DOI:10.16016/j.1000-5404.201507114

丙泊酚后处理对肾性高血压大鼠心肌的保护作用

税春玲,杨建平,唐佩灵,江 伟,杨 柳 (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院麻醉科)

[摘要] **目的** 探讨丙泊酚后处理对肾性高血压大鼠(renal hypertensive rats,RHR)的心肌保护作用,并探讨其可能的机制。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠采用"两肾一夹"法制备肾性高血压大鼠模型,在此模型基础上制备结扎 RHR 左冠状动脉前降支 30 min、再灌注 60 min 的急性心肌缺血再灌注损伤模型。将 24 只 RHR 按照随机数字表法分为 3 组($n=8$):缺血再灌注组(I/R 组)、丙泊酚组(P 组)、丙泊酚 + 苍术苷(ATR)组(PA 组)。3 组分别于再灌注同时通过尾静脉缓慢注入生理盐水 1.5 mL(I/R 组)或丙泊酚(2 mg/kg)(P 组)或丙泊酚(2 mg/kg) + 苍术苷(Atractyloside,ATR)(5 mg/kg)(PA 组),然后再灌注至 60 min。记录左冠状动脉结扎前(T0)、结扎后 15 min(T1)、结扎后 30 min(T2)、再灌注 15 min(T3)、再灌注 30 mim(T4)、再灌注 60 min(T5)时收缩压(SBP)、舒张压(DBP)和心率(HR)。电子显微镜下观察再灌注 60 min 时的心肌细胞超微结构的改变情况,TUNEL 法检测细胞凋亡。**结果** 再灌注 15 min 和 30 min 时 P 组的 SBP 和 DBP 较 I/R 组和 PA 组高($P<0.05$)。电子显微镜观察再灌注 60 min 后的心肌细胞超微结构,P 组心肌细胞线粒体膜轻度水肿,而 I/R 组和 PA 组心肌细胞线粒体肿胀明显,数量减少。P 组的心肌细胞凋亡指数(apoptosis index,AI)[(16 ± 4) %]低于 I/R 组[(48 ± 5)%]和 PA 组[(38 ± 8)%],差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 丙泊酚后处理对 RHR 大鼠心肌缺血再灌组损伤具有保护作用,其机制可能与抑制线粒体通透性转换有关。

[关键词] 丙泊酚;后处理;缺血再灌注损伤;线粒体;高血压
[中图法分类号] R322.11;R544.1;R971.2 [文献标志码] A

Myocardial protective effect of propofol postconditioning in renal hypertensive rats

Shui Chunling, Yang Jianping, Tang Peiling, Jian Wei, Yang Liu (Department of Anesthesiology, Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of propofol postconditioning on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in renal hypertensive rats (RHR) and possible mechanism. **Methods** Renal hypertensive model was induced in adult male Sprague-Dawley (SD) rats with two-kidney one-clip method, and cardiac I/R injury was established by ligaturing left anterior descending (LAD) coronary artery for 30 min and then reperfusing for 60 min. Twenty-four RHR were randomly divided into 3 groups ($n=8$): I/R group, propofol group (P group) and propofol + atractyloside group (PA group). Normal saline 1.5 mL (I/R group), propofol 2 mg/kg (P group), and propofol 2 mg/kg and atractyloside 5 mg/kg (PA group) were intravenously infused at the beginning of reperfusion (propofol and atractyloside diluted to 1.5 mL with normal saline equally). Systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) were recorded before ligaturing LAD coronary artery (T0), at 15 min (T1) and 30 min (T2) after ligaturing LAD coronary artery, and at 15 min (T3), 30 min (T4) and 60 min (T5) of reperfusion, respectively. Morphologic change of myocardial cells was observed with an electron microscope at 60 min of reperfusion. Apoptosis was evaluated by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)

