

体外反搏提高切应力调节 NO 和 cGMP 机制的探讨

钱孝贤¹, 陈燕铭¹, 吴伟康², 刘勇¹, 周彬¹, 陈璘¹, 郑振声³ (1 中山大学附属第三医院心内科, 广东 广州 510630; 中山大学²中山医学院病理生理教研室, ³卫生部辅助循环重点实验室, 广东 广州 510080)

摘要:目的 观察体外反搏对心肌梗死犬头背干切应力和信号转导物质一氧化氮(NO)和环磷酸鸟苷(cGMP)的影响, 探讨体外反搏保护缺血心肌的机制。方法 19 只健康杂种犬随机分为对照组、缺血组和缺血+反搏组(反搏组)3 组, 采用开胸结扎冠状动脉左前降支的方法建立心肌缺血模型, 观察体外反搏前后头背干切应力的变化, 用改良硝酸还原酶法测定体外反搏前后心肌缺血犬血浆和主动脉 NO 含量, 采用放免法检测心肌缺血前后血浆和主动脉 cGMP 的含量。结果 体外反搏可提高因心肌缺血而造成的切应力降低, 并使之恢复正常。同时也发现体外反搏可提高缺血组犬血浆和主动脉 NO 和 cGMP 水平。结论 体外反搏能提高切应力, 促进 NO 和 cGMP 的产生, 这可能是其抗心肌缺血损伤的重要机制之一。

关键词: 心肌缺血; 切应力; 一氧化氮; 环磷酸鸟苷; 反搏动术; 狗

中图分类号: R542.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)07-1003-03

Effects of external counterpulsation on shear stress and production of nitric oxide and cGMP in canines with myocardial infarction

QIAN Xiao-xian¹, CHEN Yan-ming¹, WU Wei-kang², LIU Yong¹, ZHOU Bin¹, CHEN Lin¹, ZHENG Zhen-sheng³

¹Department of Cardiology, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; Department of Pathophysiology², Key Laboratory of Assisted Circulation of Ministry of Health³, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To investigate the effects of external counterpulsation (ECP) on shear stress and signal transduction in canines with myocardial infarction. **Methods** Nineteen healthy dogs were randomly divided into control, ischemia, and ischemia plus ECP groups. Myocardial infarction was induced in the latter two groups by ligation of the left anterior descending artery (LAD). Serum and aorta NO levels of the dogs were determined by modified nitrate reductase method, and serum and aorta cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels by radioimmunoassay. **Results** The shear stress in the truncus brachiocephalicus decreased after LAD ligation, but increased significantly after 2 h of ECP treatment. Serum and aorta NO levels in ECP and control groups were significantly higher than those in the ischemic group ($P < 0.05$). Serum and aorta cGMP levels in control group and ECP group after LAD ligation were also significantly higher than those in the ischemic group ($P < 0.05$). **Conclusion** ECP can increase the shear stress and increase NO and cGMP levels in dogs with myocardial ischemia, which might be an important mechanism of ECP for protection of the ischemic myocardium.

Key words: myocardial ischemia; shear stress; nitric oxide; guanosine cyclic monophosphate; counterpulsation; dogs

一氧化氮(NO)是内皮细胞分泌的重要血管活性物质,它广泛参与机体多种生理功能,从动物实验和临床实验中均发现,NO参与心肌缺血的发病机制^[1]。NO能激活可溶性鸟苷酸环化酶,升高细胞内环鸟苷酸(cGMP)水平,是NO多种生物效应的主要信号转导机制^[2]。增强型体外反搏(enhanced external counterpulsation,EECP)是一种新型、无创性辅助循环装置,临床证明增强型体外反搏对冠心病具有较好的疗效^[3]。我们已初步观察了体外反搏对心肌缺血时NO和NOS的影响^[4],本研究通过动物实验拟进一步研究体外反搏对急性心肌缺血犬头背干切应力的作

用,并观察体外反搏对NO和其信号转导的下游cGMP的影响,以探讨体外反搏治疗心肌缺血的机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象和分组

健康成年杂种犬19只,雌雄兼用,体质量(15±3)kg,由本校动物实验中心提供。将动物随机分为3组,即正常对照组(对照组)5只、心肌缺血组(缺血组)7只、心肌缺血+体外反搏组(反搏组)7只。由于实验中缺血组和反搏组各有1只犬在冠状动脉结扎时室颤死亡,最后缺血组和反搏组各6只犬。

