

吴亚辉, 乔梁, 林洪启. 基于 Cx43/mito-KATP 信号轴观察右美托咪定预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏的保护机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 76-84.

Wu YH, Qiao L, Lin HQ. The protective mechanism of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion of the isolated rat heart uses the connexin 43/mito-KATP signaling axis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 76-84.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.10.012

基于 Cx43/mito-KATP 信号轴观察右美托咪定 预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏的保护机制

吴亚辉¹, 乔 梁², 林洪启^{3*}

(1.河南省人民医院麻醉科, 郑州 450003; 2.河南省人民医院耳鼻喉科, 郑州 450003;
3.华中阜外医院麻醉科, 郑州 450003)

【摘要】 目的 探讨右美托咪定预处理对大鼠离体缺血再灌注(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)心脏的保护作用以及对缝隙连接蛋白 43(connexin43, Cx43)/线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mito-KATP)信号轴的调控机制。**方法** 构建离体心脏 Langendorff 灌注模型。采用随机数字表法将 50 个离体心脏分为 5 组($n=10$):空白组(Blank 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理组(I/R+Dex 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理+mito-KATP 通道阻断剂 5-HD 组(I/R+Dex+5-HD 组)、缺血再灌注+mito-KATP 通道阻断剂组(I/R+5-HD 组)。采用停灌 30 min,再灌注 120 min 的方法制备大鼠离体心脏心肌缺血再灌注损伤模型。Blank 组以 K-H 溶液持续灌流 180 min;模型组以 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min,造成 MIRI 损伤;I/R+Dex 组以含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min;I/R+Dex+5-HD 组先以含 10 mg/L 的 mito-KATP 通道阻断剂 5-羟羧酸(5-HD)的 K-H 溶液灌流 15 min,含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 15 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min;I/R+5-HD 组先以含 10 mg/L 的 5-HD 的 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min。TTC 染色检测各组心脏心肌梗死面积比例。免疫组化检测各组心脏中 Cx43 的表达。Western blot 检测各组心脏中 p-Cx43 的表达水平。**结果** 与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高,Cx43、p-Cx43 的表达明显降低;与 I/R 组相比,I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显降低,Cx43、p-Cx43 的表达升高,I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高,Cx43、p-Cx43 的表达明显降低;与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高,Cx43、p-Cx43 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定预处理能够促进 Cx43 的表达及磷酸化,促进 mito-KATP 通道的开放,减轻离体心脏的缺血再灌注损伤。

【关键词】 缝隙连接蛋白 43;线粒体 ATP 敏感性钾通道;右美托咪定预处理;离体心脏;缺血再灌注损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 10-0076-09

The protective mechanism of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion of the isolated rat heart uses the connexin 43/mito-KATP signaling axis

WU Yahui¹, QIAO Liang², LIN Hongqi^{3*}

(1. Henan Provincial People's Hospital Department of Anesthesiology, Zhengzhou 450003, China.

【作者简介】 吴亚辉(1982—),男,硕士,主治医师,研究方向:心肌保护和脑保护。E-mail: 272411645@qq.com

【通信作者】 林洪启(1972—),男,硕士,主任医师,研究方向:围术期器官保护。E-mail: lhq9988@126.com

2. Henan Provincial People's Hospital Department of Otorhinolaryngology, Zhengzhou 450003.

3. Department of Anesthesiology of Central China Fuwai Hospital, Zhengzhou 450003)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion injury (MIRI) in isolated rat hearts and its potential regulatory mechanism via the connexin 43 (Cx43)/mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mito-KATP) signaling axis. **Methods** The isolated heart Langendorff perfusion model was used. The random number table method was used to divide 50 isolated hearts into 5 groups ($n=10/\text{group}$): control (Blank group), ischemia-reperfusion (I/R group), ischemia-reperfusion + dexmedetomidine preconditioning (I/R+Dex group), ischemia-reperfusion+dexmedetomidine preconditioning+mito-KATP channel blocker 5-HD (I/R+Dex+5-HD group), and ischemia-reperfusion+mito-KATP channel blocker (I/R+5-HD group) groups. The rat model of isolated myocardial ischemia-reperfusion injury was prepared by stopping perfusion for 30 min and reperfusion for 120 min. The Blank group was continuously perfused with K-H solution for 180 min. The I/R group was perfused with KH solution for 30 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min, causing MIRI injury. The I/R+Dex group was perfused with KH solution containing 10 mg/L dexmedetomidine for 30 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min. The I/R+Dex+5-HD group was perfused with KH solution containing 10 mg/L of mito-KATP channel blocker 5-hydroxykynolic acid (5-HD) for 15 min, perfused with KH solution containing 10 mg/L of dexmedetomidine for 15 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min. The I/R+5-HD group was perfused with KH solution containing 10 mg/L of 5-HD for 30 min, stopped for 30 min, and then perfused with KH solution for 120 min. Triphenyltetrazolium chloride staining was used to detect the proportion of cardiac infarction in each group. The expression of Cx43 in rat hearts from each group was detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the heart expression levels of p-Cx43 in each group. **Results** Compared with the Blank group, the myocardial infarction area of the I/R, I/R+Dex, I/R+Dex+5-HD and I/R+5-HD groups were significantly increased, and the expression levels of Cx43 and p-Cx43 were significantly decreased. Compared with the I/R group, the area of myocardial infarction in the I/R+Dex and I/R+Dex+5-HD groups were significantly reduced, and the expression levels of Cx43 and p-Cx43 were increased. Compared with the I/R group, the area of myocardial infarction in the I/R+5-HD group was significantly increased, and the expression levels of Cx43 and p-Cx43 were significantly reduced. Compared with the I/R+Dex group, the areas of myocardial infarction in the I/R+Dex+5-HD and I/R+5-HD groups, were significantly reduced, and the expressions of Cx43 and p-Cx43 were reduced. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Dexmedetomidine preconditioning can promote the expression and phosphorylation of Cx43, and the opening of the mito-KATP channel, and reduce ischemia-reperfusion injury of isolated hearts.

