

网络出版时间: 2021-05-14 14:53 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1448.003.html>

AKT/mTOR 信号通路介导神经病理性疼痛对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

李玉为 张巧云 曹亚红 王家友 李 锐

摘要 目的 探讨神经病理性疼痛对大鼠心肌缺血灌注损伤的影响及蛋白激酶 B (AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路参与该过程的调节机制。方法 SD 大鼠 42 只, 体重 250~320 g (10 周龄), 采用随机数字表法分为 3 组: 对照组 (Con 组)、心肌缺血再灌注损伤组 (I/R 组)、神经病理性痛 + 心肌缺血再灌注损伤组 (NP + I/R 组)。采用坐骨神经慢性缩窄损伤 (CCI) 法制备神经病理性疼痛模型, 术前、术后第 3、7、14 天测定各组大鼠机械缩足反应阈 (MWT) 和热缩足潜伏期 (TWL), 术后第 14 天结扎左冠状动脉前降支, 缺血 30 min 再灌注 120 min, 建立心肌缺血再灌注损伤模型。术毕取心脏制作切片, 检测梗死区 (IS) 和缺血危险区 (AAR), 计算心肌梗死面积。Western blot 法检测心肌组织

AKT/mTOR 信号通路和自噬相关的 AKT、mTOR 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 蛋白表达。结果 与 Con 组相比, I/R 组和 NP + I/R 组 CCI 术后第 3、7、14 天的 MWT 和 TWL 降低, I/R 组 IS/AAR 增加, p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值降低, LC3-II/I 比值增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 I/R 组相比, NP + I/R 组 IS/AAR 降低, p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值增加, LC3-II/I 比值降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 神经病理性疼痛减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤, 其机制可能与神经病理性疼痛调控 AKT/mTOR 信号通路抑制细胞过度自噬有关。

关键词 神经病理性疼痛; 心肌缺血再灌注损伤; 心肌保护
中图分类号 R 541.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0850-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.003

2021-03-19 接收

基金项目: 安徽省高校科学研究项目 (编号: KJ2019A0283)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院麻醉与围术期医学科 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室, 合肥 230601

作者简介: 李玉为, 女, 硕士研究生;

李 锐, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lrayd@sina.com

心肌缺血是缺血性心脏病患者发病和死亡的主要原因之一, 往往需要溶栓或经皮冠状动脉介入治疗。冠状动脉缺血一段时间后再灌注会进一步加重心肌损伤。缺血预处理可以有效减轻心肌缺血再灌

rate of podocytes. High-intension imaging system was used to detect cell proliferation, podocyte migration was measured by transwell and cell scratch assay, Western blot detected the expression of AKT/NF- κ B signaling pathway related proteins, apoptotic protein Bim, and the podocyte marker proteins WT-1, Podocin and desmin. **Results**

Compared with the normal group, the results of Annexin FITC/PI double staining showed that the apoptosis rate of podocytes in the high glucose group increased ($P < 0.01$); The high-content imaging system showed that the number of podocytes in the high glucose group decreased ($P < 0.01$); Transwell showed that the number of podocytes migrate ability increased in the high glucose group ($P < 0.01$); The cell scratch showed that the scratch healing rate of the high glucose group increased ($P < 0.01$); Western blot showed that the expression levels of p-AKT, p-p65, p-I κ B α , Bim, and desmin protein in the podocytes of the high glucose increased ($P < 0.01$), and the expression of WT-1 and Podocin proteins decreased ($P < 0.01$). Compared with the high glucose group, the apoptosis rate of podocytes decreased after add BBR ($P < 0.05$); the number of podocytes increased in the different concentrations of BBR ($P < 0.01$); the number of podocyte migration was lower ($P < 0.05$); Scratch healing rate decreased ($P < 0.01$); In addition, BBR reduced the protein expression levels of p-AKT, p-p65, p-I κ B α , Bim and desmin ($P < 0.05$), the expression level of WT-1 and Podocin protein increased ($P < 0.01$). **Conclusion** BBR may improve the podocyte injury, inhibit the podocyte apoptosis, and weaken the podocyte migration ability induced by high glucose through regulating AKT/NF- κ B signaling pathway.

