

急性心肌梗死后猪血清内皮型一氧化氮合酶的表达：体外低能震波物理能量的影响途径*☆

孙 帅¹, 郭 涛²

Expression of serum endothelial nitric oxide synthase in pigs following acute myocardial infarction: Influencing ways of extracorporeal cardiac shock wave therapy

Sun Shuai¹, Guo Tao²

Abstract

BACKGROUND: Extracorporeal cardiac shock wave therapy (CSWT) can up-regulate angiogenic factors and its receptors, promote angiogenesis and collateral circulation establishment by introducing shock waves to myocardium, however, the specific mechanisms remain unclearly.

OBJECTIVE: To observe the influence of CSWT on the content of serum endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in pigs following acute myocardial infarction (AMI).

METHODS: Pig AMI model was established by embolizing the distal of left anterior coronary artery. Following model preparation, pigs were randomly divided into 2 groups. In the experimental group received three CSWT at days 1, 3 and 5, 200 hits per point, totally 12 points, with 0.09 mJ/mm² energy. Pigs with simple AMI were served as the control group. The serum eNOS level was detected by ELISA method before, immediate postoperative, and at days, 1, 3, 5, and weeks 1, 2, 3, and 4 after operation.

RESULTS AND CONCLUSION: The eNOS level of both groups were obvious decreased at immediate postoperative than that before operation. At day 1 after CSWT, eNOS level was increased in the experimental group, which was still decreased in the control group. It revealed that CSWT play a positive effect on ischemia myocardium. The eNOS level reached a peak in the experimental group after 3 times of CSWT, lasted for 2-3 weeks, and began to decrease at week 4. The difference between the experimental group and control group had significance ($P < 0.01$). The results demonstrated that CSWT can treat AMI effectively by promoting eNOS expression.

Sun S, Guo T. Expression of serum endothelial nitric oxide synthase in pigs following acute myocardial infarction: Influencing ways of extracorporeal cardiac shock wave therapy. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(9):1649-1652.

[<http://www.crter.cn> <http://en.zglckf.com>]

摘要

背景: 体外心脏震波治疗通过体外导入心肌的低能震波物理能量,使活体内血管再生因子及其受体表达上调,促进缺血组织的血管新生和加速侧支循环建立,但其具体作用机制尚不完全明确。

目的: 观察体外心脏震波治疗对急性心肌梗死后猪血清内皮型一氧化氮合酶水平的影响。

方法: 以冠脉左前降至远端栓塞法制作猪急性心肌梗死模型。造模后以抽签法随机分为2组:实验组于术后1, 3, 5 d接受3次体外心脏震波治疗,200击/点,共12点,能量为0.09 mJ/mm²。以单纯心肌梗死为对照组。于术前,术后即刻、1 d、3 d、5 d、1周、2周、3周、4周采用酶联免疫反应方法检测血清内皮型一氧化氮合酶水平。

结果与结论: 实验组及对照组术后即刻血清内皮型一氧化氮合酶水平均较术前明显减少。实验组术后1 d接受体外心脏震波治疗后内皮型一氧化氮合酶表达开始升高,而对照组内皮型一氧化氮合酶呈下降趋势,说明实验组导入体内的超声波能量在心肌缺血局部产生了正性作用。第3次接受体外心脏震波治疗治疗后内皮型一氧化氮合酶表达达高峰,可持续两三周,第4周下降。对照组内皮型一氧化氮合酶随时间推移逐渐减少,两组间比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。结果说明体外心脏震波可通过有效地促进内皮型一氧化氮合酶表达治疗急性心肌梗死。

关键词: 体外心脏震波; 急性心肌梗死; 内皮型一氧化氮合酶; 数字化医学; 心血管疾病

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.09.030

孙帅, 郭涛. 急性心肌梗死后猪血清内皮型一氧化氮合酶的表达: 体外低能震波物理能量的影响途径[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(9):1649-1652. [<http://www.crter.org> <http://cn.zglckf.com>]

¹Department of Cardiology, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China; ²Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Sun Shuai☆, Studying for doctorate, Attending physician, Department of Cardiology, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China
alice1191@sina.com

Supported by: the Tackle Key Program for Society of Yunnan Province, No. 2006SG10*

Received: 2009-12-11
Accepted: 2010-01-15

¹ 云南省第一人民医院心内科, 云南省昆明市 650032; ² 昆明医学院第一附属医院心内科, 云南省昆明市 650031

孙 帅☆, 女, 1975年生, 山东省青岛市人, 汉族, 昆明医学院在读博士, 主治医师, 主要从事体外心脏震波治疗冠心病研究。
alice1191@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)09-01649-04

