doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.10.007

大鼠心肌缺血再灌注模型中低温处理对心肌无复流的影响分析 *

陈亚锋[1] 徐晓东[1] 金露萍[1] 李 慎[1] 夏 豪[2]

（1 湖北民族大学附属荆门市第一人民医院心血管内科 湖北 荆门 448000；2 武汉大学人民医院心血管内科 湖北 武汉 430060）

摘要 目的：探究低温治疗对大鼠心肌缺血模型再灌注后组织无复流的相关影响。**方法：**选择标准成年 Sprague Dawley 大鼠 40 只（雄性雌性各 20 只），平均体重（205.6± 1.5）g，随机分为对照组和观察组，每组各 20 只，建立心肌缺血再灌注模型，对照组给予常温处理，观察组则在再灌注结束时晚期给予低温干预，对两组大鼠心肌组织无复流的差异及相关变量进行比较分析。**结果：**观察组的心肌缺血高危区域所占的百分比平均水平为（16.7± 3.5）%，低于对照组的（35.6± 2.5）%（$P<0.05$）；观察组的组织坏死区域所占的百分比平均水平为（23.8± 5.1）%，低于对照组的（56.4± 3.9）%（$P<0.05$）。与对照组相比，观察组再灌注结束时心率降低，收缩压和平均血压升高（$P<0.05$）；两组大鼠心肌染色宏观评价显示心肌梗死面积无明显差异，但观察组无复流的区域小于对照组。**结论：**在大鼠心肌缺血动物模型中通过再灌注后晚期给予治疗性的低温处理能够显著改善微血管的堵塞，并且此效应与心肌梗死的面积无关。

关键词：心肌缺血；大鼠；再灌注；心肌无复流；低温

中图分类号：R-33；R541.4 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273（2021）10-1834-05

Effect of Hypothermia on Myocardial No-reflux in the Rat Model of Myocardial Ischemia-reperfusion*

CHEN Ya-feng[1], XU Xiao-dong[1], JIN Lu-ping[1], LI Shen[1], XIA Hao[2]

(1 Department of Internal Medicine-Cardiovascular, Jingmen First People's Hospital Affiliated to Hubei University for Nationalities, Jingmen, Hubei, 448000, China; 2 Department of Internal Medicine-Cardiovascular, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the related effects of hypothermia on myocardial no-reflow in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion. **Methods:** 40 adult Sprague Dawley rats (20 males and 20 females) were selected, the average body weight were (205.6± 1.5) g. They were randomly divided into control group and observation group, 20 for each group. The model of myocardial ischemia-reperfusion was established, and the control group was treated with normal temperature. The observation group was given low temperature intervention at the end of reperfusion. The differences of myocardial tissue no-reflow and the related variables were compared and analyzed. **Results:** The average percentage of high-risk areas of myocardial ischemia in the observation group was (16.7± 3.5)%, which was lower than that of the control group (35.6± 2.5)%($P<0.05$). The average percentage of tissue necrosis area in the observation group was (23.8± 5.1)%, which was lower than that in the control group (56.4± 3.9)% ($P<0.05$). Compared with the control group, the heart rate decreased, systolic blood pressure and mean blood pressure increased at the end of reperfusion in the observation group($P<0.05$). The macroscopic evaluation of myocardial staining showed no significant difference in infarct size between the two groups, but the area no-reflow in the observation group was smaller than that in the control group. **Conclusions:** Late administration of therapeutic hypothermia after reperfusion in a rat model of myocardial ischemia in rats can significantly improve microvascular occlusion, and this effect is independent of the area of myocardial infarction.