Key words berberine; diabetic nephropathy; podocyte; AKT; NF- κ B; signaling pathway

注损伤^[1], 研究^[2]表明伤害性刺激也可以产生类似的保护效应。神经病理性疼痛是躯体感觉神经系统损伤或疾病引起的疼痛, 但其对心肌缺血再灌注损伤是否有保护作用尚有争议^[3-5]。心肌缺血再灌注损伤后自噬增强, 与蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路有关^[6]。自噬细胞通过自身细胞器与溶酶体融合后降解, 供新功能物质合成, 对细胞存活有利, 但过度自噬会加重心肌缺血再灌注损伤^[7]。该研究拟观察神经病理性疼痛对大鼠心肌缺血再灌注的影响, 并从细胞自噬的角度初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 42 只雄性成年 SD 大鼠, 体重 250 ~ 320 g (10 周龄), 由安徽医科大学实验动物中心提供。采用随机数字表法分为三组 ($n = 14$): 对照组 (Con 组)、心肌缺血再灌注损伤组 (I/R 组) 和神经病理性痛 + 心肌缺血再灌注损伤组 (NP + I/R 组)。动物饲养环境温度控制为 $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 湿度控制为 $(40 \pm 15) \%$, 昼夜节律按 12 h/12 h 进行周期性调节饲养。

1.2 主要试剂和仪器 2,2-联喹啉-4,4'-二甲酸二钠 (BCA) 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天科技研究所; HE 染色试剂盒购自南京建成生物研究所; AKT、p-AKT、p-mTOR、mTOR 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、 β -actin 均购自美国 Abcam 公司; 山羊抗兔和山羊抗鼠二抗均购自北京中杉金桥生物科技有限公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; 氯化三苯基四氮唑 ($2,3,5$ -triphenyltetrazoliumchloride, TTC) 购自美国 Sigma 公司; von Frey 触痛仪购自美国 IITC 公司; BME 410A 热痛刺激仪购自中国医学科学院生物工程研究所; HX-300S 型动物呼吸机购自成都泰盟科技有限公司; PowerLab 系统购自澳大利亚 AD 公司; Tanon 全自动凝胶成像系统购自上海天能科技有限公司。

1.3 模型制备

1.3.1 神经病理性疼痛模型建立 根据文献^[8]采用坐骨神经慢性缩窄损伤 (chronic constriction injury, CCI) 法制备大鼠神经病理性疼痛模型。腹膜注射戊巴比妥钠 45 mg/kg, 大鼠麻醉后, 在左下肢股骨下方约 1 cm 处切开皮肤, 于股二头肌间隙钝性肌

肉分离, 暴露坐骨神经。用 4-0 铬肠线结扎坐骨神经干, 间隔约 1 mm, 结扎 4 道, 结扎坐骨神经干时以见左下肢轻微震颤为度。NP + I/R 组大鼠接受 CCI 术, Con 组与 I/R 组仅暴露坐骨神经, 不结扎。

1.3.2 心肌缺血再灌注损伤模型建立 在 CCI 术后第 14 天, 根据参考文献^[9]建立 I/R 损伤模型。加热垫将其温度保持在 $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 大鼠腹腔注射 45 mg/kg 的戊巴比妥钠麻醉后气管切开, 连接动物呼吸机, 设置呼吸频率 70 ~ 80 次/min, 潮气量为 20 ~ 30 ml/kg 进行机械通气。右颈总动脉切开置管, 通过压力换能器, 连接 PowerLab 系统, 记录有创平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP) 和心电图。沿左锁骨中线切开皮肤 2 cm, 在第 4、5 肋间开胸, 打开心包膜暴露心脏。将带有 6-0 Prolene 线的圆针在左耳下方 2 mm 处进针, 深度为 1.0 ~ 1.5 mm, 宽度为 2 ~ 3 mm, 从肺动脉圆锥下出针。稳定 15 min 后, 通过拉紧线结形成左冠状动脉前降支闭塞, 形成心肌缺血。I/R 组和 NP + I/R 组大鼠心肌缺血 30 min, 再灌注 120 min; 而 Con 组仅进行开胸、穿线。

