

· 实验研究 ·

七氟醚对低温全心缺血-再灌注心律失常心肌组织 Kir2.1 蛋白表达的影响

王贵龙 糜睿 徐雄坤 高鸿 刘艳秋 李华宇 代东君 符校魁

【摘要】 目的 观察七氟醚对低温全心缺血-再灌注心律失常心肌组织 Kir2.1 蛋白表达的影响。**方法** 健康成年雄性 SD 大鼠, 体重 280~320 g, 制备 Langendorff 离体心脏灌注模型 24 只, K-H 液平衡灌流 15 min 后, 随机分为三组: 对照组 (C 组)、低温全心缺血-再灌注组 (IR 组) 和七氟醚组 (Sev 组), 每组 8 只。C 组持续平衡灌流 37 °C K-H 液 105 min。IR 组 K-H 液继续灌流 15 min 后, 采用 4 °C Thomas 液 20 ml/kg 使心脏停跳 60 min, 心脏周围用 4 °C 的 Thomas 液进行保护, 在心脏停跳 30 min 时追加注射 4 °C Thomas 液 10 ml/kg, 在心脏停跳 60 min 时再灌注 K-H 液 30 min。Sev 组灌注液为饱和 1 MAC 七氟醚的 K-H 液, 其余同 IR 组。观察并记录再灌注期间心律失常发生情况、心脏复跳时间和心律失常持续时间; 记录平衡灌流 15 min (T_0)、继续灌注 15 min/平衡 30 min (T_1)、再灌注 15 min/平衡 105 min (T_2)、再灌注 30 min/平衡 120 min (T_3) 的左心室前壁外膜层和内膜层心肌单相动作电位 (MAP), 计算 50% 和 90% 单相动作电位时程 ($MAPD_{50}$ 、 $MAPD_{90}$); Western blot 法和免疫组织化学法检测心肌组织 Kir2.1 蛋白相对含量和分布。**结果** 灌注心脏复跳时 IR 组有 6 例发生心律失常, 2 min 内有 1 例恢复正常节律; Sev 组有 2 例发生心律失常, 2 min 内有均恢复正常节律; IR 组心脏复跳时间、心律失常持续时间明显长于 Sev 组 ($P < 0.05$); 与 T_0 和 T_1 时比较, T_2 — T_3 时 IR 组外膜层和内膜层 $MAPD_{90}$ 明显延长 ($P < 0.05$); Sev 组外膜层 $MAPD_{90}$ 明显延长 ($P < 0.05$)。 T_2 — T_3 时 Sev 组和 IR 组外膜层和内膜层 $MAPD_{90}$ 明显长于 C 组 ($P < 0.05$), Sev 组内膜层和外膜层 $MAPD_{90}$ 明显短于 IR 组 ($P < 0.05$)。IR 组 Kir2.1 蛋白相对含量明显低于 C 组 ($P < 0.05$), Sev 组 Kir2.1 蛋白相对含量明显高于 IR 组 ($P < 0.05$); C 组 Kir2.1 蛋白呈强阳性表达, 且具有规则的分布; IR 组 Kir2.1 蛋白的表达点状分散分布且无规律; Sev 组 Kir2.1 蛋白呈强阳性表达, 且具有规则的分布。**结论** 七氟醚降低低温全心缺血-再灌注心律失常的发生, 其分子机制可能与 Kir2.1 蛋白的表达与分布改善有关。

