

研究论文

大鼠肢体预缺血减小心肌缺血-再灌注后的梗塞范围

董京辉, 刘宜先, 吉恩生, 何瑞荣*

河北医科大学基础医学研究所生理研究室, 石家庄 050017

摘要: 在氨基甲酸乙酯麻醉大鼠上观察肢体预缺血 (limb ischemic preconditioning, LIP) 对缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 心肌的影响, 旨在探讨 LIP 对 IR 心肌有无保护效应, 并明确腺苷和神经通路是否参与此效应。所得结果如下: (1) 在心脏缺血 30 min 和再灌注 120 min 过程中, 梗塞心肌占缺血心肌的 $51.48 \pm 0.82\%$ 。(2) LIP 时心肌梗塞范围为 $35.14 \pm 0.88\%$, 较单纯心肌缺血-再灌注时显著减小 ($P < 0.01$), 表明 LIP 对心肌有保护作用。(3) 事先切断股神经可取消 LIP 的保护效应。(4) 股动脉内局部给予腺苷 (10 nmol/kg), 可模拟 LIP 对心肌的保护作用; 心肌梗塞范围是 $37.28 \pm 1.68\%$, 而股静脉内注射同等剂量腺苷则无保护作用。(5) 股动脉内预先应用腺苷 A_1 受体拮抗剂 8-环戊-1,3-二丙基嘌呤 (DPCPX) (32 nmol/kg) 可部分阻断 LIP 诱发的心肌保护效应。以上结果表明, 肢体短暂预缺血可减小心肌缺血-再灌注后的梗塞范围, 而局部释放的腺苷和由此所激活的相关的神经通路在 LIP 的心肌保护中起重要作用。

关键词: 缺血-再灌注; 肢体预缺血; 腺苷; 心肌梗塞范围

中图分类号: Q463; R331.3

Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats

DONG Jing-Hui, LIU Yi-Xian, JI En-Sheng, HE Rui-Rong*

Department of Physiology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: The effect of limb ischemic preconditioning (LIP) on ischemia-reperfused myocardium was examined in the urethane-anesthetized rats to determine whether LIP produces cardioprotection and to observe the roles of adenosine and neural reflex in this effect. The area at risk (AR) and infarct area (IA) were determined using Evans blue and nitro-blue tetrazolium staining respectively. Infarct size (IS) was defined as $100 \times IA/AR$ (%). The results obtained are as follows: (1) During 30 min myocardial ischemia and subsequent 120 min reperfusion, the myocardial infarct size occupied $51.48 \pm 0.82\%$ of the area at risk. (2) LIP significantly reduced the myocardial infarct size to $35.14 \pm 0.88\%$ ($P < 0.01$), indicating the cardioprotective effect of such an intervention. (3) Femoral nerve section (FNS) completely abolished the cardioprotection afforded by LIP. (4) Intrafemoral artery injection of adenosine (10 nmol/kg) produced a similar effect to that of LIP, reducing the myocardial infarct size to $37.28 \pm 1.68\%$, while intrafemoral vein injection of the same dose of adenosine showed no effect. (5) Pretreatment with a selective adenosine A_1 receptor antagonist 8-cyclopentyl-1, diprolylxanthine (DPCPX) (32 nmol/kg) partially abolished the cardioprotection of LIP on myocardium. Taken together, it is concluded that LIP reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion, and that the locally released adenosine and thereby the activated relevant neural pathway play an important role in the cardioprotection provided by LIP.

Key word: ischemia-reperfusion; limb ischemic preconditioning; adenosine; myocardial infarct size

