·基础研究·

紫外线照射充氧自体血心脏停搏液对犬体外循环手术时心肌线粒体的影响

周涛　秦国伟　向道康

【摘　要】 **目的**　研究紫外线照射充氧自体血(UBIO)心脏停搏液对犬体外循环(CPB)心内直视手术时心肌线粒体的影响。**方法**　选取 20 只雄性杂交犬,按随机数字表法将其分为对照组和 UBIO 心脏停搏液组(UBIO 组),每组 10 只。建立犬 CPB 心内直视手术模型,CPB 中对照组使用普通含血心脏停搏液,实验组采用 UBIO 心脏停搏液。在阻断升主动脉前和开放升主动脉后,分别从冠状静脉窦取血,检测血清心肌肌钙蛋白 I(cTnI)和肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平。在打开和关闭右心房时,分别取右心房组织标本,采用化学比色法检测组织匀浆线粒体超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及丙二醛(MDA)含量,同时测定心肌线粒体膨胀度。**结果**　阻断升主动脉前,2 组犬 cTnI、CK-MB 含量之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。在开放升主动脉后,对照组 cTnI、CK-MB 含量高于 UBIO 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。打开右心房时,2 组犬心肌组织匀浆 SOD 活性、GSH-Px 活性和 MDA 含量之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。关闭右心房时,2 组犬心肌组织匀浆 SOD 活性、GSH-Px 活性低于打开右心房时的 SOD 活性、GSH-Px 活性($P<0.05$)。2 组犬关闭右心房时的 MDA 含量均高于组内打开右心房时的 MDA 含量($P<0.05$)。关闭右心房时,UBIO 组心肌组织匀浆 SOD 活性[(34.1±5.1)KNU/g]、GSH-Px 活性[(44.2±7.4)kat/g]高于对照组 SOD 活性[(20.5±4.3)KNU/g]、GSH-Px 活性[(32.7±6.3)kat/g],MDA 含量[(6.9±1.2)mol/L]低于对照组[(9.5±1.9)mol/L]($P<0.05$)。UBIO 组线粒体膨胀度改变较小。**结论**　CPB 心内直视手术时存在心肌线粒体清除氧自由基能力下降及线粒体本身脂质过氧化反应,UBIO 心脏停搏液可以保持线粒体清除氧自由基的能力,并减轻线粒体本身的受攻击程度,较好地维持线粒体结构与功能,减轻心肌损伤。

【关键词】 心肺转流术;　紫外线照射充氧自体血;　心肌保护;　线粒体

Effect of cardioplegia solution of autologous blood treated with ultraviolet irradiation and oxygenation on myocardial mitochondrion in mongrel dogs underwent open heart surgery under cardiopulmonary bypass

*ZhouTao**, *Qin Guowei*, *Xiang Daokang*. **Department of Cardiac Surgery*, *Guizhou Provincial People's Hospital*, *Guiyang 550002*, *China*

Corresponding author: *Xiang Daokang*, *Email*: *xiangdaokang@vip.sina.com*

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effect of cardioplegia solution of autologous blood treated with ultraviolet irradiation and oxygenation (UBIO) on myocardial mitochondrion in mongrel dogs underwent open heart surgery under cardiopulmonary bypass (CPB). **Methods**　Twenty male mongrel dogs were randomly divided into a control group and a UBIO group, 10 dogs in each group. The UBIO group was infused with UBIO blood as the cardiac arresting solution via the ascending aorta, while the control group was given the same treatment except that the cardiac arresting solution was blood cardioplegia. Blood samples were taken from coronary venous sinus before cross-clamping and after aorta declamping to measure the levels of cardiac troponin I (cTnI) and creatinine kinase MB isozyme (CK-MB). For both groups, right atrial myocardial tissue samples were taken to detect the activity of myocardial mitochondrion superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-PX), and concentrations of malondialdehyde (MDA) when the right atrium was opened and closed. **Results**　In both groups, the average levels of SOD and GSH-PX were decreased during CPB, and the decrease of SOD and GSH-PX were to a significantly larger extent in UBIO group ($P<0.05$). The concentrations of cTnI, CK-MB, and MDA in the control group were increased significantly higher than those in the UBIO group ($P<0.05$). **Conclusion**　The attenuated lipid peroxidation of myocar-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2015.09.004

基金项目:贵州省自然科学基金[黔科合 J 字(2013)2175 号]

作者单位:550002 贵阳,贵州省人民医院心脏外科(周涛、向道康);广西壮族自治区人民医院心电诊断科(秦国伟)

通信作者:向道康,Email:xiangdaokang@vip.sina.com

dial mitochondria plays an important role in myocardial protection by UBIO as cardioplegia solution in open heart surgery under CPB.

