

维吾尔异常黑胆质载体心肌缺血再灌注损伤动物模型的建立及其心脏超微结构的改变

阿布都乃比·麦麦提艾力 艾力·艾比不拉 木拉提·阿布都热合曼
艾斯卡尔·沙比提 哈木拉提·吾普尔

摘要 目的 建立异常黑胆质载体心肌缺血再灌注损伤(MIRI)动物模型,观察其心脏超微结构的改变。
方法 根据维吾尔医学理论,采用多因素复制大鼠异常黑胆质性动物模型并确立模型建立后,再建立 MIRI 模型。36 只雄性 SD 大白鼠随机分为正常假手术组、正常手术组、模型假手术组及模型手术组,每组 9 只。观察各组造模前后的心电图变化、心肌酶(CK-MB)、肌钙蛋白(cTnT)以及心肌细胞超微结构等指标。**结果** 与正常假手术组比较,正常手术组与模型手术组动物心肌超微结构有一定的损害,如细胞肌质密度降低,肌丝排列松散,肌浆网扩张,肌原松散,线粒体数目减少,线粒体空泡变、肿大等变化。其中模型手术组动物心肌细胞超微结构破坏更加严重。与正常假手术组比较,正常手术组 CK-MB 与 cTnT 增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与正常假手术组比较,模型假手术组 CK-MB 与 cTnT 无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型手术组比较,模型假手术组及正常手术组 CK-MB 与 cTnT 水平明显较低,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论** 通过此实验成功建立更近临床实际的动物模型,此模型的建立为下一步干预治疗的系列研究提供了有力的条件。

关键词 维吾尔族医学;异常黑胆质;心肌缺血再灌注损伤

Establishment of Uyghur Medicine Abnormal Savda Carrier MIRI Animal Model and Its Cardiac Ultrastructural Changes Abudunaibi · Maimaitiaili, Aili · Aibibula, Mulati · Abudurehman, Aisikaer · shabiti, Halmurat · Upur Department of Cardiac Surgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi (830011), China

ABSTRACT Objective To innovatively establish a new platform of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) animal model by observing abnormal savda carrier MIRI indicators, and to observe changes of myocardial ultrastructure. **Methods** According to Uyghur medical theories, an abnormal savda carrier animal model was established and confirmed using multifactor, and then MIRI models set up. Totally 36 male white SD rats were randomly divided into the normal sham-operation group, the normal operation group, the model sham-operation group, and the model operation group, 9 in each group. ECG changes, myocardial enzymes (CK-MB), and cardiac troponin (cTnT), and ultramicrostructures were observed. **Results** Compared with the normal sham-operation group, some damage of ultramicrostructures occurred in heart muscles of rats in the normal operation group and the model operation group, such as lowered myoplasm density, loosely arranged myofilament, dilated myofibrils, reduced mitochondria number, vacuole and swelling mitochondrion. Ultramicrostructural damage of cardiac muscle cells was more severe in rats of the model operation group. Compared with the normal sham-operation group, CK-MB and cTnT increased in the normal operation group with statistical difference ($P < 0.01$). Compared with the normal sham-operation group, there was no statistical difference in CK-MB or cTnT in the model sham-operation group ($P > 0.05$). Compared with the model operation group, CK-MB and cTnT

基金项目:国家自然科学基金地区基金资助项目(No. 81460755)

作者单位:新疆医科大学第一附属医院心脏外科(乌鲁木齐 830011)

通讯作者:木拉提·阿布都热合曼, Tel: 13079999320, E-mail: 40215432@qq.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 05. 0590

obviously decreased in the model sham-operation group and the normal operation group with statistical difference (all $P < 0.01$). Conclusion Abnormal savda carrier MIRI model established in this experiment could provide favorable conditions for further MIRI intervention treatment.

