

# 线粒体 $K_{ATP}$ 通道介导远端缺血预处理对严重失血性休克大鼠在体心脏功能的保护作用

胡宪文 蒋玲玲 刘晓芬 吴云 李云 张野

**摘要** 目的 观察远端缺血预处理(RIPC)对严重失血性休克大鼠在体心脏功能的保护作用及其机制。方法 32只雄性SD大鼠,体重300~350g,随机分成4组:对照组(C组)、失血性休克组(S组)、RIPC组(R组)、RIPC+线粒体 $K_{ATP}$ 通道阻滞剂组(B组),每组8只。采用经大鼠颈动脉60min内放血占总血容量50%,观察30min后经颈静脉30min回输释放的血液建立严重失血性休克和复苏模型。在放血前双侧后肢以止血带捆绑阻断血流5min,再灌注5min,反复4个循环形成RIPC。B组在RIPC前15min经颈静脉注入线粒体 $K_{ATP}$ 通道阻滞剂(5-羟基萘酸盐)10mg/kg。C组所有手术操作同S组,但不放血。持续监测心电图、平均动脉压(MAP)到血液回输后2h,在放血前、放血后、输血前、输血后即刻、输血后1、2h用彩色超声仪测量心输出量(CO)、左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)、心肌做功指数(MPI)、左室后壁厚度(LVPWD)。结果 在失血和休克阶段,与C组比较,S组、B组和R组MAP、CO、LVEF、LVFS均降低( $P < 0.01$ ),MPI、LVPWD升高( $P < 0.01$ );血液回输后,与C组比较,R组MAP、CO、LVEF、LVFS、MPI、LVPWD差异无统计学意义;与R组比较,S组和B组MAP、CO、LVEF、LVFS明显降低( $P < 0.01$ ),MPI、LVPWD明显升高( $P < 0.01$ );S组和B组各心脏功能指标差异无统计学意义。结论 RIPC明显保护严重失血性休克大鼠在体心脏功能,其保护作用可能与线粒体 $K_{ATP}$ 通道激活有关。

**关键词** 远端缺血预处理;失血性休克;心功能;线粒体 $K_{ATP}$ 通道

中图分类号 R 605.971; R 654.2; R 971.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0735-04

术中出血是大手术尤其选择性血管外科手术的常见并发症,严重术中出血会导致失血性休克,使围术期死亡率增加到5%~8%<sup>[1]</sup>。尽管液体复苏是治疗失血性休克的主要方法,但失血性休克和复苏可导致心肌的缺血再灌注损伤,直接影响心脏功能<sup>[2]</sup>。有报道<sup>[3-6]</sup>显示远端缺血预处理(remote ische-

mic preconditioning, RIPC)对缺血再灌注心肌具有保护作用,然而RIPC是否能够减轻严重失血性休克与复苏导致的心肌缺血再灌注损伤,从而维护心脏功能,目前国内外尚无报道。该研究旨在观察RIPC对在体大鼠失血性休克与复苏后心脏功能的影响,为临床应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 药品和仪器** 戊巴比妥(Virbac AH Inc,批号:E0149);5-羟基萘酸盐(美国Sigma公司,批号:SLBC7951V);抽血输血双向全自动输液泵(Genie Touch™,美国);动物呼气末 $CO_2$ 监测仪(End-Til IL 200,美国Midmark-Cardell公司);动物血压心电图监护仪(Series 7010 monitor,美国Marquette公司)。

**1.2 实验动物** 健康成年雄性SD大鼠32只,清洁级6月龄,体重300~350g,由Harlan实验中心提供,大鼠自由摄食进水,在室温( $22 \pm 1$ )℃,相对湿度( $50 \pm 5$ )%,光照/黑夜周期12h/12h环境中适应饲养1周后实验。术前12h禁食。

**1.3 动物分组** 32只大鼠随机分为4组(每组8只):对照组(C组)、失血性休克组(S组)、RIPC组(R组)、RIPC+线粒体 $K_{ATP}$ 通道阻滞剂组(B组)。经大鼠左颈动脉60min内放出血占总血容量50%,观察30min后经右颈静脉30min内回输放出的血液建立严重失血性休克与复苏模型<sup>[7]</sup>。C组所有手术操作同S组,但不放血。R组和B组在放血开始前双侧后肢以止血带捆绑阻断血流5min,松开5min,反复4次,每次捆绑以双后肢皮肤颜色改变及超声多普勒在捆绑下方听不到动脉波动为准<sup>[8]</sup>。B组在RIPC前15min经颈静脉注入线粒体 $K_{ATP}$ 通道阻滞剂(5-羟基萘酸盐)10mg/kg<sup>[9]</sup>。

