

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0426-03

镁对缺血再灌注心脏内皮细胞功能和血小板活化的影响

杨贵荣¹, 董果雄², 张社华³, 张薇¹

(1. 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012; 2. 青岛大学医学院附属医院心内科, 山东省青岛市 266003; 3. 青岛大学医学院中心实验室, 山东省青岛市 266021)

[关键词] 病理生理学; 镁对内皮细胞和血小板的影响; 放射免疫法; 缺血再灌注; α 颗粒膜蛋白 140; 一氧化氮; 兔[摘要] 为探讨心肌缺血再灌注时内皮细胞功能和血小板活化状态及硫酸镁对它们的影响, 将新西兰大耳白兔 32 只分为 4 组。对照组在左冠状动脉前降支中上 2/3 处穿线; 缺血组于同一位置持续结扎血管; 再灌注组及治疗组结扎 0.5 h 后再灌注。治疗组于结扎后静滴硫酸镁溶液, 其余各组静滴等量生理盐水。于结扎前、缺血 0.5 h、再灌注 1 h 及 4 h 采血, 用火焰原子吸收法测定血浆 Mg^{2+} 浓度, 硝酸还原酶法测定血浆一氧化氮浓度, 放射免疫法测定血小板表面 α 颗粒膜蛋白 140。发现: 对照组手术前后血浆 Mg^{2+} 、一氧化氮浓度和血小板表面 α 颗粒膜蛋白 140 分子数差别无统计学意义 ($P > 0.05$); ④缺血组、再灌注组心肌缺血 0.5 h, 血浆 Mg^{2+} 、一氧化氮浓度较术前及对照组相应时间显著降低 ($P < 0.05$), 并随时间延长呈进行性下降, 而血小板表面 α 颗粒膜蛋白 140 分子数显著升高 ($P < 0.05$), 并随时间延长进一步上升; ④治疗组应用硫酸镁后, 血浆 Mg^{2+} 、一氧化氮浓度较缺血组、再灌注组相应时间明显升高, 而血小板表面 α 颗粒膜蛋白 140 分子数明显降低, 但仍高于对照组 ($P < 0.05$)。提示缺血再灌注过程中存在内皮细胞功能损伤及血小板活化, 硫酸镁可能有保护内皮细胞和抑制血小板活化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Magnesium on Endothelium and Platelet Activation in Rabbit Model with Ischemia-Reperfusion of Heart

YANG Gui Rong¹, DONG Guo Xiong², ZHANG She Hua³, and ZHANG Wei¹

(1. Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012; 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003; 3. Central Laboratory, Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China)

[KEY WORDS] Myocardial Reperfusion Injury; Alpha-granule Membrane Protein 140; Nitric Oxide; Rabbits; Endothelium; Magnesium Sulfate

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the endothelial function and platelet activation during myocardial ischemia-reperfusion injury and the protective effect of magnesium. **Methods** Thirty-two rabbits were randomly divided into four groups. In control group the left anterior descending coronary artery (LAD) was falsely ligated. In ischemia group the LAD was ligated. Rabbits in reperfusion group and therapy group underwent 0.5 h of LAD occlusion and 4 h of reperfusion. After LAD ligation rabbits in therapy group were intravenously given magnesium sulfate and rabbits in the rest groups were given 0.9% sodium chloride. The level of plasma Mg^{2+} , nitric oxide (NO) and the number of alpha-granule membrane protein 140 (GMP-140) molecule on platelet surface were measured before LAD ligation and after ischemia for 0.5 h, reperfusion for 1 h and 4 h. **Results** The plasma concentrations of Mg^{2+} , NO and the number of GMP-140 molecule on the platelet surface in control group were of no statistical difference before and after false LAD ligation ($P > 0.05$); ④The level of Mg^{2+} , NO were significantly decreased and the number of GMP-140 molecule on platelet surface was increased after myocardial ischemia/ischemia-reperfusion in ischemia group, reperfusion group compared with those before LAD ligation and those at the same time in control group ($P < 0.05$); ④The level of Mg^{2+} , NO was increased and GMP-140 was decreased in therapy group compared with those in ischemia group and reperfusion group ($P < 0.05$). **Conclusions** It suggests that there is endothelial dysfunction and platelet activation during ischemia-reperfusion. Sulfate magnesium might be useful in protecting endothelium and inhibiting platelet activation.

