

## 七氟醚预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的机制研究\*

饶淑梅,高丽,马永超<sup>△</sup>

(漯河医学高等专科学校医学生物工程重点实验室,河南漯河 462002)

**[摘要]** 目的 了解非受体酪氨酸激酶 c-Src 在七氟醚预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。方法 将健康雄性 Wistar 大鼠 50 只,随机分为 5 组(n=10),假手术组(I 组)、缺血再灌注组(II 组)、七氟醚预处理组(III 组)、七氟醚预处理加二甲亚砜(DMSO)组(IV 组)和七氟醚预处理加 c-Src 特异性抑制剂 SU6656 组(V 组)。III、IV、V 组于再灌注前 1 min 进行七氟醚后处理;V 组于再灌注前 5 min 静脉注射 SU6656;IV 组给予等容量 DMSO。再灌注 120 min 后,采集动脉血样,检测血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶同工酶(CK-MB)的活性。取小鼠心脏并分离左心室,计算心肌梗死面积;检测 Src、磷酸化 Src(p-Src)、心肌过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的表达水平。结果 与 I 组比较,其余 4 组血清 CK-MB、LDH 的活性、心肌梗死面积、心肌 p-Src/Src、CAT、SOD 升高( $P < 0.05$ );与 III、IV 组比较,II、V 组血清 CK-MB、LDH 的活性、心肌梗死面积、CAT 升高,SOD 活性降低,同时心肌 p-Src/Src 显著下降( $P < 0.05$ )。结论 c-Src-活性氧(ROS)信号通路可能介导了七氟醚预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用。

**[关键词]** 非受体酪氨酸激酶;活性氧;七氟醚;心肌缺血;再灌注损伤

**[中图分类号]** R361

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)10-1325-03

## Study on mechanism of protective effect of sevoflurane pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats\*

Rao Shumei, Gao Li, Ma Yongchao<sup>△</sup>

(Key Laboratory of Medical Bioengineering, Luohe Medical College, Luohe, Henan 462002, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the role of non-receptor tyrosine kinase(c-Src) in sevoflurane pretreatment for relieving myocardial ischemia- reperfusion injury. **Methods** By using the random number table, the healthy male Wistar rats were randomly divided into 5 groups (n=10); sham operation group (I), ischemia- reperfusion group(II), sevoflurane pretreatment group(III), sevoflurane pretreatment plus dimethyl sulfoxide(DMSO, IV) and sevoflurane pretreatment plus c-Src specific inhibitor SU6656 group(V) groups. The group III, IV and V were performed the sevoflurane aftertreatment before reperfusion; the group V was injected by SU6656 at 5 min before reperfusion; the group IV was given the equal volume DMSO. The arterial blood sample in each group was collected at 120 min after reperfusion for detecting serum LDH level and CK-MB activity. Rats were killed for taking the heart and separating the left ventricle to calculate the area of myocardial infarctio; the expression levels of Src, phosphorylated Src (p-Src), CAT and SOD in myocardial tissue were detected in each group. **Results** Compared with the group I, the level of serum CK-MB and LDH activity, myocardial infarct area and p-Src/Src, CAT, SOD in the other 4 groups were increased significantly ( $P < 0.05$ ); comparing with the group III, the serum CK-MB and LDH activity, myocardial infarct area and SOD, CAT, in the group II, IV and V were increased, however the level of p-Src/Src was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The c-Src-reactive oxygen signaling pathway might mediate the role of sevoflurane pretreatment for reducing myocardial ischemia- reperfusion injury in rat.

**[Key words]** non-receptor tyrosine kinase; reactive oxygen; sevoflurane; myocardial ischemia; reperfusion injury

临床上冠状动脉溶栓术和心搏骤停复苏后可发生心肌缺血再灌注损伤。如何减少缺血再灌注损伤一直是临床工作的难点。有研究表明,七氟醚预处理可减轻脑部缺血及心肌缺血再灌注损伤<sup>[1-2]</sup>。而且研究发现部分细胞内信号通路介导了缺血后处理减轻心肌缺血再灌注损伤的作用。非受体酪氨酸激酶 c-Src 通路是细胞内非常重要的信号转导通路,参与多种细胞生物学行为调控,不仅参与细胞分化、增殖,还通过调节细胞内氧化还原状态,调节细胞的凋亡<sup>[-3-5]</sup>。七氟醚预处理的心肌保护机制是否与 c-Src-活性氧(ROS)信号转导通路有关尚有

