论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1736-04

缺血预处理对离体大鼠心肌线粒体心磷脂及心功能的影响

邓胜利,喻 田,余志豪 (遵义医学院麻醉学系药理学教研室,贵州 遵义 563003)

摘 要:目的 探讨缺血预处理(ischemic preconditioning,IP)对缺血再灌注损伤大鼠心肌线粒体心磷脂(cardiolipin)及心功能的影响。**方法** 清洁级SD大鼠72只,体质量200~300 g,雌雄各半,用随机数字表法分为正常组、对照组、缺血预处理组(IP组)、5-羟葵酸(5-HD)拮抗缺血预处理组(HD组),每组18只。采用Langendorff灌流装置建立大鼠离体心脏缺血再灌注模型,正常组灌注平衡20 min,持续灌注100 min;对照组灌注平衡20 min,持续灌注30 min,缺血40 min,再灌注30 min;IP组灌注平衡20 min后,给予2次间断缺血预处理,每次缺血5 min再灌注5 min,余缺血再灌注同对照组;HD组在预处理前灌注5-HD 10 min,余同IP组。各组分别于灌注平衡末(T_1)、缺血前即刻(T_2)、再灌注末(T_3)记录心率(HR)、左心室发展压(LVDP)和左心室舒张末压(LVEDP),采用高效液相色谱仪测定心肌线粒体心磷脂含量。**结果** 与T_1、T_2时比较,各组T_3时HR、LVDP明显降低,LVEDP明显升高,心肌线粒体心磷脂含量明显降低($P<0.05$,$P<0.01$);与正常组比较,余3组T_3时HR、LVDP明显降低,LVEDP明显升高,心肌线粒体心磷脂含量明显降低($P<0.05$,$P<0.01$);与对照组比较,IP组及HD组T_3时HR、LVDP明显升高,LVEDP明显降低,心肌线粒体心磷脂含量明显升高($P<0.05$,$P<0.01$);与IP组比较,HD组T_3时HR、LVDP明显降低,LVEDP明显升高,心肌线粒体心磷脂含量明显降低($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** IP可维护心肌线粒体心磷脂含量的相对稳定,改善大鼠离体缺血再灌注心脏功能,其机制主要与mito-KATP通道的激活有关。

关键词: 缺血预处理;线粒体;心功能;再灌注损伤;心磷脂
中图法分类号: R322.11;R329.25;R457.9 **文献标识码:** A

Ischemic preconditioning maintains myocardial mitochondria cardiolipin and attenuates heart impairment in isolated rat hearts

DENG Sheng-li, YU Tian, YU Zhi-hao (Department of Pharmacy, Faculty of Anesthesiology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ischemic preconditioning (IP) on the content of myocardial mitochondria cardiolipin and the heart function in isolated rat hearts. **Methods** Seventy-two healthy SD rats of both sexes (36 males, 36 females) weighing 200 to 300 g were randomly divided into 4 groups ($n=18$ for each group): normal group, control group, IP group (IP) and 5-hydroxydecanoate (5-HD) plus IP group (HD). Langendorff apparatus were used to establish the model of ischemia/reperfusion in isolated rat hearts. The hearts were perfused for 20 min to get stabilization followed by continuous perfusion in normal group for 100 min. In control group, after perfusing of 20 min for stabilization followed by continuous perfusion for 30 min, the hearts were then reperfused for 30 min after 40 min ischemia. In IP group, the hearts were given a 5-minute ischemia and 5-minute reperfusion for twice in order within a brief intermittent period, and ischemia reperfusion was carried out in the same way as that in control group. In HD group, the hearts were perfused with 100 μmol/L 5-HD before IP, and the following procedures were carried out as those in IP group. HR, left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular developed pressure (LVDP) were recorded at the end of stable perfusion (T_1), immediately before ischemia (T_2) and at the end of reperfusion (T_3) in all the groups. The content of myocardial mitochondria cardiolipin was measured with HPLC. **Results** When the

基金项目: 国家自然科学基金(30460132)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30460132)
作者简介: 邓胜利,男,贵州省遵义市人,硕士,副教授,主要从事心肌保护及临床麻醉方面的研究,发表论文7篇。电话:(0852)8609145,E-mail:zydsl2004@163.com
通信作者: 喻 田,E-mail:zyyutian@21cn.com
收稿日期: 2008-12-18;**修回日期:** 2009-03-19

parameters at T_3 were compared with those at T_1 and T_2, HR and LVDP were decreased, LVEDP was increased and the content of myocardial mitochondria cardiolipin was decreased. All these changes were significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The changes mentioned above were also significant at T_3 in control, IP and HD groups than in normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conversely, HR and LVDP were increased, LVEDP was decreased, and the content of myocardial mitochondria cardiolipin became higher at T_3 in IP group than in control group and HD group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The values were also significant at T_3 in HD group than in control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** IP maintains the stable level of myocardial mitochondria cardiolipin and improves the cardiac function during ischemia/reperfusion in isolated rat hearts. The protective effect of IP probably may result from the activation of mitochondrial ATP sensitive potassium channels.