【Keywords】 connexin43; mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; dexmedetomidine preconditioning; Isolated heart; ischemia-reperfusion injury

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 常发生在心肺复苏、冠状动脉搭桥术、溶栓疗法和心脏移植等过程中,主要的临床表现为缺血再灌注后的心室舒缩功能障碍,心肌细胞的能量异常,心律失常,血管无复流以及心室超微结构变化,致使心肌损伤加重的现象^[1]。MIRI 的病理机制十分复杂,尚未完全明确。迅速恢复心脏缺血后的灌注,是降低患者心肌梗死的面积,改善其临床预后的关键因素^[2]。右美托咪定是在 ICU 和临床麻醉中广泛应用的镇静和镇痛药物。研究表明作为一种高选择性 α_2 肾上腺素受体激动剂,右美托咪定在外科手术中具有良好的心脏保护作用^[3]。杨冯睿等^[4]研究表明

在离体心脏 MIRI 模型中,应用右美托咪定在缺血前进行预处理能明显降低离体心脏的心肌损伤,降低其梗死面积。但对右美托咪定预处理对心脏的保护机制的报道较少。缝隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 动物心室工作细胞的主要连接蛋白,在心肌细胞的细胞膜以及线粒体膜上广泛表达。研究显示 Cx43 磷酸化后能够调控缝隙连接的传导与细胞膜的通透功能,在维系心室舒缩功能中发挥重要作用^[5]。定位与线粒体膜上的线粒体 ATP 敏感性钾通道 (mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mito-KATP) 被认为是器官缺血保护的效应器,心肌缺血后,mito-KATP 通道开放,发挥心脏保护的作用^[6]。研究表明

mito-KATP 通道参与心肌缺血预适应的过程,保护脏器免于损伤。但右美托咪定预处理对心脏的保护机制是否与 Cx43 和 mito-KATP 通道有关尚未有确切的报道^[7]。本研究通过建立大鼠离体心脏灌流模型,进而复制缺血再灌注(I/R)模型,从 Cx43 的表达和 mito-KATP 通道的开放出发,来探讨右美托咪定预处理对心脏的保护机制,从而为临床医师的药物选择积累基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8~10 周清洁级 50 只 SD 雄性大鼠,体重 220~250 g,从河南省实验动物中心采购[SCXK(豫)2017-0001],动物饲养在郑州大学实验动物中心[SYXK(豫)2018-0003]。本研究的实验目的以及操作经郑州大学实验动物中心伦理委员会审核批准(IACUC20200613-15),在实验过程中,遵循 3R 原则,给与实验动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸右美托咪定注射液(dexmedetomidine hydrochloride inject, 2 mL:200 μ g, 5 瓶/盒,国药准字:H20090248,江苏恒瑞医药股份有限公司,生产批号:7WS-0563R);mito-KATP 通道阻断剂 5-羟葵酸(5-HD)(美国 abcam 公司,生产批号:ADX-0096V);HE 试剂盒(上海碧云天生物技术公司,生产批号:7604BG-1A);TTC 染色试剂盒(广东锐博生物科技技术股份有限公司,生产批号:YTO0064);兔抗大鼠 Cx43 抗体(生产批号:RB0019-01-1A)、p-Cx43 抗体(生产批号:RB0630-056L)、兔抗大鼠 GAPDH(生产批号:RB0328-073C)(德国 Rebstock 公司);Western blot 试剂盒(生产批号:JV-0018SD-3F)、免疫组化试剂盒(生产批号:JV-0567H-5N)(美国 Jackson 公司)。

