

# 大鼠心肌缺血再灌注模型中中性粒细胞与心肌损伤程度的相关性研究

吴志峰, 余伯阳<sup>\*</sup>, 朱丹妮, 严永清

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 210038)

**摘要** 目的 观察大鼠心肌缺血再灌注模型中中性粒细胞与心肌损伤程度的相关性, 为进一步探讨机理和寻求新药提供依据。方法 采用冠脉结扎建立大鼠心肌缺血再灌注模型, 分别在不同时程测定血清中肌酸激酶(CPK)、心肌组织中脂质过氧化产物(MDA)含量, 采用测定髓过氧化物酶(MPO)活性来定量分析中性粒细胞。结果 随着缺血 30 min 后再灌注时间的增加, CPK、MDA 和 MPO 都呈现时间相关性, 而且在再灌 2 h 时都达到峰值。结论 在大鼠心肌缺血再灌注损伤中心肌组织的损伤程度与心肌组织中浸润的中性粒细胞有密切相关性。

**关键词** 心肌缺血再灌注; 中性粒细胞; 髓过氧化物酶; 相关性

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)03-0231-03

自人们认识到冠心病与炎症有关以来, 大量的研究表明心肌缺血能够引起急性炎症反应, 而再灌注后加剧, 导致不可逆的细胞损伤, 这些包括<sup>[1]</sup>: 发生低能量状态; 细胞内  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  超载; 细胞结构的丢失以及膜的破裂。现在有一个共同的认识即上述不同机制是相互联系的。一系列研究表明, 氧自由基的形成以及随后发生的细胞膜的脂质过氧化在心肌缺血再灌注损伤中起着重要作用<sup>[2-4]</sup>。缺血组织再灌注时所产生的急性炎症反应中中性粒细胞(PMN)扮演着重要的角色<sup>[5]</sup>。粘附在心肌上活化的 PMN 释放出氧自由基, 造成心肌细胞的损伤, 随着更多的 PMN 的聚集, 损伤程度也加剧<sup>[6]</sup>。

本研究探讨大鼠心肌缺血再灌注过程中, 中性粒细胞在心肌聚集、粘附的时程与心肌损伤程度的相关性, 从整体角度探讨 PMN 在心肌缺血再灌注损伤中的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

十六烷基三甲基溴化铵(HTAB)、盐酸邻联茴香胺(*o*-dianisidine dihydrochloride)为 Sigma 公司产品, 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、磷酸钾、氢氧化钠为分析纯

试剂, MDA (批号: 20010709)、CPK (批号: 20010529)测试盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 动物

250 ~ 300 g 雄性 SD 大鼠, 由中国药科大学实验动物室提供。

### 1.3 仪器及器材

ECG-6511 心电图机(Nikon Kohden); BH-140B 动物人工呼吸机(浙江医科大学医学仪器厂)。

### 1.4 心肌缺血再灌注模型的制备

大鼠 ip 乌拉坦 1.0 g/kg 麻醉, 背位固定, 人工呼吸(通气量 20 ml/kg 体重, 频率 48 ~ 52 次/min)<sup>[7]</sup>, 记录心电图。开胸, 暴露心脏, 以左冠状静脉主干为标志, 于左心耳根部下方 2 mm 处进针, 以 50 号丝线穿过心肌表层在肺动脉圆锥旁出针, 拉紧结扎线。立即将心脏送回原位并关闭胸腔, 以 ECG II 导联 ST 段明显抬高或 T 波高耸作为结扎成功标志。假手术组只穿线而不结扎冠脉。结扎冠脉 30 min 后, 解开结扎线以再通冠脉分别为 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h ( $n=8$ ), 造成心肌缺血再灌注损伤模型, 以此再灌注不同时间分为 5 组, 另假手术组为对照组, 共分为六组。并以此来评测中性粒细胞聚集的时程和心肌损伤的相关性。

1.5 血清中肌酸激酶(CPK)活力的测定

实验完毕时从颈动脉取血 2 ml, 4℃离心, 分离血清, 按 CPK 试剂盒操作说明测定 CPK 活性。

1.6 心肌中髓过氧化物酶(MPO)活力的测定和脂质过氧化产物(MDA)含量的测定

实验完毕取心脏用冰生理盐水冲洗残血, 剪去动脉、右心室和主要血管, 将剩余心肌组织称重, 然后加入 PBS 50 mmol/L (pH 6.0) 在 04℃条件下制成 10%的匀浆, 分成两部分(匀浆 I 和匀浆 II)。所得匀浆 I 加入 0.5% HTAB 再次用内切式匀浆器匀浆。然后用液氮冷冻-解冻反复三次以破碎细胞, 然后离心 30 min (20000×g, 4℃)。取上清 0.1 ml 与 2.9 ml 反应液混合。以分光光度计在 460 nm 处测定 2 min 内光密度的变化值。反应液为: 盐酸邻联茴香胺 16.7 mg, PBS (50 mmol/L) 10 ml, 蒸馏水 90 ml 加入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度为 0.0005%。1U 的 MPO 活力以 25℃时 1 min 分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mol 表示。所得匀浆 II 离心 15 min (3500×g, 4℃)。得上清液, 按 MDA 试剂盒操作说明测定 MDA 含量。