Key words: ischemic preconditioning; mitochondria; heart function; reperfusion injury; cardiolipin

缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)可能通过触发机体一些内源性保护机制产生抗缺血再灌注损伤作用[1]。近来研究表明缺血再灌注损伤可以减少内膜心磷脂含量[2]。应用 IP 对心肌进行预处理,其心磷脂含量是否发生改变及与 IP 抗缺血再灌注损伤之间的关系目前尚无定论。本研究拟采用 Langendorff 离体心脏缺血再灌注模型,通过观察 IP 对心肌线粒体心磷脂的影响,以进一步探讨 IP 的心肌保护作用机制。

1　材料与方法

1.1　动物选择及分组

清洁级 SD 大鼠 72 只,1 ~ 2 月龄,体质量 200 ~ 300 g,雌雄各半,由第三军医大学实验动物中心提供。采用随机数字表法分为 4 组:正常组、对照组、缺血预处理组(IP 组)、5-羟葵酸拮抗缺血预处理组(HD 组),每组 18 只。

1.2　主要试剂及仪器

5-羟葵酸(5-HD,批号:L1085,美国 Sigma 公司),Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所),其余试剂为国产分析纯。Langendorff 离体心脏灌注装置(西班牙 PanLab 公司),PowerLab/8SP 实验数据采集系统(澳大利亚 AD Instrument 公司),HP-1100 系列高效液相色谱分析仪(美国 Agilent 公司),色谱柱(柱号:E1718250,大连依利特分析仪器有限公司),GF-1 型控时调速高速分散器(江苏海门其林贝尔公司),5804R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3　离体心脏灌注模型的建立

参照文献[1]的方法建立离体心脏灌注模型,即腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg、肝素 250 μg/kg 麻醉后迅速取出心脏,置 4 ℃充氧 K-H 液中,液面下主动脉插管,连接于 Langendorff 灌注装置上。用 37 ℃预先氧平衡的 K-H 液心脏逆行灌注,灌注压 5.8 kPa,将带有乳胶水囊的测压管经二尖瓣插入左心室,连接 PowerLab/8SP 实验数据采集系统,调节水囊使起始的左心室舒张末压(LVEDP)为 7 mmHg。离体心脏 Langendorff 灌注模型制备成功的标准:平衡末心率 > 160 次/min,左心室收缩峰压 > 10 kPa,室性早搏 < 2 个/min。

1.4　灌注方法

正常组平衡灌注 20 min,持续灌注 100 min;对照组平衡灌注 20 min,持续灌注 30 min;IP 组于平衡 20 min 后给予 2 次 IP,每次缺血 5 min 再灌注 5 min;HD 组于 IP 前 10 min 主动脉逆灌 5-HD 100 μmol/L,持续 10 min。对照组、IP 组和 HD 组按上述因素处理后给予灌注 4 ℃ ST. Thomas 停跳液,全心缺血 40 min,复灌 30 min。

1.5　心脏功能测定

各组分别于灌注平衡末(T_1)、缺血前即刻(T_2)和再灌注末(T_3)测定心率(HR)、左心室发展压(LVDP)和左心室舒张末压(LVEDP)。

1.6　心肌线粒体心磷脂含量的测定

于以上时点参照 Zydowo 等[3]的方法提取心肌线粒体,根据 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒说明,采用 TECAN SUNRISE 型酶标仪进行线粒体蛋白质定量。线粒体心磷脂提取参照文献[4]的方法加以改进:即线粒体悬液按 1∶10(体积分数比)加心磷脂提取液,混匀,静置 20 min,3 000 r/min 离心 3 min,取下层,加所取下层液体积量 1/5 的 0.05 mol/L $CaCl_2$ 旋转混匀,静置 1 min,3 000 r/min 离心 10 min,取下层氯仿相(以上操作均在 4 ℃条件下进行),在 40 ℃的水浴箱中用 N_2 吹至溶剂刚挥发殆尽,准确加入磷脂稀释液,密封、避光, -20 ℃储存待行高效液相色谱(HPLC)检测。参照文献[5]的方法,采用高效液相色谱仪器对线粒体心磷脂进行定性、定量分析。定量分析采用峰面积积分值的方法,通过峰面积积分值转换为心磷脂量与线粒体蛋白含量之比表示线粒体心磷脂含量(μg/mg)。

