

预处理对心肌细胞的保护作用

张梅, 黄体钢, 杨万松, 陈元禄, 周丽娟

(天津医科大学附属第二医院心脏科, 天津 300211)

[关键词] 缺血; 再灌注损伤; 缺氧; 心肌细胞; 心肌梗死

[摘要] 为探讨缺氧和缺血预处理对心肌细胞的保护作用, 分别在培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧模型、离体大鼠灌注和在体大鼠心肌缺血/再灌注模型中, 观察缺血和缺氧预处理对心肌细胞再次长时间缺氧/复氧或缺血/再灌注损伤的保护作用。结果发现, 在培养的乳鼠心肌细胞中, 缺氧预处理组细胞存活率和超氧化物歧化酶含量较缺氧/复氧组增加 ($P < 0.01$), 乳酸脱氢酶的释放和丙二醛含量则减少 ($P < 0.01$)。对离体或在体大鼠心脏的缺血预处理也可减少长时间缺血/再灌注对心肌细胞的损伤。离体大鼠缺血预处理组冠状动脉流出液中乳酸脱氢酶的释放和组织丙二醛的含量较非预处理组减少 ($P < 0.01$), 心脏的湿干重比和组织超氧化物歧化酶含量则增加 ($P < 0.01$)。在体大鼠心肌缺血预处理组梗死范围和血清乳酸脱氢酶较缺血/再灌注组减少 ($P < 0.01$), 无论是再次缺血还是再灌注期室性心律失常的发生率在预处理组明显低于非预处理组 ($P < 0.01$)。结果提示, 缺血或缺氧预处理对心肌具有保护作用, 预处理可以减少再次长时间的缺氧/复氧或缺血/再灌注对心肌细胞的损伤。

[中图分类号] R363.22

[文献标识码] A

Effects of Hypoxic or Ischemic Preconditioning on Cardiomyocytes

ZHANG Mei, HUANG Ti-Gang, YANG Wan-Song, CHEN Yuan-Lu, and ZHOU Li-Juan

(Department of Cardiology, Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

MeSH Ischemia; Reperfusion Injury; Anoxia; Cardiomyocytes; Myocardial Infarction

ABSTRACT **Aim** To investigate the effects of hypoxic or ischemic preconditioning on cardiomyocytes. **Methods** In the hypoxia/reoxygenation (H/R) model of cultured neonatal rat cardiomyocytes, and the ischemia/reperfusion (I/S) model of the isolated or in situ rat hearts, the present study observes the effects of PC on H/R or I/R injury on cardiomyocytes. The infarct size, cell viability, LDH release and the content of MDA were measured. **Results** Hypoxia PC attenuated H/R injuries on cardiomyocytes. On the model of cultured neonatal rat cardiomyocytes, compared with the cardiomyocytes unpreconditioned, the number of viable cell and the SOD content were increased ($P < 0.01$), the LDH release and the MDA content were decreased ($P < 0.01$) in preconditioned group. In isolated or in situ rat hearts, ischemic PC decreased the injuries to cardiomyocytes. The coronary artery effusion or plasma LDH levels, tissue MDA contents, the infarct sizes and arrhythmia during occlusion or reperfusion were greatly decreased in preconditioned myocardium after a long time I/R than those in the unpreconditioned ($P < 0.01$). **Conclusions** Cultured neonatal rat cardiomyocytes, isolated and in situ rat hearts have PC phenomenon. PC can obviously protect cultured neonatal rat cardiomyocytes, isolated or in situ rat heart from H/R or I/R injuries.

1986 年, Murry 等在犬心实验中首次发现多次短暂缺血和再灌注后, 心肌可以耐受长时间缺血, 梗塞面积减小, 首次提出了缺血预处理 (ischemic preconditioning, IP 或 PC) 的概念。这为缺血心肌的保护及其机理的探讨开辟了崭新的领域。随后一些研究者用不同的预处理方法, 在不同种属的动物身上,

从整体到离体器官及细胞水平进行了广泛深入的研究。本实验分别在培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 损伤模型上, 大鼠离体及在体心脏缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 模型上, 观察缺氧 (缺血) 预处理的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒由北京中生生物工程高技术公司提供; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和超氧化物歧化酶 (superox-

