吗啡后处理抑制缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及其抗氧化机制

王 志[1], 赵惠娟[2], 彭 俊[1], 车月娟[1], 李玉娟[1], 曾静贤[1], 彭书岭[1*]
(中山大学 1.附属第二医院麻醉科, 广东 广州 510120; 2.附属第一医院手术室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨吗啡后处理抑制缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的作用以及与氧化应激的关系。【方法】SD大鼠45只随机分成3组,每组15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)。再灌注末,TUNEL染色检测细胞凋亡,检测氧化应激指标和心肌caspase-3的活性。【结果】再灌注120 min,可在I/R组缺血区心肌检测到大量凋亡心肌细胞(18.0 ± 1.1)%,吗啡后处理显著降低心肌细胞凋亡指数(10.8 ± 1.2)%,$P < 0.01$)。与I/R组相比,吗啡后处理明显上升了心肌组织超氧化物歧化酶(SOD)活力,降低了心肌组织丙二醛(MDA)含量($P < 0.01$)。与假手术的对照组比较,缺血再灌注损伤组caspase-3活性明显增强($P<0.01$),而吗啡后处理组明显降低了缺血再灌注损伤所增强的caspase-3活性($P < 0.01$)。【结论】大鼠在体心脏缺血模型,吗啡后处理可通过抗氧化应激,抑制缺血再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡。

关键词: 心肌再灌注损伤; 后处理; 吗啡; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 凋亡
中图分类号: R543.31 **文献标识码**: A **文章编号**: 1672-3554(2009)05-0532-05

Anti-apoptotic Effect of Morphine Postconditioning on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Its Anti-oxidative Stress Mechanism

WANG Zhi[1], ZHAO Hui-juan[2], PENG Jun[1], CHE Yue-juan[1],
LI Yu-juan[1], ZENG Jing-xian[1], PENG Shu-ling[1*]
(1. Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital;
2. Department of Operation Room, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the anti-apoptotic effect of morphine postconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury and its relationship to the oxidative stress.【Methods】Forty-five rats were randomly separated into 3 groups: sham-operated (S group), ischemia-reperfusion (I/R group), morphine postconditioning + I/R (M group). Cardiac myocyte apoptosis was determined quantitatively by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) methods. The amount of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) and caspase-3 in myocardium were measured at the end of the reperfusion period.【Results】A significant number of TUNEL positive cells [(18.0 ± 1.1)%] were observed in myocardial tissue from hearts subjected to 45 min of myocardial ischemia followed by 120 min of reperfusion. Administration of morphine exerted a significant anti-apoptotic effect, as evidenced by reduced TUNEL-positive staining [(10.8 ± 1.2)%, $P < 0.01$ versus I/R]. Compared with the I/R group, treatment with morphine inhibited the rise in MDA and increased SOD activity in the myocardial tissue ($P < 0.01$). Caspase-3 activity was increased in the myocardial tissue after ischemia-reperfusion injury compared with that in sham-operation group ($P < 0.01$). Treatment with morphine reduced this elevation compared with the I/R group ($P < 0.01$).【Conclusion】Morphine postconditioning can significantly reduce ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis via mediating oxidative stress in rats.

Key words: myocardial reperfusion injury; postconditioning; morphine; SOD; MDA; apoptosis
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2009,30(5):532-536]

收稿日期: 2009-02-19
基金项目: 广东省医学科研基金(A2008179)
作者简介: 王 志,博士,主治医师; * 通信作者:彭书岭,博士,主任医师,硕士导师,E-mail: psl333@cncbb.net

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。2003 年,Zhao 和他的同事提出了心肌缺血后处理的概念[1],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]。心肌细胞凋亡在心肌缺血再灌注损伤所起的作用越来越受到关注。目前认为，缺血再灌注损伤导致的细胞凋亡主要与氧自由基生成、钙超载、白细胞激活和能量代谢障碍有关。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细胞凋亡的影响及与氧化应激的关系。本研究旨在利用大鼠在体心肌缺血模型,观察吗啡后处理抑制缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的作用及对丙二醛(malondialdehyde,MDA) 和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)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);DAPI (4,6-联脒-2-苯基吲哚)(Sigma 公司,美国);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒,丙二醛(MDA)测定试剂盒,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)；一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(江苏碧云天生物科技公司)。

