

预缺血对大鼠心肌缺血再灌注凋亡的影响

焦向英¹, 罗 宁², 赵荣瑞¹

(1. 山西医科大学生理学教研室; 2. 山西省肿瘤医院, 山西省太原市 030001)

[主题词] 预缺血; 再灌注损伤; 凋亡; 大鼠; 中性粒细胞; 一氧化氮

[摘要] 为观察大鼠心肌缺血再灌注的致凋亡作用和再灌注早期不同阶段中性粒细胞浸润与凋亡的关系及预缺血对凋亡的影响, 制备在体大鼠心肌缺血再灌注模型, 实验分为四组: 缺血+1 h 再灌注组、缺血+2 h 再灌注组, 缺血+3 h 再灌注组及预缺血组, 观察分析心功能、梗死面积、中性粒细胞计数、心肌髓过氧化物酶活性及凋亡指数等指标。结果发现, 缺血再灌注明显引起心脏功能损伤、中性粒细胞浸润和心肌细胞凋亡, 且随再灌注时间延长而加重, 预缺血明显减轻其损伤并抑制凋亡。心肌细胞凋亡与中性粒细胞浸润存在显著正相关关系。结果提示, 预缺血可通过减轻凋亡对心肌发挥保护作用。

[中图分类号] R364.12

[文献标识码] A

Effect of Ischemic Preconditioning on Ischemia/Reperfusion Induced Cardiomyocyte Apoptosis

JIAO Xiang-Ying¹, LUO Ning², and ZHAO Rong-Rui¹

(1. Department of Physiology, Shanxi Medical University; 2. Shanxi Tumor Hospital, Taiyuan 030001, China)

[MeSH] Ischemia; Reperfusion Injury; Apoptosis; Rats; Neutrophils; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate whether ischemia and reperfusion can induce cardiomyocytes apoptosis and the relation between polymorphnuclear neutrophils (PMN) infiltration and cardiomyocytes apoptosis. The effect of ischemic preconditioning on apoptosis was also investigated. **Methods** Forty-eight male Wistar rats were randomly assigned to one of the following four groups: I+ 1h R group, I+ 2h R group, I+ 3h R group and IP group. The following variables were measured: cardiac function, infarct size, PMN counts, myocardial myeloperoxidase activity and apoptotic cell index. **Results** Ischemia and reperfusion caused obvious cardiac function injury, PMN infiltration and cardiomyocytes apoptosis, and heart injury increased as the reperfusion continued; ischemic preconditioning significantly reduced heart injury and apoptosis. Correlative analysis between PMN count and apoptotic index suggested a significant positive correlation existed between PMN infiltration and cardiomyocyte apoptosis ($r = 0.943, P < 0.001$). **Conclusion** Ischemic preconditioning significantly reduced PMN infiltration and attenuated myocyte apoptosis.

预缺血 (ischemic preconditioning, IP) 作为心肌内源性保护机制, 可以明显减轻缺血再灌注引起的各种损伤^[1], 但其机制仍不明了。近来有研究表明, 在缺血再灌注引起的心肌细胞死亡中, 不仅有细胞坏死, 还有细胞凋亡的发生^[2,3]。为了探讨缺血再灌注时细胞凋亡发生的机制, 并对其进行干预, 我们设计进行了此项实验。

1 材料和方法

1.1 动物手术

选用雄性 Wistar 大鼠 48 只, 体重 250~300 g, 由本校实验动物中心提供。氨基甲酸乙酯 1 g/kg 腹腔麻醉, 经左颈总动脉插管至左心室, 监测室内压。开胸取冠状动脉左前降支起始段, 以 7-0 无创缝合针线结扎, 打一活结, 拉紧丝线造成缺血, 松开丝线恢复再灌注。手术后稳定 20 min, 随机分入各组进行实验。

1.2 实验分组

将大鼠随机分为四组: I+ 1R 组给予 30 min 缺血及 1 h 再灌注; ④I+ 2R 组给予 30 min 缺血及 2 h 再灌注; ④I+ 3R 组给予 30 min 缺血及 3 h 再灌注;

IP 组大鼠先给予两次 5 min 缺血和 10 min 再灌注作为预缺血, 随后给予 30 min 缺血及 3 h 再灌注。

1.3 观测指标

1.3.1 心功能 室内压信号输入计算机, 以 MS-302 生物信号分析系统 (广州药学院) 监测记录左心室内

[收稿日期] 2001-06-24 [修回日期] 2001-10-18

[作者简介] 焦向英, 男, 1973 年 9 月出生, 陕西富平人, 博士, 讲师, 主要从事心肌缺血再灌注损伤研究及教学工作。罗宁, 女, 1975 年 4 月出生, 山西太原人, 住院医师, 主要从事病理学研究。赵荣瑞, 男, 1931 年 3 月出生, 辽宁岫岩人, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心肌缺血、外周多巴胺受体、心肌受体自身抗体。