【关键词】 七氟醚; 低温全心缺血-再灌注; 再灌注心律失常; Kir2.1 蛋白

Effect of sevoflurane on the expression of Kir2.1 protein in myocardium with hypothermic global ischemia-reperfusion arrhythmia WANG Guilong, MI Rui, XU Xiongkun, GAO Hong, LIU Yanqiu, LI Huayu, DAI Dongjun, FU Xiaokui. The People's Hospital of Zhijin County, Bijie 552100, China
Corresponding author: GAO Hong, Email: 2169617@qq.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of sevoflurane on the expression of Kir2.1 protein in myocardial tissue of arrhythmia induced by hypothermic global ischemia-reperfusion. **Methods** Twenty-four healthy adult male SD rats, weighing 280–320 g, were successfully prepared into Langendorff isolated heart perfusion model. After 15 min of K-H liquid equilibrium perfusion, they were randomly divided into three groups ($n = 8$): control group (group C), hypothermic global ischemia-reperfusion group (group IR) and sevoflurane group (group Sev). In group C, K-H fluid was continuously perfused for 105 min. In group IR, after 15 min of continuous perfusion of K-H solution, Thomas solution (4 °C, 20 ml / kg) was injected to make the heart stop beating. When the heart stopped beating for 30 minutes, Thomas solution (4 °C, 10 ml / kg) was added. When the heart stopped beating for 60 min, K-H solution was reperused for 30 min. In group Sev, K-H fluid contained 1.0 MAC sevoflurane and other procedures were the same as that in group IR. The occurrence of arrhythmia were recorded during the period of reperfusion. MAP_s including time course ($MAPD_{50}$ and $MAPD_{90}$) of endocardium and epicardium was recorded at the time of balanced perfusion for 15 min (T_0), continuous perfusion for 15 min (T_1), reperfusion for 15 min/continuous perfusion for 105 min (T_2) and reperfusion for 30 min/continuous perfusion for 120 min (T_3). The expression and distribu-

DOI:10.12089/jca.2020.05.012

作者单位: 552100 贵州省毕节市, 织金县人民医院麻醉科 (王贵龙、糜睿、徐雄坤); 贵州医科大学第三附属医院麻醉科 (高鸿); 贵阳市第四人民医院麻醉科 (刘艳秋); 贵州医科大学麻醉学院 (李华宇、代东君、符校魁)

通信作者: 高鸿, Email: 2169617@qq.com

tion of Kir2.1 protein in myocardium were detected by immunoblotting and immunohistochemistry. **Results**

Arrhythmias occurred in 6 cases in group IR and returned to normal rhythm in 1 case within 2 min, and that occurred in 2 cases in group Sev and returned to normal rhythm in 2 min. The development of arrhythmia and time for restoration of spontaneous heart beat in group IR were significantly longer than those in group Sev ($P < 0.05$); Compared with T_0-T_1 , $MAPD_{90}$ in the outer and inner membrane of group IR was significantly longer ($P < 0.05$), and $MAPD_{90}$ in the outer membrane of group Sev was significantly longer ($P < 0.05$). At T_2-T_3 , $MAPD_{90}$ of outer and inner membrane in group Sev and group IR were significantly longer than that in group C ($P < 0.05$), and $MAPD_{90}$ of inner and outer membrane in group Sev were significantly shorter than that in group IR ($P < 0.05$). The relative content of Kir2.1 protein in group IR was significantly lower than that in group C ($P < 0.05$), and the relative content of Kir2.1 protein in group Sev was significantly higher than that in group IR ($P < 0.05$). Kir2.1 protein in group C showed strong positive expression and regular distribution. Kir2.1 protein in group IR was scattered and irregular. Kir2.1 protein in group Sev showed strong positive expression and regular distribution. **Conclusion** Sevoflurane can reduce the occurrence of hypothermia ischemia-reperfusion arrhythmia, and its molecular mechanism may be related to the changes of Kir2.1 protein expression and distribution.

【Key words】 Sevoflurane; Hypothermic global ischemia-reperfusion; Reperfusion arrhythmia; Kir2.1 protein

缺血-再灌注心律失常(reperfusion arrhythmia, RA)为缺血心肌恢复血供时的主要并发症,其引发的血流动力学紊乱与患者预后密切相关^[1-2]。课题组前期研究发现,心肌复极时程延长是 RA 发生的电生理基础^[3],而七氟醚可通过缩短心肌复极时程降低 RA 的发生风险^[4-5]。由 Kir2.1 蛋白构成的内向整流钾通道电流(Ik1)是心肌细胞动作电位复极 3、4 期的关键离子通道^[6-7]。研究表明 Kir2.1 蛋白表达下调可引起动作电位的延长^[8],但七氟醚对低温全心缺血-再灌注心律失常心肌组织 Kir2.1 蛋白的表达尚不清楚。因此本研究通过 Langendorff 离体心脏低温全心缺血-再灌注心脏模型,建立观察七氟醚对 RA 心室肌组织 Kir2.1 蛋白表达及分布的影响,明确其降低 RA 发生的分子机制。