待研究。本研究以 Wistar 大鼠为模型,构建心肌缺血模型,检测 c-Src-ROS 信号转导通路在七氟醚预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 动物:健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 50 只,体质量 240~270 g,2~3 月龄,由河南省实验动物中心提供。仪器及药品:80 麻醉机购自美国 Datex-Ohmeda 公司,Vamos 气体监测仪购自德国 Drager 公司;七氟醚购自山东济南维都化工公司,SU6656 购自 Calbiochem 公司;乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸

\* 基金项目:漯河医学高等专科学校基金(2013-S-LMC03)。 作者简介:饶淑梅(1987-),讲师,硕士研究生,主要从事老年性疾病研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel:13839527381; E-mail:13839527381@163.com。

磷酸激酶同工酶(CK-MB)试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成试剂有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及模型建立** (1)实验分组:采用随机数字表法,将 50 只大鼠随机分为 5 组( $n=10$ ):假手术组(I组)、缺血再灌注组(II组)、七氟醚预处理组(III组)、七氟醚预处理加二甲亚砜(DMSO)组(IV组)和七氟醚预处理加 c-Src 特异性抑制剂 SU6656 组(V组)。(2)模型建立:腹腔注射 3%戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉下,用 16G BD 套管针经口气管插管后,接 DHX150B 小型动物呼吸机行机械通气,动物呼吸机进气口与 80 麻醉机相连,潮气量 6~8 mL,通气频率 75 次/min,吸呼比 1:2,气管导管呼气端连接 Vamos 气体监测仪,监测呼气末七氟醚浓度及二氧化碳分压(PCO<sub>2</sub>)水平,维持 PCO<sub>2</sub> 35~45 mm Hg。左侧颈总动脉穿刺置管,连接 BL-420F 生物机能实验系统,监测有创动脉压及标准 II 导联心电图。模型制备过程中维持直肠温度 36.5~37.5 °C。II~V 组参照文献[1]介绍的方法制备心肌缺血再灌注损伤模型。于左侧胸壁第 3、4 肋间距离胸骨左缘约 0.5 cm 逐层钝性分离开胸,7~0 丝线穿过左冠状动脉前降支,稳定 10 min 后结扎,以结扎线远端心前壁变青紫色或苍白色、ST 段抬高、T 波高耸为缺血成功标志。缺血 30 min 时松开结扎线,心肌缺血区恢复红润、ST 段回落和(或)T 波恢复为再灌注成功的标志。I 组仅在左冠状动脉前降支下进行穿线。III、IV、V 组进行七氟醚预处理:再灌注前 3 min 吸入七氟醚,使再灌注前 1 min 呼气末七氟醚浓度为 2.5%~3.0%后,持续吸入 5 min;V 组于再灌注前 5 min 经股静脉注射 SU6656 (Calbiochem 公司)0.5 mg/kg,IV 组给予等容量 0.02% DMSO。

**1.2.2 心肌损伤指标的检测** 再灌注 120 min 时,每组 10 只大鼠,均经左颈动脉取血样 2 mL,离心,取上清液,采用比色法检测血清 LDH 和 CK-MB 的活性。每组取 5 只大鼠,再次结扎左冠状动脉前降支,经左颈总动脉逆行注射 1%伊文氏蓝 3.4 mL,未蓝染的区域为缺血区心肌。取出心脏,冰冻 10 min,垂直于心脏长轴切片(片厚 2 mm),置入 1%四氮唑蓝溶液中,于 37 °C 孵育 15 min,缺血心肌呈砖红色,梗死心肌呈灰白色。10%甲醛溶液固定,24 h 后进行封片、扫描,数码照相,采用 Image 6.0 软件进行分析。根据参考文献[1]计算心肌梗死面积比例,其公式为:

$$\text{梗死面积} = (\text{梗死区面积} \div \text{缺血危险区面积}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{梗死体积} = \text{梗死面积} \times 2 \quad (2)$$

**1.2.3 Western blot 检测大鼠心肌磷酸化 Src(p-Src)、c-Src 蛋白表达水平** 再灌注 120 min 时,每组取 5 只大鼠,迅速取出心脏,用预冷生理盐水冲洗,取左心室前壁组织,一边加液氮一边进行组织研磨。加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂,4 °C,13 200 r/min,离心 15 min。BCA 法测蛋白水平后,均衡各组蛋白水平,蛋白样品经变性处理后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。经半干式转移到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入抗鼠 p-Src 抗体,4 °C 孵育过夜,按 1:7 500 比例稀释二抗,室温下孵育 1 h。PBST 洗 3 次,等体积混匀化学发光液 A、B 液,曝光、显影、定影,图像经

Image J 软件进行灰度扫描分析。PVDF 膜经抗体洗脱后,加 5%牛奶封闭液重新室温封闭 1 h。加入兔抗鼠  $\beta$ -actin 及 c-Src 抗体。以目的蛋白条带光密度值与  $\beta$ -actin 光密度值的比值反映目的蛋白表达,计算 p-Src 与 c-Src 表达的比值(p-Src/c-Src)反应 c-Src 活性。

