

· 基础研究 ·

DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2021.03.12

右美托咪定对猪体外循环下心肌线粒体功能的影响

吴建江,戴晓雯,王 江

[摘要]:目的 探讨右美托咪定(Dex)对小型猪心肺转流(CPB)心肌缺血/再灌注损伤线粒体功能的影响。方法 将12只小型猪随机分为两组,分别为CPB组(T组)和CPB+Dex组(D组)。D组在麻醉诱导前均予以1 μg/kg的Dex输注,速率为0.5 μg/(kg·h)。比较两组麻醉前(T0)、CPB建立后(T1)、心脏复跳后5 min(T2)、心脏复跳后60 min(T3)和心脏复跳后120 min(T4)心脏功能的变化,以及心脏复跳后测定血清中心肌损伤指标、氧化应激损伤和线粒体能量代谢的变化。结果 与T组比较,D组小型猪在T0~T4心脏功能明显改善。与T组比较,D组血清中肌酸激酶同工酶和肌钙蛋白I降低、改善心肌细胞超微结构、提高Mn-过氧化物歧化酶水平、增加线粒体三磷酸腺苷含量、降低线粒体活性氧簇产生率($P<0.05$)。结论 1 μg/kg Dex并以0.5 μg/(kg·h)的速率输注能有效减轻CPB对小型猪的心肌损伤和线粒体功能障碍。

[关键词]: 右美托咪定;猪;心肺转流;缺血/再灌注损伤;线粒体功能;心肌损伤;心肌保护

Effect of Dexmedetomidine on myocardial mitochondrial function under cardiopulmonary bypass in pigs

Wu Jianjiang, Dai Xiaowen, Wang Jiang

Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Wang Jiang, Email: 710985359@qq.com

[Abstract]: Objective To investigate the effect of dexmedetomidine (Dex) on myocardial ischemia/reperfusion injury in minipigs with cardiopulmonary bypass (CPB). **Methods** Twelve miniature pigs were randomly divided into 2 groups: the CPB group (T group) and the CPB+Dex group (D group). In group D, 1 μg/kg Dex was infused before induction of anesthesia at a rate of 0.5 μg/(kg·h). Then, we compared the changes of cardiac function in the two groups before anesthesia (T0), after the establishment of CPB (T1), 5 min (T2), 60 min (T3) and 120 min (T4) after the heart beat resumed, and measured the serum myocardium damage indicators, oxidative stress damage and changes in mitochondrial energy metabolism after heart resuscitation. **Results** Compared with the T group, the cardiac function of miniature pigs in the D group was significantly improved before anesthesia, after the establishment of CPB, as well as at 5 min, 60 min and 120 min after the heart beat resumed. Compared with group T, serum creatine kinase isoenzyme and troponin I decreased in group D, which improved the ultrastructure of cardiomyocytes, increased the level of Mn-peroxidase and the content of mitochondria ATP, and decreased the production rate of mitochondrial reactive oxygen species ($P<0.05$). **Conclusion** Infusion of 1 μg/kg Dex at a rate of 0.5 μg/(kg·h) can effectively alleviate myocardial injury and mitochondrial dysfunction in pigs with CPB.

[Key words]: Dexmedetomidine; Pig; Cardiopulmonary bypass; Ischemia/reperfusion injury; Mitochondrial function; Myocardial Injury; Myocardial protection

心肺转流(cardiopulmonary bypass, CPB)是心脏外科手术中常用的心脏辅助技术,同时可引发全身性炎症反应综合征并影响患者预后,其炎症反应包括激活血小板、嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细

胞,从而导致内皮通透性增加以及微血管损伤。这些炎症反应与心肌缺血再灌注(Ischemia/reperfusion, I/R)损伤有关,导致心肌梗死、呼吸衰竭、肾和神经功能障碍、出血过多、肝功能改变、多器官衰竭等以及死亡^[1]。右美托咪定(Dexmedetomidine, Dex)是一种选择性的α₂-肾上腺素能激动剂,被广泛用于CPB下心脏手术患者的镇静和镇痛,Dex作用于交感神经末梢的α₂-肾上腺素能受体,抑制去甲肾上腺素的释放^[2]。已经显示α₂-肾上腺素能激

