

吗啡受体在腺苷预处理心肌保护效果中的作用

周必强¹, 郭酉新², 李刚³

(1. 广东深圳市保健办专家门诊部, 深圳 518020; 2. 武汉同济医院心胸外科; 3. 广东深圳市孙逸仙心血管医院外科)

[摘要] **目的** 研究吗啡受体在心肌腺苷预处理心肌保护中的作用。**方法** 以离体大白鼠工作心脏模型, 比较经腺苷预处理和纳洛酮 + 腺苷预处理, 在心肌缺血再灌注前后, 左室压 (LVP)、左室舒张末期压 (LVDEP)、左心室内压上升及下降最大速率 ($\pm dp/dt_{max}$)、主动脉压 (AP)、冠脉流量 (CF)、主动脉流量 (AF) 和测定冠脉流出液乳酸脱氢酶 (LDH)、心肌三磷酸腺苷 (ATP) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、脂质过氧化物 (LPO) 含量及自灌注停搏液至完全停搏的时间 (AT)。**结果** 复跳 30 min 后, 除 LVDEP 外, Control 组和 Nal + APT 组各项心功能指标均低于 ATP 组, 均差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。复灌工作心 30 min 后, 各组 LPO、LDH 均有提高, 但 APT 组明显低于 Nal + APT 组和 Control 组; 各组 ATP、SOD 均有所下降。**结论** 腺苷预处理的心肌保护作用需要阿片样受体介导, 腺苷受体的心肌保护作用与阿片样受体可能存在交互作用。

[关键词] 缺血预处理, 心肌; 腺苷; 受体, 阿片样, μ ; 纳洛酮; 心肌再灌注; 大鼠, Wistar

中图分类号: R459.9 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/J.issn.1672-6790.2017.03.022

The role of opioid receptor in myocardial preservation with adenosine pretreatment Zhou Biqiang*, Guo Youxin, Li Gang (* The Out-Patient Department of Specialist of Shenzhen Health Care Committee, Shenzhen 518020 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of opioid receptor on myocardial preservation with adenosine pretreatment in isolated rat hearts which suffer from ischemia/reperfusion injury. **Method** The model of Langendorff perfused isolated rat heart was used to study the effects of APT and Nal + APT on left ventricular pressure (LVP)、left ventricular end-diastolic pressure (LVDEP)、the maximal rate of rise and fall in left ventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$)、aortic pressure (AP)、coronary flow (CF)、aortic flow (AF)、activities of lactate dehydrogenase (LDH)、superoxide dismutase (SOD) a lipid peroxidation (LPO)、concentrations of ATP level pre-and post-ischemia/reperfusion. **Result** Nal + APT Compared with ischemia/reperfusion group and APT, Naloxone restrained the the recovery of cardiac hemodynamics and promoted the recovery of contractile function, decreased ATP level and SOD activity, and increased leakage of intracellular lactic dehydrogenase. **Conclusion** Adenosine pretreatment cardioprotection requires the activation of opioid receptors and relies on these receptors functionally interacting with adenosine receptors.

[Key words] Ischemic preconditioning, myocardial; Adenosine; Receptors, opioid, μ ; Naloxone; Myocardial reperfusion; Rats, wistar

腺苷预处理 (APT) 具有心肌保护作用^[1-3]。在心肌腺苷预处理心肌保护机制中, 腺苷受体与阿片受体是否相互作用, 阻断阿片受体是否能抑制腺苷的预处理的心肌保护作用, 目前国内未见明确报告。

本实验通过观察离体大鼠心脏缺血/再灌注期间心功能及心肌三磷酸腺苷 (ATP)、酶学、心律失常等的变化, 评价用动脉灌注给以外源的 APT 的效果, 尝试用纳洛酮干预腺苷预处理 (Nal + APT) 的心肌保护作用, 了解在细胞水平研究腺苷、阿片肽对心

肌保护的调节作用, 研究两者是否存在交互作用并探讨其机制, 是本次研究目的。

1 材料和方法

1.1 实验动物 健康 Wistar 大白鼠 24 只, 8 周龄, 雌雄各半, 体质量 350 ~ 400 g, 由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供 (动物的合格证批号: 20160703)。