急性心肌梗死后, 溶栓及介入治疗重建冠状动

脉血流供应已成为有效的治疗手段。然而, 再灌注早期冠状动脉血流的快速恢复可引起心肌进一步损伤。其发生与多种因素有关。本实验通过观察内皮细胞和血小板在缺血及再灌注期的变化, 探讨缺血再灌注损伤的发生机制及硫酸镁对该病理过程的影响。

[收稿日期] 2002-12-21 [修回日期] 2003-06-05

[作者简介] 杨贵荣, 女, 1972 年出生, 山东省乐陵市人, 在读博士研究生, 从事冠心病的基础与临床研究, 联系电话: 0531-2920944, E-mail: yanggr2001@163.com。董果雄, 男, 1957 年出生, 山西省洪洞县人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础与临床研究, 联系电话: 0532-5953696。张社华, 女, 1957 年出生, 山西省洪洞县人, 副教授, 主要从事冠心病的基础研究。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

新西兰大耳白兔, 体重 3~4 kg, 由青岛市药品检验所提供。以 25% 的乌拉坦按 50 mg/kg 麻醉后, 常规消毒, 铺巾, 分离颈静脉供取血用。多导电生理记录仪监测体表心电图。

32 只兔随机均分为 4 组。对照组: 胸骨正中线第 2~4 肋间开胸, 剪开心包, 暴露心脏, 在冠状动脉左前降支中上 2/3 处穿线, 不结扎; 缺血组: 于同一位置持续结扎至实验结束; 再灌注组: 结扎 0.5 h 后剪断缝线再灌注 4 h; 治疗组: 动物模型同再灌注组, 但于结扎后由耳缘静脉经电子蠕动泵于 1 h 内匀速滴入硫酸镁 (400 mg/kg 体重) 治疗, 硫酸镁溶于 20 mL 生理盐水中。其余各组于相应时间内滴入等量生理盐水。

1.2 仪器及试剂

AA-670 型原子吸收分光光度计, 系日本岛津公司产; LKB-1275 型 γ 计数仪, 系芬兰 WALLAC 公司产; Miniplus 2 型电子蠕动泵, 为法国 CSA 公司产。25% 硫酸镁注射液 (10 mL/支), 由山东医药公司天福制药厂产, 批号 9803161; 血小板表面 α 颗粒膜蛋白 140 试剂盒, 由苏州医学院止血与血栓研究室提供; 血浆一氧化氮试剂盒, 由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 测定方法

于结扎前、结扎 0.5 h、再灌注 1 h 及 4 h 取血

3.6 mL。其中 1.8 mL 以肝素抗凝, 2 000 r/min 离心 10 min, 取血浆, 用火焰原子吸收法测定血浆 Mg^{2+} 浓度, 硝酸还原酶法测定血浆一氧化氮浓度。余 1.8 mL 血以依地酸二钠抗凝, 用放射免疫法测定血小板表面 α 颗粒膜蛋白 140。

1.4 统计学分析

各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析及 Q 检验进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结果

2.1 血浆 Mg^{2+} 和一氧化氮浓度变化

对照组冠状动脉前降支假结扎前后血浆 Mg^{2+} 、一氧化氮浓度无显著差异 ($P > 0.05$), 提示手术本身对实验过程基本无影响。缺血组及再灌注组冠状动脉前降支结扎 0.5 h 后, 血浆 Mg^{2+} 、一氧化氮浓度较结扎前及对照组同一时间显著降低 ($P < 0.05$), 并随缺血或再灌注时间延长进一步下降。治疗组在冠状动脉前降支结扎 0.5 h 后, 血浆一氧化氮浓度较结扎前及对照组同一时间显著降低 ($P < 0.05$), 再灌注 1 h、4 h 与缺血 0.5 h 比较无差异, 较缺血组及再灌注组同一时间显著提高, 但未达对照组相应水平; 应用硫酸镁 0.5 h 后血浆 Mg^{2+} 浓度较结扎前及对照组同一时间显著升高, 再灌注 1 h、4 h 较结扎前及对照组同一时间极显著升高。见表 1、表 2 (Table 1, Table 2)。

