

一氧化氮在吗啡后处理对心肌缺血再灌注 损伤保护中的作用

王 志¹, 赵惠娟², 金冬梅³, 车月娟¹, 李玉娟¹, 王 飞¹, 彭书峻^{1*}

(中山大学 1. 附属第二医院麻醉科, 2. 附属第一医院手术室, 3. 附属第二医院康复科, 广东 广州 510120)

摘 要: 【目的】探讨吗啡后处理对急性心肌缺血/再灌注损伤的保护作用以及对信号通路 eNOS/NO 的影响。【方法】SD 大鼠 56 只随机分成 4 组, 每组 14 只: S 组(假手术, 只穿线, 不结扎), I/R 组(单纯缺血再灌注), M 组(吗啡后处理 + 缺血再灌注), L + M 组(L-NAME + 吗啡后处理 + 缺血再灌注)。除 S 组外, 所有大鼠心脏都经历 45 min 缺血和 120 min 再灌注。观察血流动力学指标, 于再灌注 120 min 时, 各组随机取 9 只大鼠, 用 TTC 法染色, 计算心肌缺血梗死区(IA/AR); 其余 5 只大鼠, 取心肌, 用 Western Blot 技术分析总 eNOS 和磷酸化 eNOS 的蛋白表达, 硝酸盐还原酶法测定心肌 NO 含量。运用 SPSS 12.0 统计软件, 统计学分析采用方差分析及 SNK 检验。【结果】与 I/R 组比较, M 组梗死面积明显缩小, (32 ± 2.8) % vs (49 ± 2.9) % ($P < 0.01$); 磷酸化 eNOS 的蛋白表达明显增加; 心肌组织内 NO 含量也明显增加。非选择性一氧化氮合成酶抑制剂, L-NAME 完全消除吗啡后处理对心肌的保护作用, 明显降低吗啡后处理所诱导的心肌组织内 NO 含量的增加, 但并没有抑制吗啡后处理所诱导的磷酸化 eNOS 蛋白表达的增加。【结论】大鼠在体心脏缺血模型, 吗啡后处理可通过 eNOS/NO 信号通路, 抗心肌缺血/再灌注损伤。

关键词: 心肌再灌注损伤; 后处理; 吗啡; 一氧化氮

中图分类号: R543.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)05-0641-05

Nitric Oxide Mediates Cardioprotective Effects of Morphine Postconditioning in Myocardial Ischemia-reperfusion

WANG Zhi¹, ZHAO Hui-juan², JIN Dong-mei³, CHE Yue-juan¹,
LI Yu-juan¹, WANG Fei¹, PENG Shu-ling^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Operation Room, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

3. Department of Rehabilitation, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the cardioprotective effect of morphine postconditioning on ischemic reperfused rat heart and to test the hypothesis that phosphorylation of eNOS by morphine may participate in the cardioprotective effect of morphine after myocardial ischemia and reperfusion. 【Methods】 Rats subjected to 45 min of myocardial ischemia followed by 120 min of reperfusion were assigned to the following groups: sham-operated (S group), ischemia-reperfusion (I/R group), morphine postconditioning + I/R (M group), morphine postconditioning + L-NAME + I/R (L + M group). Infarct size was assessed by triphenyltetrazolium chloride staining. Akt phosphorylation expression was assessed by immunoblotting. The nitric oxide concentrations in cardiac tissue were quantified by a chemiluminescence detector. Statistical analysis was performed using SPSS 12.0 for Windows software. The statistical significance was determined by analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test. 【Results】 Morphine postconditioning reduced infarct size compared with that in the I/R group: 32 ± 2.8 % versus 49 ± 2.9 % ($P < 0.01$). eNOS phosphorylation expression increased after morphine postconditioning. Morphine postconditioning also resulted in marked increase in NO content. The cardioprotective effects and increased NO production of morphine

收稿日期: 2009-04-21

基金项目: 广东省医学科研基金(A2008179)

作者简介: 王志, 博士, 副主任医师; * 通信作者: 彭书峻, 博士, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: psl333@cncbb.net

postconditioning were significantly inhibited by L-NAME. However, pretreatment with L-NAME could not inhibit the phosphorylation of eNOS in morphine-treated rats. 【Conclusion】 Morphine postconditioning can reduce ischemia-reperfusion injuries in rat heart by increasing the phosphorylation of eNOS and the NO production.