1.2 实验模型及程序 大白鼠腹腔注射 1.0 g/kg 乌拉坦和股静脉注射 500 U 肝素。开胸, 剪开肺动脉及主动脉前壁, 迅速于主动脉根部插入灌注管, 即行 Langendorff 灌流, 灌注压为 7.5 kPa。结扎肺静

脉,剪开左心耳将内径 2 mm 左房灌注管插入左房,内径 1 mm 测压管插入左心室。灌注 15 min 后转为工作心模型 10 min,左房灌注压为 1.5 kPa,左心后负荷为 7.5 kPa。HEPES-KH 缓冲液成分:NaCl 118.5 mmol/L, KCl 4.70 mmol/L, CaCl₂ 1.80 mmol/L, MgSO₄ 1.20 mmol/L, HEPES 20 mmol/L, KH₂PO₄ 1.20 mmol/L, Glucose 11.10 mmol/L, pH 为 7.4,使用时新鲜配制,经 0.45 μm 滤器过滤,灌流液以 95% O₂ 及 5% CO₂ 持续平衡并维持在 37 ℃。

1.3 分组及预处理程序 将动物编号按单纯随机法分为 3 组,每组均 8 只。

(1) 缺血/灌注对照组 (Control 组): Langendorff 逆行灌注 15 min,阻断左房及主动脉管,经主动脉根部,以 3.5 kPa 压力注入 4 ℃ St. Thomas' II 停搏液 (pH 7.6) 停搏心脏,首剂 20 mL/kg,同时心脏表面以冷 0.9% 氯化钠注射液降温并维持心肌温度为 15 ℃ 直至复跳。停搏期间,每隔 30 min 复灌 4 ℃ 停搏液,剂量为 15 mL/kg。停搏 2 h 后开放主动脉灌注管,恢复 Langendorff 逆行灌注 15 min 后,转入左心工作状态,观察 30 min;

(2) 腺苷预处理组 (APT 组): Langendorff 逆行灌注 15 min,后 10 min 经主动脉根部以 7.5 kPa 压力匀速加灌 0.1 mmol/L 腺苷 (Sigma 公司产品),剂量为 1.4 mg/kg。随后处理同 Control 组。

(3) 纳洛酮 + 腺苷预处理组 (Nal + APT 组):

Langendorff 逆行灌注 15 min,前 5 min 经主动脉根部以 7.5 kPa 压力匀速加灌 0.1 mmol/L 纳洛酮,剂量为 3 mg/kg,随后处理同 APT 组。

1.4 各项指标观察 由生理多导连续观察血流动力学指标左室收缩压 (LVSP)、左室舒张末期压 (LVDEP)、左室压力上升及下降最大速率 ($\pm dp/dt_{max}$)、主脉压 (AP)、心电图 (EKG)、并同时观察冠脉流量 (CF)、主动脉流量 (AF)、心输出量 (Co),以持续停灌前工作心基础水平为 100%,比较复灌末心功能恢复的百分率。记录自灌注停搏液至完全停搏的时间 (AT),测定工作心 30 min 冠脉流出液乳酸脱氢酶 (LDH)、心肌组织分别测定三磷酸腺苷 (ATP) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、脂质过氧化物 (LPO) 含量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0. 软件进行资料分析。观测资料均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均通过正态性检验。整体分析采用单因素方差分析,多重比较为 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学指标比较 停搏前,各组 AP、LVSP、LVDEP、 $\pm dp/dt_{max}$ 及 AF、CF、Co 等差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

