

# 热休克对大鼠缺血-再灌心肌的保护作用探讨<sup>①</sup>

谭红梅 吴伟康 罗汉川

(中山医科大学病理生理教研室; 广州, 510089)

**摘要** 目的: 从离体和在体两方面探讨热休克反应对缺血-再灌心肌的保护作用。方法: 实验采用 SD 大鼠, 随机分为热休克组和对照组。动物经热休克处理恢复 24 h 后, 离体部分取心进行 Langendorff 灌流, 复制缺血 30 min/再灌 30 min 的模型, 实验中全程记录心电图(ECG)及心肌收缩幅度, 并测定冠脉流出液的流量变化、肌酸激酶(CK)活性及丙二醛(MDA)含量; 在体部分行冠脉左前降支结扎/松绑术复制缺血 30 min/再灌 30 min 的模型, 实验全程记录 ECG 并测定 MDA 的含量。结果: 离体部分热休克组再灌注 2、5、10、15、20、30 min, 6 个时点心肌收缩幅度及冠脉流量的恢复率显著高于对照组, 再灌最初 5 min 内心律失常的发生率显著低于对照组, 再灌 30 min 时心肌内 MDA 的含量也显著低于对照组; 在体部分热休克组再灌最初 5 min 内心律失常的发生率及再灌 30 min 时心肌内 MDA 的含量均显著低于对照组。结论: 热休克反应对大鼠离体与在体的缺血-再灌心肌均有一定的保护作用。

**关键词** 热休克; 缺血再灌注损伤/病理生理学

**中图分类号** R 542.2

## PROTECTIVE EFFECT OF HEAT SHOCK RESPONSE ON MYOCARDIAL ISCHEMIA AND REPERFUSION INJURY IN RAT

Tan Hongmei Wu Weikang Luo Hanchuan

(Department of Pathophysiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract Objective:** To restore the supply of blood as early as possible is a basic way to rescue ischemic myocardium. But when blood supply restored after a certain time of ischemia, injured myocardium can't recover entirely, and more severe injury may occur. In this study, hearts of rats heat-shocked were examined for evidence of protection during ischemia and reperfusion. **Methods:** Rats were hyperthermia for 15 min to 42 °C. Twenty-four hours later their hearts were isolated and perfused by Langendorff method *in vitro*, or the left anterior descending coronary artery was ligated *via* a midline sternotomy and reperfused *in vivo*. The following items were examined: ① ECG, ② coronary flow and contractile force, ③ activity of CK, ④ concentration of MDA. **Results:** The coronary flow recovery and contractile force recovery of HS group were significantly higher than these of control group at 2, 5, 10, 15, 20 and 30 min of reperfusion, and the CK activity of effluent of HS group at 1, 5 and 20 min of reperfusion was significantly lower than that of control group *in vitro*. The incidence of arrhythmia in the first 5 min of reperfusion and the concentration of MDA at 30 min of reperfusion of HS group were significantly lower than these of control group *in vitro* and *in vivo*. **Conclusion:** The results suggested that heat shock response can protect against ischemia and reperfusion injury of rat heart *in vitro* and *in vivo*.

**Subject headings** heat shock; ischemia and reperfusion injury/pathophysiology

尽早恢复血流供应是挽救缺血心肌的根本途径, 但早在 50 年代就有人注意到了再灌所带来的

损伤现象。近 20 年来,随着介入心脏学的广泛开展,再灌损伤日益受到人们的重视<sup>[1]</sup>。许多科学工作者已在这方面做了大量工作,尝试了许多药物,如 $\beta$ 受体阻滞剂、自由基清除剂、钙离子拮抗剂等,由于再灌损伤的机制极其复杂,牵涉的因素很多,因而这些药物的疗效都不够理想<sup>[2]</sup>。在这种情况下,人们就想寻找一种内源性的心肌保护途径,即要激发心肌提高自身的防护能力。有学者发现热休克反应能减轻缺血-再灌对心肌的损伤,对心肌有保护作用。然而,目前有关热休克反应对心肌保护的研究方面尚存一些矛盾的结果,而且,目前关于热休克反应对离体心脏的作用研究较多,而对在体心脏研究较少,且矛盾结果主要发生在在体研究方面<sup>[3]</sup>。因此,我们同时从离体及在体两方面进行了实验,分别探讨了热休克反应对离、在体心肌的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