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　实验动物分组

SD大鼠 45 只,体质量 280 ~ 320 g,雄性(中山大学动物中心提供,清洁级，证书号 SCXK2004-0011),随机分成 3 组:S 组(n = 15,假手术,只穿线,不结扎)；I/R 组(n = 15,单纯缺血再灌注)；M 组(n = 15,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)。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,各组大鼠各取 9 个心脏,TUNEL 染色检测细胞凋亡。其余 6 个心脏用于检测氧化应激指标和心肌 caspase-3 的活性。

1.4　荧光分光光度法检测 caspase-3 活性

检测前准备：参照试剂说明书以已知量的游离 AMC 做出工作曲线(荧光强度)。胞浆 caspase-3 样本制作:再灌注 120 min 后,将冷盐水漂洗干净的缺血区心肌组织,约 50 mg 放入玻璃匀浆器,加入 1 ml 裂解液在冰上充分匀浆,然后将匀浆液转移至离心管。将匀浆液以 10 000 × g,4 ℃离心 10 min,吸取上清液备用。用考马斯亮蓝法检测样品上清液蛋白浓度。caspase-3 荧光底物检测,空白对照管:在 Eppendorf 管中加入 480 μL caspase-3 缓冲液,20 μL 底物;样本管:在 Eppendorf 管中在加入 460 μL caspase-3 缓冲液,20 μL 底物，混匀后再加入 20 μL 样本;将所有 Eppendorf 管置于 37 ℃ 孵育 60 min,测量荧光强度;每个样本的实际荧光强度 = 样本管荧光强度-空白对照管荧光强度。根据样品上清液蛋白浓度计算单位剂量 caspase-3 的荧光强度。

1.5　心肌细胞凋亡检测

采用末端脱氧核苷基转移酶介导的 dUTP 原位平端标记法(TUNEL)定量检测心肌细胞凋亡。心肌细胞原位凋亡检测方法简述如下：再灌注 120 min 后,取缺血区心肌组织,固定、包埋、切片。按原位凋亡试剂盒检测程序标记、检测凋亡细胞。荧光显微镜下,TUNEL 染色可见凋亡的心肌细胞呈绿色,DAPI 染色可见心肌细胞呈蓝色。荧光显微镜观察,计数,每张切片取 5 个视野,每个视野计数 150 ~ 200 个心肌细胞中凋亡细胞数,平均计算 TUNEL 染色阳性细胞百分比作为凋亡指数(apoptosis index,AI);拍照。计算:凋亡指数(apoptotic index,AI) = 凋亡细胞数/计数细胞总数 × 100%。

1.6　测定心肌组织氧化应激指标

黄嘌呤氧化酶法测定 SOD，硫代巴比妥酸法测定 MDA。取组织块 300 mg 在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称质量,放入 5 mL

的小烧杯内加入生理盐水,体积是组织块的9倍,用小剪子将组织剪碎(在冰上进行)。冰上研磨成组织匀浆,匀浆至无肉眼可见的组织颗粒,取0.1 mL组织匀浆用于测MDA,剩下的4 500 × g离心20 min,上清液为SOD抽提液。按照MDA、SOD试剂盒说明书配制试剂,测定各管吸光度,考马斯亮蓝检测蛋白含量。根据组织中SOD、MDA含量公式计算其含量。

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($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较使用方差分析及SNK检验,以$P < 0.05$为差异有统计学意义。

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)无显著性差异($P > 0.05$)。再灌注120 min时,与各自平衡点相比,I/R组和M组,MAP和RPP明显降低($P < 0.05$)。但缺血及再灌注后,两组间血流动力学参数无显著性差异($P > 0.05$,表1)。