Key words: Myocardial ischemia; Rat; Reperfusion; Myocardial no-reflow; Low temperature

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2021)10-1834-05

前言

急性心肌梗死中心肌无复流定义为闭塞或狭窄的冠状动脉再通后仍存在部分心肌组织缺乏灌注[1,2]，有研究显示冠状动脉血管近端闭塞 90 分钟后，即使将闭塞的血管打开后荧光染色显示大部分的心内膜下层仍缺乏血液灌注[3]，大鼠模型中由于动物本身侧支循环有限且代谢率较高，冠脉缺血 30 分钟后再通即可观察到较为显著的无复流现象。心肌组织无复流最大的危害在于组织坏死碎片的清除，从而促进炎症细胞及因子的介入和作用，使心肌坏死的区域增大，进一步发生左心室的扩

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81660054）；荆门市科技计划项目（2019YFYB027）

作者简介：陈亚锋（1972-），男，博士，副主任医师，从事心血管内科方向的研究，E-mail: chenyafeng12@163.com

（收稿日期：2020-11-28 接受日期：2020-12-23）

大和心肌重塑[4-6]。有研究显示在心肌缺血时通过低温处理能够降低心肌梗死的面积,减少再灌注后的微血管性的心肌损伤[7,8]。因此本研究旨在探究心肌再灌注后通过低温处理对大鼠心肌无复流的相关影响。现将结果整理如下。

1 材料和方法

1.1 材料

选择标准成年 Sprague Dawley 大鼠(购自上海凯学生物科技有限公司,许可证号 91310120MA1HK1JC5H)40 只(雄性:雌性 =1:1),平均体重(205.6± 1.5)g,随机分为对照组和观察组,每组各 20 只(每组按 1~20 编号),于标准条件下分笼饲养,每笼 2 只;本研究所有操作和相关内容均经动物实验伦理委员会知情同意。

1.2 仪器和试剂

盐酸氯胺酮注射液(西安汉丰药业有限责任公司,国药准字:H20054748,规格:2 mL:0.1 g);甲苯噻嗪(自配,武汉远成共创科技有限公司);注射硫磺素 S 溶液及蓝色色素(上海源叶生物科技有限公司);颈动脉导管(软管型号 REF 60-011-02,HelixMark);UV 灯(2200,北京北分瑞利分析仪器有限公司);大鼠心电监护仪器(Mindray)。

1.3 动物模型建立

首先腹腔注射盐酸氯胺酮(70 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)进行麻醉后气管插管且机械通气,分离左侧冠状动脉,近端使用丝线进行结扎以关闭或打开冠状动脉的血流;分离右侧的颈动脉,插入导管测量心率和血压;实验结束时左侧颈静脉内注射硫磺素 S 溶液以评估心肌无复流现象,注射蓝色色素评价心肌的缺血风险。

1.4 干预措施

于左侧第 4 肋间隙进行胸廓切开手术,监测记录直肠和胸腔的温度,研究中大鼠冠状动脉封闭的时间为 60 分钟,后期的再灌注时间为 180 分钟; 观察组大鼠冠状动脉再灌注 1 分钟后,将生理盐水(22℃)灌注胸腔,心脏表面被恒温的液体覆盖,如图 1 所示, 经过约 10 分钟后将胸腔内温度降至约 26℃,再灌注后低温处理 60 分钟后使大鼠体温逐渐恢复。对照组为常温操作,无低温盐水灌注胸腔处理,使用水循环加热垫将大鼠体温始终保持在 36.5-37.0℃左右。实验结束前 1 分钟于冠脉近端注射荧光染料硫磺素 S 评估心肌无复流的大小,非荧光素灌注区域表示为无复流区域位置。实验结束时,重新封闭冠状动脉并且将蓝色色素溶液注射入血管中来评价在冠脉闭塞期间组织的血液灌注情况,蓝色部分表示非缺血区域,粉红色表示在冠脉闭塞期间此部分组织无血液灌注,存在心肌缺血。