KEYWORDS Uygur medicine; savda; myocardial ischemia-reperfusion injury

心肌保护一贯多重视基础研究,如心肌保护液的添加成分、降低炎症反应的方法等。心肌缺血预调方法是一种有效的心肌保护措施,其在临床方面的应用已成为心肌保护研究热点。目前,心肌保护措施的研究一般于动物心肌缺血再灌注损伤(MIRI)模型上进行^[1],且实验动物均处于健康状况,而由于心脏外科患者手术是在病变的心脏基础上进行。心脏由于手术创伤及阻断心脏血流、停跳灌注会处于缺血缺氧状态,即使是较短时间内恢复心脏供血,其所致的心功能衰竭也要数日才能恢复^[1]。维吾尔医学体液论认为,当人体长时间处在体内外各种不良因素影响时,保持人体正常生理功能所必需的黑胆质、黏液质、血液质和胆液质 4 种正常体液之一或几个同时发生“燃烧”,分别产生属性不同的各自对应的病理产物,并在血管壁产生的沉淀物还可作为新的刺激源继续刺激血管壁,加重血管壁组织、细胞功能的受阻,继而导致动脉粥样硬化、高血压、冠心病等心血管疾病,其中以异常黑胆质性最为典型。患有心脏疾病心肌的缺血再灌注损伤与健康心肌缺血再灌注相比破坏程度可能更加严重。故研究小组认为目前常用的模型不能完全体现心脏外科患者手术治疗过程中引起的心肌损害的实际表现。因此需要建立一种以维吾尔医异常黑胆质症为载体的动物心肌缺血再灌注损伤模型,使其与临床疾病状态更为相似^[2]。

材料与方法

1 实验动物 36 只雄性 SD 大白鼠,体重 120 ~ 180 g,由新疆医科大学实验动物中心提供[许可证号:SYXK(新)2010-0003]。

2 试剂及仪器 氯胺酮(0.05 g/mL,上海紫源制药有限公司,批号:H31020540);阿托品(0.5 mg/mL,上海亨元(川汇)诺克药业有限公司,批号:H20065792);地西洋(安定),(5 mg/mL,西南药业股份有限公司,批号:H50021483);BIC-500 型模拟气候箱(沈阳市温控开关厂);BL-420 生物信息采集系统(上海精密实验设备有限公司);P-300 型生理压力传感器(上海精密实验设备有限公司);DK-S24 型恒温水浴锅(沈阳市温控开关厂);BS-1105 型电子天平(科大创新股份有限公司中佳分公司);FM-生

化培养箱(科大创新股份有限公司中佳分公司);YJ-875 净化工作台(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

3 干寒属性饲料的制备 相等比例的芫荽籽和大麦按每公斤 7:3 的比例加入到普通饲料中^[3],然后制成颗粒状干饲料,委托新疆医科大学医学试验动物中心加工^[4]。

4 分组及模型建立

4.1 异常黑胆质动物模型建立 将 36 只大鼠按照随机数字表法分为 2 组:正常组 18 只,造模组 18 只。造模组处于干寒喂养环境(温度 6 ~ 10 °C,相对湿度 32%),给予干寒属性大鼠饲料,同时在不可预知的足底点击(20 ~ 40 v, 20 min, 每天 1 次, 21 天)作用下建立的异常黑胆质动物模型。观察实验动物一般状况、体温、体重、舌象、尿和大便性质及形状等生物表征。参考文献[5]判断模型的建立。

4.2 异常黑胆质动物心肌缺血再灌注损伤(MIRI)模型建立 确定异常黑胆质载体动物模型建立成功后,再次随机分亚组:正常组分为正常假手术组、正常手术组,模型组分为模型假手术组及模型手术组,每组 9 只大鼠。氯胺酮 1 支,阿托品 1 支,安定 1 支用盐水稀释到 10 mL,按每 100 g 体重 0.75 mL 对所有大鼠进行腹腔麻醉,动物仰卧固定于手术台上,大头针穿刺四肢皮下接心电图机,稳定 5 min 后记录一段正常心电图作为对照。气管插管处接呼吸机辅助呼吸(辅助呼吸参数为:呼吸频率 50 次/min,潮气量 20 mL/kg,呼吸时比 1:1^[6])。剪断 3、4 肋骨,用拉钩拉开胸壁,在两侧胸壁肌肉分别穿一双线留小圈在内侧^[7]。小心剪开心包膜,暴露心脏,用棉签轻压住心脏。以左冠状静脉主干为标志,在左心耳下缘 3 ~ 4 mm 处,以 520 无创缝合针进针,进针约 115 mm,斜向右上方肺动脉圆锥方向出针,针距 3 ~ 4 mm,并置内径 115 mm、长 0.15 cm 的带凹槽乳胶管备用,分别将线两端穿入小圈内。待呼吸平稳后收紧结扎线,连同乳胶管一并结扎,使乳胶管压迫左冠状动脉前降支(LAD)。正常假手术组仅穿线,不结扎;正常手术组结扎 30 min,再灌注 120 min;模型假手术组仅穿线,不结扎;模型手术组结扎 30 min,再灌注 120 min。整