[基金项目] 重庆医科大学附属永川医院科学基金项目(YJQN2011031)
[通信作者] 杨建平,E-mail: cqyjp38@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1355.042.html(2015-12-4)

assay at 60 min of reperfusion. **Results** SBP and DBP of the P group were higher than those of the PA group and I/R group ($P<0.05$) at T3 and T4. Microscopic observation showed the majority of myocardial cells were intact and mitochondria were moderately swollen at 60 min of reperfusion in the P group. The I/R group and PA group showed obvious mitochondrial swelling, disorganized cristae, and vacuolation at 60 min of reperfusion. The apoptosis index [(16±4)%] of myocardial cells in the P group was decreased compared with that [(48±5)%] of the I/R group and that [(38±8)%] of the PA group ($P<0.05$). **Conclusion** Propofol postconditioning effectively protects the RHR against I/R injury by inhibition of mitochondrial permeability transition pore during the early reperfusion.

[**Key words**] propofol; postconditioning; ischemia-reperfusion injury; mitochondrial permeability transition pore; hypertension

Supported by the Science Foundation of Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University. Corresponding author: Yang Jianping, Tel: 86-23-85381667, E-mail: cqyjp38@126.com

丙泊酚是已经得到证实的具有心肌保护作用的围术期常用麻醉药物之一[1-3],目前实验研究对象多为成年健康动物,临床上发生急性心肌梗死的患者大多高龄并有高血压等合并症,心肌保护机制的研究也应该关注高血压等合并症可能对药物性保护机制的影响。桂波等[4]研究发现,给予丙泊酚预处理对合并高血压的离体心肌同样具有保护作用。缺血后处理通常与经典的缺血预处理有相似的心肌保护效果并更有临床应用价值。近期的研究认为线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,mPTP)在心肌缺血再灌注损伤过程中的大量开放是导致心肌细胞坏死的重要原因[5],我们假设临床常用诱导剂量的丙泊酚后处理对肾性高血压大鼠(renal hypertensive rats,RHR)心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemic reperfusion injury,MIRI)有保护作用,使用特异性线粒体通透性转换孔开放剂苍术苷(Atractyloside,ATR),拟进一步探讨其可能的线粒体机制,为临床围术期高血压患者心肌保护提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 丙泊酚(propofol,AstraZeneca 公司),苍术苷(ATR,sigma 公司),TUNEL 试剂盒(Roche 公司),其余试剂为国产分析纯试剂(国药集团上海化学试剂公司)。

1.2 动物模型制备及分组

1.2.1 肾性高血压模型制备 健康成年雄性 SD 大鼠,体质量 200~220 g(重庆医科大学实验动物中心)。参照经典的"两肾一夹"的方法制作肾性高血压大鼠(RHR)模型 24 只。SD 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉(0.3 mL/100 g),经腹正中切口分离大鼠左肾动脉,在左肾动脉上方 0.5 cm 处以 4 号丝线结扎,逐层缝合腹部切口。喂饲常规饲料。术后第 8 周用尾动脉血压计测量,收缩压(SBP)大于 160 mmHg 视为高血压模型成功。

1.2.2 心肌缺血/再灌注损伤模型制备 24 只 RHR 大鼠麻醉后气管切开并插管,接小动物呼吸机机械通气(潮气量:20 mL/kg,呼吸频率:50~60 /min)。分离右侧颈总动脉并置管,经换能器连接 BL-420F 生物机能实验系统。连续监测心率(HR)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP),肢导联心电图连续监测Ⅱ导联心电图。剪开胸腔后在动脉圆锥与左心耳之间冠状静脉处用 5/0 丝线结扎左冠状动脉前降支(LAD)。以左室前壁呈蓝紫色及同步心电图示 ST 段抬高为结扎成功标志,剪断丝线复灌时左室前壁缺血区紫色消失。

1.2.3 分组 24 只 RHR 大鼠按照随机数字表法分成 3 组($n=8$):缺血再灌注组(I/R),缺血 30 min,再灌注同时尾静脉注入生理盐水 1.5 mL,再灌注 60 min;丙泊酚组(P 组),缺血 30 min,再灌注同时通过尾静脉缓慢注入丙泊酚(2 mg/kg),再灌注至 60 min;丙泊酚+ATR 组(PA 组),缺血 30 min,再灌注同时尾静脉注入丙泊酚(2 mg/kg)+ATR(5 mg/kg),再灌注至 60 min。所有药物均以生理盐水稀释至 1.5 mL。