Key words: myocardial reperfusion injury; postconditioning; morphine; nitric oxide

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(5): 641-645]

近年来的研究表明,直接靶向再灌注期的心肌缺血后处理(ischemic postconditioning)能产生明显的心肌保护效果。Zhao 等^[1]提出了心肌缺血后处理的概念,即心肌缺血再灌注前,短时间重复几个循环的结扎和开放冠脉,可以明显减轻再灌注损伤。在 Langendorff 心脏灌流离体模型上,有研究表明,吗啡后处理对心肌缺血/再灌注损伤有保护作用^[2]。NO 在维持血管舒张,抑制血小板聚集及白细胞粘附在血管壁上起作用,这些作用提示 NO 对缺血再灌注损伤可起保护作用^[3]。但目前尚不清楚,在体心肌缺血模型上,吗啡后处理对心肌缺血/再灌注损伤的影响及机制。本研究利用大鼠心肌缺血/再灌注损伤的在体模型,观察吗啡后处理对心肌缺血/再灌注损伤的作用及对信号通路 eNOS/NO 的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和试剂

SAR-830/P 小动物呼吸机 (IITC 公司,美国); Biopac MP150 监测系统 (Biopac Systems 公司,美国);数码相机 DSC-T10 (Sony 公司,日本)。吗啡 (批号 070901, 沈阳第一制药厂);伊文蓝 (Evans blue),氯化三苯基四氮唑 (TTC) 非选择性一氧化氮合成酶抑制剂 NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma 公司,美国);一抗 eNOS 兔多克隆抗体、抗磷酸化 eNOS 兔多克隆抗体,二抗抗鼠 IgG,HRP、二抗抗兔 IgG,HRP、蛋白分子质量标准及化学发光系统 Lumi GLO reagent and peroxide (Cell Signaling Technology 公司,美国);总一氧化氮检测试剂盒 (江苏碧云天生物科技公司);考马斯亮兰蛋白定量试剂盒 (南京建成生物医学工程研究所)。

1.2 心肌缺血/再灌注动物模型的建立

SD 大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 (60 mg/kg) 麻醉,仰卧固定于手术台上,气管插管后行人工机械通气,监测心电图,左颈内静脉置管,备用。右颈动脉置管,接监护仪,监测动脉血压。胸骨左侧

切开皮肤,在第 4 肋间进入胸腔,暴露心脏,剪开心包,用 6 号 Prolene 线结扎左冠状动脉前降支,结扎线以下心肌变为暗红色,心电图 T 波明显高尖,为结扎成功的标志。

1.3 动物分组及实验设计

SD 大鼠 56 只 (由中山大学动物中心提供,清洁级,证书号 SCXK2004-0011),随机分成 4 组,每组 14 只;S 组 (假手术,只穿线,不结扎);I/R 组 (单纯缺血再灌注);M 组 (吗啡后处理 + 缺血再灌注,再灌注前 3 min 和再灌注后 2 min 内静脉注入吗啡 1.25 mg/kg);L + M 组 ($n = 9$, L-NAME + 吗啡后处理 + 缺血再灌注,左冠状动脉前降支结扎前 20 min 静脉注入 10 mg/kg L-NAME 非选择性一氧化氮合成酶抑制剂)。除 S 组外,所有大鼠的心脏都经历 45 min 的缺血和 120 min 的再灌注。监测血流动力学指标,于再灌注 120 min 时,每组大鼠各取 9 个心脏,用于伊文蓝和 TTC 法染色,计算心肌缺血梗死区 (IA/AR)。其余大鼠心脏用于用 Western Blot 技术分析总 eNOS 和磷酸化 eNOS 的蛋白表达,硝酸盐还原酶法测定心肌 NO 含量。

