 0.05$). **Conclusions** Ischemic postconditioning can protect myocardium against ischemia-reperfusion injury in swine, the mechanism may be related to decreasing oxygen free radical MDA and increasing the antioxidant activity of SOD.

[Key words] Ischemic Postconditioning; Myocardium; Swine; Ischemia-reperfusion injury; Oxygen free radical

[基金项目] 云南省应用基础研究面上项目基金资助项目 (2007C243M)

[作者简介] 孙海梅 (1972~), 女, 白族, 云南大理市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事危重病医学临床工作.

缺血后处理是近年来提出的一种新的心肌保护措施,但其具体的心肌保护机制尚不清楚^[1-3]。新近的研究提示,缺血后处理对心肌缺血再灌注的保护作用可能与抗氧化作用有关^[4-7]。本研究属系列课题,在建立猪闭胸式心肌梗死模型的基础上,探讨缺血后处理对猪心肌再灌注损伤保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

15只8~11月健康滇南小耳猪,雌雄不限,体质量19~24.5 kg,由昆明医学院动物实验室提供。超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。2,3,5-氯化三苯基氯四氮唑(TTC)购自SIGMA公司。戊巴比妥钠购自杭州赛诺菲公司。青霉素购自山东鲁抗药业。实验中导丝(长、短导丝及球囊导丝),动脉鞘、穿刺针、导管及压力泵等均为德国贝朗公司产品,均为临床使用过的废旧材料,并在术前12 h用2%戊二醛消毒液浸泡消毒。数字减影血管造影机(飞利浦公司,FD10机型)。心电监护仪(美国公司,Dash3000机型)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立 实验猪15只,随机分为3组:假手术组(S组, $n=5$),缺血再灌注组(IR组, $n=5$),缺血后处理组(IPC组, $n=5$)。实验猪,空腹6 h以上,3%戊巴比妥钠20~30 mg/kg耳缘静脉麻醉后将猪仰卧固定在手术台上施行手术。监测心电及血压,据肢体运动情况每20~30 min重复静脉注射戊巴比妥钠2~5 mg/kg,使猪保持麻醉状态。行右股动脉穿刺,置入6 F动脉鞘,静脉注入肝素8 000 U,后每隔1 h追加注射肝素2 000 U。经动脉鞘置入5 F猪尾导管至左心室,行左心室造影。以5 F 3.0 L左冠状动脉造影导管分别行左、右冠状动脉造影,观察猪冠状动脉的分布情况。在导丝指引下,置入2.0 mm或2.5 mm的球囊至左前降支(LAD)第一对角支的远端,以3~4 atm打开球囊堵住LAD。心肌梗死模型成功标志:冠脉造影示球囊远端血流中断,心电图表现为 $V_1 \sim V_3$ 导联出现ST段抬高,T波高耸融合。撤除球囊形成再灌注,拔除动脉鞘管并压迫止血。S组不行球囊充气堵住LAD 60 min; IPC组

行球囊充气堵住LAD 60 min后,球囊放气30 s,充气30 s(循环8次); IR组行球囊充气堵住LAD 60 min后直接撤除球囊。实验结束后肌注青霉素400万U,在猪清醒之前送回动物中心。手术后约1 h猪苏醒,第2天即可进食。

1.2.2 血SOD、MDA的测定 分别于缺血前,再灌注2 h,24 h取猪前腔静脉血1 mL,以4 500 r/min分离血清,-20℃保存待测。采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸盐法分别测定血清丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD),药盒购自南京建成生物工程研究所,严格按说明书操作。

1.2.3 心肌梗死面积测定 心肌缺血再灌注72 h后,将实验猪麻醉后,开胸取心脏,生理盐水冲洗,沿心脏的基底部短轴方向将左心室连续切成4~5 mm的薄片,对心肌行TTC染色,将心肌放入含有10 g/L的TTC的PBS($pH=7.4$)溶液中孵育10 min。根据染色与否定义确定心肌梗死范围,坏死区(灰白色)和非坏死区(深红色)。扫描后用图像分析软件计算心肌梗死体积和左室体积,用梗死体积占左室体积的百分比表示并计算心肌梗死面积。

1.3 统计学方法

采用SPSS统计软件进行分析。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间不同时间点均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血SOD和MDA的变化

