

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0927-05

· 论著 ·

含毗那地尔心脏保存液的供心保存效果

梁伟涛, Vitali Rusinkevich, 藏旺福, 周健

(上海交通大学医学院附属瑞金医院心脏外科, 上海 200025)

[摘要] 目的 观察含不同浓度毗那地尔的心脏保存液对供心的保存效果。方法 40只SD大鼠根据供心保存方式随机分为正常对照组、Celsior液对照组、Celsior液+0.25 mmol/L毗那地尔组、Celsior液+0.5 mmol/L毗那地尔组和Celsior液+1 mmol/L毗那地尔组($n=8$)。建立Langendorff离体心脏灌注模型,离体心脏置各保存液中6 h,再灌注30 min,观察并比较各组心功能指标[左心室收缩末压(LVESp)、左心室发展压(LVDP)、冠脉流量(CF)、左心室内压最大上升速率(dp/dt_{max})和左心室内压最大下降速率(dp/dt_{min})]、心肌超微结构和心肌细胞凋亡指数。结果 与Celsior液对照组、Celsior液+0.25 mmol/L毗那地尔组和Celsior液+1 mmol/L毗那地尔组比较,Celsior液+0.5 mmol/L毗那地尔组大鼠供心LVESp、LVDP、CF、 dp/dt_{max} 和 dp/dt_{min} 显著提高($P<0.05$),心肌细胞凋亡指数显著降低($P<0.05$),且心肌细胞和线粒体结构较为完整。结论 与单纯Celsior心脏保存液相比,含0.5 mmol/L毗那地尔的Celsior心脏保存液能减少供心保存后心肌细胞的凋亡,促进心功能的恢复,改善供心低温保存的效果。

[关键词] 毗那地尔; 心脏保存; 心肌凋亡; 缺血再灌注损伤

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.013

[中图分类号] R654; R-332

[文献标志码] A

Effects of heart preservation solution containing Pinacidil on donor heart preservation

LIANG Wei-tao, Vitali Rusinkevich, ZANG Wang-fu, ZHOU Jian

(Department of Cardiac Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] Objective To observe the effects of heart preservation solution containing different concentrations of Pinacidil on donor heart preservation. Methods Forty SD rats were randomly divided into normal control group, Celsior solution control group, Celsior solution + 0.25 mmol/L Pinacidil group, Celsior solution + 0.5 mmol/L Pinacidil group and Celsior solution + 1 mmol/L Pinacidil group according to different ways of donor heart preservation, with 8 rats in each group. Langendorff model of isolated heart was established, and isolated hearts were preserved in preservation solutions for 6 h, followed by reperfusion for 30 min. The parameters of cardiac function such as left ventricular end-systolic pressure (LVESp), left ventricular development pressure (LVDP), coronary flow (CF), maximum rate of left ventricular pressure rise (dp/dt_{max}) and minimum rate of left ventricular pressure rise (dp/dt_{min}), myocardial ultrastructure and myocardiocyte apoptotic index were observed and compared among groups. Results Compared with Celsior solution control group, Celsior solution + 0.25 mmol/L Pinacidil group and Celsior solution + 1 mmol/L Pinacidil group, the parameters of LVESp, LVDP, CF, dp/dt_{max} and dp/dt_{min} significantly increased ($P<0.05$), the myocardiocyte apoptotic index significantly decreased ($P<0.05$), and the structures of myocardiocytes and mitochondria were intact in Celsior solution + 0.5 mmol/L Pinacidil group. Conclusion Compared with single Celsior heart preservation solution, Celsior heart preservation solution containing 0.5 mmol/L Pinacidil can decrease myocardiocyte apoptosis after donor heart preservation, promote recovery of cardiac function and improve the effects of hypothermic preservation of donor hearts.