1.3 监测指标

1.3.1 血流动力学指标 记录 LAD 结扎前(T0)、结扎后 15 min(T1)、30 min(T2)、再灌注 15 min(T3)、再灌注 30 min(T4)、再灌注 60 min(T5)时 SBP、DBP 和 HR。

1.3.2 电子显微镜下观察心肌细胞超微结构 再灌注 60 min 时,留取 1 mm×1 mm 左心室前壁组织,2.5% 戊二醛磷酸盐缓冲液固定过夜。制作电镜标

本,行超薄切片,黏附于铜网,醋酸铀与柠檬酸双重染色。H-600 投射电子显微镜下观察心肌细胞超微结构变化情况。

1.3.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 再灌注 60 min 时,取心室左前壁组织常规石蜡包埋连续切为 4 μm 厚组织片,参照 TUNEL 试剂盒操作步骤进行。TUNEL 染色及苏木精复染后,凋亡细胞的细胞核被染为棕黄色,正常细胞核呈蓝色。随机选取 10 个高倍视野,计算凋亡指数(apoptosis index,AI)即凋亡细胞数占视野中总细胞数的比例。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用配对 t 检验,组间比较采用重复测量的方差分析,组间概率比较采用 Fisher 精确概率法,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学变化

I/R、P 和 PA 组 SBP 和 DBP 的比较显示,随着再灌注时间的延长,3 组大鼠 SBP 和 DBP 均呈进行性下降,T5 时点 SBP 和 DBP 较 T0 时点低($P<0.05$);P 组 T3 和 T4 时点 SBP 和 DBP 较 I/R 组和 PA 组高($P<0.05$);3 组各时点 HR 变化差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2.2 心肌细胞形态学改变

电镜下观察心肌细胞超微结构,I/R 组和 PA 组线粒体明显肿胀,数量减少,线粒体嵴排列紊乱,稀疏;P 组心肌纤维排列均匀,横纹明显,线粒体膜结构完整,仅轻度水肿,线粒体嵴清晰(图 1)。

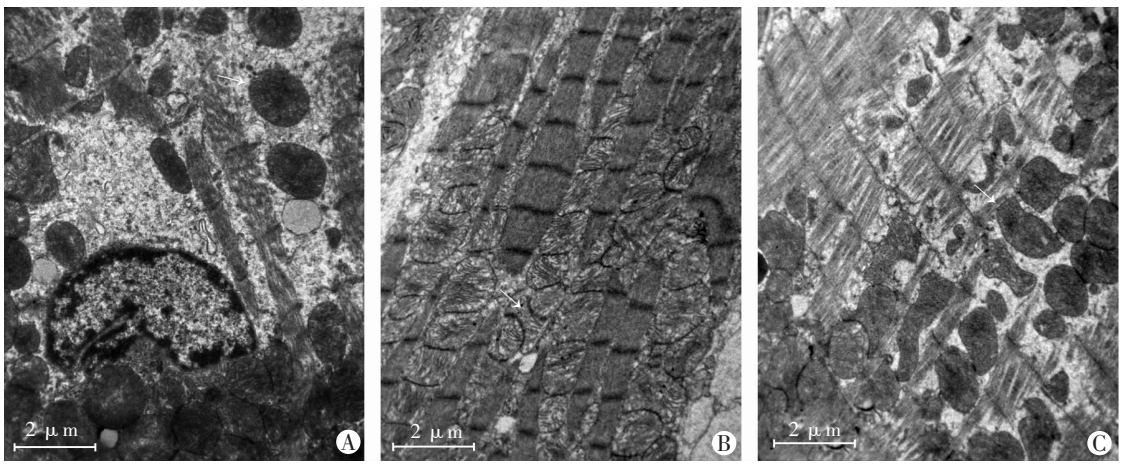
2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡

光镜下观察,凋亡细胞核和/或细胞碎片呈深浅不一的棕黄色,正常细胞的细胞核为蓝色,见图 2。I/R 组心肌细胞凋亡指数[(48±5)%]和 PA 组[(38±8)%]较 P 组[(16±4)%]高($P<0.05$)。

表 1 3 组大鼠不同时点血流动力学变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

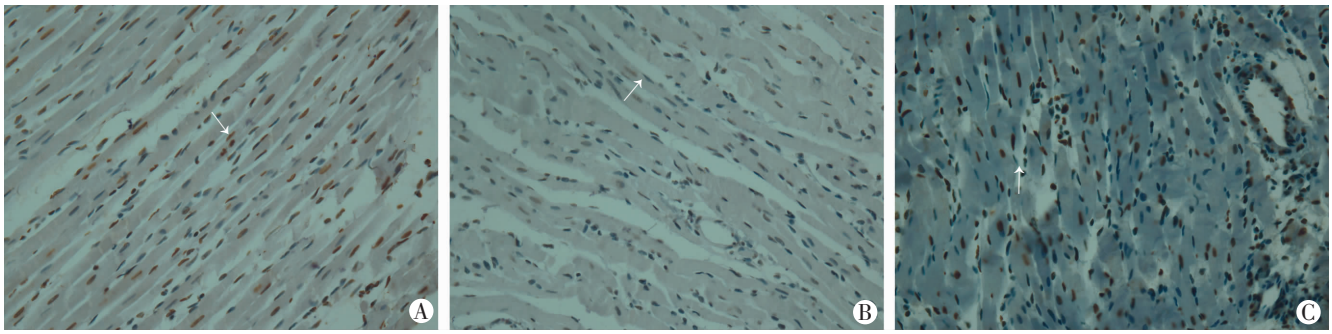
组别	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	HR(次/min)
I/R 组			
T0	168±6	96±4	378±46
T1	168±8	97±8	379±34
T2	159±7	96±10	367±39
T3	132±10[a]	82±13[a]	350±34
T4	124±12[a]	79±7[a]	340±35
T5	123±12[a]	76±8[a]	331±57
P 组			
T0	167±4	103±11	369±35
T1	169±7	10±27	369±33
T2	164±6	97±6	350±42
T3	155±9[bc]	95±7[abc]	343±41
T4	140±10[abc]	88±6[abc]	326±33
T5	132±17[a]	74±8[a]	316±50
PA 组			
T0	169±5	100±9	377±28
T1	163±6	99±7	357±32
T2	158±4	95±4	329±38
T3	132±13[a]	83±4[a]	322±26
T4	124±9[a]	75±8[a]	311±29
T5	123±12[a]	75±10[a]	294±41

a:$P<0.05$,与 T0 比较;b:$P<0.05$,与 I/R 比较;c:$P<0.05$,与 PA 比较



A:I/R 组 B:P 组 C:PA 组(箭头示细胞内线粒体)

图 1 电子显微镜下观察心肌细胞超微结构



A: I/R 组; B:P 组; C:PA 组 正常细胞核为蓝色,凋亡细胞核呈棕黄色(箭头示)

图 2 TUNEL 检测细胞凋亡 (×400)

