doi:10.11659/jjssx.02E022061

·基础研究·

右美托咪定联合七氟醚对糖尿病小鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用

金 辉[1],肖志博[1],葛树胜[1],吴小精[1],尹顺花[2],李 媛[1] (1.海南医学院第一附属医院麻醉科,海南 海口 570100;2.海南省妇女儿童医学中心麻醉科,海南 海口 570100)

[摘 要] **目的** 探讨右美托咪定(Dex)联合七氟醚-后处理(Sev-postC)对糖尿病小鼠心肌缺血/再灌注损伤(MI/RI)的保护作用及其分子机制。**方法** 体外实验:分别在低糖(LG)和高糖(HG)条件下培养 H9c2 心肌细胞,并诱导缺氧/复氧(H/R)损伤模型,给予细胞七氟醚(Sev)或七氟醚联合右美托咪定(Sev+Dex)处理。CCK-8 检测心肌细胞存活能力;ELISA 检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的水平;Western blot 检测细胞中缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)和巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)的表达。在体动物实验:分别使用健康小鼠和2型糖尿病小鼠构建 MI/RI 模型,并给予小鼠 Sev-postC 或 Sev-postC+Dex 治疗。Western blot 检测小鼠心脏组织中 HIF-1α 和 MIF 的表达;HE 染色检测小鼠心肌组织损伤情况;ELISA 检测小鼠血清 LDH 和 CK-MB 的水平,以及心肌组织 SOD 和 MDA 的水平。**结果** 细胞实验结果显示,与 LG-Control 组相比,LG-H/R 组细胞存活能力显著降低($P<0.01$);与 LG-H/R 组相比,LG-Sev 组细胞存活能力显著升高($P<0.01$);与 HG-Control 组相比,HG-H/R 组细胞存活能力显著降低($P<0.01$);与 HG-H/R 组相比,HG-Sev 组细胞存活能力无显著变化($P>0.05$),HG-Sev+Dex 组细胞存活能力则显著升高($P<0.01$)。与 HG-H/R 组相比,HG-Sev 组 LDH、CK-MB、SOD 和 MDA 水平无显著变化($P>0.05$),HG-Sev+Dex 组上述4项指标均具有显著变化($P<0.01$)。与 HG-H/R 组相比,HG-Sev 组 HIF-1α 和 MIF 的表达无显著变化($P>0.05$),HG-Sev+Dex 组 HIF-1α 的表达显著降低($P<0.01$),MIF 的表达显著升高($P<0.01$)。小鼠模型研究结果显示,在糖尿病小鼠中,与 DM-MI/RI 组相比,DM-Sev-postC 组小鼠 HIF-1α 和 MIF 的表达无显著变化($P>0.05$),而 DM-Sev-postC+Dex 组小鼠 HIF-1α 表达显著降低($P<0.01$),MIF 的表达显著升高($P<0.01$)。HE 染色结果显示,与 DM-MI/RI 组相比,DM-Sev-postC 组小鼠心肌损伤无明显缓解,而 DM-Sev-postC+Dex 组小鼠心肌损伤缓解十分显著。与 DM-MI/RI 组相比,仅 DM-Sev-postC+Dex 组小鼠 LDH、CK-MB、MDA 和 SOD 的水平有显著变化($P<0.01$)。**结论** Dex 联合应用 Sev-postC 能够明显缓解糖尿病小鼠 MI/RI。

[关键词] 右美托咪定;七氟醚-后处理;糖尿病;心肌缺血/再灌注损伤
[中图分类号] R614 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-02-18

Protective effect of dexmedetomidine combined with sevoflurane on myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice

JIN Hui[1], XIAO Zhi-bo[1], GE Shu-sheng[1], WU Xiao-jing[1], YIN Shun-hua[2], LI Yuan[1] (1. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570100, China; 2. Department of Anesthesiology, Hainan Women and Children Medical Center, Haikou Hainan 570100, China)

