

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01026

西维来司钠对犬缺血再灌注损伤心肌线粒体的保护作用

Protective effect of sivelestat sodium on canine myocardial mitochondria during ischemia/reperfusion injury

张筑华¹, 章建平¹, 方 华^{1,2*}, 王泉云², 王儒蓉²

1. 贵州省人民医院麻醉科, 贵阳 550002
2. 四川大学华西医院麻醉科, 成都 610041

[摘要] **目的** 探讨中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)抑制剂西维来司钠对体外循环(CPB)中犬缺血再灌注损伤心肌线粒体功能的保护作用。**方法** 12只犬随机分为对照组(C组, $n=6$)和西维来司钠组(S组, $n=6$), 建立CPB心肌缺血再灌注损伤模型。S组于CPB前静脉注射西维来司钠(40 mg/kg), C组静脉注射等量生理盐水。分别于CPB前、阻断主动脉60 min和开放主动脉60 min时, 测定血浆NE、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度以及心肌线粒体三磷酸腺苷(ATP)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)含量、髓过氧化物酶(MPO)水平、线粒体肿胀度(MSD)和线粒体含量。于CPB前和开放主动脉30、60 min时测定血流动力学指标。**结果** S组在阻断主动脉60 min和开放主动脉60 min时ATP、SOD、GSH-Px、T-AOC、MSD和线粒体含量均高于C组($P<0.01$), 而NE、IL-1 β 、TNF- α 、MDA和MPO均低于C组($P<0.01$)。与CPB前相比, 开放循环后C组CO、CI和SV均下降($P<0.01$); S组在开放30 min时CO、CI和SV均降低($P<0.05$), 在开放60 min时CO、CI和SV均恢复至CPB前水平。开放循环期间S组CO、CI和SV均高于同期C组($P<0.01$)。**结论** 西维来司钠可明显提高犬缺血再灌注损伤心肌线粒体抗氧化能力, 改善心肌能量代谢。

[关键词] 西维来司钠; 心肌线粒体; 体外循环

[中图分类号] R 615 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-1026-03

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)过程中活化中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)释放的中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)介导的全身性炎症反应及脂质过氧化反应是引起心肌线粒体功能障碍的主要因素之一^[1], 明显影响转流后心脏功能的恢复。本研究在CPB前静脉注射NE抑制剂西维来司钠, 观察犬心肌线粒体功能的变化, 探讨其对缺血再灌注损伤心肌线粒体的保护作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 西维来司钠和三磷酸腺苷(ATP)标准品(美国Sigma公司); 犬中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、IL-1 β 、TNF- α 定量ELISA试剂盒(法国Diacclone公司); 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 实验分组及动物模型的建立 成年健康杂种犬12只(四川大学实验动物中心提供), 体质量12~18 kg, 雌雄不限, 手术当日晨禁食, 随机分为对照组(C组, $n=6$)和西维来司钠组(S组, $n=6$)。两组动物腹腔内注射2.5%戊巴比妥钠25 mg/kg麻醉, 气管内插管后连接呼吸机行机械通气, 经

右股动、静脉插管作动脉压(ABP)、中心静脉压(CVP)监测, 右颈内静脉插入5F四腔Swan-Ganz漂浮导管。两组动物均模拟临床开胸, 连接Sarns 5000型人工心肺机(美国3M公司)及科威97型鼓泡式氧合器动、静脉管道(以复方氯化钠及羟乙基淀粉各500 ml预充)建立CPB心肌缺血再灌注模型; 转机流量为60~80 ml/(min·kg), 血液温度维持在28~30℃, 稳定转机5 min后阻断升主动脉, 主动脉根部灌入4℃ St. Thomas停搏液(10 ml/kg), 阻断升主动脉60 min, 开放升主动脉后观察循环情况60 min。S组于CPB前5 min经静脉注射西维来司钠40 mg/kg, C组经静脉注射等量生理盐水。

1.3 观察指标 分别于CPB前、阻断60 min和开放60 min时采集静脉血。采用ELISA法定量测定静脉血浆NE、IL-1 β 和TNF- α 浓度。分别于CPB前、阻断60 min和开放60 min时分别取左心室前壁心肌, 一部分置超声匀浆器中, 4℃下用生理盐水制成10%组织匀浆, 600×g离心5 min, 取上清液于-80℃冰箱冻存, 采用LC-10AVP型高效液相色谱仪(日本岛津公司)HPLC法测定ATP; 一部分进行电镜检查, 参照Flameng等^[2]分级法计算心肌细胞0~I级线粒体含量(%); 另一部分采用差速离心法提取心肌线粒体^[3]; 心肌组织块称质量后, 按1:9(W/V)加入分离液(包括0.225