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题(2017D04007)

作者单位: 830054 乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院麻醉科

通信作者: 王 江, Email: 710985359@qq.com

动剂可以保护缺血性心肌, Dex 抑制了再灌注后血浆去甲肾上腺素浓度的增加, 表明 Dex 通过直接作用于心肌而不是通过中枢神经系统介导的心肌, 发挥抗 I/R 损伤的保护作用^[3]。但 Dex 对 CPB 后心肌线粒体功能的影响仍未完全阐明, 本研究旨在评估 Dex 是否能减轻 CPB 下心肌线粒体损伤, 为降低临床心脏手术后高发病率和死亡率提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 清洁级健康小型猪体重(33±3) kg, 按数字表法随机分为两组(6 只/组): CPB 组(T 组)建立 CPB; CPB+Dex(D 组)麻醉诱导前给予以 1 μg/kg 的 Dex 输注, 速率为 0.5 μg/(kg·h) 并建立 CPB。由新疆医科大学动物实验中心提供, 并依照美国国立卫生院发布的有关实验室动物饲养及使用指南(1996 年修改版)。

1.2 CPB 模型的建立 小型猪静脉注射, 行气管插管后胸部正中切口, 电锯劈开胸骨, 切开心包, 切缘吊于胸壁, 静脉注射肝素 3 mg/kg 系统肝素化后, 分别在升主动脉、主动脉根部、上腔静脉、下腔静脉缝荷包备用。升主动脉(12 F)、上腔静脉(10 F)、下腔静脉(12 F)予以插管并固定, 连接人工心肺机。主动脉根部荷包中央插入并固定 16 号套管针, 连接冷灌装置。各组均以羟乙基淀粉 130/0.4 氯化钠注射液预充, 预充总量 30~40 ml/kg, 维持流量 120~160 ml/(kg·min), 将红细胞压积保持在 0.20~0.25。阻断升主动脉后在主动脉根部灌注 4℃ 改良 del Nido 心脏停搏液 15 ml/kg, 停跳 60 min 后开放升主动脉, 辅助循环 120 min。复跳期间酌情使用血管活性药物维持循环稳定, 如有恶性心律失常予以交流电复律。

1.3 监测时点及血流动力学指标 两组的观察时间点为麻醉前(T0)、CPB 建立后(T1)、心脏复跳后 5 min(T2)、心脏复跳后 60 min(T3)和心脏复跳后 120 min(T4)。Powerlab/8SP 数据采集系统于复灌末分别记录: 心率(heart rate, HR)、左室收缩峰压(left ventricular systolic pressure, LVPSP)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LV-EDP)、左心室内压上升最大速率(+dp/dt_{max})和左心室内压下降最大速率(-dp/dt_{max})。

1.4 电镜观察心肌超微结构排列形态改变 心脏灌流结束后, 取下心脏, 用双面刀片在左室游离壁处取材。心室肌切成 1 mm³ 的小块, 用 4℃ 戊二醛磷酸缓冲液固定液 24 h, 常规脱水、浸透、包埋、染色、制成 50~70 nm 的超薄切片, 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)下, 观察心肌细胞

超微结构。

1.5 ELISA 法检测 利用肌酸磷酸激酶同工酶(creatine phosphokinase MB, CKMB)和心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)试剂盒(Sigma-Aldrich, 美国)检测血清中 CKMB 和 cTnI 含量。

1.6 Western blot 分析 再灌注末每组取剪取左心室缺血危险区心肌组织, 立刻置于液氮保存。提取心肌组织总蛋白, 采用组织裂解液裂解, 取样品 30 μg, 在 SDS-PAGE 凝胶系统中电泳, 转膜, 于 37℃ 封闭 2 h, 加入兔抗猪锰-超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, Mn-SOD)1 μg/ml (Stressgen Biotechnologies, 加拿大)孵育过夜(4℃), TBST 液洗膜后与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗 1:5 000 室温孵育 1 h, 电化学发光(electro-chemi-luminescence, ECL)显色成像, 应用 Quantity One 2.6.2 图像分析系统对目的蛋白条带进行灰度值分析。

