

· 基础研究 ·

# 盐酸右美托咪定预处理对缺血-再灌注损伤大鼠心肌 Bax 和 Bcl-2 表达的影响\*

陈盼, 赵明<sup>△</sup>, 蒋鹏, 王胜军, 谷腾飞

(江苏省镇江市江苏大学附属医院麻醉科 212000)

**摘要:**目的 研究盐酸右美托咪定对大鼠心肌缺血-再灌注损伤时心肌凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 表达的影响。方法 将 21 只健康 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组(sham 组,  $n=7$ )、缺血-再灌注组(I/R 组,  $n=7$ )、缺血-再灌注+盐酸右美托咪定组(DEX 组,  $n=7$ )。采用结扎左冠状动脉前降支的方法制备在体大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型。采用 RT-PCR、免疫组化方法检测 Bcl-2 和 Bax mRNA、蛋白的表达, TUNEL 法检测凋亡细胞 TTC 染色测定心肌梗死面积。结果 与 sham 组比较, I/R 组 Bcl-2 和 Bax mRNA 和蛋白表达增加( $P<0.05$ ); 与 I/R 组比较, DEX 组 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达升高( $P<0.05$ ), Bax mRNA 和蛋白表达下降( $P<0.05$ ), 凋亡细胞明显减少( $P<0.01$ ), 心肌梗死面积减小( $P<0.05$ )。结论 盐酸右美托咪定预处理可上调心肌缺血-再灌注损伤大鼠心肌 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达, 下调 Bax mRNA 和蛋白表达, 表明盐酸右美托咪定在心肌缺血-再灌注损伤中有抗凋亡的作用。

**关键词:** 心肌缺血; 心肌再灌注损伤; 细胞凋亡; 基因, bcl-2; 右美托咪定

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)16-1604-03

## Effects of dexmedetomidine on myocardial expression of Bax and Bcl-2 in rat myocardial ischemia/reperfusion injury\*

Chen Pan, Zhao Ming<sup>△</sup>, Jiang Peng, Wang Shengjun, Gu Tengfei

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of dexmedetomidine on the expression of Bcl-2 and apoptosis related protein Bax in rat myocardium apoptosis during ischemia reperfusion. **Methods** 21 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham group, I/R group(I/R group) and IR+dexmedetomidine group(DEX group). Ligation of left anterior descending coronary artery was performed for establishing the rat myocardial ischemia/reperfusion injury mode in vivo. Real-time and immunohistochemistry were used to analyze the expression of Bcl-2 and Bax at mRNA and protein levels, TUNEL was used to analyze apoptotic index and TTC staining was adopted to investigate the infarct size. **Results** Compared with the sham group, the expression of Bcl-2 at mRNA and protein level were increased in the I/R group( $P<0.05$ ), the expression of Bax at mRNA and protein level was significantly increased in the I/R group( $P<0.05$ ). Compared with the I/R group, the expression of Bcl-2 at mRNA and protein level was heightened( $P<0.05$ ) in the DEX group, Bax at mRNA and protein level was decreased in the DEX group( $P<0.01$ ). The infarct size and apoptotic index were reduced compared with the IR group. **Conclusion** Dexmedetomidine can inhibit the apoptosis of myocardium by up-regulating the expression of Bcl-2 and down-regulating the expression of Bax at mRNA and protein level, which may be part of the molecular mechanism of dexmedetomidine on myocardial preservation.