[作者简介] 张梅, 女, 1966 年 7 月出生, 天津人。1989 年获天津医科大学医疗系学士学位, 1993 年~1996 年在天津医科大学附属第二医院心血管内科攻读硕士、博士, 并获得医学博士学位。导师为著名心脏病学专家黄体钢教授。目前在天津市心脏病学研究所和天津医科大学附属第二医院心内科从事心血管临床和基础研究工作。

ide dismutase, SOD) 检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 预处理对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响

1.2.1 动物模型与分组 取生后 1~3 天的乳鼠心室组织,胰酶消化分离,用含 20% 小牛血清的 MEM 培养基,95% 空气、5% CO₂ 培养箱内培养乳鼠心肌细胞。取第二代心肌细胞,按 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板,孵育 24 h,无血清 MEM 液再培养 24 h。实验分四组: ①缺氧/复氧组,参照文献[1],将接种有细胞的培养板置于密闭的缺氧孵育容器中,以 95% N₂、5% CO₂ 持续缺氧孵育 2 h,再持续以 95% O₂、5% CO₂ 复氧孵育 1 h; ②缺氧预处理组,细胞经预缺氧 20 min,置培养箱恢复 20 min,再按缺氧/复氧操作进行; ③短暂缺氧(transient hypoxia, TH) 组,缺氧孵育 20 min,再置 CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 20 min; ④对照组,培养板置 CO₂ 培养箱中持续孵育 3 h。

1.2.2 观察指标 台盼兰排斥法计算细胞存活率;取上清液测定 LDH 活性;硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量及黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 含量。

1.3 预处理对离体心肌缺血/再灌注损伤的影响

1.3.1 动物模型与分组 健康 Wistar 大鼠,雌雄不限,体重 200~250 g。用 5% 戊巴比妥钠(50 μg/g)腹腔注射麻醉,迅速摘取心脏,以 4℃ 的 KH 液冲洗并悬挂于 Langendorff 灌流架上,用 95% O₂-5% CO₂ 饱和的 KH 液,经主动脉逆行非循环式灌注心脏,压力 80 cm H₂O,37℃ 恒温,平衡灌注 15 min,稳定后随机分为四组。①缺血/再灌注组($n=9$):心脏保湿保温,停止灌注 45 min 后再灌注 15 min; ②缺血预处理组($n=9$):心脏停止灌注 5 min 后再灌注 5 min,反复 3 次,然后进行缺血/再灌注的操作; ③短暂缺血(transient ischemia, TI)组($n=6$):方法同缺血预处理组,但不进行缺血/再灌注的操作; ④对照组($n=6$):KH 液持续灌注 60 min。

1.3.2 观察指标 收集平衡灌注 10~15 min 及实验结束前 15 min 的冠状动脉流出液,测定 LDH 活性。实验结束后,称量心肌组织的湿重及干重,计算湿干重比。测定心肌组织丙二醛和 SOD 含量。

1.4 预处理对在体心肌缺血/再灌注损伤的影响

1.4.1 动物模型与分组 健康雄性 Wistar 大鼠,平均体重 269.79 ± 17.76 g。用 5% 戊巴比妥钠(50 μg/g)腹腔注射麻醉。气管插管,人工呼吸,颈动脉插管,持续记录心电图变化。以左冠状静脉为标志,用弯针跨腔勾绕左冠状动脉前降支主支,线两端共

穿一根聚乙烯小管以形成闭环。拉紧闭环并用止血钳固定即产生缺血,放松闭环即发生再灌注。结扎前 1 min 给予肝素(250 mu/g)。将大鼠随机分为三组: ①对照组($n=10$)为假手术组,仅穿线不结扎; ②缺血/再灌注组($n=12$)动物先行 3 次 5 min 假性缺血/再灌注(仅穿线不结扎),然后行 30 min 缺血,2 h 再灌注; ③缺血预处理组($n=12$)动物先行 3 次 5 min 缺血/再灌注,然后行 30 min 缺血,2 h 再灌注。

1.4.2 观察指标 以伊文思兰+ TTC 双重染色^[2],用称重法^[3]测量梗死范围的大小。实验结束时,心腔内取血测定 LDH 活性、丙二醛及 SOD 含量。统计室性心动过速(ventricular tachycardia, VT)和心室纤维性颤动(ventricular fibrillation, VF)的发生率。