S组、IR组、IPC组缺血前MDA和SOD无明显差别。再灌注后2 h及24 h,与S组相比,IR组和IPC组SOD值明显降低,MDA值明显升高($P < 0.05$);与IR组相比,IPC组在再灌注后2 h、24 h的SOD活性明显增高($P < 0.05$),MDA含量明显下降($P < 0.05$),见表1。

2.2 病理学检查

术后3 d行TTC染色,存活心肌组织被红染,而未被染色的区域呈白色或灰白色为梗死区。经图像分析处理后,S组未发生心肌梗死,IPC组心肌梗死的面积是 $(10.89 \pm 2.02)\%$,IR组心肌梗死的面积是 $(23.26 \pm 3.13)\%$,两者差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表1 各组猪 SOD 和 MDA 变化 $[(\bar{x} \pm s) n=5]$ Tab. 1 The SOD and MDA levels of swines in each group $[(\bar{x} \pm s) n=5]$

组别	SOD (U/mL)			MDA (nmol/mL)		
	缺血前	再灌注 2 h	再灌注 24 h	缺血前	再灌注 2 h	再灌注 24 h
S 组	48.21 ± 2.66	50.91 ± 3.11	51.23 ± 2.56	3.64 ± 0.23	3.82 ± 0.22	3.42 ± 0.47
IR 组	50.26 ± 2.02	24.86 ± 1.88 [#]	25.42 ± 2.54 [#]	3.24 ± 0.13	7.63 ± 0.71 [#]	6.71 ± 0.58 [#]
IPC 组	49.44 ± 2.39	28.96 ± 2.10 ^{#*}	31.28 ± 2.46 ^{#*}	3.29 ± 0.18	6.52 ± 0.64 ^{#*}	5.77 ± 0.63 ^{#*}

与 S 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 IPC 组比较, ^{*} $P < 0.05$.

表2 两组缺血再灌注 3 d 后心梗面积的比较 $(\bar{x} \pm s)$ Tab. 2 Infarction size of swines IR group and IPC group $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	心梗面积 (%)
IR 组	5	23.26 ± 3.13
IPC 组	5	10.89 ± 2.02 [*]

与 IR 组比较, ^{*} $P < 0.05$.

3 讨论

目前研究表明缺血后处理对鼠、兔、犬等体型较小的动物心肌保护效果较为肯定,但对体型较大且冠脉与人类最为接近的猪的心肌保护作用却尚无定论^[8-11].

本研究通过球囊封堵冠脉建立猪闭胸式心肌缺血再灌注损伤动物模型^[12].通过控制球囊的放气-充气,实现了心肌缺血和后处理的反复短暂缺血再灌注时间的准确控制,心电图、冠脉造影及 TTC 染色均显示猪闭胸式心肌缺血再灌注模型构建成功.实验发现与缺血再灌注组相比,在球囊充气堵住 LAD 60 min 致心肌缺血后,行球囊放气 30 s,充气 30 s (循环 8 次)即缺血后处理能显著缩小心梗面积、减轻氧化应激,对猪心肌缺血再灌注损伤产生保护作用.

心肌的缺血再灌注损伤中,有多种因素参与了这一过程,其中再灌注早期爆发式产生的氧自由基在心肌缺血再灌注损伤中起了非常重要的作用^[4].氧自由基对心肌的损害主要表现为脂质过氧化反应,即氧自由基与心肌细胞膜上的多不饱和脂肪酸结合,引起脂质过氧化作用,形成脂质过氧化物,进而引起细胞生物分子结构变化和细胞功能损伤,最终导致心肌细胞的损伤.目前缺血后处理发挥心肌保护作用的具体机制尚不清楚,有学者认为抑制再灌注早期自由基氧化应激反应可能是其发挥心肌保护作用的途径之一^[13,14].