ML870 八道通生理记录仪(加拿大 Visual Sonics 公司);离体心脏 Langendorff 灌流装置(普升科技有限公司);Gel Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司);R290 深冷冰箱(德国维根斯公司);IX70-S8F2 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);TCS SP2 型电镜(德国 Leica 公司);TGL-16G 高速低温离心机(北京六一仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠离体心脏 Langendorff 灌流模型的建立

50 只大鼠适应性喂养一周后,随机分为 5 组,

每组 10 只,分别为空白组(Blank 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理组(I/R+Dex 组)、缺血再灌注+右美托咪定预处理+mito-KATP 通道阻断剂 5-HD 组(I/R+Dex+5-HD 组)、缺血再灌注+mito-KATP 通道阻断剂组(I/R+5-HD 组)。造模方法如下^[8]:使用 36 mg/kg 的浓度为 1.6%戊巴比妥钠将大鼠麻醉,腹腔注射 25 mg/kg 肝素钠进行抗凝,开胸,沿主动脉弓将心脏切下取出,转移至 4℃的 Krebs-Henseleit(K-H)溶液中轻柔挤压以排出余血,以动脉针埋入主动脉同时以缝合线将其扎紧,悬挂在 Langendorff 灌流装置上,排净 Langendorff 管中的气体后,将灌流管插入主动脉。以 12 mL/min 的恒流速将 K-H 液逆流灌注 30 min,以稳定心脏的活动;采用 ML870 型八道通生理记录心脏的左室的收缩曲线,监测心率(heart rate, HR)、左室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP)、左室内压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)、左室内压最大上升速率($+dp/dt_{max}$)等参数的变化。待心脏活动平衡后即可造模,本研究中以全心缺血/再灌注的方式造模,即全心停灌 30 min,再灌注 120 min,造模成功标准^[9]:HR $\geq$ 200 次/分,左室发展压(left ventricular development pressure, LVDP) $\geq$ 50 mmHg。本研究使用的 K-H 溶液现用现配,主要的成分如下(g/L):KCl 0.35, NaCl 6.89, $MgSO_4$ 0.29, $NaHCO_3$ 2.09, $CaCl_2$ 0.283, 葡萄糖 1.99, KH_2PO_4 0.16, pH 维持在 7.3~7.4。

1.3.2 实验分组处理

Blank 组心脏以 K-H 溶液持续灌流 180 min;模型组心脏以 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min,造成 MIRI 损伤;I/R+Dex 组心脏以含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min;I/R+Dex+5-HD 组心脏先以含 10 mg/L 的 5-HD 的 K-H 溶液灌流 15 min,含 10 mg/L 的右美托咪定的 K-H 溶液灌流 15 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min;I/R+5-HD 组心脏先以含 10 mg/L 的 5-HD 的 K-H 溶液灌流 30 min,停止 30 min,再以 K-H 溶液灌流 120 min^[10]。

1.3.3 酶联免疫测定试剂盒(enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA)检测各组心脏冠脉流出液心肌钙蛋白 I(cTnI)的含量

心脏缺血再灌注 180 min 后 5 min 内心脏冠脉

漏出液的总量,即为冠脉流量 (coronary outflow, CF),同时留取各组心脏冠脉漏出液 2 mL,离心后,收集上清,ELISA 试剂盒检测冠脉漏液中 cTnI 的含量。

1.3.4 TTC 染色检测各组心脏心肌梗死面积比例

灌注 180 min 结束后,取下心脏,在 -80°C 深冷冰箱中冷冻 5 min 后,剔除心脏组织,将心脏横断成 6~7 块约 2 mm 厚度的组织。同时将 100 mg 的心脏组织,以 2% TTC 在室温下避光染色 20 min,10% 福尔马林溶液固定 24 h,数码相机拍照,梗死区域呈白色或灰白色,非梗死区域呈鲜红色^[11],留取图像,同时采用 Alpha View 图像分析软件分析梗死面积占左心室总面积的百分比。

1.3.5 各组心脏病理学改变

取出 100 mg 的心脏组织,PBS 缓冲液冲洗 3 次,HE 染色,制片,光镜下观察各组心脏的组织形态变化。

1.3.6 各组心脏超微结构病理损伤

取出 100 mg 的心脏组织,经固定,脱水,包埋,以及醋酸双氧铀 (uranyl acetate) 及枸橼酸铅 (lead citrate) 染色后,制成 50 nm 切片,干燥后,电镜观察各组心脏超微结构病理改变。

1.3.7 免疫组化检测各组心脏中 Cx43 的表达

取出 100 mg 的心脏组织,10% 的聚甲醛固定 2 h,脱水,透明,浸蜡后切片,以枸橼酸钠缓冲液进行高温抗原修复后,双氧水封闭,PBS 冲洗后,加入一抗 (1:500), 4°C 孵育过夜,次日加入二抗 (1:2000),二氨基联苯胺 (DAB) 染色,苏木素染核,清洗、脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜下观察,目的蛋白在胞质中呈棕褐色^[12]。