[收稿日期] 2010-07-26 **[接受日期]** 2010-09-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30672260), 贵州省科技厅基金(黔科合J字20092314)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672260) and Foundation of Science and Technology Department of Guizhou Province [Qiankehe J zi(20092314)]。

[作者简介] 张筑华, 副教授、副主任医师。E-mail: zhangzhuhua1964@yahoo.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0851-5937110, E-mail: succiniter@hotmail.com

mol/L D-mannitol, 0.075 mol/L sucrose, 0.05 mol/L EDTA, 10 mol/L Tris-HCl, pH 7.4), 置于 0~4℃ 冰浴中的烧杯内, 快速剪碎心肌组织块, 以超声匀浆器匀浆, 600×g 4℃ 低温离心 5 min, 取上清液, 分离液悬浮沉淀, 再次超声匀浆, 600×g 4℃ 低温离心 5 min, 重复 2 次。4 次离心所得到的上清液再以 10 000×g 4℃ 低温离心 10 min, 沉淀即为线粒体; 用分离液重悬后, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准品, 考马斯亮蓝法测定线粒体悬液蛋白浓度, 分别取 100 g/L 的线粒体 1 ml 测定 MPO 和 MDA, 分别取 10 g/L 的线粒体 50 μl 测定 SOD 和 GSH-Px。参照文献[4]测定线粒体悬液 520 nm 处光密度值, 作为线粒体肿胀的指标。NE、IL-1β、TNF-α、SOD、GSH-Px、MPO 和 MDA 按试剂盒操作说明测定。应用心脏电脑多功能监护仪(Sirecter-960 型)于 CPB 前、开放 30 min 及 60 min 时经 Swan-Ganz 漂浮导管热稀释法测定心输出量(cardiac output, CO), 并计算心脏指数(cardiac index, CI)和每搏量(stroke volume, SV)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用成组 *t* 检验, 组内比较采用配对 *t* 检验, 检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 NE、IL-1β、TNF-α、MPO 和 MDA 变化 结果(表 1)表明: 与 CPB 前相比, 阻断后各时点 C 组 NE、IL-1β、TNF-α、MPO 和 MDA 逐渐升高($P < 0.01$), 均在开放 60 min 时达最高值($P < 0.01$); S 组 NE、IL-1β、TNF-α、MPO 和 MDA 在阻断期间无明显升高, 开放后虽不同程度升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且与 C 组组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 心肌线粒体 ATP、GSH-Px、T-AOC、SOD、MSD 和 0~I 级线粒体含量变化 结果(表 1)表明: 线粒体肿胀引起其浊度降低, 表现为 520 nm 处光密度值下降。阻断 60 min 和开放 60 min 时 C 组 ATP、GSH-Px、T-AOC、SOD、MSD 和 0~I 级线粒体含量均较 CPB 前降低($P < 0.01$), 阻断 60 min 时 S 组 ATP、GSH-Px、T-AOC、SOD、MSD 和 0~I 级线粒体含量均较 CPB 前降低($P < 0.05$), S 组在开放 60 min 时 ATP、GSH-Px、T-AOC、SOD、MSD 和 0~I 级线粒体含量均恢复至 CPB 前水平。阻断 60 min 和开放 60 min 时 S 组 ATP、GSH-Px、T-AOC、SOD、MSD 和 0~I 级线粒体含量均高于 C 组($P < 0.01$)。

表 1 各组 NE、IL-1β、TNF-α、MPO、ATP、SOD、GSH-Px、T-AOC、MDA、MSD 和 0~I 级线粒体含量的变化

($n=6, \bar{x} \pm s$)

