

# 肌钙蛋白 I 与肌红蛋白联合检测在评价缺血导致心肌损伤中的应用

袁 瑾, 李娜娜, 李文花, 鲜春波 (遵义医学院附属医院检验科, 贵州遵义 563003)

**【摘要】 目的** 探讨心肌肌钙蛋白 I(cTnI)与肌红蛋白(Mb)在异丙肾上腺素诱导的心肌缺血中,对评价心肌损伤中的价值。**方法** 将 32 只大鼠随机分成 4 组,用异丙肾上腺素建立不同程度的心肌缺血模型,分为对照组和低、中、高剂量组,用 ELISA 方法检测不同程度心肌缺血大鼠血清中 cTnI 含量与外周血 Mb 表达水平,同时结合心肌肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)结果,分析心肌梗死后血清中 cTnI 检测的灵敏性,分析大鼠心肌缺血后外周血 Mb 与心肌缺血严重程度之间的关系。取大鼠心肌组织制成石蜡切片,采用末端标记法对其进行免疫组化染色,镜下观察心肌细胞是否凋亡及凋亡的程度与心肌缺血的关系,以凋亡细胞占细胞总数的平均百分比表示。**结果** (1)心肌梗死大鼠模型建立成功,大鼠心肌梗死后血清中 cTnI 含量明显升高,与 CK、CK-MB 的升高程度相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其升高的倍数均大于 CK、CK-MB,且随着心肌梗死程度的加重,血清中 cTnI 的含量越高。(2)Mb 在缺血早期升高较早且幅度较大,随缺血程度的进一步加重,其升高也随之增加。(3)心肌细胞凋亡检测可见,对照组未见明显凋亡细胞,低剂量组和中剂量组相继出现数量不等的棕黄色颗粒,而高剂量组出现大量棕黄色颗粒。**结论** cTnI 与 Mb 都可作为缺血心肌损伤程度评价的指标,cTnI 具有较高的灵敏性并随缺血程度加深而升高。Mb 在缺血发生的早期即可大幅升高,但对于缺血程度的评价价值不及 cTnI。随着缺血程度的加深,心肌细胞除缺血坏死外还可出现凋亡,说明凋亡也是加重缺血表现的一个因素。

**【关键词】** 心肌缺血; 肌钙蛋白 I; 肌红蛋白; 凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.05.016 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)05-0547-03

## Application of combination detection of serum cTnI and Mb in evaluating myocardial damage caused by ischemia

YUAN Jin, LI Na-na, LI Wen-hua, XUAN Chun-bo (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**【Abstract】 Objective** To research into the value of the serum cardiac troponin I(cTnI) and myohemoglobin (Mb) combination detection in evaluating myocardial damage caused by isoprenaline-inducing ischemia. **Methods** 32 rats were randomly divided into 4 groups, low, middle and high doses groups and control group for establishing isoprenaline-inducing myocardial ischemic model. To detect serum cTnI and Mb by the ELISA method in the rats with different degrees of myocardial ischemia. Combining with the results of serum myocardial enzymes CK, CK-MB, the sensitivity of cTnI detection and the relation between peripheral blood Mb and myocardial ischemia after ischemia were analyzed. Myocardial tissues were observed under light microscope and the TUNEL method was used to determine the cell apoptosis. Then the average percentage of apoptosis cells was figured out to evaluate the apoptosis effect. **Results** (1) The rat myocardial ischemia model was successfully established. The content of serum cTnI protein was obviously increased, having significant difference compared with the elevated levels of CK and CK-MB ( $P < 0.05$ ), its increasing multiple was higher than that of CK and CK-MB and with aggravating degree of myocardial ischemia, the content of cTnI protein became higher in serum. (2) Mb went up with high increment at the early myocardial ischemia stage and increased with the myocardial ischemia getting more severe. (3) A significant number of TUNEL positive cells were observed ( $P < 0.05$ ) in the high dose group. Buffy pellets varied in amount existed in low dose group and middle dose group, comparing with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** cTnI and Mb all can be the targets to evaluate myocardial ischemia, cTnI has the better sensitivity and can go up with the increasing severity of myocardial ischemia. Mb may rise greatly at the early stage, but the value to evaluate the severe degree is not as good as cTnI. The apoptosis is an important factor to make myocardial ischemia heavier.