1.3.8 Western blot 检测各组心脏中 p-Cx43 的表达水平

取出 100 mg 的心脏组织,常规裂解、匀浆、离心后,测定蛋白浓度,电泳分离,转膜、封闭,滴加一抗 (均为 1:500), 4°C 孵育过夜,次日清洗后加入二抗 (均为 1:1000),显色,凝胶成像仪下读取各条带灰度值,以 GAPDH 作为内参,计算目的蛋白相对表达水平。

1.4 统计学方法

数据统计采用 SPSS 16.0 软件,作图工具采用 Graphpad5.01,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异显著,具有统计学意义。

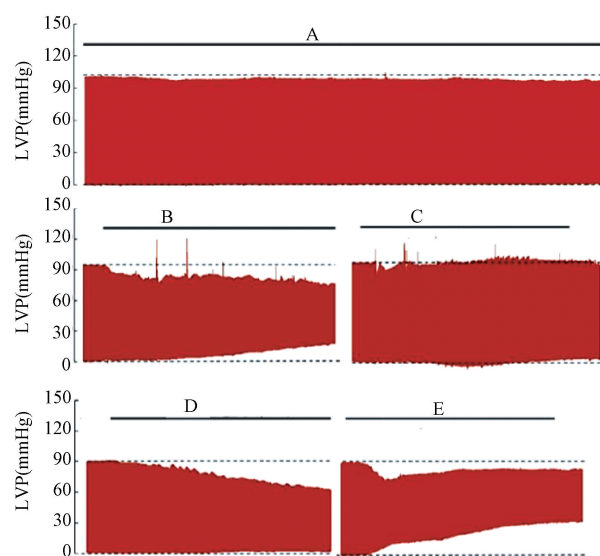
2 结果

2.1 各组大鼠离体心脏血流动力学参数的比较

在心脏 K-H 液持续灌流 180 min 内,Blank 组心脏的左心室收缩力未出现明显波动,说明在本实验操作过程中,离体心脏状态良好,无心功能降低的状况出现,如图 1 所示。各组离体心脏血流动力学参数比较如图 2 所示,与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显降低,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),与 I/R 组相比,I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显升高,I/R+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显降低,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 LVDP、 $dp/dt_{\max}$ 、 $-dp/dt_{\max}$ 明显降低,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。各组心脏的 HR 差异不明显,不具有统计意义 ($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠离体心脏心肌梗死面积的比较

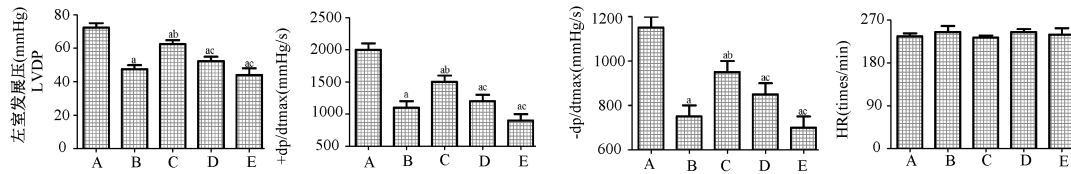
TTC 染色结果如图 3 所示,与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高,差异均具有统计学意义 ($P<0.05$),与模型组相比,I/R+Dex 组、I/R+



注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。

图 1 各组大鼠离体心脏左心室收缩力 (LVP) 的实时监测
Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Figure 1 Real-time monitoring of left ventricular contractility (LVP) of isolated rats hearts of in each group

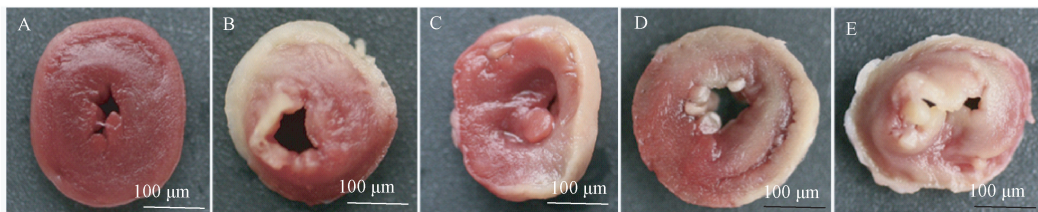


注: A: Blank 组; B: I/R 组; C: I/R+Dex 组; D: I/R+Dex+5-HD 组; E: I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 I/R 相比, ^b $P < 0.05$; 与 I/R+Dex 组相比, ^c $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠离体心脏血流动力学参数比较

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P < 0.05$. Compared with I/R group, ^b $P < 0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of hemodynamic parameters of isolated rat hearts in each group