材料与方法

实验动物与分组 健康成年雄性 SD 大鼠(贵州医科大学实验动物中心提供),体重为 280~320 g。制备 Langendorff 离体心脏灌注模型 24 只, K-H 液平衡灌注 15 min 后,随机分为三组:对照组(C 组)、低温全心缺血-再灌注组(IR 组)和七氟醚组(Sev 组)。C 组 37℃ K-H 液持续平衡灌注 105 min。IR 组 37℃ K-H 液继续灌注 15 min 后,注射 4℃ Thomas 液 20 ml/kg 使心脏停跳,在心脏停跳 30 min 时追加注射 4℃ Thomas 液 10 ml/kg,当心脏停跳 60 min 时再灌注 K-H 液 30 min。Sev 组灌注液为饱含 1MAC 七氟醚的 K-H 液,其余同 IR 组。

检测心律失常情况和单相动作电位 观察并记录再灌注期间心脏复跳时间、心律失常发生情况和心律失常持续时间。于平衡灌注 15min(T_0)、继

续灌注 15 min/平衡灌注 30 min(T_1)、再灌注 15 min/平衡灌注 105 min(T_2)、再灌注 30 min/平衡灌注 120 min(T_3)时记录左心室前壁外膜层和内膜层心室肌单相动作电位(MAP),计算 MAP 50% 和 90%的复极时程($MAPD_{50}$ 和 $MAPD_{90}$)。

Western blot 法检测心室肌组织 Kir2.1 蛋白的相对含量 取上述实验左心室肌组织,按说明加入适当细胞裂解液和蛋白酶抑制剂(PMSF),冰上匀浆,运用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量。根据分子量大小,制备 12%的分离胶,5%的浓缩胶,上层胶电压 80 V 下层胶电压 120 V 进行电泳,200 mA 恒电流转膜 2 h,用封闭液封闭 2 h,分别孵育兔抗大鼠一抗(Kir2.1 抗体,1:2 000)4℃过夜,加用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:8 000)室温孵育 1h。ECL 显色后曝光,显影。以内参 GAPDH 蛋白条带光密度值作为标准,计算 Kir2.1 蛋白相对含量。

免疫组织化学法检测心室肌组织 Kir2.1 蛋白的分布 石蜡包埋组织切片 3 μm 厚,脱蜡、水化;室温下 3%过氧化氢孵育 10 min,采用高压热修复法进行抗原修复,分别以兔抗大鼠(Kir2.1 抗体)作为一抗过夜,每张切片加 50 μl 羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体 37℃孵育 30 min,对每张切片 100 μl 采用 DAB 染色液显色,最终显微镜下观察,若出现棕黄色后立即将切片放入自来水中终止反应。用自来水冲洗苏木素复染,脱水透明、中性树胶封片。以出现棕黄色物质者定为 Kir2.1 阳性细胞。观察 Kir2.1 蛋白的分布情况。

统计分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采

用重复测量资料的方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

离体心脏灌注期间,C 组无心律失常发生;复跳时 IR 组 6 例发生心律失常,2 min 内 1 例恢复正常节律;Sev 组 2 例发生心律失常,2 min 内均恢复正常节律。IR 组心脏复跳时间和心律失常持续时间明显长于 Sev 组($P<0.05$)(表 1)。

表 1 IR 组和 Sev 组大鼠心脏复跳时间和心律失常持续时间的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	心脏复跳时间 (s)	心律失常持续时间 (min)
IR 组	8	23.6 $\pm$ 5.2	6.9 $\pm$ 1.7
Sev 组	8	12.4 $\pm$ 4.8 ^a	3.3 $\pm$ 1.1 ^a

注:与 IR 组比较,^a $P<0.05$

三组间外膜层和内膜层组内组间 MAPD₅₀ 差异

表 2 三组大鼠心室肌不同部位不同时点 MAPD₅₀ 的比较($\text{ms}, \bar{x}\pm s$)

