

· 实验研究 ·

PI3K/Akt 信号通路在舒芬太尼后处理减轻
在体大鼠心肌缺血-再灌注损伤中的作用

沈途 吴巧玲 尚游 陈晓光

【摘要】 目的 探讨 PI3K/Akt 信号通路在舒芬太尼后处理减轻在体大鼠心肌缺血-再灌注损伤时细胞凋亡中的作用。**方法** 取 90 只健康成年雄性 SD 大鼠,采用随机数字表法分为五组:假手术组(Sham 组),只穿线不结扎;缺血-再灌注组(IR 组),结扎左冠状动脉前降支造成心肌缺血 30 min,再灌注 120 min;舒芬太尼后处理组(Sufen 组),在灌注即刻,给予舒芬太尼 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 输注 3 min,再灌注处理同 IR 组;舒芬太尼后处理+LY294002 (PI3K 抑制剂)组(SL 组),再灌注前 10 min 给予 LY294002 0.3 mg/kg,并行舒芬太尼后处理;LY294002 组(IL 组),再灌注前 10 min 给予 LY294002 0.3 mg/kg,再灌注 120 min。在缺血前即刻(T_0)、缺血 30 min(T_1)、再灌注 60 min(T_2)和再灌注 120 min(T_3)时记录 HR 和 MAP;再灌注末,测定心肌梗死面积(IS/AAR);再灌注 15 min 时,采用 Western blot 法测定心肌组织总的 Akt 和磷酸化的 Akt 蛋白含量;在再灌注末,用 RT-PCR 检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达。**结果** 五组大鼠组间组内 HR 差异无统计学意义; T_2 、 T_3 时 IR 组、SL 组和 IL 组 MAP 明显低于 Sham 组($P<0.05$);Sufen 组 IS/AAR 明显低于 IR、SL 和 IL 组($P<0.05$);五组心肌总的 Akt 蛋白含量表达差异无统计学意义;与 Sufen 组比较,sham、IR、SL 和 IL 组磷酸化的 Akt 表达明显下调($P<0.05$),IR 组、SL 和 IL 组 Bax mRNA 的表达明显升高,Bcl-2 mRNA 的表达明显降低($P<0.05$)。**结论** 舒芬太尼后处理可减轻心肌缺血-再灌注损伤,可能与激活 PI3K/Akt 信号通路,降低 Bax 和增加 Bcl-2 蛋白表达而达到抑制心肌细胞的凋亡有关。

【关键词】 舒芬太尼后处理;心肌缺血-再灌注损伤;PI3K/Akt

Role of PI3K/Akt signaling pathway in the sufentanil postconditioning alleviated myocardial ischemia reperfusion injury in rats in vivo SHEN Tu, WU Qiaoling, SHANG You, CHEN Xiaoguang. Department of Anesthesiology, The First Hospital Affiliated to Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China

Corresponding author: CHEN Xiaoguang, Email: 18040099890@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sufentanil postconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats in vivo and the role of PI3K/Akt signaling pathway. **Methods** Ninety healthy male SD rats were randomly allocated to Sham group(the coronary suture was passed, not tied, and maintained for 150 min), group IR (ischemia for 30 min followed by 120 min reperfusion), group Sufen (administration of 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sufentanil for 3 min at the onset of reperfusion following 30 min of ischemia), group SL (administration of sufentanil and 0.3 mg/kg LY294002 DMSO) for 10 min prior to reperfusion) and group IL (only administration 0.3 mg/kg LY294002 for 10 min prior to reperfusion). HR and MAP were measured at the following time points: end of stabilization prior to ischemia (baseline); 30 min of ischemia; 60 and 120 min of reperfusion; at the end of 120 min reperfusion, the rats were sacrificed for assessment infarct area, the expression of Bax and Bcl-2 mRNA; the myocardial tissue samples were collected 15 min following reperfusion to determine the total and phosphorylated Akt expression by Western blot. **Results** There were no significant differences in the HR among the 6 groups; MAP were significantly decreased at 60 and 120 min following reperfusion ($P<0.05$) in group IR, groups SL and IL compared to group Sham; there were no significant differences in the total Akt expression among the 6 groups; phosphorylated Akt were significantly upregulated, the infarct area were significantly decreased, Bax mRNA levels were significantly decreased and Bcl-2 mRNA levels were significantly increased ($P<0.05$) in group Sufen compared to group IR, there were no significant differences respectively between groups SL, IL and IR.