1.4 实验方法

1.4.1 疼痛行为学评估 在术前、术后第 3、7、14 天时测定大鼠机械缩足反应阈 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反应潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 评价疼痛行为。将大鼠置于带金属网底的有机玻璃笼内, 待其适应环境 30 min 后, 手平持 von Frey 触痛仪的刺激针缓慢接触大鼠左侧足底, 记录大鼠突然出现缩足反应时的数值。重复测量 3 次, 间隔时间大于 10 s, 取其平均值作为 MWT, 评价机械痛阈。将大鼠置于底部为特制玻璃 (2 mm 厚度) 的笼内, 适应环境 30 min 后, 采用 BME 410A 热痛刺激仪热辐射光源照射左侧足底, 记录从照射开始至大鼠出现快速抬足反应的时间。重复测定 3 次, 每次间隔 10 min, 取其平均值作为 TWL, 评价热痛阈。

1.4.2 心律失常评分 连续记录心电图, 于再灌注 30 min 内记录室性早搏 (premature ventricular contraction, PVCs) 及室性心动过速/心室颤动 (ventricular tachycardia/ventricular fibrillation, VT/VF) 发生次数。心律失常评分标准^[10]: 记录时间内 PVCs < 50 次为 0 分; 记录时间内发生 PVCs 50 ~ 499 次记 1 分; 记录时间内发生 PVCs ≥ 500 次和 (或) 短暂的自发性 VT/VF 记 2 分; 记录时间内发生短暂的自发性 VT/VF, 总持续时间不到 1 min 记 3 分, 1 ~ 2 min 记 4 分, > 2 min 记 5 分。

1.4.3 心肌梗死面积测定 在心肌缺血再灌注结束后,采用颈椎脱臼法处死大鼠,取出心脏用 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)灌注冲去血液,然后扎紧左冠状动脉处的线结,从主动脉逆行灌注 0.25% 伊文思蓝(evans blue) 染料 0.5 ml,置于 -80°C 冰箱冷冻。将冷冻心脏切成 5~6 片,厚 2 mm,置于 1% TTC 37°C 下温孵 10 min 后用 10% 甲醛固定。使用 Imaging J 软件(Version 1.45,美国) 分析左室(left ventricle, LV)、右心室(right ventricle, RV)、心脏缺血危险区(area at risk, AAR) 和梗死区(infarct size, IS) 面积和 IS/AAR 值。

1.4.4 HE 染色 取结扎部位以下心脏组织置于 4% 多聚甲醛中固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片。切片经脱蜡后水洗,苏木精染色、95% 乙醇分色、水洗、反蓝,然后 0.5% 伊红液中染色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。

1.4.5 Western blot 实验 取心脏标本加入 RIPA 细胞裂解液 100 μl ,冰上研磨至液态,12 000 r/min 离心 30 min,留取上清液提取总蛋白,使用 BCA 试剂盒按照说明书实验步骤测量总蛋白浓度。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 凝胶上样 30 μg 蛋白,电泳、转膜、5% 脱脂牛奶封闭,洗膜后分别加入 p-AKT 一抗(1:1 000)、AKT 一抗(1:1 000)、p-mTOR 一抗(1:1 000)、mTOR 一抗(1:1 000)、LC3 一抗(1:1 000) 和 β -actin 一抗(1:2 000) 4°C 摇床孵育过夜。次日洗膜,二抗用山羊抗鼠 IgG(1:10 000) 或山羊抗兔 IgG(1:10 000) 室温孵育 1 h。洗膜后暗室使用 ECL 发光试剂盒显影,在 Tanon 全自动凝胶成像系统中自动曝光采集图像。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验流程如图 1。在 NP + I/R 组中 2 只大鼠未成功建立神经病理性疼痛模型,1 只大鼠心肌缺血期间出现严重心律失常;I/R 组中有 3 只大鼠在缺血再灌注期间死亡。此 6 只大鼠均予以剔除。

2.1 大鼠的 MWT 和 TWL 数值变化 Con 组、I/R 组、NP + I/R 组三组术前 MWT 和 TWL 基础值差异无统计学意义。与 Con 组和 I/R 组相比,NP + I/R 组大鼠在 CCI 术后第 3、7、14 天的 MWT 和 TWL

降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Con 组与 I/R 组各时点的 MWT 和 TWL 之间差异无统计学意义。见图 2、表 1。