**【Key words】** myocardial ischemia; cardiac troponin I; myoglobin; apoptosis

心肌缺血性损伤,特别是急性心肌梗死(AMI)是严重威胁人类生命的主要疾病之一,肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)一直是诊断急性心肌梗死(AMI)的重要指标,尤其是 CK-MB 常作为诊断 AMI 的“金标准”<sup>[1]</sup>,但 CK、CK-MB 的测定存在诊断特异性差、早期诊断灵敏度不高、诊断窗口时间短等不足。心肌肌钙蛋白 I(cTnI)是心脏的结构蛋白,由于它

在个体发育的各个阶段均不在骨骼肌中表达,使其成为心肌损伤最敏感、最特异的血清标志物之一,具有诊断窗口期宽、诊断阈值明确及测定快速等优点,目前认为 cTnI 是检测心肌损伤的理想指标<sup>[2]</sup>。血清中的肌红蛋白(Mb)来自骨骼肌或心肌组织的损伤,是一种相对分子质量为  $18 \times 10^3$  的蛋白,在心机坏死的早期释放入血, Mb 的优势在于诊断心肌梗死的早期敏感

性较高、较快,一般也可用于阴性诊断,对于排除心肌梗死与再通后再梗死意义重大<sup>[3]</sup>。Mb 在血中出现时间早与其相对分子质量很小、能迅速自缺血损伤部位释放进入血液循环有关,这一点非常有助于超急性期入院患者和溶栓后再灌注的及时诊断<sup>[4]</sup>。本研究采用异丙肾上腺素制造大鼠心肌缺血模型,通过对 cTnI 和 Mb 的检测并与 CK、CK-MB 对比,来反映心肌缺血的程度,对其敏感性和特异性做出评价,同时采用末端标记法检测缺血时心肌细胞的凋亡现象,观察细胞凋亡对心肌缺血的影响。

**1 材料与方 法**

**1.1 研究对象** 健康 Wistar 大鼠 32 只,雌雄不限,体质量均约 150 g,由遵义医学院实验动物中心提供(批号:20071016)。随机分为 4 组,正常对照组(腹腔注射生理盐水 10 mg/kg,即第 1 组)、低剂量组(腹腔注射盐酸异丙肾上腺素 5 mg/kg,即第 2 组)、中剂量组(腹腔注射盐酸异丙肾上腺素 10 mg/kg,即第 3 组)、高剂量组(腹腔注射盐酸异丙肾上腺素 20 mg/kg,即第 4 组),每组 8 只,随机分配。

**1.2 试剂** cTnI 测定试剂盒(美国 ADA 公司),Mb 测定试剂盒(美国 ADA 公司),CK、CK-MB 测定试剂盒(日本奥林巴斯公司),盐酸异丙肾上腺素(上海禾丰有限公司),细胞凋亡试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

**1.3 心肌缺血大鼠模型的建立** 按 5、10、20 mg/kg 计算每组

大鼠所需注射盐酸异丙肾上腺素的量,分别为 1.5、3.0、6.0 mL,正常对照组按 10 mg/kg 注射生理盐水 3.0 mL。注射后 16 h 做心电图观察,出现 ST 段明显抬高,表示心肌梗死大鼠模型复制成功,将典型心电图保存。各组大鼠摘眼球取血 3 mL 左右,置于普通试管中,以 3 000 r/min 的速度离心 10 min,取血清-20℃保存。

