

内吗啡肽-1 后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用

宗巧凤, 张冠军, 于 影, 张蔚屏, 李正红

[摘要] **目的:** 观察内吗啡肽-1 (EM-1) 后处理对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤 (IRI) 的保护作用, 并初步探讨 EM-1 对 IRI 可能的保护作用。 **方法:** 雄性 SD 大鼠 24 只, 随机分为 4 组: 假手术组 (S 组)、缺血复灌组 (I/R)、缺血后处理组 (IPO 组) 和 EM-1 后处理组 (EM 组)。S 组于大鼠冠状动脉左前降支下穿线不结扎维持 150 min; I/R 组结扎大鼠冠状动脉左前降支 30 min, 再灌注 120 min 复制缺血再灌注模型, IPO 组和 EM 组分别于再灌注前 5 min, 静脉给予 0.9% 氯化钠注射液 0.5 ml 和 EM-1 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 再灌注 120 min。动态监测血流动力学指标的变化; 再灌注结束后取动脉血浆检测丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; 光学显微镜检查心肌细胞形态。 **结果:** 与 S 组比较, I/R 组各时间点心率、平均动脉压和心率 - 血压乘积均显著降低 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 形态学显示心肌细胞损伤明显; 血浆 MDA 含量增高, SOD 活性下降 ($P < 0.01$)。与 I/R 组比较, 除 EM 组再灌注 120 min 平均动脉压无明显增高外, IPO 组和 EM 组各时间点心率、平均动脉压和心率 - 血压乘积均有所增高 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 形态学显示 IPO 组和 EM 组心肌细胞损伤减轻; IPO 组和 EM 组血浆 MDA 含量均降低, SOD 活性增加 ($P < 0.01$)。 **结论:** EM-1 后处理对心肌 IRI 产生保护作用, 其可能通过抗氧化应激损伤发挥心肌保护作用。

[关键词] 内吗啡肽-1; 心肌缺血再灌注; 缺血后处理; 心肌保护

[中国图书资料分类法分类号] R 614.2; R 542.2 [文献标志码] A

The effects of endomorphin - 1 postconditioning in rat with myocardial ischemia reperfusion injury

ZONG Qiao-feng, ZHANG Guan-jun, YU Ying, ZHANG Wei-ping, LI Zheng-hong
(Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of endomorphin-1 (EM-1) postconditioning in rat with myocardial ischemia-reperfusion injury (IRI) in vivo and to assess its mechanism. **Methods:** twenty-four male Sprague Dawley rats were randomly divided into 4 groups: sham group (S group), ischemia-reperfusion group (I/R group), ischemia postconditioning group (IPO group), EM-1 postconditioning group (EM group). S group was established through threading under the left anterior descending branch of coronary artery and no occluding for 150 min; I/R group was established through occluding the left anterior descending branch of coronary artery for 30 min and reperfusion for 120 min; IPO group and EM group were respectively intravenous injection 0.9% NaCl 0.5ml and EM-1 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ on 5 min before reperfusion, then reperfusion for 120 min. Dynamic index of blood flow was recorded and analyzed. At the end of reperfusion, arterial blood sample was obtained to measure plasma contents of malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD); the rats were sacrificed for assessment cell morphology of light microscopy. **Results:** Compared to S group, the heart rate, mean arterial pressure and rate-pressure product were decreased in I/R group ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); the contents of MDA was significantly increased and the activities of SOD was significantly decreased in I/R group ($P < 0.01$); in cell morphology of light microscopy, the damage of myocardial structure was significantly increased in I/R group. The heart rate, mean arterial pressure and rate-pressure product in IPO and EM group were increased compared to I/R group except of MAP at 120 min following reperfusion in EM group ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), the contents of MDA in IPO and EM group was decreased and the activities of SOD was increased compared to I/R group ($P < 0.01$), in cell morphology of light microscopy, the damage of myocardial structure was significantly reduced in IPO and EM group. **Conclusions:** EM-1 postconditioning can relieve ischemia reperfusion injury in myocardial protection, EM-1 postconditioning produces the protective effect by reducing the MDA and increasing the SOD.