表1 各组血流动力学参数的比较

Table 1 Systemic hemodynamics ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	HR (min^{-1})			MAP(mmHg)			RPP($\times 10^3$ mmHg/min)		
		Baseline	20-min CAO	2-h CAR	Baseline	20-min CAO	2-h CAR	Baseline	20-min CAO	2-h CAR
S	9	320 ± 6	332 ± 10	330 ± 9	120 ± 7	117 ± 6	126 ± 6	40 ± 4	37 ± 3	38 ± 2
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)]

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

2.2 吗啡后处理对心肌caspase-3活性的影响

与假手术的对照组比较,缺血再灌注损伤组caspase-3活性明显增强($P < 0.01$),而吗啡后处理组明显降低了缺血再灌注损伤所增强的caspase-3活性($P < 0.01$,表2)。

表2 Caspase-3蛋白酶活性变化

Table 2 Caspase-3 activity after ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Caspase-3 activity
S	6	100 ± 0
I/R	6	377 ± 7[1)]
M	6	229 ± 9[2)]
F		75.114
P		0.000

Rats were subjected to 45 min of ischemia before 2 h of reperfusion; 1) Compared with Sham group $P < 0.01$; 2) Compared with I/R group $P < 0.01$.

2.3 凋亡检测结果

荧光显微镜下,TUNEL染色可见凋亡的心肌细胞呈绿色,DAPI染色可见心肌细胞呈蓝色(图1)。缺血再灌注组和吗啡后处理组TUNEL阳性细胞较假手术组显著性升高($P < 0.01$);吗啡后处理组TUNEL阳性细胞显著低于缺血再灌注组($P < 0.01$;图2)。

2.4 吗啡后处理对心肌氧化应激状态的影响

再灌注末,缺血再灌注损伤导致了心肌组织中的MDA含量显著升高,相应的,SOD活力的显著下降。与I/R组相比,吗啡后处理明显上升了心肌组织SOD活力,降低了MDA含量($P < 0.01$,图3)。

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[3]。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。吗啡作为中枢性镇痛药,不仅可以作用于中枢神经系统的阿片受体产生镇痛作用,还对心肌的缺血再灌注损伤具有明显的保护作用。多项研究

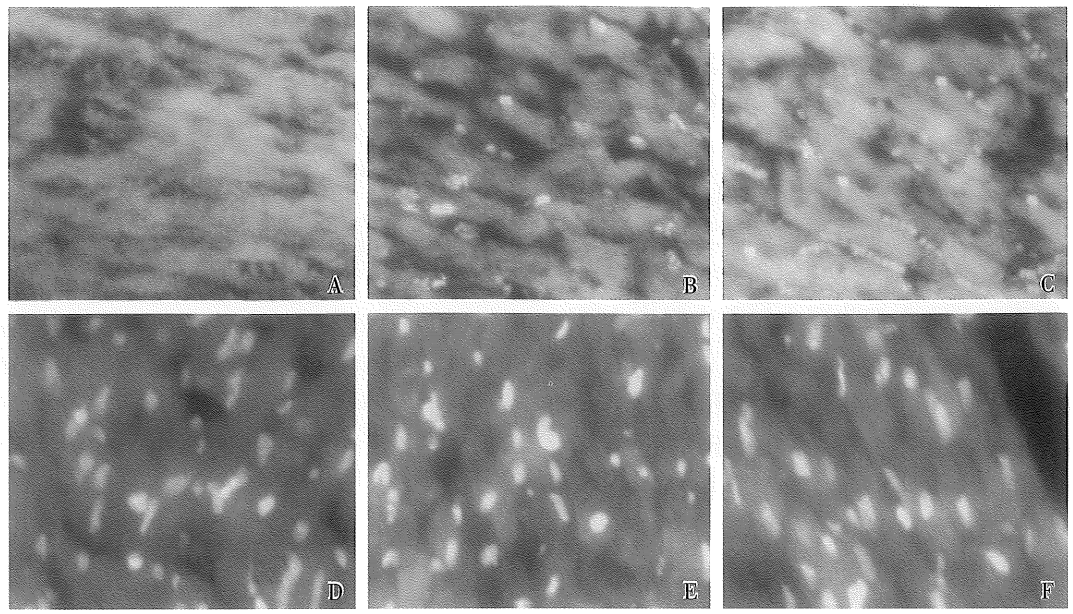


图 1　荧光标记 TUNEL 实验示心肌细胞凋亡情况

Fig.1　Myocardial apoptotic nuclei were detected by TUNEL staining

Apoptotic nuclei were detected by TUNEL staining (green, ×200). A: sham-operated group; B: ischemia-reperfusion group; C: morphine postconditioning group. Total nuclei were labeled with DAPI (blue, ×200); D: sham-operated group; E: ischemia-reperfusion group; F: morphine postconditioning group.