复跳 30 min 后,除 LVDEP 外,Control 组和 Nal + APT 组各项心功能指标均低于 ATP 组,均差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 三组大鼠停搏前各项指标 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	AP (kPa)	LVDEP (kPa)	LVSP (kPa)	+ dp/dt _{max}	- dp/dt _{max}	CF (mL/min)	Co (mL/min)	SV (mL)
Control 组	8	10.8 ± 1.2	0.36 ± 0.08	12.4 ± 1.3	344.7 ± 47.1	262.4 ± 43.6	11.5 ± 3.5	25.5 ± 4.6	0.11 ± 0.02
APT 组	8	10.9 ± 1.2	0.36 ± 0.07	12.6 ± 1.3	349.0 ± 48.1	259.8 ± 44.9	11.2 ± 3.8	25.7 ± 4.5	0.10 ± 0.02
Nal + APT 组	8	10.5 ± 1.1	0.37 ± 0.09	12.3 ± 1.4	347.1 ± 46.9	265.0 ± 47.0	11.3 ± 3.7	24.8 ± 4.6	0.10 ± 0.02
F 值		0.258	0.046	0.112	0.017	0.027	0.010	0.075	0.900
P 值		0.775	0.956	0.895	0.983	0.973	0.990	0.928	0.422

表 2 复跳 30 min 后各组心功能恢复百分比比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	AP (kPa)	LVDEP (kPa)	LVSP (kPa)	+ dp/dt _{max}	- dp/dt _{max}	CF (mL/min)	Co (mL/min)	SV (mL)
Control 组	8	88.1 ± 2.5	0.37 ± 0.07	85.8 ± 3.2	78.2 ± 5.4	75.2 ± 7.5	73.2 ± 7.6	74.1 ± 8.7	72.0 ± 5.9
APT 组	8	99.2 ± 3.4 ^a	0.12 ± 0.08 ^a	99.3 ± 2.5 ^a	98.8 ± 4.8 ^a	95.1 ± 7.8 ^a	94.6 ± 7.5 ^a	95.2 ± 8.6 ^a	88.5 ± 6.9 ^a
Nal + APT 组	8	87.3 ± 2.8 ^b	0.34 ± 0.13 ^b	85.2 ± 3.4 ^b	77.1 ± 5.3 ^b	75.8 ± 7.8 ^b	72.6 ± 8.1 ^b	74.6 ± 8.4 ^b	71.8 ± 6.8 ^b
F 值		40.952	14.449	54.968	44.827	17.287	20.939	15.829	17.195
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:多重比较为 LSD-t 检验,与 Control 组比较,^a $P < 0.05$;与 APT 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 冠脉流出液 LDH 和心肌 ATP、SOD、LPO 含量变化 停搏前各组 LDH 和心肌 ATP、SOD、LPO 含量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

复灌工作心 30 min 后,各组 LPO、LDH 均有提高,但 APT 组明显低于于 Nal + APT 组和 Control 组;各组 ATP、SOD 均有所下降。见表 4。

表 3 停搏前冠脉流出液 LDH 及心肌 ATP、SOD、LPO 对比($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	ATP ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	SOD (IU/mg)	LPO (nmol/mg)	LDH (IU/L)
Control 组	8	2.8 ± 0.2	10.5 ± 1.3	7.6 ± 1.3	7.4 ± 1.2
APT 组	8	2.8 ± 0.3	10.1 ± 1.1	7.4 ± 1.3	7.6 ± 1.4
Nal + APT 组	8	2.9 ± 0.3	10.2 ± 1.2	7.3 ± 1.3	7.4 ± 1.3
<i>F</i> 值		0.260	0.223	0.138	0.052
<i>P</i> 值		0.774	0.802	0.871	0.950

表 4 复跳 30 min 后冠脉流出液 LDH 及心肌 ATP、SOD、LPO 对比($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	ATP ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	SOD (IU/mg)	LPO (nmol/mg)	LDH (IU/L)
Control 组	8	1.64 ± 0.19	5.8 ± 0.7	14.5 ± 1.5	19.0 ± 2.6
APT 组	8	2.66 ± 0.24^a	9.7 ± 1.1^a	8.2 ± 1.3^a	9.2 ± 1.8^a
Nal + APT 组	8	1.65 ± 0.21^b	5.7 ± 1.2^b	13.9 ± 1.7^b	18.5 ± 1.3^b
<i>F</i> 值		59.860	39.444	42.778	63.211
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注:多重比较为 LSD-t 检验,与 Control 组比较,^a $P<0.05$;与 APT 组比较,^b $P<0.05$