压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、心率(heart rate,HR)及左心室内压发展最大速率(dp/dtmax)。

1.3.2 梗死面积 常规以 Evan’s 蓝和 1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色区分心肌正常区、缺血区和梗死区,称重法测定。结果表达为缺血区/左心室(area at risk/left ventricular, AAR/LV)及梗死区/缺血区(necrosis area/area at risk, NEC/AAR)。

1.3.3 心肌髓过氧化物酶活性测定 根据 Mullane 等^[4]方法测定心肌髓过氧化物(myeloperoxidase, MPO)活性。心肌组织样品加入 10 倍体积的 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide(HTAB)溶液匀浆后于 12 000 g 4℃离心 30 min,吸取上清液于-20℃冰箱保存。测定时将上清液加入新鲜配制的含 0.167 g/L σ -dianisidine hydrochloride 和 0.0005% H₂O₂ 的 KH₂PO₄ 溶液中(50 mmol/L, pH=6),于 460 nm 处测定其光密度值的变化(第 2 min 与第 1 min OD 值之差),MPO 活性以 25℃下每分钟分解 1 μ mol 过氧化物作为 1 u。

1.3.4 中性粒细胞计数 取左心室心肌标本制备病理切片,光镜 100 倍下选取缺血区计数中性粒细胞(polymorphnuclear neutrophil, PMN)数目,每个心脏计数 2 张切片,每片计数 9 个区域。

表 1. 各组心脏血流动力学指标变化.

Table 1. Hemodynamic data of different groups ($\bar{x} \pm s$, n=12).

Index	Group	Baseline	Ischemia 15 min	Ischemia 30 min	Reperfusion 1 h	Reperfusion 2 h	Reperfusion 3 h
HR (beats/min)	I+ 1h R	336 $\pm$ 41	329 $\pm$ 56	329 $\pm$ 41	297 $\pm$ 27		
	I+ 2h R	350 $\pm$ 58	320 $\pm$ 59	327 $\pm$ 31	296 $\pm$ 35	285 $\pm$ 42	
	I+ 3h R	332 $\pm$ 55	326 $\pm$ 50	339 $\pm$ 63	326 $\pm$ 53	297 $\pm$ 52	274 $\pm$ 46
	IP	345 $\pm$ 65	354 $\pm$ 61	353 $\pm$ 62	358 $\pm$ 37	336 $\pm$ 44	323 $\pm$ 49 ^a
LVSP (kPa)	I+ 1h R	16.6 $\pm$ 1.8	13.3 $\pm$ 1.8	13.9 $\pm$ 0.8	12.8 $\pm$ 0.9		
	I+ 2h R	17.3 $\pm$ 1.8	14.3 $\pm$ 1.8	14.0 $\pm$ 1.0	13.1 $\pm$ 1.0	12.7 $\pm$ 1.0	
	I+ 3h R	16.8 $\pm$ 1.1	13.5 $\pm$ 1.0	13.3 $\pm$ 1.8	13.1 $\pm$ 1.0	12.7 $\pm$ 1.8	11.8 $\pm$ 1.9
	IP	16.3 $\pm$ 2.3	13.8 $\pm$ 2.3	13.6 $\pm$ 1.9	13.6 $\pm$ 1.9 ^a	13.6 $\pm$ 1.6 ^a	13.5 $\pm$ 1.4 ^a
+ dp/dt max (kPa/s)	I+ 1h R	684 $\pm$ 47	556 $\pm$ 71	495 $\pm$ 45	432 $\pm$ 36		
	I+ 2h R	729 $\pm$ 143	544 $\pm$ 79	496 $\pm$ 73	448 $\pm$ 47	387 $\pm$ 68	
	I+ 3h R	693 $\pm$ 95	524 $\pm$ 96	510 $\pm$ 56	489 $\pm$ 69	407 $\pm$ 59	359 $\pm$ 61
	IP	666 $\pm$ 152	572 $\pm$ 115	590 $\pm$ 98 ^a	562 $\pm$ 111 ^a	570 $\pm$ 103 ^a	518 $\pm$ 84 ^a
-dp/dt max (kPa/s)	I+ 1h R	504 $\pm$ 39	383 $\pm$ 52	352 $\pm$ 56	315 $\pm$ 53		
	I+ 2h R	508 $\pm$ 48	376 $\pm$ 66	375 $\pm$ 31	336 $\pm$ 42	300 $\pm$ 44	
	I+ 3h R	530 $\pm$ 39	397 $\pm$ 67	399 $\pm$ 43	356 $\pm$ 30	323 $\pm$ 50	286 $\pm$ 49
	IP	532 $\pm$ 43	408 $\pm$ 84	396 $\pm$ 61	404 $\pm$ 51 ^a	397 $\pm$ 44 ^a	380 $\pm$ 35 ^a