收稿日期: 2009-12-11
修回日期: 2010-01-15
(20091214006/GW·Z)

0 引言

对于无冠状动脉介入治疗、无外科冠脉旁路搭桥治疗指征而药物治疗效果又差的缺血性心肌病患者, 其预后较差^[1]。因此, 寻找一种有效的、无创的治疗缺血性心肌病的方法成为目前研究的热点^[2]。虽然没有一种药物和方法可以取代瘢痕心肌成为有收缩性的组织, 但是可以通过促进心肌血管再生使冬眠心肌恢复功能。2000年德国埃森大学心血管中心Gutersohn等^[3]提出低能量的震波可以上调体外培养的人上皮细胞的血管再生因子。2003-09瑞士STORZ MEDICAL公司在多年制造体外震波碎石设备的基础上, 开发研制出体外心脏震波治疗仪^[4]。目前已有研究表明, 体外心脏震波治疗应用于动物模型和缺血性心肌病患者均收到了显著疗效^[5-6]。体外心脏震波治疗用于急性心肌梗死治疗是否同样安全有效, 目前尚在研究中。

本实验利用猪急性心肌梗死模型, 观察体外心脏震波治疗治疗后血清的表达, 探讨体外心脏震波治疗用于急性心肌梗死的安全性, 同时通过动态监测血清内皮型一氧化氮合酶的变化, 为进一步阐明体外心脏震波治疗的机制提供新线索。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2009-05-08/08-27完成, 动物模型制作及治疗、抽血均在昆明医学院第一附属医院完成; 样本检测送南京建成生物工程公司。

材料: 西双版纳小耳猪12头, 体质量20~30 kg, 雌雄不拘, 购自昆明医学院动物科, 并由动物科工作人员饲养。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准^[7]。

仪器及试剂:

仪器	来源
Labsystems Finnpipette 100 μL 单道移液器	芬兰
Thermo 50 μL 8 道移液器	杭州华通仪表有限公司
HH-4 数显恒温水浴锅	国华电器有限公司
华东电子 DG5033A 酶标仪	南京华东电子集团医疗装备 有限责任公司

体外心脏震波治疗仪: 由瑞士STORZ MEDICAL AG公司研制, 是一台非侵入式血管再生设备, 见图1。它通过超声心动图定位、心电图R波触发, 将低能超声震波的能量导入心肌组织, 在细胞内产生机械剪切力和空穴效应, 引起局部微环境改变, 发挥促进心肌血运重建的治疗作用^[7]。



Figure 1 Extracorporeal cardiac shock wave therapy instrument
图1 体外心脏震波治疗仪

试剂盒信息: 美国ADL goat anti-porcine endothelial Nitric Oxide Synthase Elisa 试剂盒。Catalog No:QRCT-301330101222EIT/UTL。Lot No: RT110371。

实验方法: 将猪以3%戊巴比妥静脉麻醉后, 于腹股沟动脉穿刺, 经导丝将右冠脉指引导管插入至主动脉升段, 注射欧乃派克行左冠状动脉造影, 选择左前降支远端为堵塞目标血管, 将球囊放置到位, 用压力泵以202.65 kPa扩张球囊, 阻断前向血流1, 2, 5 min, 每次间隔60 s, 然后将以往手术中用过并消毒的球囊(1.5 cm)完整剪下, 两端磨光滑, 由球囊杆沿导丝推送至堵塞处, 将球囊永久植入冠状动脉前降支远端, 冠状动脉造影显示前降支远端TIMI血流0级, 室壁运动减弱, 心电图相应导联ST-T改变, 即认为急性左室前壁心肌梗死模型制作成功^[8]。造模后以抽签法随机分为实验组(体外心脏震波治疗治疗组)和对照组, 每组各6只。

分组干预情况: 实验组于术后1, 3, 5 d共接受3次体外心脏震波治疗(见图2), 治疗部位经超声定位选择在梗死边缘区, 共12点, 200击/点, 能量为0.09 mJ/mm²。分别于手术前, 以及手术后8个不同时间点(术后即刻、1 d、3 d、5 d、1周、2周、3周、4周)抽取外周血, 用酶联免疫反应方法检测血清内皮型一氧化氮合酶水平。对照组仅行心梗模型制作, 不行体外心脏震波治疗治疗, 余同实验组。



Figure 2 Treating picture of extracorporeal cardiac shock wave therapy
图2 实验组猪体外心脏震波治疗图