1.4 心肌梗死面积测定

大鼠心脏再灌注 120 min 后,再次结扎左冠状动脉,左颈内静脉注入 1 mL 3%伊文蓝,100 g/L 氯化钾终止心跳,取出心脏标本以 PBS 漂洗,去除心房、右室及结扎线以上的左室心肌组织,将心脏横断面切成 2 mm 切片,置于 10 g/L TTC 染液中染色 20 min (37 °C)。分别称质量切片,用数码相机 (Sony, Camedia DSC-T10, Tokyo, Japan) 拍照,以 Image J (1.31v) 软件 (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA) 计算心肌梗死范围大小。每个心肌切片缺血区面积和梗死区面积占切片面积的百分比,然后,乘每个心肌切片的质量。缺血区 (AR, 伊文蓝未染区,红色) 及梗死区 (IA, TTC 未染区,白色),缺血区以缺血区质量占左室质量 (LV) 的百分比 (AR/LV) 表示。心肌梗死范围大小以梗死区质量占缺血区质量的百分比 (IA/AR) 表示。

1.5 蛋白质印迹(Western blot)检测

大鼠心脏再灌注 120 min 时,取心肌缺血区,冰冻于液氮,然后-80 °C保存。以备测定总 eNOS 和磷酸化 eNOS。心肌组织总蛋白提取,采用组织裂解液(10 mmol/L Tris HCl pH 7.4, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L Na₂EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.5% Nonidet P-40, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate, 2 mmol/L Na₃VO₄), 提取总蛋白 30 μg,加等量样本处理液,100 °C 煮沸 5 min,冷却。取等量的样品用 120 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转至硝酸纤维素膜。膜用含体积分数 50 mL/L 的牛血清白蛋白和 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4 和体积分数 1 mL/L Tween 20) 在室温下封闭。1 h 后用 eNOS 抗体(1:600)、磷酸化 eNOS 抗体(1:600)杂交,4 °C 下过夜。再与相应的二抗于室温下作用 1 h,免疫反应性条带用化学发光系统 Lumi GLOreagent and peroxide 检测,用 X 线胶片曝光记录。蛋白条带用 Bio.Rad Quantity One software(Hercules, CA)进行定量分析。

1.6 心肌组织 NO 含量测定

取心肌组织约 100 mg,加入预冷的 0.9 mL 蒸馏水,冰上匀浆至无肉眼可见的组织颗粒,准备好

组织匀浆。将匀浆液以 10 000 × g,4 °C 离心 10 min,取上清,上清液含一氧化氮、硝酸盐和亚硝酸盐,利用硝酸盐还原酶还原硝酸盐为亚硝酸盐,然后通过经典的 Griess reagent 检测亚硝酸盐,通过上述方法检测出所有的硝酸盐和亚硝酸盐的量,就可以推算出总的一氧化氮的量;蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法。

1.7 统计学处理

用 SPSS 12.0 统计软件,实验数据用均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示,统计学比较使用方差分析及 SNK 检验,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组血流动力学参数的变化

缺血前 3 组间心率(HR)、平均动脉压(MAP)和心率-收缩压乘积(RPP)差异无统计学意义($P > 0.05$)。再灌注 120 min 时,与各自平衡点相比,I/R 组、M 组和 L + M 组,MAP 和 RPP 明显降低($P < 0.05$)。但缺血及再灌注后,各组间血流动力学参数差异无统计学意义(表 1)。

