

吗啡后处理对大鼠离体缺血再灌注心肌自噬的影响

赵其宏^{1,2}, 张颖², 沙磊²

摘要 目的 研究吗啡后处理(PC)对离体大鼠缺血再灌注心肌自噬的影响及其可能机制。方法 成年雄性SD大鼠48只,随机分为3组:空白对照组(C组)、缺血再灌注组(I/R组)、吗啡PC组(M组),每组16只。采用Langendorff心脏灌流装置构建大鼠离体心肌缺血再灌注模型。C组持续灌注110 min,另两组平衡灌注20 min后实行30 min缺血、60 min再灌注;M组于再灌注开始前即刻给予1 μmol/L吗啡灌注15 s、洗脱15 s,共重复4次。再灌注末检测冠脉流出液肌酸激酶(CK)活性,分析心肌梗死面积,观察心肌病理学变化,Western blot测定心肌组织微管相关蛋白1轻链3-II/I(LC3-II/I)以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化mTOR(p-mTOR)的表达。结果 与I/R组比较,M组CK活性显著降低($P < 0.01$),心肌梗死面积显著减小($P < 0.01$),心肌病理学改变较轻,LC3-II/I比值明显降低($P < 0.01$),p-mTOR表达增高($P < 0.01$)。结论 吗啡PC通过激活mTOR抑制缺血再灌注诱导的心肌自噬,并进一步减轻心肌缺血再灌注损伤。

关键词 吗啡;再灌注损伤;后处理;自噬

中图分类号 R 961

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1871-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.011

吗啡是阿片类镇痛药,因其镇痛作用强、价格便宜,目前仍被广泛用于临床。研究^[1]表明,吗啡后处理(postconditioning, PC)可以减轻心肌缺血再灌注损伤(reperfusion injury, RI),但其机制尚不明确。自噬可降解长寿蛋白质和受损、衰老的细胞器,对维持细胞内稳态及修复细胞损伤具有重要的生理意义。研究^[2-5]表明,自噬在心肌缺血RI中发挥了重要的作用。然而,吗啡PC减轻心肌缺血RI的作用是否与自噬相关,尚未见报道。该研究旨在探讨吗啡PC对缺血再灌注心肌自噬的影响及可能机制,为临床防治心肌缺血RI提供理论依据。

2018-08-24 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目(编号:KJ2015B032by)

作者单位:¹蚌埠医学院第一附属医院麻醉科,蚌埠 233004

²南方医科大学第三附属医院麻醉科,广州 510630

作者简介:赵其宏,男,博士研究生,副主任医师,责任作者,E-mail: zhaohq0516@163.com

1 材料与方法

1.1 试剂与设备 吗啡(批号:150305)购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司;肌酸激酶(creatin kinase, CK)试剂盒、HE染色试剂盒购自南京建成生物研究所;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)购自美国Amresco公司;兔抗微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian rapamycin target protein, mTOR)及磷酸化mTOR(p-mTOR)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;兔抗GAPDH多克隆抗体购自美国ProteinTech公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物公司;蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自海门碧云天生物技术研究所;Langendorff灌流装置、U/4C501H型MedLab生物信号采集处理系统购自南京美易科技有限公司;EP-OCH酶标仪购自美国BioTek公司。

1.2 动物与分组 清洁级雄性SD大鼠(蚌埠医学院实验动物中心提供)48只,体质量250~300 g,平均分成3组:空白对照组(C组)、缺血再灌注组(I/R组)、吗啡PC组(M组),每组16只。

1.3 Langendorff灌流模型的制备 大鼠腹腔注射10%水合氯醛(400 mg/kg)麻醉充分后断头,开胸迅速取出心脏置于改良K-H液[单位(mmol/L): NaCl 118.5, KCl 4.7, CaCl₂ · 2H₂O 2.25, NaHCO₃ 24.8 μl - 葡萄糖 11, MgSO₄ · 7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2; pH 7.4],经主动脉逆行插管并将心脏固定在Langendorff灌流装置上,以上述K-H液常规恒压灌流,以95% O₂和5% CO₂混合气体饱和K-H液,维持灌流液温度37℃。C组持续灌注110 min,其余两组心脏平衡灌注20 min后,停灌30 min、再灌注60 min,模拟缺血再灌注模型;其中,M组停灌30 min后,于再灌注开始前给予含1 μmol/L吗啡的K-H液灌注15 s,再换不含吗啡的K-H液灌注15 s,重复4次。