血样本的采集: 实验组于体外心脏震波治疗治疗术毕即刻采集血样, 对照组血样在相同时间采集。余血样按实验设计在相应时间采集。采血后2 h内常温下离心(5 000 r/min, 5 min), 取血清置于-80 °C冰箱储存待测。

酶联免疫法测定内皮型一氧化氮合酶: 将Elisa 试剂盒放置室温40 min。取出酶标板, 依照次序分别加入100 μL的标准品于空白微孔中; 标记样品标号, 加100 μL血清样本于空白微孔中。在标准品孔和样品孔中分别加入50 μL的酶标记溶液, 并将其混均, 用保鲜膜密封酶标板, 置于37 °C水浴锅水浴60 min。清洗板清洗6次后, 每孔加入底物A、B液各50 μL, 混均置37 °C水浴锅避光反应15 min。最后每孔加入50 μL的终止液终止反应。将酶标板置于华东电子DG5033A酶标仪上, 450 nm处测定A值, 根据标准曲线计算样本含量。

主要观察指标: 血清内皮型一氧化氮合酶水平变化。

设计、实施、评估者: 第二作者设计并评估实验, 实施者为第一作者。

统计学分析: 使用SPSS 11.5软件。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

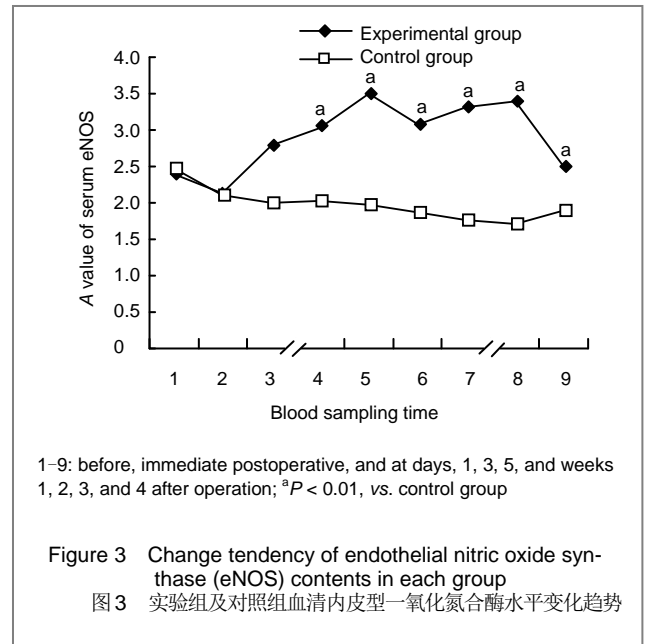
2.1 实验动物数量分析 12只猪均造模成功进入结果分析。

2.2 各组内皮型一氧化氮合酶检测结果 术后即刻实验组及对照组血清内皮型一氧化氮合酶水平均较术前明显减少。体外心脏震波治疗治疗组于术后1 d治疗后内皮型一氧化氮合酶表达开始升高, 第3次治疗(即术后5 d)后达高峰, 内皮型一氧化氮合酶表达升高可持续两三周, 第4周下降。对照组术后血清内皮型一氧化氮合酶表达呈持续减少, 术后4周最低。两组结果相比差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。数据结果见表1。趋势图变化见图3。

表1 实验组及对照组血清内皮型一氧化氮合酶水平变化
Table 1 Changes of endothelial nitric oxide synthase contents in each group ($\bar{x} \pm s, A$)

Time	Experimental group	Control group
Before operation	2.382 2±0.072 7	2.479 8±0.100 2
Immediate postoperative	2.131 9±0.076 2	2.107 7±0.052 0
1 d	2.791 1±0.287 6 ^a	2.001 6±0.123 7
3 d	3.034 4±0.224 6 ^a	2.013 6±0.112 3
5 d	3.511 0±0.043 3 ^a	1.976 0±0.016 5
1 wk	3.077 1±0.040 5 ^a	1.870 2±0.101 1
2 wk	3.324 9±0.181 9	1.769 3±0.012 1
3 wk	3.396 7±0.063 9 ^a	1.703 6±0.032 1
4 wk	2.495 3±0.189 4 ^a	1.894 8±0.123 8