1.5 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较用非配对 t 检验,两组以上均数比较用方差分析,多组间比较用 q 检验,率的比较用 χ^2 或 Fisher 精确法。

2 结果

2.1 缺氧预处理对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响

表 1 (Table 1) 显示,缺氧/复氧组细胞存活率较对照组下降,而 LDH 活性和丙二醛含量明显升高,SOD 含量明显降低(P 均 < 0.01)。短暂缺氧组细胞存活率较对照组下降,LDH 活性则升高(P 均 < 0.05)。与缺氧/复氧组比较,缺氧预处理组细胞存活率、SOD 含量分别增高 55% 和 70%,而 LDH 活性及丙二醛含量分别降低 32% 和 23%(P 均 < 0.01)。

表 1. 缺氧预处理对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的作用。

Table 1. Effects of hypoxic preconditioning on H/R injury of rat cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=6$).

Groups	Viability (%)	LDH (u/L)	MDA (μmol/L)	SOD (10^3 NU/L)
Control	88.6 ± 3.6	19.7 ± 3.2	1.0 ± 0.6	37.3 ± 3.6
H/R	42.2 ± 5.4^a	83.0 ± 12.3^a	3.2 ± 0.4^a	12.3 ± 4.3^a
PC	65.4 ± 5.5^{ab}	56.2 ± 8.3^{ab}	2.4 ± 0.4^{ab}	20.9 ± 4.2^{ab}
TH	76.9 ± 8.1^{ab}	30.2 ± 5.1^{cb}	1.5 ± 0.3^b	33.3 ± 5.0^b

a: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with H/R group.

2.2 缺血预处理对离体大鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响

表 2 (Table 2) 显示,经缺血/再灌注损伤后,大鼠冠状动脉流出液中 LDH 活性较对照组增加 5.0

倍, 心肌组织湿干重比值增加 38%, 丙二醛含量增加 1.9 倍, SOD 含量减少 35% (P 均 < 0.01)。短暂缺血组心肌细胞轻度受损。与缺血/再灌注组比较,

缺血预处理组冠状动脉流出液中 LDH 活性降低 35%, 心肌水肿程度减轻 13%, 心肌组织丙二醛含量下降 40%, SOD 含量增高 29% (P 均 < 0.01)。

表 2. 缺血预处理对离体灌注大鼠心脏缺血/再灌注损伤的作用。

Table 2. Effects of ischemic preconditioning on I/R injury of the isolated rat heart ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	Coronary artery effusion		Tissue		
		LDH ₁ (u/L)	LDH ₂ (u/L)	weight rate(w/d)	MDA (nmol/g)	SOD (10 ³ NU/g)
Control	6	10.67 \pm 4.32	16.67 \pm 8.60	3.40 \pm 0.38	55.33 \pm 13.49	1.20 \pm 0.03
I/R	9	15.33 \pm 7.30	102.33 \pm 246.32 ^a	4.68 \pm 0.51 ^a	162.40 \pm 21.43 ^a	0.78 \pm 0.08 ^a
PC	9	12.67 \pm 5.24	66.78 \pm 20.93 ^{ab}	4.06 \pm 0.42 ^{ab}	97.16 \pm 15.65 ^{ab}	1.01 \pm 0.04 ^{ab}
TI	6	10.83 \pm 5.42	32.33 \pm 7.47 ^b	3.57 \pm 0.28 ^b	70.00 \pm 12.33 ^b	1.11 \pm 0.03 ^{ab}

a: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with I/R group.

2.3 缺血预处理对在体大鼠心脏缺血/再灌注损伤的作用

表 3(Table 3) 显示, 三组大鼠体重、心脏重量均无显著性差异。缺血/再灌注组和缺血预处理组 LDH 活性、丙二醛含量较对照组显著升高 ($P < 0.$

01), SOD 含量降低 ($P < 0.05$)。缺血预处理组 LDH 活性较缺血/再灌注组明显降低 ($P < 0.01$), 丙二醛含量也显著降低 ($P < 0.05$), 两组间 SOD 含量无显著性差异。