注: A: Blank 组; B: I/R 组; C: I/R+Dex 组; D: I/R+Dex+5-HD 组; E: I/R+5-HD 组。

图 3 TTC 染色结果

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

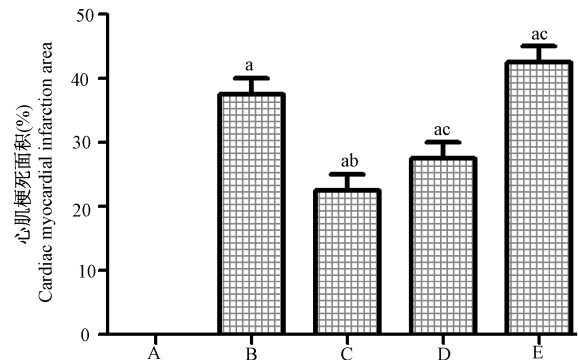
Figure 3 Results of TTC staining

Dex+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显降低, I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 I/R+Dex 组相比, I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的心肌梗死面积明显升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.3 各组大鼠离体心脏心肌组织病理损伤和超微结构的变化

HE 染色结果如图 5 所示, Blank 组心脏细胞形态正常, 胞核规则, 横纹清晰可辨, 心肌纤维排列, 间质未见明显异常; I/R 组心脏心肌纤维排列紊乱, 分布松散, 出现或断裂, 或溶解的现象, 细胞间质增宽明显, 水肿严重, 炎性细胞浸润明显, 细胞胞核严重固缩, 呈现多处坏死灶点; I/R+Dex 组, I/R+Dex+5-HD 组心脏的心肌细胞损伤明显比 I/R 组均有不同城的减轻, 并且 I/R+Dex 组的病理损伤比 I/R+Dex+5-HD 组还要缓解; I/R+5-HD 组心脏的心肌损伤最为严重。

电镜下观察各组大鼠心肌组织超微结构改变如图 6 所示: Blank 组心脏心肌横纹清晰, 心肌纤维排列规则, 胞核性状正常, 线粒体嵴结构、形态和数量正常; I/R 组心脏心肌纤维出现大面积的溶解现象, 胞核明显扩大, 核膜破裂, 染色质固缩明显, 线粒体数量减少, 肿胀明显, 呈现空泡样变性, 嵴结构



注: A: Blank 组; B: I/R 组; C: I/R+Dex 组; D: I/R+Dex+5-HD 组; E: I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 I/R 相比, ^b $P < 0.05$; 与 I/R+Dex 组相比, ^c $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠离体心脏心肌梗死面积比较

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P < 0.05$. Compared with I/R group, ^b $P < 0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of myocardial infarction area in isolated rats hearts in each group

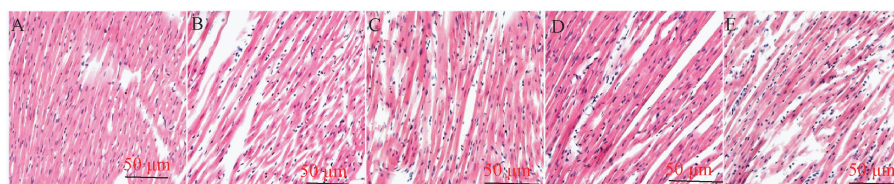
或变短或变疏或断裂或缺失, 胶原纤维松散的排列; I/R+Dex 组心肌纤维排列趋于规整, 细胞稍见肿胀, 少部分线粒体存在空泡样变性, 坏死病灶明显减小; I/R+Dex+5-HD 组心脏心肌细胞损伤明显缓解, 细胞排列趋于规则, 线粒体损伤明显减轻, 但比

I/R+Dex 组恢复的程度要小;I/R+5-HD 组心脏心肌坏死病灶面积以及分布灶点最为严重,线粒体的空泡样变性更为严重。

2.4 各组大鼠离体心脏冠脉流量以及冠脉漏出液中 cTnI 的含量的比较

与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 CF 明显降低,cTnI 的含量明显升高,差异均具有统计学意义 ($P <$

0.05),与 I/R 组相比,I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的 CF 明显升高,cTnI 的含量明显降低,I/R+5-HD 组心脏的 CF 明显降低,cTnI 的含量明显升高,差异均具有统计学意义 ($P <$ 0.05),与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 CF 明显降低,cTnI 的含量明显升高,差异均具有统计学意义 ($P <$ 0.05),见图 7。

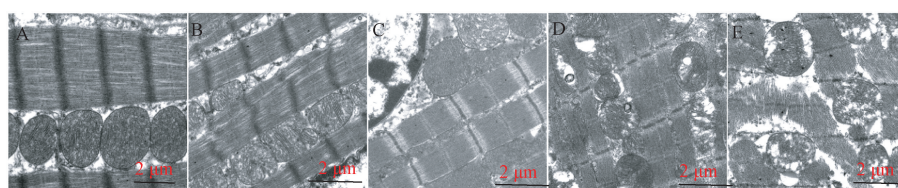


注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。

图 5 HE 染色结果

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Figure 5 Results of HE staining

