

右美托咪定预处理减轻离体大鼠心脏缺血/ 再灌注损伤的线粒体相关机制

姜翠翠,夏满莉,王 敏,陈士票

(嘉兴学院医学院,浙江 嘉兴 314001)

[摘要] **目的:**研究右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)预处理对心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的作用及其与线粒体渗透性转换孔(mPTP)和/或线粒体ATP敏感性钾通道(mitoK_{ATP})的关系。**方法:**分离SD雄性大鼠心脏置于Langendorff系统行全心停灌30 min,再灌注120 min建立心肌I/R损伤模型,停灌前15 min给予Dex(10 nmol/L)处理。测定左心室动力学、再灌注期间冠脉流量及再灌注5 min时中乳酸脱氢酶(LDH)含量,实验结束测定心肌组织formazan含量以反映心肌梗死状况。**结果:**与正常对照组相比,I/R组明显降低了再灌注期间的左室发展压、冠脉流量及再灌注末心肌组织formazan含量,显著升高了再灌注左室舒张末压、心肌LDH渗出;Dex预处理明显改善了I/R心脏功能及心肌组织活性($P < 0.01$);mPTP开放剂苍术苷(20 μ mol/L,再灌注前给药20 min)及mitoK_{ATP}抑制剂5-羟基癸酸(100 μ mol/L,停灌前给药20 min)可取消Dex预处理产生的抗心脏I/R损伤作用。**结论:**围手术期常用的辅助麻醉药Dex具有减轻离体大鼠心脏I/R损伤作用,且该心肌保护作用可能与Dex促进缺血前mitoK_{ATP}的开放,抑制再灌注早期mPTP的开放有关。

[关键词] 右美托咪啶/治疗应用;缺血预处理,心肌/药物治疗;线粒体/药物作用;钾通道/药物作用;腺苷三磷酸酶类/代谢;心肌再灌注损伤/预防和控制

[中图分类号] R 331.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2013)03-0326-05

Dexmedetomidine preconditioning protects isolated rat hearts against ischemia/reperfusion injuries and its mechanism

JIANG Cuicui, XIA Manli, WANG Min, CHEN Shipiao (Jiaxing University College of Medicine, Jiaxing 314001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of dexmedetomidine (Dex) preconditioning against ischemia/reperfusion (I/R) injuries in isolated rat hearts and its relation to mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel (mitoK_{ATP}). **Methods:** The hearts of male SD rats were isolated to mount on the Langendorff apparatus and subjected to 30 min global ischemia followed by 120 min reperfusion. The isolated hearts were treated with Dex (10 nmol/L) before ischemia for 15 min. The left ventricular hemodynamic parameters, coronary flow (CF) and the lactate dehydrogenase (LDH) release in the coronary effluent at 5 min reperfusion were measured. The formazan content was assayed to determine the myocardial viability at the end of

收稿日期:2012-02-29 修回日期:2012-11-30

基金项目:浙江省嘉兴市科技局科研项目资助(2010AY1061)。

作者简介:姜翠翠(1991-),女,本科生。

通讯作者:夏满莉(1975-),女,硕士,副教授,从事心血管生理和药理学研究;E-mail:sunny3643826@163.com

reperfusion. **Results:** Compared with normal controls, I/R markedly decreased the left ventricular developed pressure and CF during the whole reperfusion period and the formazan content; while the left ventricular end diastolic pressure and LDH release were significantly increased. Dex preconditioning markedly improved the myocardial viability and cardiac function ($P < 0.01$), which were reversed by the treatment with both atractyloside (20 $\mu\text{mol/L}$ before ischemian), an opener of mPTP, and 5-hydroxydecanoate (100 $\mu\text{mol/L}$ at the beginning of reperfusion), an inhibitor of $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, for 20 min. **Conclusion:** Dex has protective effect against I/R injuries in isolated rat hearts, which may be related to inhibiting the opening of mPTP at the beginning of reperfusion and activating $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ before ischemia.

