

右美托咪定预处理对缺血再灌注损伤大鼠心肌线粒体功能的影响

陆沁源, 邵东华*

(江苏大学附属人民医院麻醉科, 江苏 镇江 212002)

[摘要] 目的: 观察右美托咪定预处理对心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)大鼠线粒体功能的影响, 探讨其对缺血再灌注心肌的保护作用。方法: 将 30 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 3 组: 假手术组(A), MIRI 组(B), MIRI+右美托咪定组(C)。采用结扎冠脉左前降支的方法建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型, 通过心脏超声检测大鼠心功能的变化, real-time PCR 检测线粒体功能相关基因 mRNA 水平的表达。透射电镜观察心肌线粒体超微结构。结果: 与 A 组相比, B 组和 C 组心肌功能受损, 线粒体功能相关基因 mRNA 表达均降低($P < 0.05$); 与 B 组相比, C 组心肌功能损伤减轻, 线粒体功能相关基因 mRNA 表达水平明显增加($P < 0.05$)。与 A 组相比, B 组线粒体超微结构损伤显著; 与 B 组相比, C 组线粒体损伤程度明显减轻。结论: 右美托咪定预处理可以减轻缺血再灌注所致心肌线粒体功能损伤, 改善心肌功能, 发挥保护心肌作用。

[关键词] 右美托咪定; 心肌缺血再灌注损伤; 线粒体

[中图分类号] R542.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)10-1198-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20161010

Effects of dexmedetomidine preconditioning on mitochondrial function in rats with myocardial ischemia reperfusion injury

Lu Qinyuan, Shao Donghua*

(Department of Anesthesiology, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of dexmedetomidine preconditioning on mitochondrial function of myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI), and to explore the protective effect of dexmedetomidine preconditioning on myocardium with ischemia and reperfusion injury. **Methods:** A total of 30 healthy male Sprague Dawley (SD) rats, aged 8 weeks, were randomly divided into three groups: the sham operation group (group A), the myocardial ischemia-reperfusion group (group B), and the dexmedetomidine preconditioning group (group C). The model of myocardial ischemia reperfusion injury was performed by ligation of the left anterior descending coronary artery. Cardiac functions were detected by echocardiography. The expression of the mRNA levels associated with mitochondrial function was performed by real-time PCR. Ultrastructure of myocardial mitochondria was observed under electronic microscope. **Results:** Compared with group A, the cardiac function of group B and group C were markedly decreased; the mRNA levels of genes related to mitochondrial function were significantly lower in group B and group C than that in group A ($P < 0.05$). Compared to group B, the cardiac function of group C was enhanced; the mRNA levels of genes related to mitochondrial function were higher in group C than in group B ($P < 0.05$). We also found that impaired mitochondrial ultrastructure was observed in group B. Compared with group B, impaired mitochondrial structure was significantly improved in group C. **Conclusion:** Dexmedetomidine preconditioning could improve mitochondrial function to alleviate myocardial ischemia reperfusion injury.

[Key words] dexmedetomidine; myocardial ischemia reperfusion injury; mitochondria

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(10): 1198-1201]

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 是指缺血心肌恢复血供后出现更为严重的心肌功能损伤, 是临床麻醉工作中

[基金项目] 镇江市社会发展基金(Sh2014087)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sdhjsdxsrmmy@126.com

常见的病理生理过程, 尤其心脏手术中多见。

右美托咪定是高选择性肾上腺素 α_2 受体激动剂, 具有镇痛、镇静及抗焦虑等作用, 广泛应用于临床工作中^[1-2]。有研究表明右美托咪定对缺血再灌注心肌有保护作用^[3], 但具体机制未完全阐明。

本研究通过建立大鼠缺血再灌注模型,通过预处理右美托咪定,观察其对缺血再灌注大鼠心脏收缩功能及大鼠心肌线粒体结构和功能的影响,旨在探讨右美托咪定对 MIRI 的保护作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠,体重 230~250 g,由江苏大学实验动物中心提供。右美托咪定(江苏恒瑞医药股份有限公司),TRIzol(Invitrogen 公司,美国),real-time RT-PCR 试剂盒(Roche 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组