指 标	组别	CPB 前	阻断 60 min	开放 60 min
NE ρ_B /(ng · ml ⁻¹)	C	5.36 ± 1.72	57.28 ± 10.24**	85.46 ± 19.42**
	S	4.81 ± 1.56	7.65 ± 3.44△△	24.91 ± 8.19*△△
IL-1β ρ_B /(pg · ml ⁻¹)	C	49.72 ± 20.37	160.45 ± 32.74**	204.12 ± 41.57**
	S	53.16 ± 19.43	75.42 ± 21.36△△	108.62 ± 32.71**△△
TNF-α ρ_B /(pg · ml ⁻¹)	C	110.23 ± 22.19	160.48 ± 31.27**	243.71 ± 25.65**
	S	119.36 ± 24.52	128.15 ± 22.19△△	157.73 ± 28.64**△△
MDA m_B /(nmol · mg ⁻¹)	C	0.72 ± 0.07	3.57 ± 0.14**	5.62 ± 0.19**
	S	0.84 ± 0.08	1.12 ± 0.06△△	2.23 ± 0.07*△△
MPO z_B /(AU · g ⁻¹)	C	0.42 ± 0.36	3.48 ± 0.67**	5.86 ± 1.55**
	S	0.45 ± 0.74	0.51 ± 0.29△△	1.89 ± 0.65*△△
ATP (μ mol · g ⁻¹)	C	7.68 ± 0.52	3.86 ± 0.44**	4.92 ± 0.37**
	S	8.59 ± 0.76	6.57 ± 0.71*△△	7.96 ± 0.54△△
SOD z_B /(AU · mg ⁻¹)	C	8.25 ± 0.74	5.36 ± 0.39**	6.17 ± 0.54**
	S	8.67 ± 0.81	7.22 ± 0.72*△△	8.31 ± 0.63△△
GSH-Px c_B /(μ mol · L ⁻¹)	C	64.53 ± 20.49	36.83 ± 16.77**	40.28 ± 22.19**
	S	66.75 ± 19.54	49.47 ± 21.38*△△	62.32 ± 25.45△△
T-AOC z_B /(U · mg ⁻¹)	C	46.25 ± 9.53	27.52 ± 7.26*	14.59 ± 5.13**
	S	43.82 ± 7.34	35.61 ± 8.24*△△	41.27 ± 8.36△△
MSD	C	9.52 ± 2.18	6.71 ± 1.23**	3.51 ± 0.83**
	S	9.11 ± 1.85	7.93 ± 2.56*△△	8.84 ± 2.49△△
0~I 级线粒体含量(%)	C	98.15 ± 1.62	80.17 ± 2.65**	57.36 ± 9.42**
	S	97.39 ± 1.76	89.74 ± 3.08*△△	93.59 ± 5.41△△

C: 对照组; S: 西维来司钠组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 CPB 术前相比; △△ $P < 0.01$ 与 C 组相比

2.3 CO、CI、SV 的变化 结果(表 2)表明: 与 CPB 前比较, 开放循环后 C 组 CO、CI 和 SV 均下降($P < 0.01$); S 组在开放 30 min 时 CO、CI 和 SV 均较 CPB 前降低($P < 0.05$), 在开放 60 min 时 CO、CI 和 SV 均恢复至 CPB 前水平; 开放循环期间 S 组 CO、CI 和 SV 均高于同期 C 组($P < 0.01$)。

3 讨论

CPB 期间心肌线粒体功能障碍与活化 PMN 引起的全身炎症反应及脂质过氧化反应密切相关^[5]。NE 是活化 PMN 释放的一种炎性因子, 过量释放时不仅能够引起组织

损伤,还可激活信号转导引起全身性炎症反应及脂质过氧化反应^[6]。联合测定 MPO 活性与 MDA 含量可准确反映组织内 PMN 的活化程度^[7]。IL-1 β 是主要由 PMN 合成分泌的一种促炎性细胞因子,可介导全身性炎症过程引起 PMN 与内皮细胞的黏附增加^[8]。TNF- α 的大量释放可激活细胞因

子级联反应,并通过破坏线粒体功能引起缺血后心肌细胞凋亡及心肌收缩功能障碍^[9]。心脏功能的维持有赖于充足的 ATP 供给,ATP 及 0~ I 级线粒体含量持续下降与术后心脏功能不全密切相关^[10]。

表 2 各组 CO、CI 和 SV 的变化

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

指标	组别	CPB 前	开放 30 min	开放 60 min
CO (L · min ⁻¹)	C	1.48 ± 0.11	0.62 ± 0.04 * *	0.77 ± 0.08 * *
	S	1.52 ± 0.13	0.81 ± 0.04 * $\Delta\Delta$	0.98 ± 0.09 $\Delta\Delta$
CI (L · min ⁻¹ · m ⁻²)	C	2.14 ± 0.18	1.22 ± 0.18 * *	1.13 ± 0.08 * *
	S	2.16 ± 0.21	1.85 ± 0.14 * $\Delta\Delta$	2.04 ± 0.25 $\Delta\Delta$
SV (ml/beat)	C	10.52 ± 1.35	5.39 ± 0.51 * *	8.64 ± 0.59 * *
	S	10.83 ± 0.76	8.15 ± 0.94 * $\Delta\Delta$	9.97 ± 0.73 $\Delta\Delta$

C: 对照组; S: 西维来司纳组。* P<0.05, ** P<0.01 与 CPB 术前相比; $\Delta\Delta$ P<0.01 与 C 组相比

本研究结果表明,CPB 期间不仅可引起循环 NE、IL-1 β 和 TNF- α 浓度明显升高,而且心肌缺血再灌注还可造成线粒体内 MPO 活力与 MDA 含量显著上升,与此同时,心肌线粒体肿胀程度明显增加且 0~ I 级线粒体含量、CO、CI 和 SV 显著降低。这说明 CPB 期间血液接触人工管道及心脏缺血再灌注等因素均可通过刺激 PMN 活化并大量释放 NE 产生多重效应,引起全身性炎症反应及脂质过氧化反应扩大,损害心肌线粒体结构,造成心输出量下降。