[Key words] Pinacidil; heart preservation; cardiomyocyte apoptosis; ischemia-reperfusion injury

[基金项目] 2009年教育部博士点专项科研基金(20090073110086)(Foundation from the Ministry of Education of China, 20090073110086)。

[作者简介] 梁伟涛(1986—),男,硕士生;电子信箱:liang-weitao@hotmail.com。

[通信作者] 藏旺福,电子信箱:zangwf@hotmail.com。

目前临幊上用于原位心脏移植的供心保存时间局限于4 h,移植后患者的生存率随供心缺血时间的延长而降低^[1]。供心低温缺血保存移植后,会引起缺血再灌注损伤,诱发心肌细胞凋亡,从而影响移植后供心功能的恢复,降低供心低温保存效果^[2]。毗那地尔是一种非选择性ATP敏感性钾离子通道开放剂,其能引起细胞膜的超极化和线粒体膜的去极化,抑制细胞内钙超载及减少ATP消耗,保护心肌细胞和线粒体的完整性,从而起到保护心肌的作用^[3,4]。

研究^[3]显示,毗那地尔对短时间的心肌缺血具有保护作用。本研究延长供心保存时间至6 h,观察含不同浓度毗那地尔的心脏保存液对供心保存6 h后的心功能、心肌超微结构和心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物和分组 健康SD大鼠40只,体质量250~300 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物生产许可证号码:SCXK(沪)2007-0005,动物使用许可证号码:SYXK(沪)2008-0050。大鼠根据供心保存方式随机分为正常对照组、Celsior液对照组、Celsior液+0.25 mmol/L毗那地尔组、Celsior液+0.5 mmol/L毗那地尔组和Celsior液+1 mmol/L毗那地尔组,每组8只。

1.1.2 主要试剂 毗那地尔(Sigma);Celsior液(含KCl 15 mmol/L、MgCl₂ 13 mmol/L、CaCl₂ 0.25 mmol/L、甘露醇 60 mmol/L、乳酸钠 80 mmol/L、组氨酸 30 mmol/L、谷氨酸钠 20 mmol/L、谷胱甘肽 3 mmol/L),Krebs-Henseleit缓冲液(含NaCl 118.00 mmol/L、KCl 4.70 mmol/L、KH₂PO₄ 1.18 mmol/L、MgSO₄ 1.20 mmol/L、NaHCO₃ 24.50 mmol/L、葡萄糖 11.10 mmol/L、CaCl₂ 1.50 mmol/L),灌注前用95%O₂和5%CO₂平衡10 min,温度恒定于37 °C,压力保持于90~95 cmH₂O(1 cmH₂O=98.0665 Pa),pH值维持于7.35~7.45。

1.1.3 主要仪器 Langendorff离体心脏灌注模型;BL-420E生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);LKB V型超薄切片机,CM-120透射电子显微镜(Philips);pH计(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 离体心脏灌注模型的建立 大鼠称体质量,腹腔注射戊巴比妥钠(65 mg/kg)及肝素(1.4 U/g)。仰卧位固定,经胸骨正中切口暴露心脏,迅速于主动脉弓三大分支处离断主动脉,快速切取心脏,并立即

置于4 °C Krebs-Henseleit液中冷冻、漂洗以排尽心内残留血液,并修剪多余组织,游离出升主动脉。将主动脉连接至Langendorff灌注装置,用37 °C、持续通氧(95%O₂、5%CO₂)的Krebs-Henseleit液进行灌注,压力维持于90~95 cmH₂O,pH值维持于7.4左右。离体心脏复跳后,剪开肺动脉根部以降低右心室压力,随后剪开左心耳,将带传感器的球囊通过左心房插入左心室内,并向球囊内注入蒸馏水以维持左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure,LVEDP)于5~10 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。每个离体心脏均给予电刺激以维持心率在300次/min左右。灌注10 min后,记录左心室收缩末压(left ventricular end-systolic pressure,LVESP)、左心室发展压(left ventricular development pressure,LVDP)、冠脉流量(coronary flow,CF)、左心室内压最大上升速率(maximum rate of left ventricular pressure rise,dp/dt_{max})和左心室内压最大下降速率(minimum rate of left ventricular pressure rise,dp/dt_{min})。停止Krebs-Henseleit液灌注,立即改用4 °C、75 cmH₂O压力的心脏停搏液(与心脏保存液相同)灌注。灌注2~3 min后,离体心脏完全停搏,除正常对照组立即恢复再灌注30 min外,其余各组的离体心脏均完全浸泡于4 °C保存液中保存。保存6 h后取出并连接至Langendorff灌注装置进行再灌注30 min。

1.2.2 心功能检测 离体心脏低温保存6 h并再灌注30 min后,记录心功能各项指标,包括LVESP、LVDP、dp/dt_{max}、dp/dt_{min}和CF,检测方法同供心保存前。