Abstract: Objective To explore the protective effect and the molecular mechanism of dexmedetomidine (Dex) combined with sevoflurane-post conditioning (Sev-postC) on myocardial ischemia/reperfusion injury (MI/RI) in diabetic mice. **Methods** In vitro experiments: H9c2 cardiomyocytes were cultured under low glucose (LG) and high glucose (HG) conditions respectively, hypoxia/reoxygenation (H/R) injury models were induced, and cells were treated with sevoflurane (Sev) or sevoflurane combined with dexmedetomidine (Sev+Dex). CCK-8 was used to detect the viability of cardiomyocytes. ELISA was used to detect the levels of lactate dehydrogenase (LDH), creative kinase isoenzyme MB (CK-MB), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) of cells. Western blot was used to detect the expressions of hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF-1α) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) of cells. In vivo animal experiments: MI/RI models were constructed by using healthy mice and type 2 diabetic mice, respectively, and the mice were given Sev-postC or Sev-postC+Dex treatment. Western blot was used to detect the expression of HIF-1α and MIF in mouse heart tissue. HE staining was used to detect myocardial tissue damage in mice. ELISA was used to detect the serum LDH and CK-MB levels, as well as the SOD and MDA levels of myocardial tissues. **Results** The results of cell experiment showed that compared with the LG-Control group, the cell viability in the LG-H/R group was significantly reduced ($P<0.01$); compared with the LG-H/R group, the cell viability of the LG-Sev group was significantly increased ($P<0.01$); compared with the HG-Control group, the cell viability in the HG-H/R group was significantly reduced ($P>0.05$); compared with the HG-H/R group, the cell viability in the HG-Sev group was not significantly changed ($P>0.05$), while the cell viability in the HG-Sev+Dex group was significantly increased ($P<0.01$). Compared with the HG-H/R group, the levels of LDH,

[基金项目] 海南省自然科学基金青年基金项目(820QN397)
[通信作者] 金 辉,E-mail:jinhui9099@sina.com

CK-MB,SOD and MDA in the HG-Sev group were not significantly changed ($P>0.05$); while the 4 above indicators in the HG-Sev + Dex group had significant changes ($P<0.01$). Compared with the HG-H/R group, the expression of HIF-1α and MIF in the HG-Sev group were not significantly changed ($P>0.05$), while the expression of HIF-1α in the HG-Sev + Dex group was significantly reduced ($P<0.01$), and the expression of MIF was significantly increased ($P<0.01$). The results of the mice model study showed that in diabetic mice, compared with the DM-MI/RI group, the expression of HIF-1α and MIF in the DM-Sev-postC group were not significantly changed ($P>0.05$), while the expression of HIF-1α in the DM-Sev-postC + Dex group was significantly reduced ($P<0.01$), and the expression of MIF was significantly increased ($P<0.01$). HE staining results showed that compared with the DM-MI/RI group, the myocardial injury in the DM-Sev-postC group was not significantly relieved, while the myocardial injury in the DM-Sev-postC + Dex group was significantly relieved. Compared with the DM-MI/RI group, only the levels of LDH, CK-MB, MDA and SOD in the DM-Sev-postC + Dex group had significant changes ($P<0.01$). **Conclusion** Dex combined with Sev-postC can significantly alleviate the MI/RI in diabetic mice.

Keywords: dexmedetomidine; sevoflurane-post conditioning; diabetes; myocardial ischemia/reperfusion injury

近年来,糖尿病的发病率逐年上升,并呈年轻化趋势,已成为严重威胁人类健康的全球性公共卫生问题。2019 年全球 65 岁及以上的人群中约有 193 万人患有糖尿病,预计 2045 年将达到 2 762 万[1]。心血管疾病,特别是急性冠状动脉综合征是糖尿病患者的重要合并症,其危害远大于糖尿病本身。心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MI/RI)是临床常见的病理生理过程,心肌发生缺血后,应及时行血液再灌注恢复血液供应以防止心肌死亡,但该过程也会对心肌造成二次损伤,这种现象被称为 MI/RI[2]。研究发现,糖尿病患者心肌缺血的发生率比非糖尿病患者高 1.45 ~ 2.99 倍,这对糖尿病患者来说是一个严重的健康威胁[3]。而且长期患有糖尿病可引发血管内皮功能障碍,这将加剧缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)引起的心肌损伤[4-5]。