基金项目:沈阳市科学技术项目计划(F13-221-9-71)

作者单位:121001 锦州医科大学附属第一医院麻醉科(沈途、吴巧玲、尚游);中国医科大学第一附属医院麻醉科(陈晓光)

通信作者:陈晓光,Email: 18040099890@163.com

Conclusion Sufentanil postconditioning can induce myocardial protection through activation of the PI3K/Akt signaling pathway and inhibition of cell apoptosis via down-regulation Bax and up-regulation Bcl-2 expression.

【Key words】 Sufentanil postconditioning; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Phosphatidylinositol-3-kinase/protein-serine-threonine kinases

缺血后处理能够减轻心肌缺血-再灌注损伤,目前阿片类药物后处理对心肌的保护作用已被证实^[1,2]。舒芬太尼由于分布容积小,清除半衰期短,反复应用后很少蓄积,且对血流动力学影响小,而广泛应用在临床麻醉。有研究表明,舒芬太尼后处理可通过上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达,减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤时的细胞凋亡^[3]。细胞凋亡是心肌缺血-再灌注损伤发病机制中的重要环节^[4],研究表明 PI3K/Akt 信号通路能够通过调节 Bax 和 Bcl-2 的表达参与心肌细胞的凋亡^[5,6]。本研究拟探讨 PI3K/Akt 信号通路在舒芬太尼后处理减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤时细胞凋亡的作用。

材料与方法

实验动物与分组 90 只健康雄性 SD 大鼠,体重(250±32)g,随机均分为五组:假手术组(Sham 组),只穿线不结扎;缺血-再灌注组(IR 组),结扎左冠状动脉前降支造成心肌缺血 30 min,再灌注 120 min;舒芬太尼后处理组(Sufen 组),在灌注即刻,给予舒芬太尼 1.0 μg/kg 输注 3 min,再灌注处理同 IR 组;舒芬太尼后处理+LY294002 (PI3K 抑制剂)组(SL 组),在灌注前 10 min 给予 LY294002 0.3 mg/kg,并行舒芬太尼后处理;LY294002 组(IL 组)在灌注前 10 min 给予 LY294002 0.3 mg/kg,再灌注 120 min。

动物模型制备 腹腔注射 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 进行麻醉,连接皮下电极进行 ECG 监测,颈部行气管切开并插管连接动物呼吸机进行通气,调节潮气量和通气频率。MAP 和 HR 的监测来自右颈总动脉内的压力换能器,药物及输液通道选择左侧颈内静脉。打开胸腔后剪开心包膜,从而暴露心脏,以左冠状静脉主干为标志,结扎冠状动脉左前降支,心肌缺血的标志是:结扎后 ECG ST 段明显上抬及结扎线远端心肌颜色变苍白,而再灌注成功的标志是:松开后原苍白区出现充血反应呈现暗红色。

血流动力学指标检测 检测和记录五组大鼠在缺血前即刻(T_0)、缺血 30 min(T_1)、再灌注 60 min(T_2)和再灌注 120 min(T_3)时的 HR 和 MAP。

心肌梗死面积(IS/AAR)检测 每组随机选取 6 只大鼠于再灌注末,结扎冠状动脉左前降支,从左侧颈内静脉中注入 5%伊文氏蓝(Even, S Blue) 1 ml,呈现深蓝色的是非缺血区心肌。把心脏用纸擦干称重,剪取左心室后速冻。然后将左心室切成 2 mm 厚的心肌片,置入 1%氯化三苯基四氮哇(TTC)溶液中后再放入甲醛中固定。红色的是缺血危险区(AAR),白色的是心肌梗死区(IS),最后计算 IS/AAR。

