

and the same time points of sham group, the HR and MAP at $T_2 - T_4$ in I/R group and TSNB group significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with I/R group, the HR and MAP at $T_2 - T_4$ in TSNB group significantly increased ($P < 0.05$). Compared with T_0 , the serum cTnI level at $T_2 - T_4$ increased significantly in I/R group and TSNB group ($P < 0.01$). Compared with the sham group, the serum cTnI level at $T_2 - T_4$ in I/R group and TSNB group significantly increased ($P < 0.01$). There was no significant difference in the serum cTnI level between I/R group and TSNB group at $T_2 - T_3$ ($P > 0.01$), while the serum cTnI level in I/R group was significantly higher than that in TSNB group at T_4 ($P < 0.01$). Compared with I/R group, the percentage of myocardial infarction area and myocardial ischemia danger area significantly decreased in TSNB group ($P < 0.01$), and the rats in sham group had no myocardial infarction. The Beclin-1 expression in cardiac muscle in I/R group was significantly higher than that in sham group ($P < 0.01$). The Beclin-1 expression in myocardial tissue in TSNB group was significantly lower than that in I/R group ($P < 0.01$). **Conclusion** The TSNB can alleviate MIRI in rats, which may be related with cardiomyocyte autophagy factor down regulation and coronary artery expansion.

Key words: thoracic sympathetic nerve block; ischemia-reperfusion injury; cardiomyocyte autophagy

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI) 是急性心脏缺血性疾病的一种常见并发症, 已引起人们的关注, 因此, MIRI 后对心肌的保护性研究一直是医学领域的热点之一^[1]。胸交感神经阻滞 (thoracic sympathetic nerve block, TSNB) 作为一种常用的神经阻滞方法, 在 MIRI 中的保护作用越来越受人们关注, 其可以通过阻滞相应节段躯体神经和交感神经传入和传出纤维的兴奋传导, 产生阻滞区域感觉、运动神经麻痹和交感神经功能障碍。血清心肌坏死标志物增高对早期诊断急性心肌梗死有重要意义, 心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 即是血清心肌坏死标志物的一种, 已被视为检测心肌损伤的金标准^[2]。自噬是细胞在外界环境影响下, 对内部受损、坏死的细胞器进行降解的过程, 它可以利用降解产物提供能量和重建细胞结构, 进而在维持心肌细胞稳态、促进心肌细胞生存方面起重要作用。在心肌组织自噬因子中, Beclin-1 既是调控自噬的关键因子之一, 也是自噬重要基因之一。作为自噬标志物的 Beclin-1 已成为检测自噬活性的重要方法, 其表达与自噬活性密切相关^[3]。本实验旨在通过检测 MIRI 大鼠血清中 cTnI 水平及心肌组织中自噬标志物 Beclin-1 的表达水平, 探讨胸交感神经阻滞对 MIRI 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年雄性 Wistar 大鼠 [北京维通利华实验动物技术有限公司 SCXK (京) 2012-0001] 30 只, 体质量 280 ~ 320 g, 随机分为假手术组、心肌缺血再灌注 (ischemic reperfusion, I/R) 组和 TSNB 组, 每组 10 只。

1.2 实验仪器和试剂 ALC-V8 动物呼吸机 (上海奥尔科特生物科技有限公司), ALC-B10 生物信息采集系统 (上海奥尔科特生物科技有限公司), 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (南京森贝加生物科技有限公司), 2,3,5-氯三苯四唑 (2,3,

5-trihenylterzolium chloride, TTC) (美国 Sigma 公司), Beclin-1 抗大鼠单克隆一抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司), β -actin 抗大鼠单克隆一抗、辣根过氧化物酶标记二抗 (美国 Jackson ImmunoResearch 公司)。

1.3 方法

1.3.1 TSNB 模型制备 TSNB 组和假手术组大鼠采用胸 4 ~ 胸 5 头端直视置管法, 大鼠腹腔内注射 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛 ($0.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉, 俯卧位固定, 剃除背毛, 以胸 4 ~ 胸 5 为中心消毒, 纵行切开皮肤, 分离皮下组织, 暴露胸 4 ~ 胸 5 椎弓板, 用注射器针头挑开棘上韧带、棘间韧带及黄韧带, 造成 1 个小的穿刺孔, 此孔可见白色硬脊膜, 直视下将硬膜外导管送入硬膜外隙, 并向头侧置管 1 cm, 将导管另一端引出背部, 接上微量注射器, 随后缝合皮肤, 固定硬膜外导管于背部。TSNB 组大鼠硬膜外隙注射体积分数 0.5% 罗哌卡因 $0.125 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 假手术组和 I/R 组大鼠注射等量生理盐水。

