

远端肢体缺血预处理对失血性休克液体复苏大鼠心肌损伤的保护作用研究

林辉 刘隽华 周天恩 杨正飞

【摘要】 目的 利用心脏超声、心电图以及心肌损伤标志物综合评价远端肢体缺血预处理对失血性休克液体复苏大鼠心肌损伤的保护作用。**方法** 成年健康雄性 SD 大鼠 (300 ~ 350 g) 36 只, 随机分为 3 组 ($n=12$): 空白对照组 (C 组)、失血性休克复苏组 (SR 组) 和远端肢体缺血预处理组 (RIPC 组)。经股动脉持续 1 h 放出全身血容量的 50% 血液, 1 h 后由股静脉 30 min 回输全部自体血, 建立失血性休克和复苏模型。RIPC 组于放血前 40 min 采用止血带阻断双侧后肢血流 5 min, 松开 5 min, 反复 4 次, 行远端肢体缺血预处理。于基础状态 (BL)、放血结束即刻 (S1)、回输自体血液前 (S2)、回输结束即刻 (R1)、回输后 1 h (PR1h) 以及 2 h (PR2h), 记录心电图以及平均动脉压 (MAP), 采用心脏彩色多普勒超声测量心输出量、LVEF、左心室短轴缩短率 (FS) 以及左心室心肌活动指数 (Tei Index), 利用免疫化学发光仪检测动脉血在 BL、S2、PR2h 时间点的心肌肌钙蛋白 I (cTn I) 浓度, 观察大鼠复苏后 72 h 存活情况。**结果** 与 C 组相比, SR 组在 S1 至 PR2h 时, RIPC 组在 S1 和 S2 时 MAP、心输出量、LVEF 降低, Tei Index 升高 ($P<0.01$); 和 SR 组比较, RIPC 组在复苏开始后的 MAP、心输出量、LVEF 升高, Tei Index 降低 ($P<0.01$); 在 S1 至 PR2h, SR 组与 RIPC 组 ST 段偏移程度以及 cTn I 浓度比 C 组增加 ($P<0.01$); 然而, RIPC 组的 ST 段偏移程度较 SR 组轻 ($P<0.01$), 复苏存活率较高 ($P<0.01$)。**结论** 远端肢体缺血预处理显著减轻失血性休克液体复苏后大鼠的心肌缺血再灌注损伤, 明显改善了生存预后。

【关键词】 休克; 心肌缺血再灌注损伤; 缺血预处理; 心功能; 肌钙蛋白 I

Effect of remote ischemic pre-conditioning on myocardial ischemic injury in a hemorrhagic shock-reperfusion rat model Lin Hui, Liu Juanhua, Zhou Tianen, Yang Zhengfei. Department of Internal Medicine, Hospital of South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China

Corresponding author, Yang Zhengfei, E-mail: yangzhengfei@vip. 163. com

【Abstract】 Objective Cardiac ultrasound, electrocardiogram and measurement of myocardial injury markers were performed to comprehensively investigate the effect of remote ischemic pre-conditioning (RIPC) upon myocardial ischemic injury in a hemorrhagic shock-reperfusion rat model. **Methods** Thirty six male adult Sprague-Dawley rats, weighing 300-350 g, were randomly divided into the sham control (C), hemorrhagic shock-reperfusion (SR) and RIPC groups ($n=12$ for each group). Hemorrhagic shock-reperfusion rat models were established by 60-min bleeding (50% of total blood volume) via femoral artery followed by 30-min reperfusion via femoral vein at 1 h later. In the RIPC group, bilateral hind limbs were clamped at 40 min before hemorrhage. The procedure involved four cycles of 5 min of ischemia followed by 5 min of reperfusion. Electrocardiographic tracing and mean arterial pressure (MAP) were continuously recorded for at baseline (BL), immediately after bleeding (S1), before reperfusion (S2) and after reperfusion (R1) and 1 h after reperfusion (PR1h) and 2 h after reperfusion (PR2h, respectively. Cardiac output (CO), left ventricular ejection fraction (LVEF), fractional shortening (FS) and Tei Index were measured by electrocardiogram. The concentration of cardiac troponin I (cTnI) in the arterial blood was measured at BL, S2 and PR2h. The survival of animals was observed at 72 after resuscitation. **Results** Compared with the C group, the MAP, CO and FS in the SR group at S1-PR2h, and in the RIPC group at S1-S2 were significantly decreased whereas Tei Index was considerably