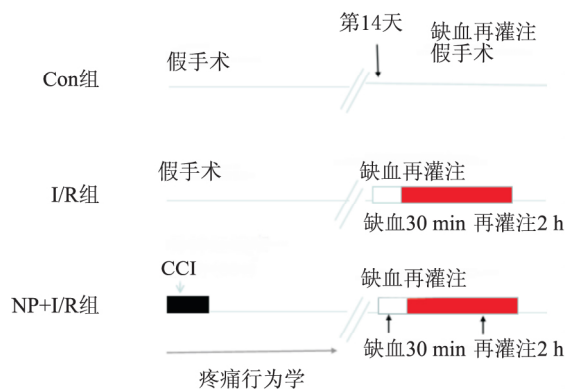


图1 实验示意图

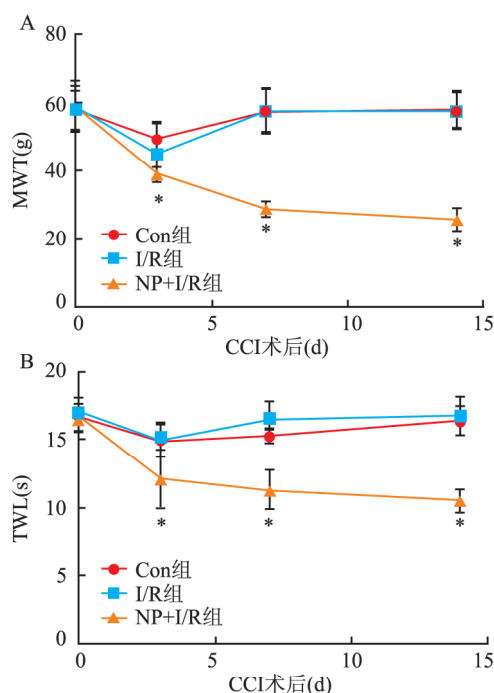


图2 大鼠的 MWT 和 TWL 数值

A: MWT; B: TWL; 与 I/R 组比较: * $P < 0.05$

2.2 MAP 及心率 三组 MAP 和心率(heart rate, HR) 基础值之间差异无统计学意义。与 Con 组相比,I/R 组和 NP + I/R 组 MAP、HR 在缺血 30 min 时刻和再灌注 120 min 时刻降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但 I/R 组与 NP + I/R 组之间 MAP 和 HR 差异无统计学意义。见表 2。

2.3 心律失常评分 与 Con 组相比,I/R 组和 NP + I/R 组的心律失常评分增加,差异有统计学意义($P < 0.05$) ,见图 3。

表1 MWT 和 TWL 数值($n=11$ $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 0 d | | 3 d | | 7 d | | 14 d | |
|----------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | MWT(g) | TWL(s) | MWT(g) | TWL(s) | MWT(g) | TWL(s) | MWT(g) | TWL(s) |
| Con | 57.7 ± 5.8 | 17.0 ± 0.5 | 49.2 ± 4.8 | 14.8 ± 0.6 | 57.4 ± 6.1 | 15.3 ± 0.4 | 58.0 ± 5.0 | 16.4 ± 1.0 |
| I/R | 58.1 ± 6.7 | 16.7 ± 0.5 | 44.9 ± 3.9 | 14.9 ± 1.1 | 57.8 ± 6.5 | 16.5 ± 1.2 | 57.8 ± 5.1 | 16.7 ± 1.3 |
| NP + I/R | 59.3 ± 6.9 | 16.7 ± 1.1 | 39.2 ± 2.0* | 12.1 ± 2.0* | 28.9 ± 1.9* | 11.3 ± 1.4* | 25.7 ± 3.2* | 10.6 ± 0.8* |
| P 值 | 0.864 2 | 0.609 7 | <0.001 | 0.000 1 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| F 值 | 0.15 | 0.50 | 16.42 | 12.48 | 88.52 | 59.59 | 152.00 | 98.72 |

与 I/R 组比较: * $P < 0.05$ 表2 各组大鼠各时间点血压及心率情况($n=6$ $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 0 min | | 30 min | | 120 min | |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | MAP(kPa) | HR(次/min) | MAP(kPa) | HR(次/min) | MAP(kPa) | HR(次/min) |
| Con | 13.3 ± 0.4 | 380 ± 36 | 12.9 ± 0.5 | 396 ± 31 | 11.6 ± 0.8 | 379 ± 23 |
| I/R | 13.3 ± 0.5 | 384 ± 23 | 7.7 ± 0.4 | 326 ± 20 | 9.2 ± 0.3* | 372 ± 23 |
| NP + I/R | 13.2 ± 0.7 | 389 ± 34 | 8.0 ± 0.4* | 333 ± 54* | 9.2 ± 0.1* | 353 ± 28 |
| P 值 | 0.909 2 | 0.905 6 | <0.001 | 0.018 7 | <0.001 | 0.270 8 |
| F 值 | 0.10 | 0.10 | 214.60 | 5.25 | 35.93 | 1.43 |