1.3.2 MIRI 模型制备 硬膜外穿刺成功后, 将 3 组大鼠仰卧位固定, 四肢皮下接入心电电极, 连接生物信息采集系统, 颈部皮肤剃毛消毒, 于颈部正中切开皮肤, 逐层分离肌肉, 显露气管后于气管上做“T”形切口, 行气管插管, 连接动物呼吸机, 呼吸频率 $60 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸比为 1.5 : 1; 右颈总动脉置管检测平均动脉压 (mean arterial blood pressure, MAP) 和心率 (heart rate, HR), 使用保温毯维持体温。MIRI 组和 TSNB 组大鼠沿胸骨左缘切开皮肤, 逐层分离肋间肌, 剪开心包膜暴露心脏, 用 6-0 号带线缝合针于左心耳 2 ~ 3 mm 处进针约 1.5 mm, 在肺动脉圆锥与左心耳之间出针, 线的 2 个末端套一聚乙烯管, 连同聚乙烯管一起结扎左冠状动脉前降支。40 min 后松开结扎线复灌 120 min。假手术组大鼠给予心脏左冠状动脉前降支穿线, 但不结扎。

1.3.3 血清 cTnI 水平测定 每只大鼠于开胸前 (T_0)、缺血前 (T_1)、缺血 20 min (T_2)、缺血 40 min (T_3) 及再灌注 120 min (T_4) 时取静脉血, 采用

ELISA 法检测血清 cTnI 水平。

1.3.4 心肌梗死面积测定 再灌注 120 min 时处死大鼠,取心脏,用冷盐水冲洗干净积血,将心脏放入 -20 ℃ 冰箱 20 min,切成 2 mm 厚的心肌切片,行 TTC 染色,应用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)计算梗死区和心肌缺血危险区面积。

1.3.5 心肌组织中 Beclin-1 相对表达量测定 再灌注 120 min 时处死大鼠,取缺血区心肌组织,采用 Western blot 方法检测心肌组织中 Beclin-1 表达。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行单因素方差分析,两均数比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 3 组大鼠 HR 比较

Tab.1 Comparison of HR of the rats among the three groups						($\bar{x} \pm s$, 次 · min ⁻¹)
组别	<i>n</i>	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
假手术组	10	438.51 ± 5.64	437.58 ± 5.64	437.77 ± 4.32	439.13 ± 4.09	434.64 ± 6.21
I/R 组	10	436.52 ± 5.46	437.16 ± 4.74	379.11 ± 6.17 ^{ab}	374.20 ± 4.90 ^{ab}	365.30 ± 4.58 ^{ab}
TSNB 组	10	436.62 ± 3.89	436.39 ± 4.24	402.51 ± 4.32 ^{abc}	398.47 ± 5.70 ^{abc}	386.38 ± 6.03 ^{abc}

注:与 T₀ 时比较^a*P* < 0.01;与假手术组比较^b*P* < 0.01;与 I/R 组比较^c*P* < 0.01。

表 2 3 组大鼠 MAP 比较

Tab.2 Comparison of MAP of the rats among the three groups						($\bar{x} \pm s$, mmHg)
组别	<i>n</i>	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
假手术组	10	104.68 ± 11.86	103.32 ± 12.81	102.63 ± 15.03	97.66 ± 6.93	97.11 ± 9.88
I/R 组	10	103.64 ± 8.39	102.67 ± 7.80	75.58 ± 6.88 ^{ab}	74.31 ± 4.95 ^{ab}	73.14 ± 7.37 ^{ab}
TSNB 组	10	105.10 ± 12.47	104.90 ± 13.12	92.99 ± 8.60 ^{abc}	89.21 ± 5.54 ^{abc}	88.51 ± 9.25 ^{abc}

注:与 T₀ 时比较^a*P* < 0.01;与假手术组比较^b*P* < 0.01;与 I/R 组比较^c*P* < 0.01;1 mmHg = 0.133 kPa。

2.3 3 组大鼠血清 cTnI 水平比较 结果见表 3。与 T₀ 时比较,T₂ ~ T₄ 时 I/R 组和 TSNB 组大鼠血清 cTnI 水平显著升高 (*P* < 0.01);与假手术组比较,T₂ ~ T₄ 时 I/R 和 TSNB 组大鼠血清 cTnI 水平显著升高 (*P* < 0.01);与 I/R 组比较,T₂ ~ T₃ 时 TSNB 组大鼠血清 cTnI 水平差异无统计学意义 (*P* > 0.05),T₄ 时 TSNB 组大鼠血清 cTnI 水平显著降低 (*P* < 0.01)。T₀ 时 3 组大鼠血清 cTnI 水平比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。