**Key words:** myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; apoptosis; gene, bcl-2; dexmedetomidine

心肌缺血-再灌注损伤(myocardium ischemia-reperfusion injury, MIRI)是心肺复苏、心肌梗死溶栓和介入治疗以及心脏移植中的重要病理生理过程<sup>[1]</sup>。大量基础和临床研究表明缺血、缺氧后的再灌注不仅可以导致细胞的坏死,也可以诱导细胞的凋亡,所以在缺血-再灌注损伤中,细胞凋亡是其众多机制之一<sup>[2]</sup>。盐酸右美托咪定是高选择性  $\alpha_2$ -受体激动剂,其在镇静、镇痛方面的研究已经有报道,但对其在缺血-再灌注损伤中的保护作用的报道却不多。本研究通过建立大鼠在体心肌缺血-再灌注损伤模型,观察盐酸右美托咪定对大鼠心肌缺血-再灌注损伤后心肌组织中 Bcl-2 和 Bax 的表达,旨在探讨盐酸右美托咪定在心肌缺血-再灌注损伤中的抗凋亡作用及其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** 盐酸右美托咪定注射液 200  $\mu\text{g}/2\text{ mL}$ (江苏恒瑞医药有限公司提供,批号:10110434)、Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪; Bcl-2、Bax 和  $\beta$ -actin 引物均由上海生工合成; 逆转录试剂盒和 RT-PCR 试剂盒购于 TAKARA 公司; Trizol Reagent 试剂盒购于 Invitrogen 公司; 兔抗鼠 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗鼠 Bax 单克隆抗体、TUNEL 试剂盒均购于武汉博士德公司; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)购自美国 Sigma 公司。

**1.2 实验动物分组与处理** 健康 3 个月龄 SD 雄性大鼠 21 只,体质量 250~300 g,江苏大学动物中心提供。随机分成 3 组:假手术组(sham 组,  $n=7$ )、缺血-再灌注组(I/R 组,  $n=7$ )、

缺血-再灌注+盐酸右美托咪定组(DEX 组,  $n=7$ )。除 sham 组左冠状动脉穿线不结扎,连续观察 105 min 外,其余两组均结扎左冠状动脉前降支缺血 30 min,再灌注 60 min,DEX 组在结扎前 30 min 经腹腔注射盐酸右美托咪定注射液 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sham 组和 I/R 组在结扎前 30 min 腹腔注入等量的生理盐水。

**1.3 大鼠心肌缺血-再灌注模型的建立** 参照文献[3-4]制备心肌缺血-再灌注损伤模型。

**1.4 检测方法与指标**

**1.4.1 心肌梗死面积测定** 建模成功后,迅速取出心脏,用生理盐水洗去血液,将左心室水平切成约 2 mm 的薄片,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  0.5% TTC 磷酸缓冲液中染色 15 min,用以区分坏死区(灰白色)和非坏死区(深红色)并称质量,梗死面积以坏死区心肌质量占左室质量的百分比来表示。

**1.4.2 Bcl-2 和 Bax 的 mRNA 的检测** 将制备成功的模型动物断头处死,迅速取大鼠心肌缺血区域的组织,提取总 RNA 后,按照 TAKARA 试剂盒将总 RNA 逆转成 cDNA 并保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。应用 SYBR Premix Ex Taq RT-PCR 试剂盒,按照说明书以大鼠心肌组织的 cDNA 为模板在 Rotor-Gene 6000 荧光定量 PCR 仪上进行扩增及定量分析。设定  $\beta$ -actin 为内参基因(正向引物:5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC,反向引物:5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC)。Bcl-2 引物(正向:5'-TCCAAGCAAACGTC-CAGA,反向:5'-TCCTTCCCAGT-TAATGATGC):94  $^{\circ}\text{C}$  30 s $\rightarrow$ 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s $\rightarrow$ 60  $^{\circ}\text{C}$  20 s $\rightarrow$ 72  $^{\circ}\text{C}$  20 s(35 个循环)。Bax 引物(正向:5'-AAAGTGCCCGAGCT-GATC,反向:5'-AGGACTCCAGCCACAAAGA):94  $^{\circ}\text{C}$  30 s $\rightarrow$ 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s $\rightarrow$ 61  $^{\circ}\text{C}$  20 s $\rightarrow$ 81  $^{\circ}\text{C}$  20 s(35 个循环),扩增循环结束后,进行熔解曲线分析,用  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$  方法进行计算和统计。