1.2.3 心肌超微结构观察 离体心脏低温保存6 h并再灌注30 min后,各组随机切取左心室壁上的一块心肌组织,PBS冲洗后置于2.5%的戊二醛溶液中固定,PBS冲洗3次后再用1%锇酸固定,PBS冲洗后用4%的醋酸铀水溶液染色30 min,酒精逐级脱水、丙酮脱水,以无水丙酮与包埋剂按1:1混合渗透组织后用纯包埋剂包埋,60 °C聚合,经修块和超薄切片后,用4%的醋酸铀染色20 min,再用枸橼酸铅染色5 min,电子显微镜观察心肌超微结构的改变。

1.2.4 心肌细胞凋亡检测 离体心脏低温保存6 h并再灌注30 min后,切取左心室尖部全层心肌,10%甲醛固定、常规脱水、石蜡包埋、切片,TUNEL法检测心肌细胞凋亡。先将组织切片用二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,37 °C下用蛋白酶K处理30 min后再用

PBS 冲洗; 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液室温下孵育 30 min, PBS 冲洗后加入 FITC 荧光标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)的混合液, 37 ℃水浴箱中反应 60 min, PBS 冲洗; 加辣根过氧化物酶孵育 30 min (37 ℃), PBS 冲洗; DAB 显色(避光), 苏木精复染后脱水、封片。于光学显微镜下观察, 细胞核呈棕黄色或棕褐色者为染色阳性的凋亡细胞。每张切片随机选择 10 个视野, 计算凋亡指数(apoptotic index, AI)(凋亡细胞占细胞总数的百分比)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 心功能指标

各组平衡灌注末 LVESP、LVDP、dp/dt_{max}、dp/dt_{min} 和 CF 比较差异均无统计学意义($P > 0.05$) (表 1)。低温保存 6 h 后, 不同心脏保存液组各项指标均显著低于正常对照组($P < 0.05$); 其中, Celsior 液 + 0.5 mmol/L 毗那地尔组各项指标显著高于其他心脏保存液组($P < 0.05$), Celsior 液对照组各项指标显著低于其他心脏保存液组($P < 0.05$), 而 Celsior 液 + 0.25 mmol/L 毗那地尔组与 Celsior 液 + 1 mmol/L 毗那地尔组各项指标比较差异均无统计学意义($P > 0.05$) (表 2)。

表 1 各组平衡灌注末心功能指标比较($\bar{x} \pm s$, n=8)

Tab 1 Comparison of parameters of cardiac function in each group at the end of stabilization period ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	LVESP	LVDP	CF	dp/dt _{max}	dp/dt _{min}
正常对照组	133.05 ± 7.74	127.10 ± 8.20	8.54 ± 1.42	2 859 ± 263	1 854 ± 195
Celsior 液对照组	129.47 ± 6.15	122.60 ± 6.94	9.63 ± 1.06	2 618 ± 511	1 875 ± 265
Celsior 液 + 0.25 mmol/L 毗那地尔组	134.79 ± 9.50	128.55 ± 9.57	8.60 ± 1.78	2 850 ± 222	1 779 ± 276
Celsior 液 + 0.5 mmol/L 毗那地尔组	132.47 ± 6.36	125.99 ± 7.06	9.38 ± 1.03	2 863 ± 447	1 704 ± 253
Celsior 液 + 1 mmol/L 毗那地尔组	134.35 ± 6.22	128.50 ± 6.82	8.85 ± 0.92	2 915 ± 293	1 758 ± 217

注: 表中 LVESP 和 LVDP 的单位为 mmHg, CF 的单位为 mL/min, dp/dt_{max} 和 dp/dt_{min} 的单位为 mmHg/s。

表 2 各组不同保存液保存后心功能指标比较($\bar{x} \pm s$, n=8)