1.4 指标检测

1.4.1 冠脉流出液CK活性 再灌注末,收集冠脉

流出液放入 -20 °C 冰箱中保存,待所有标本收齐后按照试剂盒说明采用分光光度法测定 CK 活性。

1.4.2 心肌梗死面积 实验结束后,将心脏取下,迅速放于 -80 °C 冰箱中冰冻 20 min,取出后沿心尖向心底部平行切成约 2 mm 厚的切片 5~6 片,放入 1% 的 TTC 磷酸盐缓冲液中(pH 7.4),37 °C 水浴箱中避光孵育 20 min 并不时振荡,使染色液与心肌切片充分接触。再用双蒸水冲洗后放入 10% 福尔马林中固定过夜,增加颜色对比度。将心肌切片拍照后分析,心肌梗死面积百分比(%)=(心肌梗死面积之和/心肌总面积之和)×100%。

1.4.3 心肌病理学观察 再灌注末,取下心脏并经冠状面剪开,置于 10% 中性福尔马林中固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片(厚 4 μm),贴片,烘烤后制成石蜡切片备用。将上述石蜡切片经二甲苯脱蜡、乙醇水化后,浸入苏木精染液中染色 30~60 s,流水冲洗后 1% 盐酸酒精分化 1~3 s,双蒸水冲洗后浸入碳酸锂中返蓝 5~10 s,流水冲洗后放入 0.5% 伊红液中染色 30~60 s,双蒸水冲洗后梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。光学显微镜下观察,细胞核呈蓝色,胞质、肌纤维、胶原纤维呈深浅不一的红色。

1.4.4 蛋白表达情况 再灌注末,剪取左心室前壁心肌组织,冲洗后称重,放入 -80 °C 冰箱中保存。所有标本取齐后在低温条件下剪碎、滴加组织裂解液后匀浆、裂解 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度后再用裂解液配平,沸水中变性后放入 -20 °C 冰箱中待用。装好玻璃板,按照凝胶配置试剂盒说明书配胶并灌胶,待胶凝固后将夹有 SDS-PAGE 凝胶的玻璃板转移至电泳槽中,并注入电泳缓冲液,取等量上述蛋白样品加入上样孔内进行电泳,蛋白分离后电转移至硝酸纤维素膜上,然后放入 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h。PBS 冲洗后加入 1:1 000 的兔抗 LC3 抗体、mTOR 及 p-mTOR 抗体 4 °C 孵育过夜后 PBS 漂洗,加入 1:1 000 二

抗,室温孵育 2 h。PBS 漂洗后,化学发光显色,条带扫描后分析灰度值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件和 Excel 2007 进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠脉流出液 CK 活性 与 C 组比较,I/R 组和 M 组 CK 活性均显著增加(P < 0.01)。与 I/R 组比较,M 组 CK 活性显著降低(P < 0.01)。见表 1。

表 1 3 组大鼠冠脉流出液 CK 活性与心肌梗死面积比较(n=6 $\bar{x} \pm s$)

组别	CK 活性(U/L)	心肌梗死面积(%)
C	51.3 ± 4.8	13.6 ± 3.2
I/R	243.4 ± 21.8*	51.9 ± 8.4*
M	131.9 ± 12.1*#	29.0 ± 7.1*#
F 值	346.942	68.013
P 值	<0.001	<0.001

与 C 组比较: * P < 0.01; 与 I/R 组比较: # P < 0.01

2.2 心肌梗死面积 与 C 组比较,I/R 组和 M 组心肌梗死面积均显著增加(P < 0.01)。与 I/R 组比较,M 组心肌梗死面积显著减小(P < 0.01)。见表 1。