DOI: 10. 3969/j. issn. 0253-9802. 2016. 04. 006

作者单位: 510640 广州, 华南农业大学医院内科 (林辉); 510700 广州, 中山大学附属第一医院黄埔院区皮肤科 (刘隽华); 510120 广州, 中山大学孙逸仙纪念医院急诊科 (周天恩, 杨正飞)

通讯作者, 杨正飞, E-mail: yangzhengfei@vip. 163. com

elevated (all $P < 0.01$). Compared with the SR group, the MAP, CO and FS were significantly decreased whereas Tei Index was considerably increased in the RIPC group after resuscitation (all $P < 0.01$). From S1 to PR2h, ST-segment depression and cTn I concentration in the SR and RIPC groups were significantly higher than those in the C group (all $P < 0.01$), whereas the degree of increase in the RIPC group was significantly less than that in the SR group ($P < 0.01$). The survival rate after resuscitation in the RIPC group was also significantly higher compared with that in the SR group ($P < 0.01$). **Conclusion** RIPC effectively alleviates myocardial ischemic injury and significantly enhances prognosis outcomes in a hemorrhagic shock-reperfusion rat model.

[Key words] Shock; Myocardial reperfusion injury; Ischemic pre-conditioning; Cardiac function; Troponin I

心胸外科手术、选择性血管外科手术、肿瘤切除术中均可能并发大出血,导致失血性休克^[1]。尽管及时的液体复苏后可以纠正血流动力学,然而缺血再灌注引起的心肌损伤不利于预后^[2-3]。许多研究证实,远端肢体缺血预处理可改善缺血再灌注导致的心肌损伤^[4]。然而远端肢体缺血预处理减轻失血性休克液体复苏后诱发的心肌损伤程度的研究并不多见。心脏超声、心电图以及心肌损伤标志物的变化综合反映心肌损伤的严重程度^[5-6]。本研究拟从心脏超声以及心电图等方面评价远端肢体缺血预处理对失血性休克液体复苏大鼠心肌损伤的保护作用。

材料与方法

一、动物选择及随机分组

成年健康雄性 10 周龄的 SD 大鼠 36 只,体重 300 ~ 350 g,由广州中医药大学动物实验中心提供,普通安静的环境 [温度 (25 ± 1)℃,湿度 (50 ± 5)%] 适应性饲养 1 周后开始实验。应用随机数字表方法,把动物分为 3 组:空白对照组 (C 组, $n = 12$)、失血性休克复苏组 (SR 组, $n = 12$) 和远端肢体缺血预处理组 (RIPC 组, $n = 12$)。

二、失血性休克复苏动物模型的制备

大鼠麻醉前禁食 12 h,自由饮水。利用二氧化碳诱导麻醉后,腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉,仰卧位固定在实验台上。取颈正中切口,置入右颈静脉插管用于输血及监测中心静脉压;分离右侧股动脉以及股静脉并置入导管用于放血及监测平均动脉压 (MAP)。经股静脉注射肝素 200 U/kg, 10 min 后采用抽血输血双向全自动注射泵 BYZ-810D (比扬医疗器械有限公司,中国长沙) 经股动脉持续放血 1 h,血液收集在 20 ml 无菌注射器内。失血量为总血容量的 50%。观察 1 h 后,经 30 min 由股静脉回输全部自体血,建立失血性休

克和复苏模型。自体血回输结束后观察 2 h,待大鼠清醒后拔除所有导管,缝合伤口,肌肉注射头孢唑啉预防感染。实验过程中采用灯照直射维持直肠温度 (38.0 ± 0.5)℃。等待动物翻身反射恢复且清醒后回笼饲养观察。C 组不放血,手术操作同 SR 组。RIPC 组于放血前 40 min 采用止血带阻断双侧后肢血流 5 min,松开 5 min,反复 4 次,行远端肢体缺血预处理,其余操作同 SR 组。阻断血流的标准:双后肢皮肤颜色改变,皮肤温度下降,止血带捆绑以下部位超声监测不到动脉搏动。本实验方案遵循的程序经过中山大学孙逸仙纪念医院实验动物伦理委员会审查讨论后批准实行。

三、心脏彩色多普勒超声 (彩超)