1.2 研究方法

1.2.1 手术方法 实验动物用戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,气管插管,连接电动人工呼吸机(SC-2型,上海仪器设备厂生产)。分离右颈外静脉,插管备取血用。分离头背干动脉,卡上合适的电磁流量探头,测定头背干动脉血流量。左胸第IV~V肋间开胸,暴露心脏,

收稿日期:2006-01-20

基金项目:广东省医学科研基金(A1998189)

Supported by Medical Research Foundation of Guangdong Province (A1998189)

作者简介:钱孝贤(1967-),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事心肌缺血的发病机制及其防治的研究,电话:020-85516867-2168, E-mail:xiaoxianq@tom.com

剪开心包并缝制心包吊床,左心室心尖部直接插管,导管对外接压力换能器,以监测心功能变化。在左冠脉前降支第 1~2 分支间分离冠状动脉以备结扎,造成心肌缺血模型。对照组在上述准备的基础上用假结扎的方法(冠脉分离穿线不结扎);缺血组及反搏组则分离冠脉并结扎。对照组和缺血组动物不处理,缺血+反搏组在冠脉结扎后 60 min 进行体外反搏,连续 120 min。选用佛山分析仪器厂双山牌增强型体外反搏装置(EECP-MC2),反搏气囊充气压力为 0.035~0.04 MPa。各组均于结扎前,结扎后 60、120(反搏组则为反搏后 60 min)、180 min(反搏组则为反搏后 120 min)分别记录头背干血流变化曲线,并采血检测血清 NO 含量和血浆 cGMP 水平,然后快速放血处死动物,取主动脉检测 NO 和 cGMP 含量,术中用心外膜心电图监测心肌缺血情况。

1.2.2 切应力计算方法 使用手持式黑白扫描器将多导生理记录仪记录的血流变化曲线输入计算机,通过数据生成软件包将其转换为数据文件,用参考文献[5]中介绍的方法计算时相剪切应力及其峰值和平均值等特征参数。

1.2.3 样品处理 采取静脉血,在 30 min 内 4℃低温离心分离血清和血浆,分装后置-70℃冰箱保存,分批检测 NO 和 cGMP 含量;取主动脉组织 2 块,每块约 100 mg,置预冷生理盐水中清洗,马上放入液氮中,然后转移置-70℃冰箱保存,分批检测 NO 和 cGMP 的含量。血清和主动脉 NO 含量的测定采用硝酸还原酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶法^[4],测定 NO 的代谢产物 NO₂/NO₃⁻来表示 NO 的水平。血浆和主动脉 cGMP 的测定方法:cGMP 检测试剂盒购于上海东亚放免中心,参照说明书操作,由专人盲法测定,灵敏度为 5 pg/ml,批内变异为 7.5%,批间变异为 8%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件包处理,计量资料用均数±标准差表示,多组间比较用方差分析,两两比较用 SNK 法。

2 结果

2.1 体外反搏对犬头背干局部切应力的作用

本实验观察了犬头背干切应力的正向峰值、负向峰值和平均值的动态变化,发现在冠脉结扎后 1 h,缺血组和反搏组犬上述各指标均有不同程度的下降(P<0.05);经过 2 h 反搏治疗,反搏组犬头背干切应力的正向峰值、负向峰值和平均值渐渐升

高,并恢复正常,而缺血组犬则继续下降(P<0.05),见表 1。

表 1 3 组犬头背干局部切应力的变化

Tab.1 Changes of the shear stress in the truncus brachiocephalicus of the dogs in the 3 groups (dyne/cm², Mean±SD)

Group	Before ligation	1 h after ligation	1 h after ECP	2 h after ECP
Positive peak value				
Control (n=5)	73.3±8.3	72.4±3.2	72.2±2.3	69.1±1.9
Ischemia (n=6)	69.0±1.9	43.7±8.9*	38.6±4.2*	32.3±3.7*
ECP (n=6)	70.0±3.5	46.7±10.1*	52.8±9.4 [#]	55.5±8.4 [#]
Negative peak value				
Control (n=5)	20.3±6.9	18.7±5.7	22.4±0.7	22.0±2.4
Ischemia (n=6)	22.0±2.4	20.9±3.0	16.4±0.6	14.8±1.7*
ECP (n=6)	24.4±4.0	14.5±1.9	28.8±4.3 [#]	30.0±3.8 [#]
Mean value				
Control (n=5)	10.3±3.2	9.6±1.4	8.9±1.8	9.2±1.1
Ischemia (n=6)	9.2±1.1	8.2±1.2	4.3±1.1	3.8±1.1*
ECP (n=6)	8.1±1.2	5.3±1.7	9.4±3.0 [#]	9.8±3.3 [#]

