

## • 研究报告 •

## 阿片受体拮抗剂对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护效应

管香怡 李培杰 张正义 汤晓琴 赵建洪 曹文

【关键词】阿片受体；缺血/再灌注损伤，心肌；心肌；超微结构

近 20 年来,随着对急性心肌梗死 (AMI)溶栓及急诊介入治疗的广泛开展,其病死率已明显降低。然而,血管再通后的再灌注损伤可导致心脏功能障碍,影响患者的生活质量甚至预后。目前已证实再灌注损伤与细胞内钙超载、氧自由基及炎症介质有关,如何防治缺血/再灌注(I/R)损伤已成为目前研究的热点问题。新近一些研究证实,啡啡可通过阿片受体对 I/R 心肌产生保护效应,但其确切机制尚不清楚。已知人类和动物心脏组织中存在  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  3 种阿片受体亚型,而成年大鼠仅发现有  $\delta$ 、 $\kappa$  2 种受体亚型。本实验中通过建立大鼠心肌 I/R 模型,探讨啡啡对大鼠心肌急性 I/R 损伤的保护效应是通过激活何种特异性阿片受体起作用的,为临床早期正确使用特异性阿片受体( $\delta$  和  $\kappa$  受体)激动剂提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 动物及分组:健康 SD 大鼠 50 只,雌雄不拘,体重 200~250 g,由甘肃中医药大学动物中心提供。实验前适应性饲养 1 周。术前禁食 12 h,自由饮水。按随机数字表法分为 I/R 组、啡啡组、啡啡+ $\kappa$  受体拮抗剂(NTI)组、啡啡+ $\delta$  受体拮抗剂(nor-BNI)组、假手术组,每组 10 只。

1.2 动物模型制备及处理:用质量分数为 0.45%的戊巴比妥钠 1.0 ml/kg 腹腔注射麻醉,行颈内动脉插管。气管切开、插管,行机械通气,开胸、结扎左冠状动脉(冠脉)前降支,缺血 30 min 后再灌注

4.5 h,缺血前、缺血后和再灌注后各描记心电图 1 次,以结扎后 ST 段升高为心肌缺血模型制备成功的标志。各药物干预组均于缺血前 10 min 和再灌注后 2 h 分别腹腔注射啡啡 0.36 mg/kg、nor-BNI 0.724 mg/kg(Tocris 公司提供)、NTI 0.45 mg/kg(Tocris 公司),其中 nor-BNI/NTI 与啡啡的分子数之比为 1:1;I/R 组和假手术组注入等量生理盐水。

1.3 检测指标和方法:于缺血 10 min 及再灌注 4.5 h 取颈外动脉血检测各项指标。内皮素-1(ET-1)试剂盒由北京北免东雅生物技术研究所提供,采用竞争放射免疫法(RIA)进行分析测量。

1.4 心肌梗死面积测定:置心室组织于 -20 C 冰箱冻存,连续切成 1~2 mm 厚的切片共 9 片,将整个心肌切片放入 pH7.4、质量分数为 1%的氯化三苯四唑(TTC)溶液中,在 37 C 孵箱中孵化 5~30 min。结果显示梗死心肌呈白色(心肌梗死范围,IA),正常心肌呈鲜红色(正常心肌范围,NR),然后用数码相机分析系统计算心肌梗死面积[心肌梗死面积=梗死面积/心室总面积 $\times$ 100%]。

1.5 统计学处理:采用 SPSS8.0 统计软件包,计量资料数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用方差分析、配对  $t$  检验等, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组血浆 ET-1 浓度比较(表 1):缺血 10 min I/R 组和各药物干预组的心浆 ET-1 浓度均较假手术组显著增加( $P$  均  $<0.01$ ),而 I/R 组和各药物干预组间比较差异则均无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ )。

再灌注 4.5 h 后啡啡组心浆 ET-1 浓度显著低于 NTI 组( $P<0.01$ ),但与 nor-BNI 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。I/R 组及 NTI 组再灌注 4.5 h 心浆 ET-1 浓度较缺血 10 min 显著增加( $P$  均  $<0.01$ );啡啡及 nor-BNI 组增加不显著( $P$  均  $>0.05$ )。