部位	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
外膜层	C 组	8	17.7 $\pm$ 2.0	16.6 $\pm$ 2.9	16.1 $\pm$ 3.8	17.9 $\pm$ 2.4
	IR 组	8	17.5 $\pm$ 3.2	16.2 $\pm$ 1.7	16.1 $\pm$ 2.6	17.1 $\pm$ 2.5
	Sev 组	8	17.3 $\pm$ 3.2	15.1 $\pm$ 2.3	17.1 $\pm$ 4.2	17.8 $\pm$ 2.6
内膜层	C 组	8	18.8 $\pm$ 2.2	16.0 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 3.7	16.0 $\pm$ 3.6
	IR 组	8	18.9 $\pm$ 1.0	16.4 $\pm$ 4.9	15.3 $\pm$ 4.0	17.5 $\pm$ 3.9
	Sev 组	8	18.2 $\pm$ 2.9	15.9 $\pm$ 3.1	18.9 $\pm$ 3.6	17.9 $\pm$ 3.8

表 3 三组大鼠心室肌不同时点 MAPD₉₀ 的比较($\text{ms}, \bar{x}\pm s$)

部位	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
外膜层	C 组	8	34.7 $\pm$ 4.0	33.6 $\pm$ 2.9	33.9 $\pm$ 3.8	32.9 $\pm$ 2.4
	IR 组	8	33.5 $\pm$ 3.2	34.2 $\pm$ 1.7	47.1 $\pm$ 2.6 ^{abc}	45.1 $\pm$ 2.5 ^{abc}
	Sev 组	8	34.3 $\pm$ 3.2	33.1 $\pm$ 2.3	39.1 $\pm$ 4.2 ^{abcd}	37.8 $\pm$ 2.6 ^{abcd}
内膜层	C 组	8	39.8 $\pm$ 2.2	36.0 $\pm$ 0.7	35.3 $\pm$ 3.7	36.6 $\pm$ 3.6
	IR 组	8	39.9 $\pm$ 3.1	35.4 $\pm$ 4.9	47.3 $\pm$ 4.0 ^{abc}	47.5 $\pm$ 3.9 ^{abc}
	Sev 组	8	39.2 $\pm$ 2.9	35.9 $\pm$ 3.1	39.9 $\pm$ 3.6 ^{cd}	37.9 $\pm$ 3.8 ^{cd}

注:与 T₀ 比较,^a $P<0.05$;与 T₁ 比较,^b $P<0.05$;与 C 组比较,^c $P<0.05$;与 IR 组比较,^d $P<0.05$

无统计学意义(表 2)。

与 T₀ 和 T₁ 时比较,T₂—T₃ 时 IR 组外膜层和内膜层 MAPD₉₀ 明显延长,Sev 组外膜层 MAPD₉₀ 明显延长($P<0.05$)。T₂—T₃ 时 Sev 组和 IR 组外膜层和内膜层 MAPD₉₀ 明显长于 C 组($P<0.05$),Sev 组内膜层和外膜层 MAPD₉₀ 明显短于 IR 组($P<0.05$)(表 3)。

C 组 Kir2.1 蛋白呈强阳性表达,且具有规则的分布;IR 组 Kir2.1 蛋白的表达点状分散分布且无规律;Sev 组 Kir2.1 蛋白呈强阳性表达,且具有规则的分布(图 1)。

与 C 组比较,IR 组 Kir2.1 蛋白相对含量明显降低($P<0.05$);与 IR 组比较,Sev 组 Kir2.1 蛋白相对含量明显增加($P<0.05$)。C 组和 Sev 组 Kir2.1 蛋白相对含量差异无统计学意义(图 2)。

讨 论

缺血-再灌注心律失常(reperfusion arrhythmia, RA)是指冠状动脉闭塞或心肌血流阻断后恢复心肌再灌注所致的心律失常。近年来,随着麻醉、心脏

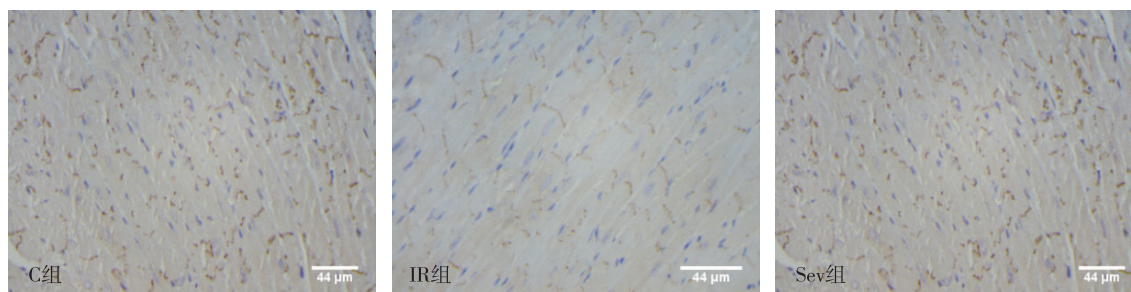


图1 三组大鼠心室肌组织中 Kir2.1 蛋白分布免疫组化染色图(×400)