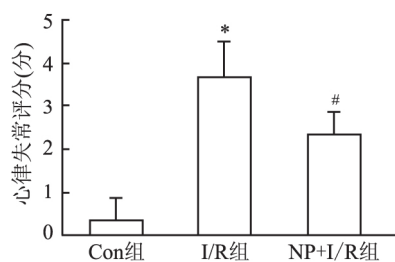
与 Con 组比较: * $P < 0.05$ 

图3 心律失常评分

与 Con 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

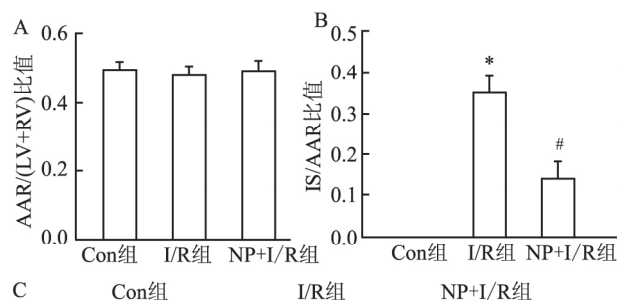
2.4 心肌梗死面积 三组之间 AAR/(LV + RV) 差异无统计学意义。与 Con 组相比, I/R 组 IS/AAR 增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 I/R 组相比, NP + I/R 组 IS/AAR 降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4及表3。

表3 各组大鼠心肌梗死面积比较($n=6$ $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | AAR(LV + RV) | IS/AAR |
|----------|---------------|--------------|
| Con | 0.49 ± 0.02 | 0 |
| I/R | 0.48 ± 0.02 | 0.35 ± 0.04* |
| NP + I/R | 0.49 ± 0.03 | 0.14 ± 0.04# |
| P 值 | 0.695 0 | <0.001 |
| F 值 | 0.372 8 | 161.2 |

与 Con 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

2.5 HE 染色 Con 组心尖部心肌纤维排列整齐; I/R 组心尖部心肌纤维排列紊乱, 可见坏死灶, 水肿明显; NP + I/R 组心尖部心肌纤维排列紊乱, 坏死灶和水肿较 I/R 组轻。见图5。



C Con组 I/R组 NP+I/R组

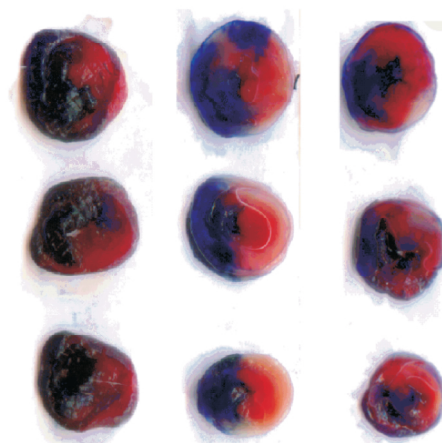


图4 三组大鼠心脏 TTC 染色结果

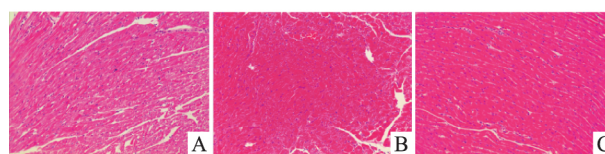
A: AAR/(LV + RV); B: IS/AAR; C: 大鼠心肌梗死代表图; 与 Con 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$ 

图5 三组心肌组织学比较 HE ×200

A: Con 组; B: I/R 组; C: NP + I/R 组

2.6 AKT、mTOR 及 LC3 蛋白分子表达情况 与 Con 组相比, I/R 组心尖部心肌组织的 p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 表达下调, LC3-II / I 表达上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 I/R 组相比, NP + I/R 组心尖部心肌组织的 p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 比值上调, LC3-II / I 比值下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 6。