1.7　统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间和组内比较采用单因素方差分析及 LSD-t 检验。

2　结果

与对照组比较,IP 组及 HD 组 T_3 时 HR、LVDP 明显升高,LVEDP 明显降低,心肌线粒体心磷脂含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 IP 组比较,HD 组 T_3 时 HR、LVDP 明显降低,LVEDP 明显升高,心肌线粒体心磷脂含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与正常组比较,余 3 组 T_3 时 HR、LVDP 明显降低,LVEDP 明显升高,心肌线粒体心磷脂含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 T_1、T_2 时比较,各组 T_3 时 HR、LVDP 明显降低,LVEDP 明显升高,心肌线粒体心磷脂含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1、2。

表1 缺血再灌注损伤大鼠各组各时点心功能指标的比较（$n=18$，$\bar{x}\pm s$）

组别	HR(次/min)			LVDP(mmHg)			LVEDP(mmHg)		
	T_1	T_2	T_3	T_1	T_2	T_3	T_1	T_2	T_3
正常组	324±17	326±14	301 ± 14^{fh}	98.1±6.6	95.0±6.5	87.1 ± 2.5^{fh}	7.45±0.19	7.62±0.12	9.67 ± 0.87^{fh}
对照组	328±15	325±20	204 ± 13^{bgi}	100.4±6.5	97.0±3.2	49.2 ± 2.3^{bgi}	7.45±0.22	7.61±0.26	32.97 ± 1.64^{bgi}
IP组	325±15	325±6	286 ± 10^{adgi}	99.4±4.9	95.2±4.3	72.5 ± 4.8^{bdgi}	7.48±0.15	7.67±0.18	19.43 ± 1.72^{bdgi}
HD组	333±13	312±14	222 ± 18^{bcegi}	100.2±3.4	95.4±3.2	61.3 ± 5.8^{bdegi}	7.50±0.18	7.62±0.25	23.47 ± 1.68^{bdegi}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与对照组比较；e：$P<0.01$，与IP组比较；f：$P<0.05$，g：$P<0.01$，与T_1比较；h：$P<0.05$，i：$P<0.01$，与T_2比较

表2 缺血再灌注损伤大鼠各组各时点心肌线粒体心磷脂含量的比较（μg/mg，$n=18$，$\bar{x}\pm s$）

组别	T_1	T_2	T_3
正常组	78.15±5.89	78.60±10.52	68.15 ± 4.41^{fh}
对照组	77.67±8.93	78.35±4.39	44.16 ± 2.84^{bgi}
IP组	76.57±3.51	72.59±6.77	60.42 ± 4.80^{adgi}
HD组	78.24±5.36	73.28±7.95	50.32 ± 5.77^{bcegi}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与对照组比较；e：$P<0.01$，与IP组比较；f：$P<0.05$，g：$P<0.01$，与T_1比较；h：$P<0.05$，i：$P<0.01$，与T_2比较

3 讨论

心肌细胞中线粒体含量较多，约占细胞容积的30%以上，线粒体基本功能是通过呼吸链的氧化磷酸化供给细胞所需能量，这要求线粒体结构与功能的高度完整性。心磷脂作为线粒体膜磷脂双层分子的基本结构之一，与线粒体的结构与功能有关，是呼吸酶如细胞色素C(CytC)还原酶及其他某些线粒体蛋白发挥正常功能所必需的物质[6]。

本研究结果表明，缺血再灌注末对照组线粒体心磷脂含量较正常组低，IP组心磷脂较对照组高，说明缺血再灌注对线粒体心磷脂具有损害作用，而IP则对心磷脂具有一定的保护作用。其原因可能是缺血再灌注一方面损害线粒体呼吸功能，使心磷脂的合成受阻[7]；另一方面心磷脂是多不饱和脂肪酸，为线粒体内膜主要成分，其特殊位置离线粒体内膜产生活性氧簇(ROS)的位点很近，易受ROS的攻击转变为过氧化心磷脂；同时缺血再灌注还激活磷脂酶A2活性，使磷脂活化分解[8]，导致已合成的心磷脂含量减少，以上因素共同导致线粒体心磷脂含量的下降。而心磷脂又是线粒体呼吸链复合体能够正常“锚定”在线粒体内膜上的重要物质，其含量下降势必又影响呼吸酶活性[9]，进而影响呼吸电子的传递，导致电子漏增加，产生更多ROS，形成一个有害的正反馈循环，加重线粒体心磷脂的损害。而IP可能通过保护还原型谷胱甘肽(GSH)含量，增强心肌细胞对ROS的清除能力[10]，开放三磷酸腺苷敏感性钾离子通道，保护线粒体呼吸酶活性，减少ROS的过度产生[11]，并抑制磷脂酶A2的激活，减少膜磷脂降解[12]，降低心磷脂的氧化与分解，产生保护作用。一旦心磷脂含量受到保护，则阻断了上述缺血再灌注所引起的有害正反馈循环，使心磷脂得到进一步保护。

