

微低温超极化停跳对犬心肌细胞线粒体的保护作用

靳三庆¹, 徐颖琦², 吴金浪³, 郭隽英¹, 朱艳玲¹, 陈秉学¹, 王治平²

(中山大学 1. 附属第一医院麻醉科, 2. 附属第一医院心胸外科, 3. 基础医学院电子显微镜室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】从心肌细胞线粒体改变的角度, 比较超极化停跳和去极化停跳(钾停跳)的心肌保护效果。【方法】18 只纯种比格犬, 体质量 8.5~15 kg, 随机分为实验组和对照组, 实验组 10 例, 对照组 8 例。全麻后建立体外循环模型。阻断主动脉后从主动脉根部灌注停跳液 20 mL/kg, 全心缺血 45 min 后, 恢复灌注 60 min。实验组的停跳液为温血(34 °C)尼可地尔(含尼可地尔 400 μmol/L), 对照组的停跳液为传统的 4 °C 高钾停跳液(含钾 22 mmol/L), 停跳后两组心脏均局部冰敷以保持低温。心脏停跳期间若出现心电活动, 则追加停跳液首量的三分之一。在主动脉阻断前、主动脉阻断 40 min、主动脉开放 30 min, 用活检针刺取右室全层心肌行电子显微镜检查, 每个标本随机选取 6 个视野照片, 用图象分析系统分析计算线粒体的面积和周长, 并计算得出线粒体体积密度、比表面和单位面积线粒体计数。检验水准 $\alpha=0.05$ 。【结果】两组中各有 1 例因主动脉阻断不全而被剔除, 其它各例在实验中均无须追加停跳液。每组 3 个时间点之间、两组间线粒体的体积密度(volume-density, V/V)、比表面(R_{sv})和单位面积线粒体计数的变化均无统计学意义($P>0.05$)。【结论】在我们的实验方案下, 超极化停跳和高钾停跳都能有效地保护心肌细胞线粒体, 且两种方法具有相似的保护效果。

关键词:超极化停跳; 心肌保护; 线粒体, 心肌细胞

中图分类号: R654.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0439-04

Protective Effects of Tepid Hyperpolarizing Arrest in a Dog Model of Cardiopulmonary Bypass on Myocardial Mitochondria

JIN San-qing¹, XU Ying-qi², WU Jin-lang³, GUO Jun-ying¹, ZHU Yan-ling¹,
CHEN Bing-xue¹, WANG Zhi-ping²

(1. Department of Anesthesia, 2. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, 3. Department of Electron Microscopy, Preclinical Medical College, SUN Yat-sun University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To compare the protective effects of hyperpolarizing arrest and potassium arrest on myocardial mitochondria. 【Methods】 Eighteen Beagle dogs, weighing 8.5 to 15.0 kg, were randomly assigned to study group ($n=10$) and control group ($n=8$). After general anaesthesia with tracheal intubation, a cardiopulmonary bypass model was instituted. Cardioplegia solution (20 mL/kg) was perfused to the aortic root after aortic clamp. Global ischemia lasted 45 min and then reperfusion was started for 60 min. The cardioplegia solution for study group was tepid blood nicorandil (34 °C, 400 μmol/L of nicorandil), for control group was traditional hyperkalemic Thomas solution (4 °C, 22 mmol/L of potassium). Topical cooling was applied to the hearts for both groups after asystole achieved in order to keep a hypothermia condition for myocardium during global ischemia. One-third of the first dosage of cardioplegia solution would be perfused to the aortic root whenever there appeared cardiac electric activity during global ischemia. Right ventricle samples were taken by biopsy needle for electron microscopy before aortic clamp, at 40 min after clamp, and at 30 min after clamp removal. Six views of electron microscopy were randomly chosen and photographed for analysis. Automatic photo analysis system was used to analyze the mitochondria area and circumference, and then the mitochondria volume-density (V/V), ratio of surface to volume (R_{sv}), as well as mitochondria counts were calculated. Statistic standard $\alpha=0.05$. 【Results】 There was one dropout for each group because of insufficient aortic clamp, and no additional cardioplegia solution was needed during global ischemia. There is no significance for V/V , R_{sv} and mitochondria counts within group among the different time points, and between groups. 【Conclusion】 With our study protocol, both hyperpolarizing arrest and potassium arrest can effectively protect the myocardial mitochondria during global ischemia, and the two methods have similar

收稿日期: 2004-11-05

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2003C30602); 广东省医学科学研究基金资助项目(A2000145)

作者简介: 靳三庆(1966-), 男, 河南南召人, 硕士, 副主任医师, 硕士生导师. E-mail: sanqingjin@hotmail.com

protection effects for myocardial mitochondria.