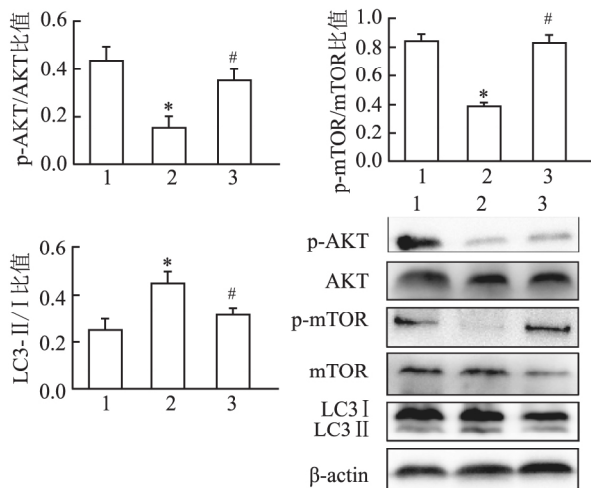


图6 Western blot 检测 AKT、mTOR 及 LC3 等蛋白表达情况

1: Con 组; 2: I/R 组; 3: NP + I/R 组; 与 Con 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

坐骨神经 CCI 法是制备神经病理性疼痛模型的经典手术方式。CCI 术后大鼠术侧的下肢会出现蜷缩、无法负重等表现。MWT 和 TWL 值显著降低为神经病理性疼痛模型建立成功的标志。在 CCI 术后第 14 天制备缺血再灌注模型, 心脏结扎部位以下的组织明显发绀, HR、血压下降, 心电图显示 ST 段抬高和 QRS 波宽大畸变, 以上情况提示成功建立了心肌缺血再灌注损伤模型。

神经病理性疼痛产生可能与其外周和中枢敏化相关, 另外胶质细胞的激活扩散也参与神经病理性疼痛的形成^[11]。一般情况下, 末梢神经元受到诸如疼痛之类的有害刺激时, 电信号将传导至一级神经元, 即脊髓背根神经节 (DRG), 随后传递至脊髓、丘脑, 产生痛觉。该研究显示病理性疼痛减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌梗死面积, 这与 Cheng et al^[3] 研究结果一致, 其小鼠脊神经损伤 5 d 后行心肌缺血再灌注损伤耐受实验, 同样观察到神经损伤组心肌梗死面积减少, 且认为其心肌保护作用与丘脑室旁前核的调节有关。

细胞自噬属于一种保守的分解代谢机制, 在基础或应激情况下, 细胞双层膜将胞内错误折叠的蛋白质、受损的细胞器吞噬, 成为自噬小体, 随后与溶酶体融合而被降解。故细胞自噬在循环利用营养物质、平衡细胞能量及促进细胞存活等方面起着重要作用, 但细胞过度自噬也会加重心肌细胞损伤^[7, 12]。在自噬发生过程中, 胞质内的 I 型 LC3 经过泛素样加工修饰后再与自噬膜上的磷脂酰乙醇胺结合并形成 II 型 LC3, 因此, 检测 LC3-II / I 可以反应自噬发生的程度^[13]。自噬不但参与疼痛的调控, 对缺血再灌注损伤也产生调控作用。Izumi et al^[14] 在足底切口痛模型大鼠的 DRG 神经元上观察到 p-mTOR 表达增多, Liu et al^[15] 在神经病理性疼痛模型的 L4-L5 脊髓上也观察到 p-AKT、p-mTOR 表达增多。另外, 赵其宏等^[13] 发现吗啡后处理可致体外实验观察到缺血再灌注损伤心肌梗死面积减少, 并且该心肌保护机制与抑制心肌过度自噬相关。该研究表明心肌缺血再灌注损伤引起心肌 AKT 和 mTOR 表达减少, LC3 蛋白表达增加; 而神经病理性疼痛大鼠心肌缺血再灌注损伤后 AKT 和 mTOR 表达增加, 自噬相关蛋白 LC3 表达减少, 即神经病理性疼痛的心肌保护作用可能与过度自噬的减轻有关。此外, 该研究显示神经病理性疼痛大鼠心律失常评分降低, 心肌组织形态学上心肌排列紊乱及坏死、水肿程度减轻。因此, 神经病理性疼痛减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤可能与神经病理性疼痛调控 AKT/mTOR 信号通路抑制细胞过度自噬有关。