2.3 心肌组织病理学变化 C 组心肌细胞形态正常,心肌纤维结构完整、清晰,排列规则有序,无明显的水肿和坏死。I/R 组心肌细胞水肿明显,胞质出现空泡样变性,心肌纤维严重断裂、溶解,排列紊乱而稀疏,部分细胞可见核仁。M 组心肌细胞轻度肿胀、可见少量坏死,心肌纤维断裂较轻、结构紊乱轻微,大体形态正常。见图 1。

2.4 心肌组织蛋白表达情况 与 C 组比较,I/R 组 LC3-II / I 比值显著增高(P < 0.01)、M 组 p-mTOR 表达增高(P < 0.01)。与 I/R 组比较,M 组 LC3-II / I 比值显著降低(P < 0.01)、p-mTOR 表达显著增高(P < 0.01)。见表 2、图 2。

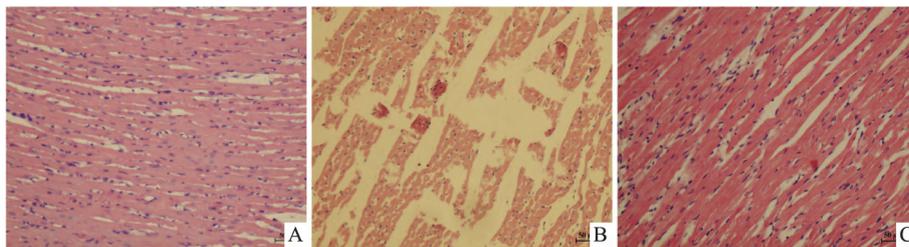


图 1 3 组大鼠心肌组织病理学变化 HE × 200

A: C 组; B: I/R 组; C: M 组

表2 3组大鼠心肌组织中 LC3-II / I、mTOR 与 p-mTOR 的表达水平比较(n = 4 $\bar{x} \pm s$)

组别	LC3-II / I 比值	p-mTOR / mTOR 比值
C	1.03 ± 0.09	0.84 ± 0.12
I/R	1.59 ± 0.16*	0.74 ± 0.11
M	1.21 ± 0.13#	1.42 ± 0.21* #
F 值	19.175	22.985
P 值	0.001	<0.001