表 1. 兔血浆 Mg^{2+} 浓度变化

Table 1. Changes of Mg^{2+} concentration in rabbits ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	n	结扎前	结扎 0.5 h	再灌注 1 h	再灌注 4 h
对照组	8	1.26 ± 0.26	1.17 ± 0.27	1.12 ± 0.28	1.13 ± 0.25
缺血组	8	1.24 ± 0.29	0.98 ± 0.19 ^{ac}	0.84 ± 0.24 ^{ac}	0.72 ± 0.26 ^{bd}
再灌注组	8	1.28 ± 0.24	1.01 ± 0.27 ^{ac}	0.86 ± 0.23 ^{ac}	0.74 ± 0.21 ^{bd}
治疗组	8	1.17 ± 0.21	1.52 ± 0.26 ^{ac}	2.51 ± 0.29 ^{bd}	2.31 ± 0.28 ^{bd}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与结扎前比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与对照组同一时间比较。

表 2. 兔血浆一氧化氮浓度变化

Table 2. Changes of nitric oxide concentration in rabbits ($\bar{x} \pm s$, μ mol/L)

分 组	n	结扎前	缺血 0.5 h	再灌注 1 h	再灌注 4 h
对照组	8	138.01 ± 15.54	142.52 ± 18.03	145.51 ± 16.25	136.66 ± 17.31
缺血组	8	136.44 ± 16.80	101.93 ± 8.86 ^{ac}	73.58 ± 18.34 ^{bd}	54.24 ± 16.93 ^{bd}
再灌注组	8	133.78 ± 13.58	108.16 ± 15.60 ^{ac}	85.03 ± 16.83 ^{bd}	55.46 ± 30.60 ^{bd}
治疗组	8	132.50 ± 14.40	107.65 ± 21.13 ^{ac}	114.29 ± 19.77 ^{ac}	108.55 ± 11.09 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与结扎前比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与对照组同一时间比较。

2.2 血小板表面 α 颗粒膜蛋白140变化

对照组各时间血小板表面 α 颗粒膜蛋白140无显著差异($P > 0.05$)。缺血组及再灌注组在冠状动脉前降支结扎0.5 h后,血小板表面 α 颗粒膜蛋白140上升,并随时间延长而进一步增加,与结扎前及对照组同一时间相比均有显著差异。治疗组在冠状

动脉前降支结扎0.5 h后,血小板表面 α 颗粒膜蛋白140较结扎前及对照组同一时间显著升高($P < 0.05$),再灌注1 h、4 h维持在结扎0.5 h时水平,显著高于对照组同一时间,但较缺血组及再灌注同一时间显著下降(表3, Table 3)。

表3. 兔血小板表面 α 颗粒膜蛋白140变化(单位:分子数/血小板)

Table 3. Changes of alpha granule membrane protein 140 on platelet surface in rabbits ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	结扎前	缺血0.5 h	再灌注1 h	再灌注4 h
对照组	8	778.32 ± 132.59	852.01 ± 169.87	840.38 ± 182.28	865.74 ± 415.23
缺血组	8	760.63 ± 260.52	1298.38 ± 325.15 ^{ac}	2232.54 ± 538.11 ^{bd}	3309.88 ± 774.22 ^{bd}
再灌注组	8	748.00 ± 360.05	1275.32 ± 511.75 ^{ac}	2152.54 ± 796.06 ^{bd}	3224.79 ± 1016.98 ^{bd}
治疗组	8	755.12 ± 286.09	1278.25 ± 519.30 ^{ac}	1246.27 ± 288.42 ^{ac}	1150.23 ± 209.78 ^{ac}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与结扎前比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与对照组同一时间比较。