Key words: hyperpolarizing arrest; myocardial protection; mitochondria, myocardium.

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(4):439-442]

目前,临床上普遍使用的心脏停跳心肌保护方法是高钾停跳液。高钾停跳液可使心肌细胞膜呈现去极化状态,激活离子泵,使能量消耗增多,氧自由基产生亦增多,细胞内钙负荷超载。这些因素均可使心肌缺血一再灌注损伤的加重^[1]。心肌细胞膜内的腺苷酸三磷酸敏感性钾通道(ATP-sensitive K⁺ channel, K_{ATP}通道)激动剂,可使心脏停跳,心肌细胞膜处在超极化状态。Cohen等^[2]认为它比钾停跳有更好的心肌保护效果。文献[3-7]报告,均为离体实验,采用的是深低温的停跳方法^[6]。K_{ATP}通道是一种生理性保护通道,在深低温状态下能否开放,尚属未知。鉴于此,本研究拟用完整的体外循环模型,微低温停跳后再施行深低温的保护法,以心脏缺血前后心肌细胞线粒体变化的情况为观察指标,比较两种停跳方法的心肌保护效果。现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物准备

18 只雄性成年纯种比格犬(广州市医药工业研究所),体质量 8.5~15 kg,随机分为实验组和对照组,实验组 10 例,对照组 8 例。在肌注氯胺酮 20~30 mg/kg 麻醉后,将犬置于实验台上,股动脉穿刺以测压和抽取动脉血标本行血气分析,动脉血气取样时间为气管插管前、气管插管 30 min、主动脉阻断前、主动脉开放前、主动脉开放后 30 min。以针灸针刺入四肢并将其固定,然后与心电监测仪连接以监测心电,同时胸部备皮以备建立体外循环模型。之后以芬太尼 0.2 mg、维库溴铵 2 mg 快速诱导气管插管,并接鸟牌呼吸机控制呼吸,频率 20 min⁻¹,压力 16~20 cmH₂O。术中视麻醉情况静脉追加适量咪唑安定、芬太尼和维库溴铵。

1.2 建立体外循环模型

备皮、开胸,经上、下腔静脉和主动脉插管建立体外循环模型。使用美国 Sarns 7000 型人工心肺机和美国 Medtronic Minimax 膜肺。体外循环的预充:犬血全血(由放血犬提供)800 mL,60 g/L 羟乙基淀粉(HAES) 100 mL,50 g/L 碳酸氢钠 100 mL,预充液中加入肝素 25 mg,并根据血气分析结果酌情补充 100 g/L 氯化钾和 50 g/L 氯化钙。在建立体外循环模型的手术操作过程中,每只犬补

充乳酸林格液 500 mL,60 g/L 羟乙基淀粉(HAES) 500 mL,以维持血流动力学平稳。体外循环采用平流,流量 90~120 mL(kg·min),转流期间平均动脉压维持在 60~80 mmHg。

1.3 停跳液的灌注

从主动脉根部灌注停跳液 20 mL/kg,全心缺血 45 min 后,开放主动脉并恢复心跳。①实验组(study group):停跳液为温血(33.0~35.0 ℃)尼可地尔(nicorandil,含尼可地尔 400 μmol/L),②对照组(control group):停跳液为传统的冷晶体(4 ℃)高钾停跳液(含钾 22 mmol/L),即 Thomas 液。两组犬心停跳后均予心脏局部冰屑覆盖以使心肌处于深低温状态。心脏停跳期间若出现心电活动,则追加停跳液首量的三分之一。

1.4 线粒体的观察

在主动脉阻断前、主动脉阻断 40 min、主动脉开放 30 min,用活栓针刺取右室全层心肌放入 25 g/L 戊二醛和 20 g/L 多聚甲醛混合液中固定,再经漂洗-固定-漂洗-脱水,树脂包埋,制作超薄切片,行电子显微镜检查(Hitachi H-600 透射电镜)。每个标本随机选取 6 个视野进行照片,对适合进行线粒体分析的照片用德国 KONTRON IBAS 2.0 全自动图像分析系统进行图像分析,并计算线粒体的体积密度、比表面和单位面积线粒体计数。

1.5 统计学方法

数值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计软件用 SPSS 10.0,用重复测量设计的方差分析法对所得资料进行统计分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 一般情况

两组中各有 1 例被剔除,均因为主动脉阻断不完全,使实验过程中多次追加停跳液。其余各例犬心在 45 min 的全心缺血过程中,心脏均未出现电活动,无须追加停跳液。