[Key words] endomorphin-1; myocardial ischemia reperfusion; ischemia postconditioning; cardioprotection

[收稿日期] 2014-06-06

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究重点资助项目 (KJ2011A202); 蚌埠医学院研究生创新计划项目 (Byyex1307)

[作者单位] 蚌埠医学院 生理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 宗巧凤 (1987 -), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 李正红, 硕士研究生导师, 博士, 教授. E-mail: lizhbmc@163.com

缺血预处理和缺血后处理是治疗缺血再灌注损伤 (IRI) 的重要内源性保护措施^[1], 但在临床中实施有一定的困难和限制; 而药物后处理是指在再灌注早期给予一定的药物处理, 无创伤性, 且实施比较方便^[2]。阿片类药物是临床上常用的一类麻醉性镇痛药, 亦有心肌保护作用。文献报道^[3-6] 吗啡、芬

太尼、瑞芬太尼、舒芬太尼等阿片类药物后处理可减轻大鼠心肌 IRI。内吗啡肽 (endomorphin, EM) 是 1997 年发现的阿片样四肽^[7], EM 对 μ 阿片受体有高选择性和高亲和力, 被认为是 μ 阿片受体内源性配体, 在痛觉调制、心血管、消化和免疫等方面发挥着重要的生物学功能。EM 有 2 种: EM-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) 和 EM-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂), 其中 EM-1 在脑中的分布较为广泛且浓度更高, 多集中在下丘脑和孤束核^[14], 在心血管调节中发挥重要作用。EM 作为新发现的内源性阿片肽, 具有广阔的应用前景, 其是否在 IRI 中发挥心肌保护作用, 尚未有相关的实验研究, 因此, 本研究通过建立在体大鼠心肌 IRI 模型, 探讨 EM-1 后处理对心肌 IRI 的保护作用, 为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级 SD 雄性大鼠 24 只, 体质量 250 ~ 350 g, 由蚌埠医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂 EM-1 购自美国 Sigma 公司, 肝素钠注射液购自天津生物化学有限公司, 水合氯醛购自上海沪试化学试剂有限公司, 丙二醛 (MDA) 及超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 复制在体大鼠心肌 IRI 模型 实验前大鼠禁食 12 h, 自由饮水。术前 4% 水合氯醛 1 ml/100 g 腹腔注射, 麻醉后仰卧位固定于手术台, 颈部正中切口, 暴露气管, 行气管插管并连接呼吸机, 潮气量为 2 ~ 3 ml/100 g, 呼吸频率为 70 ~ 80 次/分。同时分离右侧颈总动脉, 行颈总动脉插管, 打开并连接 Med-Lab 系统, 实时记录心率和血压变化。大鼠胸前手术区剪毛, 沿胸骨左缘 3、4 肋间行纵向约 2.5 cm 切口开胸, 钝性分离打开胸腔, 然后分离心包膜暴露心脏。在左心耳下方, 用 5-0 细丝线在冠状动脉左前降支 (LAD) 中上 1/3 下穿过, 线的两端穿 1 个聚四氟乙烯管, 稳定 20 min 后使聚四氟乙烯管端抵住冠状动脉, 收紧线头, 用另 1 个聚四氟乙烯管固定, 心电图可见 ST 段弓背向上抬高, 为心肌缺血成功, 缺血 30 min 后去掉聚四氟乙烯管, 松开丝线, 再灌注 120 min, 完成复制 I/R 模型。

1.3.2 分组处理 将 24 只 SD 雄性大鼠随机分为 4 组: 假手术组 (S 组)、缺血复灌组 (I/R 组)、缺血后

处理组 (IPO 组)、EM-1 后处理组 (EM 组), 每组各 6 只。(1) S 组: LAD 下只穿线不结扎维持 150 min。(2) I/R 组: 结扎 LAD 30 min, 再灌注 120 min。(3) IPO 组: 结扎 LAD 25 min 后, 经静脉滴注 0.9% 氯化钠注射液 0.5 ml; 在结扎 LAD 30 min 后, 开放 LAD, 实施再灌注 30 s 后再次结扎 LAD 30 s, 共 3 个循环后开放 LAD 实施再灌注 120 min。(4) EM 组: 基本处理同 I/R 组, 在再灌注前 5 min 时, 鼠尾静脉给予 EM-1 20 μ g/kg。