SOD、T-AOC 和 GSH-Px 水平可准确反映心肌线粒体氧化与抗氧化平衡状态^[11]。本研究结果表明,缺血再灌注过程中心肌线粒体 SOD、T-AOC 和 GSH-Px 水平明显降低,提示缺血再灌注心肌线粒体氧化与抗氧化状态的明显失衡可能延缓术后心脏功能恢复。

西维来司纳能够特异性抑制活化 PMN 释放 NE^[12]。本研究结果表明,CPB 前静脉注射西维来司纳 40 mg/kg 可降低循环 NE、IL-1 β 及 TNF- α 浓度,抑制缺血再灌注心肌线粒体内 MPO 活力与 MDA 含量增高,与此同时,还可增加心肌线粒体 SOD、T-AOC、GSH-Px、ATP 水平及心肌细胞 0~ I 级线粒体含量,减轻心肌线粒体肿胀程度并促进 CO、CI 和 SV 的迅速升高。结果提示 CPB 前静脉注射西维来司纳可能通过抑制心肌缺血再灌注过程中活化 PMN 释放 NE,以减少 IL-1 β 、TNF- α 、MPO 和 MDA 的产生及减轻其引起全身炎症反应及脂质过氧化反应,进而减少心肌线粒体内源性抗氧化物质(SOD、GSH-Px)的消耗,稳定心肌线粒体氧化与抗氧化平衡,从而促进 CPB 后心脏功能的快速恢复。

[参考文献]

[1] Akiyama D, Hara T, Yoshitomi O, Maekawa T, Cho S, Sumikawa K. Postischemic infusion of sivelestat sodium hydrate, a selective neutrophil elastase inhibitor, protects against myocardial stunning in swine[J]. J Anesth, 2010, 24: 575-581.
 [2] Flameng W, Borgers M, Daenen W, Stalpaert G. Ultrastructural and cytochemical correlates of myocardial protection by cardiac hypothermia in man[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1980, 79:

413-424.
 [3] Shlafer M, Gallagher K P, Adkins S. Hydrogen peroxide generation by mitochondria isolated from regionally ischemic and nonischemic dog myocardium[J]. Basic Res Cardiol, 1990, 85: 318-329.
 [4] Jung M E, Wilson A M, Ju X, Wen Y, Metzger D B, Simpkins J W. Ethanol withdrawal provokes opening of the mitochondrial membrane permeability transition pore in an estrogen-preventable manner[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 328: 692-698.
 [5] Civelek A, Roth M, Lemke P, Klövekorn W P, Bauer E P. Leukocyte-depleted secondary blood cardioplegia attenuates reperfusion injury after myocardial ischemia[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 51: 249-254.
 [6] Fujii M, Miyagi Y, Bessho R, Nitta T, Ochi M, Shimizu K. Effect of a neutrophil elastase inhibitor on acute lung injury after cardiopulmonary bypass [J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2010, 10: 859-862.
 [7] Stassano P, Di Tommaso L, Monaco M, Iesu S, Brando G, Buonpane S, et al. Myocardial revascularization by left ventricular assisted beating heart is associated with reduced systemic inflammatory response[J]. Ann Thorac Surg, 2009, 87: 46-52.
 [8] Sohn N, Marcoux J, Mycyk T, Krahn J, Meng Q. The impact of different biocompatible coated cardiopulmonary bypass circuits on inflammatory response and oxidative stress[J]. Perfusion, 2009, 24: 231-237.
 [9] Veres G, Radovits T, Otila G, Hirschberg K, Haider H, Krieger N, et al. Efficacy of the non-adenosine analogue A1 adenosine receptor agonist (BR-4935) on cardiovascular function after cardiopulmonary bypass[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2010, 58: 86-92.
 [10] French K J, Coatney R W, Renninger J P, Hu C X, Gales T L, Zhao S, et al. Differences in effects on myocardium and mitochondria by angiogenic inhibitors suggest separate mechanisms of cardiotoxicity[J]. Toxicol Pathol, 2010, 38: 691-702.
 [11] 方华, 李昌熙, 王泉云, 刘进, 左云霞. 吡咯烷二硫氨基甲酸酯对犬缺血-再灌注损伤心肌抗氧化作用的影响[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2008, 37: 193-197.
 [12] Wakayama F, Fukuda I, Suzuki Y, Kondo N. Neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, attenuates acute lung injury after cardiopulmonary bypass in the rabbit endotoxemia model [J]. Ann Thorac Surg, 2007, 83: 153-160.