^a $P < 0.01$, vs. control group



从两组曲线走势看, 两组血清内皮型一氧化氮合酶A值存在显著性差异。

3 讨论

目前, 国际上公认的冠状动脉粥样硬化性心脏病的治疗方法有药物治疗, 冠状动脉介入和冠状动脉搭桥。而血管再生疗法是继这三大治疗方法外一新的研究方向^[9]。震波是一种纵向声波, 似单一的、短的压力脉冲针, 穿过超声波水到达人体组织。脉冲波持续时间为1 μs, 振幅100 MPa, 随后数微秒的拉伸振幅较低。进入组织后其可在组织局部产生直径1 μm大小细胞泡, 继而细胞泡破裂形成“空穴效应”并在细胞膜上产生剪应力^[10]。通过产生一氧化氮(NO)起到促进缺血组织的血管再生^[11]。而体外心脏震波治疗仪正是基于上述原理制作而成, 它通过滴定式释放经过聚焦的脉冲波能量, 经机载实时超声心动图精确定位心肌缺血靶区, 依靠实时体表心电图R波触发体外震波在心电活动绝对不应期发放。体外导入心肌的低能震波物理能量能够使活体内血管再生因子及其受体表达上调, 有促进缺血组织的血管新生和加速侧支循环建立的作用。

NO是一种重要的心血管系统信号分子, 其具有舒张血管、调节血流、抑制血管平滑肌细胞增殖等多种功能。由于NO是一种气体自由基, 在体内极不稳定, 半衰期仅为3-5 s, 临床检测困难, 误差大, 因此许多关于NO的研究都集中在一氧化氮合酶的研究上^[12]。内皮型一氧化氮合酶是NO合成途径中的限速酶。大量研究表明在血管内皮和心肌中表达的内皮型一氧化氮合酶能够维持心脏和血管的正常生理功能, 调节心室及血管重构过程^[13-15]。其促进生成的NO在缺血后心肌组织微

循环形成过程中起重要作用^[16]。同时能够减少心脏前后负荷, 增强心肌的扩张效应, 通过左心室 Frank-Starling 调节机制来保持心输出量, 对生理和病理状态下的心脏泵血均有益^[17]。

石姝梅等^[18]采用开胸结扎大鼠冠状动脉左前降支建立心梗模型, 反转录聚合酶链反应检测大鼠心肌梗死后 1、2 及 24 h 三个时段心肌内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达, 发现结扎 2 h 时大鼠梗死及梗死周围区域心肌组织内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达下降, 并一直持续至结扎后 24 h。本实验通过动态监测猪心梗后体外心脏震波治疗治疗组与未治疗组血清中内皮型一氧化氮合酶含量变化, 探讨体外心脏震波治疗是否能够促进内皮型一氧化氮合酶生成对心脏起保护性作用。

本实验结果体外心脏震波治疗治疗组于术后 1 d 治疗后内皮型一氧化氮合酶表达开始升高, 而未治疗组内皮型一氧化氮合酶呈下降趋势, 说明治疗组导入体内的超声波能量在心肌缺血局部产生了正性作用。第 3 次治疗(即术后 5 d)后达高峰, 内皮型一氧化氮合酶表达升高可持续两三周, 第 4 周下降。因治疗方案是参照国外已有的文献进行, 故体外心脏震波治疗仅于动物心梗术后 1, 3, 5 d 治疗过 3 次, 可以看出 3 次治疗后抽血, 血清中内皮型一氧化氮合酶表达均升高, 且内皮型一氧化氮合酶表达升高可持续两三周^[19]。而对照组术后血清内皮型一氧化氮合酶表达呈持续减少, 术后 4 周最低。这与心肌细胞损伤坏死及愈合过程有关, 冠脉血流中断 15 min 以上即可出现心肌坏死, 1.0~2.0 h 绝大部分心肌出现坏死, 一两周后坏死心肌开始吸收, 逐渐形成瘢痕组织, 在 6~8 周形成瘢痕愈合。而内皮型一氧化氮合酶只有在瘢痕愈合期才开始表达, 故在心肌尚未修复过程中血清内皮型一氧化氮合酶表达呈持续减少。与既往文献报道相符^[20]。两组结果相比有明显统计学差异($P < 0.01$)。

综上所述, 体外心脏震波治疗能够促进急性心肌梗死后猪血清内皮型一氧化氮合酶的表达, 对心肌缺血区域血管再生起促进作用。治疗过程中无不良反应产生, 治疗无创、安全, 有望成为将来治疗心肌梗死的一种新方法。

4 参考文献

[1] Jessup M, Brozena S. Heart failure. N Engl J Med. 2003;348:2007-2018.
 [2] Wang YS, Cheng XS. Nanchang Daxue Xuebao:Renwen Shehui Kexueban.17(2009)03:541-543.
 王耀晟, 程晓曙.细胞移植修复缺血性心肌梗死的哲学思考[J]. 南昌大学学报:人文社会科学版,2009,40(2): 541-543.
 [3] Gutersohn A, Caspari G. Shock waves upregulate vascular endothelial growth factor mRNA in human umbilical vascular endothelial cells. Circulation.2000;102(suppl):18.