于基础状态 (BL)、放血结束即刻 (S1)、回输自体血液前 (S2)、回输结束即刻 (R1)、回输后 1 h (PR1h) 以及 2 h (PR2h),采用 HD15 彩色超声仪 (飞利浦公司,荷兰) 测量 5 个心动周期左心室舒张末期内径 (LVEDD) 和左心室收缩末期内径 (LVESD),计算心输出量、LVEF 以及左心室短轴缩短率 (FS), $FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100\%$; 测量 5 个心动周期等容舒张时间 (IVRT)、等容收缩时间 (IVCT) 和射血时间 (ET),计算左心室心肌活动指数 (Tei Index), $Tei Index = (IVCT + IVRT) / ET$ 。

四、心电图 ST 变化

采用迈瑞 BeneViewT5 监护仪监测心电图和 MAP,并利用 Windaq 生理记录仪连续记录大鼠的心电图、MAP 等生理参数。以 BL 的 ST 段为基线标准,计算 S1, S2, R1, PR1h 以及 PR2h 的 ST 变化值。

五、心肌损伤标志物

在 BL, S2, PR2h 时间点分别抽取动脉血 0.5 ml,低温离心后提取上清液,利用 ACCESS 2 免疫化学发光仪检测心肌肌钙蛋白 I (cTn I) 浓度。

六、生存结局

记录大鼠失血性休克复苏后 72 h 的生存结局情况（每组存活率 = 每组存活大鼠数量/每组实验大鼠总数）。

七、统计学处理

采用 SPSS 16.0 的统计学软件进行分析，定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析进行组间比较（差异有统计学意义后采用 LSD-*t* 法进行两两对比），单组重复测量设计的方差分析进行组内比较（差异有统计学意义后，前后对比采用配对 *t* 检验，用 Bonferroni 法校正检验水准），定性资料比较采用 Fisher 确切概率法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 3 组大鼠各个时刻血流动力学以及心功能指标的比较（ <i>n</i> = 12， $\bar{x} \pm s$ ）							
指 标	分 组	BL	S1	S2	R1	PR1h	PR2h
MAP (mm Hg)	C 组	140 ± 11	137 ± 10	142 ± 5	138 ± 12	143 ± 11	140 ± 8
	SR 组	144.3 ± 9.1	44.5 ± 8.0 ^{ac}	49.5 ± 4.3 ^a	101.0 ± 5.3 ^{ac}	84.9 ± 8.7 ^{ac}	73.5 ± 4.6 ^{ac}
	RIPC 组	135.3 ± 6.5	47.6 ± 10.2 ^{abc}	45.6 ± 6.5 ^{ab}	128.5 ± 9.7 ^{abc}	122.3 ± 11.1 ^{ab}	129.0 ± 10.4 ^{ab}
心输出量 (ml/min)	C 组	110.2 ± 3.4	107.0 ± 5.5	102.3 ± 5.7	108.8 ± 6.0	106.4 ± 4.5	110.0 ± 4.7
	SR 组	114.4 ± 4.5	42.9 ± 3.0 ^{ac}	46.8 ± 4.7 ^a	66.0 ± 5.6 ^{ac}	59.8 ± 7.2 ^{ac}	51.1 ± 4.3 ^{ac}
	RIPC 组	112.6 ± 6.7	45.8 ± 4.4 ^{abc}	45.2 ± 7.9 ^{ab}	109.6 ± 8.1 ^{abc}	101.0 ± 10.8 ^{ab}	99.9 ± 4.6 ^{ab}
LVEF (%)	C 组	68.8 ± 1.1	70.8 ± 1.2	68.9 ± 1.0	71.1 ± 1.5	69.8 ± 1.2	70.5 ± 0.7
	SR 组	70.0 ± 0.6	60.0 ± 0.7 ^{ac}	59.0 ± 0.9 ^a	63.4 ± 0.6 ^{ac}	58.0 ± 0.9 ^{ac}	50.0 ± 1.6 ^{ac}
	RIPC 组	69.6 ± 0.4	64.6 ± 0.5 ^{abc}	63.6 ± 0.6 ^{ab}	68.9 ± 0.4 ^{abc}	69.6 ± 0.7 ^{ab}	68.6 ± 0.8 ^{ab}
FS (%)	C 组	36.5 ± 3.6	35.6 ± 3.7	36.8 ± 4.0	37.8 ± 5.7	35.6 ± 4.1	37.0 ± 3.9
	SR 组	37.6 ± 4.7	50.9 ± 7.2 ^{ac}	49.3 ± 6.5 ^a	31.3 ± 4.7 ^{ac}	24.6 ± 3.1 ^{ac}	20.9 ± 4.2 ^{ac}
	RIPC 组	38.5 ± 4.6	58.4 ± 4.5 ^{abc}	56.2 ± 6.5 ^{ab}	37.7 ± 4.6 ^{abc}	36.6 ± 5.1 ^{ab}	35.2 ± 5.0 ^{ab}
Tei Index	C 组	0.690 ± 0.034	0.692 ± 0.044	0.695 ± 0.037	0.686 ± 0.026	0.695 ± 0.041	0.691 ± 0.035
	SR 组	0.686 ± 0.030	1.128 ± 0.060 ^{ac}	1.116 ± 0.090 ^a	1.036 ± 0.093 ^{ac}	1.175 ± 0.090 ^{ac}	1.257 ± 0.096 ^{ac}
	RIPC 组	0.688 ± 0.029	1.078 ± 0.059 ^{abc}	1.005 ± 0.099 ^{ab}	0.798 ± 0.109 ^{abc}	0.762 ± 0.089 ^{ab}	0.738 ± 0.099 ^{ab}