*P<0.05 vs control, [#]P<0.05 vs ischemia

2.2 体外反搏对犬血清 NO 的影响

冠脉结扎后 1 h,反搏组和缺血组犬血清 NO 水平明显下降(P<0.05);经过 2 h 反搏治疗后,反搏组犬血清 NO 浓度明显增加,并恢复至缺血前水平(P<0.05);而缺血组犬血清 NO 继续降低,正常组和反搏组犬血清 NO 均高于缺血组(P<0.05),见表 2。

表 2 3 组犬血清 NO₂/NO₃⁻ 的变化

Tab.2 Changes of serum NO levels in the 3 groups (μmol/g, Mean±SD)

Group	Before ligation	1 h after ligation	1 h after ECP	2 h after ECP
Control (n=5)	73.2±15.2	67.3±11.2	70.2±12.1	71.7±13.8
Ischemia (n=6)	75.4±11.2	53.2±4.0*	54.4±7.6	50.7±10.9* ^{&}
ECP (n=6)	76.6±14.5	54.4±3.8*	80.3±19.5 [#]	85.2±16.5 [#]

*P<0.05 vs control, [#]P<0.05 vs ischemia, [&]P<0.05 vs before ligation

2.3 体外反搏对犬血浆 cGMP 的影响

随着心肌缺血时间的延长,缺血组犬血中 cGMP 水平逐渐降低;而经过 2 h 的反搏治疗,反搏组犬血中 cGMP 渐渐升高,而缺血组仍然在较低水平,见表 3。

表 3 3 组犬血浆 cGMP 水平的变化

Tab.3 Changes of plasma cGMP levels in the 3 groups (μmol/g, Mean±SD)

Group	Before ligation	1 h after ligation	1 h after ECP	2 h after ECP
Control (n=5)	6.3±1.5	7.5±4.3	6.4±3.6	6.1±1.6
Ischemia (n=6)	4.3±1.8	2.5±2.5*	1.0±0.5*	1.3±0.8* ^{&}
ECP (n=6)	4.5±1.2	2.3±2.8*	4.2±2.2 [#]	10.1±3.3 ^{&} [#]

*P<0.05 vs control, [#]P<0.05 vs ischemia, [&]P<0.05 vs before ligation

2.4 犬主动脉 NO 和 cGMP 含量的变化

正常组和反搏组犬主动脉 NO 和 cGMP 含量高

于缺血组 ($P < 0.05$), 对照组和反搏组之间则无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 3 组犬主动脉 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 和 cGMP 含量的变化
Tab.4 Changes of $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ and cGMP in the aorta of the dogs in the 3 groups (Mean \pm SD)

Group	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol/g}$)	cGMP (pmol/g)
Control ($n=5$)	55.0 \pm 11.6*	6.5 \pm 1.2*
Ischemia ($n=6$)	19.6 \pm 7.4	3.1 \pm 0.6
ECP ($n=6$)	41.8 \pm 12.6*	5.5 \pm 0.7*

* $P < 0.05$ vs ischemia

3 讨论

NO 主要来源于血管内皮细胞, 它是内皮细胞产生的最强的舒血管物质, 在 NO 的前体充分存在的前提下, NO 的合成受内皮细胞中一氧化氮合酶(NOS) 的表达和活性的调节。现已证实引起 NO 释放的刺激形式主要有两种: 一种是化学刺激如缓激肽和乙酰胆碱等; 另一种是机械刺激, 如血管张力、切应力、内皮细胞变形及血液脉冲流动等^[2]。在缺血(缺氧)时, 内皮功能受损, 产生 NO 减少, 引起一系列的病理生理变化。实验发现内源性 NO 可保护心肌抗缺血再灌注损伤, 而给予 NO 的抑制剂则可扩大心肌梗死面积^[6]。本实验发现在冠脉结扎后 1 h, 缺血组和反搏组犬头背干切应力的正向峰值、负向峰值和平均值有不同程度的下降 ($P < 0.05$); 经过 2 h 反搏治疗, 犬头背干切应力的各项指标渐渐升高, 并恢复正常, 而缺血组犬则继续下降 ($P < 0.05$)。结果提示体外反搏可使因心肌缺血造成的切应力降低恢复正常。同时本实验发现, 反搏组犬血清 NO 含量明显高于缺血组 ($P < 0.05$), 正常组和反搏组犬主动脉 NO 含量高于缺血组 ($P < 0.05$), 这可能是由于体外反搏提高了切应力, 刺激血管内皮产生 NO 增加; 此外, 反搏可提高主动脉根部舒张压, 增加心输出量^[7], 进而改善血管内皮功能。最近的研究发现慢性 EECF 能在体修复高胆固醇血症引起的猪动脉内皮细胞损伤^[8]; 临床观察也发现体外反搏可增加冠心病患者血清 NO 水平^[9], 本实验结果与此相一致。