与 C 组比较: * P < 0.01; 与 I/R 组比较: # P < 0.01

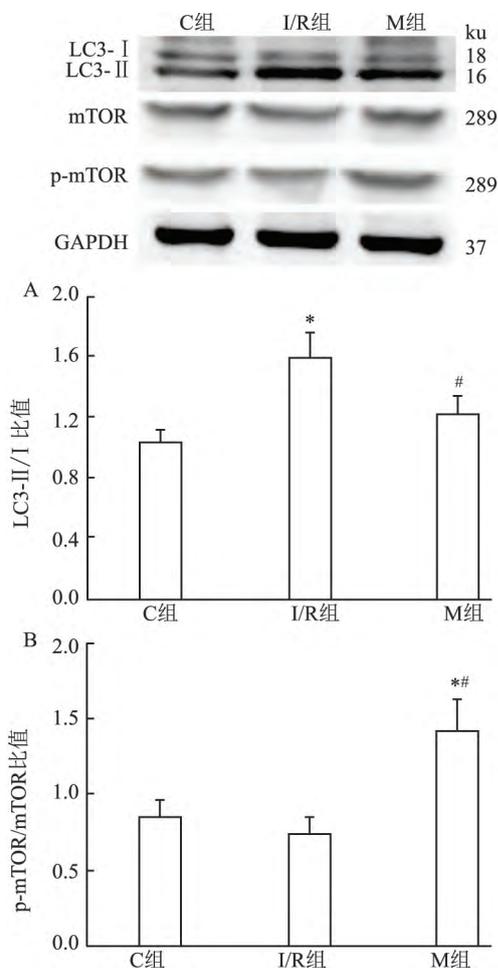


图2 3组大鼠心肌组织中 LC3-II / I、mTOR 与 p-mTOR 的表达水平

A: LC3-II / I; B: p-mTOR / mTOR; 与 C 组比较: * P < 0.01; 与 I/R 组比较: # P < 0.01

3 讨论

吗啡为阿片受体的激动剂,阿片受体在体内分布广泛,尤以中枢神经系统表达最高。Lu et al^[6]研究表明,中枢部位的阿片受体激活后可以减轻在体心脏的缺血 RI。因此,为了排除心脏以外因素的干扰,本实验使用 Langendorff 离体灌流装置构建大鼠心肌缺血 RI 模型。此外,参考文献^[1]并结合预实验结果,本研究选择的吗啡剂量为 1 μmol/L; 本研

究结果表明,该剂量的吗啡 PC 显著降低离体缺血再灌注大鼠心脏的冠脉流出液 CK 活性、减小心肌梗死面积、改善组织病理学变化,与 Jang et al^[1]的报道一致。

心肌缺血 RI 是临床上常见的病理生理现象,其机制十分复杂。越来越多的研究^[2-3]表明,自噬与心肌缺血 RI 的关系密切。自噬作为一种程序性死亡方式广泛存在于真核细胞中,自噬在平衡细胞能量、循环利用营养物质、促进细胞存活方面发挥着十分重要的作用;然而,过度的自噬会引起组织损伤^[3,7]。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 II、I 型 LC3 的表达水平,即 LC3-II / I 可以反应自噬发生的程度^[8]。本研究中,I/R 组 LC3-II / I 表达水平显著高于 C 组,提示缺血再灌注诱导心肌自噬增强;而 M 组 LC3-II / I 表达水平低于 I/R 组,说明吗啡 PC 可以下调缺血再灌注心肌的自噬水平。本研究结果显示自噬发生的强弱同冠脉流出液 CK 活性、心肌梗死面积及心肌组织病理学的变化趋势相一致;提示抑制自噬的发生可以减轻心肌缺血 RI,与 Zheng et al^[3]和张静等^[4]的研究结果一致。

自噬发生的调节机制非常复杂,目前尚未完全弄清,其中 mTOR 对自噬的调控发挥了重要作用,mTOR 磷酸化激活后抑制自噬的发生^[3]。mTOR 是众多信号分子的靶蛋白,蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 就是其中的重要一员。张静等^[4]研究表明,七氟醚 PC 通过激活 Akt/mTOR 信号通路,抑制心肌细胞自噬的增强从而减轻大鼠离体灌注心脏缺血 RI。另一项研究^[3]显示,特异性抑制 Akt1/2 的活性能够逆转小檗胺 PC 减轻大鼠离体心脏缺血 RI 和自噬的作用。而 Wu et al^[9]报道,舒芬太尼 PC 可以上调缺血 RI 心肌 Akt 的磷酸化水平。细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 是 mTOR 的另一上游蛋白,ERK 激活后通过磷酸化 mTOR 抑制自噬的发生而减轻肝脏缺血 RI^[7]。Ha et al^[10]报道,瑞芬太尼 PC 能够上调缺血再灌注心肌细胞内 ERK 磷酸化表达水平。此外,阿片类药物 PC 还能够降低缺血再灌注引起的氧化应激反应增强^[11],激活一氧化氮合酶^[12],抑制线粒体通透性转换孔的开放^[1],这些都是抑制自噬发生的可能机制^[13,2]。