a: P<0.05, compared with I+ 3 h R group.

2.2 梗死面积

各组缺血面积比例基本一致,随再灌注时间延长,梗死面积逐渐扩大,而预缺血组梗死面积明显缩小(表 2, Table 2)。

1.3.5 dUTP 缺口末端标记阳性细胞计数 每组取 6 只大鼠,10% 甲醛 4℃固定,常规石蜡切片,切片经二甲苯、梯度酒精入水,蛋白酶 K 10 mg/L 37℃处理 30 min 后,使用 dUTP 缺口末端标记(terminal dUTP nick end labing, TUNEL) 凋亡检测试剂盒 (AKP 法) 检测凋亡,底物用 AP-red,苏木素复染后封片,光镜 100 倍下观察。阳性细胞核呈红色,阴性细胞核呈蓝色。随机选取切片缺血区(左心室左侧壁)6 个区域,计数凋亡细胞占心肌细胞总数的百分比作为凋亡指数(apoptotic index, AI),以评价凋亡程度。

1.4 数据处理

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异比较使用单因素方差分析,两两比较使用 Student-Newmarr-Keuls 比较,以 P<0.05 为差异显著,SPSS 统计软件处理。

2 结果

2.1 心功能变化

各组动物缺血前心功能均无明显差异,缺血后心功能明显下降,恢复再灌注后心功能进一步下降,并随再灌注时间延长而加重,而预缺血组心功能损伤较缺血再灌注组明显减轻(表 1, Table 1)。

2.3 中性粒细胞计数

切片观察表明,各组正常心肌区域很少见 PMN 浸润,而缺血区明显可见 PMN 浸润。再灌注早期,PMN 浸润集中于血管内,随再灌注时间延长,PMN

表 2. 各组缺血及梗死面积比较.

Table 2. Comparison of risk area and necrosis area among four groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$, %).

Groups	ARR/LV	NEC/ARR
I+ 1h R	58.44 $\pm$ 8.86	38.93 $\pm$ 5.09
I+ 2h R	47.46 $\pm$ 8.58	42.26 $\pm$ 5.34
I+ 3h R	47.10 $\pm$ 4.60	41.98 $\pm$ 4.23
IP	49.09 $\pm$ 3.06	20.37 $\pm$ 6.12 ^a

a: $P < 0.05$, compared with I+ 3h R group.

向血管外移动,至再灌注 3 h 时,中性粒细胞浸润主要位于血管外心肌细胞间,且浸润程度随再灌注时间延长而明显加重,而预缺血组 PMN 浸润程度明显减轻(表 3, Table 3)。

2.4 心肌髓过氧化物酶活性

随再灌注时间延长,缺血区 MPO 活性升高,而预缺血组 MPO 活性明显降低(表 3, Table 3)。

2.5 TUNEL 阳性细胞计数

TUNEL 阳性细胞多见于梗死区中心及周边,且绝大多数是心肌细胞。TUNEL 显示,在 I+ 1 h 组即可见凋亡细胞,随再灌注时间延长,凋亡细胞数目增加,而预缺血组凋亡细胞的数目明显减少(表 3, Table 3)。

表 3. 各组中性粒细胞计数、髓过氧化物活性及凋亡指数比较.

Table 3. Comparison of polymorphnuclear neutrophils counts, cardiac myeloperoxidase activity and myocytes apoptosis among four groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$).

Groups	PMN count	MPO activity (u/g)	Apoptotic Cell (%)
I+ 1h R	159 $\pm$ 15 ^a	2.71 $\pm$ 0.46 ^a	26.48 $\pm$ 7.61
I+ 2h R	191 $\pm$ 20	3.36 $\pm$ 0.39	31.17 $\pm$ 5.01
I+ 3h R	211 $\pm$ 26	3.73 $\pm$ 0.33	33.89 $\pm$ 6.18
IP	102 $\pm$ 14 ^a	1.86 $\pm$ 0.45 ^a	10.14 $\pm$ 2.75 ^a

a: $P < 0.05$, compared with I+ 3h R group.