3 讨论

在研究丙泊酚后处理对成年健康大鼠心肌保护作用的基础上,本研究探讨丙泊酚后处理对肾性高血压大鼠(RHR)的心肌保护作用及其可能的线粒体机制,旨在为临床围术期高血压患者心肌保护提供参考。本研究结果显示 P 组 T3 和 T4 时点 SBP 和 DBP 较 I/R 组和 PA 组高($P<0.05$),提示常用诱导剂量的丙泊酚后处理可改善肾性高血压大鼠缺血再灌注后的血压。表明丙泊酚后处理能够较好的维持再灌注后的心脏功能。本研究结果显示 P 组心肌细胞凋亡指数低于 I/R 组和 PA 组($P<0.05$),提示丙泊酚后处理可有效抑制 RHR 大鼠缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡。此外,电镜观察其心肌细胞超微结构发现,P 组线粒体结构基本完整,而 ATR 组和 I/R 组线粒体肿胀,数量减少,表明丙泊酚后处理能够较好维持 RHR 大鼠缺血再灌注损伤后心肌细胞线粒体的完整性,保存了细胞的能量工厂,从而为受损细胞的恢复提供保障。当 PA 组同时使用特异性线粒体通透性转换孔开放剂 ATR 和丙泊酚后,其结果显示丙泊酚的心肌保护效应消失。这点间接证实丙泊酚后处理对 RHR 大鼠再灌注后的心肌保护作用可能与在线粒体水平抑制 mPTP 开放,阻断凋亡信号传递有关。

多项临床研究已经证实丙泊酚对合并有基础心血管疾病的心肌具有保护作用,丙泊酚后处理可减轻冠脉搭桥手术患者的心肌损伤[6],体外循环心内直视手术过程中持续输注丙泊酚在维持麻醉同时可明显减轻心肌缺血再灌注损伤[7]。Sun 等[8]研究认为丙泊酚可改善成年健康大鼠缺血再灌注损伤心脏梗死面积,并较快恢复心脏损伤后的心功能。Li 等[9]研究认为丙泊酚后处理对原代培养的新生大鼠心肌细胞可减少细胞凋亡,提高细胞存活率。丙泊酚可能通过多种途径,激活细胞内源性抗凋亡通路或抑制凋亡蛋白活化通路来抑制致命性的心肌损伤[10-11]。而缺血再灌注损伤过程中 mPTP 大量开放已被认为是导致细胞凋亡的重要原因之一[12]。mPTP 开放抑制剂环胞菌(cyclosporin)[13]能够减少梗死面积,改善急性心肌梗死后左心功能[14],逆转高胆固醇血症对缺血后处理心肌保护作用的抑制[15]。抑制 mPTP 开放也是多种药物处理的心肌保护机制之一及靶点所在[16-17]。再灌注开始时使用 mPTP 开放剂 ATR 可能抵消了丙泊酚后处理对凋亡细胞数的抑制效应和循环改善作用。这些研究结果与本实验结果相吻合。但是,另有研究发现高血糖能够取消吸入麻醉药七氟烷后处理的心肌保护作用[18]。而丙泊酚对缺血再灌注损伤的 2 型糖尿病大鼠心脏保护作用不明显[19],可其后的研究发现丙泊酚能减轻 2 型糖尿病大鼠的心肌损伤[20]。虽然目前的一些研究结果尚有争论,但临床选用具有心肌保护效果的药物时,仍应该考虑患者并存疾病对其保护效应的影响,尽可能选择不受合并症影响其效果的药物可能会更有益于患者。

由于本实验仅观察了 RHR 心肌缺血再灌注至 60 min 时段范围内的血流动力学及心肌细胞超微结构变化,得出的结论也仅限于此时段范围内。丙泊酚后处理对合并高血压的心肌缺血再灌注损伤的远期保护作用仍有待进一步研究。

综上所述,本研究结果显示,丙泊酚后处理对肾性高血压大鼠的心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,其保护机制可能与抑制线粒体通透性转换,减轻心肌细胞凋亡有关。

参考文献:

[1] Xu J, Li H, Irwin M G, *et al*. Propofol ameliorates hyperglycemia-induced cardiac hypertrophy and dysfunction via heme oxygenase-1/signal transducer and activator of transcription 3

signaling pathway in rats[J]. Crit Care Med, 2014, 42(8): e583 – e594. DOI:10.1097/CCM.0000000000000415

[2] King N, Al-Shaama M, Suleiman M S. Propofol improves recovery of the isolated working hypertrophic heart from ischemia-reperfusion[J]. Pflugers Arch, 2012, 464(5): 513 – 522. DOI:10.1007/s00424 – 012 – 1152 – 5

[3] Soro M, Gallego L, Silva V, *et al*. Cardioprotective effect of sevoflurane and propofol during anaesthesia and the postoperative period in coronary bypass graft surgery: a double-blind randomized study[J]. Eur J Anaesthesiol, 2012, 29(12): 561 – 569. DOI:10.1097/EJA.0b013e3283560aea

[4] 桂波, 曹红, 曾因明. ERK1/2 参与丙泊酚预处理对肾性高血压大鼠离体心肌缺血再灌注损伤的作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 76 – 80.