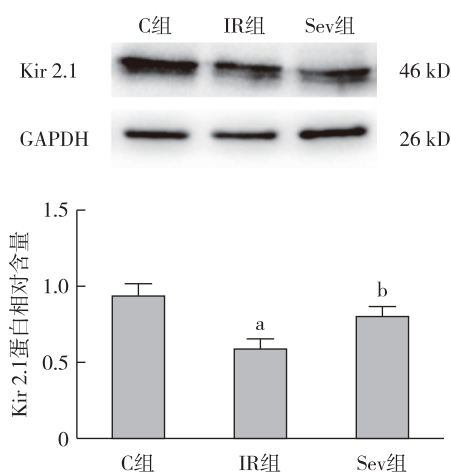
注:与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$

图2 三组大鼠心室肌组织中 Kir2.1 蛋白相对含量

外科、术后护理及心肺转流等技术的进步,心脏外科手术的效果得到了显著的改善^[9]。然而,心肺转流心内直视手术过程中心肌血流完全阻断,尽管采用低温高钾停跳等措施保护心肌,但 RA 仍然是心内直视手术心脏复跳时的主要并发症,其发生率可高达 80%^[1-2],直接影响此类手术的成败和患者临床结局。

课题组前期研究表明低温全心缺血-再灌注心肌复极时程延长是 RA 的重要电生理机制^[3],且七氟醚可通过缩短缺血-再灌注心肌复极时程而改善缺血-再灌注期间心律失常发生情况^[4-5]。离子通道表达或功能异常是心律失常发生的病理生理基础。通道存在于心室肌细胞,主要作用是维持静息膜电位的稳定和可兴奋细胞的兴奋。Ik1 的主要组成成份是 Kir2.1,由 KCNJ2 基因编码,是构成心肌细胞动作电位复极末期的主要电流通道之一^[10-11]。研究显示,心肌肥厚、心肌梗死、急性缺血性心肌等病理性心肌病时,心肌组织 Kir2.1 蛋白表达下调引起的 Ik1 下降可导致静息膜电位去极化并延长动

作电位时程,增加心律失常风险^[12-13]。本研究发现,离体心脏缺血-再灌注大鼠心室肌 Kir2.1 蛋白表达减少,同时 MAPD 延长,从而使得心律失常发生风险增加,且七氟醚的使用可改善这一情况。

心肌细胞的单相动作电位时程(monophasic action potential duration, MAPD)代表着动作电位的 0~3 相电位水平,反映心肌细胞复极化的过程。MAPD₅₀反映动作电位的 2 相,此期由 Ca^{2+} 内流与 K^{+} 外流而形成,主要涉及 L 型钙电流($I_{\text{Ca-L}}$)、内向整流钾电流快激活成分(I_{Kr})及内向整流钾电流的慢激活成分(I_{Ks})。MAPD₉₀代表复极化的 3 相,该期主要与 K^{+} 外流相关,主要涉及 I_{Kr} 和 I_{Ks} ^[14-15]。本实验结果显示七氟醚可缓解低温全心缺血-再灌注心律失常心室肌细胞复极时程 MAPD₉₀。

本实验结果显示七氟醚可明显上调低温全心缺血-再灌注心室肌组织 Kir2.1 蛋白的表达,并改善其分布情况,且使得缺血-再灌注心肌复极时程缩短,心律失常发生风险降低,提示七氟醚可能通过调控 I_{K1} 通道而缓解再灌注心律失常得发生,其具体机制有待进一步深入研究。