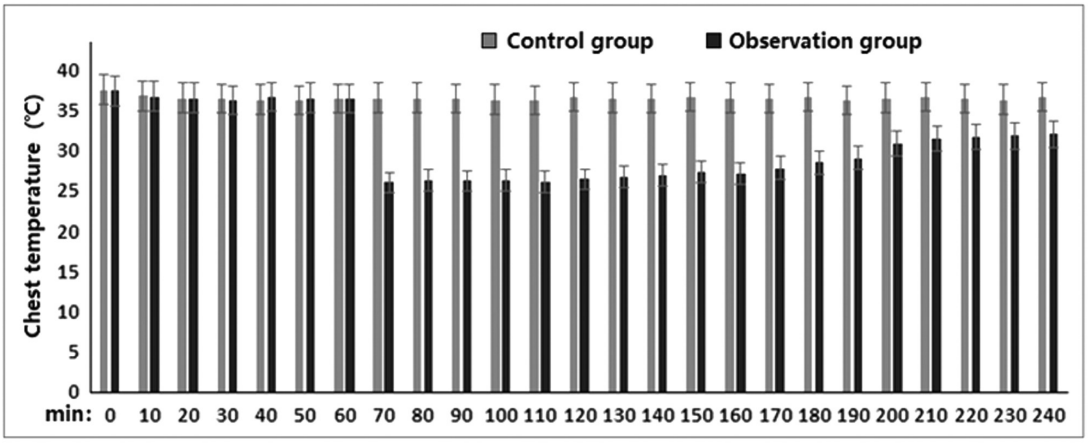

图 1 两组大鼠胸腔温度变化统计

Fig.1 Statistics of chest temperature changes in the two groups of rats

1.5 评价内容

针状电极肢体导联(右下肢)对大鼠心电进行监护,心肌缺血的标志为 ST 段抬高和 / 或 T 波高耸、R 波增宽,再灌注的标志为升高的 ST 段或 T 波逐渐降低[9];选择冠状动脉闭塞之前、再灌注开始时以及再灌注结束时作为 3 个测量时间点评价两组大鼠的心率和血压;在深度麻醉下,静脉给予大鼠 KCl 进行安乐死处理,分离并整体去除心脏,自顶点至基底部横切为 4 部分,分别进行称重记录;在 UV 灯下拍摄心脏切片评估硫磺素 S 染色情况间接反映无复流心肌区域,在白光下评价心肌的缺血位置和区域。然后将它们在 1%三苯基四唑氯化物(TTC)中孵育,观察发现存活的心肌细胞染色呈砖红色,但是未染色的梗塞组织则为白色。心脏切片再次拍照,使用 Image J 软件将局部缺血(缺血高危区域占左心室的百分比),梗塞(占高危区域百分比)和无复流区域进行数字化分析。

1.6 数据统计与分析

采用 SPSS 23.0 软件进行数据的统计与分析。采用($\bar{x}\pm s$)表示计量资料,组间比较采用 t 检验,重复观测资料则行重复测量方差分析(球检验校正为 HF 法,统计量为 F)。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 无复流组织评价

以心肌缺血高危区域所占的百分比反映心肌组织无复流范围,结果显示观察组心肌组织无复流范围平均水平低于对照组,组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$),以组织坏死区域所占的百分比反映心肌无复流范围,结果显示观察组心肌无复流范围平均水平低于对照组, 组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。各样本心肌组织无复流范围水平具体情况见图 2,各样本心肌无复流范围水平具体情况见图 3。

表 1 两组大鼠心肌缺血高危区域所占的百分比($\bar{x}\pm s$,%)

Table 1 Percentages of high-risk areas of myocardial ischemia in the two groups of rats ($\bar{x}\pm s$, %)

Groups	No reflow range of myocardial tissue	No reflow range of myocardium
Control group(n=20)	35.6± 2.5	56.4± 3.9
Observation group(n=20)	16.7± 3.5	23.8± 5.1
t	19.651	22.708
P	0.000	0.000