Western blot 法检测 Akt 和磷酸化 Akt 的蛋白表达 再灌注 15 min 时,随机选取 6 只大鼠,取缺血危险区心肌组织 200 mg 立刻置于液氮中,−80℃冰箱保存。组织样本首先被剪碎然后放入裂解液中 30 min,离心后获得蛋白,使用 Lowry 法检测蛋白的浓度。蛋白中加入样品处理液后进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转至硝酸纤维素膜上后室温下封闭 1 h,然后加入 Akt 抗体(1:1 000)和 Akt 磷酸化的抗体(1:500),β-actin 抗体(1:400),4℃过夜,在于相应的二抗室温下孵育 2 h,用发光剂发光系统检测,X 线胶片曝光记录。蛋白条带用 Scion Image (Beta 4.03 for Windows)进行定量分析。

RT-PCR 检测 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达 再灌注末,随机选取 6 只大鼠,取左心室前壁坏死心肌组织约 100 mg,即刻于液氮中保存。采用 Trizol reagent 试剂提取心肌总的 RNA, RNA 的浓度用紫外分光光度计测定, cDNA 合成之后,应用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪检测 Bax、Bcl-2 及内参 β-actin。Bax 上游引物:5'-GTTACAGGG-TTTCA-TCCAGG-3',下游引物:5'-CGTGTCCACGTCAG-CAAT-3',扩增长度 178 bp;Bcl-2 上游引物:5'-T-ACGAGTGGGATACTGGAGA-3',下游引物:5'-TCAGGCTGGAAGGAGAAG-3',扩增长度 80 bp;β-actin 上游引物:5'-CGTGGGTGACATTAAAG-AG-3',下游引物:5'-TTGCCGATAGTGATGAC-CT-3',扩增长度 132 bp。循环参数:95℃ 30 s;95℃ 5 s、60℃ 34 s,40 个循环;95℃ 15 s、60℃ 1 min、95℃ 15 s。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件处理分析,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表

示,组间比较行单因素方差分析。

结 果

五组大鼠 HR 组间组内差异无统计学意义; T_2 、 T_3 时 IR、SL 和 IL 组 MAP 明显低于 Sham 组 ($P<0.05$) (表 1)。

再灌注末,IR、Sufen、SL 和 IL 组 IS/AAR 明显高于 Sham 组 ($P<0.05$); Sufen 组 IS/AAR 明显低于 IR、SL 和 IL 组 ($P<0.05$), IR、SL 和 IL 组 IS/AAR 差异无统计学意义 (图 1)。

五组心肌总的 Akt 蛋白含量差异无统计学意义;与 Sufen 组比较, Sham、IR、SL 和 IL 组磷酸化 Akt 蛋白含量明显下降 ($P<0.05$) (图 2)。

与 Sham 组比较, IR、Sufen、SL 和 IL 组 Bax mRNA 的表达明显升高 ($P<0.05$), IR、SL 和 IL 组 Bcl-2 mRNA 的表达明显降低 ($P<0.05$), Sufen 组 Bcl-2 mRNA 的表达明显升高 ($P<0.05$); 与 Sufen 组比较, IR、SL 和 IL 组 Bax mRNA 的表达明显升高, Bcl-2 mRNA 的表达明显降低 ($P<0.05$) (表 2)。

讨 论

心肌梗死是心肌不可逆的损伤,梗死面积是目前判断缺血-再灌注损伤程度最有效的指标^[7],在体大鼠的心肌缺血-再灌注模型更能够模拟真实的病理生理变化,因此本实验参照文献^[8]选择舒芬太尼的给药剂量及时间制作舒芬太尼后处理的模型,结果表明舒芬太尼后处理能够降低心肌梗死面积,

与之前的研究一致^[8]。应用 PI3K 抑制剂 (LY294002) 的大鼠,心肌梗死面积与 IR 组比较并未减小,揭示 LY294002 拮抗了舒芬太尼后处理的心肌保护作用。