[**Key words**] Dexmedetomidine/therapeutic use; Ischemic preconditioning, myocardial/drug therapy; Mitochondria/drug effects; Potassium channels/drug effects; Adenosine Triphosphatases/metabolism; Myocardial reperfusion injury/prevention & control

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2013,42(3):326-330.]

缺血性心肌梗死是当今人类的主要致死原因之一,及早恢复缺血区心肌的血流供应是减少心肌细胞死亡,挽救患者生命的最佳办法;但是,恢复血流灌注后又给心肌带来了心律失常、心肌梗死等新的损伤,即缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤^[1]。心肌 I/R 损伤机制复杂,有研究发现电刺激迷走神经可减少心肌 I/R 引起的心肌损伤,其机制可能与抑制线粒体渗透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放有关^[2];研究认为,增强迷走神经兴奋可能是减少 I/R 损伤,挽救缺血心肌的有效辅助治疗手段。

右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)为高选择性 α_2 -肾上腺素能受体激动剂,可抑制交感神经兴奋性,增强迷走神经兴奋性,常用于血管疾病患者围手术期的辅助麻醉与镇静镇痛,有助于减少围手术期的心脏副反应^[3]。研究发现,通过 Dex 预处理,可激活 α_2 -肾上腺素能受体,减轻大鼠心肌 I/R 损伤^[4-5]。再者,线粒体是缺血药物预处理发挥心肌保护作用的终末效应器之一^[2,6],Dex 减少心肌 I/R 损伤亦可能与调控心肌 mPTP 开放及其上游线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$)活性有关^[2,4],但有关 Dex 的心肌线粒体作用国内外尚未见报道。本实验应用 Langendorff 模型研究 Dex 对离体大鼠心脏 I/R 时心功能及心肌梗死的影响,探讨 Dex 预处理与心肌 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -mPTP 的关系。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 苍术苷(atractyloside, Atr)、5-羟基癸酸(5-hydroxydecanoate, 5-HD)及氯化三苯四氮唑(2,3,5-triphenylterazolium chloride, TTC)均购自 Sigma 公司。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)购自江苏恒瑞医药股份有限公司,批号为 20100412,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测试盒购自南京建成生物工程研究所,其余试剂为市售分析纯。Krebs-Henseleit (K-H)液(mmol/L): NaCl 118.0、KCl 4.7、 KH_2PO_4 1.2、 MgSO_4 1.2、 NaHCO_3 25.0、葡萄糖 10.0、 CaCl_2 2.5, pH 7.4, 以 95% O_2 + 5% CO_2 饱和。

1.2 离体心脏 Langendorff 灌流和左心室功能评价 雄性 SD 大鼠(体重 240 ~ 270 g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供)断头后开胸迅速取出心脏,置于 4℃ 改良 K-H 液中洗净血液,转移并固定于 Langendorff 灌流装置,以改良 K-H 液行常规恒压(76 mmHg)灌流,维持灌流液温度(37℃)。切开左心耳,将充水乳胶囊由此插入至左心室,囊内压力经特氟纶管传递至压力传感器,由 Medlab 生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司)记录和分析。向插入左心室内的乳胶囊注水使左心室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)维持于 5 ~ 8 mmHg,连续记录实验过程中左心室发展压(left ventricular developed pressure,

LVDP)及心率(heart rate,HR)等各项指标^[7]。

1.3 心肌 I/R 损伤模型制备 采用全心停灌的方法制备 I/R 损伤模型,即心脏在 Langendorff 灌流装置平衡 20 min,继续灌流 20 min 后,停止灌流 30 min 作为缺血,再灌注 120 min。

1.4 冠脉流出液 LDH 活性的测定 在复灌 5 min 末收集冠脉流出液,按试剂盒说明检测 LDH 活性。

1.5 心肌组织活性的测定 心脏从灌流装置上取下后切成 1~2 mm 薄片,在 37℃ 水浴中用 TTC(1%)孵育 30 min 后,取出心肌片,吸干表面的水分并称其湿重,加入二甲基亚砷(20 ml/g)后匀浆,离心(1 000 × *g*, 10 min),取上清液在 490 nm 处测量其吸光度,以吸光度值大小反映心肌组织活性。