目前认为, NO 能激活可溶性鸟苷酸环化酶, 升高细胞内 cGMP 水平, 是 NO 多种生物效应如松弛血管平滑肌、抑制血小板聚集和参与神经传递的主要信号转导机制^[2]。本研究发现心肌缺血时, 血浆中的 cGMP 水平明显下降, 经过反搏治疗后, 反搏组犬血中 cGMP 渐渐升高, 与缺血组比较有显著性差异。在临床上也发现冠心病患者血浆中 cGMP 是减少的, 体外反搏后 cGMP 水平明显升高^[10], 本实验结果与

此相似。同时还发现反搏组犬主动脉中 cGMP 含量也明显高于缺血组, 但与正常组无显著性差异, 结果提示体外反搏可促进 cGMP 的产生。

本研究结果发现体外反搏能提高心肌缺血犬头背干的切应力, 促进 NO 和 cGMP 的产生, 这可能是其抗心肌缺血损伤的重要机制之一。信号转导系统是一个新的领域, 本研究仅初步观察了 NO 和 cGMP 在体外反搏作用机制中的意义, 其具体机制有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] Ma X, Weyrich AS, Lefler DJ, et al. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium[J]. Circ Res, 1993, 72(2): 403-12.
- [2] Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology[J]. J Thromb Haemost, 2003, 1: 2112-8.
- [3] Lawson WE, Hui JC, Zheng ZS, et al. Improved exercise tolerance following enhanced external counterpulsation: cardiac or peripheral effect[J]? Cardiology, 1996, 87(4): 271-5.
- [4] 钱孝贤, 郑振声, 吴伟康, 等. 体外反搏对心肌梗死犬一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(4): 257-60.
- [5] 柳兆荣, 李惜惜. 用流量波形计算血管壁切应力[J]. 中国生物医学工程学报, 1988, 7(4): 216-22.
- [6] Williams MW, Taft CS, Ramnauth S, et al. Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischemia-reperfusion injury in the rabbit[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(1): 79-86.
- [7] 陈燕铭, 钱孝贤, 吴伟康, 等. 体外反搏对心肌缺血犬血流动力学的影响及内皮素机制探讨[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(12): 2350-3.
Chen YM, Qian XX, Wu WK, et al. Effects of external counterpulsation on the hemodynamics and endothelin-1 in myocardial ischemical canines[J]. Chin J Pathophysiol, 2005, 21(12): 2350-3.
- [8] 陈小林, 何小洪, 张焰, 等. 慢性体外反搏对高胆固醇血症猪动脉内皮细胞的影响[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(12): 1491-3.
Chen XL, He XH, Zhang Y, et al. Effect of chronic enhanced external counterpulsation on arterial endothelial cells of porcine with hypercholesteremia[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2005, 25(12): 1491-3.
- [9] 钱孝贤, 吴伟康, 郑振声, 等. 增强型体外反搏对冠心病患者血清一氧化氮和丙二醛的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(1): 14-6.
Qian XX, Wu WK, Zheng ZS, et al. Effects of external counterpulsation on the sera nitric oxide and malondialdehyde in coronary heart disease patients[J]. Chin J Pathophysiol, 1999, 15(1): 14-6.
- [10] 张苗青, 伍贵富, 郑振声. 体外反搏对冠心病患者血浆 cAMP 和 cGMP 及其比值的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13(2): 150-3.
Zhang MQ, Wu GF, Zheng ZS, et al. The effect of external counterpulsation on plasma cAMP/cGMP balance in patients with coronary heart disease[J]. Chin J Pathophysiol, 1997, 13(2): 150-3.