选取雄性 SD 大鼠 30 只,随机分为假手术组(A),MIRI 组(B),MIRI+右美托咪定组(C),每组各 10 只。

1.2.2 缺血再灌注大鼠模型建立

大鼠腹腔注射 5%水合氯醛(10 mL/kg),麻醉成功后固定于操作台。尾静脉置管,MIRI+右美托咪定组予以右美托咪定预处理,先予以 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 负荷剂量,然后以 5 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 持续输注 1 h,假手术组和 MIRI 组给予等体积生理盐水输注 1 h。预处理结束后,开胸,暴露心脏及冠状动脉,结扎左冠状动脉前降支 30 min 后,松解结扎部位,将心脏放回胸腔内,消毒,缝合皮肤。以心电图示 ST 段升高为 MIRI 造模成功标志。假手术组仅穿线而未结扎。

1.2.3 心功能检测

术后 2 周行超声心动图检查。腹腔注射 5%水合氯醛麻醉后仰卧位固定,胸部备皮,对大鼠行超声心动图检查:左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室舒张末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd)、左室收缩末内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESd)。

1.2.4 real-time PCR 检测

造模成功,心功能检测完成后猝死大鼠,每组分别各取 5 只大鼠心脏,分离左心室心尖部心肌组织。过氧化物酶体增殖激活受体 γ 共激活因子 1- α (peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1- α , PGC1- α)、超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2, Sod2) 和柠檬酸合成酶(citrate synthase, Cs) 基因在维护线粒体功能中发挥重要作用。通过 real-time PCR 检测这些基因 mRNA 表达的变化。TRIzol 法提取总 RNA,逆转录为 cDNA 后行

real-time PCR 扩增。以 ABI 7900 系统实时定量检测荧光强度,读取 C_T 值并采集熔解曲线, C_T 值 ≥ 40 为阴性,分别记录目的基因和内参基因的 C_T 值。基因表达差异采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算, ΔC_T =待测样品目的基因的 C_T 值-待测样品内参的 C_T 值,每组实验重复 3 次。引物序列见表 1。各处理组 C_T 值/对照组 C_T 值,计算出各自相对值进行作图。

表 1 各引物序列见下表

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'→3')
Sod2	上游 TGGACAAACCTGAGCCCTAA
	下游 GACCCAAAGTCACGCTTGATA
Cs	上游 GCACGCCAGTGCTTCTTC
	下游 CATGCTGCTGTCTGAAGGTC
PGC1- α	上游 CCAAACCCACAGAGAACAGAA
	下游 TCTGGGGTCAGAGGAAGAGA
GAPDH	上游 GCATGGCCTTCCGTGTTCTACC
	下游 GCCGCTGCTTCACCACCTTCT

1.2.5 透射电镜观察

大鼠猝死,立即切取心尖部心肌组织,低温下将心肌组织切成数块体积为 1.0 mm³ 左右组织块,立即置入 5%戊二醛固定液中,经过固定、漂洗、脱水、浸渍、包埋、超薄切片处理,最后 50~80 nm 的超薄切片置于透射电子显微镜下观察心肌线粒体超微结构的变化。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,所有实验结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同处理组心功能的变化

心脏超声记录不同处理组大鼠心功能的变化。造模成功后,超声心动图检测结果提示:MIRI 组和 MIRI+右美托咪定组 LVEDd 和 LVESd 均高于假手术组(表 2),LVEF 均低于假手术组($P < 0.05$),且 MIRI+右美托咪定组 LVEDd 和 LVESd 均明显小于

表 2 不同处理组心功能的变化

Table 2 Changes of cardiac function in each group

($\bar{x} \pm s, n=10$)

指标	假手术组	MIRI 组	MIRI+右美托咪定组
LVEDd(cm)	0.51 \pm 0.12	0.79 \pm 0.19*	0.62 \pm 0.10**
LVESd(cm)	0.28 \pm 0.10	0.64 \pm 0.17*	0.50 \pm 0.14**
LVEF(%)	85.13 \pm 7.11	46.09 \pm 5.43*	59.86 \pm 5.27**