Received 2003-05-05 Accepted 2003-07-09

*Corresponding author. Tel: +86-311-6265566; E-mail: syho@hebmh.edu.cn

1986年, Murry等^[1]首次提出了缺血预处理 (ischemic preconditioning, IP) 的概念, 即多次反复短暂的缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 可使心肌在随后发生的持续性缺血中得到保护。随后Przyklenk等^[2]证实, 左冠状动脉回旋支短暂缺血能使由左前降支供血的心肌在随后的持续性缺血中得到保护。有证据表明, 短暂的肾预缺血^[3-5]、小肠预缺血^[6,7]等也对心肌的IR损伤有保护作用。以上这种器官间预处理 (interorgan preconditioning, IOPC) 对心肌的保护作用在多种动物上得到证实, 但对于其机制尚未完全清楚。目前较为统一的观点是心脏远隔器官在预缺血过程中, 局部释放的一系列介导因子如腺苷^[6]、缓激肽^[8]、去甲肾上腺素^[9]等通过信号转导通路激活ATP敏感性K⁺通道, 从而对心肌呈现保护效应; 其中腺苷假说尤为突出。Gho等^[10]指出小肠预缺血能够保护心肌, 而预缺血前给予神经节阻断剂六甲双铵则可取消此效应。Liem等^[6]的研究表明, 肠系膜动脉内给予腺苷能够模拟小肠预缺血对心肌的保护作用, 而预缺血前应用非选择性腺苷受体拮抗剂8-苯茶碱能够阻断此保护效应。据此设想, 腺苷和神经通路参与心肌的IOPC效应。而Oxman等^[11]的研究表明短暂的肢体预缺血(limb ischemic preconditioning, LIP) 能明显减少大鼠心肌IR过程中发生的快速型心律失常。本实验旨在麻醉大鼠IR模型上验证LIP能否减小大鼠心肌梗塞范围, 并进一步探讨腺苷和神经通路是否参与此过程。

1 材料和方法

实验用42只雄性Sprague-Dawley大鼠, 体重为260~340 g, 25%氨基甲酸乙酯(1.25 g/kg)腹腔麻醉。

1.1 大鼠心脏IR模型制备 动物麻醉后, 取仰卧位固定, 气管插管。经右侧颈总动脉插管, 连接血压换能器(YP-100型), 输入载波放大器(AP-600)监测血压。经微分计(ED-601G)计数心率。沿胸骨左缘打开胸腔, 气管插管接呼吸机, 潮气量为1.5 ml/100 g, 通气频率为60~70次/min。剪开心包膜, 暴露心脏, 轻轻向上推起胸腺及左心耳, 在肺动脉干与左心耳之间找到左冠状动脉前降支。在动脉下穿一3-0的丝线, 其末端套一直径2 mm、长2 cm的聚乙烯管。拉紧丝线以阻断冠脉血流, 心脏表面青紫。松开丝线, 即可恢复血流, 心脏表面出现明显充血^[12,13]。由RM-6000多道生理记录仪同时记录血压、心率。以血压-心率指数 (pressure-rate index, PRI, 即平均动脉压与心率之乘积/1000) 反映心肌耗氧量。

1.2 大鼠心肌缺血范围及梗塞范围的确定 实验结束后, 重新结扎冠状动脉, 由左心室注入1%伊文思蓝, 确定未缺血心肌与缺血心肌。将缺血心肌组织切成厚为1~1.5 mm的组织片, 放入37℃、1%的氯化硝基四氮唑蓝的磷酸缓冲液中15 min, 可见存活心肌被染成蓝色, 梗塞心肌呈灰白色。切取梗塞心肌组织并称量, 求得其所占缺血心肌重量的百分数作为心肌梗塞范围; 缺血心肌所占左心室重量的百分数作为心肌缺血范围^[12]。

1.3 实验程序和分组 待动物各参数稳定后, 记录结果作为基础对照值, 然后按以下分组进行实验: (1)单纯IR组 ($n=6$): 心肌缺血30 min-再灌注120 min, 分别测定缺血和再灌注过程中的血压和心率, 最后确定心肌缺血范围和梗塞范围; (2)肢体预缺血(LIP)+IR组 ($n=6$): 左侧股动脉缺血10 min再灌注10 min后, 再按(1)组的实验步骤进行, 以验证LIP对IR心肌有无保护作用; (3)切断股神经(femoral nerve section, FNS)+LIP+IR组 ($n=6$): 在经盐酸普鲁卡因阻断股神经后加以切断, 10 min后再按(2)组实验程序进行, 以了解股神经是否参与LIP对IR心肌的作用; (4)股动脉内注射腺苷(intrafemoral artery injection of adenosine, FA Ado)+IR组 ($n=6$): 股动脉内局部注射腺苷(10 nmol/kg), 10 min后进行IR, 观察外源性局部给予腺苷能否模拟LIP的作用; (5)FNS+FA Ado+IR组 ($n=6$): 切断股神经10 min后按(4)组实验步骤进行, 观察股动脉局部应用腺苷所起的作用是否有股神经参与; (6)股静脉内注射腺苷(intrafemoral vein injection of adenosine, FV Ado)+IR组 ($n=6$): 股静脉内注射腺苷(10 nmol/kg), 以观察股区局部应用腺苷对IR心肌的效应是否是由于其直接作用于心脏所致; (7)股动脉内注射DPCPX(intrafemoral artery injection of DPCPX, FA DPCPX)+LIP+IR组 ($n=6$): 股动脉给予腺苷A₁受体拮抗剂8-环戊-1,3-二丙基嘌呤(8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, DPCPX)(32 nmol/kg)后5 min, 再按(2)组步骤进行, 以了解LIP过程中腺苷的作用是通过何种受体亚型介导的。图1为各实验组操作程序的模式图。