**1.4.3 免疫组化法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达** 剪下缺血区心肌于 10% 甲醛固定 24 h,石蜡包埋切片,按试剂盒说明书用免疫组化法染色。光学显微镜下观察,Bcl-2 蛋白染色呈棕黄色颗粒,位于核膜或胞浆内;Bax 蛋白染色呈棕黄色颗粒,位于细胞浆内。在每张载玻片上随机选择 10 个区域,免疫阳性细胞率=免疫细胞阳性数/(免疫细胞阳性数+免疫细胞阴性数) $\times$ 100%。

**1.4.4 TUNEL 法检测凋亡细胞** 剪下缺血区心肌于 10% 甲醛中固定 24 h,石蜡包埋切片,按 TUNEL 试剂盒说明书进行标记染色,凋亡的细胞核染成棕黄色,未凋亡的细胞核为蓝色。高倍镜下每张切片随机选取 10 个视野,计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数,以凋亡指数反映各组心肌凋亡的情况,凋亡指数=视野内凋亡细胞个数/视野内所有心肌细胞个数 $\times$ 100%。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件处理分析数据,所有计量数据均以  $\bar{x}\pm s$  表示。多样本均数组间比较用单向方差分析(one-way ANOVA),多样本均数组间两两比较采用最小显著差数法分析,两组间差异检验采用  $t$  检验, $P<0.05$  示差异有统计学意义, $P<0.01$  提示差异有显著统计学意义。

**2 结果**

**2.1 盐酸右美托咪定对大鼠心肌梗死面积的影响** 由 TTC 染色结果可见 sham 组染色后心肌呈深红色;I/R 组和 DEX 组可见明显的灰白色梗死灶,且 DEX 组的梗死面积明显缩小,与 I/R 组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

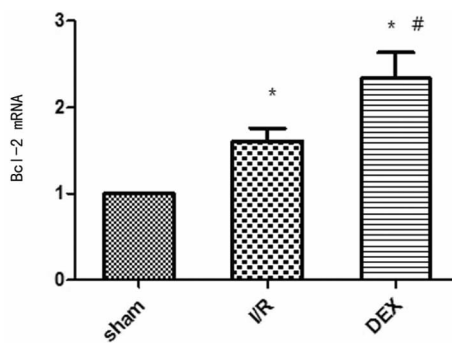
**2.2 Bcl-2、Bax 的 RT-PCR 检测** I/R 组和 DEX 组,与 sham

组相比,Bcl-2 mRNA 表达增高( $P<0.05$ ),Bax mRNA 表达增高( $P<0.05$ );DEX 组与 I/R 组比较,Bcl-2 mRNA 表达增高( $P<0.05$ ),Bax mRNA 表达降低( $P<0.05$ ),见图 1,2。

表 1 大鼠心肌组织梗死范围( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

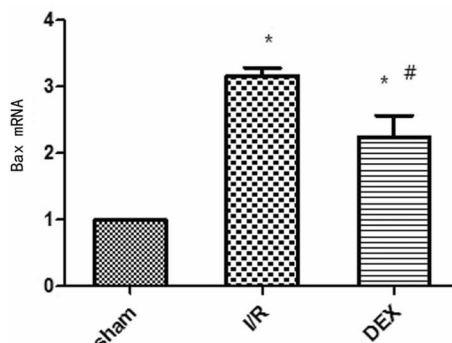
组别	$n$	心肌梗死面积(%)
shame 组	7	0
I/R 组	7	29.86 $\pm$ 0.75
DEX 组	7	23.60 $\pm$ 0.55*