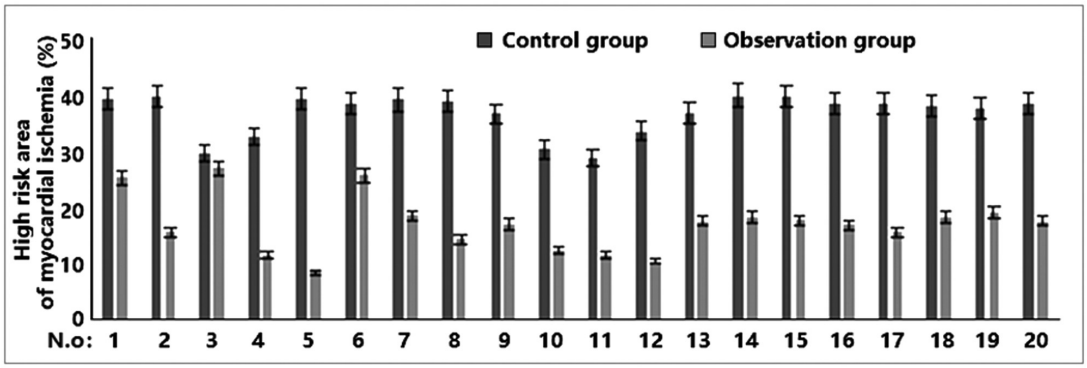

图 2 以心肌缺血高危区域所占的百分比反映心肌组织无复流范围(%)

Fig.2 Shows the percentage of high-risk areas of myocardial ischemia, reflecting the absence of reflow in myocardial tissue (%)

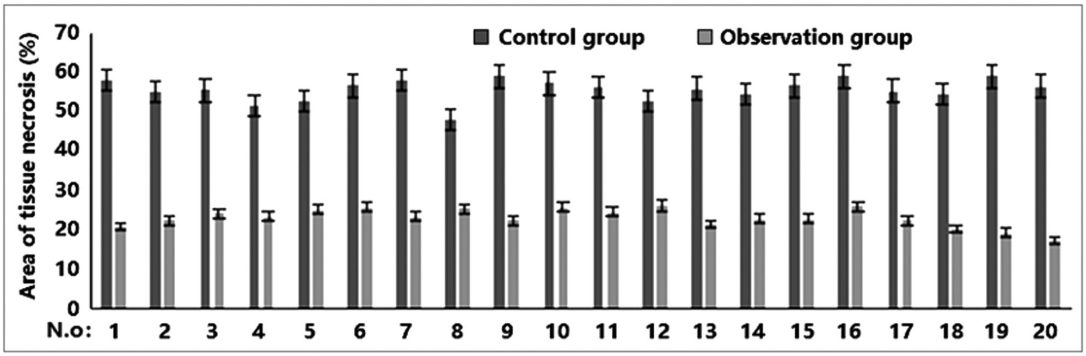

图 3 以组织坏死区域所占的百分比反映心肌无复流范围(%)

Fig.3 Shows the absence of myocardial reflow in terms of the percentage of tissue necrotic areas (%)

2.2 两组大鼠心肌缺血高危区域、梗死范围比较

两组大鼠心肌缺血高危区域、梗死范围比较无显著性差异(P>0.05);两组大鼠心肌染色宏观评价中白色区域表示组间心肌梗死面积无明显差异,但通过硫磺素 S 染色显示观察组无复流的区域小于对照组(黑色区域),见表 2 和图 4。

表 2 两组大鼠心肌缺血高危区域、梗死范围比较($\bar{x}\pm s$,%)

Table 2 Comparison of high-risk myocardial ischemia area, infarction area between the two groups of rats ($\bar{x}\pm s$, %)

Groups	High-risk myocardial ischemia area (left ventricle)	Infarction area(high-risk areas)
Control group(n=20)	53.0± 2.8	72.5± 2.7
Observation group(n=20)	46.8± 3.5	72.2± 3.0
t	4.269	8.512
P	0.896	0.775

2.3 两组大鼠心率和血压比较

两组不同时间点心率、舒张压、平均血压整体比较差异均有统计学意义(P<0.05),对照组不同时间点收缩压整体比较差异有统计学意义(P<0.05),而观察组不同时间点收缩压整体比较差异无统计学意义(P>0.05);与对照组相比,观察组再灌注结束时心率降低,收缩压和平均血压升高(P<0.05),见表 3。