2.2 各组心肌梗死面积比较(表 2):啡

啡组心肌梗死面积较 I/R 组和 NTI 组显著减小,差异具有统计学意义( $P$  均  $<0.05$ ),其作用较 nor-BNI 组相当( $P>0.05$ );NTI 组不能明显缩小 I/R 时的心肌梗死面积( $P>0.05$ )。

表 1 各组大鼠心浆 ET-1 浓度变化( $\bar{x}\pm s$ ) ng/L

组别	动物数(只)	缺血 10 min	再灌注 4.5 h
I/R 组	10	40.31 $\pm$ 13.28 <sup>*</sup>	117.38 $\pm$ 20.61 <sup>*▲</sup>
啡啡组	10	46.79 $\pm$ 18.78 <sup>*</sup>	58.39 $\pm$ 13.71 <sup>#</sup>
NTI 组	10	37.85 $\pm$ 15.10 <sup>*</sup>	108.02 $\pm$ 10.65 <sup>*△▲</sup>
nor-BNI 组	10	41.22 $\pm$ 10.71 <sup>*</sup>	67.60 $\pm$ 11.55 <sup>*#☆</sup>
假手术组	10	34.22 $\pm$ 9.06	46.88 $\pm$ 6.78

注:与假手术组比较:<sup>\*</sup> $P<0.01$ ;与 I/R 组比较:<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与啡啡组比较:<sup>△</sup> $P<0.01$ ;与 NTI 组比较:<sup>☆</sup> $P<0.01$ ;与本组缺血 10 min 比较:<sup>▲</sup> $P<0.01$

表 2 各组大鼠心肌梗死面积比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	心室总面积	梗死面积(%)
I/R 组	7	803.81.8 $\pm$ 52.289.4	33.0 $\pm$ 4.7
啡啡组	7	770.403.4 $\pm$ 69.369.0	27.0 $\pm$ 2.8 <sup>#</sup>
NTI 组	7	814.491.4 $\pm$ 169.625.1	35.0 $\pm$ 5.4 <sup>△</sup>
nor-BNI 组	7	799.301.8 $\pm$ 98.071.8	23.0 $\pm$ 3.5 <sup>#☆</sup>

注:与 I/R 组比较:<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与啡啡组比较:<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与 NTI 组比较:<sup>☆</sup> $P<0.05$

2.3 心肌细胞透射电镜结果(彩色插页图 1):I/R 组和 NTI 组心肌细胞线粒体肿胀、嵴溶解、甚至空泡化,心肌纤维出现收缩带、竹节样改变、甚至出现肌溶灶;啡啡组和 nor-BNI 组线粒体数量增多致密,线粒体肿胀不明显,心肌纤维排列尚规则有序,肌膜下可见散在的肌溶灶;假手术组细胞核形态正常,线粒体无肿胀,心肌纤维排列整齐。

## 3 讨论

啡啡是一种非选择性阿片受体激动剂,可兴奋  $\delta$  和(或) $\kappa$  受体,新近研究结果表明,啡啡介导的心肌保护作用是通过阿片受体实现的,而纳洛酮可以拮抗这种作用<sup>[1-2]</sup>。刘良明等<sup>[3]</sup>在创伤性低容量性休克大鼠中观察到脑组织阿片受体升高与血流动力学变化和心功能指标降低呈显著负相关,给予 Nor-BNI 组可逆转心功能下降。本研究结果表明,

基金项目:甘肃省科学事业费资助项目(QS061-C33-38)

作者单位:730030 甘肃,兰州大学第二医院急救中心(管香怡,李培杰,张正义,曹文),放射科(赵建洪);兰州大学基础医学院解剖教研室(汤晓琴)

通讯作者:李培杰(Email:lpj8942552@yahoo.com.cn)