Tab 2 Comparison of parameters of cardiac function in each group after preservation with different preservation solutions ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	LVESP	LVDP	CF	dp/dt _{max}	dp/dt _{min}
正常对照组	132.17 ± 12.77 ^①	125.06 ± 12.94 ^①	9.38 ± 1.03 ^①	2 875 ± 348 ^①	1 946 ± 166 ^①
Celsior 液对照组	75.54 ± 8.23 ^①	69.87 ± 10.49 ^①	5.35 ± 0.62 ^①	1 696 ± 201 ^①	1 361 ± 178 ^①
Celsior 液 + 0.25 mmol/L 毗那地尔组	92.08 ± 8.03	85.30 ± 8.57	6.70 ± 1.67	1 986 ± 202	1 538 ± 120
Celsior 液 + 0.5 mmol/L 毗那地尔组	108.74 ± 9.44 ^①	103.10 ± 9.67 ^①	7.99 ± 1.15 ^①	2 323 ± 297 ^①	1 703 ± 166 ^①
Celsior 液 + 1 mmol/L 毗那地尔组	92.00 ± 17.92	85.47 ± 17.81	6.70 ± 1.42	1 975 ± 286	1 530 ± 152

注: 表中 LVESP 和 LVDP 的单位为 mmHg, CF 的单位为 mL/min, dp/dt_{max} 和 dp/dt_{min} 的单位为 mmHg/s。^① P < 0.05 与其余各组比较。

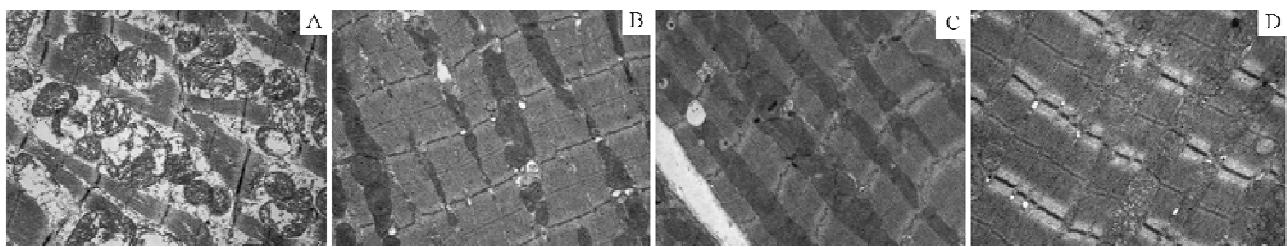
2.2 心肌超微结构

正常对照组心肌纤维排列整齐、未见断裂, 线粒体完整, 未见明显肿胀。Celsior 液对照组心肌纤维出现明显断裂及溶解, 线粒体明显肿胀, 线粒体嵴可见空泡变性; Celsior 液 + 不同浓度毗那地尔组心肌纤维排列整齐, 均未见明显断裂及破坏, 线粒体完整, 仅有少量线粒体肿胀, 线粒体嵴清晰(图 1)。

2.3 心肌细胞凋亡

心肌凋亡细胞的细胞核内有分布均匀的棕褐色或棕黄色颗粒, 体积 ≤ 正常细胞核, 凋亡细胞呈孤立、散在分布(图 2)。正常对照组、Celsior 液对照组、Celsior 液 + 0.25 mmol/L 毗那地尔组、Celsior 液 +