2 结果

2.1 心肌缺血再灌注损伤中血清 CPK 活力变化

对照组动物血清中 CPK 含量为 79.50±6.11 (U), 而模型组 CPK 活力明显高于对照组 ( $P<0.001$ )。CPK 活力随着缺血再灌注时间的延长而增加。在缺血 30 min, 再灌注 2 h 时 CPK 活性达到峰值 297.57±21.08(U), 有极显著性差异(图 1)。

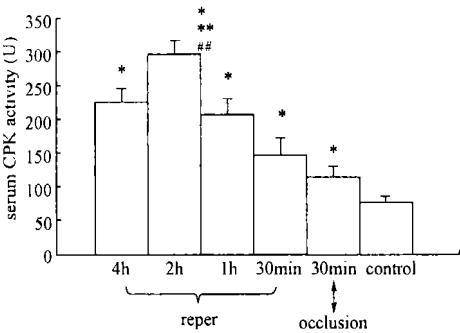


Fig 1. Time-related increase in CPK activity in ischemic myocardium following 30 min occlusion and 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h reperfusion ( $n=8, \bar{x} \pm s$ ).  $\bar{P}<0.001$  vs control,  $\bar{P}<0.001$  vs reper 4 h,  $\bar{P}<0.001$  vs reper 1 h.

2.2 心肌缺血再灌注损伤中心肌组织中髓过氧化物酶(MPO)活力的变化

对照组动物心肌组织中 MPO 活性非常低

0.0018±0.0007 (U/g tissue)。随着缺血再灌注时间的延长, 心肌组织中 MPO 的活力逐渐增加, 当心肌缺血 30 min, 再灌注 2 h 时 MPO 活性最强 0.0535±0.0131 (U/g tissue) ( $P<0.001$  vs control) (图 2)。

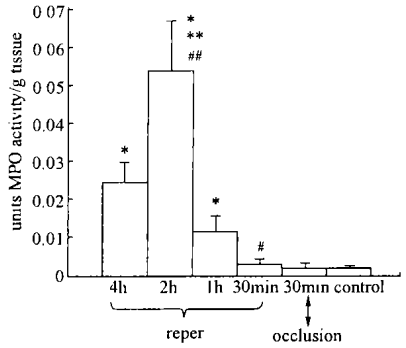


Fig 2. Time-related increase in MPO activity in ischemic myocardium following 30 min occlusion and 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h reperfusion ( $n=8, \bar{x} \pm s$ ).  $\bar{P}<0.001$  vs control,  $\bar{P}<0.01$  vs control,  $\bar{P}<0.001$  vs reper 4 h,  $\bar{P}<0.001$  vs reper 1 h.

2.3 心肌缺血再灌注损伤中心肌组织中脂质过氧化产物(MDA)含量变化

对照组动物心肌组织中 MDA 含量比较低 0.8679±0.1416 (nmol/mg prot)。随着缺血再灌注时间的延长, 心肌组织中 MPO 的活力逐渐增加, 当心肌缺血 30 min, 再灌注 2 h 时 MPO 活性最强 2.2447±0.1799 (nmol/mg prot) ( $P<0.001$  vs control) (图 3)。

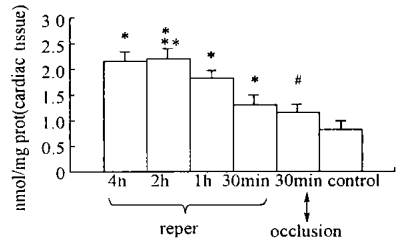
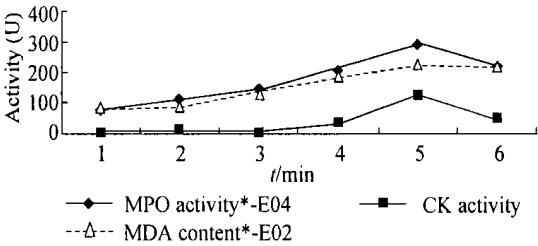


Fig 3. Time-related increase in MDA content in ischemic myocardium following 30 min occlusion and 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h reperfusion ( $n=8, \bar{x} \pm s$ ).  $\bar{P}<0.001$  vs control,  $\bar{P}<0.01$  vs control,  $\bar{P}<0.001$  vs reper 1 h.