个实验过程同步记录手术前后多导联心电图以标准Ⅱ导联 S-T 段抬高 ≥ 0.1 mV 作为缺血成功,S-T 段下降 1/2 以上作为再灌注成功^[8]。

5 观察指标及方法

5.1 定性指标 观察正常组与模型组实验动物皮肤毛发,舌象舌苔,行为状态,情绪反应,饮水状态及尿的颜色,兴奋程度,气味,大便颜色及形状。

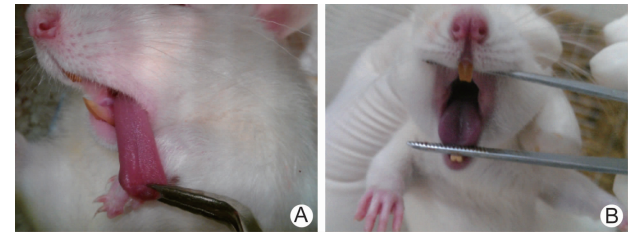
5.2 心肌酶(CK-MB)及肌钙蛋白(cTnT)检测 CK-MB、cTnT 测定于实验动物缺血再灌注 120 min,腹主动脉抽血 4~8 mL。送动物实验室生化室分别以 N-乙酰胱氨酸激活法及免疫抑制法测定^[9]。

5.3 心肌超微病理结构 实验动物再灌注损伤明确后处死(从右心耳放血致死),取有心肌梗死区中间部全层心肌,心肌标本按电镜标本常规制作程序处理,超薄切片机制备机切片,酯酶钠染色及硝酸铅复染,透射电镜观察心肌超微结构改变^[10]。

6 统计学方法 采用 SPSS 17 统计软件进行处理分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行差异分析重复测量资料采用方差分析法进行对比。分类资料用构成比描述其基本特征。心肌功能指标用多个均数的比较进行差异分析,组间比较采用方差分析多组间比较。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组大鼠一般状态比较(图 1,表 1) 与正常组比较,造模组一般状态有明显的改变,出现了形体消瘦、烦躁不宁、易怒、攻击性强、倦怠嗜睡、易醒、孤僻、毛发乱无光泽、易掉、皮肤较凉,舌淡暗紫有瘀斑,大便干燥、体重增长速度慢、尿和大便量增多等改变。观测到舌象变化,正常组舌淡红色,造模组舌暗紫色,有瘀斑。在实验过程中有 2 只大鼠非预期死亡,均发生在造模组,死亡原因分析为在已有异常黑胆质症候的疾病基础上进行阻断冠状动脉血流使发生大面积心肌梗死心脏骤停可能性大,未影响最终结果。



注:A 为正常组舌象;B 为造模组舌象

图 1 大鼠舌象观测

表 1 两组大鼠一般状态的比较		
观察项目	正常组(18 只)	造模组(18 只)
体形	正常	消瘦
皮肤毛发	有光泽	暗淡,无光泽,枯燥
行为状态	佳	烦躁
情绪反应	佳	易怒,攻击性强
兴奋程度	对刺激敏感	反应略减
睡眠状态	正常	倦怠嗜睡,易惊
尿量性质	浅黄色	清,有臭味
大便状态	成形,较软	成形,细长,较硬
舌象舌苔	舌淡红	舌暗紫,有瘀斑,少苔

2 各组 CK-MB 及 cTnT 水平比较(表 2) 与正常假手术组比较,正常手术组 CK-MB 与 cTnT 增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与正常假手术组比较,模型假手术组 CK-MB 与 cTnT 无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型手术组比较,模型假手术组及正常手术组 CK-MB 与 cTnT 水平明显降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