3 讨论

内皮源性舒张因子(endothelium derived relaxing factor, EDRF)即一氧化氮(nitric oxide, NO),为血管内皮细胞分泌的重要舒血管物质之一,是心血管系统新型信使分子,在体内由一氧化氮合酶催化氧和L-精氨酸生成。实验表明,缺血再灌注时血浆一氧化氮浓度降低,可能原因有:缺血时,血流量下降,氧、L-精氨酸等合成NO的原料缺乏;④缺血再灌注过程中,缺氧后恢复血氧供应使细胞内钙超载,内皮细胞发生坏死或功能紊乱,合成NO的能力降低;④再灌注时产生的大量氧自由基使NO灭活加速。

血小板 α 颗粒膜蛋白140(granule membrane protein 140, GMP-140)属粘附分子选择素家族^[1,2],是反映血小板活化与释放的最具特异性的分子标志物^[3]。实验结果表明,缺血使血小板表面GMP-140增加,再灌注恢复血液供应并不能使缺血期增高的血小板表面GMP-140立即恢复正常,提示血小板活化可能参与缺血再灌注损伤。GMP-140在缺血再灌注过程中增高的原因可能为:恢复血氧供应时产生的大量氧自由基破坏了血小板膜及颗粒膜的稳定性;血浆一氧化氮水平下降,对GMP-140的抑制作用降低^[4];活化的中性粒细胞产生的组织因子对其表达也可能有诱导作用。血小板表面GMP-140与血小板黏附聚集功能有良好的相关性^[5],可作为病情演变及估计预后的指标。

人们早就观察到镁与缺血性心脏病的关系。本次实验结果提示,缺血及再灌注使血浆 Mg^{2+} 浓度下降。血浆 Mg^{2+} 60%~80%与三磷酸腺苷结合存在,

而三磷酸腺苷可与磷酸肌酸互相转化,血浆 Mg^{2+} 下降可能与病理情况下三磷酸腺苷缺乏、磷酸肌酸含量减少、拮抗钙离子进入细胞内以及心肌缺血时交感神经兴奋、镁利用增加等有关。

体外实验表明,保护内皮细胞可使NO合成增加^[6]。本次实验显示,应用硫酸镁后,血浆NO浓度增加,而血小板表面GMP-140下降,提示硫酸镁对缺血再灌注损伤有保护作用,部分是通过保护内皮细胞和抑制血小板活化实现的。可能的作用机制有: Mg^{2+} 能对抗自由基生成,直接促进自由基清除,或通过增强超氧化物歧化酶及过氧化物酶活性间接加强自由基清除;还能调整细胞内外离子流向,引起细胞膜超极化,从而稳定内皮细胞及血小板膜;亦能拮抗钙离子,防止内皮细胞及血小板内钙超载,从而保护内皮细胞及抑制血小板活化。

[参考文献]

- McEver RP. Leukocyte interaction mediated by selectins. *Thromb Haemostas*, 1991, **66** (1): 80-87
- Guidollet J, Chignier E, Pillot P. Enhanced expression of P-selectin (CD62P) by endothelial cells seeded onto synthetic arterial prostheses (PET, Dacron) is correlated with leukocyte interactions. *J Biomed Mater Res*, 1999, **44** (2): 156-161
- McEver RP, Beckstedt JH, Moore KL. GMP-140, a platelet granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelium cells and is located in Weibel-palade bodies. *J Clin Invest*, 1989, **84** (1): 92-99
- 吕以杰, 张丽华, 颜淑红, 张峰, 朱世明. 脑梗死并高脂血症患者血浆P-选择素水平的变化及降脂干预. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 152-155
- 于化鹏, 刘兰平, 王均, 古国贤. 肺心病患者血小板膜蛋白P-selectin与血小板功能的变化. *中华内科杂志*, 1995, **34** (1): 13-15
- 尹小川, 刘建康, 周序璇, 胡黎平, 李朝红, 邓漪平. 三七总皂甙对培养的猪主动脉内皮细胞释放一氧化氮的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (1): 20-23

(此文编辑 曾学清)