3 讨论

APT 模拟短暂心肌缺血预处理(IPC)后腺苷大量释放,对随后心肌缺血再灌注损伤起到保护作用^[4]。腺苷预处理减少心肌正性肌力活动、心肌氧耗和 ATP 降解,增加糖的运输和能量贮备^[5];抑制自由基产生,减轻心肌损伤^[6];减少了心肌细胞的糖酵解,减轻了细胞内酸中毒的程度^[7]。本研究中,APT 组 SV、CO、LVDEP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 等心功能指标均优于对照组,结果与同类研究相近^[8]。

腺苷 A 受体通过 G 蛋白与其他蛋白偶联而产生作用,包括 KATP 开放,缩短了心肌动作电位时程,钙通道关闭, Ca^{2+} 内流降低,延缓和减轻了缺血期间心肌细胞的钙离子超载,减轻了心肌缺血性挛缩;同时,通过腺苷 A2 受体介导,可以阻止缺血再灌注诱发大鼠心肌细胞产生肿瘤坏死因子 α ,减少心肌细胞损伤^[5,6],减轻心功能损伤。同样,大鼠心肌存在阿片 κ 和 δ 受体,吗啡经激活 κ 阿片受体可对急性心肌缺血再灌注损伤发

挥心肌保护作用^[9],由阿片受体激动剂介导的心肌保护可以被纳洛酮阻止。阿片受体是通过钾通道、PKC 等途径,减少钙超载起到心脏保护作用,作用机制上与腺苷受体有共同的路径与机制^[10-11]。

纳洛酮预处理后,Nal + APT 组 SV、CO、LVDEP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 等心功能指标和酶学指标均劣于 APT 组,表明腺苷预处理的心肌保护作用需要阿片样受体介导,腺苷受体的心肌保护作用与阿片样受体可能存在交互作用。

参考文献

[1] LEE HT, LAFARO RJ, REED GE. Pretreatment of human myocardium with adenosine during open heart surgery [J]. J Card Surg,1995,10(6):665-676.

[2] HEADRICK JP, PEART JN, REICHELT ME, et al. Adenosine and its receptors in the heart:regulation,retaliation and adaptation[J]. BiochimBiophys Acta,2011,1808(5):1413-1428.

[3] COHEN MV, DOWNEY JM. Adenosine:trigger and mediator of cardioprotection[J]. Basic Res Cardiol,2008,103(3):203-215.

[4] 尹晓清,伍硕允,吴炎豪,等. 腺苷预处理对心脏直视手术心肌保护作用的临床研究[J]. 中华实验外科杂志,2000,17(3):227-228.

[5] AUCHANPACH JA ,GROSS GJ. Adenosine A1 receptor, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs [J]. Am J physiol,1993,264 (4 Pt 2):H1327- H 1336.

[6] WAGNER DR,COMBES A,MCTIERNAN C,et al. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor[J]. Cire Res,1998,82(1):47-56.

[7] WAGNER DR,MCTIERNAN C,SANDERS VJ,et al. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor-alpha in the failing human heart [J]. Circulation,1998,97(6):521-524.

[8] VINTEN-JOHANSEN J, ZHAO ZQ, CORVERA JS, et al. Adenosine in myocardial protection in on-pump and off-pump cardiac surgery[J]. Ann Thorac Surg,2003,75(2):S691-S699.

[9] BENEDICT PE, BENEDICT MB, SU TP, et al. Opiate drugs and delta-receptor-mediated myocardial protection. Circulation[J]. 1999,100(19 Suppl):111357-111360.

[10] SCHWARTZ CF,GEORGES AJM, GALLAGHER MA, et al. Delta opioid receptors and low temperature myocardial protection[J]. Ann Thorac Surg,1999,68(6):2089-2892.

[11] SCHUNZ JJ,HSU AK,GROSS GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-senstive mechanism in the rat heart [J]. Circ Res,1996,78(6):1100-1104.