**1.4 cTnI 与 Mb 的检测** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测,严格按试剂盒说明书操作。

**1.5 CK、CK-MB 的检测** 用奥林巴斯 AU2700 生化分析仪检测血清中 CK、CK-MB 的含量。

**1.6 细胞凋亡的检测** 制备石蜡切片,进行免疫组化染色,选取相应部位,细胞计数在 100 倍高倍视野,用标准的 10×10 目镜栏栅计数,共计数 10 个视野;结果以阳性细胞数占细胞总数的平均百分比表示。

**1.7 统计学方法** 数据用 SPSS11.0 软件进行统计学处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *q* 检验。

**2 结 果**

**2.1 大鼠心肌缺血模型的制造** 由图 1~4 可见,与正常对照组相比较,腹腔注射不同剂量(5、10、20 mg/kg)盐酸异丙肾上腺素的大鼠,其心电图的 ST 段明显抬高,表明大鼠腹腔注射不同剂量的盐酸异丙肾上腺素后,发生了不同程度的心肌缺血,而且随着剂量的增大,大鼠心肌缺血越严重并出现梗死,说明模型建立成功。

表 1 心肌缺血大鼠血清中 cTnI、Mb 的含量及与 CK、CK-MB 比较( $\bar{x} \pm s$ ,ng/mL)

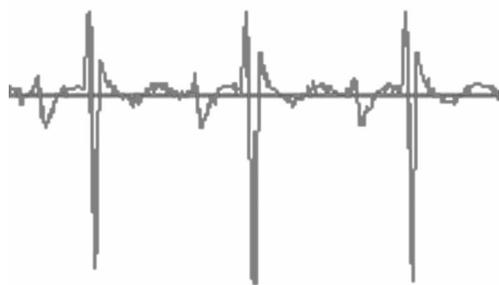
分组	cTnI	Mb	CK	CK-MB
正常对照组	0.16±0.03	236.23±31.10◆	1882.75±30.56	1788.75±23.22
低剂量组	5.20±0.97#	322.41±22.90◆	1974.75±78.85#	1897.37±13.81#
中剂量组	14.87±0.57#	416.19±49.22◆	1980.75±101.92#	1950.75±27.49#
高剂量组	26.45±3.62#	545.13±61.57◆	2597.75±91.91◆	2503.50±41.52◆

注:与正常对照组比较,#*P*<0.05;各组间相比较,◆*P*<0.05。



注:正常 T 波前肢长,后肢短,顶部圆钝,基底较宽。

图 1 正常心电图



注:缺血型 T 波高耸,双肢对称,波形变窄。

图 2 低剂量诱导组心电图

**2.2 cTnI、Mb 与 CK、CK-MB 的检测** 见表 1。

**2.3 心肌细胞凋亡检测结果**

**2.3.1 免疫组化染色结果** 见图 5。

**2.3.2 小血管表现** 见图 6。



注:ST 段抬高与 T 波融合成单向曲线,是急性心肌梗死最重要的心电图特征。

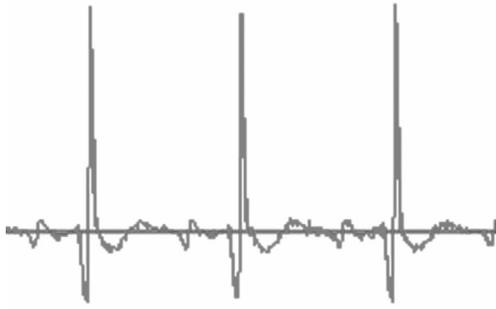
图 3 中剂量诱导组心电图

**2.3.3 凋亡细胞计数结果** 见表 2。

表 2 心肌缺血模型大鼠心肌细胞凋亡( $\bar{x} \pm s$ ,n=10)