2.2 两组犬心肌线粒体体积密度、比表面、单位面积线粒体计数的变化

两组犬心肌线粒体的体积密度、比表面、单位面积线米立体计数在两组之间的差异及组内各时间点的差异比较均无统计学意义(表 1)。

表1 两组犬心肌线粒体体积密度、比表面和单位面积线粒体计数的变化

Table 1 Changes of the myocardial mitochondrial volume-density, ratio of surface to volume, and myocardial mitochondrial number counts of two groups

Time points ¹⁾	Mitochondrial volume-density		Mitochondrial ratio of surface to volume (mm ² /mm ³) ³⁾		Mitochondrial number counts (numbers/mm ²) ⁴⁾	
	(V/V, %) ²⁾					
	Study (n=38 ⁵⁾)	Control (n=22 ⁵⁾)	Study (n=38 ⁵⁾)	Control (n=22 ⁵⁾)	Study (n=38 ⁵⁾)	Control (n=22 ⁵⁾)
T1	0.23±0.08	0.21±0.05	0.47±0.08	0.44±0.07	21.29±6.59	17.97±5.80
T2	0.23±0.09	0.22±0.06	0.46±0.11	0.45±0.06	19.35±5.87	19.38±5.65
T3	0.22±0.07	0.23±0.08	0.45±0.07	0.47±0.11	18.35±6.42	20.22±6.46

1) T₁: Before aortic clamp, T₂: 40 min after aortic clamp, T₃: 30 min after clamp removal. 2) Comparison between control and study group, $F=0.572, P=0.452(P>0.05)$; Comparison among the different time points(within groups), $F=0.003, P=0.997(P>0.05)$. 3) Comparison between control and study group, $F=0.249, P=0.620(P>0.05)$; Comparison among the different time points(within groups), $F=0.006, P=0.994(P>0.05)$. 4) Comparison between control and study group, $F=0.230, P=0.634(P>0.05)$; Comparison among the different time points(within groups), $F=0.058, P=0.944(P>0.05)$. 5) n is the effective photo numbers which were analyzed

3 讨论

心脏手术临床上常用的低温钾停跳心肌保护效果不完善,它可以损伤冠脉内皮功能,进而影响术后心功能的恢复,引起并发症甚至死亡^[2];冷晶体心脏停搏液(即低温钾停跳)灌注对心肌能量保存效果差,缺血-再灌注损伤明显^[8],于是学者们不断寻找改善的方法。有作者指出血液停跳液比晶体停跳液有更好的心肌保护效果^[9];持续温血灌注停跳和间断冷血或冷晶体灌注停跳相比,可使心肌细胞凋亡的比例减小,冠脉内皮的损伤减轻^[10];降低停跳液中的钾浓度可得到更好的心肌保护效果^[11];对于缺血再灌注的心肌,艾司洛尔(esmolol)具有明显的增强心肌保护的作用^[12],尼卡地平可以减少未成熟心肌的缺血-再灌注损伤^[13]。尽管心肌保护的方法措施不断改进,但再灌注损伤依然存在,且严重的并发症仍未解决^[14]。

Noma^[15]首次报道了在豚鼠心室肌细胞上存在着三磷酸腺苷敏感性钾通道(K_{ATP}),其后发现 K_{ATP} 广泛存在于哺乳动物的心血管系统中。Cohen等人^[4]发现通过大剂量 K_{ATP} 激动剂激活 K_{ATP} 使心肌细胞膜超极化可使心脏电机械活动静止,称之为心脏的超极化停跳,并且比钾停跳有更好的心肌保护效果。在兔心Langendorff模型上的研究发现,应用 K_{ATP} 激动剂Aprikalim和Pinacidil进行的超极化停跳心肌保护效果明显较钾停跳为好^[3,5]。在兔心经过常温缺血^[6]或长时间低温缺血^[7]的情况下,超极化停跳具有与托玛斯液同样好的心肌保护效果。

Chambers等^[16]认为,钾停跳液虽然应用了很多年,但仍然存在一系列的问题;最近的研究已证实超极化停跳可以减少缺血期间的离子转运,并

使高能磷酸化合物得到更好的保存,从而减少再灌注损伤,是一种很有前途的心肌保护方法,但在进入临床应用前,仍需大量的研究工作。但在 K_{ATP} 激动剂中^[17],Aprikalim和Pinacidil在大剂量时均有一定的毒性反应,使其临床应用受到限制,而尼可地尔已用于临床心绞痛的治疗,未发现明显毒性反应。 K_{ATP} 在低温状态下活性如何未见报道,因此,本研究选用微低温尼可地尔进行超极化停跳。