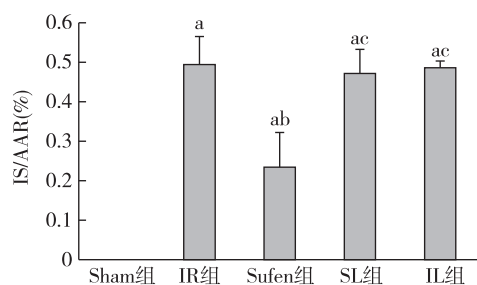
在心肌缺血-再灌注损伤的发生机制中,细胞凋亡起到关键性的作用,而凋亡相关基因的表达与细胞凋亡相关^[5],其中细胞凋亡的启动或抑制是由凋亡基因和抗凋亡基因的相互作用决定的。Bcl-2 是最主要的抗凋亡基因,多表达于线粒体外膜、核膜和内质网膜上,其表达可抑制细胞凋亡,而 Bax 的表达则可促进细胞凋亡。研究表明大部分麻醉药物对心肌的保护作用是通过上调 Bcl-2 和下调 Bax 的表达而减少心肌缺血-再灌注损伤引起的细胞凋亡^[3,4,6],本实验研究与上述有关文献一致。

PI3K/Akt 信号通路被认为是细胞内最重要的生存通路,其最明显的作用是调节细胞凋亡过程,能够抑制细胞凋亡^[5]。目前,已经发现麻醉药物丙泊酚和七氟醚等可通过激活 PI3K/Akt 通路,抑制促凋亡因子活性,减少了缺血-再灌注引起的细胞凋亡^[9,10]。在此通路中 Akt 是 PI3K 下游的直接靶点,p-Akt 可以抑制促凋亡蛋白 Bad、Bax 和 caspase 的形成,达到抑制凋亡的目的;而 GSK3 β 是 Akt 下游的重要靶酶,PI3K-Akt 的激活与否决定了 GSK3 β ^[10],磷酸化的 GSK3 β 失去活性,丧失其诱导细胞凋亡的作用。本实验研究表明, Sufen 组心肌梗死面积明显降低,而使用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 后,心肌梗死面积明显增加,提示舒芬太

表 1 五组大鼠血流动力学指标的比较 ($\bar{x}\pm s$)

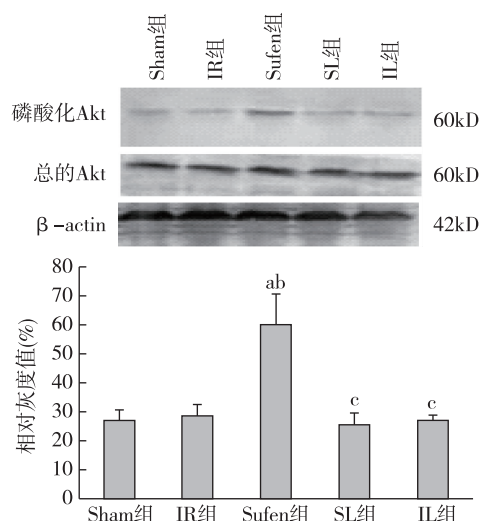
指标	组别	只数	T_0	T_1	T_2	T_3
HR(次/分)	Sham 组	18	320.00 $\pm$ 7.96	301.17 $\pm$ 6.78	273.17 $\pm$ 4.54	251.00 $\pm$ 4.92
	IR 组	18	324.50 $\pm$ 9.05	309.83 $\pm$ 8.46	274.67 $\pm$ 3.16	260.33 $\pm$ 2.79
	Sufen 组	18	318.67 $\pm$ 9.82	297.50 $\pm$ 10.01	269.33 $\pm$ 6.65	249.17 $\pm$ 2.27
	SL 组	18	317.33 $\pm$ 2.26	304.83 $\pm$ 2.63	274.17 $\pm$ 2.60	256.67 $\pm$ 2.56
	IL 组	18	317.83 $\pm$ 2.65	302.50 $\pm$ 8.78	278.83 $\pm$ 2.90	257.00 $\pm$ 2.21
MAP(mm Hg)	Sham 组	18	119.78 $\pm$ 2.54	112.16 $\pm$ 2.50	104.89 $\pm$ 1.20	105.45 $\pm$ 2.85
	IR 组	18	112.17 $\pm$ 0.56	106.28 $\pm$ 1.22	95.61 $\pm$ 0.75 ^a	90.89 $\pm$ 1.36 ^a
	Sufen 组	18	117.50 $\pm$ 1.72	107.50 $\pm$ 3.14	99.44 $\pm$ 0.95	99.17 $\pm$ 1.90
	SL 组	18	115.22 $\pm$ 2.83	107.06 $\pm$ 2.79	95.22 $\pm$ 2.47 ^a	93.50 $\pm$ 2.82 ^a
	IL 组	18	116.50 $\pm$ 1.61	107.33 $\pm$ 1.05	95.34 $\pm$ 1.20 ^a	91.18 $\pm$ 1.40 ^a