SD 大鼠,体质量 180~250 g,雌雄各半。由中山医科大学实验动物中心提供;丙二醛(MDA)测定试剂盒,由海军 421 医院抗衰老中心提供;肌酸激酶(CK)测定试剂盒,意大利 Sclavo 公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 热休克处理(H-S) 动物随机分为两组,热休克组(HS group)用 $\rho$ (戊巴比妥钠)=30 g/L 进行腹腔注射麻醉(45 mg/kg),放入 42 °C 温箱,以数字温度计监测肛温,等温度达 42 °C 时开始计时,维持 42~42.5 °C 达 15 min,然后于室温恢复 24 h;对照组(control group)除不加热外,余处理均相同。

1.2.2 离体大鼠心脏 Langendorff 缺血-再灌模型 采用主动脉插管,置入保温室内,进行主动脉灌流。灌流液为用 95% 的 O<sub>2</sub> 和 5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和的 Krebs-Hensleit 液。灌流液的压力和温度严格保持恒定[0.8 kPa, (37±0.5) °C],灌流量 8~10 mL/min。用蛙心夹夹住心尖,通过张力换能器在 LMS-2B 型二导生理记录仪上全程记录心肌收缩曲线,在主动脉根部及心尖部插入 ECG 电极,在二导生理仪上全程记录心脏电活动曲线。操作完毕

后,稳定预灌 10min,描记 10 min 正常活动曲线,然后缺血 30 min(灌流量为 1 mL/min),再灌 30 min。  
1.2.3 在体大鼠缺血-再灌模型<sup>[4]</sup> 用 $\rho$ (戊巴比妥钠)30 g/L 进行腹腔注射麻醉(45 mg/kg),做颈部正中切口,气管插管作机械通气,然后行胸骨正中切口,稳定 10 min,用 6 号医用缝针和 2 号医用缝线在冠状动脉左前降支起始部(相当于左心耳处)穿越冠状动脉深处作一待扎线,在待扎线表面垫一直径 1.5 mm 的塑料丝,再拉紧结扎,借助塑料丝压迫动脉,阻断循环,关闭胸腔,缺血 30 min。解除结扎时,先拔出塑料丝,再剪断结扎线,松绑再灌 30 min。实验中全程记录 II 导联心电图。

1.2.4 冠脉流量(coronary flow, CF)及其恢复率(coronary flow recovery) 于预灌第 10 min,即缺血(Is)0 min,再灌(Rp)第 1、2、5、10、15、20、30 min 各收集 1 min 流出液,精确量取体积,得各时点 CF (mL),并将后 7 个时点的 CF 与 Is 0 min 的 CF 相比得相应时点的冠脉流量恢复率(coronary flow recovery,  $R_{cf} / \{10^{-2}\} \cdot [1]$ )。

1.2.5 心肌收缩幅度(contractile force)及其恢复率(contractile recovery) 根据心肌收缩曲线,精确度量预灌第 10 min(即 Is 0 min)末,缺血第 30 min(Is 30 min)末,再灌第 1、2、5、10、15、20、30 min 末 9 个时点的心肌收缩幅度(mm),并将后 8 个时点的心肌收缩幅度与缺血 0 min 的心肌收缩幅度相比得相应时点的心肌收缩恢复率(contractile recovery,  $R_c / \{10^{-2}\} \cdot [1]$ )。

1.2.6 肌酸激酶(creatine kinase, CK)的测定 采用优化紫外分光光度法,按意大利 Sclavo 公司 CK 试剂盒说明书操作。收集 1 min 的流出液进行测定。

1.2.7 丙二醛(MDA)的测定 MDA 的测定采用 TBA 法<sup>[5]</sup>。

### 1.3 统计学方法

心律失常发生率的比较采用确切概率计算法,心肌收缩幅度及冠脉流量的变化采用重复测量分类数据分析,离体部分 CK 活性及 MDA 含量的变化采用重复测量数据方差分析,CK 活性及 MDA 含量采用两样本均数配对  $t$  检验。结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2 结果

### 2.1 离体部分

热休克对离体大鼠心肌收缩幅度的影响, 结果见图 1。

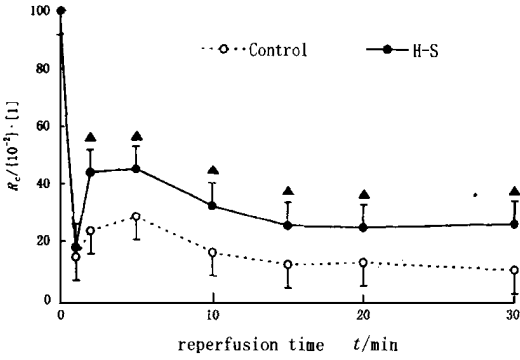


图 1 热休克对离体大鼠心肌收缩幅度的影响

Fig. 1 Effect of H-S on contractile force of isolated rat heart

①  $R_a$  contractile recovery. ② Contractile recovery of the isolated rat heart after 30 min of global ischemia. At each time point, contractility during reperfusion was expressed as a percentage of basal contractility. Bars represent one standard deviation of mean.  $n = 8$  for each group. Compared with control group,  $\blacktriangle P < 0.05$