1.6 实验分组 大鼠随机分为 5 组(*n* = 9):①正常对照组(Con):离体心脏 Langendorff 灌流 190 min;②I/R 损伤组(I/R):离体心脏平衡 20 min,继续灌流 20 min,全心停灌 30 min 作为缺血,然后再灌注 120 min;③Dex 预处理组(Dex):同 I/R 组,但在停灌前 15 min 用含 Dex

(10 nmol/L)的 K-H 液灌流,停灌 30 min 后用 K-H 液再灌注 120 min^[4];④Dex + 5-HD 组:平衡 20 min 后用含 5-HD(100 μmol/L)的 K-H 液灌流 20 min,再灌注前 15 min 加入 Dex(10 nmol/L),停灌 30 min 后用 K-H 液再灌注 120 min;⑤Dex + Atr 组:同 Dex 预处理组,但于再灌注前 20 min 用含 Atr(20 μmol/L)的 K-H 液灌流。

1.7 统计学处理 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数间比较采用 One-way ANOVA 和 Newman-Keuls 法检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Dex 预处理对 I/R 心脏冠脉流量及左心室收缩功能的影响 表 1 示,各组别大鼠的基础冠脉流量、LVDP 及 LVEDP 差异无显著性;与正常对照组比较,I/R 组再灌注期的冠脉流量和 LVDP 均明显下降(*P* < 0.01),而 LVEDP 显著增加(*P* < 0.01);Dex(10 nmol/L)预处理 15 min 均明显减弱 I/R 对冠脉流量及 LVDP 的抑制作用(*P* < 0.01)以及对 LVEDP 的抬升作

表 1 Dex 预处理对 I/R 心脏冠脉流量及左心室收缩舒张功能的影响

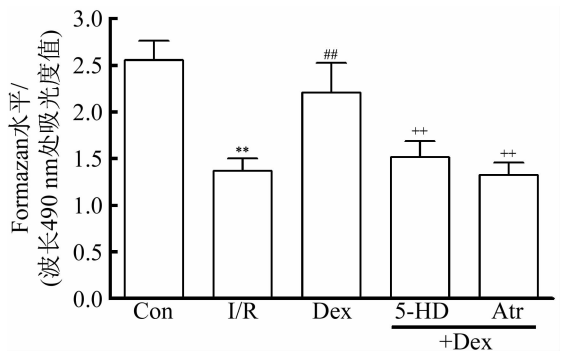
Table 1 Effect of dexmedetomidine (Dex) preconditioning on coronary flow and left ventricular systolic and diastolic function in isolated rat hearts subjected to ischemia/reperfusion (*n* = 9, $\bar{x} \pm s$)