2.6 中性粒细胞浸润程度与心肌细胞凋亡的相关分析

以 PMN 计数代表 PMN 浸润程度,以大鼠心肌 TUNEL 阳性细胞计数代表凋亡程度,相关分析发现,两者呈现显著正相关关系($r = 0.943$, $P < 0.001$) (图 1, Figure 1)。

3 讨论

本研究使用 TUNEL 方法对心肌细胞凋亡情况

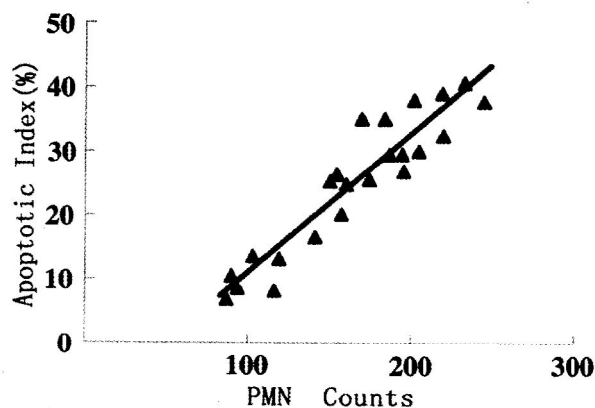


图 1. 心肌细胞凋亡指数与中性粒细胞计数的相关分析.

Figure 1. Correlation between PMN counts and caedimyoocytes apoptosis.

进行了测定,结果表明,在缺血再灌注引起的心肌细胞死亡即心肌梗死中,同时有细胞坏死和凋亡的发生。凋亡在缺血 30 min 再灌注 1 h 时出现,且随着再灌注时间的延长,凋亡细胞的数目也增加,说明再灌注可以诱发心肌细胞凋亡。研究还表明,凋亡细胞主要分布于梗死区中心及周边,结合 Fliss 等^[5]的研究,我们推测缺血早期细胞死亡以凋亡为主,梗死中心的凋亡主要由缺血所诱发,缺血持续加重造成细胞内能量耗竭,才使损伤心肌发生坏死,而梗死区周边的凋亡主要由再灌注所诱发,再灌注后恢复了血液供应,因而损伤的细胞获得能量得以启动凋亡而发生死亡,再灌注造成了额外的心肌细胞损伤。

我们的研究表明,随着再灌注时间的延长,再灌注区域 PMN 浸润逐渐加重,与凋亡的变化趋势一致,两者存在显著正相关关系。而大量的研究表明,PMN 在再灌注心肌的粘附、浸润是造成再灌注损伤的重要原因,活化的 PMN 可以产生大量的活性氧代谢物,包括 H_2O_2 、 O_2^- 及 $ONOO^-$ ^[6],这些物质均已证明可对心肌细胞造成损伤而诱发凋亡^[7]。

由于凋亡的发生是细胞的主动过程,凋亡早期的细胞仍有活力有功能,可以完成复杂的凋亡过程,因而可对各种信号通路发生反应,可能使用某些药物诱导这些细胞延缓甚至取消凋亡,由于凋亡早期的心肌细胞可能仍有收缩功能,因而延缓或减少其死亡对于再灌注后心脏功能的恢复具有十分重要的临床意义。有鉴于此,在本实验中,我们初步观察了预缺血对再灌注所致心肌细胞凋亡的影响。结果表明,预缺血作为心脏内源性保护机制,不仅可以减轻心肌坏死,同样可抑制心肌细胞凋亡的发生,这与 Gottlieb 等^[8]在离体实验中的结果一致,这可能与预

缺血减轻了再灌注区域 PMN 的浸润,减少活性氧代谢物的生成及损伤,从而减轻了凋亡的发生有关。

[参考文献]

- [1] Li YW, Whittaker P, Kloner RA. The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J*, 1992, **123**: 346-353
- [2] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 1996, **74**: 86-107
- [3] Sharov VG, Sabban HN, Shimoyama H, et al. Evidence of cardiomyocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*, 1996, **148**:

141-149

- [4] Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods*, 1985, **14**: 157-167
- [5] Fliss H, Gaattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 1996, **79**: 949-956
- [6] Jordan JE, Zhao ZQ, Johansen JV. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1999, **43**: 860-878
- [7] Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*, 1999, **99**: 2 934-941
- [8] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 1 621-628

(此文编辑 文玉珊)