热休克对离体大鼠冠脉流量的影响, 结果见图 2。

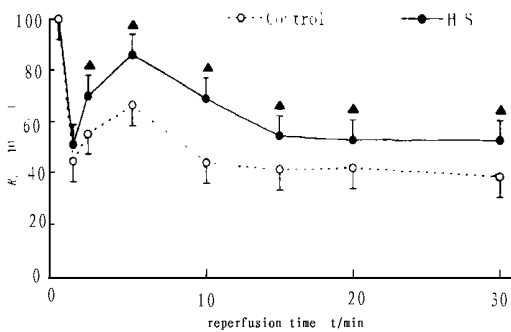


图 2 热休克对离体大鼠冠脉流量的影响

Fig. 2 Effect of H-S on coronary flow of isolated rat heart

①  $R_{cf}$ : coronary flow recovery. ② Changes in coronary flow after 30 min of global ischemia. Coronary flow was measured by collecting the coronary effluent. Flow at each time point was expressed as a percentage of baseline flow. Bars represent one standard deviation of mean.  $n = 8$  for each group. Compared with control group,  $\blacktriangle P < 0.05$

热休克对再灌最初 5 min 内心律失常发生率 (incidence of reperfusion arrhythmias, IRA) 的影响, 结果见表 1。热休克对再灌注流出液中 CK 活性的影响, 结果见表 2。

表 1 热休克对离体大鼠再灌最初 5 min 内心律失常发生率的影响

Table 1 Effect of H-S on IRA in the first 5 min of reperfusion of isolated rat heart

	$n$	Positive( $n_1$ )	IRA(%)
HS group	8	3	37.5 <sup>1)</sup>
C group	8	8	100

1) Compared with C group,  $P = 0.0256$

表 2 热休克对流出液中 CK 活性的影响

Table 2 Effect of H-S on CK activity in the ischemia-reperfusion myocardium ( $\lambda_{CK}/U^{\circ}L^{-1}$ )

$t/min$	C group ( $n = 8$ )	HS group ( $n = 8$ )
Is 0	— <sup>1)</sup>	— <sup>1)</sup>
Is 30	22.18 ± 16.43	28.75 ± 20.14
Rp 1	107.16 ± 52.40	59.87 ± 44.92 <sup>2)</sup>
Rp 5	354.44 ± 66.90	198.76 ± 60.52 <sup>2)</sup>
Rp 20	207.16 ± 64.36	130.47 ± 44.75 <sup>2)</sup>

1) —: Undetectable; 2) Compared with C group,  $P < 0.05$

热休克对离体大鼠缺血-再灌心肌 MDA 含量的影响。缺血 0 min、缺血 30 min、再灌 30 min, 分别取心室肌组织测 MDA 的含量, 结果见表 3。

表 3 热休克对离体大鼠缺血-再灌心肌 MDA 含量的影响

Table 3 Effect of H-S on MDA in the ischemia-reperfusion myocardium of isolated rat heart

$t/min$	C group <sup>1)</sup> ( $n = 8$ )	HS group <sup>1)</sup> ( $n = 8$ )
Is 0	54.8 ± 6.7	56.8 ± 8.8
Is 30	69.8 ± 9.4	64.2 ± 7.7
Rp 30	97.2 ± 9.6	74.0 ± 10.2 <sup>2)</sup>

1)  $m$  (MDA, 0.1g Mc)/nmol; 2) Compared with C group,  $P < 0.05$

### 2.2 在体部分

热休克对再灌最初 5 min 内心律失常发生率的影响, 结果见表 4。热休克对心肌内 MDA 含量 ( $MDA, 0.1g Mc$ )/nmol 的影响, 结果见表 5。

表4 热休克对再灌最初5 min内心律失常发生率的影响

Table 4 Effect of H-S on IRA in the first 5 min *in vivo*

	<i>n</i>	Positive( <i>n</i> <sub>1</sub> )	IRA(%)
HS group	7	2	28.57 <sup>1)</sup>
C group	8	7	87.5