\*: $P<0.05$ ,与 I/R 组比较。



\*: $P<0.05$ ,与 I/R 组比较;#:  $P<0.05$ ,与 sham 组比较。

图 1 大鼠心肌组织 Bcl-2 mRNA 表达



\*: $P<0.05$ ,与 sham 组比较;#:  $P<0.05$ ,与 I/R 组比较。

图 2 大鼠心肌组织 Bax mRNA 表达

**2.3 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响** I/R 组和 DEX 组,与 sham 组相比,Bcl-2 蛋白表达增高( $P<0.05$ ),Bax 的蛋白表达增高( $P<0.05$ );DEX 组与 I/R 组比较,Bcl-2 的蛋白表达增高( $P<0.05$ ),Bax 的蛋白表达降低( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达和凋亡细胞阳性率( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

组别	Bcl-2(%)	Bax(%)	凋亡指数
Sham 组	10.1 $\pm$ 0.40	11.57 $\pm$ 0.53	3.14 $\pm$ 0.40
I/R 组	23.71 $\pm$ 0.51*	49.28 $\pm$ 1.19*	30.86 $\pm$ 0.91*
DEX 组	33.29 $\pm$ 0.75* $\Delta$	35.43 $\pm$ 0.65* $\Delta$	19.71 $\pm$ 0.75* $\Delta$

\*: $P<0.01$ ,与 sham 组比较; $\Delta$ :  $P<0.05$ ,与 I/R 组比较。

**2.4 I/R 组大鼠缺血区心肌可见大量凋亡细胞** TUNEL 法检测细胞凋亡的结果,sham 组大鼠缺血区心肌极少见凋亡细胞;DEX 组比 I/R 组凋亡细胞明显减少( $P<0.01$ ),见图 3。

### 3 讨 论

细胞凋亡是细胞主动的、通过基因严密调控的程序性死亡。Bcl-2 即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 原癌基因,通过其所编码 Bcl-2 蛋白而发挥其抑制细胞凋亡的功能,它是一个多基因家族,Bcl-2 和 Bax 蛋白是此家族的两个主要成员,Bcl-2 有抗凋亡的作用,而 Bax 则促凋亡。若 Bcl-2 表达增多,则形成 Bcl-2/Bcl-2 同源二聚体,也可形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体,均起抑制细胞凋亡的作用。若 Bax 表达增多,形成 Bax/Bax 同源二聚体,则促进细胞凋亡发生。细胞凋亡是心肌缺血-再灌注损伤作用机制之一,其他包括炎症反应、能量代谢障碍、钙离子超载和活性氧的大量产生等<sup>[5-6]</sup>。

盐酸右美托咪定为高选择性  $\alpha_2$ -肾上腺素受体激动剂,具有镇静、镇痛、抗交感和抑制血浆中的儿茶酚胺释放作用,还有止涎、抗寒颤和利尿的作用<sup>[7]</sup>。 $\alpha_2$ -受体是去甲肾上腺素受体的一个亚型,广泛分布在中枢神经系统内外, $\alpha_2$ -受体有  $\alpha_2$ -A、 $\alpha_2$ -B 和  $\alpha_2$ -C 3 个亚型,这些受体调节各个系统的功能,如心血管系统、交感神经系统和血液系统等,中枢神经系统脑内  $\alpha_2$ -AR 最密集的区域在脑的蓝斑,而盐酸右美托咪定已被证实的作用位点是蓝斑<sup>[8]</sup>。Engelhard 等<sup>[9]</sup>研究证明,盐酸右美托咪定对大鼠大脑不全性缺血-再灌注有神经保护作用,可能是通过 Madm-2(murine double minute 2)抑制 P53 的活性,下调 Bax 和上调 Bcl-2 表达,产生抗凋亡作用。Dahmani 等<sup>[10]</sup>研究表明,在大鼠大脑缺血-再灌注损伤中,盐酸右美托咪定通过激活  $\alpha_2$ -肾上腺素受体,减少腺苷酸环化酶激活,增加磷酸化的黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)含量,发挥神经保护作用。本研究结果表明,与 sham 组比较,I/R 组 Bcl-2、Bax 的 mRNA 和蛋白表达量均增加,而 DEX 组与 I/R 组比较,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达量增加,Bax mRNA 和蛋白表达量降低,凋亡细胞减少,而心肌梗死面积缩小与 Okada 等<sup>[11]</sup>的研究一致,表明盐酸右美托咪定预处理可以减少心肌细胞凋亡,减少心肌梗死范围,保护心肌组织。盐酸右美托咪定在缺血-再灌注损伤过程中可促进 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达,抑制 Bax mRNA 及蛋白的表达,可能是通过  $\alpha_2$ -肾上腺素受体-腺苷酸环化酶通道,增加磷酸化的 FAK 含量,再介导 FAK-Ras-MAPK 通路和 FAS-PI3K 通路,上调 Bcl-2 表达的同时下调 Bax 的表达,发挥抗凋亡作用,保护缺血-再灌注的心肌细胞;有研究表明盐酸右美托咪定可降低大鼠血浆中的儿茶酚胺的浓度<sup>[12]</sup>,产生神经保护作用。因此,盐酸右美托咪定也可能通过激动交感神经末梢的突触前  $\alpha_2$ -受体兴奋,降低循环中的去甲肾上腺素的释放并降低血浆中的儿茶酚胺的浓度,减少细胞内  $Ca^{2+}$  内流。

