

温血诱导心脏停跳及复跳前再灌注对 幼兔心肌的保护作用

蓝斌¹, 张希², 李木泉¹, 姚尖平²

(1. 汕头市中心医院心胸外科, 广东 汕头 515031; 2. 中山大学附属第一医院心胸外科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨温血诱导停跳及复跳前再灌注对未成熟心肌的保护作用。【方法】16只(2~3周)健康幼兔各分为对照组(冷晶体停跳液诱停)和实验组(温血诱停及再灌注)。采用幼兔离体心脏模型, 分别检测两组心肌超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、腺苷三磷酸(ATP)水平, 心肌水质量分数 $w_{\text{水}}$ 和心肌细胞超微结构的变化。【结果】心肌的MDA质量摩尔浓度 m_{MDA} , 实验组(331.42±40.40) nmol/g、对照组(334.42±41.47) nmol/g ($P>0.05$); 心肌的SOD比活性 z/m , 实验组(397.5±48.8) U/g、对照组(397.2±48.7) U/g ($P>0.05$); 心肌的ATP质量分数 w_{ATP} , 实验组(139.3±31.9) $\mu\text{g/g}$ 、对照组(138.7±21.5) $\mu\text{g/g}$ ($P>0.05$); 心肌水质量分数, 实验组(63.81±2.45)%、对照组(66.96±2.44)% ($P<0.01$)。温血诱停及复跳前再灌注后, 心肌细胞线粒体、细胞核等超微结构均得到较好保护。【结论】温血诱导停跳及再灌注和冷晶体停跳液, 对未成熟心肌能量代谢和减轻缺血再灌注损伤方面的保护作用相同; 但前者对心肌细胞超微结构的保护作用较好, 细胞水肿程度较为轻微。

关键词: 模型, 心血管; 心脏停搏, 人工; 心肌再灌注; 心肌再灌注损伤; 心麻痹液; 兔/外科学; 兔/生理学

中图分类号: R654.2; R36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)05-0394-03

Myocardial Protection Effects of Warm Induction and Reperfusion with Blood Cardioplegia in Neonatal Rabbits LAN Bin¹, ZHANG Xi², LI Mu-quan¹, YAO Jian-ping². (1. Department of Cardiothoracic Surgery, Shantou Central Hospital, Shantou 515031, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the myocardial protection effects of warm induction and reperfusion with blood cardioplegia in immature myocardium. 【Methods】Sixteen neonatal rabbits, 2~3 weeks old, were divided into two groups: the control group (cold induction with crystalloid cardioplegia) and the experimental group (warm induction and reperfusion with blood cardioplegia). An isolated heart model of neonatal rabbits was established in this study. Some indexes such as myocardial superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde(MDA) content, adenosine triphosphate(ATP) content, water content(mass), and myocardial ultrastructure were observed in these two groups. 【Results】Molality of myocardial MDA was (331.42±40.40) nmol/g in the experimental group and (334.42±41.47) nmol/g in the control group respectively ($P>0.05$); Specific activity of myocardial SOD was (397.5±48.8) U/g in the experimental group versus (397.2±48.7) U/g in the control group ($P>0.05$); Mass fraction of myocardial ATP was (139.3±31.9) $\mu\text{g/g}$ in the experimental group and (138.7±21.5) $\mu\text{g/g}$ in the control group ($P>0.05$); Mass fraction of myocardial water was (63.81±2.45)% in the experimental group and (66.96±2.44)% in the control group ($P<0.01$). The myocardial ultrastructure was better protected by warm induction and reperfusion with blood cardioplegia. 【Conclusion】Both warm induction and reperfusion with blood cardioplegia or with cold crystalloid cardioplegia can improve myocardial energy metabolism and reduce the ischemia reperfusion injury for immature myocardium. The myocardial ultrastructure could be better protected by warm induction and reperfusion with blood cardioplegia.

Key words: models, cardiovascular; heat arrest, induced; myocardial reperfusion; myocardial reperfusion injury; cardioplegic solutions; rabbits/ surgery; rabbits/ physiology

近年来, 随着对未成熟心肌保护基础和临床研究的深入, 人们发现未成熟心肌具有与成年心肌完全不同的细胞结构和代谢特性。本实验采用幼兔离体心脏膜型, 用温血停跳液诱导停跳, 以及复跳

前再灌注与冷晶体停跳液比较, 观察幼兔心肌的氧自由基、能量代谢和细胞超微结构的变化, 旨在探索更适合未成熟心肌的保护方法。

收稿日期: 2002-06-08

基金项目: 汕头市重点科技基金资助项目(2000-90)