1.7 心肌 ATP 含量测定 ATP 测定试剂盒是基于荧光素-荧光素酶反应来定量心肌 ATP 含量, 通过反相高效液相色谱法测定心肌磷酸肌酸的浓度。糖原检测试剂盒用于测定心肌中糖原的浓度^[4]。

1.8 线粒体活性氧(reactive oxygen, ROS)产生的测定 通过荧光测定方法检测线粒体 ROS 的产生率^[5]。在一个线粒体反应体系中, 将 2.9 ml 线粒体 ROS 测定培养基和 0.5 mg 线粒体加入到 3 ml 石英比色皿中。在另一个线粒体反应体系中, 加入 5 mmol/L 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)3 μl 之前, 使用 3.3 mmol/L 不含线粒体的琥珀酸作为底物, 这一反应体系在 37℃ 孵育 15 min, 测定线粒体反应体系的荧光强度(样品荧光强度)和无线粒体反应体系的荧光强度(基础荧光强度), 通过从样品荧光强度中减去基础荧光强度来计算 ROS 产生速率。

1.9 统计学分析 使用 GraphPad Prism 7.0(GraphPad Software, San Diego, CA)进行统计分析。数据采用均数±标准误($\bar{x} \pm SD$)表示, 所有数据采用单因素方差分析。两组间使用 Student's *t* 检验。多组间采用单因素方差分析, 并进行图基(tukey)事后检验法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能指标 与 T 组比较, D 组 LVPSP 和 +dp/dt_{max} 在 T2、T3 和 T4 各时点明显增加, -dp/dt_{max} 在 T3 和 T4 明显增加(*P* < 0.05), 而 LVEDP 在再灌注开始时显著降低(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 两组动物血流动力学变化($n=6, \bar{x} \pm SD$)

指标	时点	T 组	D 组	P 值
HR (次/min)	T0	93.67±19.77	90.33±17.76	0.944
	T1	93.33±10.25	97.33±13.22	0.883
	T2	76.50±12.88	81.83±20.31	0.599
	T3	84.17±12.40	85.50±17.33	0.881
	T4	90.83±13.38	86.67±15.69	0.631
LVPSP (mmHg)	T0	122.33±9.54	123.83±5.23	0.944
	T1	120.17±9.07	121.50±5.47	0.754
	T2	73.67±5.54	86.60±5.57	0.003
	T3	83.83±5.42	103.83±5.81	0.001
	T4	86.83±5.81	99.17±7.20	0.008
LVEDP (mmHg)	T0	15.83±2.32	16.17±2.14	0.792
	T1	16.17±1.17	17.18±1.33	0.397
	T2	32.33±2.16	23.33±2.23	0.001
	T3	30.17±3.49	21.67±1.51	0.001
	T4	24.17±1.84	17.83±1.47	0.001
+dp/dt _{max} (mmHg/s)	T0	2 131.67±188.31	2 245±236.37	0.357
	T1	2 115±305.00	2 065±174.90	0.698
	T2	1 430±278.93	1 918.33±118.22	0.006
	T3	1 655±290.16	2 155±180.42	0.005
	T4	1 664.83±232.52	2 103.33±189.21	0.004
-dp/dt _{max} (mmHg/s)	T0	2 468.33±233.62	2 631.67±239.79	0.143
	T1	2 501.67±288.20	2 283.33±670.57	0.686
	T2	1 928.33±428.65	2 243.33±284.16	0.164
	T3	1 935±290.16	2 423.33±152.67	0.004
	T4	2 133.33±140.24	2 392.33±155.13	0.012

注:HR:心率;LVPSP:左室收缩峰压;LVEDP:左室舒张末压;+dp/dt_{max}:左心室内压上升最大速率;-dp/dt_{max}左心室内压下降最大速率