**1.2.4 心肌 CAT、SOD 水平的检测** 新鲜心肌组织经液氮下研磨匀浆后,加入蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂,4 °C,13 200 r/min,离心 15 min。取上清液 BCA 法测蛋白浓度后,均衡各组蛋白浓度,按 CAT、SOD 试剂盒说明书进行 CAT、SOD 水平的检测。

**1.3 统计学处理** 所有数据应用 SPSS12.0 软件进行统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 Dunnett-*t* 检验,以及成组 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 各组大鼠血清 CK-MB、LDH 水平及心肌梗死面积比较

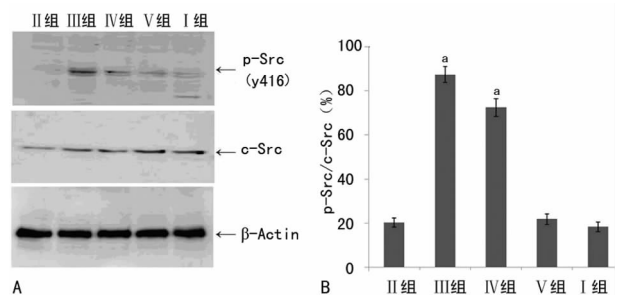
I 组未发生心肌梗死。与 I 组比较,其余 4 组均出现不同程度的心肌梗死及血清 CK-MB、LDH 阳性。与 II、V 组比较,III、IV 组心肌梗死面积及血清 CK-MB、LDH 水平显著降低( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠血清 CK、LDH 水平及心肌梗死面积比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	LDH (u/L, $n=10$ )	CK-MB (u/L, $n=10$ )	心肌梗死面积 (%, $n=5$ )
I 组	313.0 ± 22.0	258.0 ± 27.0	0
II 组	744.0 ± 45.0 <sup>a</sup>	877.0 ± 35.0 <sup>a</sup>	42.6 ± 3.8 <sup>a</sup>
III 组	528.0 ± 37.0 <sup>ab</sup>	602.0 ± 57.0 <sup>ab</sup>	19.8 ± 2.3 <sup>ab</sup>
IV 组	531.0 ± 38.0 <sup>a</sup>	619.0 ± 44.0 <sup>a</sup>	21.1 ± 3.7 <sup>ab</sup>
V 组	769.0 ± 40.0 <sup>a</sup>	849.0 ± 46.0 <sup>a</sup>	43.5 ± 3.9 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 I 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 II、V 组比较。

**2.2 各组大鼠心肌组织 p-Src、c-Src 蛋白表达水平比较** III、IV 组心肌细胞 p-Src 表达水平显著高于其他 3 组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1。



A: Western blot 检测; B: 统计分析图; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 I、II、V 组比较。

图 1 各组大鼠心肌组织 p-Src、c-Src 蛋白表达比较( $n=5$ )

**2.3 各组大鼠心肌组织 SOD、CAT 活性比较** 与 III、IV 组比较,II、V 组 SOD 活性降低、CAT 活性增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠心肌组织 SOD、CAT 活性比较 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	SOD(U/mgpro)	CAT(U/mgpro)
I 组	46.22 ± 1.82 <sup>a</sup>	18.12 ± 0.62 <sup>a</sup>
II 组	31.08 ± 0.31	24.11 ± 0.32
III 组	42.22 ± 0.49 <sup>a</sup>	18.94 ± 1.10 <sup>a</sup>
IV 组	41.08 ± 0.92 <sup>a</sup>	19.11 ± 0.72 <sup>a</sup>
V 组	33.12 ± 0.84	20.14 ± 0.92

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 II、V 组比较。

### 3 讨 论

缺血、缺氧性损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是指缺血后的再灌注不仅不能使脏器功能恢复, 反而加重脏器的功能障碍和结构损伤<sup>[6]</sup>。临床上脑外伤、缺血性脑卒中、颈动脉内膜剥脱术、心脏手术等麻醉管理期间存在缺氧缺血性脑损伤的可能。缺血缺氧性损伤直接影响到疾病的预后、手术成功率和患者存活率。因此, 研究缺血缺氧性脑损伤作用的机制及如何减轻缺血缺氧性脑损伤, 具有重要的临床意义。