有研究表明，心磷脂是形成线粒体呼吸链复合体所必需的物质[13]，且心磷脂缺乏将导致细胞色素C释放进入细胞溶质[14]，激活Caspase-9[15]，诱导加速细胞凋亡[16]。本研究结果显示，IP组心磷脂含量较高，其缺血再灌注后的心脏功能恢复较好，具有一定的心肌保护作用。可能是IP通过前述机制，在一定程度上保护了线粒体心磷脂含量，维护线粒体膜结构的完整性；加之能保护线粒体呼吸链复合体酶的活性，保障细胞ATP供给，并限制细胞色素C的释放及诱导的细胞凋亡，从而产生心肌保护作用。既往研究还证明，ATP敏感性钾通道在心肌细胞上存在结构相似，位置与功能不同的两类，即细胞膜ATP敏感性钾通道(sarc-KATP)和线粒体ATP敏感性钾通道(mito-KATP)，mito-KATP开放可抑制线粒体通透性转换孔(PTP)开放，减少线粒体膜电位的丢失[17]，保护线粒体功能[18]，抑制细胞内钙超载等，推测mito-KATP在心肌保护作用中可能占有重要地位。本研究结果也表明，缺血预处理之前给予5-HD，T_3时HD组HR、LVDP较IP组降低，较对照组高；LVEDP较IP组升高，较对照组低；而心磷脂含量较IP组降低，较对照组高，提示特异性线粒体ATP敏感性钾通道(mito-KATP)阻断剂5-HD能部分阻滞IP对心磷脂及其心肌保护作用，说明在IP的心肌保护中，mito-KATP通道可能占有主导地位，同时可能还与sarc-KATP或其他机制也发挥一定作用有关。

综上所述，IP可维护心肌线粒体心磷脂含量的相对稳定，改善大鼠离体缺血再灌注心脏功能，其机制主要与mito-KATP通道的激活有关。

参考文献：

[1] 张 琼，喻 田，傅小云，等. 缺血预处理对大鼠离体心脏心肌线粒体功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2007，27(8)：745－747.

[2] Paradies G，Petrosillo G，Pistolese M，*et al*. Decrease in mitochondrial complex Ⅰ activity in ischemic/reperfused rat heart：involvement of reactive oxygen species and cardiolipin[J]. Circ Res，2004，94(1)：

53 – 59.
[3] Zydowo M M, Swierczynski J, Nagel G, *et al*. The respiration and calcium content of heart mitochondria from rats with vitamin D-induced cardionecrosis[J]. Biochem J, 1985, 226(1): 155 – 161.
[4] Bligh E G, Dyer W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem physiol, 1959, 37(8): 911 – 917.
[5] Lesnefsky E J, Stoll M S, Minkler P E, *et al*. Separation and quantitation of phospholipids and lysophospholipids by high-performance liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 2000, 285(2): 246 – 254.
[6] Petrosillo G, Di-Venosa N, Pistolese M, *et al*. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia-reperfusion: role of cardiolipin[J]. FASEB J, 2006, 20(2): 269 – 276.
[7] Gohil V M, Hayes P, Matsuyama S, *et al*. Cardiolipin biosynthesis and mitochondrial respiratory chain function are interdependent[J]. J Biol Chem, 2004, 279(41): 42612 – 42618.
[8] 刘　蔚, 王浩春, 张雁芳, 等. 心肌线粒体 ATP 敏感性钾通道开放保护线粒体结构和功能[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(11): 1252 – 1254.
[9] Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, *et al*. Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex Ⅲ activity *via* cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles[J]. Mitochondrion, 2001, 1(2): 151 – 159.
[10] Morihira M, Hasebe N, Baljinnyam E, *et al*. Ischemic preconditioning enhances scavenging activity of reactive oxygen species and diminishes transmural difference of infarct size[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(2): H577 – H583.
[11] Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja P P, *et al*. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(2): H531 – H539.
[12] 曾志勇, 王志农, 徐志云, 等. 缺血预处理对体外循环中心肌磷脂酶 A_2 活性和细胞膜微黏度变化的影响[J]. 中国循环杂志, 2003, 18(5): 385 – 387.
[13] Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin is essential for organization of complexes Ⅲ and Ⅳ into a supercomplex in intact yeast mitochondria[J]. J Biol Chem, 2005, 280(33): 29403 – 29408.
[14] Belikova N A, Vladimirov Y A, Osipov A N, *et al*. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes[J]. Biochemistry, 2006, 45(15): 4998 – 5009.
[15] Qin Y, Vanden-Hoek T L, Wojcik K, *et al*. Caspase-dependent cytochrome c release and cell death in chick cardiomyocytes after simulated ischemia-reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(6): H2280 – H2286.
[16] Choi S Y, Gonzalvez F, Jenkins G M, *et al*. Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(3): 597 – 606.
[17] 陈其彬, 喻　田, 傅小云, 等. 二氮嗪预处理对大鼠离体心脏缺血再灌注时心肌线粒体通透性转换孔的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2008, 28(1): 25 – 28.
[18] 黄　河, 肖颖彬, 杨天德, 等. 二氮嗪预处理对大鼠缺血性损伤心肌线粒体功能的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(9): 807 – 809.