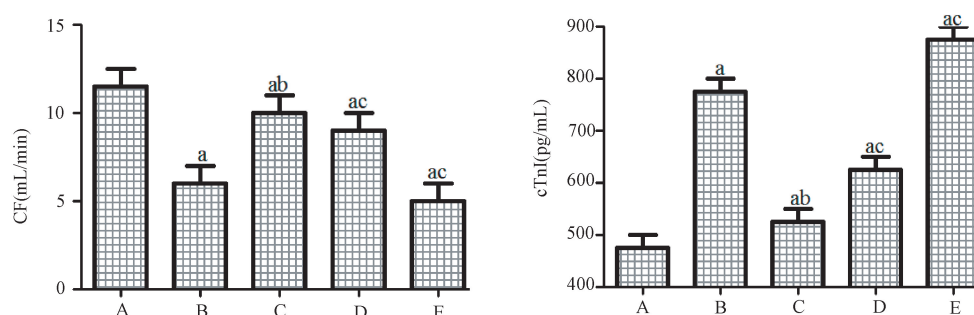


注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。

图 6 电镜观察结果

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Figure 6 Observation results under electron microscope



注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比,^a $P <$ 0.05;与 I/R 相比,^b $P <$ 0.05;与 I/R+Dex 组相比,^c $P <$ 0.05。

图 7 各组大鼠离体心脏冠脉流量以及冠脉漏出液中 cTnI 的含量的比较

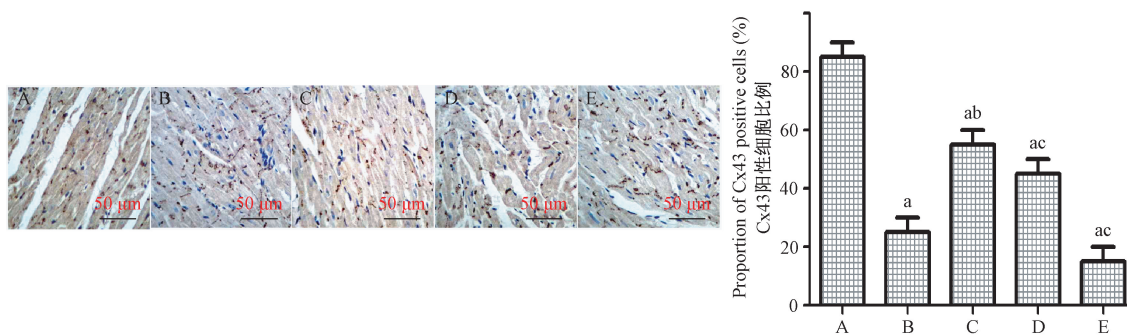
Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group.

Compared with Blank group, ^a $P <$ 0.05. Compared with I/R group, ^b $P <$ 0.05. Compared with I/R+Dex group, ^c $P <$ 0.05.

Figure 7 Comparison of the coronary flow and the content of cTnI in the coronary leakage of rat isolated hearts in each group

2.5 各组大鼠离体心脏中 Cx43 的表达

免疫组化结果显示,与 Blank 组相比,I/R 组、I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$),与 I/R 组相比,I/R+Dex 组、I/R+Dex+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显升高,Cx43 的表达明显升高,I/R+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$),与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组、I/R+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43 的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$),见图 8。

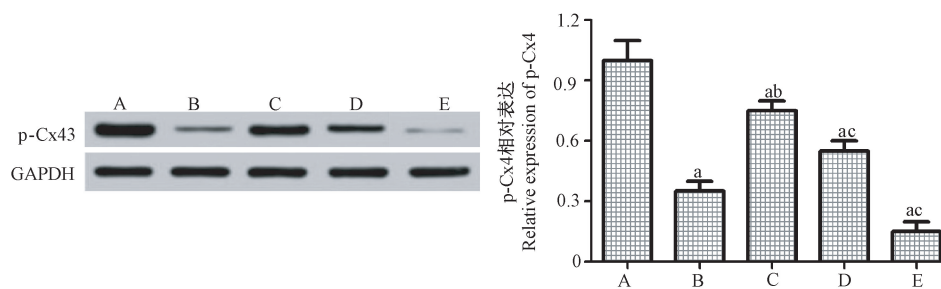


注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比,^a $P<0.05$;与 I/R 相比,^b $P<0.05$;与 I/R+Dex 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 8 各组大鼠离体心脏中 Cx43 的表达

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P<0.05$. Compared with I/R group, ^b $P<0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P<0.05$.