表 1 各组血流动力学参数的比较

Table 1 Systematic hemodynamics

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Group	n	HR/min ⁻¹			MAP/mmHg			RPP/(10 ³ ·min ⁻¹ ·mmHg)		
		Baseline	20-min CAO	2-h CAR	Baseline	20-min CAO	2-h CAR	Baseline	20-min CAO	2-h CAR
I/R	9	336 ± 10	325 ± 13	309 ± 15	125 ± 9	113 ± 8	90 ± 9 ¹⁾	38 ± 3	33 ± 1	26 ± 4 ¹⁾
M	9	318 ± 11	309 ± 9	297 ± 13	115 ± 6	106 ± 2	91 ± 6 ¹⁾	33 ± 3	35 ± 3	24 ± 3 ¹⁾
L + M	9	325 ± 7	311 ± 10	297 ± 11	121 ± 8	112 ± 6	91 ± 9 ¹⁾	40 ± 2	34 ± 1	27 ± 5 ¹⁾

HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; RPP: rate-pressure product. 20-min CAO: 20 minutes after coronary artery occlusion; 2-h CAR: 2 hours after coronary artery reperfusion. 1) Compared with baseline values, $P < 0.05$

2.2 心肌梗死面积的变化

各组间,缺血区占左室(AR/LV)的百分比的差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1A)。与 I/R 组比较,M 组心肌梗死面积明显缩小,梗死区占缺血区(IA/AR)的百分比为(32 ± 2.8)% vs (49 ± 2.9)% ($P < 0.01$);非选择性一氧化氮合成酶抑制剂,l-NAME 完全消除吗啡后处理对心肌的保护作用,W + M 组心肌梗死面积为(48 ± 3.3)% (图 1B)。

2.3 吗啡后处理对总 eNOS 和磷酸化 eNOS 的影响

各组间,总 eNOS 表达的差异无统计学意义($P > 0.05$)。以各组磷酸化 eNOS 与总 eNOS 的比

值进行比较,吗啡后处理使磷酸化 eNOS 增高。与 I/R 组比较,M 组磷酸化 eNOS 的增高有统计学意义($P < 0.05$),l-NAME 没有抑制吗啡后处理所诱导的磷酸化 eNOS 蛋白表达的增加(图 2,3)。

2.4 吗啡后处理对心肌组织 NO 含量的影响

与假手术的对照组比较,缺血/再灌注损伤组心肌组织内 NO_x 含量明显减少 ($P < 0.05$),吗啡后处理明显增加心肌组织内 NO_x 含量,而非选择性一氧化氮合成酶抑制剂,l-NAME 明显降低心肌组织内 NO_x 含量(表 2)。

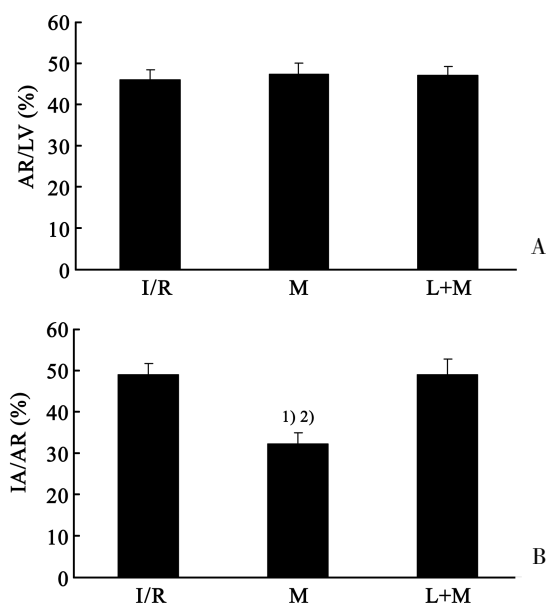


图 1 吗啡后处理对心肌梗死面积的影响

Fig.1 Effect of morphine postconditioning on infarct size in myocardial ischemia-reperfusion injury

Bar graphs showing the ratio of area at risk to left ventricular mass (AR/LV, A) and infarct size as percentage of the area at risk (IA/AR, B). 1) Compared with I/R group, $P < 0.01$, 2) Compared with the L + M group, $P < 0.01$