1.3.3 血流动力学指标监测 采用 Med-Lab 生物机能实验系统全程监测并记录大鼠心率 (HR)、平均动脉压 (MAP), 并计算心率 - 血压乘积 (RPP)。

1.3.4 血浆 MDA 含量及 SOD 活性测定 再灌注 120 min 后, 从颈总动脉取血约 3 ml, 置于肝素化的离心管中, 3 000 r/min 离心 20 min, 取血浆 - 80 $^{\circ}$ C 保存, 严格按照试剂盒说明书的操作测定 MDA 含量和 SOD 活性。

1.3.5 心肌组织病理形态学观察 实验结束取各组大鼠的心肌梗死区, 迅速将其放入 4% 甲醛溶液 4 $^{\circ}$ C 固定 24 ~ 72 h, 依次经过脱水、包埋、切片、常规苏木精 - 伊红染色, 最后树胶封片, 显微镜下观察。

1.4 统计学方法 采用单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 4 组大鼠血流动力学指标比较 4 组大鼠 HR、MAP 和 RPP 的基础值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 S 组比较, I/R 组缺血期和再灌注期 HR、MAP 和 RPP 均下降 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), IPO 组及 EM 组在不同时间段均有所下降 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 与 I/R 组比较, 除 EM 组再灌注 120 min MAP 无明显的增高外, IPO 组及 EM 组 HR、MAP 和 RPP 基本都有所升高 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 4 组大鼠血浆 SOD 活性和 MDA 含量比较 与 S 组比较, I/R 组、IPO 组和 EM 组血浆中 SOD 活性均降低, MDA 含量升高 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 与 I/R 组比较, IPO 组和 EM 组大鼠血浆中 SOD 活性均显著升高 ($P < 0.01$), MDA 的含量降低 ($P < 0.01$) (见表 2)。

2.3 4 组大鼠心肌组织病理形态学比较 S 组可见心肌细胞排列紧密, 肌浆染色均匀, 肌纤维完整, 间质中未见明显的炎性细胞及红细胞浸润; I/R 组可见心肌细胞排列紊乱, 肌浆染色不均, 肌纤维水肿、

表 1 4 组大鼠 HR、MAP 和 RPP 比较 ($n=6; \bar{x} \pm s$)

分组	基础值	缺血 30 min	再灌注	
			60 min	120 min
HR/(次/分)				
S 组	399.33 ± 23.77	394.50 ± 24.44	383.83 ± 21.15	367.50 ± 28.66
I/R 组	390.50 ± 20.42	273.83 ± 49.14 **	281.26 ± 44.60 **	284.01 ± 34.99 **
IPO 组	412.84 ± 28.11	320.63 ± 25.77 ^{△*}	340.60 ± 38.48 ^{△△}	341.14 ± 20.44 ^{△△△}
EM 组	411.68 ± 25.97	370.43 ± 45.11 ^{△△#}	346.14 ± 40.94 [△]	341.19 ± 34.16 ^{△△△}
<i>F</i>	1.11	12.12	7.71	8.20
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	610.835	1427.765	1398.319	907.599
MAP/mmHg				
S 组	106.14 ± 7.23	99.67 ± 7.91	92.56 ± 7.19	92.67 ± 6.89
I/R 组	117.51 ± 10.62	55.89 ± 21.63 **	66.38 ± 15.30 **	55.83 ± 20.98 *
IPO 组	115.29 ± 7.68	77.08 ± 9.65 [△]	84.70 ± 10.19 ^{△△}	80.10 ± 22.31
EM 组	109.97 ± 8.99	87.35 ± 19.97 ^{△△}	89.47 ± 6.77 ^{△△}	74.12 ± 22.29
<i>F</i>	2.08	8.07	7.39	3.80
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.01	<0.05
<i>MS</i> _{组内}	76.215	255.587	111.582	370.553
RPP/(mmHg · min ⁻¹ · 10 ⁻³)				
S 组	42.52 ± 5.30	39.42 ± 5.06	35.60 ± 4.20	34.10 ± 4.15
I/R 组	45.80 ± 3.63	15.79 ± 7.93 **	18.73 ± 5.64 **	16.18 ± 7.00 **
IPO 组	47.61 ± 4.83	24.88 ± 5.02 [*]	28.72 ± 3.88 ^{△△}	27.22 ± 7.09 [△]
EM 组	45.43 ± 6.25	32.86 ± 10.12 ^{△△}	31.16 ± 6.02 ^{△△}	25.46 ± 8.15 [△]
<i>F</i>	1.02	11.57	2.14	7.15
<i>P</i>	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	25.915	54.026	25.186	45.728