**1.4 失血性休克和复苏模型制作** 大鼠麻醉前禁食8h,自由饮水。腹腔内注射戊巴比妥钠50mg/kg,麻醉后仰卧位固定在实验台上,气管内插管,保留自主呼吸。取颈正中切口,右颈静脉置管用于输血及测中心静脉压,左颈动脉插管用于放血及测动

2014-01-15 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:81200089)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院麻醉科,合肥 230601

作者简介:胡宪文,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

huxianwen001@126.com

脉压。经颈静脉给予肝素 200 U/kg 10 min 后,经颈动脉由抽血输血双向全自动输液泵(Genie Touch™, 美国)在 1 h 内持续放血,失血量占总血容量 50% (总血容量占体重 6.12%)<sup>[10]</sup>。观察 30 min 后,经颈静脉在 30 min 内回输放出的血液,建立失血性休克和复苏模型。所有动物持续监测心电图、平均动脉压(mean artery pressure, MAP)到血液回输后 2 h。待清醒拔除所有导管,缝合伤口,肌肉注射青霉素预防感染。采用烤灯照射维持直肠温约 37 ℃。待大鼠翻正反射恢复且完全清醒后放回笼中饲养。

**1.5 心功能测定** 在放血前、放血结束即刻、血液回输前、血液回输后即刻、回输后 1、2 h,采用 Vivid 彩色超声仪测量 3 个心动周期左心室舒张末期内径和左心室收缩末期内径,计算心输出量(cardiac output, CO)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimension, LVDs)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVDd), LVFS = (LVDd - LVDs) / LVDd。测量 3 个心动周期等容舒张时间(isovolumic relaxation time, IVRT)、等容收缩时间(isovolumic contraction time, IVCT)和射血时间(ejection time, ET),计算左心室心肌做功指数(myocardial power index, MPI), MPI = (IVCT + IVRT) / ET。测量 3 个心动周期左室后壁厚度(left ventricular posterior wall dimension, LVPWD)。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用单因素方差分析,组内不同时间点的均数比较采用反复测量的方差分析。

## 2 结果

**2.1 一般情况** 4 组大鼠 MAP、CO、LVEF、LVFS、LVPWD、MPI 在放血前基础值差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。4 组大鼠均经受了从放血开始到输血后 1 h 的实验过程,但在输血后 2 h 时,C 组有 8 只,R 组有 8 只,S 组剩余 6 只,B 组剩余 6 只。

**2.2 统计分析** 在不同时间点多组均数比较采用单因素方差分析的  $F$  值见表 1。

**2.3 心功能测定** 在失血和休克观察阶段,与 C 组比较,S 组、R 组和 B 组 MAP、CO、LVEF、LVFS 均降低( $P < 0.01$ ),MPI、LVPWD 升高( $P < 0.01$ );S

表 1 不同时间点多组均数比较单因素方差分析的  $F$  值

项目	放血前	放血后	输血前	输血后即刻	输血后 1 h	输血后 2 h
MAP	0.604	893.664	625.101	71.403	80.229	9.844
CO	1.093	251.699	310.966	96.762	148.295	114.315
LVEF	2.608	41.351	49.496	21.831	57.817	103.016
LVFS	0.035	39.071	35.631	21.504	28.117	34.379
LVPWD	0.189	10.338	12.758	19.484	16.447	48.748
MPI	0.214	68.701	37.739	66.102	149.598	237.392

组、R 组和 B 组 MAP、CO、LVEF、LVFS、MPI、LVPWD 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。血液回输后,与 C 组比较,S 组和 B 组 MAP、CO、LVEF、LVFS 均降低( $P < 0.01$ ),MPI、LVPWD 升高( $P < 0.01$ ),R 组和 C 组 MAP、CO、LVEF、LVFS、MPI、LVPWD 差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与 R 组比较,S 组和 B 组 MAP、CO、LVEF、LVFS 均降低( $P < 0.01$ ),MPI、LVPWD 升高( $P < 0.01$ );S 组和 B 组 MAP、CO、LVEF、LVFS、MPI、LVPWD 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