1.4 药品和试剂 腺苷(Sigma)应用0.9%生理盐水于实验时新鲜配制; DPCPX(Sigma)用0.02% NaOH溶液于实验时新鲜配制; 伊文思蓝(上海新中化学厂)和氯化硝基四氮唑蓝(上海化学前进试剂厂), 应用磷酸缓冲液配制。

1.5 统计学处理 所有数据输入Origin 6.0统计软件处理, 结果用平均值±标准误(mean ± SE)表示, 组内数

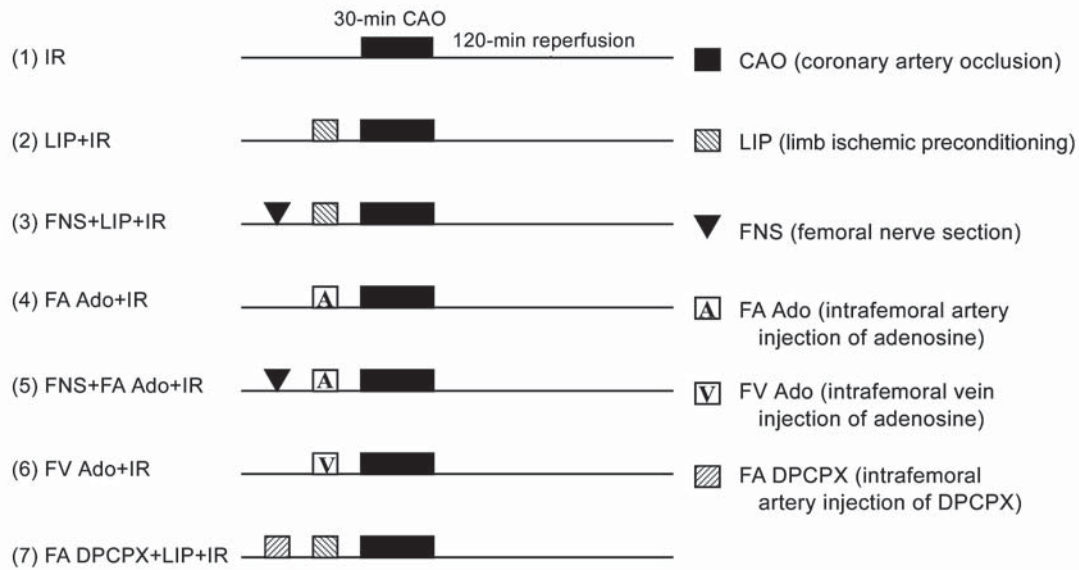


图 1. 实验程序模式图

Fig. 1. Schematic diagram of experimental protocols.

据应用配对 t 检验, 组间数据应用 Newman-Keuls 检验, 以 $P < 0.05$ 作为有统计学显著性。

2 结果

2.1 血压、心率和心肌耗氧量

总体上看, 各组大鼠的平均动脉压、血压-心率指数在 IR 过程中均呈进行性下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而心率变化不太一致 (表 1)。

2.2 心肌缺血范围

各组的心肌缺血范围无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2), 说明各组动物结扎冠状动脉的部位是基本一致的。

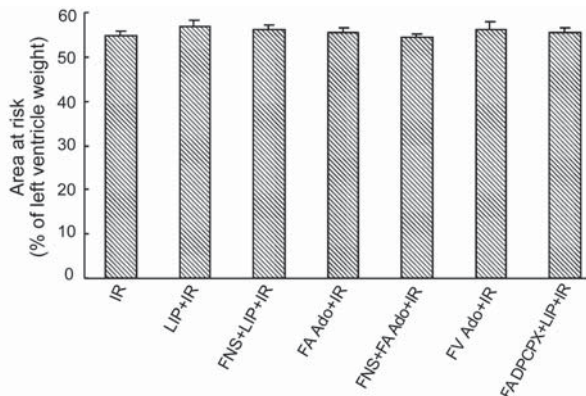


图 2. 各组大鼠的心肌缺血范围

Fig 2. Myocardial areas at risk of different experimental groups.