表 3 3 组大鼠血清 cTnI 水平比较

Tab.3 Comparison of serum cTnI level of rats among the three groups						($\bar{x} \pm s$, ng · L ⁻¹)
组别	<i>n</i>	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
假手术组	10	15.60 ± 1.62	16.42 ± 2.25	16.41 ± 1.74	16.43 ± 2.48	16.25 ± 1.78
I/R 组	10	15.18 ± 1.34	15.39 ± 3.48	25.69 ± 1.24 ^{ab}	25.58 ± 1.41 ^{ab}	32.40 ± 2.55 ^{ab}
TSNB 组	10	15.73 ± 1.32	15.54 ± 3.34	24.15 ± 2.19 ^{ab}	25.66 ± 1.25 ^{ab}	28.05 ± 1.40 ^{abc}

注:与 T₀ 时比较^a*P* < 0.05;与假手术组比较^b*P* < 0.05;与 I/R 组比较^c*P* < 0.05。

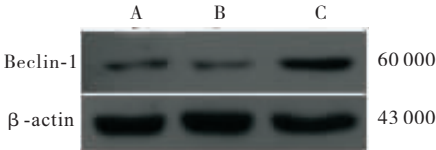
2.4 3 组大鼠心肌梗死区与心肌缺血危险区比较 与 I/R 组比较,TSNB 组大鼠心肌梗死区与心肌缺血危险区面积的百分比显著降低 [(38.28 ± 2.13)% *vs* (24.53 ± 1.75)%, *P* < 0.01],假手术组大鼠无心肌梗死。

2 结果

2.1 3 组大鼠一般情况 TSNB 组大鼠 TSNB 5 ~ 6 min 后出现眼睑下垂、胸腹肌肉松弛、胸前阻滞区体表温度升高;I/R 组大鼠左前降支结扎、复灌后,心电图出现宽大增高的 QRS 波,心肌颜色变苍白;提示 TSNB 及 MIRI 动物模型制备成功。假手术组大鼠无上述表现。

2.2 3 组大鼠 HR、MAP 比较 结果见表 1、2。与组内 T₀ 时及假手术组同时间点比较,T₂ ~ T₄ 时 I/R 组和 TSNB 组大鼠 HR、MAP 显著降低 (*P* < 0.05);与 I/R 组比较,T₂ ~ T₄ 时 TSNB 组大鼠 HR、MAP 显著升高 (*P* < 0.05)。3 组大鼠 T₀ 时 HR、MAP 与 T₁ 时比较,差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。

2.5 3 组大鼠心肌组织 Beclin-1 相对表达量比较 结果见图 1。与假手术组比较,I/R 组大鼠心肌组织中 Beclin-1 表达显著增高 (0.75 ± 0.02 *vs* 0.27 ± 0.01, *P* < 0.01);与 I/R 组比较,TSNB 组大鼠心肌组织中 Beclin-1 表达显著降低 (0.57 ± 0.02 *vs* 0.75 ± 0.02, *P* < 0.01);TSNB 组大鼠心肌组织中 Beclin-1 表达较假手术组显著增高 (*P* < 0.01)



A:TSNB 组;B:假手术组;C:I/R 组。

图 1 3 组大鼠心肌组织 Beclin-1 相对表达量

Fig.1 Relative expression of Beclin-1 in myocardial tissue of rats in the three groups

3 讨论

MIRI 指心肌缺血恢复血流供应后造成代谢功能障碍及结构损伤加重的现象,随着冠状动脉介入手术及溶栓治疗等的广泛开展,MIRI 也越来越常见。缺血的心肌组织再灌注后,在改善心肌供血的

同时,加重了单纯心肌缺血所造成的损伤,出现心律失常、心肌梗死面积扩大、持久性心室收缩功能低下等;因此,通过合理的围术期心肌保护措施减少 MIRI 是目前亟待解决的问题^[4]。

目前,对于 MIRI 的研究主要有 3 种 I/R 模型:(1)心肌细胞缺氧复氧模型;(2)体外的离体心脏 Langendorff 灌流模型;(3)通过结扎左冠状动脉前降支模拟缺血,松开结扎线模拟再灌注的在体动物模型。本实验采用结扎左冠状动脉前降支模拟 I/R 模型制作方法,是因为大鼠模型接近于临床病理特点,并且大鼠左冠状动脉前降支走行和分布与人类相似,结扎 40 min 后松开线结再灌注 120 min 能够有效建立 I/R 模型,本研究显示,结扎左冠状动脉前降支 40 min 后,松开线结再灌注 120 min,能够造成大鼠心肌严重损伤。

心脏由胸段脊髓(胸 1~胸 5)侧角发出的交感神经支配,TSNB 可直接阻滞支配心脏的交感神经节前纤维传导,减少因心肌损伤带来的疼痛,改善左心室壁的运动能力,降低心肌耗氧量及 HR,减少儿茶酚胺的释放,使狭窄的冠状动脉扩张,降低冠状动脉阻力,增加冠状动脉血流,但其对正常的冠状动脉无影响^[5-6],由于冠状动脉近 70% 的血流来自心室舒张期,因此,HR 减慢可以一定程度上使冠状动脉扩张^[7],从而减轻再灌注引起的心肌损伤。本研究结果发现,硬膜外注入罗哌卡因后,TSNB 组大鼠 HR 及 MAP 较 I/R 组显著下降。