七氟醚(sevoflurane, Sev)是一种广泛用于临床和基础研究的吸入麻醉剂。研究证实,七氟醚 - 后处理(sevoflurane-post conditioning, Sev-postC)可以有效减轻健康心肌的 I/R 损伤[6-7];而高血糖可抵消Sev-postC 的心肌保护作用,但其具体机制尚不清楚。有研究显示,巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)在 MI/RI 过程中发挥着重要作用,而高血糖能够抑制 MIF 的表达[8-9]。右美托咪定(dexmedetomidine, Dex)是一种高度选择性的 α2 受体激动剂,通常在临床中用作镇静剂。研究证实,Dex 能够有效保护心肌免于 I/R 损伤,其保护机制包括上调缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, HIF-1α)的表达[10]。HIF-1α 在心肌缺血过程中被显著诱导表达,其在心肌缺血/缺氧过程中是启动内源性心肌保护机制的起始因子,是防御 MI/RI 的主要调节因子[11]。而 MIF 是 HIF-1α 的下游效应因子,心肌组织中 HIF-1α 与 MIF 的表达密切相关[9,11]。因此,本研究拟通过体外研究和在体构建糖尿病小鼠 MI/RI 模型,探讨 Dex 联合 Sev-postC 对糖尿病小鼠 MI/RI 的保护作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 C57 BL/KS m/m(Lepr-WT/WT)小鼠 15 只,体质量(23 ± 2)g;6 ~ 8 周龄 SPF 级雄性 C57 BL/KS db/db(Lepr-KO/KO)2 型糖尿病小鼠 20 只,体质量(41 ± 3)g,购自海南药物研究所有限责任公司;H9c2 大鼠胚胎心肌细胞购自武汉普诺赛生物;FBS(批号:10091155),低葡萄糖 DMEM(批号:11966025),高葡萄糖 DMEM(葡萄糖 35 μmol/L;批号:12100061)购自美国 Gibco;Sev(批号:SF-2785016),Dex(批号:YT-1732234),戊巴比妥钠(批号:PZ-2437186)购自北京阳光生物;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶 MB(creative kinase isoenzyme MB, CK-MB)ELISA 试剂盒(批号:CSB-E11723m、CSB-E14404m),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定试剂盒(批号:CSB-E08556m)购自武汉华美;丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号:S0131S),CCK-8 细胞活力测定试剂盒(批号:C0037)购自上海碧云天;BCA 蛋白定量试剂盒(批号:71285-3),ECL 化学发光底物(批号:WBULS0500),蛋白酶抑制剂混合物(批号:P2714)购自美国 Merck-Millipore;RIPA 裂解液(批号:89901)购自美国 Thermo Fisher;兔抗 HIF-1α 单抗(批号:ab179483),兔 MIF 单抗(批号:ab187064),山羊抗兔 IgG(H + L)HRP 二抗(批号:ab3721)购自美国 Abcam;酶标仪(型号:800TS)购自美国 BioTek 公司;光学显微镜(型号:Ci-E)购自日本 Nikon。

1.2 体外和在体实验分组

体外实验分组:①LG-Control 组,低糖(LG)培养条件下培养 H9c2 心肌细胞;②LG-H/R 组,低糖培养条件下对 H9c2 心肌细胞进行缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)处理;③LG-Sev 组,低糖培养条件

下对 H9c2 心肌细胞进行 H/R 处理后,加入 Sev 处理细胞;④HG-Control 组,高糖(HG)培养条件下培养 H9c2 心肌细胞;⑤HG-H/R 组,高糖培养条件下对 H9c2 心肌细胞进行 H/R 处理后,在常氧条件下继续培养 12 h;⑥HG-Sev 组,高糖培养条件下对 H9c2 心肌细胞进行 H/R 处理后,加入 Sev 处理细胞,在常氧条件下继续培养 6 h;⑦HG-Sev + Dex 组,高糖培养条件下对 H9c2 心肌细胞进行 H/R 处理后,在对细胞进行 Sev 处理的同时加入 Dex 处理细胞,然后收获细胞。