q 检验:与 S 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 I/R 组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 IPO 组比较[#] $P < 0.05$

表 2 4 组大鼠血浆 SOD 活性和 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

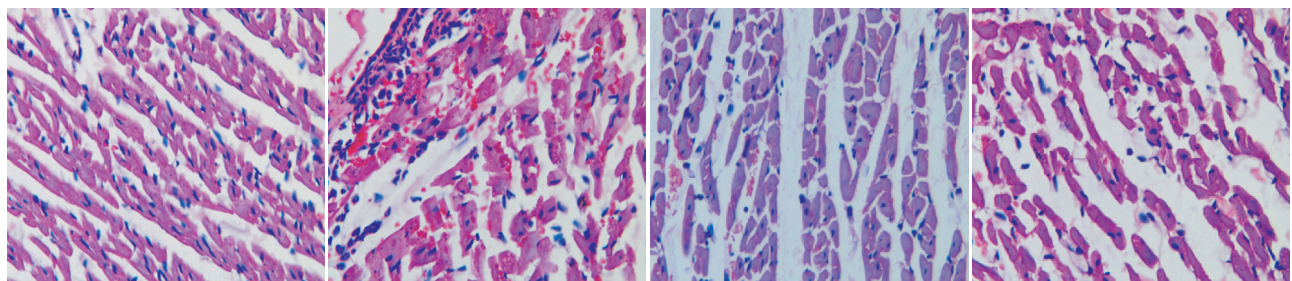
分组	<i>n</i>	SOD/(U/ml)	MDA/(nmol/ml)
S 组	6	143.86 ± 7.41	4.91 ± 0.94
I/R 组	6	84.10 ± 12.42 **	9.51 ± 1.41 **
IPO 组	6	124.10 ± 12.28 ^{△△}	6.50 ± 0.70 ^{△△}
EM 组	6	117.59 ± 19.54 ^{△△*}	7.21 ± 0.90 ^{△△*}
<i>F</i>	—	19.99	21.01
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01
<i>MS</i> _{组内}	—	185.444	—

q 检验:与 S 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 I/R 组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

断裂,间质中可见炎细胞呈小灶状浸润,同时可见大量红细胞;IPO 组和 EM 组相对 I/R 组心肌细胞排列比较紧密和整齐,肌纤维较为完整,肌浆染色相对均一,间质中炎症细胞和红细胞浸润明显减少,损伤较 I/R 组轻(见图 1)。

3 讨论

心肌 IRI 是临床麻醉工作中的常见病理过程,尤其在体外循环下心脏手术、心肌梗死患者的冠状动脉溶栓术、经皮冠状动脉支架术、冠状动脉搭桥术等临床过程中更为多见,因此,如何防治和减轻 IRI、最大限度保护缺血心肌,成为心血管研究的重点之一。缺血预处理^[8]和缺血后处理^[9]仍是目前临床减轻 IRI 的有效措施,麻醉药后处理具有与缺血后处理类似的效应,对心肌 IRI 有明显的保护作用。



S 组心肌病理切片

I/R 组心肌病理切片

IPO 组心肌病理切片

EM 组心肌病理切片

图 1 光学显微镜检查结果

用。实验已经证明阿片类药物在心肌缺血再灌注中发挥着重要的心肌保护作用。当心肌缺血时,心脏通过自身分泌或者旁分泌内源性阿片肽,并作用于心肌上的阿片受体,发挥重要的心肌保护作用^[10]。EM 是否在心肌 IRI 中发挥保护作用尚鲜见报道。本研究选择在体大鼠心肌缺血 30 min 再灌注 120 min 模型,采用 EM-1 后处理(再灌注前 5 min 单次静脉注入),结果显示缺血前各组 HR、MAP 和 RPP 基础值差异均无统计学意义($P > 0.05$),I/R