3 讨论

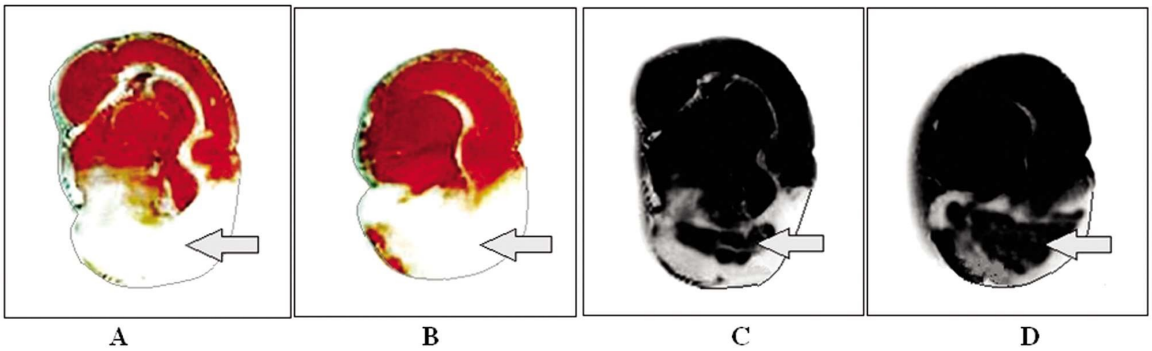

图 4 两组大鼠心肌染色宏观评价

Fig.4 Macro evaluation of myocardial staining in rats in both groups

注:A、B 为 TTC 孵育后活的心肌细胞(红色区域)与梗死组织区域分布(箭头所指白色区域);C、D 表示通过硫磺素 S 染色组间白色梗死区域内组织无复流区域(箭头所指黑色区域)差异。

Notes: A and B were the distribution of live myocardial cells (red areas) and infarcted tissue area (white areas indicated by arrows) after TTC incubation. C and D represent differences in tissue reflow areas (black areas indicated by arrows) within the white infarcted area between the two groups stained by sulphurin S.

表 3 两组大鼠心率和血压比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of heart rate and blood pressure between the two groups of rats ($\bar{x}\pm s$)

Time points	Heart rate(beats/min)		Systolic pressure(mmHg)		Diastolic pressure(mmHg)		Mean blood pressure(mmHg)	
	Control group (n=20)	Observation group(n=20)	Control group (n=20)	Observation group(n=20)	Control group (n=20)	Observation group(n=20)	Control group (n=20)	Observation group(n=20)
Before coronary occlusion	245.6± 2.5	260.6± 9.5	78.6± 2.6	80.6± 4.1	52.5± 3.1	58.7± 5.3	64.7± 2.9	67.7± 4.3
Start of reperfusion	233.6± 9.2	225.0± 12.4	80.8± 3.3	79.5± 5.5	56.9± 2.8	53.6± 5.4	64.6± 3.9	63.8± 5.4
End of reperfusion	235.9± 8.4	167.6± 4.4[a]	61.5± 2.4	81.4± 4.5[a]	40.5± 2.8	54.1± 4.7	45.5± 3.2	61.4± 4.2[a]
F	15.075	501.618	286.091	0.811	170.945	5.977	216.615	9.291
P	0.000	0.000	0.000	0.449	0.000	0.004	0.000	0.000

Note: compared with control group, [a]$P<0.05$.