表 3. 三组大鼠体重及生物化学指标的比较。

Table 3. comparison of LDH, MDA, SOD and weight for control, I/R and PC group in rats ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	BW (g)	HW (mg)	LDH (u/L)	MDA (nmol/L)	SOD (u/L)
Control	10	264.10 \pm 20.21	911.20 \pm 61.92	234.10 \pm 50.88	4.34 \pm 1.96	353.48 \pm 65.28
I/R	12	270.25 \pm 15.55	906.42 \pm 85.72	712.42 \pm 106.98 ^a	9.41 \pm 2.45 ^a	220.49 \pm 96.98 ^a
PC	12	274.08 \pm 17.91	924.67 \pm 67.45	537.42 \pm 63.39 ^{ab}	7.40 \pm 1.75 ^{ad}	308.68 \pm 93.56 ^d

a: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$, compared with I/R group. BW: body weight; HW: heart weight.

表 4 (Table 4) 显示, 缺血预处理组大鼠梗死区重量较缺血/再灌注组明显降低, 梗死区重量/缺血区重量也相应降低 (P 均 < 0.01)。从图 1 (Figure 1) 中可以看出, 相同缺血程度时, 缺血预处理组梗死区占心脏的比重较缺血/再灌注组显著降低。缺血预处理组室性心律失常发生率明显低于缺血/再灌注组 ($P < 0.05$)。

表 4. 缺血/再灌注和预处理组大鼠梗死范围的比较。

Table 4. Infarct size data for I/R and PC groups in rats ($\bar{x} \pm s$, n=12)

Groups	HW	AAR (g)	IS (g)	IS/AAR (%)
I/R	906.4 \pm 85.7	227.0 \pm 47.5	119.3 \pm 26.8	53.2 \pm 9.3
PC	924.7 \pm 67.5	247.0 \pm 40.6	66.1 \pm 25.5 ^a	26.3 \pm 7.9 ^a

a: $P < 0.01$, compared with I/R group. HW: heart weight; AAR: area at risk; IS: infarct size.

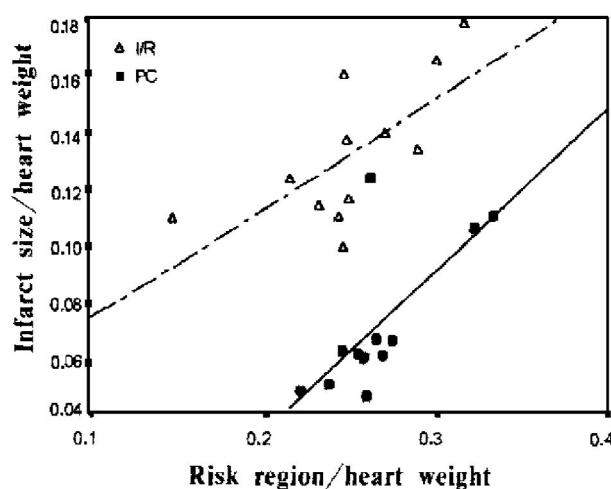


图 1. 缺血/再灌注组和缺血预处理组大鼠心肌梗死范围与缺血区域的关系。

Figure 1. The correlation between infarct size and risk region of I/R and PC groups in rats.

3 讨论

以往人们认为,短暂的心肌缺血造成心肌的可逆性损伤会使其更难以耐受再次缺血损伤,故多次短暂缺血必然发生累加而导致心肌坏死。但自 80 年代以来的研究发现,一定时间的反复短暂缺血不一定对心肌造成累加性不利影响。Murry 等在狗的在体实验中发现,4 次短暂的冠状动脉左旋支缺血可使心肌在随后的 40 min 缺血中得到保护。从而首次提出了缺血预处理的概念:即反复短暂缺血可以使心肌在后的持续性缺血中得到保护,从而减少心肌梗死面积。然后,缺血预处理这种内源性保护现象在多种属动物的心肌缺血/再灌注模型上得到证实^[4,5]。缺血预处理所需要的缺血时间及次数因动物种属而异。大鼠心脏的缺血预处理时间亦报道不一,但多数资料表明,3 次 5 min 缺血继之 5 min 再灌注进行缺血预处理是安全可靠的。本实验对大鼠心脏进行缺血预处理,可有效缩小心肌梗死面积。研究发现,缺血预处理的保护作用除表现为减少心肌梗死面积这一“金标准”以外,还表现在对缺血和再灌注后心电图的影响。在家兔的动物实验中,连续多次 5 min 的冠状动脉闭塞,ST 段抬高幅度下降^[6],而且与降低缺血程度及侧枝循环无关。在大鼠的实验中观察到,预处理可以减少缺血和再灌注的室性期前收缩、室性心动过速和心室纤颤的发生^[7]。另有学者报道相反^[8],给猪 4 次 15 min 缺血后其 ST 段进一步抬高,预处理使动作电位缩短,室颤阈降低,室颤的发生增加^[9]。其原因目前仍不清楚。本实验中在体大鼠心脏经预处理不仅可以减少缺血/再灌注后的心肌梗死面积,而且降低室性心律失常的发生率。在体及离体大鼠的实验表明,缺血预处理可以减轻缺血/再灌注损伤的心肌酶释放及脂质过氧化,起到保护心肌的作用。