作者简介: 蓝斌(1962-), 男, 广东汕头人, 硕士, 副主任医师; 张希, 导师, 教授。

©1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1 材料与方 法

1.1 分 组

16只健康新西兰幼兔,2~3周龄,(167±15)g(由中山大学实验动物中心提供),雌雄不拘。随机分为两组:对照组(冷晶体停跳液组 $n=8$):用4℃St. Thomas 停跳液诱导停跳,缺血期间定时冷晶体停跳液灌注。实验组(温血诱信及再灌注组 $n=8$):用温血停跳液诱导停跳,缺血期间定时冷血信跳液灌注,复跳前低钾温血停跳液再灌注。两组幼兔的体质量无统计学差异。

1.2 方 法

新西兰幼兔,肝素化(3 mg/kg),乙醚吸入麻醉,10 min 内迅速开胸取出心脏,置于4℃K-H 液中,插入固定主动脉灌注针,连接到 Langendorff 灌注装置上;灌注37℃K-H 液(灌注压7.8 kPa),心脏复跳。从主动脉顺行灌注4℃St. Thomas II(对照组),37℃温血停跳液(实验组)(15 mL/kg,灌注压5.3 kPa),心脏停跳,置于4℃K-H 液中,局部降温;缺血60 min,缺血期间每20 min 冷停跳液灌注一次;60 min 后心脏复温,复灌37℃K-H 液,心脏复跳(实验组复跳前用温血停跳液灌注一次),再灌注20 min。含血停跳液的配制:从同种新西兰大白兔取血,与St. Thomas II按1:1比值混合;K⁺浓度:诱导停跳液为20 mmol/L,再灌注停跳液为8 mmol/L。

1.3 实验观察指标

①心肌再灌注损伤指标:缺血前和再灌注末分别切取心肌组织约100 mg,制成组织匀浆,测定心肌丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)。②心肌腺苷三磷酸(ATP)含量:缺血前和再灌注末分别切取心肌组织,制成组织匀浆,用高效液相色谱法测定心肌ATP含量。③心肌水质量分数(实验组 $w_{G,wt}$,对照组 $w_{G,wc}$):实验结束后称心脏湿质量后,用100℃烤箱烘干24 h后再称其干质量。按公式 $w_{G,wt \text{ or } wc} = (1 - \text{干质量} / \text{湿质量}) \times 100\%$ 计算心肌水质量分数。④心肌细胞超微结构:实验结束后即切取心尖组织固定,包埋,超薄切片染色后,电镜观察超微结构改变。

1.4 统计学方法

采用SPSS 9.0软件包。计量资料均以均数±标准差表示;采用的检验方法包括两独立样本和配对 t 检验;统计学检验水准 α 取0.05。

2 结 果

2.1 心肌再灌注损伤指标

缺血前和再灌注末实验组心肌MDA质量摩尔浓度分别与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两组再灌注末心肌MDA质量摩尔浓度较缺血前明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);再灌注末与缺血前心肌MDA质量摩尔浓度差值实验组与对照组接近,差异无统计学意义($P>0.05$),表1。

表1 缺血前和再灌注末心肌MDA质量摩尔浓度差值比较
Table 1 Molality of myocardial MDA before ischemia and at the end of reperfusion [$m_{G,MDA} / (\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1})$]

Groups	n	Baseline	Reperfusion	Difference
Control	8	169.08±20.99	334.42±41.47 ²⁾	163.34±25.35
Test	8	159.50±23.09 ¹⁾	331.31±40.40 ^{1),2)}	168.55±31.34 ¹⁾

Compared with control group, 1) $P>0.05$; Compared with baseline, 2) $P<0.01$

缺血前和再灌注末实验组心肌SOD比活性分别与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两组再灌注末心肌SOD比活性较缺血前减少,差异有统计学意义($P<0.05$);再灌注末与缺血前心肌SOD比活性差值实验组与对照组接近,差异无统计学意义($P>0.05$),表2。

表2 缺血前和再灌注末心肌SOD比活性差值
Table 2 Specific activity of myocardial SOD before ischemia and at the end of reperfusion [$z / m(\text{SOD}) / (\text{U} \cdot \text{g}^{-1})$]

Groups	n	Baseline	Reperfusion	Difference
Control	8	47.57±4.93	39.72±4.87 ²⁾	8.55±4.60
Test	8	47.07±4.24 ¹⁾	39.75±4.88 ^{1),2)}	8.45±3.5 ¹⁾