作者简介:管香怡(1972-),女(汉族),甘肃省人,硕士研究生,主治医师(Email:zanxy04@lzu.cn)。

NTI 具有拮抗吗啡降低血浆 ET-1 及缩小心肌梗死面积的作用,从而拮抗吗啡的心肌保护效应,而 nor-BNI 对吗啡的心肌保护效应无明显影响,由此证实吗啡主要是通过  $\kappa$  受体介导,而非  $\delta$  受体发挥心肌保护效应。从心肌超微结构方面也进一步证实吗啡激活  $\kappa$  阿片受体对缺血心肌产生保护作用。Milei 和杨兴易等<sup>[4-5]</sup>对心肌 I/R 后细胞超微结构的研究发现,I/R 后心肌细胞超微结构改变明显,证实再灌注可产生快速的线粒体损伤,包括线粒体肿胀、嵴溶解、心肌纤维断裂、膜渗漏等改变,本研究结果与文献<sup>[6]</sup>报道的基本一致。关于  $\kappa$  阿片受体激动产生心肌保护效应的机制观点有:① Wang 和 Wu 等<sup>[7-8]</sup>的实验发现,激活心肌细胞膜上的  $\kappa$  阿片受体可模拟缺血预处理早期和晚期的保护作用。② 陈迈等<sup>[9]</sup>的实验结果表明,ATP 敏感性钾通道( $K_{ATP}$ )介导了刺激  $\kappa$  阿片受体诱导的心脏保护性效应。而  $K_{ATP}$  激活可抑制钙内流,有利于减轻心肌细胞内和线粒体内的钙超载,从而使心肌损伤得以减轻<sup>[10]</sup>。③ 有研究表明,蛋白激酶 C (PKC) 已被证实为  $\kappa$  阿片受体介导的心脏保护作用的重要细胞内信使<sup>[11]</sup>。④ 心肌缺血后内源性阿片肽与心肌细胞膜上的阿片受体结合,通过 Gi 蛋白的耦联作用抑制腺苷酸环化酶(AC),降低细胞内环磷酸腺苷(cAMP)浓度,抑制细胞膜钙通道蛋白磷酸化,降低细胞内  $Ca^{2+}$  浓度。

以往对阿片受体介导心脏保护作用的机制研究多集中在钙超载、钾通道、PKC 等途径,而未涉及血管活性介质的作用。ET-1 由血管内皮细胞合成和分泌,是目前发现最强的缩血管物质,可引

起多数血管收缩,尤以冠脉最敏感,分布于心血管系统的主要是 ET-1,ET 属二氢吡啶敏感的钙通道激动剂,它可促进  $Ca^{2+}$  内流导致心肌和血管平滑肌细胞内  $Ca^{2+}$  超载,增强心肌正性变时和变力作用,引起冠脉收缩,导致心肌严重缺血甚至发生梗死。最近有实验证实,吗啡可通过降低血浆 ET-1 浓度而发挥心肌保护效应<sup>[1-2]</sup>。本研究证实,吗啡通过兴奋  $\kappa$  阿片受体降低血浆 ET-1 从而发挥对 I/R 心肌的保护效应,使心肌梗死面积减小。但也有实验显示,吗啡对大鼠心肌急性 I/R 损伤的保护作用是经  $\delta$  受体介导的<sup>[12]</sup>,而与  $\kappa$  阿片受体无关。这与本实验及一些研究结果不符,其原因尚有待探讨。

#### 参考文献:

- 1 张正义,李培杰,陈天铎,等.吗啡对急性心肌梗死保护效应的临床研究[J].中国急救医学,2004,24(3):160-162.
- 2 张正义,李培杰,陈天铎,等.吗啡对急性心肌梗死再灌注损伤保护效应的实验研究[J].中国危重病急救医学,2004,16(11):656-659.
- 3 刘良明,胡德耀,卢儒权,等.创伤低血容量性休克大鼠脑  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  阿片受体变化及其在心血管功能抑制中的作用[J].中国危重病急救医学,1998,10(7):390-393.
- 4 Milei J, Fraga C G, Grana D R, et al. Ultrastructural evidence of increased tolerance of hibernating myocardium to cardioplegic ischemia-reperfusion injury [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(12): 2329-2336.
- 5 杨兴易,王学斌,林兆奋,等.贝科能对心肺复苏后大鼠心、脑、肾的保护作用[J].中华急诊医学杂志,2006,15(2):131-135.