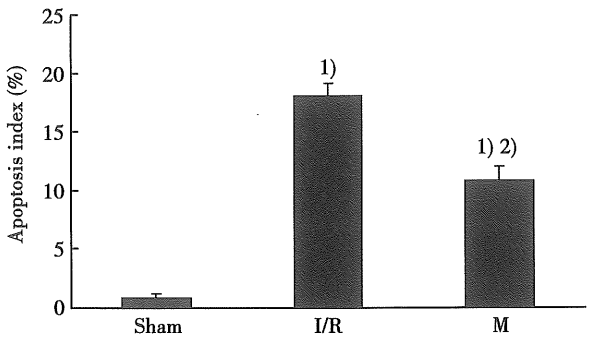


图 2　吗啡后处理对心肌细胞凋亡的影响

Fig.2　Effect of morphine postconditioning on apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury

1) Compared with sham group $P<0.01$; 2) Compared with the I/R group $P<0.01$; Error bar: standard deviation

证实[4],吗啡能模拟缺血预处理(ischemia preconditioning,IPC)的心肌保护效应,明显减少局灶性心肌缺血再灌注引起的梗死范围，阿片受体拮抗剂纳洛酮能完全阻断吗啡和 IPC 的心肌保护效应。在 Langendorff 心脏灌流离体模型上，毛张凡等[2]研究表明,吗啡后处理也对心肌缺血/再灌注损伤有保护作用。运用在体大鼠心脏缺血/再灌注模型,我们的研究结果显示,吗啡后处理明显降低心肌细胞凋亡。

动物实验和临床的研究发现，细胞凋亡可能

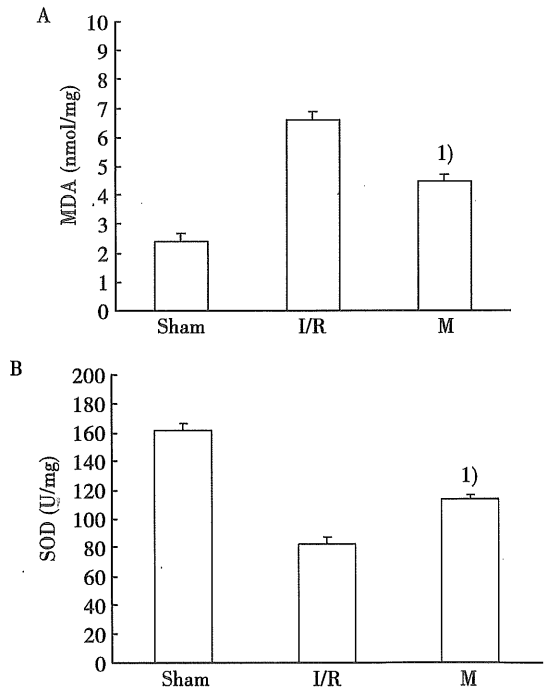


图 3　吗啡后处理对心肌组织 MDA 和 SOD 的影响

Fig.3　Effect of morphine postconditioning on MDA and SOD in myocardial ischemia-reperfusion injury