药物预处理的脏器保护作用成为近年来研究的热点。已有研究发现利用七氟醚和氟烷、安氟醚、异氟醚等吸入麻醉药进行预处理, 有心肌保护效应, 但具体机制目前不甚清楚<sup>[7-8]</sup>。线粒体介导的细胞凋亡调控可能参与到七氟醚预处理对心肌细胞的保护作用<sup>[9-11]</sup>。由于大鼠循环系统与人体极为相似, 心肌侧支循环较少, 再灌注损伤发生的概率比较高。因此, 本研究采用大鼠为研究对象, 结果表明, 与 I 组比较, II 组血清 CK-MB、LDH 的活性和心肌梗死体积升高, 提示大鼠心肌缺血再灌注损伤模型制备成功。进一步的研究结果表明, 当大鼠预先通入七氟醚处理 10 min 可减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤。七氟醚预处理可减少心肌梗死面积, 降低血清心肌酶水平, 减轻心肌缺血再灌注损伤。然而当大鼠在预处理七氟醚同时注射 c-Src 活性抑制剂 SU6656, 大鼠心肌损伤与 II 组同样严重, 提示 c-Src 信号通路可能参与了七氟醚预处理的保护作用。对心肌组织 p-Src 表达水平检测表明, III、IV 组心肌 p-Src 水平显著高于 I、II、V 组, 说明七氟醚预处理可增强心肌 c-Src 的活性。

c-Src 广泛地分布于各种组织中, 在细胞生长、增殖、凋亡、血管生成、神经细胞分化等多种细胞功能调节的信号通路中具有重要作用<sup>[12-13]</sup>。对心肌组织 CAT 及 SOD 水平检测进一步表明, II 组心肌 CAT 水平增高而相应的 SOD 水平降低, CAT、SOD 活性与细胞内 ROS 的水平密切相关, 表明缺血再灌注引起心肌细胞内 ROS 水平增加, 后者损伤线粒体内膜, 使线粒体内膜通透性增加, 细胞色素 C 从线粒体内释放出来, 启动细胞凋亡信号, 诱导细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。当大鼠预先处理七氟醚后, 能显著逆转心肌细胞内 CAT、SOD 的活性, 但同时使用 SU6656, 则七氟醚的这种作用减弱或消失, 这提示七氟醚预处理可能通过调节 c-Src 活性, 进一步调节细胞内 CAT、SOD 的活性, 对心肌细胞起保护作用。

### 参考文献

[1] 陈龙, 左明章, 刘功俭, 等. JNK 信号通路在大鼠脑室损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(1): 93-96.

[2] 王宁, 薛荣亮, 姚凤珍, 等. Sp60025-JNK 抑制剂对大鼠脑缺血再灌注神经元的保护作用[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(20): 1838-1841.

[3] Molloy SS, Thomas G. The enzymes[J]. Academic Press, 2001, 26(2): 199-235.

[4] Hilbig A. Src kinase and pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 2008, 17(7): 179-185.

[5] Ischenko I, Guba M, Yezhelyev M, et al. Effect of Src kinase inhibition on metastasis and tumor angiogenesis in human pancreatic cancer[J]. Angiogenesis, 2007, 35(10): 167-182.

[6] 刘悦, 彭云水, 刘雅, 等. P13K-Akt-eNOS 信号转导通路在七氟醚后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(3): 371-375.

[7] 方喜业. 医学实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 90.

[8] Bouwman RA, Salic K, Padding FG. Cardio protection via activation of protein kinase C2 delta depends on modulation of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger[J]. Circulation, 2006, 14(2): 1226-1232.

[9] Li H, Yin J, Li L, et al. Isoflurane postconditioning reduces ischemia-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation and interleukin-1 $\beta$  production to provide neuroprotection in rats and mice[J]. Neurobiol Dis, 2013, 54(4): 216-224.

[10] Chang DJ, Chang CH, Kim JS, et al. Isoflurane-induced post-conditioning in senescent hearts is attenuated by failure to activate reperfusion injury salvage kinase pathway[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2012, 56(7): 896-903.

[11] Hu ZY, Abbott GW, Fang YD, et al. Emulsified isoflurane postconditioning produces cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Physiol Sci, 2013, 63(4): 251-261.

[12] Hu ZY, Peng XY, Liu F, et al. Emulsified isoflurane protects rat heart in situ after regional ischemia and reperfusion[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2014, 28(2): 190-198.

[13] Schlessinger J. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis[J]. Cell, 2000, 100(3): 293-296.

[14] Liu SH, Lin CH, Liang FP, et al. Andrographolide down-regulates the v-Src and Bcr-Abl oncoproteins and induces Hsp90 cleavage in the ROS-dependent suppression of cancer malignancy[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(2): 229-242.

[15] Ishihara Y, Shiba D, Shimamoto N. Primary hepatocyte apoptosis is unlikely to relate to caspase-3 activity under sustained endogenous oxidative stress[J]. Free Radic Res, 2005, 9(2): 163-173.