[5] Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signaling pathways for protection against necrosis[J]. Cardiovasc Res, 2012, 94(2): 181 – 189. DOI:10.1093/cvr/cvr302

[6] 王海云, 王国林, 于泳浩, 等. 丙泊酚后处理对体外循环冠脉旁路移植术患者心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 天津医药, 2010, 38(4): 266 – 269.

[7] 夏文芳, 周青山, 邹捍东. 丙泊酚对体外循环心脏手术患儿心肌酶谱和预后的影响[J]. 医药导报, 2011, 30(9): 1171 – 1173.

[8] Sun H Y, Xue F S, Xu Y C, *et al*. Propofol improves cardiac fuctional recovery after ischemia-reperfusion by upregulating nitric oxide synthase activity in the isolated rat hearts[J]. Clin Med J (Engl), 2009, 122(24): 3048 – 3054.

[9] Li H, Tan J, Zou Z, *et al*. Propofol post-conditioning protect against cardiomyocyte apoptosis in hypoxia/reoxygenation injury by suppressing nuclear factor-kappa B translocation via extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Eur J Anaesthesiol, 2011, 28(7): 525 – 534. DOI:10.1097/EJA.0b013e32834296d5

[10] 邓琳, 隋海静, 杨雪, 等. 丙泊酚对大鼠心肌缺血再灌注损伤时凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2013, 47(3): 237 – 239.

[11] 刘柳, 庞勇, 何东伟, 等. 丙泊酚后处理对离体大鼠缺血再灌注心肌的保护作用及机制[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(17): 1779 – 1782.

[12] Ong S B, Samangouei P, Kalkhoran S B, *et al*. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 78: 23 – 34. DOI:10.1016/j.yjmcc.2014.11.005

[13] Hausenloy D J, Boston-Griffiths E A, Yellon D M. Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent[J]. Br J Pharmacol, 2012, 165(5): 1235 – 1245.

[14] Sheu J J, Chua S, Sun C K, *et al*. Intra-coronary administration of cyclosporine limits infarct size, attenuates remodeling and preserves left ventricular function in porcine acute anterior infarction[J]. Int J Cardiol, 2011, 147(1): 79 – 87.

[15] Wu N, Li W N, Shu W Q, *et al*. Blocking the mitochondrial permeability transition pore with cyclosporine-A can restore cardioprotection of ischemic postconditioning in hypercholesterolemic rat heart[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(3): 446 – 454.

[16] Nazari A, Sadr S S, Faghihi M, *et al*. Vasopressin attenuates ischemia-reperfusion injury via reduction of oxidative stress and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening in rat hearts[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 760: 96 – 102. DOI:10.1016/j.ejphar.2015.04.006

[17] Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, *et al*. Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes: comparison with cyclosporine A[J]. Eur J Pharmacol, 2012, 675(1/3): 40 – 46.

[18] Huhn R, Heinen A, Weber N C, *et al*. Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore[J]. Br J Anaesth, 2008, 100(4): 465 – 471. DOI:10.1093/bja/aen022

[19] 隋海静, 邓琳, 杨雪, 等. 丙泊酚对2型糖尿病大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(1): 74 – 76.

[20] 杨雪, 隋海静, 李冬梅, 等. 丙泊酚对2型糖尿病大鼠心肌缺血-再灌注损伤时凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(4): 385 – 388.

(**收稿**:2015-07-21;**修回**:2015-10-05)

(编辑 吴培红)