本研究所采用的观察指标是目前公认的能较好地反映组织内氧自由基水平及氧化损伤程度的间接指标^[15].MDA 是脂质过氧化物的终末产物,检

测其含量可反映机体内脂质过氧化的程度,并间接反映组织细胞受自由基攻击的严重程度.SOD 是清除体内自由基的特异酶,其活力的高低间接反应机体清除自由基的能力.本研究结果显示,与缺血前比较,单纯缺血再灌注组再灌注后 2 h、24 h 的 SOD 值显著下降,MDA 水平显著增高,表明缺血再灌注后机体组织内抗氧化酶活性下降,脂质过氧化损伤加重.与缺血再灌注组比较,缺血后处理组 SOD 值显著增高,MDA 值显著降低,结果提示缺血后处理可能通过氧自由基的生成减少和提高机体组织内抗氧化能力发挥心肌保护作用.本研究的结果与其它学者对缺血后处理具有减少活性氧类物质的产生,抑制脂质过氧化反应等的作用从而发挥心脏保护作用研究结果相一致^[7,16,17].

总之,本研究提示缺血后处理可能通过减少氧自由基的生成,提高心肌细胞的抗氧化能力,限制心肌梗死范围,缺血后处理的心肌保护作用可能与抗氧化作用机制有关,对心肌再灌注损伤的治疗进行了有益的探索,但能否应用于临床尚有待进一步深入研究.

[参考文献]

- [1] ZHAO Z-Q, CORVERA J S, HALKOS M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol*, 2003, 285: 579 - 588.
- [2] CRISOSTOMO P R, GEORGE M W, MELJING W, et al. Preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials [J]. *J Am Coll Surg*, 2006, 202(5): 797 - 812.
- [3] HAIMEI SUN, TAO GUO, LIU LIU, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after acute myocardial infarction in pigs [J]. *Heart Surgery Forum*, 2010, 13(5): 305 - 310.
- [4] 孙海梅, 郭涛. 缺血后处理心肌保护作用的基础与临床研究 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(6): 1 111 - 1 113.

(下转第 21 页)

- [7] EFFERTH T, DUNSTAN H, SAUERBREY A, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer[J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(4):767-773.
- [8] CHEN H H, ZHOU H J, WANG W Q, et al. Antimalarial dihydroartemisinin also inhibits angiogenesis[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 53(5):423-432.
- [9] CHEN H H, ZHOU H J, WU G D, et al. Inhibitory effects of artesunate on angiogenesis and on expressions of vascular endothelial growth factor and VEGF receptor KDR/flk-1[J]. *Pharmacology*, 2004, 71(1):1-9.
(2012-02-21 收稿)

(上接第15页)

- [5] SASAKI H, SHIMIZU M, OGAWA K, et al. Brief ischemic-reperfusion performed after prolonged ischemia (ischemic postconditioning) can terminate reperfusion arrhythmias with no reduction of cardiac function in rats[J]. *Int Heart J*, 2007, 48:205-213.
- [6] DARLING C E, JIANG R, MAYNARD M, et al. Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289:1 618-1 626.
- [7] THIBAUT H, PIOT C, STAAT P, et al. Long-term benefit of postconditioning [J]. *Circulation*, 2008, 117(8):1 037-1 044.
- [8] ILIODROMITISE K, GEORGIADIS M, COHEN M V, et al. Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs [J]. *Basic Res Cardiol*, 2006, 101:502-507.
- [9] SCHWARTZ L M, LAGRANHA C J. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs[J]. *Am Physiol*, 2006, 290:1 011-1 018.
- [10] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对缩小猪急性心肌梗死面积的作用观察[J]. *重庆医学*, 2010, 39(5):522-523.
- [11] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对猪心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(3):384-386.
- [12] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 以球囊封堵法建立猪心肌梗死模型的可行性研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(46):9 032-9 036.
- [13] ZHAO Z Q, VINTEN JOHANSEN J. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70:200-211.
- [14] SUN H Y, WANG N P, KERENDI F, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca^{2+} overload[J]. *Am J Physiol*, 2005, 288:1 900-1 908.
- [15] ZHOU J F, CHEN J X, SHEN H C, et al. Abnormal reactions of free radicals and oxidative damages in the bodies of patients with chronic glomerulonephritis[J]. *Biomed Environ Sci*, 2002, 15(3):233-244.
- [16] GUMINA R J, GROSS G J. If ischemic preconditioning is the gold standard, has a platinum standard of cardioprotection arrived comparison with NHE inhibition[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 1999, 8:39-44.
- [17] HALKOS M E, KERENDI F, CORVERA J S, et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning [J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78:961-969.
(2012-01-02 收稿)