【Key words】 Cardiopulmonary bypass; Ultraviolet blood irradiation and oxygenation; Myocardial protection; Mitochondrion

紫外线照射充氧血(ultraviolet blood irradiation and oxygenation,UBIO)回输是一种将自身抗凝血经一定波长的紫外线照射处理后再回输体内的方法[1]。UBIO 在临床上已广泛应用并取得了肯定的疗效。本课题前期的动物实验研究发现,添加 UBIO 的心脏停搏液能明显减轻缺血再灌注损伤时心肌组织的脂质过氧化反应,减轻手术过程中的心肌能量失衡,有较好的心肌保护效果[2]。但其具体机制尚未完全明确。心肌缺血再灌注损伤过程中存在能量代谢障碍,线粒体是机体能量产生的主要场所,线粒体结构及功能正常是维持能量正常代谢的关键因素,心肌缺血再灌注损伤可能与线粒体功能变化密切相关[3-5]。UBIO 心脏停搏液对心肌的保护作用是否与减轻线粒体损伤有关尚需进一步研究。本研究通过建立犬体外循环(cardiopulmonary bypass,CPB)心内直视手术模型,研究 UBIO 心脏停搏液对心肌细胞线粒体脂质过氧化反应的影响,旨在进一步了解 UBIO 停搏液的心肌保护机制。

材料与方法

一、实验动物与分组

选取 15 ~ 20 kg 健康成年雄性杂种犬 20 只(购自广西医科大学实验动物中心),采用随机数字表法将犬随机分为对照组和 UBIO 心脏停搏液组(UBIO 组),每组 10 只。本研究中动物处理符合相关动物伦理学标准。

二、设备与试剂

河南产 ZWG-B2 光子氧液体治疗仪,上海产抗凝血袋,北京产 K501919 型激活全血凝固时间(activated clotting time of whole blood,ACT)检测仪,上海产 MHJ-ⅡC 型麻醉机,美国产 SH-ISTAT 型血气分析仪,美国产 PB840 型呼吸机,美国产 Coulter STKS 型全自动血细胞分析仪,日本产日立 CR21 型高速冷冻离心机,日本产日立 Z8000 型塞曼效应原子吸收分光光度仪,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)和丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,德国产 1010 型电化学免疫发光仪,日本产 7170A 型全自动生化分析仪。

三、动物模型建立

模型建立前,适应性喂养 1 周,使用咪唑安定(0.1 mg/kg)、异丙酚(1.5 mg/kg)和维库溴铵(0.1 mg/kg)进行麻醉,行气管插管,机械通气,潮气量15 ml/kg,呼吸频率 16 次/min,术中复合全身麻醉维持,成功建立 CPB、完成心内操作、顺利撤除 CPB 视为动物模型建立成功。2 组犬采用相同的预充液及血液稀释标准,CPB 采用相同器材。使用 3 mg/kg 肝素全身肝素化,肝素化后通过锁骨下静脉按 10 ml/kg 体重放出自体血,同时从外周静脉途径输入等量生理盐水,UBIO 组立即用 ZWG-B2 型光子氧液体治疗仪行紫外线照射(波长 240 ~ 300 nm)5 min[6]。配置心脏停搏液,对照组血液无特殊处理,装入抗凝血袋静置 5 min 后用于配置心脏停搏液。向 2 组犬血液中加入 10% 氯化钾和 5% 碳酸氢钠,使氯化钾浓度达 23 ~ 24 mmol/L,PH 为 7.6 ~ 7.8[2]。