随着缺血预处理研究的进展,人们将“缺血预处理可以减少心肌梗死面积”这一概念扩展到组织水平和细胞水平。培养的细胞实验研究中,无论是用缺氧或用氰化物抑制细胞代谢的方法来替代缺血,通过肌酸激酶的释放、苔盼兰的穿透性、细胞收缩力、细胞形态的变化来观察细胞膜的完整性和细胞的死亡,得出的结论一致^[10,11]。本实验用培养的乳鼠心肌细胞给予缺氧预处理,发现细胞脂质过氧化减少,LDH 释放减少,细胞存活率增高。

预处理的心肌保护机制尚不十分清楚,目前认

为是一种受体介导的现象。短暂的缺血激活一种或几种心肌细胞膜受体,通过一种或多种信号传导系统,作用于某种有效蛋白的磷酸化,最终导致心肌细胞能够耐受随后的持续缺血^[12]。

参考文献

- [1] Webster KW, Discher DJ, Bishopric NH, et al. Cardioprotection in and in vitro model of hypoxia preconditioning [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, **27**: 453-458
- [2] Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat-stress is associated with resistance to myocardial infarction [J]. *Circulation*, 1993, **88**: 1264
- [3] Schultz JE, Yao Z, Cavaletto I, et al. Glibenclamide-induced blockade of ischemic preconditioning is time dependent in intact rat heart [J]. *Am J Physiol*, 1997, **272**: H2607-H2615
- [4] Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ, et al. Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model? [J]. *Circulation*, 1995, **92**: 1546-1557
- [5] Hale SL, Kloner RA. Effect of ischemic preconditioning on regional myocardial blood flow in the rabbit heart [J]. *Coronary Artery Dis*, 1992, **3**: 133-140
- [6] Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Progressive decrease in the ST segment elevation during ischemic preconditioning: Is it related to recruitment of collateral vessels [J]? *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28**: 1493-1499
- [7] Lawson CS, Coltart DJ, Hearse DJ. "Does"-dependency and temporal characteristics of protection by ischemic preconditioning against ischemia-induced arrhythmias in rat hearts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, **25**: 1391-1402
- [8] Figueras J, Segura R, Bermejo B. Repeated 15-minute occlusions in pigs increase occlusion arrhythmias but decrease reperfusion arrhythmias that are associated with extracellular hypokalemia [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, **28**: 1589-1597
- [9] Ovize M, Aupetit JF, Rioufol G, et al. Preconditioning reduces infarct size but accelerates the time to ventricular fibrillation in ischemic pig hearts [J]. *Am J Physiol*, 1995, **269**: H72-H79
- [10] Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, et al. Preconditioning in rabbit cardiomyocytes: Role of pH, vacuolar protein ATPase and apoptosis [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 2391-2398
- [11] Strickler JS, Jacobsen KA, Liang BT. Direct preconditioning of cultured chick ventricular myocytes: Novel functions of cardiac adenosine A_{2A} and A₃ receptors [J]. *J Clin Invest*, 1996, **98**: 1773-1779
- [12] Przyklenk K, Kloner RA. Ischemic preconditioning exploring the paradox [J]. *Prog Cardiovasc Res*, 1998, **40**: 517-547

(此文 1999-08-10 收到, 2000-01-18 修回)

(此文编辑 文玉珊)