2.2 心肌线粒体超微结构与形态 T组心肌结构严重受损,肌丝溶解甚至断裂;线粒体肿胀明显,嵴膜间隙增宽、破裂,肌浆网高度扩张。D组心肌清晰,肌丝排列尚整齐,部分肌丝及肌节间隙增宽并溶解;线粒体大多数形态完整,数量较多;嵴膜清晰可见,但未见溶解破裂。见图1。

2.3 心肌 CKMB 和 cTnI 水平 在 T4 时,两组的 CKMB 值持续增加,与 T 组相比,D 组中的 CKMB 值显著降低 ($P < 0.05$)。在 T3 和 T4 时,两组的 cTnI 值均增加,与 T 组相比,D 组中的 cTnI 值显著降低 ($P < 0.05$)。见表2。

2.4 心肌 Mn-SOD、ROS 产生率和 ATP 含量 在 T4 时检测心肌 Mn-SOD、ROS 产生率和 ATP 含量,T 组的线粒体 ROS 产生率明显高于 D 组 ($P < 0.001$),与 T 组相比,D 组中的 Mn-SOD 和 ATP 含量显著升高 ($P < 0.001$)。见表3。

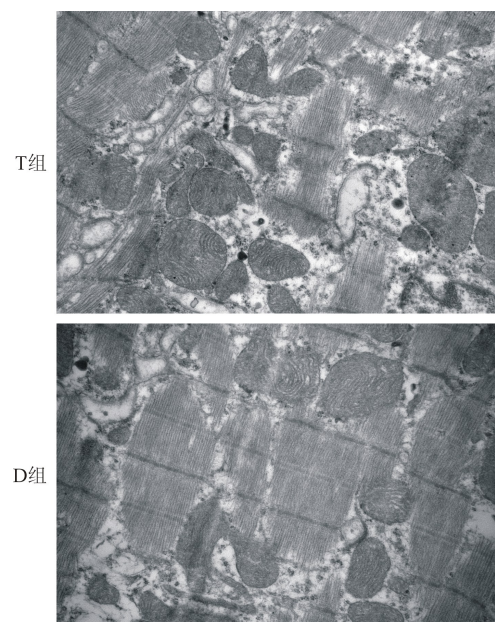


图1 两组心肌线粒体超微结构与形态变化($\times 30\ 000$)

表 2 两组样本血清中 CKMB 和 cTnI 含量变化($n=6, \bar{x} \pm SD$)

时点	CKMB($\mu\text{g/L}$)			cTnI(mg/L)		
	T 组	D 组	P 值	T 组	D 组	P 值
T0	5.32 $\pm$ 0.73	5.43 $\pm$ 0.57	0.692	0.37 $\pm$ 0.23	0.41 $\pm$ 0.27	0.830
T1	6.76 $\pm$ 1.17	6.35 $\pm$ 0.98	0.488	3.37 $\pm$ 0.88	3.59 $\pm$ 0.84	0.603
T2	11.24 $\pm$ 1.57	11.32 $\pm$ 1.24	0.744	10.57 $\pm$ 1.78	11.19 $\pm$ 1.50	0.381
T3	26.94 $\pm$ 3.30	27.34 $\pm$ 2.73	0.563	25.40 $\pm$ 3.87	21.14 $\pm$ 2.90	0.046
T4	41.58 $\pm$ 4.38	33.94 $\pm$ 3.89	0.019	53.61 $\pm$ 7.18	41.84 $\pm$ 8.12	0.026

注:CKMB;肌酸激酶同工酶;cTnI;肌钙蛋白 I

表 3 两组样本心肌 Mn-SOD、ROS 产生率和 ATP 含量变化($n=6, \bar{x} \pm SD$)