- 6 田岳凤,易受乡,严洁,等.电针内关穴对心肌缺血/再灌注损伤预防保护作用的实验研究(Ⅰ)——对超微结构及细胞凋亡的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(1):15-18.
- 7 Wang G Y, Wu S, Pei J M, et al. Kappa - but not delta - opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(1):H384-391.
- 8 Wu S, Li H Y, Wong T M. Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte. Involvement of kappa - opioid receptor [J]. Circ Res, 1999, 84(12):1388-1395.
- 9 陈迈,贾国良,裴建明,等.  $K_{ATP}$  通道介导了刺激  $\kappa$  阿片受体诱导的延迟性心脏保护效应[J].第四军医大学学报,2003,24(16):1460-1462.
- 10 Pyle W G, Smith T D, Hofmann P A. Cardioprotection with kappa - opioid receptor stimulation is associated with a slowing of cross-bridge cycling [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(4): H1941-H1948.
- 11 Wang G Y, Zhou J J, Shan J, et al. Protein kinase C - epsilon is a trigger of delayed cardioprotection against myocardial ischemia of kappa - opioid receptor stimulation in rat ventricular myocytes [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 299(2):603-610.
- 12 Schultz J E, Hsu A K, Gross G J. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta 1 but not  $\mu$  - or kappa - opioid receptors [J]. Circulation, 1998, 97(13):1282-1289.

(收稿日期:2007-02-01)

(本文编辑:李银平)