在体实验分组(n = 5):①Sham 组,正常小鼠 MI/RI 模型假手术;②MI/RI 组,正常小鼠构建 MI/RI 模型;③Sev-postC 组,对正常小鼠构建 MI/RI 模型时,在再灌注前持续吸入 2.5% Sev 15 min[12];④DM-Sham 组,糖尿病小鼠 MI/RI 模型假手术;⑤DM-MI/RI 组,糖尿病小鼠构建 MI/RI 模型;⑥DM-Sev-postC 组,对糖尿病小鼠构建 MI/RI 模型时,在再灌注前持续吸入 2.5% Sev 15 min[12];⑦DM-Sev-postC + Dex 组,对糖尿病小鼠构建 MI/RI 模型时,在再灌注前持续吸入 2.5% Sev 15 min,再灌注结束后腹腔注射 10 μg/kg Dex[13]。

1.3 细胞培养与药物处理

高糖培养:H9c2 心肌细胞置于含 10% FBS 的高葡萄糖 DMEM 培养液中,培养于 5% CO_2、37 ℃恒温孵育箱中。低糖培养:在高糖培养条件下细胞生长汇合度达 90%,且生长状态良好时,消化细胞,并以 4×10^6 个/皿的密度接种于 6 孔板中,继续培养24 h;第 2 天当细胞生长汇合度达 80% 时,弃去细胞培养液,贴壁细胞用 37 ℃预热的 PBS 洗涤 3 次后,加入无血清低葡萄糖 DMEM 培养液继续培养。Sev 处理:向细胞中加入 3.4% 的 Sev 处理 6 h[14]。Sev + Dex 处理:向细胞中加入 3.4% 的 Sev 处理 6 h,同时加入 1 μmol/L的 Dex 处理 12 h[15]。

1.4 体外诱导 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤模型

H/R 损伤模型:取2×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长汇合度达 50%,适应性贴壁后,将细胞培养液更换为无血清 DMEM(高糖或低糖)培养液,置于含 0.1% O_2、5% CO_2 和 95% N_2 的低氧室中,在 37 ℃恒温、湿润的条件下缺氧培养 7 h。随后更换为含 10% FBS 的 DMEM(高糖或低糖)完全培养液,置于常氧条件下正常培养 2 h,收获细胞检测下游指标。Control 组细胞于含 10% FBS 的 DMEM(高糖或低糖)完全培养液的常氧条件下培养。

1.5 MI/RI 小鼠模型

MI/RI 造模前,对小鼠进行为期 1 周的适应性饲养。每 4 只小鼠 1 笼,饲养于 SPF 级鼠房,12 h 光照/12 h 黑暗周期循环,可自由进食和饮水。

整个手术期间都将小鼠放置在 30 ℃恒温加热垫上。于小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(60 mg/kg)进行麻醉,监测小鼠肢体张力、自主呼吸和心率。麻醉后进行气管插管,连接到动物呼吸机进行机械通气。术前开始记录小鼠心电图。MI/RI 组:小鼠开胸后,暴露心脏,用 7/0 无创缝合线结扎冠状动脉左前降支;通过心电图识别 ST 段,20 min 后松开结扎线进行再灌注。Sham 组:小鼠仅开胸,将 7/0 无创缝合线放置于冠状动脉左前降支部位,但并不进行结扎;手术后,继续监测小鼠心电图,缝合胸腔,并肌肉注射青霉素(400 kU/kg)。对于 MI/RI 组和 Sham 组小鼠,均在麻醉条件下[2% 戊巴比妥(60 mg/kg)腹腔注射]采集小鼠腹主动脉血样。待小鼠苏醒后,继续进行再灌注 24 h,然后对小鼠进行安乐死[2% 戊巴比妥(100 mg/kg)腹腔注射][13]。随后立即采集小鼠心脏样本,用于下游指标的检测。