## 3 讨论

失血性休克是由于急性大量失血引起有效循环血量不足、急性微循环障碍、组织灌流不足,而导致组织与细胞缺血、缺氧、代谢障碍和器官功能受损为特征的综合征。虽然液体复苏是治疗休克的主要方法,休克后再灌注会加重组织细胞进一步损害<sup>[11]</sup>。报道<sup>[12]</sup>表明失血性休克和复苏引起的重要器官缺血再灌注损伤的严重程度与出血量和休克时间有关。早期实验<sup>[13]</sup>证实失血性休克会导致心脏收缩功能减退,近来学者<sup>[14]</sup>发现严重失血性休克后心脏舒张功能亦受损。本实验中失血性休克模型采用的失血量占总血容量的 50%,属于重度失血性休克,总的休克时间也超过 1 h,在回输血液后,多普勒心脏检测显示 S 组大鼠失血性休克和血液回输后 LVEF 和 LVFS 明显降低,MPI 和 LVPWD 明显升高,说明此时大鼠左心室收缩和舒张功能均明显受损。

研究<sup>[3-6]</sup>表明远端肢体缺血预处理对缺血再灌注的心肌起保护作用。本实验在失血性休克发生前,采用双后肢止血带捆绑阻断血流 5 min,松开 5 min,反复 4 次造成 RIPIC。失血性休克与复苏后,多普勒心脏检测显示 R 组 LVEF 和 LVFS 较 S 组明显升高,MPI 和 LVPWD 较 S 组明显降低,血液回输后血流动力学较 S 组更平稳,表明 RIPIC 保护了心肌,改善了心脏功能,从而提供较稳定的血流动力学。

表2 MAP和心功能指标在大鼠失血性休克和复苏中的变化( $\bar{x} \pm s$ )

项目	放血前	放血后	输血前	输血后即刻	输血后1 h	输血后2 h
MAP(kPa)						
C组	18.05 ± 0.67	17.72 ± 0.64	18.00 ± 0.72	18.12 ± 0.68	17.56 ± 0.39	17.65 ± 0.49
R组	17.87 ± 0.60	6.64 ± 0.36**	7.77 ± 0.76**	17.40 ± 0.89	16.79 ± 0.97	17.11 ± 0.60
B组	17.72 ± 0.87	6.15 ± 0.59**	6.85 ± 0.55**	13.28 ± 0.71***	12.21 ± 0.75***	11.43 ± 0.74***
S组	17.61 ± 0.59	6.36 ± 0.61**	9.53 ± 0.48**	13.72 ± 1.04***	12.28 ± 1.36***	11.55 ± 0.69***
CO(ml/min)						
C组	107.5 ± 1.9	105.1 ± 3.3	105.7 ± 3.5	104.3 ± 3.9	105.7 ± 2.2	103.3 ± 1.4
R组	107.6 ± 3.0	47.0 ± 6.5**	49.4 ± 5.4**	106.9 ± 8.6	101.5 ± 9.8	98.0 ± 9.7
B组	104.6 ± 5.7	43.4 ± 5.1**	44.1 ± 5.5**	68.3 ± 5.1***	62.3 ± 5.6***	58.3 ± 8.3***
S组	106.5 ± 3.3	43.0 ± 5.8**	43.4 ± 5.1**	69.0 ± 5.2***	60.4 ± 5.1***	52.9 ± 6.2***
LVEF(%)						
C组	71.0 ± 0.9	70.9 ± 0.6	71.5 ± 0.7	71.3 ± 0.6	70.8 ± 0.5	70.8 ± 0.4
R组	71.1 ± 1.4	61.2 ± 2.1**	61.8 ± 2.0**	70.0 ± 1.9	69.8 ± 1.6	69.7 ± 1.5
B组	70.4 ± 1.3	60.1 ± 2.2**	59.3 ± 3.2**	64.7 ± 3.4***	61.1 ± 2.7***	55.8 ± 3.8***
S组	69.5 ± 1.6	61.8 ± 3.1**	60.6 ± 2.2**	63.8 ± 2.3***	59.3 ± 3.0***	53.0 ± 3.6***
LVFS(%)						
C组	34.1 ± 3.8	33.2 ± 2.6	33.5 ± 3.4	33.4 ± 3.2	33.5 ± 3.0	33.4 ± 3.2
R组	34.4 ± 3.5	24.8 ± 2.2**	24.2 ± 2.3**	33.2 ± 3.0	32.4 ± 3.2	32.3 ± 3.1
B组	34.7 ± 3.1	23.6 ± 1.8**	23.1 ± 1.7**	25.1 ± 1.7***	24.0 ± 2.2***	22.7 ± 2.4***
S组	34.5 ± 3.6	23.1 ± 1.8**	22.9 ± 2.0**	25.8 ± 2.6***	24.5 ± 2.2***	23.3 ± 2.3***
LVPWD(cm)						
C组	0.203 ± 0.029	0.201 ± 0.032	0.199 ± 0.028	0.200 ± 0.023	0.201 ± 0.032	0.203 ± 0.029
R组	0.211 ± 0.014	0.280 ± 0.052**	0.270 ± 0.048**	0.218 ± 0.020	0.215 ± 0.019	0.218 ± 0.020
B组	0.204 ± 0.022	0.271 ± 0.040**	0.305 ± 0.045**	0.280 ± 0.028***	0.304 ± 0.042***	0.312 ± 0.024***
S组	0.205 ± 0.030	0.327 ± 0.055**	0.325 ± 0.051**	0.291 ± 0.040***	0.291 ± 0.047***	0.307 ± 0.023***
MPI						
C组	0.69 ± 0.03	0.70 ± 0.04	0.69 ± 0.03	0.69 ± 0.04	0.70 ± 0.03	0.70 ± 0.02
R组	0.69 ± 0.03	1.07 ± 0.06**	1.01 ± 0.12**	0.74 ± 0.06	0.72 ± 0.06	0.70 ± 0.04
B组	0.68 ± 0.02	1.14 ± 0.07**	1.16 ± 0.12**	1.10 ± 0.08***	1.23 ± 0.07***	1.35 ± 0.07***
S组	0.69 ± 0.04	1.13 ± 0.07**	1.11 ± 0.05**	1.03 ± 0.10***	1.25 ± 0.10*#	1.32 ± 0.10*#