2 组犬均采用胸部正中切口入路,在升主动脉根部插主动脉灌注管,右心耳及下腔静脉分别插上、下腔静脉引流管,常规建立 CPB,于右上肺静脉汇入左房处插管建立左心引流,手术过程中先阻断上、下腔静脉,切开右心房,再阻断升主动脉,根据分组不同,术中主动脉根部顺行灌注不同的心脏停搏液,对照组使用普通含血心脏停搏液,UBIO 组采用 UBIO 心脏停搏液,首次剂量为 20 ml/kg,此后每 30 min 再予顺行灌注半量的心脏停搏液,术中维持鼻咽温度在 28 ℃ ~ 30 ℃,CPB 灌注流量为 60 ~ 80 ml/(kg · min),手术过程中平均动脉压维持在 60 ~ 80 mmHg(1 mmHg = 0.133 KPa)。心脏停跳后,切开房间隔组织,沿切缘剪成大小约 1.5 cm × 1.5 cm 的缺损,60 min 后使用大小合适的人工补片连续缝合修补人造房间隔缺损,逐渐复温,开放升主动脉,心脏复跳后,再缝合右心房切口,辅助循环后停机,常规给予鱼精蛋白中和肝素,监测 ACT,必要时追加鱼精蛋白。2 组犬的其他处理原则相同,术中适当使用多巴胺、肾上腺素、硝酸甘油等血管活性药物,以维持血流动力学平稳,术后常规处理。

四、标本收集与检测

切开右心房,阻断升主动脉前和开放升主动脉时,从 2 组犬冠状静脉窦取血,检测心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I,cTnI)和肌酸激酶同工酶(creatinine kinase MB isozyme,CK-MB)水平。术中切开右心房和关闭右心房时,取少许心肌组织,置于 -80 ℃超低温冰箱中保存待测。测定时,标本称重后按 1∶9 加冷分离液(蔗糖 0.25 mol/L、乙二胺四乙酸 0.001 mol/L、4-羟

乙基哌嗪乙磺酸 0.02 mol/L,PH 为 7.4)。快速剪碎心肌组织,电动匀浆器匀浆,离心半径 10.0 cm,3000 r/min,5 s,共 2 次,玻璃匀浆器匀浆 1 min,离心 10 min后取上清液,再离心 10 min,沉淀,加入分离介质,离心后沉淀分散介质。以上操作均于 4 ℃进行,线粒体分离于 1 h 内完成。使用 Lowry 法测定线粒体悬液蛋白浓度,调整浓度为 10 g/L。用透射电镜观察所提取的线粒体,发现其结构完整,纯度较高,可达到实验要求。采用化学比色法测定线粒体 SOD 活性、GSH-Px 活性及 MDA 含量,操作步骤按试剂盒说明书进行。测定线粒体悬液在 520 nm 处的吸光度值变化,作为评定线粒体肿胀程度的指标。

五、统计学分析

采用 SPSS 17.0 版软件进行统计学处理,数据以($\bar{x} \pm s$)形式表示,计量资料采用方差分析,计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结　果

一、2 组犬术中情况比较

2 组犬 CPB 转流时间、主动脉阻断时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组主动脉开放后心脏复跳率为 30%,UBIO 组心脏复跳率为 80%,差异有统计学意义($P<0.05$)。研究中,2 组犬无死亡,术后未出现低心输出量综合征、急性肾功能不全等严重并发症,20 例犬最后均纳入结果分析,中途无脱落。详见表 1。

表 1　2 组犬术中情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	体质量(kg)	CPB 转流时间(min)	主动脉阻断时间(min)	心脏自动复跳率(%)
对照组	10	17.2 ± 7.0	125.7 ± 16.5	82.5 ± 9.3	30
UBIO 组	10	16.5 ± 6.5	116.4 ± 14.2	80.7 ± 8.3	80[a]

注:与对照组比较,[a]$P<0.05$

二、2 组犬心肌损伤指标 cTnI、CK-MB 水平比较

切开右心房,阻断主动脉前,2 组犬心肌损伤指标 cTnI、CK-MB 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。开放主动脉后,2 组犬 cTnI、CK-MB 水平均较组内主动脉阻断前升高($P<0.05$)。与对照组主动脉开放后比较,UBIO 组犬 cTnI、CK-MB 水平显著较低,差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2。

三、2 组犬 SOD 活性、GSH-Px 活性及 MDA 含量比较

切开右心房时,2 组犬 SOD 活性、GSH-Px 活性及 MDA 含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。关闭右心房时,2 组犬 SOD 活性、GSH-Px 活性均低于组内打开右心房时($P<0.05$),MDA含量均高于组内打开右心房时($P<0.05$)。与对照组关闭右心房时比较,UBIO 组 SOD 活性、GSH-Px 活性明显较高($P<0.05$),MDA 含量显著较低($P<0.05$)。详见表 3。