[4] Erbel R, Gutersohn A. Cardiac shock wave therapy, a successful workshop at ESC 2003 [DB/OL]. http://www.storzmedical.com/English/News, 2003-09-01.
 [5] Fukumoto Y, Ito A, Uwatoku T, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy ameliorates myocardial ischemia in patients with severe coronary artery disease. Coron Artery Dis. 2006;17(1):63-70.
 [6] Nishida T, Shimokawa H, Oi K, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. Circulation. 2004;110(19):3055-3061.
 [7] Storz Medical non-invasive treatment of refractory angina pectoris [DB/OL]. http://www.storzmedical.com/English/Products/Products.htm. 2004-03-01.
 [8] Shi XJ, Ma X, Ma YT, et al. Zhongguo Bijiao Yixue Zazhi. 2007;17(7):231-234.
 石向江, 马翔, 马依彤, 等. 经皮冠脉内球囊封堵建立猪心梗模型[J]. 中国比较医学杂志, 2007,17(7):231-234.
 [9] Sun S, Guo T. Zhongguo Xinxueguan Bing Yanjiu. 2009; 7(4):315-317.
 孙帅, 郭涛. 体外心脏震波治疗冠心病[J]. 中国心血管病研究, 2009,7(4):315-317.
 [10] Apfel RE. Acoustic cavitation: a possible consequence of biomedical uses of ultrasound. Br J Cancer. 1982;45(suppl):140-146.
 [11] Mariotto S, Cavalieri E, Amelio E, et al. Extracorporeal shock waves from lithotripsy to anti-inflammatory action by NO production. Nitric Oxide. 2005;12(2):89-96.
 [12] Chen LL, Yin H, Huang J. Inhibition of TGF-beta signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis. Cardiovasc Pathol. 2007;16(4):221-230.
 [13] Zhong CS, Sun AY. Shanghai: Shanghai Yike Daxue Chubanshe. 1999: 28-30.
 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学[M]. 2版. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 28-30.
 [14] Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. Pharmacogenomics. 2007;8(12):1723-1734.
 [15] Qin W, Chen X. Zhongguo Xinxueguan Bing Yanjiu. 2008; 5(6):392-393.
 秦卫, 陈鑫. 内皮型一氧化氮合酶基因---冠心病基因治疗的新靶点[J]. 中国心血管病研究, 2008,5(6):392-393
 [16] Tao DS, Wang HS, Wang ZW, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009; 18(12):3461-3464.
 陶登顺, 王辉山, 汪曾炜, 等. 人内皮型一氧化氮合酶基因转染猪动脉的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009,18(12):3461-3464.
 [17] Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. Vascul Pharmacol. 2006;45(5):268-276.
 [18] Shi SM, Lu DF, Jiang XF, et al. Zhongguo Dongmai Yinghua Zazhi. 2005; 13(3):271-274.
 石姝梅, 陆东风, 蒋小峰, 等. 急性心肌梗死大鼠心脏一氧化氮合酶表达的改变[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005,13(3):271-274.
 [19] Uwatoku T, Ito K, Abe K, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy improves left ventricular remodeling after acute myocardial infarction in pigs. Coronary Artery Disease. 2007;18(5):397-404.
 [20] Smith RS Jr, Agata J, Xia CF, et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. Life Sci. 2005; 76(21):2457-2471.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 云南省社会攻关项目 (2006SG10),

利益冲突: 无利益冲突。

课题的创新点: 目前已有研究表明, 体外心脏震波治疗应用于动物模型和缺血性心脏病患者均收到了显著疗效。体外心脏震波治疗用于急性心肌梗死治疗是否同样安全有效, 目前尚在研究中。

本实验利用猪急性心肌梗死模型, 观察体外心脏震波治疗治疗后血清的表达, 探讨体外心脏震波治疗用于急性心肌梗死的安全性, 同时通过动态监测血清内皮型一氧化氮合酶的变化, 为进一步阐明体外心脏震波治疗的机制提供新线索。

临床意义: 体外心脏震波治疗能够促进急性心肌梗死后猪血清内皮型一氧化氮合酶的表达, 对心肌缺血区域血管再生起促进作用, 治疗过程中无不良反应产生, 治疗无创、安全, 有望成为将来治疗心肌梗死的一种新方法。