2.4 缺血再灌注不同时程血清中 CPK 活性、心肌组织中 MPO 活性和 MDA 含量三者的相关性

见图 4。  
由图 4 可见血清中 CK 活性、心肌组织中 MPO 活性和 MDA 含量三者呈现较好的相关性, 随着缺血再灌注时间的增加, 三者的活性或含量同时增加。在缺血 30 min 再灌 2 h 时三者都同时达到峰值。



1. control; 2. occlusion; 3. reperfusion 30 min; 4. reperfusion 1h; 5. reperfusion 2 h; 6. reperfusion 4 h  
Fig 4. The correlation of CPK, MPO and MDA during rat myocardial ischemia/reperfusion injury. (n=8)

3 讨 论

CPK 释放增加被认为是心肌细胞损伤最敏感的标志之一, 心肌中 CPK 耗竭可反映心肌缺血范围的大小, 而心肌中这些酶释放入血的多少则与心肌坏死程度呈正相关, 故测定其血中活性可作为估计心肌缺血损伤程度的指标<sup>[8]</sup>。心肌缺血再灌注损伤时产生的氧自由基对心肌损害主要通过脂质过氧化作用生成过氧化脂质来完成的。MDA 能间接反映出心肌组织中过氧化脂质量的多少, 因此 MDA 值可以判断心肌损伤的程度。

在本实验中, 我们通过测定中性粒细胞所特有的酶—髓过氧化物酶(MPO)的活性, 来观察心肌缺血再灌注损伤模型中心肌组织中中性粒细胞的浸润。测定心肌中 MPO 的活性可以灵敏地, 并且定量地反应心肌组织中中性粒细胞的含量<sup>[9]</sup>。在缺血 30min 再灌 2h 时心肌组织中 MPO 活性达到最高值, 与此相平行的是, 心肌中 MDA 含量和血清中 CPK 活性也在再灌注 2 h 时达到最大值。

The Correlation Study of Neutrophils and Myocardium Injury on Myocardium Ischemic Reperfusion in Rat

WU Zhi-Feng, YU Bo-Yang

Department of Chinese Complex Recipe Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

**ABSTRACT** **AIM** The purpose is to observe the correlation of neutrophils and myocardium injury on myocardium ischemic reperfusion in rat. **METHODS** Myocardium ischemic reperfusion model was made by occluding the left coronary artery with a snare. CPK, MDA and MPO were determined at different times. **RESULTS** With the increase of reperfusion time, the contents of CPK, MDA and MPO have been enhanced. After 30 min occlusion and 2 h reperfusion, the contents come to the peak value. **CONCLUSION** The myocardium injury correlates with the neutrophils infiltrated in the myocardium on myocardium ischemic reperfusion in rat.  
**KEY WORDS** Myocardium ischemic reperfusion; Neutrophils; Myeloperoxidase (MPO); Correlation

实验表明心肌损伤的程度与心肌内中性粒细胞浸润数呈正相关。也就可以证明聚集在缺血区的中性粒细胞被激活, 产生大量的氧自由基, 对组织细胞产生损伤作用。我们对中性粒细胞在心肌缺血再灌注损伤中作用的研究, 可以为深入研究心肌缺血再灌注损伤机理及寻求有效的抗心肌缺血药物提供依据。

参 考 文 献

[1] Campo GM, Squadrito F, Campo S, et al. Beneficial effect of raxofelast, an hydrophilic vitamin E analogue, in the rat heart after ischemia and reperfusion injury [ J ] . *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30**: 1493-1503.  
[2] Mullane KM, Read N, Salmon JA, et al. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs [ J ] . *J Pharmacol Exp Ther*, 1984, **228**: 510-522.  
[3] Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog [ J ] . *Circulation*, 1983, **67**: 1016-1023.  
[4] Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavalec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog [ J ] . *Am J Pathol*, 1983, **3**: 98-117.  
[5] Sanaja M, Motterlini R, Santoro F, et al. Oxidative injury in reoxygenated and reperfused hearts [ J ] . *Free Rad Biol Med*, 1994, **41**: 137-152.  
[6] Enteman ML, Youker K, Shoji T, et al. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes: a compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence [ J ] . *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1335-1345.  
[7] 但汉雄(Dan HX), 吴基良(Wu JL), 李立中(Li LZ)等. 羧乙基锗倍半氧化物对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[ J ] . *微量元素与健康研究*, 1999, **16**(2): 1-3.  
[8] Hillis LD, Braunwald E. Myocardial ischemia(second of three parts) [ J ] . *New Engl Med*, 1977, **296**: 1034-1039.  
[9] Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium [ J ] . *J Pharmacol Meth*, 1985, **14**: 157-167.