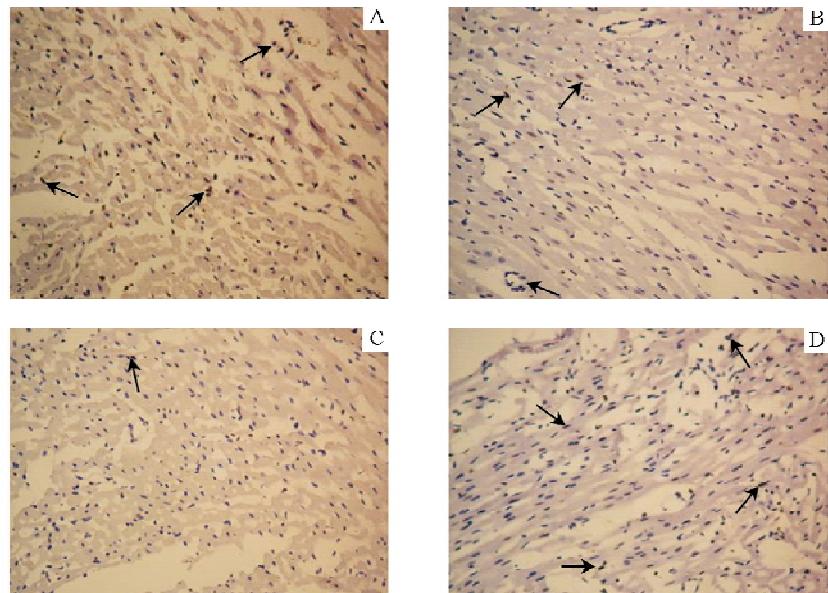
0.5 mmol/L 毗那地尔组和 Celsior 液 + 1 mmol/L 毗那地尔组的 AI 分别为 4.38 ± 1.74、24.76 ± 2.23、10.46 ± 3.86、6.25 ± 3.27、10.33 ± 3.69; 统计学分析结果显示: Celsior 液对照组、Celsior 液 + 0.25 mmol/L 毗那地尔组和 Celsior 液 + 1 mmol/L 毗那地尔组的 AI 均显著高于正常对照组和 Celsior 液 + 0.5 mmol/L 毗那地尔组($P < 0.05$), 而正常对照组与 Celsior 液 + 0.5 mmol/L 毗那地尔组的 AI 比较差异无统计学意义($P > 0.05$); Celsior 液对照组的 AI 显著高于其他各组($P < 0.05$), 而 Celsior 液 + 0.25 mmol/L 毗那地尔组与 Celsior 液 + 1 mmol/L 毗那地尔组的 AI 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A. Celsior 液对照组；B. Celsior 液 + 0.25 mmol/L 吡那地尔组；C. Celsior 液 + 0.5 mmol/L 吡那地尔组；D. Celsior 液 + 1 mmol/L 吡那地尔组。

图 1 电子显微镜观察各组低温保存 6 h 后的心肌超微结构 $\times 13\,500$

Fig 1 Ventricular myocardial ultrastructure in each group observed by electronmicroscopy after hypothermic preservation for 6 h $\times 13\,500$



A. Celsior 液对照组；B. Celsior 液 + 0.25 mmol/L 吡那地尔组；C. Celsior 液 + 0.5 mmol/L 吡那地尔组；D. Celsior 液 + 1 mmol/L 吡那地尔组；箭头所示为心肌凋亡细胞。

图 2 各组低温保存 6 h 后心肌凋亡检测 TUNEL $\times 400$

Fig 2 Detection of cardiomyocyte apoptosis after hypothermic preservation for 6 h in each group TUNEL $\times 400$

3 讨 论

ATP 敏感性钾离子通道广泛分布于心肌细胞膜和线粒体膜上,两种钾离子通道在心肌保护中均起着重要的作用^[5]。尽管有研究^[4]表明,细胞膜 ATP 敏感性钾离子通道在缺血预处理中起着主要作用,但许多研究者^[3,5,6]仍认为,线粒体 ATP 敏感性钾离子通道开放才是缺血预处理产生的主要机制。当敲除细胞膜 ATP 敏感性钾离子通道表达基因后,小鼠心脏对缺血预处理的敏感性降低,说明细胞膜和线粒体膜上的 ATP 敏感性钾离子通道在心肌保护方面具有协同作用^[7]。

吡那地尔是非选择性 ATP 敏感性钾离子通道开放剂,能使心肌细胞膜超极化并使线粒体膜去极化,从而抑制其余离子通道的激活及减少低温条件下 ATP 的进一步消耗,因而能使线粒体的结构及功能

保护完整,而保护线粒体的完整性则是防止缺血再灌注损伤的主要途径^[8]。本研究对心肌超微结构的观察也证实了含吡那地尔的 Celsior 保存液能较好地保护低温保存后心肌细胞和线粒体的完整性,供心保存时间可延长至 6 h,保存效果得到了提高。

线粒体膜 ATP 依赖性钾离子通道的开放,使得线粒体膜去极化,减少线粒体内的钙离子流入细胞质内,防止钙超载,也防止心肌细胞及线粒体水肿,维持了细胞膜及线粒体膜的稳定性,保护了生物膜磷脂中多聚不饱和脂肪酸免受大量氧自由基的攻击^[5,9],并且使心肌纤维及血管平滑肌的肌张力在缺血后得以降低^[10],ATP 的消耗也得以进一步降低,这都对供心缺血再灌注后心功能及 CF 的恢复提供了极大帮助。本研究表明,与单纯的 Celsior 保存液相比,即使经过 6 h 的低温保存,含吡那地尔的 Celsior 保存液仍能提高供心保存后的 CF 及左心室收缩