综上所述,七氟醚通过调控 Kir2.1 蛋白表达及分布而缩短低温全心缺血-再灌注心室肌复极时程,改善缺血-再灌注心律失常的发生。

参 考 文 献

- [1] Talwar S, Patel K, Juneja R, et al. Early postoperative arrhythmias after pediatric cardiac surgery. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2015, 23(7): 795-801.
- [2] Kadric N, Osmanovic E. Rhythm disturbance after myocardial revascularization. Med Arch, 2017, 71(6): 400-403.
- [3] 何幼芹, 高鸿, 刘艳秋, 等. 低温缺血-再灌注对心房肌电稳定性的影响. 临床麻醉学杂志, 2019, 35(11): 1118-1121.
- [4] 王贵龙, 高鸿, 王子君, 等. 不同浓度七氟醚对缺血-再灌注心肌单相动作电位影响. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(5): 478-482.
- [5] 王贵龙, 高鸿, 王子君, 等. 七氟醚对大鼠离体心脏全心缺

- 血-再灌注心律失常及电生理的影响. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(12): 1223-1226.
- [6] 李文凭, 崔晓栋, 成敏. 内向整流钾通道 Kir2.1 亚型的表达及功能. 生理科学进展, 2015, (4): 287-289.
- [7] Balse E, Boycott HE. Ion channel trafficking: control of ion Channel Density as a Target for Arrhythmias. Front Physiol, 2017, 8: 808.
- [8] Zuo D, Chen K, Zhou M, et al. Kir2.1 and K2P1 channels reconstitute two levels of resting membrane potential in cardiomyocytes. J Physiol, 2017, 595(15): 5129-5142.
- [9] Soltani G, Jahanbakhsh S, Tashnizi MA, et al. Effects of dexmedetomidine on heart arrhythmia prevention in off-pump coronary artery bypass surgery: a randomized clinical trial. Electron Physician, 2017, 9(10): 5578-5587.
- [10] Ji Y, Veldhuis MG, Zandvoort J, et al. PA-6 inhibits inward rectifier currents carried by V93I and D172N gain-of-function $K_{IR}2.1$ channels, but increases channel protein expression. J Biomed Sci, 2017, 24(1): 44.
- [11] Veeraraghavan R, Lin J, Keener JP, et al. Potassium channels in the Cx43 gap junction perinexus modulate ephaptic coupling: an experimental and modeling study. Pflugers Arch, 2016, 468(10): 1651-1661.
- [12] He J, Xu Y, Yang L, et al. Regulation of inward rectifier potassium current ionic channel remodeling by AT1 -Calcineurin-NFAT signaling pathway in stretch-induced hypertrophic atrial myocytes. Cell Biol Int, 2018, 42(9): 1149-1159.
- [13] Wang LH, Yu CH, Fu Y, et al. Berberine elicits anti-arrhythmic effects via IK1/Kir2.1 in the rat type 2 diabetic myocardial infarction model. Phytother Res, 2011, 25(1): 33-37.
- [14] Gary Tse. Mechanisms of cardiac arrhythmias. J Arrhythmia, 2016, 32(2): 75-81.
- [15] Jang YH, Kim JH, Lee YC. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels play a role in reducing both myocardial infarction and reperfusion arrhythmia in remote ischemic preconditioned hearts. Anesthesiol Pain Med, 2017, 7(1): e42505.

(收稿日期:2019-05-19)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》中英文摘要撰写规范

论著文章须有中、英文摘要,内容必须包括目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)四个部分,目的主要是回答为什么进行此项研究,说明提出问题的理由,表明研究的范围和重要性。方法中应简要说明研究课题的基本设计,所用的原理,条件,对象,材料,设备,如何分组对照,研究范围精确度,观察的指标等。结果部分应写出本研究的主要数据,被确定的关系,观察结果,得到的效果,有何新发现。结论是结果内容的升华,是由结果推论而出,是结果的分析,研究的比较,评价,应用,假设,启发,建议及预测等。摘要应具有独立性,即不阅读全文就能获得必要的信息,采用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等主语,不加评论和解释,摘要中首次出现的缩略语、代号等,非公认知者,须注明全称。考虑篇幅的限制,中文摘要可简略些,一般 300~500 字,英文摘要与中文摘要原则上相对应,考虑到国外读者的需要,可更详细,一般 500 个实词左右。英文摘要尚应包括文题(仅第一个字母大写)、所有作者姓名(姓在前,名在后;姓全大写,名字仅首字母大写)、第一作者单位名称和科室、所在城市名、邮政编码及国名。