Figure 8 Expression of Cx43 in the isolated rats hearts in each group



注:A:Blank 组;B:I/R 组;C:I/R+Dex 组;D:I/R+Dex+5-HD 组;E:I/R+5-HD 组。与 Blank 组相比,^a $P<0.05$;与 I/R 相比,^b $P<0.05$;与 I/R+Dex 组相比,^c $P<0.05$ 。

图 9 各组大鼠离体心脏中 Cx43 的磷酸化

Note. A, Blank group. B, I/R group. C, I/R+Dex group. D, I/R+Dex+5-HD group. E, I/R+5-HD group. Compared with Blank group, ^a $P<0.05$. Compared with I/R group, ^b $P<0.05$. Compared with I/R+Dex group, ^c $P<0.05$.

Figure 9 Phosphorylation of Cx43 in the isolated rat hearts of each group

3 讨论

当前,可以通过手术、溶栓等手段使缺血性心脏重新获得血液灌注,是组织器官的功能得以恢复,但是心脏组织缺血时间较长,缺血厚度心肌细胞在血流再灌注的过程中释放大量的炎性介质,给血管内皮细胞以及心室工作细胞带来一定的损伤,引起心肌细胞功能障碍,导致心肌变性或坏死,组织承受的损伤加重,形成 MIRI^[13]。MIRI 是冠状动脉旁路移植术、经皮冠状动脉介入术(PCI)等术后严重的并发症,是导致患者死亡的重要因素。缩短器官缺血时间、减轻 MIRI 损伤,在改善 PCI 等术后患者远期预后方面具有重大意义。

右美托咪定具有良好的镇静、镇痛、无呼吸抑制、止涎、利尿和抑制交感神经活性等药理学活性。作为辅助用药,在全身麻醉、小儿麻醉、局部麻醉以及无痛检查中广泛应用^[14]。但临床应用中右美托咪定显示了良好的器官保护作用引起广泛关注^[15]。阮孝国等^[16]研究表明右美托咪定可减轻关节镜下膝关节韧带修复术患者在术中的肢体缺血-再灌注损伤。符炜等^[17]临床研究表明右美托咪定对风心瓣膜置换术患者围术期心肌损伤具有保护作用。Yoshikawa 等^[18]研究表明右美托咪定的应用能够保护高血压性肥厚型大鼠心脏免受损伤。但是右美托咪定在 MIRI 中的应用的报道较少。本实验采用动物基础实验技术成熟且广泛应用的 Langendorff 离体心脏灌注模型,避免生物体神经、内分泌、体液、信号传导等因素对结果的影响的同时,能够直接且客观地评价药物对研究结果的影响。LVDP、 dp/dt_{max} 、 $-dp/dt_{max}$ 是临床上评价左室血流动力学的重要参数,心肌梗死面积是缺血再灌注对心脏损伤的终末表现。心脏冠脉流量以及冠脉漏出液中 cTnI 的含量是衡量心肌损伤快速而敏感的指标^[19]。本研究在成功建立离体心脏缺血再灌注模型后,与 I/R 组相比,I/R+Dex 组心脏的上述指标均有不同程度的好转;HE 以及超微结构观察显示,I/R+Dex 组的病理损伤以及心脏超微结构损伤明显缓解。说明右美托咪定预处理在缺血再灌注损伤中对离体大鼠心脏的保护作用。

明确药物的作用位点,一方面有助于阐明疾病的分子机制,另一方面更有助于针对疾病作用位点的靶向治疗。Cx43 是构成细胞间连接的基本结构的膜蛋白,不仅具有细胞间通讯交流的功能,其表

达与活化后还能调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡。研究证实作为心室心肌细胞缝隙连接的最主要组成成分,Cx43 的表达、分布以及磷酸化水平直接影响着心脏的结构与功能的变化,与慢性心衰、肥厚性心肌病等心血管疾病的密切相关^[20]。mito-KATP 通道是线粒体膜上的依赖钾浓度的离子通道。研究表明 mito-KATP 通道是多种心血管疾病缺血预处理后心肌免受损伤,发挥保护的终末效应分子,同时也是启动心肌自我防护效应的关键信号分子^[21]。Pisarenko 等^[22]研究表明在整体缺血的离体灌注工作大鼠心脏中,mito-KATP 通道的开放有助于减轻离体心脏的缺血再灌注损伤。研究表明缺血预处理能够促进 Cx43 的磷酸化,但是就在右美托咪定预处理中,是否存在 Cx43 的激活以及 mito-KATP 通道的开放,尚未有定论。本研究以 mito-KATP 通道阻断剂作为对照组研究 Cx43 的表达以及 mito-KATP 通道的开放在右美托咪定预处理的作用。结果显示阻断 mito-KATP 通道后,与 I/R 组相比,I/R+5-HD 组的心功能参数明显降低,心肌梗死面积明显升高,说明当离体心脏发生缺血再灌注时,心脏自动开放 mito-KATP 通道,与既往研究一致;与 I/R+Dex 组相比,I/R+Dex+5-HD 组心脏的 Cx43 阳性细胞比例明显降低,Cx43、p-Cx43 的表达均明显降低,心肌梗死面积明显升高,心肌病理损伤加重。说明右美托咪定预处理能够促进 mito-KATP 通道的开放,促进 Cx43 的表达以及磷酸化,以发挥心脏保护的作用。