指标	T 组	D 组	P 值
Mn-SOD	0.22 $\pm$ 0.12	0.76 $\pm$ 0.17	<0.001
ROS 产生率 [$\text{U}/(\text{s} \cdot \text{mg})$]	13.05 $\pm$ 2.31	6.95 $\pm$ 0.97	<0.001
ATP 含量(nmol/g)	2.66 $\pm$ 0.78	7.23 $\pm$ 1.02	<0.001

注:Mn-SOD;锰超氧化物歧化酶;ROS;活性氧

3 讨论

本研究发现 Dex 能减轻 CPB 导致的心肌缺血/再灌注损伤,稳定心肌线粒体结构和功能,减少线粒体 ROS 产生,增加线粒体 ATP 含量,从而减少心肌细胞 I/R 损伤。

前期研究证实 Dex 可以保护心肌并调节冠状动脉血流量,Dex 对冠状动脉张力具有调节作用,尤其较低浓度的 Dex 的冠状动脉舒张作用可能与内皮完整性,一氧化氮合成和大电导钙激活钾通道激活有关,从而起到心肌保护作用^[6]。然而,遗憾的是 CPB 下心肌细胞受损严重,那么 Dex 能否在实施 CPB 的心脏手术中减轻心肌线粒体功能受损?临床工作中,尽管多种方法能有效改善 I/R 损伤,但在接受心脏手术的患者中,死亡率和发病率仍居高不下。

CPB 技术是心脏手术最为有效的辅助手段,但存在快速恢复冠脉缺血区血流量,而再灌注可能会诱发心肌 I/R 损伤。为了证实上述假设,笔者观察健康小型猪实施 CPB 中使用 Dex 能否减轻心肌 I/R 损伤,能否上调并稳定心肌线粒体结构和功能,减少线粒体 ROS 产生,增加线粒体 ATP 含量,从而减轻心肌细胞氧化应激损伤。研究结果显示:与 T 组相比,D 组血清中 CKMB 和 cTnI 降低,心肌细胞超微结构稳定,Mn-SOD 水平升高,线粒体 ATP 含量增加、线粒体 ROS 产生率降低,表明 CPB 中使用 Dex 能获得更好的心肌保护效果。

前期研究显示 Dex 具有多种器官保护作用,可以保护心肌并调节冠状动脉血流量^[6]。Dex 以剂量依赖性方式降低脑电双频指数值、平均动脉血压、心

率、心输出量和混合静脉血氧饱和度^[7]。Dex 减少了胆碱能电场刺激诱导的豚鼠气管收缩和乙酰胆碱释放,同时也减弱了外源性乙酰胆碱引起的收缩和 C-纤维介导的收缩,提示 Dex 具有直接气道平滑肌作用和抑制咳嗽的潜在机制^[8]。在败血症动物中使用 Dex 后,心率降低,平均动脉压降低得到缓解,脓毒症动物的中心静脉压稳定,并改善脓毒症引起的肺功能异常^[9]。但是,大剂量静脉注射 Dex 可引起中度局部冠状动脉血管收缩,而在幼小家猪中没有代谢性心肌缺血迹象,同时在全身循环中出现明显的血管收缩反应^[10]。本结果显示,CPB 中静脉使用小剂量 Dex 能明显稳定心肌线粒体超微结构和形态,同时,D 组中 Mn-SOD 水平升高表明,减少心肌 I/R 损伤期间 ROS 升高引起的心肌组织损伤。

本研究结果表明,CPB 中静脉使用小剂量 Dex 能发挥良好的心肌保护作用。然而,本研究存在一定局限性,只观察到 Dex 在 CPB 心肌保护机制中线粒体功能和形态的变化,而未涉及关键信号通路的作用机制研究。

参考文献:

- [1] Whitlock RP, Devereaux PJ, Teoh KH, *et al*. Methylprednisolone in patients undergoing cardiopulmonary bypass (SIRS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2015, 386(10000): 1243-1253.
- [2] Hongo M, Fujisawa S, Adachi T, *et al*. Age-related effects of dexmedetomidine on myocardial contraction and coronary circulation in isolated guinea pig hearts[J]. J Pharmacol Sci, 2016, 131(2): 118-125.

(转第 187 页)