注：与 C 组比较，^a*P* < 0.01，与 SR 组比较，^b*P* < 0.01，与前一时间点比较，^c*P* < 0.05/5；1 mm Hg = 0.133 kPa

二、3 组大鼠各个时刻心电图 ST 段变化的比较

与对照大鼠 C 组比较，在 S1 至 PR2h 时 SR 组与 RIPC 组 ST 段较 BL 明显偏移（*P* < 0.01）。在 S1 和 S2 时，SR 组与 RIPC 组大鼠的 ST 段明显下移；在 R1 至 PR2h 时，SR 组与 RIPC 组大鼠的 ST 段明显上抬；然而，对比 RIPC 组大鼠，SR 组偏移程度显著增大（*P* < 0.01），见表 2。

表 2 3 组大鼠各个时刻心电图 ST 段变化的比较（mv， $\bar{x} \pm s$ ）						
分 组（ <i>n</i> = 12）	BL	S1	S2	R1	PR1h	PR2h
C 组	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SR 组	0 ± 0	-0.023 ± 0.005 ^{ac}	-0.026 ± 0.005 ^a	0.036 ± 0.007 ^{ac}	0.045 ± 0.007 ^{ac}	0.047 ± 0.007 ^a
RIPC 组	0 ± 0	-0.014 ± 0.003 ^{abc}	-0.019 ± 0.005 ^{abc}	0.013 ± 0.003 ^{abc}	0.016 ± 0.006 ^{ab}	0.019 ± 0.005 ^{ab}

注：与 C 组比较，^a*P* < 0.01；与 SR 组比较，^b*P* < 0.01；与前一时间点比较，^c*P* < 0.05/5

三、3 组大鼠 cTn I 浓度的变化结果

C 组大鼠的 cTn I 浓度在 BL、S2、PR2h 时间点变化没有统计学差异。SR 组以及 RIPC 组大鼠的 cTn I 浓度在 S2、PR2h 明显高于 BL ($P < 0.01$)。然而, cTn I 浓度在 RIPC 组在 S2、PR2h 低于 SR 组 ($P < 0.01$), 见图 1。

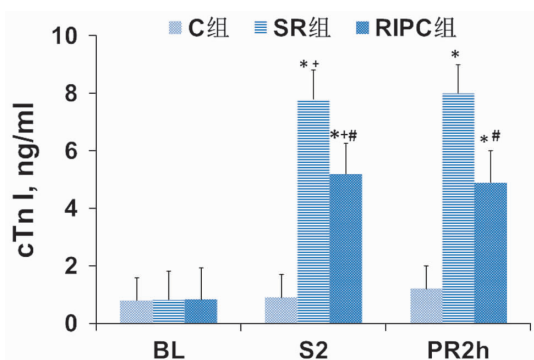


图 1 三组动物不同时间 cTn I 浓度变化的比较

注: 与 C 组比较, * $P < 0.01$; 与 SR 组比较, # $P < 0.01$; 与前一时间点比较, + $P < 0.05/2$

四、72 h 生存结局

SR 组和 RIPC 组动物液体复苏后 72 h 内存活率分别为 2/12 和 10/12, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