与假手术组比较,* $P < 0.05$;与 MIRI 组比较,** $P < 0.05$ 。

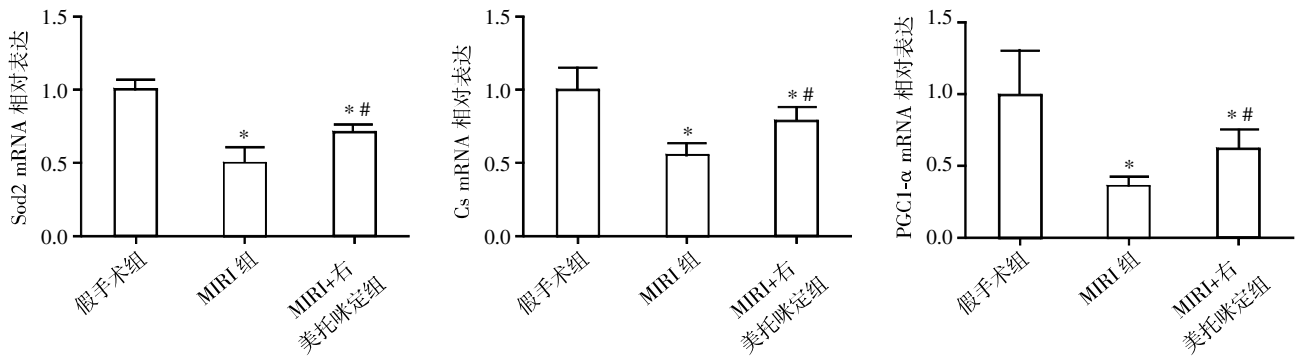
MIRI组,LVEF明显高于MIRI组(表2)。

2.2 不同处理组线粒体功能的变化

与假手术组相比,MIRI组和MIRI+右美托咪定组PGC1- α 、Sod2以及Cs基因mRNA表达水平均明显降低(图1);与MIRI组相比,MIRI+右美托咪定组PGC1- α 、Sod2和Cs基因mRNA表达水平均显著升高(图1)。

2.3 不同处理组心肌线粒体超微结构的变化

假手术组线粒体内外膜完整,无肿胀,线粒体嵴清晰、排列规整,基质电子密度正常;MIRI组线粒体内外膜结果破裂,失去完整性,线粒体肿胀,线粒体嵴数目明显减少、结构紊乱,基质电子密度明显降低;MIRI+右美托咪定组线粒体结构轻度损伤,损伤程度较缺血再灌注组显著减轻(图2)。



与假手术组比较,* $P < 0.05$;与MIRI组比较,* $P < 0.05$ ($n = 5$)。

图1 Real-time PCR检测线粒体功能相关基因Sod2、Cs和PGC1- α 的mRNA表达

Figure 1 mRNA expression of mitochondrial function related genes Sod2, Cs and PGC1- α by real-time PCR

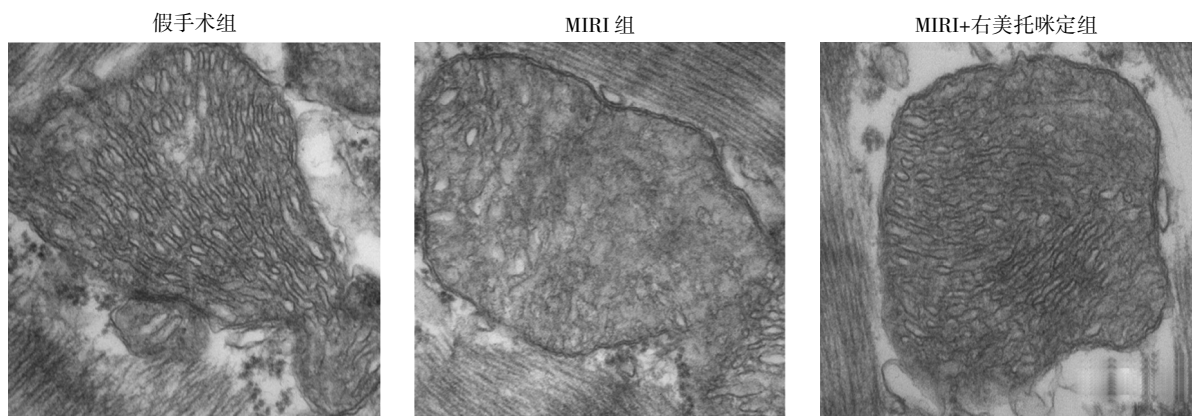


图2 透射电镜观察不同处理组心肌线粒体超微结构的改变($\times 100\ 000$)

Figure 2 Changes of mitochondrial ultrastructure in each group observed by electronic microscope($\times 100\ 000$)

3 讨论

缺血再灌注损伤是指在各种原因引发心肌缺血后,再次获得灌注血流期间出现严重的心脏结构和功能损伤^[4-5]。缺血再灌注后可致心肌细胞凋亡增多,心肌梗死面积增大,加重心脏功能损伤。本研究亦表明:缺血再灌注下,心肌功能受损,表现为左室射血分数降低,左室舒张末内径、左室收缩末内径增加。大量研究表明,吸入性麻醉药物如七氟醚、安氟醚、异氟醚等可以通过影响活性氧和蛋白酶途径、 K_{ATP} 通道的开放以及炎症因子的释放及细胞凋亡的影响,减轻组织细胞的缺血再灌注损伤^[6-9]。右美托咪定是临床