变量	基础值	再灌注时间			
		30 min	60 min	90 min	120 min
冠脉流量/% 缺血前(ml/min)					
Con	100(7.35 ± 0.22)	97.32 ± 10.14	95.76 ± 8.36	94.73 ± 8.72	92.84 ± 7.94
I/R	100(7.42 ± 0.37)	72.39 ± 9.35 ^{**}	61.54 ± 8.72 ^{**}	49.38 ± 6.72 ^{**}	41.74 ± 7.53 ^{**}
Dex	100(7.23 ± 0.72)	91.72 ± 8.73 ^{##}	83.58 ± 7.95 ^{##}	71.73 ± 9.74 ^{##}	65.35 ± 8.93 ^{##}
Dex + 5-HD	100(7.55 ± 0.46)	79.32 ± 7.58 ⁺⁺	64.51 ± 7.75 ⁺⁺	53.75 ± 6.93 ⁺⁺	46.06 ± 6.32 ⁺⁺
Dex + Atr	100(7.29 ± 0.58)	74.78 ± 8.34 ⁺⁺	60.35 ± 7.84 ⁺⁺	48.54 ± 7.93 ⁺⁺	42.97 ± 7.48 ⁺⁺
LVDP/% 缺血前(mmHg)					
Con	100(93.27 ± 9.41)	94.58 ± 10.06	92.07 ± 9.48	91.23 ± 10.32	89.48 ± 8.93
I/R	100(94.36 ± 8.38)	78.24 ± 9.83 ^{**}	64.53 ± 8.74 ^{**}	53.46 ± 9.43 ^{**}	47.87 ± 7.47 ^{**}
Dex	100(94.93 ± 9.37)	90.34 ± 9.87 [#]	82.38 ± 8.94 ^{##}	75.94 ± 9.02 ^{##}	66.48 ± 8.35 ^{##}
Dex + 5-HD	100(92.38 ± 8.41)	81.37 ± 9.42	70.56 ± 8.48 ⁺⁺	62.39 ± 9.04 ⁺⁺	53.64 ± 7.93 ⁺⁺
Dex + Atr	100(93.63 ± 9.48)	76.93 ± 10.02 ⁺	63.76 ± 9.37 ⁺⁺	55.87 ± 8.74 ⁺⁺	48.92 ± 9.36 ⁺⁺
LVDEP/mmHg					
Con	6.59 ± 0.34	8.23 ± 0.91	9.04 ± 0.89	9.53 ± 1.05	9.32 ± 0.97
I/R	6.32 ± 0.42	24.98 ± 3.84 ^{**}	26.32 ± 2.84 ^{**}	26.48 ± 3.02 ^{**}	27.04 ± 2.93 ^{**}
Dex	6.94 ± 0.51	13.37 ± 1.54 ^{##}	15.72 ± 1.05 ^{##}	15.83 ± 1.86 ^{##}	16.15 ± 1.82 ^{##}
Dex + 5-HD	6.84 ± 0.65	22.72 ± 3.17 ⁺⁺	24.24 ± 3.04 ⁺⁺	24.87 ± 2.68 ⁺⁺	25.17 ± 3.94 ⁺⁺
Dex + Atr	7.02 ± 0.72	25.32 ± 3.16 ⁺⁺	27.63 ± 2.96 ⁺⁺	27.42 ± 2.30 ⁺⁺	27.57 ± 2.86 ⁺⁺

与正常对照组(Con)比,***P* < 0.01;与缺血/再灌注损伤组(I/R)比,[#]*P* < 0.05,^{##}*P* < 0.01;与 Dex 预处理组(Dex)比,⁺*P* < 0.05,⁺⁺*P* < 0.01。

用($P < 0.01$), Dex 预处理对再灌注期间心功能的改善作用均被 5-HD 及 Atr 所逆转($P < 0.01$)。在整个实验过程中,各组间心率无明显变化(数据略)。

2.2 Dex 预处理对 I/R 心脏心肌活性及冠脉流出液 LDH 含量的影响 图 1 示,与正常对照组比较,I/R 组再灌注结束后心肌组织活性标记物 formazan 含量明显下降($P < 0.01$), Dex (10 nmol/L) 预处理 15 min 明显减弱了 I/R 对心肌组织活性的损伤作用($P < 0.01$),该改善作用被 5-HD 及 Atr 所逆转($P < 0.01$)。由图 2 所见,Dex 预处理明显抑制了 I/R 导致的冠脉流出液 LDH 含量增加($P < 0.01$),而 5-HD 及 Atr 处理则取消了 Dex 减少冠脉流出液 LDH 含量的作用。



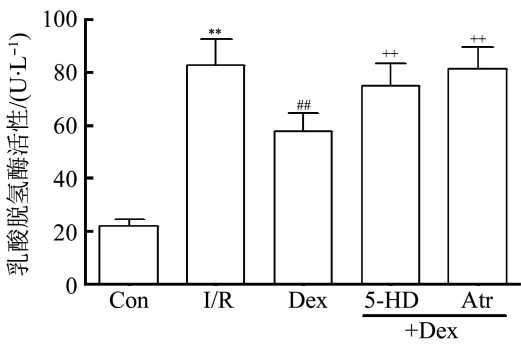
与正常对照组 (Con) 比, ** $P < 0.01$; 与缺血/再灌注损伤组 (I/R) 比, ## $P < 0.01$; 与 Dex 预处理组 (Dex) 比, ++ $P < 0.01$ ($n = 9, \bar{x} \pm s$)。