2.3 心肌梗塞范围

心肌缺血再灌注 (IR) 组, 肢体预缺血 + 心肌缺血再灌注 (LIP+IR) 组和切断股神经 + 肢体预缺血 + 心肌缺血再灌注 (FNS+LIP+IR) 组的梗塞心肌占缺血心肌的百分数分别为 $51.48 \pm 0.82\%$, $35.14 \pm 0.88\%$ 和 $51.10 \pm 1.14\%$ 。与 IR 组相比, LIP+IR 组的心肌梗塞范围明显减小 ($P < 0.01$), FNS+LIP+IR 组与 IR 组之间则无显著差异 (图 3)。心肌缺血再灌注 (IR) 组, 股动脉内应用腺苷 + 心肌缺血再灌注 (FA Ado+IR) 组, 切断股神经 + 股动脉内应用腺苷 + 心肌缺血再灌注

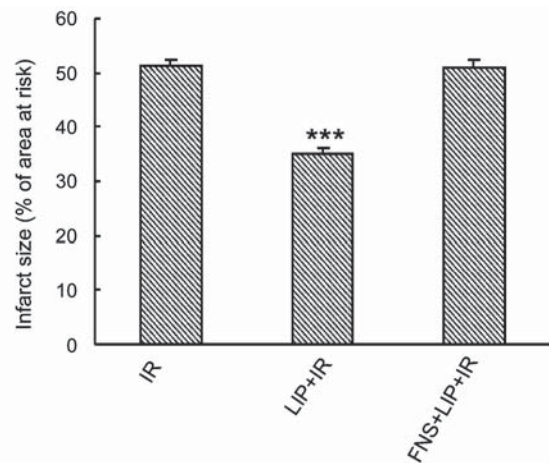


图 3. 肢体预缺血对心肌梗塞范围的影响及股神经在其中的作用

Fig 3. Effect of LIP on myocardial infarct size and the role of femoral nerve. *** $P < 0.001$ vs IR.

表 1. 麻醉大鼠心肌缺血-再灌注时心率、血压和心肌耗氧量的变化

Table 1. Changes in heart rate, blood pressure and myocardial oxygen consumption during myocardial ischemia-reperfusion in anesthetized rats

Group	<i>n</i>	Control	Ischemia (30 min)	Reperfusion (120 min)
Heart rate (bpm)				
IR	6	412 ± 10	382 ± 13*	403 ± 18
LIP+IR	6	396 ± 23	400 ± 13	356 ± 8
FNS+LIP+IR	6	392 ± 23	398 ± 14	352 ± 24
FA Ado +IR	6	448 ± 29	418 ± 25*	359 ± 14
FNS+FA Ado +IR	6	388 ± 14	401 ± 9	344 ± 18
FV Ado +IR	6	438 ± 14	404 ± 18**	377 ± 17**
FA DPCPX+LIP+IR	6	384 ± 6	350 ± 10*	292 ± 17**
Mean artery pressure (mmHg)				
IR	6	92.78 ± 5.52	77.50 ± 2.42**	71.67 ± 2.69*
LIP+IR	6	98.89 ± 3.62	92.78 ± 6.19	86.39 ± 4.31*
FNS+LIP+IR	6	90.00 ± 2.86	79.72 ± 0.90*	72.78 ± 2.46**
FA Ado +IR	6	88.34 ± 2.28	75.56 ± 2.22**	73.06 ± 2.45**
FNS+FA Ado +IR	6	112.22 ± 3.18	98.33 ± 3.92***	99.72 ± 3.29
FV Ado +IR	6	107.5 ± 6.44	84.17 ± 3.75*	81.94 ± 3.71*
FA DPCPX+LIP+IR	6	101.39 ± 3.23	85.84 ± 3.44*	80.56 ± 4.42**
Pressure-rate index (mmHg min ⁻¹ ·1000 ⁻¹)				
IR	6	38.10 ± 2.10	29.38 ± 1.49**	29.12 ± 2.22*
LIP+IR	6	38.95 ± 2.23	36.99 ± 2.52	30.71 ± 1.46*
FNS+LIP+IR	6	35.35 ± 2.42	31.71 ± 1.09	25.32 ± 1.78*
FA Ado +IR	6	39.52 ± 2.61	31.70 ± 2.53**	26.37 ± 1.86**
FNS+FA Ado +IR	6	43.48 ± 1.98	39.42 ± 1.87	34.45 ± 2.60
FV Ado +IR	6	47.27 ± 3.74	33.86 ± 1.56**	30.84 ± 1.78**
FA DPCPX+LIP+IR	6	38.95 ± 1.59	29.98 ± 1.18**	23.80 ± 2.51**