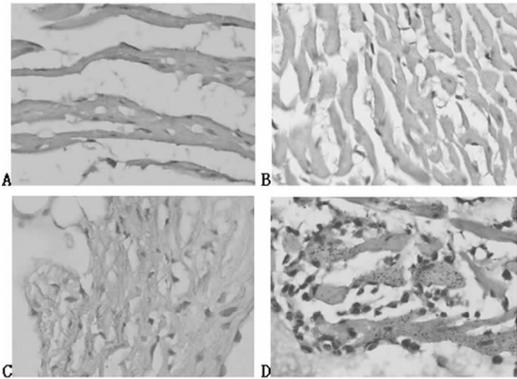
组别	剂量(mg/kg)	凋亡细胞百分率(%)
正常对照组	0	0.50±0.76
低剂量模型组	5	5.13±2.53*
中剂量模型组	10	5.63±1.60*
高剂量模型组	20	10.00±3.63*

注:与对照组比较,\**P*<0.05。



注:急性心肌梗死的坏死型 Q 波深度大于同一导联 R 波的 1/4, 宽度大于或等于 0.04 s。

图 4 高剂量诱导组心电图



注:A 为对照组;B 为低剂量组;C 为中剂量组;D 为高剂量组。

图 5 典型照片(×1 000)

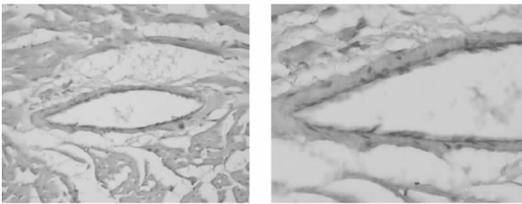


图 6 小血管表现的典型照片

### 3 讨 论

肌钙蛋白(troponin, Tn)由 3 种亚基组成,是横纹肌收缩的调节蛋白<sup>[5]</sup>,其中 TnC 为 Ca<sup>2+</sup> 结合亚基<sup>[6]</sup>,TnT 为原肌球蛋白结合亚基<sup>[7]</sup>,TnI 为抑制亚基<sup>[8]</sup>。cTnI 具有高度的心肌特异性,相对于两种骨骼肌亚型约有 40% 的不同源性,其氨基末端比慢骨骼肌亚型(sTnI)多 31 个氨基酸残基<sup>[9]</sup>,是心肌损伤最特异、敏感的标志物之一,目前已较广泛应用于临床诊断。本研究观察了大鼠发生不同程度心肌梗死后血清中 cTnI、CK、CK-MB 蛋白的变化,结果发现在大鼠心肌受损的各个阶段血清中 cTnI 的含量均明显升高,升高的倍数均大于 CK、CK-MB,表明在心肌梗死各个阶段检测血清中 cTnI 的含量,其灵敏性均高于 CK、CK-MB。

Mb 相对分子质量小(仅 1 617×10<sup>3</sup>),并且直接接触细胞膜,对膜通透性改变反应灵敏,膜破裂后能迅速逸出细胞。但 Mb 并非心肌所特有,如同时伴有肌肉损伤和肾衰竭时,最好于发病后 4~6 h 再次同时检测 Mb 与 cTnI,以作鉴别诊断。本研究中 Mb 随心肌缺血严重程度的加深而升高,与 CK、CK-

MB 相比,各组间数值差异明显,敏感性较强,与 cTnI 结合表现出较好的特异性。

凋亡是有核细胞在一定条件下通过启动内部机制,主要表现为内源性 DNA 内切酶的激活而发生的细胞自然死亡过程<sup>[10]</sup>。然而心肌细胞同样存在凋亡现象,缺血性心肌细胞死亡的方式之一就是细胞凋亡。细胞凋亡先于细胞坏死出现,在缺血早期心肌细胞主要是通过凋亡的方式丧失的,是心肌缺血早期细胞死亡的主要形式<sup>[11]</sup>。心肌细胞凋亡不仅是扩大心肌梗死范围的一个独立因子,而且参与到梗死的病理过程。本研究发现,随着异丙肾上腺素剂量的增大,心肌细胞凋亡的程度逐渐加深。作者把每张切片取 10 个视野,分别计数每个视野中所有的细胞数及凋亡的细胞数,然后计算凋亡细胞指数(AI)。AI=10 个视野凋亡细胞总数/10 个视野计数细胞总数×100%。随着异丙肾上腺素剂量的增大,凋亡指数逐渐增大(表 2)。而异丙肾上腺素剂量越大,心肌细胞缺血越严重,凋亡指数又是反映细胞凋亡程度的指标。因此表 2 说明,随着心肌缺血程度的加重,大鼠心肌细胞凋亡也随之加深。实验中还发现小血管凋亡现象明显,怀疑血管内皮细胞在缺血情况下凋亡明显,可能会在早期影响心肌细胞供血,可能是细胞坏死凋亡的原因之一,是否可能导致其他一些情况发生还需进一步研究。