（编辑　龙　亮）

（上接 1735 页）

功能,心功能不全的患儿强心、利尿、扩血管治疗;有脑水肿的患儿给予甘露醇脱水降颅压;心肺功能不全的患儿早期给予呼吸维持治疗,气管插管,机械通气[2],肺出血患儿给予肺部止血等一系列抢救治疗。

2　结果

本组 21 例并发症患儿经治疗,除 1 例死亡外,20 例痊愈出院,未出现严重的后遗症。

3　讨论

手足口病由数种病毒引起,最常见的是柯萨奇病毒 A16 型和肠道病毒 EV71 型,其感染部位包括口腔在内的整个消化道,通过唾液飞沫或带有病毒的苍蝇叮爬过的食物、水果等物品,污染的手,经鼻腔、口腔传染给健康患儿,并在肠道增殖。分析导致并发症的因素:① 21 例并发症患儿均为 5 岁以下婴幼儿,免疫力低,为易感群体。② 19 例来自乡镇,提示农村缺医少药的现象仍普遍存在,特别是广西的边远山区;其中 3 例为留守儿童,由爷爷奶奶看管,老人无能力及时将患儿送医院。另 2 例住处交通不便,延误了治疗最佳时机。③ 5 例幼儿父母对疾病的认识不够,误认为是普通感冒,自行抓药给小孩服用,病情加重后才送医院治疗。

本组 21 例患儿起病急、病情变化快、病情重、持续高热不退,均有不同程度神经、呼吸、循环三大系统的症状,符合诊断重症手足口病的标准。手足口病重症病例救治成功的关键在于救治和转诊及时。本组患儿入院后,专家组立即进行检查和会诊,避免了时间上的延误,极大地提高了治疗水平,经过积极治疗,20 例患儿病情逐渐好转,治愈出院。另 1 例患儿由于基层医务人员对手足口病的认识不足,按普通感冒治疗,未及时转诊;加上患儿年龄小,仅 1 岁 8 个月,免疫功能低下;进院时出现严重的并发症肺出血、肺水肿、心源性休克而导致中枢性呼吸衰竭,处于昏迷和休克状态,经抢救无效而死亡。

因此,在手足口病的流行季节,应加大防治力度:①通过广播、电视、报纸、宣传栏等开展手足口病防治知识的宣传,提高公众的防病意识和能力。②加强对基层医务人员的培训,提高其对手足口病的认识。③医院对发热和出疹的患儿设专门的诊所[3,4],避免交叉感染,以有效控制疾病流行。④及早发现危重患儿,及时救治,尽可能的避免死亡病例发生。

关键词: 手足口病;并发症;患儿
中图法分类号: R725.1　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 王晓云, 李　静, 杜强国, 等. 药疹误诊手足口病 2 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(5): 1212.
[2] 楼晓芳, 蒋　敏, 马美芳, 等. 32 例重症手足口病患儿的护理[J]. 中华护理杂志, 2009, 44(3): 244 – 246.
[3] 李春兰. 小儿手足口病的护理[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(9): 838.
[4] 穆传红, 林　青. 小儿手足口病 44 例护理体会[J]. 实用临床医药杂志: 护理版, 2009, 5(5): 68 – 69.

（编辑　汪勤俭）