P* < 0.05, *P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs control.

(FNS+FA Ado+IR)组, 股静脉内应用腺苷 + 心肌缺血再灌注(FV Ado+IR)组和股动脉内应用 DPCPX+

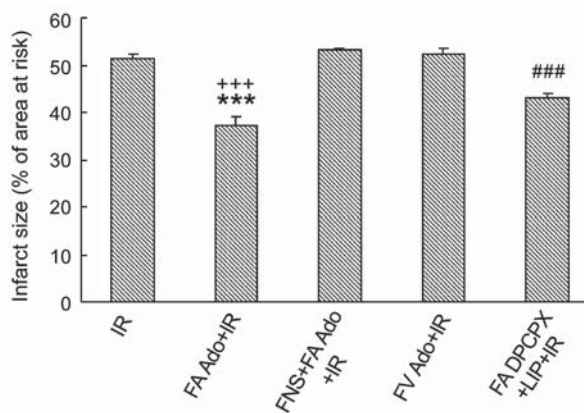


图 4. 腺苷在肢体预缺血的心肌保护效应中的作用

Fig. 4. Role of adenosine in cardioprotection provided by LIP. ****P* < 0.001 vs IR, +++*P* < 0.001 vs FA DPCPX+LIP+IR, ###*P* < 0.001 vs IR.

心肌缺血再灌注(FA DPCPX+LIP+IR)组的心肌梗塞范围分别为 51.48 ± 0.82%, 37.28 ± 1.68%, 53.13 ± 0.56%, 52.45 ± 1.12% 和 43.23 ± 0.68%; 其中 FA Ado+IR 组与 IR 组相比, 心肌梗塞范围显著减小 (*P* < 0.01), 而与 LIP 组相比则无差异 (*P* > 0.05), FNS+FA Ado+IR 组和 FV Ado+IR 组与 IR 组相比均无差异。FA DPCPX+LIP+IR 组与 IR 组和 FA Ado+IR 组相比较均有明显差异 (*P* < 0.01) (图 4)。

3 讨论

本实验的主要结果为: LIP 能够减轻麻醉大鼠 IR 心肌损伤, 明显减小心肌梗塞范围; 股神经切断可取消 LIP 对心肌的保护效应; 股动脉内注射腺苷能模拟 LIP 对心肌的保护作用, 同样切断股神经能取消此效应; 而股静脉注射同等剂量的腺苷并不能保护心肌 IR 损伤; 预先应用选择性腺苷 A₁ 受体拮抗剂能部分阻