1.6 心肌细胞存活能力测定

使用 CCK-8 细胞活力测定试剂盒测定心肌细胞存活能力。将 H9c2 心肌细胞接种于 96 孔板中,细胞贴壁后,按照各组的要求处理细胞。处理结束后,向每孔细胞中加入试剂盒自带的 10% CCK-8 溶液100 μL,在 37 ℃培养箱中孵育 2 h。然后使用 BioTek 酶标仪在 450 nm 波长下测量光密度值。细胞存活率(%) = 各组细胞光密度值/LG-Control 组细胞光密度值 ×100%。

1.7 HE 染色

新鲜小鼠心脏首先浸没于 10% 中性福尔马林中,在 4 ℃下固定 48 h,然后进行石蜡包埋并切片(5 μm)。切片经 2 次二甲苯彻底脱蜡和梯度乙醇脱水,然后使用苏木精染色液染色 5 min;分化液分化 3 s;切片复蓝约 3 s。再用 85% 和 95% 乙醇脱水,每次 4 min。然后对切片进行伊红染色 5 min;无水乙醇脱水 3 次,每次 5 min;二甲苯透明化 2 次,每次 2 min;最后,中性树胶封片。在 Nikon 光学显微镜下观察和拍照。

1.8 ELISA 检测

全血样先进行离心(3 000 ×g,5 min),获得血清样本。然后按照 ELISA 试剂盒说明书检测 LDH 和 CK-MB 水平。按照成品试剂盒操作说明书检测 SOD 活性和 MDA 水平。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测组织或细胞总蛋白浓度。使用 BioTek 酶标仪在 450 nm 波长处读取吸光值。

1.9 Western blot 检测

于心脏组织或心肌细胞中加入含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液,在液氮中研磨组织为组织匀浆;或使用超声破碎机在冰浴中破碎心肌细胞。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白浓度。取 10 μg 总蛋白/样本进行 SDS-PAGE 凝胶电泳;采用半干法电转印(恒流

100 mA),将凝胶中的蛋白电转印至 PVDF 膜上。使用含 10% 脱脂奶粉的 TBS-T 对 PVDF 膜进行封闭,室温条件下封闭 1 h。然后将 PVDF 膜与兔抗 HIF-1α 单抗(稀释度 1∶1 000)或兔 MIF 单抗(稀释度 1∶1 000)一抗于 4 ℃共同孵育过夜;第 2 天使用 TBS-T 洗膜 3 次,每次 5 min,然后将 PVDF 膜与山羊抗兔 IgG(H + L)HRP 二抗(稀释度 1∶10 000)于 37 ℃共同孵育 1 h。使用 ECL 化学发光底物进行化学发光和条带显色。

1.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism v8 软件对数据进行统计学分析。计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(*one way ANOVA*),$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