注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sufen 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 五组大鼠再灌注末 IS/AAR 的比较



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与 Sufen 组比较,^c $P < 0.05$

图 2 五组大鼠心肌总的 Akt 和磷酸化 Akt 蛋白含量的比较

表 2 五组大鼠心肌 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA
Sham 组	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
IR 组	6	2.83 ± 0.45 ^{ab}	0.74 ± 0.06 ^{ab}
Sufen 组	6	1.51 ± 0.22 ^a	1.71 ± 0.13 ^a
SL 组	6	2.80 ± 0.50 ^{ab}	0.73 ± 0.08 ^{ab}
IL 组	6	2.79 ± 0.52 ^{ab}	0.70 ± 0.18 ^{ab}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 Sufen 组比较,^b $P < 0.05$

尼后处理的心肌保护作用可能与 PI3K/Akt 通路有关;用 Western blot 法分析磷酸化 Akt,显示舒芬太尼后处理引起了磷酸化 Akt 的增加,而 LY294002 抑制了 Akt 的磷酸化,Akt 磷酸化的变化与心肌保

护效应的变化是一致的^[5],提示 PI3K/Akt 信号通路参与了舒芬太尼后处理的心肌保护,而目前研究已证明 PI3K/Akt 信号通路参与细胞凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 的调节^[5]。

综上所述,舒芬太尼后处理可减轻在体大鼠心肌缺血-再灌注损伤时细胞的凋亡,其通过 PI3K/Akt 信号通路参与调节细胞凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 完成,但是具体调节下游的哪些因子还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Chen L, Chen M, Du J, et al. Hyperglycemia attenuates remifentanyl postconditioning-induced cardioprotection against hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyoblasts. J Surg Res, 2016, 203(2): 483-490.
- [2] Huhn R, Heinen A, Weber NC, et al. Ischaemic and morphine-induced post-conditioning: impact of mk(Ca) channels. Br J Anaesth, 2010, 105(5): 589-595.
- [3] 吴巧玲,沈途,王玲玲,等.舒芬太尼后处理对大鼠心肌缺血再灌注时细胞凋亡的影响.中华麻醉学杂志,2012,32(1): 120-123.
- [4] 杨雪,隋海静,李冬梅,等.丙泊酚对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血-再灌注损伤时凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的影响.临床麻醉学杂志,2014,30(4): 385-388.
- [5] Thirunavukkarasu M, Selvaraju V, Tapias L, et al. Protective effects of Phyllanthus emblica against myocardial ischemia-reperfusion injury: the role of PI3-kinase/glycogen synthase kinase 3 β / β -catenin pathway. J Physiol Biochem, 2015, 71(4): 623-633.
- [6] 张静,余鹏,周志东,等.七氟醚后处理对大鼠心肌缺血-再灌注时 AKT/GSK3 β /mTOR 表达的影响.临床麻醉学杂志,2015,31(12): 1215-1220.
- [7] Lin PT, Chen WH, Zheng H, et al. Involvement of AQP 1 in the cardio-protective effect of remifentanyl post-conditioning in ischemia/reperfusion rats. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 12736-12745.
- [8] Wu Y, Gu EW, Zhu Y, et al. Sufentanil limits the myocardial infarct size by preservation of the phosphorylated connexin 43. Int Immunopharmacol, 2012, 13(3): 341-346.
- [9] Liu L, Pang Y, He DW, et al. Effects of propofol on PI3K/Akt signaling pathway and endoplasmic reticulum stress pathway of apoptosis induced by ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2012, 92(37): 2611-2614.
- [10] Tai W, Shi E, Yan L, et al. Diabetes abolishes the cardioprotection induced by sevoflurane postconditioning in the rat heart in vivo: roles of glycogen synthase kinase-3 β and its upstream pathways. J Surg Res, 2012, 178(1): 96-104.

(收稿日期:2016-07-21)