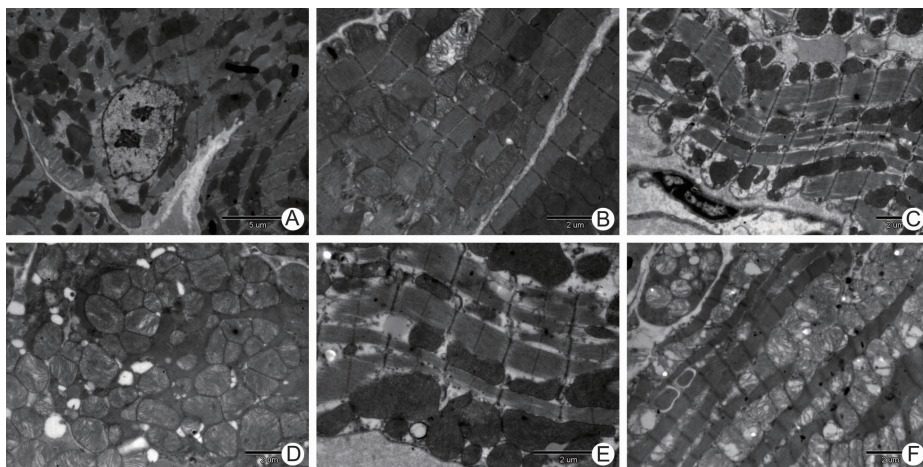
表 2 各组 CK-MB 及 cTnT 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	CK-MB(U/L)	cTnT(ng/mL)
正常假手术	9	70.245 00 $\pm$ 3.226 47	17.720 00 $\pm$ 0.837 85
正常手术	9	80.438 60 $\pm$ 2.422 58 ^{*△}	21.221 40 $\pm$ 1.161 73 ^{*△}
模型假手术	9	71.401 00 $\pm$ 1.931 63 [△]	17.354 00 $\pm$ 0.946 97 [△]
模型手术	7	102.670 90 $\pm$ 2.180 46	29.040 90 $\pm$ 0.7392 80

注:与正常假手术组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型手术组比较,[△] $P < 0.01$

3 各组心肌细胞超微结构的改变比较(图 2) 正常假手术组心肌电镜图可见,肌原纤维及线粒体排列整齐(图 2A)。正常手术组心肌电镜图可见肌质密度降低线粒体数目减少(图 2B),肌原松散,糖原颗粒排列欠整齐(图 2C)。模型假手术组心肌电镜图可见,轻微肌原纤维散乱部分线粒体肿胀其余正常(图 2D)。模型手术组心肌电镜图可见轻微肿胀,肌质密度降低,肌丝排列松散,肌浆网扩张(图 2E),肌原松散,肌浆网扩张,线粒体空泡变,水肿扩张(图 2F)。

讨 论

此前的有关异常黑胆质研究表明,干寒喂养环境、干寒属性的饲料、慢性电刺激等多因素的综合作用所建立的异常黑胆质载体动物,随造模时间的延长而出现体重增长速度慢,烦躁不安,易怒,攻击性强,倦怠嗜睡、易醒,孤僻,毛发乱无光泽、易掉、皮肤较凉,舌淡暗紫有瘀斑,大便干燥,形体消瘦,尿和大便量增多等^[11]。本实验中重复应用已有的方法造模,实验过程中很明显的观测到造模组老鼠一般状况的变化过程,符合此前的研究结果。根据此前的相关异常黑胆质的



注:A 为正常假手术组;B、C 为正常手术组;D 为模型假手术组;E、F 为模型手术组

图2 各组大鼠心肌高倍电镜图 (酯酶钠染色及硝酸铅复染, × 20 000)