功能。

心肌凋亡是缺血再灌注损伤后心肌功能无法恢复的原因之一。本研究采用经典的 TUNEL 检测方法,在 4 ℃低温保存 6 h 后发现,单纯用 Celsior 液保存供心,再灌注后的心肌凋亡数量相对较多,而加入毗那地尔后,其再灌注后的心肌凋亡数量则相对减少。研究^[9]显示,心肌凋亡的机制中涉及两种中心途径:外部死亡受体途径和内部线粒体途径。在内部线粒体途径中,钙超载是其中心环节,是诱发细胞凋亡的原因之一,抑制钙超载能降低心肌再灌注后心律失常和心功能低下的发生率^[11]。Bcl-2 家族和 Caspases 家族是最主要的凋亡控制基因,Bcl-2 基因家族包括两大类:抑制凋亡的基因(Bcl-2 等)和促进凋亡的基因(Bax 等)。Caspases 是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,凋亡的最后实施是通过 Caspases 的激活而实现的。Caspase-3 是 Caspases 级联反应中下行的最关键的凋亡执行蛋白酶,在各种程序启动的凋亡程序中起最后枢纽的作用。Caspases 通常以无活性的酶原形式存在,只有线粒体释放细胞色素 C 到细胞质内激活 Caspases 才能获得活性而发挥作用^[9,12]。毗那地尔能有效减少钙离子超载,抑制促凋亡基因 Bax 等的表达并上调抑凋亡基因 Bcl-2 的表达,阻止细胞色素 C 在线粒体内的释放,抑制 Caspase-3 的激活,从而抑制缺血再灌注后心肌细胞的凋亡,起到保护心功能的作用^[12]。

有研究者^[3]在心脏停搏液中加入毗那地尔,观察发现毗那地尔具有较好的心肌保护效果,但由于离体心脏缺血时间较短,并不能为临幊上延长供心保存时间提供有力依据。本研究在 Celsior 保存液中加入毗那地尔,将离体心脏保存时间延长至 6 h,再灌注 30 min 后,其心肌细胞及线粒体均较完整,且 AI 也明显降低,CF 及左心室收缩功能等均有所提高,对改善供心低温保存效果有所帮助,这对于临幊上延长供心保存时间有重要的指导意义,而毗那地尔改善供心保存效果的确切机制仍有待进一步研究阐明。

〔参考文献〕

- [1] Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 221–235.
- [2] Valen G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(2): S656–S660.
- [3] Yang L, Yu T. Prolonged donor heart preservation with pinacidil: the role of mitochondria and the mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channel[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 139(4): 1057–1063.
- [4] Gross CJ, Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(3): H921–930.
- [5] Testai L, Rapposelli S, Calderone V. Cardiac ATP-sensitive potassium channels: a potential target for an anti-ischaemic pharmacological strategy[J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2007, 5(1): 79–90.
- [6] Moses MA, Addison PD, Neligan PG, et al. Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(2): H559–567.
- [7] Gok S, Vural K, Sekuri C, et al. Effects of the blockade of cardiac sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels on arrhythmias and coronary flow in ischemia-reperfusion model in isolated rat hearts[J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 44(4): 197–205.
- [8] Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(2): 181–188.
- [9] Crow MT, Mani K, Nam YJ, et al. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis[J]. *Circ Res*, 2004, 95(10): 957–970.
- [10] Yang Q, Zhang RZ, Yim AP, et al. Release of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in porcine coronary arteries exposed to hyperkalemia: effect of nicorandil[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 79(6): 2065–2071.
- [11] García-Rivas GJ, Torre-Amione G. Abnormal mitochondrial function during ischemia reperfusion provides targets for pharmacological therapy[J]. *Methodist Debakey Cardiovasc J*, 2009, 5(3): 2–7.
- [12] Zhang H, Song LC, Liu YY, et al. Pinacidil reduces neuronal apoptosis following cerebral ischemia-reperfusion in rats through both mitochondrial and death-receptor signal pathways [J]. *Neurosci Bull*, 2007, 23(3): 145–150.

〔收稿日期〕 2011-03-29

〔本文编辑〕 刘晓华