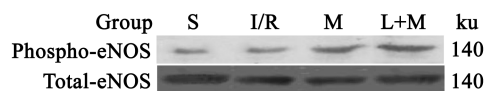


图 2 总 eNOS 和磷酸化 eNOS 蛋白表达的 Western blot 结果

Fig.2 Representative Western blot analysis of phosphorylation of eNOS and total eNOS

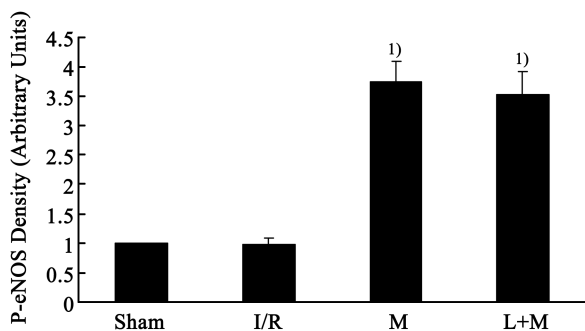


图 3 吗啡后处理对磷酸化 eNOS 表达的影响

Fig.3 Effect of morphine postconditioning on the expression of phosphorylation eNOS

Histograms depicting the relative density of phospho-eNOS in each experimental group. Values in the graphs are expressed as fold changes over the sham group and are presented as $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. 1) compared with the I/R group, $P < 0.05$

表 2 心肌组织 NO 的含量

Table 2 The content of NO in myocardial tissue

$(\bar{x} \pm s_{\bar{x}})$		
Group	n	NOx
S	5	2.02 ± 0.17
I/R	5	1.42 ± 0.12 ¹⁾
M	5	2.68 ± 0.24 ^{1) 2)}
L + M	5	1.32 ± 0.13 ^{1) 3)}
F		13.53
P		0.000

Values are $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; n, number of rats. Rats were subjected to 45 minutes of ischemia before 2 hours of reperfusion. 1) Compared with Sham group, $P < 0.05$; 2) Compared with I/R group, $P < 0.01$; 3) Compared with M group, $P < 0.05$

3 讨论

目前已知的保护心脏,减少心肌缺血/再灌注损伤最有力的方法是缺血预适应或缺血后适应。但因伦理道德及使用不便等原因限制其临床运用^[4]。用药物代替缺血,采用更为合理的诱导方法来调动这种内源性保护机制成为目前心血管领域研究重点。麻醉药对心脏保护作用的研究由来已久。作用于中枢神经系统阿片受体产生镇痛作用的吗啡,具有明显的抗心肌缺血/再灌注损伤作用。研究发现^[5],吗啡预处理可以对抗大鼠心肌的缺血/再灌注损伤,这种保护作用是通过心肌局部的阿片受体及心肌细胞的 KATP 通道介导产生的。毛张凡等^[2]研究显示,运用 Langendorff 心脏离体灌流模型,吗啡后处理对心肌缺血/再灌注损伤有保护作用。运用心脏在体缺血模型,我们的研究结果显示,吗啡后处理明显降低心肌梗死面积。本实验中,选用非选择性一氧化氮合成酶抑制剂, L-NAME 完全消除吗啡后处理对心肌的保护作用,说明一氧化氮参与了吗啡后处理的心肌保护作用。

持续基础的 NO 释放,对维持血管内皮细胞的完整性起着重要作用。NO 化学性质不稳定,生理状态下半衰期为 3 ~ 5 s,在细胞内很快代谢为硝酸盐和亚硝酸盐,通过硝酸还原酶法检测出所有的硝酸盐和亚硝酸盐的量,就可以推算出总的一氧化氮的量。NO 除了能调节血管平滑肌张力外,还有抗氧化、抗氧自由基、保护血管内皮细胞等复杂的生理病理作用^[6]。NO 能激活蛋白激酶 C