临床实践中心肌梗死后患者的死亡率较高,早期的心肌组织再灌注被认为是缩小心肌梗死面积的关键,然而部分最新的研究显示即使在心肌梗死后早期进行干预患者的死亡率仍然较高,因此需要研究新的方法来改善心肌梗死后的心脏结构和功能[10-12]。对于早期进行再灌注治疗的结果目前参差不齐,整体而言并不十分理想[13,14],另一种观点是在心肌梗死再灌注后进行相关的干预,例如对于心肌梗死后出现心力衰竭或左心室功能障碍的患者常采用血管紧张素转化酶抑制剂降低心脏的后负荷,一定程度上确实降低了左心室重塑的几率,但主要不良心脏事件的发生风险仅降低 20%-25%,并且存在低血压、肾功能损害及剧烈咳嗽等副反应,并非所有的患者都能够耐受治疗的最佳剂量[15-17],因此研发新的方法以减少不利的左心室重塑具有切实的临床意义。

一种潜在的治疗方法主要是针对梗死后心肌无复流可能有利于梗死组织的愈合从而减少左心室的重塑[18,19]。本研究中我们以大鼠作为动物模型,设定 60 分钟的冠状动脉闭塞,旨在验证晚期治疗性的低温处理对心肌无复流的限制作用。晚期的低温处理是指在再灌注后进行干预,其能够减少无复流,心肌的无复流实质上是心肌再灌注损伤的一种形式,可能是由于微血管暴露于活性氧自由基、钙、钠等分子时受到损伤所致[20,21]。晚期低温治疗的优点是在保证梗死相关的冠状动脉通常后,可通过多种方法在导管室内直接进行操作,包括热交换导管、沿冠状动脉顺行或通过冠状窦逆行输注冷流体、制冷皮肤垫等,并不影响到球囊扩张的时间,不同的临床试验中已经显示出治疗性的低温处理能够不同程度缩小心肌梗死的范围,但也有研究显示通过快速血管内核心冷却联合冷盐水作为冠状动脉介入治疗的辅助手段治疗急性心肌梗死,结果显示低温处理未能显著减少心肌的梗死,但部分患者事后分析显示若出现症状至再灌注时间在 4 小时以内则心肌梗死的面积可减少 33%[22]。本研究中组间大鼠心脏组织标本染色分析结果显示组间心肌梗死的区域无显著性差异,这与部分文献中报道的结果一致[23],提示低温处理能否降低心肌梗死的区域目前仍存在争议,可能与缺血再灌注的时间选择相关,亦可能与相应的染色或组织病理评价方法差异等有关。因此仍需要多中心、大样本的随机对照研究进一步证实。本文中观察组大鼠在再灌注后给予低温处理通过荧光染色明确显示心肌组织无复流的区域显著缩小,因

此一定程度上可以降低心肌缺血再灌注损伤的程度,具体的相关机制需要结合生物分子学的实验结果进一步分析,但就依目前的文献报道结果显示可能与氧自由基与炎症细胞因子的级联反应抑制等有关[24,25]。本研究中也存在一定的局限性,首先表现在仅选择了一个治疗时间点(再灌注后 1 分钟)进行评估,有必要下一步探究再灌注低温处理后不同时间点的指标变化以获得动态、相对全面的结果;另一方面为单中心的小样本研究,相关结论的证据力度欠佳,关于低温治疗的具体机制有必要深入进行研究,例如其对血流动力学的影响(舒张持续时间、灌注压力等)。

综上所述,本研究结果初步显示在大鼠心肌缺血动物模型中,通过再灌注后晚期给予治疗性的低温处理能够显著改善微血管的堵塞,并且此效应与心肌梗死的面积无关。

参 考 文 献(References)

[1] 吴晓鹏, 王选琦, 韩磊森, 等. 尼克地尔对 PCI 术中心肌无复流及再灌注心肌损伤保护作用与预后观察[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(8): 1045-1047

[2] Kloner RA, King KS, Harrington MG. No-reflow phenomenon in the heart and brain [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 315(3): H550-H562

[3] 殷明, 乔世刚, 曹建方, 等. 线粒体通透性转换孔介导的胀亡和凋亡对七氟醚后处理保护大鼠心肌缺血再灌注的作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(2): 178-182

[4] 陆金梅, 娄艳. 维拉帕米后处理和缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的对比[J]. 中国临床研究, 2016, 29(6): 726-729