Compared with control group, 1) $P>0.05$; Compared with baseline, 2) $P<0.05$

2.2 心肌的ATP质量分数

缺血前和再灌注末实验组心肌ATP质量分数分别与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);两组缺血前心肌ATP质量分数与再灌注末比较,差异无统计学意义($P>0.05$);再灌注末与

缺血前心肌 ATP 质量分数差值实验组与对照组接近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表 3。

表 3 缺血前和再灌注末心肌 ATP 质量分数差值比较

Table 3 Mass fraction of myocardial ATP before ischemia and at the end of reperfusion [w_{ATP} ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)]

Groups	<i>n</i>	Baseline	Reperfusion	Difference
Control	8	15.54 ± 1.94	13.87 ± 2.15 ²⁾	1.65 ± 1.87
Test	8	15.36 ± 2.47 ¹⁾	13.93 ± 3.19 ^{1,2)}	1.41 ± 2.50 ¹⁾

Compared with control group, 1) $P > 0.05$; Compared with baseline, 2) $P > 0.05$

2.3 心肌水质量分数

再灌注末心肌水质量分数实验组为 $w_{G, wt} = (63.81 \pm 2.45)\%$, 对照组为 $w_{C, wt} = (66.96 \pm 2.44)\%$, 两组差异有显著性统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 再灌注末心肌超微结构

对照组大部分线粒体肿胀, 内嵴断裂, 较乱; 细胞核轻度肿胀, 核膜有皱缩; 肌节断裂、模糊, 糖原极少(图 1)。实验组大部分线粒体轻度肿胀, 内嵴断裂, 稍乱; 细胞核轻度肿胀, 核膜有皱缩, 但变形较轻; 肌节缩短、尚完整; 糖原减少(图 2)。

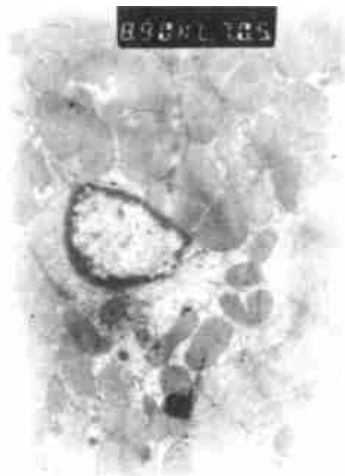


图 1 再灌注末对照组 ($\times 8900$)

Fig. 1 At the end of reperfusion in control group ($\times 8900$)

More reperfusion injury in myocardium of control group

3 讨论

自 20 年代以来, 深低温和冷晶体 St. Thomas 停跳液一直是婴幼儿心内直视手术中心肌保护的基础。随着对未成熟心肌保护理论研究和临床观察的深入, 人们认识到未成熟心肌具有与成熟心肌



图 2 再灌注末实验组 ($\times 8900$)

Fig. 2 At the end of reperfusion in test group ($\times 8900$)

Slighter reperfusion injury in myocardium of test group

不同的结构、代谢特性。温血灌注技术(warm heart surgery)在成人心脏手术中已取得较好效果, 但对未成熟心肌的保护作用是否优于传统的冷晶体停跳液, 目前尚存在不同看法^[1~3]。

本组实验结果显示: 用温血诱导心脏停跳及复跳前再灌注和冷晶体停跳液灌注后, 两组幼兔在心脏复跳后再灌注末的 MDA 含量均有一定程度的升高, SOD 含量有一定程度的降低; 组内缺血前与再灌注末的差异均有统计学意义, 而再灌注末的组间差异无统计学意义; 说明缺血后再灌注对无缺血未成熟心肌有一定程度的损伤; 温血灌注诱停和冷晶体停跳液对心肌缺血后再灌注损伤的保护作用相近。

在心肌细胞能量代谢方面, 结果显示两组幼兔缺血后心肌的 ATP 含量均能得到较好的恢复, 说明应用温血停跳液诱停再灌注和冷晶体停跳液对未成熟心肌均能提供相同的能量代谢保护作用, 这可能与未成熟心肌的特性有关^[4,5]。①健康的未成熟心肌在缺血前不存在能量储备不足, 具有较高的糖原颗粒和高能磷酸化合物储备。②在缺血期间心肌主要靠无氧酵解供能, 而未成熟心肌具有较高的糖原含量, 并且无氧酵解能力较强, 在缺血期间能产生较多的能量, 以满足心肌代谢的需要。③未成熟心肌 5'-核苷酸酶(5'-nucleotidase)含量较低, 这保证了缺血期间维持较高的 ATP 前体, 为在磷酸化提供较多的基质。④缺血期间, 未成熟心肌可通过氨基转移来获得更多的能量。这些结构和代谢特性使它对缺血缺氧具有较强的耐受能力。