1) Compared with I/R group, $P < 0.01$; Error bar: standard deviation

是心肌缺血/再灌注损伤发病机制的重要环节之一[5-6]。Gottlieb 等[7]首先在兔心脏上发现再灌注损

伤促进了细胞凋亡。Cao 等[8]采用原位末端标记和琼脂糖凝胶电泳证实，缺血和缺血再灌注的大鼠有典型的凋亡形态学改变和 DNA 梯状电泳改变，即再灌注损伤可导致心肌细胞凋亡。有研究者证实，在动物心脏移植排斥反应中，移植 3 d 后出现大量凋亡的心肌细胞[9]。Caspase-3 为天冬酰胺特异酶切的半胱氨酸蛋白酶，是细胞凋亡早期阶段激活的关键蛋白酶，在细胞凋亡过程中起中心环节作用，故也被称为死亡蛋白酶，是目前已知的凋亡最后执行因子[10-11]。Moolman 等[12]研究发现，大鼠心脏灌流离体模型上，缺血预处理通过抑制 Caspase-3 的激活，减少缺血/再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡。虽然有报道[13]，缺血/再灌注损伤模型中，缺血及吗啡预处理均可减少心肌细胞凋亡，与我们本研究的结果一致，但目前尚无吗啡与 Caspase-3 活性之间关系的报道。本研究发现，吗啡后处理明显降低了缺血/再灌注损伤所增强的 caspase-3 活性。提示吗啡后处理可通过降低 caspase-3 活性减少心肌细胞凋亡。

目前认为，缺血/再灌注损伤导致的细胞凋亡主要与氧自由基生成、钙超载、白细胞激活和能量代谢障碍有关。其中氧化应激在缺血/再灌注损伤细胞凋亡中作用受到广泛关注[14]。超氧化物歧化酶(SOD)是体内一种重要的自由基清除剂，可清除超氧阴离子，而后者是生成一系列氧自由基的启动环节。丙二醛(MDA)则是脂质过氧化的代谢产物，可作为判断对细胞氧化应激损伤程度的指标之一。本实验结果显示：较之假手术组，I/R 组大鼠心肌超氧化物歧化酶活性显著降低，丙二醛含量显著升高。提示氧化应激参与了大鼠的心肌缺血/再灌注损伤；较之 I/R 组大鼠，吗啡后处理超氧化物歧化酶活性升高，丙二醛含量显著降低，与吗啡后处理减少心肌细胞凋亡的保护作用一致。提示吗啡后处理可通过某种机制使脂质过氧化过程受到抑制，同时又通过提高内源性抗氧化酶活性而减轻氧自由基对心肌的损伤。此抗氧化作用可能也是其对心肌缺血再灌注损伤产生保护作用的机制之一。

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] Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart [J]. Circulation, 2005,112(14):2143-2148.

[4] Peart JN, Gross ER, Gross GJ. Opioid-induced preconditioning: recent advances and future perspectives [J]. Vascul Pharmacol, 2005,42(5-6):211-218.

[5] 马国川，夏　焱，罗向阳，等. 糖尿病大鼠生存信号改变对缺血再灌注损伤及心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中山大学学报：医学科学版，2006,27(5):510-514.

[6] 陈寄梅，张镜方，林秋雄，等. 未成熟心肌缺血-再灌注损伤与细胞凋亡 [J]. 中山大学学报：医学科学版，2004,25(B06):92-93.

[7] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes [J]. J Clin Invest, 1994,94(4):1621-1628.

[8] Cao Z, Ye P, Long C, et al. Effect of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist on ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Pharmacology, 2007,79(3):184-192.

[9] Downey JM, Davis AM, Cohen MV. Signaling pathways in ischemic preconditioning [J]. Heart Fail Rev, 2007,12(3-4):181-188.

[10] Vila-Petroff M, Salas MA, Said M, et al. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2007,73(4):689-698.

[11] Vannay-Bouchiche C, Pesse B, Levrand S, et al. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo [J]. Free Radic Biol Med, 2006,41(6):886-895.

[12] Moolman JA, Hartley S, Van Wyk J, et al. Inhibition of myocardial apoptosis by ischaemic and beta-adrenergic preconditioning is dependent on p38 MAPK [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2006,20(1):13-25.

[13] Okubo S, Tanabe Y, Takeda K, et al. Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004,287(4):H1786-1791.

[14] 胡志伟，杨运海，张凯伦，等. 3-硝基丙酸化学预处理对大鼠离体心脏缺血-再灌注损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志，2005, 25(5):364-366.

(编辑　徐　杰)