表 2　2 组犬心肌损伤指标 cTnI、CK-MB 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	cTnI(ng/ml)	CK-MB(U/L)
对照组			
主动脉阻断前	10	6.7 ± 0.9	22.5 ± 3.1
主动脉开放后	10	18.4 ± 3.6[a]	72.9 ± 6.8[a]
UBIO 组			
主动脉阻断前	10	6.4 ± 0.8	20.7 ± 2.9
主动脉开放后	10	10.5 ± 2.1[ab]	42.5 ± 5.4[ab]

注:与组内主动脉阻断前比较,[a]$P<0.05$;与对照组主动脉开放后比较,[b]$P<0.05$

四、2 组犬心肌线粒体膨胀程度比较

切开右心房时,2 组犬心肌线粒体膨胀程度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。关闭右心房时,2 组犬心肌线粒体膨胀程度均低于组内打开右心房时($P<0.05$),且 UBIO 组心肌线粒体膨胀程度显著高于对照组($P<0.05$)。详见表 3。

表 3　2 组犬心肌线粒体 SOD 活性、GSH-Px 活性、MDA 含量及膨胀程度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SOD 活性(KNU/g)	GSH-Px 活性(kat/g)	MDA 含量(mol/g)	膨胀程度
对照组					
切开右心房时	10	46.6 ± 5.9	54.3 ± 9.4	2.6 ± 0.7	7.9 ± 1.2
关闭右心房时	10	20.5 ± 4.3[a]	32.7 ± 6.3[a]	9.5 ± 1.9[a]	3.9 ± 0.7[a]
UBIO 组					
切开右心房时	10	47.2 ± 6.1	57.8 ± 10.3	2.5 ± 0.6	8.1 ± 1.4
关闭右心房时	10	34.1 ± 5.1[ab]	44.2 ± 7.4[ab]	6.9 ± 1.2[ab]	6.2 ± 0.9[ab]

注:与组内切开右心房时比较,[a]$P<0.05$;与对照组关闭右心房时比较,[b]$P<0.05$

讨　论

CPB 支持下的心内直视手术多是在心脏停跳状态下完成的,该过程导致的心肌缺血再灌注损伤是引发心内直视手术后心功能不全等并发症的主要原因之一。因此,手术中良好的心肌保护对减少 CPB 心内直视手术并发症非常重要。目前,使用心脏停搏液是保护心肌的主要方式之一。本课题组前期研究中曾将 UBIO 添加到传统的停搏液中,动物实验和临床研究证实 UBIO 对组织器官有较好的保护作用,但其作用机制尚不十分清楚[2,7]。

线粒体是清除氧自由基酶系统活力的重要部位之一。本研究中,切开右心房时,2 组犬 SOD 活性、GSH-Px 活性和 MDA 含量之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。关闭右心房时,2 组犬心肌组织匀浆 SOD 活性、GSH-Px 活性低于组内打开右心房时,MDA 含量高于组内打开右心房时($P<0.05$)。在关闭右心

房时,UBIO 组 SOD 活性、GSH-Px 活性高于对照组($P<0.05$),MDA 含量低于对照组($P<0.05$)。提示 CPB 可能会引起心肌线粒体清除氧自由基的能力下降,同时诱发线粒体发生脂质过氧化反应。与对照组比较,UBIO 组可以较好地维持线粒体功能,减轻 CPB 引起的线粒体脂质过氧化反应。

线粒体是三磷酸腺苷产生的重要场所,是决定细胞损伤程度、显示损伤能否可逆的关键细胞器,也是反映心肌细胞损伤程度的敏感指标之一[8]。CPB 过程中,心肌存在缺血缺氧、能量代谢障碍,线粒体功能受损,氧自由基生成较多,与此不相匹配的是组织内源性自由基清除能力下降,进而引起氧自由基的产生与清除平衡失调,导致体内大量自由基蓄积。线粒体功能障碍是缺血再灌注损伤时氧自由基的主要来源之一[7]。线粒体 SOD、GSH-Px 可以反映其清除氧自由基的能力,UBIO 组心肌组织氧的供应与消耗处于较好的平衡状态,因此,线粒体功能受影响较小,较好地保持了清除氧自由基的能力,同时线粒体也是氧自由基攻击的主要目标之一,氧自由基能使线粒体膜脂质过氧化,对其功能造成影响,加重心肌能量失衡[9]。MDA 可以反映线粒体自身脂质过氧化反应的程度[7,9]。线粒体受攻击程度减轻,其结构和功能受到的影响就会减小,最终将直观地体现在心肌线粒体膨胀度的改变上。本研究发现,2 组犬反映心肌损伤的指标 cTnI、CK-MB 水平较阻断升主动脉前升高,UBIO 组升主动脉开放后 cTnI、CK-MB 水平低于对照组,提示 UBIO 可更好地保护心肌[10-11]。