研究和本实验的结果表明我们建立的异常黑胆质载体动物模型是可行的^[12]。

由心肌超微结构的变化可知,各组心肌损伤程度有着明显的差异,正常手术组心肌超微结构示:肌质密度降低,线粒体数目减少等变化,说明缺血对心肌超微结构有一定的损伤。异常黑胆质载体动物模型组心肌超微结构示:肌纤维散乱,线粒体肿胀。心肌原纤维之间存在丰富的线粒体,使把心肌丝分离成粗细不等的肌丝束^[13],所以本组大鼠心肌细胞肌纤维散乱可能是由肿大的线粒体导致的,线粒体及细胞的肿大是由细胞缺氧引起 ATP 合成功能异常导致的一系列变化,因此笔者推测异常黑胆质载体动物模型心肌细胞处于轻度缺氧状态。异常黑胆质载体动物 MIRI 组大鼠心肌超微结构示:肌质密度降低,肌丝排列松散,肌浆网扩张,肌原松散,线粒体空泡变,水肿大。心肌细胞正常的超微结构破坏比较严重,线粒体空泡变,空泡的形成说明线粒体极度的肿胀,已经完全失去氧化代谢功能。因此可见与正常组比较,异常黑胆质载体动物心肌已经处于异常状态,异常黑胆质症动物心肌缺血再灌注损伤更严重。可能是由异常黑胆质体液导致的冠状动脉血管壁狭窄、弹性减弱以及血管壁增厚导致的心肌细胞缺血缺氧引起的^[14]。

通过比较 CK-MB 及 cTnT 水平的变化,笔者认为异常黑胆质载体动物缺血再灌注损伤的心肌缺血区域及对心肌收缩功能的影响更为严重,可能与异常黑胆质性心脏病病理基础加重了缺血再灌注组损伤程度。本实验建立了比较接近实际临床的动物模型,此模型的建立为下一步干预治疗的系列研究提供了有力的条件。

参 考 文 献

- [1] 张新宁,吕琪,张永亮,等.大鼠心肌缺血再灌注模型建立方法的改进[J].武警医学院学报,2008,17(11):941.
- [2] Nordlie MA, Wold LE, Simkhovich BZ, et al. Molecular aspects of ischemic heart disease: ischemia/reperfusion-induced genetic changes and potential applications of gene and RNA interference therapy[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2006, 11(1): 17-30.
- [3] Yusup A, Upur H, Umar A, et al. Protective effects of Munziq and Mushil of abnormal Savda to mitochondrial oxidative damage[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2004, 18(4): 471-476.
- [4] 哈木拉提·吾甫尔.维吾尔医气质、体液评及其现代研究[M].乌鲁木齐:新闻科学技术出版社,2003:100-115.
- [5] 哈木拉提·吾甫尔,阿依努尔·买提斯迪克,努尔买买提·艾买提,等.异常黑胆质证载体动物模型的建立及其自然恢复反证[J].新疆医科大学学报,2006,29(10):910-914.
- [6] 王淑侠,兰小莉,王吉文,等.大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型的改进与评价[J].解剖科学进展,2000,6(4):371-373.
- [7] Sadek HA, Nulton-Persson AC, Szweda PA, et al. Cardiac ischemia/reperfusion, aging, and redox-dependent alterations in mitochondrial function[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 420(2): 201-208.
- [8] 成伶俐,吴素华,李志梁,等.大鼠心肌缺血再灌注损伤动物模型的建立与评估[J].中国实验诊断学,2010,14(8):1163.
- [9] 曾海燕.PCSK9 和 Caspase3 在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的表达变化[D].湖南:南华大学,2011:5.
- [10] 李艳茹,崔新明,李颖,等.非酶糖基化对小鼠胸腺和脾脏超微结构的影响[J].电子显微学报,2002,21(5):527-528.

- [11] 阿衣努尔·买提斯迪克, 哈木拉提·吾甫尔, 努尔买买提·艾买提, 等. 异常黑胆质载体动物饮食量和饮水量的观察[J]. 新疆中医药, 2006, 24(1): 5-7.
- [12] 哈木拉提·吾甫尔, 阿衣努尔·买提斯迪克, 等. 维医异常黑胆质证载体动物模型的评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(3): 186-187
- [13] 赵新, 曾玉杰. 心脏缺血再灌注心律失常与心肌超微结构改变关系的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 7(7): 608-610.
- [14] Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischemia reperfusion and infarction[J]. Cardiovasc Res, 1988, 22(7): 447-451.
- (收稿: 2013-11-07 修回: 2015-02-08)