讨 论

失血性休克进行液体复苏后引起的缺血再灌注心肌损伤严重程度与出血量和休克时间密切相关^[7]。根据既往的研究, 利用出血量为总血容量 50%, 休克时间为 1 h 的方法制备严重的失血性休克模型, 并在休克后回输自体血进行复苏^[8]。而在本实验中, 休克时间延长至 2 h。结果表明, 动物放血后 MAP 明显降低至 60 mm Hg 以下, 提示大鼠失血性休克模型制备成功; 回输自体血后 MAP 回升至 60 mm Hg, 提示复苏成功。

既往研究表明, 远端肢体缺血预处理可以有效保护离体心肌的缺血再灌注损伤, 包括改善心肌最大收缩速率, 减少心肌的凋亡。参考既往实验, 我们在研究中利用放血前 40 min 采用止血带阻断双侧后肢血流 5 min, 松开 5 min, 反复 4 次的方法进行肢体缺血预处理。我们的结果和既往研究一致表明, 远端肢体缺血预处理有效保护了失血性休克液体复苏后动物的心功能, 提高了复苏后的心输出量以及射血分数, 并改善了 Tei Index 以及 FS, 从而改善了生存预后^[5]。

心肌缺血再灌注时, 心肌中的氧张力降低或无氧代谢会加强, 出现了电位差, 即可出现 ST 段的

偏移。在本研究中, 大鼠经历失血性休克后的缺血损伤以后, 心电图首先是在缺血阶段出现 ST 段下移; 在液体复苏再灌注后, 出现明显的心肌损伤, ST 段继而上抬。缺血预处理后, 休克后复苏大鼠的心电图 ST 段在缺血阶段以及再灌注后 ST 段的偏移明显减少。这些结果表明, 预处理改善了缺血再灌注的心肌损伤。

cTn I 被认为是临床上诊断心肌损伤和坏死特异性最强、敏感度最高的“金指标”, 当心肌细胞通透性增加时, cTn I 即会从心肌细胞中渗出到血液中, 从而使血清 cTn I 水平明显升高。本研究显示, 缺血和再灌注损伤后, 休克大鼠血清 cTn I 明显升高; 然而, 经过缺血预处理的大鼠 cTn I 仅轻度增高。因此, 经过远端肢体缺血预处理后, 缺血再灌注引起的心肌损伤程度明显减轻。

综上所述, 远端肢体缺血预处理可显著减轻失血性休克液体复苏后大鼠的心肌缺血再灌注损伤, 从而明显改善了生存预后。

参 考 文 献

- [1] Copeland GR, Jones D, Walters M. POSSUM: a scoring system for surgical audit. *Br J Surg*, 1991, 78 (3): 355-360.
- [2] Reynolds PS, Barbee RW, Skaflen MD, Ward KR. Low-volume resuscitation cocktail extends survival after severe hemorrhagic shock. *Shock*, 2007, 28 (1): 45-52.
- [3] Barbee RW, Reynolds PS, Ward KR. Assessing shock resuscitation strategies by oxygen debt repayment. *Shock*, 2010, 33 (2): 113-122.
- [4] Lang SC, Elsässer A, Scheler C, Vetter S, Tiefenbacher CP, Kübler W, Katus HA, Vogt AM. Myocardial preconditioning and remote renal preconditioning-identifying a protective factor using proteomic methods? *Basic Res Cardiol*, 2006, 101(2): 149-158.
- [5] Hu X, Yang Z, Yang M, Qian J, Cahoon J, Xu J, Sun S, Tang W. Remote ischemic preconditioning mitigates myocardial and neurological dysfunction via K (ATP) channel activation in a rat model of hemorrhagic shock. *Shock*, 2014, 42 (3): 228-233.
- [6] Wallace KB, Hausner E, Herman E, et al. Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity. *Toxicol Pathol*, 2004, 32 (1): 106-121.
- [7] Wallace KB, Hausner E, Herman E, Holt GD, MacGregor JT, Metz AL, Murphy E, Rosenblum IY, Sistare FD, York MJ. Remote ischemia preconditioning for renal and cardiac protection during endovascular aneurysm repair: a randomized controlled trial. *J Endovasc Ther*, 2009, 16 (6): 680-689.
- [8] Fang X, Tang W, Sun S, Huang L, Chang YT, Castillo C, Weil MH. Comparison of buccal microcirculation between septic and hemorrhagic shock. *Crit Care Med*, 2006, 34 (12 Suppl): S447-S453.

(收稿日期: 2015-12-06)

(本文编辑: 杨江瑜)