本研究中,2 组犬所用停搏液的主要区别在于停搏液中的血液是否为 UBIO。有研究表明,经过紫外线照射处理 1 min 后的血液氧含量与血液在空气中氧合 20 ~ 30 h 后的氧含量相当,紫外线照射 5 min 后氧合血红蛋白达到最高饱和状态,血氧饱和度达最高水平[6]。因此,在心脏手术过程中,使用 UBIO 心脏停搏液能以高于常规心脏停搏液多倍的氧含量灌注缺血缺氧心肌,减轻心肌氧及能量的供需失衡,减轻组织缺氧程度。Dong 等[12]研究表明,UBIO 可减少兔神经系统损伤后自由基的产生量。动物研究发现,UBIO 可以提高机体的抗氧化能力[13]。UBIO 心脏停搏液能拮抗缺血再灌注损伤心肌组织的脂质过氧化反应,有较好的心肌保护效果[2]。有研究报道,UBIO 对机体的治疗作用并非是由紫外线直接作用于机体所引起,而是通过被照射血与未被照射血接触后获得[14]。

综上所述,UBIO 心脏停搏液可以减轻犬 CPB 心内直视手术时心肌线粒体的脂质过氧化反应,提示在 CPB 中使用 UBIO 心脏停搏液可以有效保持心肌线粒体清除氧自由基的能力,减少氧自由基产生,减轻线粒体本身的受攻击程度,较好地维持线粒体功能,从而减轻心肌的缺血再灌注损伤。

参 考 文 献

[1] 夏爱军,张献清,穆士杰,等. 紫外线照射充氧自血回输对家兔光气急性中毒肝脏自由基损伤保护作用的研究[J]. 临床血液学杂志, 2012, 25(2):77-92.

[2] 向道康,柏隆书,涂丽萍,等. 紫外线照射充氧自体血心脏停搏液对体外循环中心肌保护作用的研究[J]. 山东医药,2006,46(2):7-9.

[3] Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole[J]. Cardiovasc Res,2006,70(2):191-199.

[4] Horstkotte J, Perisic T, Schneider M,et al. Mitochondrial thioredoxin reductase is essential for early post-ischemic myocardial protection [J]. Circulation,2011,124 (25):2892-2902.

[5] Wanagat J, Dai DF, Rabinovitch P. Mitochondrial oxidative stress and mammalian health span[J]. Mech Ageing Dev, 2010,131(7-8):527-535.

[6] 刘克娥,孙平. 自血光量子紫外线充氧回输疗法对慢性肺心病患者血液流变学的影响[J]. 中国临床康复,2002,6(21):3217.

[7] 周涛,向道康,周亮贤,等. 老年人工生物瓣膜置换过程中紫外线照射充氧血首次灌注对心肌的保护[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(39): 7703-7706.

[8] Forini F, Nicolini G, Iervasi G. Mitochondria as key targets of cardioprotection in cardiac ischemic disease: role of thyroid hormone triiodothyronine[J]. Int J Mol Sci,2015, 16(3):6312-6336.

[9] Yao HC, Yang LJ, Han QF,et al. Postconditioning with simvastatin decreases myocardial injury in rats following acute myocardial ischemia [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(4):1166-1170.

[10] Lurati Buse GA, Koller MT, Grapow M, et al. The prognostic value of troponin release after adult cardiac surgery-a meta-analysis[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010,37(2): 399-406.

[11] Froese NR, Sett SS, Mock T,et al. Does troponin-I measurement predict low cardiac output syndrome following cardiac surgery in children [J]. Crit Care Resusc, 2009,11(2): 116-121.

[12] Dong Y, Shou T, Zhou Y, et al. Ultraviolet blood irradiation and oxygenation affects free radicals and antioxidase after rabbit spinal cord injury[J]. Chin Med J (Engl),2000,113(11):991-995.

[13] 张献清,张晓迪,穆士杰,等. 紫外线照射充氧自血回输对梭曼中毒家兔氧自由基代谢的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(9):598-600.

[14] 崔洪香,邸文会,孟立军,等. 紫外线充氧照射自血回输与尿激酶联用治疗顽固性不稳定性心绞痛的临床观察[J]. 山东医药, 2001,41(5):38.

(修回日期:2015-07-01)

(本文编辑:凌　琛)