与C组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与R组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

远端肢体缺血预处理对缺血再灌注后心肌保护作用的机制复杂,有学者<sup>[15]</sup>认为线粒体  $K_{ATP}$  通道参与了其中的保护作用。线粒体  $K_{ATP}$  通道通过3个机制发挥脏器保护作用<sup>[16]</sup>: ① 促使线粒体膜去极化,减少再灌注期间  $Ca^{2+}$  的摄取和  $Ca^{2+}$  浓度; ② 保存缺血期间 ATP, 减低电压依赖性离子通道活性; ③ 减少再灌注期间活性氧的产生。在本研究中,在远端肢体缺血预处理前给予线粒体  $K_{ATP}$  通道阻滞剂后,多普勒心脏彩超结果显示,远端肢体缺血预处理的心脏保护作用完全被抑制,说明线粒体  $K_{ATP}$  通道参与了远端肢体缺血预处理的心脏功能的保护作用。

综上所述,在失血性休克和复苏大鼠在体模型中,RIPC减轻心肌缺血再灌注损伤,改善心脏功能,其心肌保护作用可能与其激活线粒体  $K_{ATP}$  通道有关。

## 参考文献

- [1] Copeland G P, Jones D, Walters M. POSSUM: a scoring system for surgical audit [J]. Br J Surg, 1991, 78(3): 355-60.
- [2] Flaherty D C, Hoxha B, Sun J, et al. Pyruvate-fortified fluid resuscitation improves hemodynamic stability while suppressing systemic inflammation and myocardial oxidative stress after hemorrhagic shock [J]. Mil Med, 2010, 175(3): 166-72.
- [3] Surendra H, Diaz R J, Harvey K, et al. Interaction of  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors with adenosine A1 receptors mediates cardioprotection by remote ischemic preconditioning [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 60: 142-50.
- [4] Wong G T, Lu Y, Mei B, et al. Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation [J]. Life Sci, 2012, 91(17-18): 860-5.
- [5] Hajrasouliha A R, Tavakoli S, Ghasemi M, et al. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 579(1-3): 246-52.