## • 科研新闻速递 •

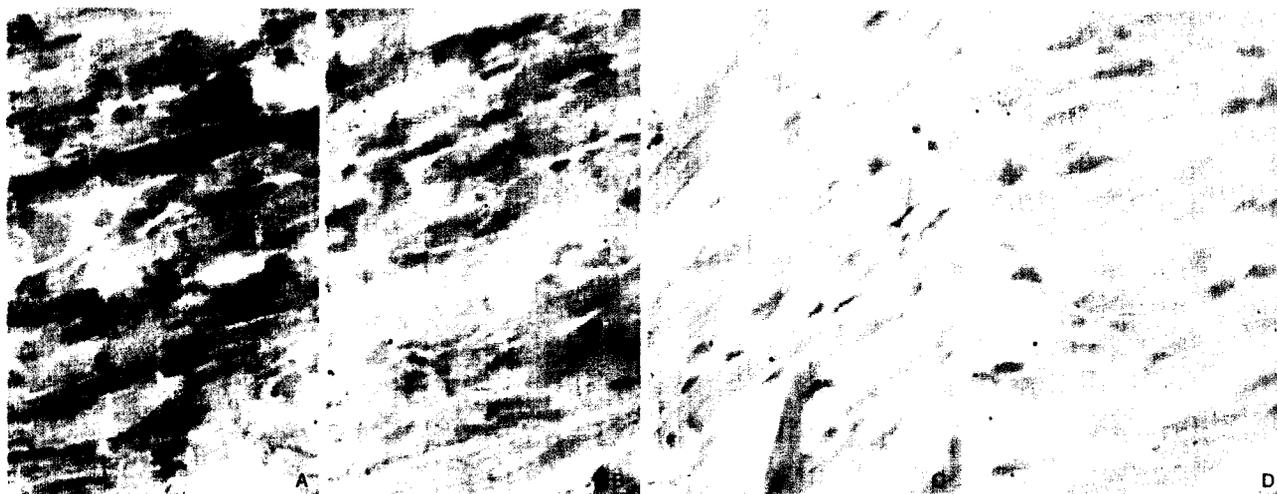
### 心外科手术患者血浆低密度脂蛋白和高密度脂蛋白的变化

最近比利时学者报道了外科心肺分流手术时血浆低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)成分变化的研究结果。抽取 21 例实施心外科手术患者术前及术后 2 d 的血液样本,分析血浆中类脂化合物、载体蛋白、过氧化氢和维生素 E 的含量。结果显示血浆脂类、维生素 E 和脂蛋白含量具有相关性。类脂含量和抗氧化剂含量极度减少,而且手术诱发血浆中脂蛋白组成发生改变,LDL 中载脂蛋白 B 减少 46% ( $P < 0.0001$ ),引起循环中 LDL 颗粒减少。术后 LDL 中胆固醇脂浓度相对于载脂蛋白 B 的浓度无变化,但甘油三酯增加 113% ( $P < 0.001$ ),游离胆固醇增加 22% ( $P < 0.05$ ),磷脂增加 23% ( $P < 0.025$ ),说明 LDL 相对于载脂蛋白 B 的颗粒直径增加。术后 HDL 中的载脂蛋白血清淀粉样蛋白 A(SAA)增加 ( $P < 0.05$ ),而载脂蛋白 A1 减少 22% ( $P < 0.005$ )。HDL 中的胆固醇脂减少与载脂蛋白 A1 和甘油三酯具有相关性,与载脂蛋白 A1 比较,游离胆固醇、磷脂及过氧化物浓度增加,维生素 E 的浓度无变化。根据以上结果,研究者认为心外科手术可引起血液中 LDL 含量减少, HDL 颗粒明显变小;且心外科手术引起的极性和非极性类脂类变化与 LDL 和 HDL 相反。

吴静,编译自《Lipids》,2007-10-03(电子版);胡森,审校

# 结扎大鼠冠状动脉对心肌和背根神经节内肿瘤坏死因子- $\alpha$ 表达的影响

(正文见657页)



A: CAO组1h缺血区心肌; B: CAO组1h非缺血区心肌; C: Sham组; D: 对照组

图1 各组大鼠TNF- $\alpha$ 在心肌的表达效应(免疫组化,  $\times 400$ )

Figure 1 Localization of TNF- $\alpha$  in myocardium of rats in each group(immunohistochemistry,  $\times 400$ )



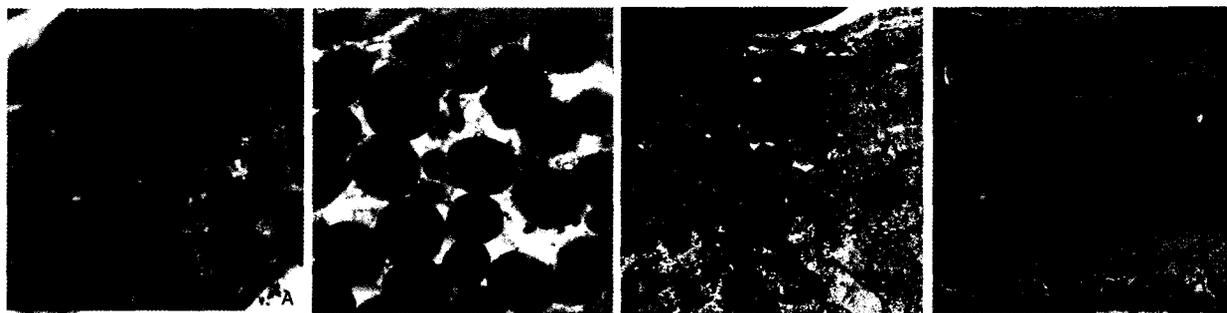
A: CAO组0.5h DRG; B: Sham组DRG; C: CAO组0.5h DRG纤维; D: CAO组0.5h 血管内皮细胞

图1 各组大鼠TNF- $\alpha$ 在DRG的表达效应(免疫组化,  $\times 400$ )

Figure 1 Localization of TNF- $\alpha$  in DRG of rats in each group(immunohistochemistry,  $\times 400$ )

# 阿片受体拮抗剂对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护效应

(正文见693页)



A: I/R( $\times 25\ 000$ ); B: 吗啡组( $\times 25\ 000$ ); C: NTI组( $\times 15\ 000$ ); D: nor-BNI组( $\times 15\ 000$ )

图1 各组大鼠心肌细胞透射电镜结果(醋酸铀-枸橼酸铅双染)

Figure 1 Transmission electron microscope changes of myocardial cell of rats in each group(uranylacetate and lead citrate double staining)