图 1 Dex 预处理对 I/R 心脏 formazan 含量的影响

Fig. 1 Effect of dexmedetomidine, 5-hydroxydecanoate and atractyloside on the formazan content from the isolated rat hearts subjected to I/R

3 讨论

本实验在离体大鼠全心 I/R 模型上发现, Dex 预处理明显增加了 I/R 大鼠心脏冠脉流量, 减少了心肌损伤标志酶 LDH 的漏出及心肌组织活性的下降, 改善了再灌注左心室收缩与舒张功能, 这些心功能改善作用均被 mitoK_{ATP} 阻断剂 5-HD 及 mPTP 开放剂 Atr 所逆转, 提示 Dex 预处



与正常对照组 (Con) 比, ** $P < 0.01$; 与缺血/再灌注损伤组 (I/R) 比, ## $P < 0.01$; 与 Dex 预处理组 (Dex) 比, ++ $P < 0.01$ ($n = 9, \bar{x} \pm s$)。

图 2 Dex 预处理对 I/R 心脏冠脉流出液 LDH 的影响

Fig. 2 Effect of dexmedetomidine on the LDH activity in the coronary effluent from the isolated rat hearts subjected to I/R

理具有对抗心肌 I/R 损伤作用, 且该作用与 mitoK_{ATP} 的激活及下游 mPTP 开放受阻有关。

在心血管系统中, Dex 作为高选择性 α_2 -肾上腺素能受体激动剂具有多种生物学效应, 如通过不同亚型的 α_2 -肾上腺素能受体产生舒张或收缩血管效应^[8], 增强迷走神经兴奋性使心肌耗氧降低, 防止缺血心肌因能量耗竭而梗死^[3,5]。由于 Dex 具有良好的心血管保护作用, 其越来越多地应用于围手术期的辅助麻醉^[9], 但是有关 Dex 对 I/R 心肌损伤作用的研究却不多见, 且基本上停留在 α_2 -肾上腺素能受体激动剂的研究水平, 其下游所涉及的机制并不清楚。研究发现, Dex 的心肌保护作用在临床镇静用药时达到的最小与最大血浆浓度 (0.23 ~ 2.3 ng/ml, 对应 1 ~ 10 nmol/L) 范围内是浓度依赖性增强的^[4], 故本实验选择近似于临床 Dex 用药浓度的上限值, 以期产生探讨 Dex 心肌保护作用的线粒体相关机制。

心肌 I/R 损伤涉及的机制复杂, 其中再灌注期的活性氧自由基大爆发、心肌细胞内 Ca²⁺ 超载等因素促使 mPTP 开放, 线粒体膜电位崩解, 释放细胞色素 C 等诸多凋亡诱导因子至细胞质诱发细胞凋亡, 这是公认的心肌 I/R 损伤的经典途径^[7]。本研究是在离体心脏上进行

的,排除了迷走神经兴奋在 Dex 预处理心肌保护作用中的影响,Dex 改善了再灌注离体心脏的冠脉流量及左心室泵血功能,这可能是因为 Dex 通过激活冠状动脉的 α_2 -肾上腺素能受体,促使血管短暂收缩,产生了类似于缺血预处理的作用^[4];且 Dex 亦有可能通过激活心肌细胞的 α -肾上腺素能受体,产生正性肌力作用,提高 L/R 心脏左心室泵血功能,由此冠脉循环增加,增加心肌氧及营养物质供应,形成心功能改善的良性循环。Dex 的心功能改善作用被 mPTP 开放剂 Atr 所取消,提示 Dex 预处理可能抑制了心肌 mPTP 在再灌注期间的开放,维持了线粒体膜结构的完整性,减少了线粒体依赖性细胞凋亡^[2,8]。Dex 预处理组心肌组织活性增加及冠脉流出液 LDH 含量减少,进一步说明 Dex 预处理明显减少了 L/R 诱导的心肌细胞膜破裂及线粒体功能紊乱。