综上所述,右美托咪定预处理能够促进 Cx43 的表达以及磷酸化,促进 mito-KATP 通道的开放,减轻离体心脏的缺血再灌注损伤。但是临床上右美托咪定预处理能否发挥相同的效应还待更为系统的研究。

参考文献:

- [1] Russo I, Penna C, Musso T, et al. Platelets, diabetes and myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16(1): 71-82.
- [2] Mokhtari-Zaer A, Marefati N, Atkin SL, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2018, 234(1): 214-222.
- [3] Bunte S, Behnenburg F, Majewski N, et al. Characteristics of dexmedetomidine postconditioning in the field of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Anesth Analg, 2020, 130(1): 90-98.
- [4] 杨冯睿, 易汉, 汪超, 等. miR-208b-3p 在右美托咪定减轻大

- 鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用研究 [J]. 重庆医学, 2018, 47(2): 153-155.
- [5] Kang PT, Chen CL, Lin P, et al. Mitochondrial complex I in the post-ischemic heart: reperfusion-mediated oxidative injury and protein cysteine sulfonation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121(8): 190-204.
- [6] 刘为, 黄丽萍, 田伟, 等. 线粒体 ATP 敏感性钾通道在尿皮质素后处理对大鼠心肌细胞保护效应中的作用 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39(2): 174-177.
- [7] Yokoyama S, Nakagawa I, Ogawa Y, et al. Ischemic postconditioning prevents surge of presynaptic glutamate release by activating mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the mouse hippocampus [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215104.
- [8] 贾敏, 王静, 张冀东, 等. 养心定悸胶囊调控 NOS 途径改善心肌缺血再灌注损伤及其引起的心律失常 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(14): 1444-1449.
- [9] 周雯静, 李进, 喻田, 等. mito-K(ATP)通道在吡那地尔后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用: 离体实验 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2018, 38(5): 627-630.
- [10] 谢铭, 黄惠丽, 张文慧, 等. 基于不同钙释放机理的花萼海绵诱癌素 A 与去乙酰毛茛碱的正性肌力作用研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2018, 34(6): 607-610.
- [11] Shu L, Zhang W, Huang C, et al. Troxerutin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Pi3k/Akt pathway in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(5): 1939-1948.
- [12] Reitz CJ, Alibhai FJ, Khatua TN, et al. SR9009 administered for one day after myocardial ischemia-reperfusion prevents heart failure in mice by targeting the cardiac inflammasome [J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 353.
- [13] Conklin DJ, Guo Y, Nystoriak MA, et al. TRPA1 channel contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(4): H889-H899.
- [14] Keating GM. Dexmedetomidine: a review of its use for sedation in the intensive care setting [J]. *Drugs*, 2015, 75(10): 1119-1130.
- [15] Mahmoud M, Mason KP. Dexmedetomidine: review, update, and future considerations of paediatric perioperative and periprocedural applications and limitations [J]. *Br J Anaesth*, 2015, 115(2): 171-182.
- [16] 阮孝国, 刘贺, 孟凡民, 等. 右美托咪定对骨科下肢手术患者止血带诱发肢体缺血-再灌注损伤的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(7): 668-670.
- [17] 符伟, 顾尔伟, 王宏, 等. 不同剂量右美托咪定对心肺转流风心瓣膜置换术患者心肌损伤的影响 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(4): 492-494.
- [18] Yoshikawa Y, Hirata N, Kawaguchi R, et al. Dexmedetomidine maintains its direct cardioprotective effect against ischemia/reperfusion injury in hypertensive hypertrophied myocardium [J]. *Anesth Analg*, 2018, 126(2): 443-452.
- [19] Peng YW, Mohammed A, Deatrick KB, et al. Differential effects of normoxic and hyperoxic reperfusion on global myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 31(2): 188-198.
- [20] Roell W, Klein AM, Breitbach M, et al. Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7145-7158.
- [21] 李宏玉, 唐强, 朱路文, 等. 运动预处理对脑缺血再灌注大鼠线粒体 ATP 敏感性钾通道蛋白及细胞凋亡的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2018, 24(5): 497-501.
- [22] Pisarenko OI, Shulzhenko VS, Studneva IM, et al. Signaling pathways of a structural analogue of apelin-12 involved in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury [J]. *Peptides*, 2015, 73(11): 67-76.

[收稿日期] 2020-08-19