cTnI 和 Mb 均为细胞内蛋白,在心肌受损的情况下逸出而导致血清中浓度增高。当凋亡存在时,凋亡细胞膜完好,通过检测血清中的酶和蛋白将无法及时、有效地反映心肌的早期缺血状态。因此将凋亡细胞相关指标的检测和各种酶、蛋白指标相结合,能够较好地评价缺血程度,同时避免一些假阴性的出现。

综上所述,cTnI 与一些传统酶学指标相比特异性较强,同时具有窗口期长、敏感性较高的优点。Mb 是心肌缺血导致细胞膜受损的最敏感指标,与心肌细胞缺血程度呈正相关,Mb 与 cTnI 相结合能够较好地为临床诊断提供帮助,并能提示疾病的发展阶段。如能够进一步与细胞凋亡指标结合,将能及时、有效地在早期心肌缺血阶段给予提示。

### 参考文献

- [1] 朱子平.血清肌钙蛋白检测对急性心肌梗死诊断的临床价值探讨[J].湖南师范大学学报,2007,4(2):29-33.
- [2] Bertinchant JP,Larue C,Pernel I. Release kinetics of serum cardiac troponin I in ischemic myocardial injury[J]. Clin Biochem,1996,29:587-594.
- [3] 王翼琳.生化标志物对急性心肌梗死的诊断价值[J].医学伦理与实践,2007,20(5):519-521.
- [4] Ishii J,Normura M,Ando T,et al. Early detection of successful coronary reperfusion based on serum myoglobin concentration; comparison with serum creatine kinase isoenzyme MB activity[J]. Am Heart J,1994,128(4):641-645.
- [5] Farah CS,Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction[J]. FASEB J,1995,9(9):755-767.
- [6] Parmacek MS,Leiden JM. Structure,function,and regulation of troponin C[J]. Circulation,1991,(下转第 551 页)

(8.06%);真菌 7 株(11.29%)。痰液中主要分离的致病菌对常用抗菌药物的敏感率见表 1。

表 1 痰液中主要分离的致病菌对常用抗菌药物的敏感率(%)

微生物	氨苄青霉素	亚胺培南	头孢唑林	头孢曲松	环丙沙星	四环素	万古霉素	青霉素
大肠埃希菌	11.0	86.0	30.0	38.7	72.0	—	—	—
铜绿假单胞菌	13.0	89.0	62.0	31.0	64.5	—	—	—
克雷伯菌属	12.0	97.0	35.0	51.0	73.0	—	—	—
不动杆菌属	22.0	82.0	18.0	43.0	42.0	—	—	—
沙雷菌属	21.0	98.0	52.0	78.0	48.0	—	—	—
金黄色葡萄球菌	13.1	—	52.4	—	16.2	86.4	92.4	—
表皮葡萄球菌	10.4	—	44.6	—	31.2	64.3	97.8	—
链球菌	41.2	—	51.2	—	65.7	46.2	100.0	—
真菌	—	—	—	—	—	—	—	86.0