(下转第 400 页 to page 400)

开了希望之门^[9, 10]。

沙眼衣原体是引起非淋球菌性尿道炎、阴道炎的主要病原体之一。长期以来分离培养一直作为诊断非淋球菌性尿道炎、阴道炎的主要方法。分离培养条件要求高,假阴性率高,不易推广。因此寻找建立特异、敏感、快速、准确的检测方法则变得非常迫切。可以预见,随着分子诊断概念和技术的发展与推广,F-PCR在沙眼衣原体的诊断、和疗效考察方面必将有广泛的应用。

(中山大学达安基因诊断中心的高劲松博士,邓文国博士生和许擎技师在实验过程中提供了很大帮助,在此诚挚谢意)

参考文献:

- [1] Livak K J, Fiod S J A, Mamaro J, *et al.* Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization [J]. *PCR Methods and Appl* 1995, 4(6): 357.
- [2] Lampe M F, Balkweber L M, Stamm W E. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to chlorhexidine gluconate gel. [J] *Antimicrob Agents Chemother*, 1998 42(7): 1726.

- [3] Holland P M, Abramson R D, Watson R, *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(16): 7276.
- [4] Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. *Biotechnology*, 1992, 10(4): 413.
- [5] Chen C H, Wang J T, Li C Z, *et al.* Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in human sera by branched-DNA signal amplification [J]. *J Virol Methods*, 1995, 53(1): 131.
- [6] Jalava T, Lehtovaara P, Kallio A, *et al.* Quantification of hepatitis B virus DNA by competitive amplification and hybridization on microplates [J]. *Biotechniques* 1993, 15(1): 134.
- [7] Nolte F S, Thummond C, Fried M W. Preclinical evaluation of AMPLICOR hepatitis C virus test for detection of hepatitis C virus RNA [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(7): 1775.
- [8] 李影,何蕴韶,程钢等.用荧光定量PCR方法检测转染细胞中外源基因的拷贝数[J].*中山医科大学学报*, 2001, 22(1): 8.
- [9] 苏学飞,左中越,程钢等.荧光定量PCR检测性病病原体的临床价值[J].*实用医学杂志*, 2001, 17(6): 561.
- [10] 李丹,杨力芳,钟梅等.实时定量PCR检测技术应用于孕妇人巨细胞病毒感染[J].*中国优生与遗传杂志*, 2000, 8(6): 4.

(编辑 黄小延)

(上接第 396 页 from page 396)

所以,对无缺氧的未成熟心肌,当缺血时间不长,心肌细胞自身的无氧酵解产能足以维持未成熟心肌缺血期间的能量需求;这时,传统的冷晶体停跳液就能使心肌得到较好的保护。

另外,实验结果还显示:温血诱停再灌注后心肌的含水量、细胞线粒体、细胞核等超微结构较用冷晶体停跳液好。这可能与含血停跳液具有较晶体停跳液高的胶体渗透压,而能起到减轻心肌细胞水肿的作用有关;同时用温血复跳前再灌注使冠状血管扩张,有利于冲洗无氧酵解产生的酸性产物(H^+ , CO_3^- 和乳酸),作为复跳前的预处理,并偿还氧债,为即将复跳的心脏提供良好的内环境。是否存在其它的作用机理有待进一步研究。

因此,温血诱导停跳及再灌注和冷晶体停跳液,对未成熟心肌能量代谢和减轻缺血再灌注损伤方面的保护作用相同;但前者对心肌细胞超微结构的保护作用较好,细胞水肿程度较为轻微。

参考文献:

- [1] Hammon J W Jr. Myocardial protection in the immature heart [J]. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60(5): 839.
- [2] Williams W G, Rebeyka I M, Tibshirani R J, *et al.* Warm induction blood cardioplegia in the infant: a technique to avoid rapid cooling myocardial contraction [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1990, 100(5): 890.
- [3] Jonas R A. Myocardial protection for neonatal and infants [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 46(suppl): 288.
- [4] Nishioka K, Jarmakani J M. Effect of ischemia on mechanical function and high-energy phosphates in rabbit myocardium [J]. *Am J Physiol*, 1982, 242(5): 1077.
- [5] Kofsky E, Juilia P, Buckberg G D. Studies of myocardial protection in the immature heart: V. Safety of prolonged aortic clamping with glutamate/aspartate blood cardioplegia [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1991, 101(1): 34.

(编辑 张敏瑞)