参考文献

- [1] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124-36.
- [2] Jones W K, Fan G C, Liao S, et al. Peripheral nociception associated with surgical incision elicits remote nonischemic cardioprotection via neurogenic activation of protein kinase C signaling [J]. Circulation, 2009, 120: S1-9.
- [3] Cheng Y F, Chang Y T, Chen W H, et al. Cardioprotection induced in a mouse model of neuropathic pain via anterior nucleus of paraventricular thalamus [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 826.
- [4] Yang Z, Li C, Wang Y S, et al. Melatonin attenuates chronic pain related myocardial ischemic susceptibility through inhibiting RIP3-MLKL/CaMKII dependent necroptosis [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 125: 185-94.
- [5] Hausenloy D J, Kharbanda R K, Møller U K, et al. Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial [J]. Lancet, 2019, 394(10207):

- 1415–24.
- [6] Li X, Hu X, Wang J, et al. Inhibition of autophagy *via* activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med* 2018 42(4):1917–24.
- [7] Wu S, Chang G, Gao L, et al. Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy [J]. *J Mol Med (Berl)* 2018 96(8):791–806.
- [8] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988 33(1):87–107.
- [9] 徐凯生, 张 丽, 张 野. β -内啡肽在 RVLM 吗啡预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的变化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020 55(4):557–62.
- [10] Cheng, X Y, Chen C, He S F, et al. Spinal NGF induces anti-intrathecal opioid-initiated cardioprotective effect *via* regulation of TRPV1 expression [J]. *Eur J Pharmacol* 2019 844:145–55.
- [11] Carlton S M, Du J, Tan H Y, et al. Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury [J]. *Pain*, 2009 147(1–3):265–76.
- [12] Nah J, Zhai P, Huang C Y, et al. Upregulation of rubicon promotes autosis during myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2020 130(6):2978–91.
- [13] 赵其宏, 张 颖, 沙 磊, 等. 吗啡后处理对大鼠离体缺血再灌注心肌自噬的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018 53(12):1871–74.
- [14] Izumi Y, Sasaki M, Hashimoto S, et al. mTOR signaling controls VGLUT2 expression to maintain pain hypersensitivity after tissue injury [J]. *Neuroscience* 2015 308:169–79.
- [15] Liu Y D, Wang Z B, Han G, et al. Hyperbaric oxygen relieves neuropathic pain through AKT/TSC2/mTOR pathway activity to induce autophagy [J]. *J Pain Res* 2019 12:443–51.

AKT/mTOR signaling pathway mediated neuropathic pain protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

Li Yuwei, Zhang Qiaoyun, Cao Yahong, et al

(*Dept of Anesthesiology, The Second Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Anesthesiology and Perioperative Medicine of Anhui Higher Education Institutes, Anhui Medical University, Hefei 230601*)

Abstract Objective To investigate the effect of neuropathic pain on myocardial ischemia-perfusion injury in rats and the regulatory mechanism of AKT/mTOR signaling pathway involved in this process. **Methods** Forty-two Sprague-Dawley rats weighing 250–320 g (10 weeks old) were randomly divided into 3 groups ($n = 14$): control group (group Con), myocardial ischemia-reperfusion injury group (group I/R) and neuropathic pain with myocardial ischemia-reperfusion injury group (group NP + I/R). The neuropathic pain model was prepared by the chronic constriction injury method (CCI) of the sciatic nerve. The mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) of each group of rats were measured before and at 3, 7, and 14 days after the operation. The left anterior descending coronary artery is ligated for 30 minutes and opened for 120 minutes 14 days after the CCI operation to establish a model of myocardial ischemia-reperfusion injury. A slice of the heart was taken to detect the infarct size (IS) and area at risk (AAR) to calculate the myocardial infarction area. Western blot was used to detect the expression of AKT, mTOR and LC3 proteins, which was related to the AKT/mTOR signal pathway and autophagy. **Results** Compared with group I/R, MWT and TWL of group NP + I/R decreased at 3, 7, and 14 days after CCI. Compared with group Con, IS/AAR increased in group I/R, the ratio of p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR decreased, the ratio of LC3-II/I increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group I/R, IS/AAR decreased in group NP + I/R, the ratio of p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR increased, the ratio of LC3-II/I decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Neuropathic pain reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. The mechanism may be related to neuropathic pain regulating AKT/mTOR signaling pathway and inhibiting excessive autophagy.

Key words neuropathic pain; myocardial ischemia-reperfusion injury; cardioprotection