D) Compared with C group *P* = 0.041

表5 热休克对在体心肌内MDA含量的影响

Table 5 Effect of H-S on MDA in myocardium *in vivo*

<i>t</i> / min	C group <sup>1)</sup> ( <i>n</i> = 7)	HS group <sup>1)</sup> ( <i>n</i> = 8)
Is 0 min	58.7 ± 10.2	56.0 ± 9.8
Rp 30 min	79.7 ± 13.4	65.2 ± 10.5 <sup>2)</sup>

D) *n* (MDA, 0.1 g Mc) / nmol; 2) Compared with C group *P* < 0.05

### 3 讨论

本实验同时从离体和在大体两部分探讨了热休克对大鼠缺血-再灌心肌的保护作用,从结果来看,离体部分热休克组再灌2、5、10、15、20、30 min 6个时点冠脉流量的恢复率均显著高于对照组,尤以再灌5 min时达到最高峰,这些结果显示,热休克处理能促进冠状动脉的再通与扩张,从而改善心肌血流的供应,尽快地恢复组织细胞的供氧,这是挽救缺血心肌的根本途径。再灌2、5、10、15、20、30 min 6个时点心肌收缩幅度的恢复率也均显著高于对照组,与冠脉流量的恢复率相一致,也以再灌5 min达到最高峰。这可能与恢复血流供应后,有氧代谢恢复,ATP生成增多,为心肌的收缩提供了能量来源有关。本实验离、在体部分结果还显示,热休克组再灌最初5 min内心律失常的发生率显著低于对照组,这一结果提示,热休克可能减少细胞膜损害,改善心肌细胞的离子交换,有利于维持细胞内外以及细胞器和细胞液之间的离子梯度,从而维持正常的电生理活动。这些结果与Currie和Stear的结果相一致<sup>5~7</sup>。

在判断心肌细胞的坏死程度上,酶逸出的多少是其指征之一,其中CK以灵敏度高、特异性强、发生变化时间早、持续时间长的特点而经常作为首选酶。临床上常把CK作为诊断心肌梗死和判断其梗死程度的指标之一<sup>8]</sup>。本实验离体部分结果显示,在缺血0 min时,两组动物流出液中均检测不到CK;缺血30 min

时,两组动物流出液中CK活性无显著性差异,而再灌1、5、20 min热休克组流出液中CK的活性均显著低于对照组,说明热休克处理组损伤明显轻于对照组,提示热休克处理能保护缺血-再灌心肌,减轻损伤程度。

再灌损伤中,自由基为其主要原因之一,而MDA的浓度为膜脂质过氧化损害程度的标志。离、在体实验都表明,在再灌30 min时,热休克组心肌内MDA含量均显著低于对照组。这也说明热休克处理能提高离、在体心肌的抗氧化能力,减少氧自由基的生成,减轻自由基所致的损伤。

上述结果提示,热休克反应对离、在体大鼠缺血-再灌心肌均有保护作用,能够促进再灌后心功能的恢复,增加冠脉流量,增强心肌收缩幅度,减少再灌时心律失常的发生率,减少离体灌流心肌细胞坏死所致的CK的外漏,减轻自由基损伤。若能在此基础上研究阐明其机制,把它合理地运用于临床,可能为心肌的保护提供一条新的途径。

### 参 考 文 献

- Braunwald E, Kloner R A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, 1985, 76: 1713
- Hearse D J. Can beta blockers limit infarct size? *Eur Heart J*, 1983, 51: 884
- Yellon D M, Iliodromitis E, Latchman D S, *et al*. Whole body heat stress fails to limit infarct size in the reperfused rabbit heart. *Cardiovasc Res*, 1992, 26: 342
- 宋来凤, 章志前. 离体大鼠心脏冠状动脉结扎缺氧的超微结构变化. *中华心血管病杂志*, 1982, 10(4): 292
- 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川, 等. 四逆汤对缺血心肌NBF、OFR浓度, MDA含量和SOD活性的影响. *中山医科大学学报*, 1993, 14(4): 293
- Currie R W, Karmazyn M, Kabc M, *et al*. Heat-Shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res*, 1988, 63: 543
- Stear S E, Yellon D M. The protective effect of heat stress against reperfusion arrhythmias in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 25: 1471
- 中国医学科学院心血管病研究所基础研究室. 血清肌酸激酶在急性心肌梗塞诊断中的价值. *心血管疾病*, 1974, 2: 278

(1998-02-07 收稿 1998-07-01 修回)