组缺血期和再灌注期 HR、MAP、RPP 均下降($P < 0.05 \sim P < 0.01$),与 I/R 组比较,IPO 组及 EM 组 HR、MAP 和 RPP 均有所升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。光学显微镜结果显示 EM-1 后处理减轻了 IRI 心肌细胞的病理改变。本研究结果表明,EM-1 后处理可以减轻大鼠心肌 IRI,表现为血流动力学影响减轻,心肌细胞形态结构改善,其作用与缺血后处理相似。

心肌缺血再灌注早期产生大量氧自由基是引起

IRI 的主要因素,大量氧自由基会导致氧化应激、脂质过氧化反应从而造成心肌细胞损伤。血浆中 SOD 是体内最重要的自由基清除酶,MDA 是自由基引起的脂质过氧化过程中的产物,检测血清中 SOD 活性和 MDA 含量可反映心肌细胞抗氧化能力和心肌损伤程度^[11]。通过抗氧化应激,抑制体内脂质过氧化反应,可对缺血再灌注产生保护作用,并改善缺血再灌注心脏的心功能^[12-13]。本研究结果显示,与 I/R 组比较,EM 组血浆中 MDA 含量降低,同时 SOD 活性升高,提示 EM-1 可能通过抗氧化应激和抑制脂质过氧化反应减少自由基的产生,从而减轻 IRI,发挥心肌保护作用。

IRI 的机制较复杂,包括氧化应激、炎症反应、细胞内钙超载、一氧化氮减少等,文献^[3-6]报道吗啡、舒芬太尼等阿片类药物后处理可通过激活再灌注损伤补救激酶途径、抑制氧自由基产生,抑制细胞内钙超载、减少心肌细胞凋亡、抑制炎症反应等减轻大鼠心肌 IRI。EM 是否通过其他途径减轻心肌缺血再灌注损伤,尚需进一步研究。与传统镇痛阿片类药物相比,EM 成瘾性低,镇痛效果好,很有可能成为临床新型的镇痛药之一,但其对其他器官的生物学效应,尤其是对心血管系统的作用直接影响临床应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM, *et al.* The reperfusion injury salvage kinase pathway : a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2005, 15(2) : 69 - 75.
- [2] Burley DS, Baxter GF. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(2) : 177 - 188.
- [3] Tanaka K, Kersten JR, Riess ML. Opioid-induced Cardioprotection [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(36) : 5696 - 5705
- [4] Chen Z, Li T, Zhang B. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts [J]. *J Surg Res*, 2008, 145(2) : 287 - 294.

- [5] Wong GT, Li R, Jiang LL, *et al.* Remifentanyl post-conditioning attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury via κ or α opioid receptor activation [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2010, 54(4) : 510 - 518.
- [6] 吴云, 顾尔伟, 方卫平, 等. 舒芬太尼后处理对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(7) : 652 - 655.
- [7] Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, *et al.* A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor [J]. *Nature*, 1997, 386(6624) : 499 - 502.
- [8] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia; a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5) : 1124 - 1136.
- [9] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2) : H579 - H588.
- [10] Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, *et al.* Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(3) : H1444 - H1451.
- [11] Jiang B, Chen Q, Liu X, *et al.* Ischemic postconditioning protects renal function after 24 hours of cold preservation in a canine autotransplantation model [J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(6) : 1776 - 1781.
- [12] Kurian GA, Suryanarayanan S, Ranlan A, *et al.* Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts [J]. *Chin Med*, 2010, 5:3
- [13] Saleh NK, Saleh HA. Protective effects of vitamin E against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Saudi Med J*, 2010, 31(2) : 142 - 147.
- [14] Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, *et al.* Differential distribution of endomorphin 1 and endomorphin 2 like immunoreactivities in the CNS of the rodent [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 405(4) : 450 - 471.

(本文编辑 马启)