- [6] Szijártó A , Czigány Z , Turóczy Z , et al. Remote ischemic preconditioning—a simple , low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: models , protocols and mechanistic background [J]. *A Review J Surg Res* , 2012 , 178( 2) : 797 – 806.
- [7] Cammarata G A , Weil M H , Fries M , et al. Buccal capnometry to guide management of massive blood loss [J]. *J Appl Physiol* , 2006 , 100( 1) : 304 – 6.
- [8] Kristiansen S B , Henning O , Kharbanda R K , et al. Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a  $K_{ATP}$  channel dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 288( 3) : H1252 – 6.
- [9] 赵 翠 ,董海龙 ,熊利泽 ,等. 线粒体 ATP 敏感性钾离子通道参与远程预处理对大鼠脑保护作用的机制 [J]. *第四军医大学学报* 2007 28( 18) : 1633 – 5.
- [10] Fang X , Tang W , Sun S , et al. Comparison of buccal microcirculation between septic and hemorrhagic shock [J]. *Crit Care Med* , 2006 , 34( 12 Suppl) : S447 – 53.
- [11] Nandra K K , Takahashi K , Collino M , et al. Acute treatment with bone marrow-derived mononuclear cells attenuates the organ injury/dysfunction induced by hemorrhagic shock in the rat [J]. *Shock* , 2012 37( 6) : 592 – 8.
- [12] Horton J W , McDonald G. Heart and brain nucleotide pools during hemorrhage and resuscitation [J]. *Am J Physiol* , 1990 , 259 ( 6Pt2) : H1781 – 8.
- [13] Shahani R , Klein L V , Marshall J G , et al. Hemorrhage-induced alpha-adrenergic signaling results in myocardial TNF-alpha expression and contractile dysfunction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* , 2001 , 281( 1) : H84 – 92.
- [14] Suzuki K , Ogino R , Nishina M , et al. Effects of hypertonic saline and dextran 70 on cardiac functions after burns [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* , 1995 , 268( 2Pt2) : H856 – 64.
- [15] Sato T , Sasaki N , Seharaseyon J , et al. Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels in ischaemic cardioprotection [J]. *Circulation* , 2000 , 101( 20) : 2418 – 23.
- [16] Ardehali H , O' Rourke B. Mitochondrial  $K_{ATP}$  channels in cell survival and death [J]. *J Mol Cell Cardiol* , 2005 , 39( 1) : 7 – 16.

## Remote ischemic preconditioning improves cardiac dysfunction via mitochondrial $K_{ATP}$ channel activation in vivo rat model of severe hemorrhagic shock

Hu Xianwen , Jiang Lingling , Liu Xiaofen , et al

( Dept of Anesthesiology , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the effects of remote ischemic preconditioning on cardiac dysfunction *in vivo* rat model of severe hemorrhagic shock and its potential mechanism. **Methods** Thirty-two male Sprague-Dawley rats , weighting 300 ~ 350 g , were randomized into four groups: control ( C ) group; shock ( S ) group; Remote ischemic preconditioning ( R ) group; Remote ischemic preconditioning with mitochondrial  $K_{ATP}$  channel blocker ( B ) group. Hemorrhagic shock and resuscitation were induced by reduction of 50% of total blood volume over an interval of 1 hour , 30 mins after bleeding , reinfusion was initiated with the shed blood over the ensuing 30 mins. RIPC was performed by four cycles of 5 mins of limbs ischemia followed by reperfusion for 5 mins. The mitochondrial  $K_{ATP}$  channel blocker ( 5-hydroxydeconate ) was injected into the right atrium fifteen minutes before the initiation of RIPC. The procedure in control group was the same as shock group but not bleeding. Electrocardiogram and mean artery pressure ( MAP ) were continuously measured to 2 h after reinfusion. Cardiac function was measured by echocardiography at baseline , after bleeding , before reinfusion , after reinfusion and at hourly intervals after reinfusion. **Results** Compared with C group , MAP , CO , LVEF , LVFS were significantly decreased and MPI , LVPWD were significantly increased in R , S and B groups (  $P < 0.01$  ) during hemorrhagic and shock phase. After reinfusion , MAP , CO , LVEF , LVFS , MPI , LVPWD were not different between R group and C group. Compared with R group , MAP , CO , LVEF , LVFS were significantly decreased and MPI , LVPWD were significantly increased in S group than B group (  $P < 0.01$  ) . There were no differences of cardiac function indexes between S group than B group. **Conclusion** RIPC obviously improves cardiac dysfunction *in vivo* rat following severe hemorrhagic shock and resuscitation , the result is associated with the activation of mitochondrial  $K_{ATP}$  channel.

**Key words** remote ischemic preconditioning; hemorrhagic shock; cardiac function; mitochondrial  $K_{ATP}$  channel