线粒体是心肌细胞供能的重要细胞器,心肌细胞的能量供应对心脏的功能起着重要的作用。线粒体的数量和形态是保证线粒体完成生理功能的重要前提。

比表面是线粒体表面积与体积的比值(ratio of surface to volume, R_{sv}),该值的变化可反映其形态变化,当线粒体肿胀时, R_{sv} 变小。如表1所示,我们的研究显示 R_{sv} 组内的变化无统计学差异,组间变化亦无统计学差异,说明两种心脏停跳方法对线粒体的形态的保护作用相似,且都对线粒体的形态有良好的保护作用。

线粒体的体积密度是指单位参照体积中线粒体所占的体积,它和单位面积中线粒体的个数一样,与细胞的功能状态密切相关。当细胞功能减退时,体积密度和线粒体个数都将减少。如表1所示,我们的研究显示两个指标的组间变化和组内变化均无统计学差异,说明两种心脏停跳方法对线粒体功能状态的影响相似,且都能对线粒体的功能状态起到良好的保护作用。

为了确保尼可地尔能激活 K_{ATP} ,使心肌细胞膜处于超极化状态,我们在实验组选用了微低温停跳。温度是心肌保护的重要因素,低温可以很好地保护心肌。是否降低超极化停跳的温度,能有更好的心肌保护效果,尚需进一步研究;而在低温下 K_{ATP} 是否能被尼可地尔激活也值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Cohen NM, Damiano RJ Jr, Wechsler AS. Is there an alternative to potassium arrest? [J]. *Ann Thorac Surg*, 1995, 60(3):858-63.
- [2] Cohen NM, Allen CA, Belz MK, *et al.* Electrophysiological consequences of hypothermic hyperkalemic elective cardiac arrest[J]. *J Cardiac Surg*, 1993, 8(2): 156-60.
- [3] Maskal SL, Cohen NM, Hsia PW, *et al.* Hyperpolarized cardiac arrest with a potassium-channel opener, aprikalim[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995, 110(4 Pt 1):1083-95.
- [4] Cohen NM, Wise RM, Wechsler AS, *et al.* Elective cardiac arrest with a hyperpolarizing adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener: A novel form of myocardial protection?[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1993, 106(2):317-28.
- [5] Lawton JS, Harrington GC, Allen CT, *et al.* Myocardial protection with pinacidil cardioplegia in the blood-perfused heart [J]. *Ann Thorac Surg*, 1996, 61(6): 1680-8.
- [6] Lawton JS, Sopic JD, Allen CT, *et al.* Myocardial protection with potassium-channel openers is as effective as St. Thomas' solution in the rabbit heart[J]. *Ann Thorac Surg*, 1996, 62(1):31-9.
- [7] Lawton JS, Hsia PW, Allen CT, *et al.* Myocardial protection in the acutely injured heart: hyperpolarizing versus depolarizing hypothermic cardioplegia [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1997, 113(3): 567-75.
- [8] 章晓华, 张镜方, 吴若彬, 等. 心肌保护方法的实验研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(3S2): 87-9.
- [9] Ferreira R, Fraga C, Carrasquedo F, *et al.* Comparison between warm blood and crystalloid cardioplegia during open heart surgery[J]. *Int J Cardiol*, 2003, 90(2-3):253-60.
- [10] Yeh CH, Wang YC, Wu YC, *et al.* Continuous tepid blood cardioplegia can preserve coronary endothelium and ameliorate the occurrence of cardiomyocyte apoptosis[J]. *Chest*, 2003, 123(5):1647-54.
- [11] Bernard M, Robert K, Caus T, *et al.* Protective effect of a low K⁺ cardioplegic solution on myocardial Na,K-ATPase activity [J]. *Cell Mol Biol (Noisyle-grand)*. 2004, 50(7):841-4.
- [12] Geissler HJ. Reduction of myocardial reperfusion injury by high-dose beta-blockade with esmolol [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 50(6): 367-72.
- [13] 陈寄梅, 张镜方, 余细勇, 等. 停搏液添加尼卡地平对未成熟心肌的保护作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(3S2):85-7.
- [14] Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection [J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 89(1): 29-46.
- [15] Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle [J]. *Nature*, 1983, 305(8):147-8.
- [16] Chambers DJ, Hearse DJ. Developments in cardioprotection: "Polarized" arrest as an alternative to "Depolarized" arrest[J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(5): 1960-6.
- [17] Jayawant AM, Lawton JS, Hsia PW, *et al.* Hyperpolarized cardioplegic arrest with nicorandil. Advantages over other potassium channel openers [J]. *Circulation*, 1997, 96(9 Suppl II): II-240-6.

(编辑 张敏瑞)