本研究初步认为,盐酸右美托咪定能抑制心肌缺血-再灌注损伤时心肌细胞凋亡的发生,保护心肌细胞,但更多保护机制有待在今后的研究中进一步证实。

### 参考文献:

[1] Dhalla NS,Elmoselhi AB,Hata T,et al. Status of myocar-

dial antioxidants in ischemia-reperfusion injury[J]. Cardiovasc Res,2000,47(3):446-456.

- [2] 刘永国,任澎,心肌缺血-再灌注损伤的机制研究进展[J]. 医学综述,2010,16(21):3267-3269.
- [3] 陆卫华,曾越枚,邵素花,等. 钴原卟啉诱导 HO-1 高表达抗大鼠心肌缺血-再灌注损伤的实验研究[J]. 重庆医学,2009,38(11):1384-1385.
- [4] 赵秀梅,孙胜,刘秀华,等. 垫扎球囊复制大鼠在体心肌缺血-再灌注模型[J]. 中国微循环,2007,11(3):206-208.
- [5] Kevin LG,Novolija E,Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice[J]. Anesth Analg,2005,101(5):1275-1287.
- [6] Loor G,Kkondapalli J,Iwase H,et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion[J]. Biochim Biophys Acta,2011,1813(7):1382-1394.
- [7] 梁飞,肖晓山. 盐酸右美托咪定的临床药理及应用[J]. 现代医院,2010,10(5):90-93.
- [8] Pandharipande P,Ely EW,Maze M,et al. Dexmedetomidine for sedation and perioperative management of critically ill patients[J]. Semin Anesth Perioper Med Pain,2006,25(2):43-50.
- [9] Engelhard K,Werner C,Eberspacher E,et al. The effect of the  $\alpha_2$ -agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats[J]. Anesth Analg,2003,96(2):524-531.
- [10] Dahmani S,Rouelle D,Gressens P,et al. Effects of dexmedetomidine on hippocampal focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation in physiologic and ischemic conditions[J]. Anesthesiology,2005,103(5):969-977.
- [11] Okada H,Kurita T,Mochizukik T,et al. The cardioprotective effect of dexmedetomidine on global ischaemia in isolated rat hearts[J]. Resuscitation,2007,74(3):538-545.
- [12] Kristin E,Christian W,Susanne K,et al. Effect of the  $\alpha_2$ -agonist dexmedetomidine on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats[J]. Anesthesiology,2002,96(2):450-457.

(收稿日期:2011-10-14 修回日期:2011-12-09)