注:—表示未检测。

### 3 讨 论

由于老年人免疫状态和抗感染能力下降,肺部感染仍居老年感染性疾病首位,老年肺部感染的发病率、死亡率均呈上升趋势,国内报道死亡率占 24.1%<sup>[2]</sup>。本观察显示,老年肺部感染主要以 G<sup>-</sup> 杆菌为主,感染率达 48.38%,与国内文献[3-4]报道相接近,主要是大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、克雷伯菌属、不动杆菌属和沙雷菌属,其中大肠埃希菌居首位,感染率达 19.35%。G<sup>+</sup> 球菌感染中主要是葡萄球菌、链球菌,其中以金黄色葡萄球菌为首,感染率达 20.96%。本文中真菌感染率为 11.29%。专家指出,药效的监测既要注意城市、医院以及病区的耐药菌动态,也应进一步做到每个患者的连续药敏观察<sup>[5]</sup>。

对致病菌的耐药性进行监测,对指导临床用药有重要意义。从 62 株药敏结果可看出,G<sup>-</sup> 杆菌中,抗菌活性最好的是亚胺培南,敏感率达到 86%~98%,临床中应将亚胺培南作为治疗 G<sup>-</sup> 杆菌感染时首选用药。G<sup>+</sup> 球菌中,万古霉素对 G<sup>+</sup> 球菌均敏感,敏感率达 92.4%~100%,因此治疗 G<sup>+</sup> 球菌感染时应首先选择万古霉素。

科学家们认为耐药产生的原因可能是自发的,也可能是通过基因突变让细菌获得了对抗抗菌药物的能力,使抗菌药物活性减弱,甚至失活。同时,耐药菌还能够通过繁殖,把耐药基因由同种细菌传播给其他细菌,使多种细菌对不同类的抗菌药物产生多重耐药性。人们滥用抗菌药物治疗,是人体细菌产生耐药性的一个重要原因<sup>[6]</sup>。另外,细菌分泌细胞外多链糖蛋白复合物将自身包绕而形成细菌生物被膜,也是导致耐药的原因之一。

在临床上,应当严格规范医生对抗菌药物的合理使用。掌握抗菌药物的抗菌范围、不良反应,滥用抗菌药物产生耐药性的严重后果,以及如何合理选择抗菌药物。根据药效学、药物动力学特点和患者的生理特征制订合理的给药方案,临床抗菌药物的应用在未确定致病菌,药敏试验结果未出来之前,往往进行经验性治疗,根据患者感染部位、症状、程度选择,推测可能的致病菌,进一步选择抗菌药物,以减少耐药菌株的产生。

本研究对致病菌的耐药性进行监测,及时通报给临床医务人员,对合理使用抗菌药物、指导临床用药有重要意义。

### 参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:754-869.
- [2] 秦汉梅,沈继备,冷素珍,等. 医院获得性支气管、肺感染临床分析[J]. 临床内科杂志,2000,17(2):993.
- [3] 马春燕. 202 例老年住院患者痰液细菌培养及耐药分析[J]. 实用医技杂志,2008,15(26):96.
- [4] 王梅,张丽华,赵玮. 老年呼吸道感染痰液细菌培养及药敏分析[J]. 河北医药,2006,28(5):389-390.
- [5] 姜素梅. 进一步规范临床抗菌用药[J]. 中华内科杂志,2001,40(9):577-578.
- [6] 王立云. 细菌耐药性分析及临床治疗对策[J]. 中国社区医师,2007,9(8):14-15.

(收稿日期:2010-09-11)

(上接第 549 页)

84(3):991-1003.

- [7] Raggi A, Grand RJ, Moir AJ, et al. Structure- function relationships in cardiac troponin T[J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 997(1-2):135-143.
- [8] Cummins P, Perry SV. Troponin I from human skeletal and cardiac muscles[J]. Biochem J, 1978, 171(1):251-259.
- [9] 闫存林,徐国宾. 人心肌肌钙蛋白 I 测定标准化的研究进

展[J]. 北京医学,2004,26(6):411-412.

- [10] 鲍伟胜,王春雷,杨英珍. 细胞凋亡与心血管疾病[J]. 中国药理学通报,1998,14(5):397-399.
- [11] 冯全洲,李玉峰,赵玉生,等. 心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡及磷酸肌酸的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(25):4902-4905.

(收稿日期:2010-09-19)