缺血前 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 开放是抵抗心肌 L/R 损伤的一条重要通路, $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 开放后可能通过激活再灌注期蛋白激酶 C- ϵ 、磷脂酰肌醇-3-激酶或腺苷 A2b 受体,共同促进线粒体糖原合成酶激酶-3 β 磷酸化,并抑制线粒体基质亲环蛋白 D 与内膜腺嘌呤核苷酸移位酶的结合(这两者是构成 mPTP 的主要成分),由此减少线粒体依赖的心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用^[10]。本实验中 Dex 预处理所产生的心肌保护作用被 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 阻断剂 5-HD 所取消,提示 Dex 预处理可能在心肌缺血前激活了 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$,启动了再灌注期心肌保护的线粒体通路。有研究显示 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 开放后,减少了心肌线粒体 Ca^{2+} 超载以及由此带来的氧化应激,从而抑制 mPTP 开放并维持线粒体膜结构的稳定^[7]。缺血前 5-HD 处理及再灌注早期添加 Atr 均取消了 Dex 预处理的心肌保护作用,进一步提示缺血前 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 激活以及由此引发的再灌注期 mPTP 开放受阻,这可能是 Dex 预处理发挥心肌保护作用的一条重要的线粒体通路。

综上所述,尽管缺血预处理的心肌保护作用是被公认的,但是由于其操作上的难度在临床应用上并不可行。本研究发现 Dex 作为一种围手术期常用的辅助麻醉与镇静镇痛药,具有减少心肌 L/R 损伤作用,且该心肌保护作用可能与

Dex 促进心肌缺血前 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 的开放,抑制再灌注早期 mPTP 的开放有关。这一发现为心血管手术中预处理心肌保护药物的选择提供了新思路,Dex 在作为麻醉药的同时,亦可能是一种有效且易于实施的抗心肌 L/R 损伤的预处理药物。

References:

- [1] BRAUNWALD E, KLONER R A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? [J]. *J Clin Invest*, 1985, 76(5): 1713-1719.
- [2] KATARE R G, ANDO M, KAKINUMA Y, et al. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 137(1): 223-231.
- [3] WIJEYSUNDERA D N, NAIK J S, BEATTIE W S. Alpha-2 adrenergic agonists to prevent perioperative cardiovascular complications: a meta-analysis [J]. *Am J Med*, 2003, 114(9): 742-752.
- [4] OKADA H, KURITA T, MOCHIZUKI T, et al. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts [J]. *Resuscitation*, 2007, 74(3): 538-545.
- [5] GUO H, TAKAHASHI S, CHO S, et al. The effects of dexmedetomidine on left ventricular function during hypoxia and reoxygenation in isolated rat hearts [J]. *Anesth Analg*, 2005, 100(3): 629-635.
- [6] HALESTRAP A P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die [J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 4(Pt 2): 232-237.
- [7] GAO Q, PAN H Y, QIU S, et al. Atractyloside and 5-hydroxydecanoate block the protective effect of puerarin in isolated rat heart [J]. *Life Sci*, 2006, 79(3): 217-224.
- [8] WONG E S, MAN R Y, VANHOUTTE P M, et al. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different $\{\alpha\}$ 2-adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 335(3): 659-664.
- [9] ARCANGELI A, D'AL C, GASPARI R. Dexmedetomidine use in general anaesthesia [J]. *Curr Drug Targets*, 2009, 10(8): 687-695.
- [10] TERASHIMA Y, SATO T, YANO T, et al. Roles of phospho-GSK-3 β in myocardial protection afforded by activation of the mitochondrial K ATP channel [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(5): 762-770.