断LIP的心肌保护效应。以上结果说明,LIP对IR心肌有保护作用,股神经和腺苷在其中起重要作用。

不少学者相继证明肾、小肠、肢体等^[5,6,11]缺血预处理能够减轻心肌的IR损伤,即器官间预处理(interorgan preconditioning, IOPC);本实验结果也表明LIP能够减少麻醉大鼠IR心肌梗塞范围。然而,IOPC对心肌保护的确切机制尚未完全明确。我们实验室丁延峰等曾证明^[5],在肾预缺血对心肌的保护作用中有肾神经和腺苷的参与。Pell等^[3]、Takaka等^[4]和Liem等^[6]的研究表明,应用非选择性腺苷受体拮抗剂8-SPT,能够完全取消远端器官预缺血的心肌保护作用,而应用选择性A₁或A₃腺苷受体拮抗剂只能部分阻断小肠预缺血对心肌的保护作用^[6]。据此设想,预缺血过程中局部释放的腺苷是这种保护作用的介导因子。此外,预先应用神经节阻断剂六甲双铵可取消小肠预缺血对IR心肌的保护作用^[6];肢体预缺血能够减少大鼠心肌IR过程中快速型心率失常的发生率^[11],应用利血平耗竭儿茶酚胺类递质后可取消这种作用,这些都表明神经通路在IOPC的心肌保护作用中是必不可少的。我们的实验结果表明,股神经切断能取消肢体预缺血对心肌的保护作用,而股动脉内注射腺苷得以模拟肢体预缺血的作用,且此作用在切断股神经后消失;股静脉注射同等剂量腺苷则不能减小心肌梗塞范围,说明股动脉局部应用腺苷减小梗塞范围的效应不是通过腺苷直接作用于心肌上的腺苷受体发挥作用的,而是腺苷作用于后肢局部的腺苷受体所致。股动脉局部应用选择性腺苷A₁受体拮抗剂DPCPX能部分阻断LIP的心肌保护效应,似表明腺苷作用的受体机制不仅限于A₁受体,可能还有其他受体亚型参与。正如Liem等^[15]的研究所指出的,腺苷在缺血预处理心肌保护中的作用,是通过A₁和A₃受体亚型共同介导的。综合我们的实验结果,可以提出这样的作用过程:肢体预缺血时局部释放的腺苷,与局部的腺苷受体结合后激活股神经中的传入纤维,由此传至神经中枢的有关部位,再经传出途径以某种方式作用于心脏,对缺血心肌起保护作用。

我们实验室以前的实验曾证实,肾预缺血时有腺苷释放,可激活肾传入神经,导致脑干内调节心血管活动的主要核团(孤束核、巨细胞旁外侧核、蓝斑和最后区)中的儿茶酚胺能神经元发生兴奋^[16]。据此似可推断,在IOPC中,交感神经系统可作为一个传出环节起作用。已有文献报道,外源性去甲肾上腺素对缺血-再灌注心肌有保护作用^[9]。

综上所述,LIP可减小麻醉大鼠IR心肌的梗塞范围,对IR心肌产生保护作用;LIP时局部释放的腺苷以及由此而激活的神经通路在这种保护效应中起重要作用。

参考文献

- [1] Murry CE, Jennings BB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.
- [2] Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic "preconditioning" protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 1996;87:893-899.
- [3] Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 1998; 275: H1542-H1547.
- [4] Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, Kinashita M. Renal ischemia-reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol* 1999;33:556-564.
- [5] Ding YF (丁延峰), Zhang MM, He RR. Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2001;53(1):7-12.
- [6] Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, Kazim S, Duncker DJ. Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *Am J Physiol* 2002;283:H29-H37.
- [7] Xiao L, Lu R, Hu C, Deng H, Li Y. Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol* 2001;427:131-135.
- [8] Schoemaker RG, Van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol* 2000; 278:H1571-H1576.
- [9] De Zeeuw S, Lameris TW, Duncker DJ, Hasan D, Boomsma F, Van den Meiracker AH, Verdouw PD. Cardioprotection in pigs by exogenous norepinephrine but not by cerebral ischemia-induced release of exogenous norepinephrine. *Stroke* 2001;32:767-774.
- [10] Gho BC, Schoemaker RG, Van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 1996;94:2193-2200.
- [11] Oxman T, Arad M, Klem R. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol* 1997;273:H1707-H1712.
- [12] Ding YF (丁延峰), Li YL, He RR. Ischemic preconditioning and exogenous L-arginine reduce infarct size in rabbit heart.

- Acta Physiol Sin (生理学报) 1996;48(6):564-570 (Chinese, English abstract).
- [13] Wang SX (王淑侠), Lan XL, Wang JW, Pei ZG. Improvement on techniques for making myocardial injury rat model. *Prog Anat Sci* (解剖科学进展) 2000;6:371-373 (Chinese, English abstract).
- [14] Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, Vogel M, Sorensen K, Redington AN, Macallister R. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning *in vivo*. *Circulation* 2002;106:2881-2883.
- [15] Liem DA, Van den Doel MA, De Zeeuw S, Verdouw PD, Dunker DJ. Role of adenosine in ischemic preconditioning in rats depends critically on the duration of the stimulus and involves both A₁- and A₃- receptors. *Cardiovasc Res* 2001;51:701-708.
- [16] Ding YF (丁延峰), Zhang XX, Wang YH, Shi GM, He RR. Renal ischemia-induced Fos expression in catecholaminergic neurons of rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2001;53(6):445-451.