广泛应用的新型静脉麻醉药物。研究表明:右美托咪定预处理可上调心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌Bcl-2蛋白表达和下调Bax蛋白表达,发挥抗凋亡作用;可以减少炎症因子(如TNF- α 、IL-6)的释放,从而减轻缺血再灌注下心肌细胞的损伤^[3]。本研究主要探究了右美托咪定预处理对缺血再灌注损伤大鼠心肌线粒体结构和功能的影响。

线粒体是合成ATP的最主要细胞器,是细胞存活的主要能量来源。PGC-1 α 是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1(PGC1)家族成员,研究表明PGC1- α 可以增加线粒体呼吸,提高线粒体的氧化能力,降低ROS的毒性作用和促进组织细胞的代谢

平衡^[10-13];Cs是一种调控酶,参与三羧酸循环^[14];Sod2主要负责清除超氧阴离子自由基,抵抗自由基对细胞的损伤作用^[15]。上述3种基因水平与线粒体功能密切相关。本研究发现:缺血再灌注损伤下这些基因 mRNA 表达水平均明显降低,线粒体超微结构损伤,提示线粒体功能受损;而右美托咪定预处理,可能通过提高 PGC1- α 、Cs 以及 Sod2 基因 mRNA 表达,如 PGC1- α 的高表达可以促进线粒体的合成和提高线粒体氧化能力等^[12],从而起到减轻线粒体结构和功能损伤,达到改善心肌功能的作用。当然,右美托咪定通过何种途径调节这些基因的表达需要后续实验进一步探究。

综上所述,本研究发现缺血再灌注下,心脏收缩功能受损、线粒体结构和功能损伤;右美托咪定预处理可以减轻缺血再灌注所致线粒体的损伤,改善心肌功能。这一发现为临床使用右美托咪定预防 MIRI 提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Devasya A,Sarpangala M. Dexmedetomidine:A review of a newer sedative in dentistry [J]. *J Clin Pediatr Dent*, 2015,39(5):401-409
- [2] Schnabel A,Meyer-Friessem CH,Reichl SU, et al. Is intraoperative dexmedetomidine a new option for postoperative pain treatment? A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Pain*, 2013, 154(7): 1140-1149
- [3] Cai Y,Xu H,Yan J, et al. Molecular targets and mechanism of action of dexmedetomidine in treatment of ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2014,9(5): 1542-1550
- [4] Turer AT,Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(3):360-368
- [5] Hausenloy DJ,Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury;a neglected therapeutic target [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1):92-100
- [6] Agarwal B,Dash RK,Stowe DF, et al. Isoflurane modulates cardiac mitochondrial bioenergetics by selectively attenuating respiratory complexes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1837(3):354-365
- [7] Frässdorf J,De Hert S,Schlack W. Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. *Br J Anaesth*, 2009, 103(1):89-98
- [8] Muntean DM,Ordodi V,Ferrera R, et al. Volatile anaesthetics and cardioprotection:lessons from animal studies [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013,27(1):21-34
- [9] Van Allen NR,Krafft PR,Leitzke AS, et al. The role of Volatile Anesthetics in Cardioprotection;a systematic review [J]. *Med Gas Res*, 2012,2(1):22
- [10] Austin S,St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism-emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125 (Pt 21):4963-4971
- [11] Wu Z,Puigserver P,Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999,98(1): 115-124
- [12] Gerhart-Hines Z,Rodgers JT,Bare O, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α [J]. *EMBO J*, 2007,26(7):1913-1923
- [13] 韩勇,沙杜鹃,顾双双,等. 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 辅激活因子-1 α 对氧-糖剥夺神经元存活率及活性氧水平影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013,33(3):323-326
- [14] Sienkiewicz-Porzucek A,Nunes-Nesi A,Sulpice R, et al. Mild reductions in mitochondrial citrate synthase activity result in a compromised nitrate assimilation and reduced leaf pigmentation but have no effect on photosynthetic performance or growth [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(1): 115-127
- [15] Peterman EM,Sullivan C,Goody MF, et al. Neutralization of mitochondrial superoxide by superoxide dismutase 2 promotes bacterial clearance and regulates phagocyte numbers in zebrafish [J]. *Infect Immun*, 2015,83(1): 430-440

[收稿日期] 2016-04-22