第四届传统医学与现代医学比较国际学术大会第一轮会议征文通知

为促进各民族传统医学相互之间及与现代医学的比较、继承、发展与融合, 进一步弘扬民族传统医学文化, 发扬传统医学与现代医学整合在诊治疾病方面的优势, 扩大中国传统医学在国内外的影响力, 加强国际间的学术交流与合作, 促进传统医学融入现代医学, 由复旦大学、复旦大学附属华山医院、中国中西医结合学会呼吸病专业委员会、《中国医学人文》杂志、云南省人民政府扶贫开发领导小组办公室、新疆医科大学、新疆维吾尔医学专科学校、内蒙古自治区中医药管理局、甘肃省中医药管理局、青海省果洛藏族自治州卫生和计划生育委员会、东中西部区域发展和改革研究院主办, 复旦大学附属华山医院、云南省西双版纳傣族自治州和云南省滇西技术大学承办的“第四届传统医学与现代医学比较国际学术大会”将于2015年11月26日-30日在中国云南省西双版纳傣族自治州召开。本次国际学术大会的目的在于构建多种民族传统医学之间及与现代医学比较研究的学术交流平台, 通过相互之间全方位的比较与交流, 促进彼此之间的认识、交融与提高, 吸取各民族传统医学的精华, 促进中国传统医学体系的构建和人类共同医学文明的发展。认识、交流、比较和融合, 是本次国际学术大会的宗旨, 会议的基本主题是相互认识、提高水平、促进融合、更好地为人类服务。另外, 根基于传统医学理论的药物和天然药物研发成果的介绍也是本次国际学术大会的重要内容。大会将分别以特邀报告、专题讲座、院士论坛、壁报交流、卫星会等多种形式就会议主题进行学术交流, 并积极介绍目前民族传统医学与现代医学诊治常见疾病中的新方法、新药物等最新研究成果。届时, 大会将分别邀请国内外多位知名院士、教授、学者做大会主题发言, 汇聚国内外著名传统医学、现代医学、中西医结合医学等领域的专家及医学相关人文学科顶级专家, 相互认识、相互交流、相互学习、共同提高。

大会主题 探讨与比较各民族传统医学发展史, 探讨与比较各民族传统医学的人文特征, 探讨与比较各民族传统医学基本理论体系和重要概念, 探讨与比较各民族传统药物等的理论基础及特点, 以求逐步明确相互之间的相似性与差异性; 探讨与比较各民族传统医学与现代医学认识和干预疾病的个性与共性, 发展与融合各民族传统医学, 推进中国传统医学和人类医学事业的发展。

征文内容 征求有关各民族传统医学(包括汉医、藏医、维医、蒙医、傣医、回医、苗医、壮医等)构成要素(包括临床实践、文化特征、古典哲学、宗教特征和历史背景的演变)方面的文章; 征求各民族传统医学与现代医学认识和干预优势病种进展及比较方面的文章; 征求涉及传统药物及天然药物(包括汉药、藏药、维药、蒙药、傣药、回药、苗药、壮药等)研究与开发进展的文章。

征文要求 (1) 凡未在国内外刊物上公开发表过的论文均可投稿。(2) 所提交的论文原则上为英文全文, 在特殊情况下可使用中文、维语、藏文或其它语言文字, 但需附300字左右英文摘要, 并注明论文题目、作者、工作单位、通讯地址、邮政编码。(3) 论文需用word格式排版, 小四号字, 1.5倍行距, 标准字间距。(4) 参会论文以附件形式发送电子邮件至jcdong2004@126.com。(5) 若无条件上网提交论文者, 请将论文用软盘邮寄至大会组委会秘书处。

截稿时间 2015年10月20日(以邮戳或电子邮件寄出时间为准, 逾期恕不受理)

联系方式 联系人: 董竞成, 联系地址: 上海市乌鲁木齐中路12号复旦大学附属华山医院(邮编200040), Tel: 021-52888301, 13601761761, 传真: 021-52888265, E-mail: jcdong2004@126.com; 联系人: 李璐璐, 联系地址: 上海市乌鲁木齐中路12号复旦大学附属华山医院(邮编200040), Tel: 021-52888301, 13816862497, 传真: 021-52888265, E-mail: lululeehui@163.com。