肌钙蛋白是心肌细胞内肌纤维上的一种调节蛋白,由 3 个亚单位(cTnI、cTnT、cTnC)组成,而血清 cTnI 是心肌坏死标志物中最重要的一种,其在预测心肌梗死面积、评估溶栓效果、鉴别不稳定型心绞痛等有重要价值^[8]。本研究发现,I/R 组大鼠 I/R 阶段血清 cTnI 水平较假手术组及 TSNB 组显著升高,说明大鼠再灌注阶段有明显心肌损伤;而 TSNB 组大鼠在 TSNB 后血清 cTnI 水平较 I/R 组大鼠显著降低,说明 TSNB 减轻了再灌注阶段的心肌损伤;提示 cTnI 对 MIRI 早期诊断具有重要价值,TSNB 对 MIRI 损伤的心肌有保护作用。

自噬因子 Beclin-1 最早是由 LIANG 等^[9]在研究 Bcl-2 如何保护中枢神经系统抵御 sindbis 病毒感染,在成年大鼠脑基因中筛选 2 种杂交酵母菌用来识别 Bcl-2 相关基因产物时发现的一种新基因。MATSUI 等^[10]研究证实,自噬在心肌缺血和再灌注 2 个不同的阶段发挥不同的作用,心肌细胞在缺血阶段主要依赖丝裂原活化蛋白激酶通路介导的自噬发挥保护作用,而在再灌注阶段依赖 Beclin-1 基因调控的自噬起破坏作用。本研究结果显示,I/R 组大鼠心肌组织中 Beclin-1 表达显著高于假手术组,

说明 MIRI 能够诱导 Beclin-1 表达;TSNB 组大鼠心肌组织中 Beclin-1 表达显著低于 I/R 组,说明 TSNB 可以降低 Beclin-1 表达,从而防止再灌注阶段心肌细胞过度自噬带来的心肌损伤,起到保护心肌的作用。

有研究表明,大鼠在体急性性心肌 I/R 2 h 后,TTC 染色能够鉴别心肌梗死^[11]。本研究结果显示,TTC 染色后,通过计算得出 TSNB 组大鼠心肌梗死面积显著小于 I/R 组;说明 TSNB 对再灌注阶段心肌起保护作用。

综上所述,TSNB 能够减轻 MIRI,对心肌有明显的保护作用,其机制可能与冠状动脉扩张及下调心肌组织自噬因子 Beclin-1 表达,从而减少再灌注阶段心肌组织自噬有关。

参考文献:

- [1] HAUSENLOY D J, BAXTER G, BELL R, et al. Translating novel strategies for cardioprotection; the Hatter Workshop Recommendations[J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(6): 677-686.
- [2] CASALINO S, MANGIA F, STELIAN E, et al. High thoracic epidural anesthesia in cardiac surgery: risk factors for arterial hypotension[J]. *Tex Heart Inst J*, 2006, 33(2): 148-153.
- [3] 刘斌, 孙静, 张晋霞, 等. 自噬及自噬相关蛋白在帕金森病模型大鼠黑质纹状体中的表达及意义[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2014, 21(3): 187-191.
- [4] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion: from mechanism to translation[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [5] CLEMENTE A, CARLI F. The physiological effects of thoracic epidural anesthesia and analgesia on the cardiovascular, respiratory and gastrointestinal systems [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2008, 74(10): 549-563.
- [6] OWCZUK R, STEFFEK M, WUJTEWICZ M A, et al. Effects of thoracic epidural anaesthesia on cardiac repolarization [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(9): 880-883.
- [7] GAUSS A, JAHN S K, EBERHART L H, et al. Cardioprotection by thoracic epidural anesthesia; meta-analysis[J]. *Anaesthesist*, 2011, 60(10): 950-962.
- [8] 曾凯宏, 刘韧, 代惊, 等. 心肌肌钙蛋白检测方法的研究进展[J]. *新医学*, 2004, 35(1): 59-60.
- [9] LIANG X H, KLEEMAN L K, JIANG H H, et al. Protection against fatal sindbis virus encephalitis by beclin: a novel Bcl-2-interacting protein[J]. *J Virol*, 1998, 72(11): 8586-8596.
- [10] MATSUI Y, TAKAGI H, QU X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy[J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 914-922.
- [11] LI H, ZHOU C, CHEN D, et al. Failure to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury with sevoflurane preconditioning in old rats *in vivo* [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2013, 57(8): 1024-1031.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)