[5] 柳宁波, 王冬梅, 孙家安, 等. 替格瑞洛对急性 ST 段抬高型心肌梗死再灌注后冠状动脉血流的影响[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(17): 1976-1981

[6] 胡飞, 戎亦骊, 朱科燕, 等. 冠心宁片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 76-82

[7] 尚文, 郭静萱, 郑亚安, 等. 亚低温应用在急性 ST 段抬高型心肌梗死治疗中的研究进展[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(5): 512-514

[8] Saclı H, Kara I, Diler MS, et al. The Relationship between the Use of Cold and Isothermic Blood Cardioplegia Solution for Myocardial Protection during Cardiopulmonary Bypass and the Ischemia-Reperfusion Injury[J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 25(6): 296-303

[9] Herring MJ, Dai W, Hale SL, et al. Rapid Induction of Hypothermia by the ThermoSuit System Profoundly Reduces Infarct Size and Anatomic Zone of No Reflow Following Ischemia-Reperfusion in Rabbit and Rat Hearts[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2015, 20(2): 193-202

[10] 刘喆, 唐强, 谢立强, 等. 急性 ST 段抬高型心肌梗死患者直接介入治疗门 - 囊时间及影响因素探讨 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(26): 5091-5095

[11] 韩军, 宣佳利, 胡浩然, 等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 118-123

[12] 李静, 钟玉玲, 马利. 脂氧素对大鼠心肌缺血再灌注后心梗程度和细胞凋亡的影响[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(3): 352-354

[13] Heusch G, Rassaf T. Time to Give Up on Cardioprotection: A Critical Appraisal of Clinical Studies on Ischemic Pre-, Post-, and Remote Conditioning[J]. Circ Res, 2016, 119(5): 676-695

[14] Rentrop KP, Feit F. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction: Concepts and controversies from inception to acceptance[J]. Am Heart J, 2015, 170(5): 971-980

[15] 卫展扬, 苏少辉, 林玉萍, 等. 重组人脑利钠肽对急性 ST 段抬高型心肌梗死再灌注后早期心律失常患者治疗效果及保护作用分析[J]. 中南医学科学杂志, 2017, 45(4): 378-381

[16] 于海侠, 陈治国. ST 段抬高型心肌梗死再灌注治疗方式与血清脑钠肽水平的变化[J]. 内科急危重症杂志, 2013, 19(3): 173, 178

[17] Erlinge D, Götberg M, Lang I, et al. Rapid Endovascular Catheter Core Cooling Combined With Cold Saline as an Adjunct to Percutaneous Coronary Intervention for the Treatment of Acute Myocardial Infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(18): 1857-1865

[18] 于杨, 刘筱, 张燕, 等. 高渗盐水预处理在大鼠缺血再灌注心肌损伤中的保护作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(6): 638-641

[19] 冯春光, 韩冰,刘奕, 等. 早期冠状动脉内应用尼可地尔对急性前壁心肌梗死患者再灌注无复流和左心室重构的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(1): 6-11

[20] 刘鹏飞, 张海涛, 齐弘炜, 等. 过表达 microRNA-486 对大鼠心肌梗死后心脏功能损伤的改善 [J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(7): 595-599

[21] Wu L, Tan JL, Chen ZY, et al. Cardioprotection of post-ischemic moderate ROS against ischemia/reperfusion via STAT3-induced the inhibition of MCU opening[J]. Basic Res Cardiol, 2019, 114(5): 39

[22] Hu S, Cao S, Tong Z, et al. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(11): 3677-3688

[23] Hausenloy DJ, Botker HE, Engstrom T, et al. Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations[J]. Eur Heart J, 2016, 38(13): 935-941

[24] Souza PC, Santos EBD, Motta GL, et al. Combined effects of melatonin and topical hypothermia on renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Acta Cir Bras, 2018, 33(3): 197-206

[25] Lu QY, Ma JQ, Duan YY, et al. Carthamin Yellow Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury With Reduced Reactive Oxygen Species Release and Inflammatory Response [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2019, 74(3): 228-234