综上所述,吗啡 PC 通过抑制自噬的发生而减轻离体灌注大鼠心脏缺血 RI,这一作用可能与其磷

酸化激活 mTOR 有关。

参考文献

- [1] Jang Y, Xi J, Wang H, et al. Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors [J]. *Anesthesiology*, 2008, 108(2): 243–50.
- [2] Cao J, Xie H, Sun Y, et al. Sevoflurane post-conditioning reduces rat myocardial ischemia reperfusion injury through an increase in NOS and a decrease in phosphorylated NHE1 levels [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(6): 1529–37.
- [3] Zheng Y, Gu S, Li X, et al. Berbamine postconditioning protects the heart from ischemia/reperfusion injury through modulation of autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(2): e2577.
- [4] 张静, 余鹏, 袁林辉, 等. 蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白通路在七氟醚后处理保护心肌缺血再灌注中的作用 [J]. *中国循环杂志* 2016, 31(9): 896–901.
- [5] 冯翔, 林先和. Met/HGF 通路抑制缺血再灌注心肌细胞自噬作用的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2017, 52(12): 1814–8.
- [6] Lu Y, Hu J, Zhang Y, et al. Remote intrathecal morphine preconditioning confers cardioprotection via spinal cord nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G pathway [J]. *J Surg Res*, 2015, 193(1): 43–51.
- [7] Yang J, Chen Q, Tian S, et al. The role of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in mouse liver ischemia reperfusion injury: regulation of autophagy through activation of MEK/ERK signaling and PTEN/PI3K/Akt/mTORC1 signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(12): 2630–45.
- [8] Metlagel Z, Otomo C, Ohashi K, et al. Structural insights into E2-E3 interaction for LC3 lipidation [J]. *Autophagy*, 2014, 10(3): 522–3.
- [9] Wu Q L, Shen T, Ma H, et al. Sufentanil postconditioning protects the myocardium from ischemia-reperfusion via PI3K/Akt-GSK-3 β pathway [J]. *J Surg Res*, 2012, 178(2): 563–70.
- [10] Ha J Y, Lee Y C, Park S J, et al. Remifentanyl postconditioning has cross talk with adenosine receptors in the ischemic-reperfused rat heart [J]. *J Surg Res*, 2015, 195(1): 37–43.
- [11] Fu D, Liu H, Li S, et al. Antioxidative and antiapoptotic effects of delta-opioid peptide [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin on spinal cord Ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 603.
- [12] Gross G J, Hsu A, Nithipatikom K, et al. Acute and chronic cardioprotection by the enkephalin analogue, Eribis peptide 94, is mediated via activation of nitric oxide synthase and adenosine triphosphate-regulated potassium channels [J]. *Pharmacology*, 2012, 90(1-2): 110–6.
- [13] Ma X, Godar R J, Liu H, et al. Enhancing lysosome biogenesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death [J]. *Autophagy*, 2012, 8(3): 297–309.

Effects of morphine postconditioning on autophagy induced by ischemia-reperfusion in isolated rat hearts

Zhao Qihong^{1,2}, Zhang Ying², Sha Lei²

¹*Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004;*

²*Dept of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630*

Abstract Objective To investigate effects of morphine postconditioning (PC) on autophagy induced by ischemia-reperfusion in isolated rat hearts and its possible mechanism. **Methods** 48 male adult SD rats were randomly divided into three groups: blank control group (C group), ischemia-reperfusion group (I/R group), morphine PC group (M group), 16 rats in each group. A Langendorff perfusion device was used to simulate myocardial ischemia-reperfusion model in isolated rat hearts. In group C, continuous perfusion was performed for 110 min, and the other two groups were subjected to 30 min of ischemia followed by 60 min of reperfusion after 20 min of balanced perfusion. M group was given 1 μ mol/L morphine perfusion for 15 s and elution for 15 s immediately, which was repeated 4 times just before reperfusion. At the end of reperfusion, the activity of creatine kinase (CK) in the coronary effluent was measured, and myocardial infarct size was analyzed, and pathological changes of the myocardium was observed, and the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3-II/I (LC3-II/I), mammalian rapamycin target protein (mTOR) and phosphorylated mTOR (p-mTOR) was determined by Western blot in myocardial tissue. **Results** Compared with I/R group, CK activity was significantly decreased ($P < 0.01$), and myocardial infarct size was significantly reduced ($P < 0.01$), and myocardial pathological changes were lighter, and LC3-II/I ratio was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression of p-mTOR was increased ($P < 0.01$) in M group. **Conclusion** Morphine PC alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by ameliorating the enhancement of myocardial autophagy induced by ischemia-reperfusion via activating mTOR.

Key words morphine; reperfusion injury; postconditioning; autophagy