(PKC), 后者被认为是内源性活性物质介导心脏保护作用时细胞内信号转导的共同通路, 故 NO 可能在缺血预适应心脏保护中起着重要作用^[7]。NO 由 NO 合酶(NOS)催化左旋精氨酸生成, 迄今为止, 已知有三种 NOS 参与 NO 的生物合成: 内皮型(eNOS)、诱导型(iNOS)和神经元型(nNOS), 已知与缺血预处理有关的物质如腺苷^[8]、乙酰胆碱^[9]和缓激肽^[10]等均可促进 eNOS 诱导的一氧化氮合成, 提示 NO 可能参与了缺血预处理。

本研究通过蛋白质印迹技术及硝酸盐还原酶法测定发现, 吗啡后处理使磷酸化 eNOS 表达明显增加和心肌组织内 NO 含量明显增加, 这与吗啡后处理引起的心肌梗死面积减小相一致。非选择性一氧化氮合成酶抑制剂, *l*-NAME 完全消除吗啡后处理对心肌的保护作用, 明显降低吗啡后处理所诱导的心肌组织内 NO 含量的增加。提示 eNOS/NO 信号通路参与了吗啡后处理对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用。本研究中, *l*-NAME 没有抑制吗啡后处理所诱导的磷酸化 eNOS 蛋白表达的增加。内源性 NO 是由 NO 合酶催化 *l*-精氨酸末端胍基中的一个氮原子氧化而生成, *l*-NAME 是 *l*-精氨酸竞争性拮抗剂, 虽然对磷酸化 eNOS 蛋白表达没有影响, 却显著降低了内源性 NO 的产量。

大量的实验证明, eNOS 是 Akt 下游的一个信号分子。研究显示, 磷酸化 eNOS 可改变酶的活性, 增加由切力应激所诱导的 NO 产生^[11-12]。1999 年, 有两个实验室报道, Akt 磷酸化 eNOS 通过 PI3K 依赖途径^[13-14]。胰岛素和雌激素均可通过 PI3K/Akt 信号通路激活 eNOS 产生 NO。我们的实验证实, 吗啡后处理通过磷酸化 eNOS 明显增加 NO 的量。至于 Akt 与 NO 这两个信号分子间的具体联系及机制仍有待进一步阐明。

参考文献:

[1] 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): H579-588.

[2] 毛张凡, 杜心灵, 孙宗全, 等. 阿片受体参与大鼠缺血后处理的心肌保护作用 [J]. *华中科技大学学报: 医*

学版, 2007, 36(5): 610-613.

- [3] Burwell LS, Brookes PS. Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(3): 579-599.
- [4] Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart [J]. *Circulation*, 2005, 112(14): 2143-2148.
- [5] 江晓菁, 师恩玮, 常业恬, 等. 吗啡在大鼠心肌缺血再灌注中的保护效应 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2002, 22(2): 559-561.
- [6] 马国川, 夏焱, 郭海霞, 等. 心肌 eNOS 表达和 NO 的改变对糖尿病大鼠缺血再灌注损伤的影响 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 29(5): 516-520.
- [7] Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning [J]. *Heart Fail Rev*, 2007, 12(3-4): 181-188.
- [8] Mullane K, Bullough D. Harnessing an endogenous cardioprotective mechanism: cellular sources and sites of action of adenosine [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27(4): 1041-1054.
- [9] Yao Z, Gross GJ. Role of nitric oxide, muscarinic receptors and the ATP-sensitive K⁺ channel in mediating the effects of acetylcholine to mimic preconditioning in dogs [J]. *Circ Res*, 1993, 73(6): 1193-1201.
- [10] Goto M, Liu Y, Yang XM, et al. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts [J]. *Circ Res*, 1995, 77(3): 611-621.
- [11] Corson MA, James NL, Latta SE, et al. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress [J]. *Circ Res*, 1996, 79(5): 984-991.
- [12] Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, et al. Ca²⁺-Independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress [J]. *Circ Res*, 1998, 82(6): 686-695.
- [13] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt [J]. *Nature*, 1999, 399(6736): 597-601.
- [14] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation [J]. *Nature*, 1999, 399(6736): 601-605.

(编辑 徐杰)