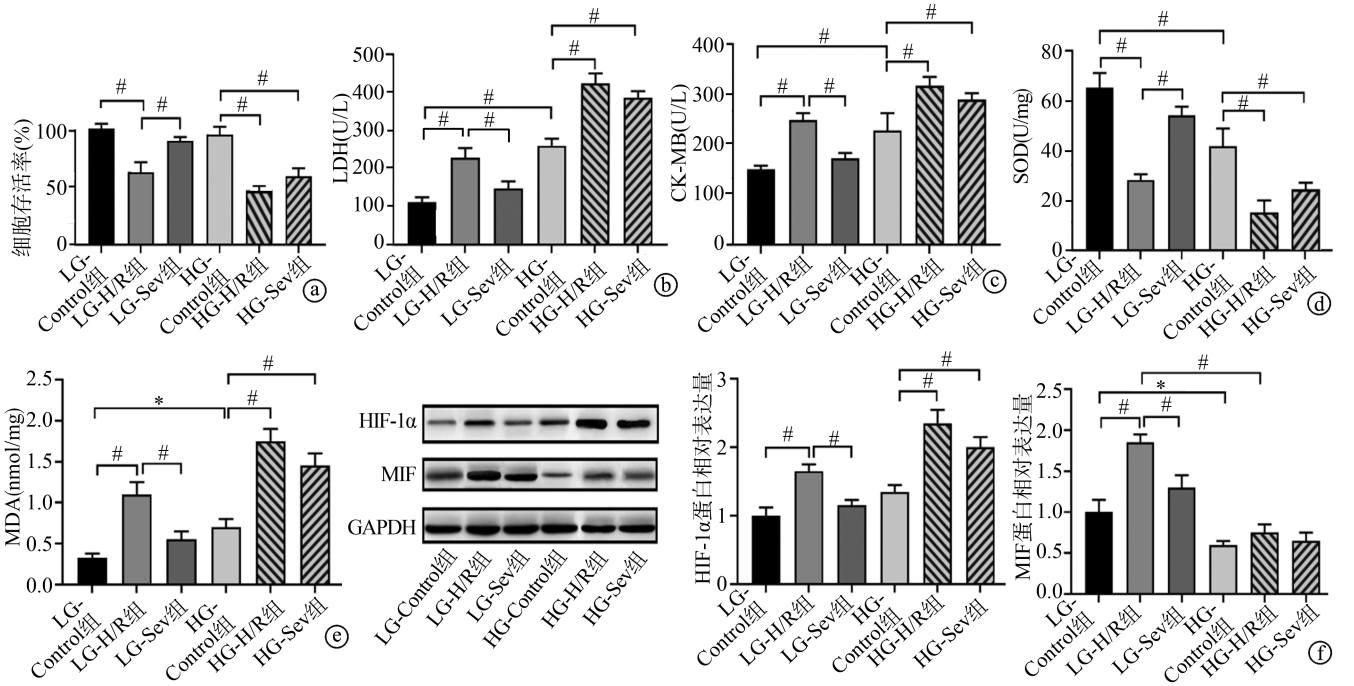
2 结果

2.1 高糖抑制 MIF 表达抵消 Sev 对心肌细胞 H/R 损伤的保护作用

与 LG-Control 组相比,LG-H/R 组细胞存活能力显著降低($P<0.01$);与 LG-H/R 组相比,LG-Sev 组细胞存活能力显著升高($P<0.01$);与 HG-Control 组相比,HG-H/R 组细胞存活能力显著降低($P<0.01$);HG-Sev组与 HG-H/R 组细胞存活能力比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1a。与 LG-Control 组相比,LG-H/R组细胞 SOD 水平显著降低($P<0.01$),LDH、CK-MB、MDA 水平均显著升高($P<0.01$);与 LG-H/R 组相比,LG-Sev 组 SOD 水平显著上升($P<0.01$),LDH、CK-MB、MDA 水平均显著降低($P<0.01$)。与 HG-Control 组相比,HG-H/R 组细胞 SOD 水平显著降低($P<0.01$),LDH、CK-MB、MDA 水平均显著升高($P<0.01$);HG-Sev 组与 HG-H/R 组 SOD、LDH、CK-MB、MDA 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$),见图 1b ~ e。与 LG-Control 组相比,LG-H/R组细胞 HIF-1α 表达显著升高($P<0.01$);与 LG-H/R 组相比,LG-Sev 组 HIF-1α 表达显著降低($P<0.01$)。与 HG-Control 组相比,HG-H/R 组细胞 HIF-1α 表达显著升高($P<0.01$);而 HG-H/R 组与 HG-Sev 组 HIF-1α 表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与 LG-Control 组相比,LG-H/R 组 MIF 表达显著上调($P<0.01$);与 LG-H/R 组相比,LG-Sev 组 MIF 表达显著下调($P<0.01$)。HG-Control 组、HG-H/R组、HG-Sev 组 MIF 表达比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与 LG-H/R 组相比,HG-H/R 组细胞 MIF 表达显著降低($P<0.01$),见图 1f。

2.2 Dex 通过上调 MIF 增强 Sev 处理对心肌细胞 H/R损伤的保护作用

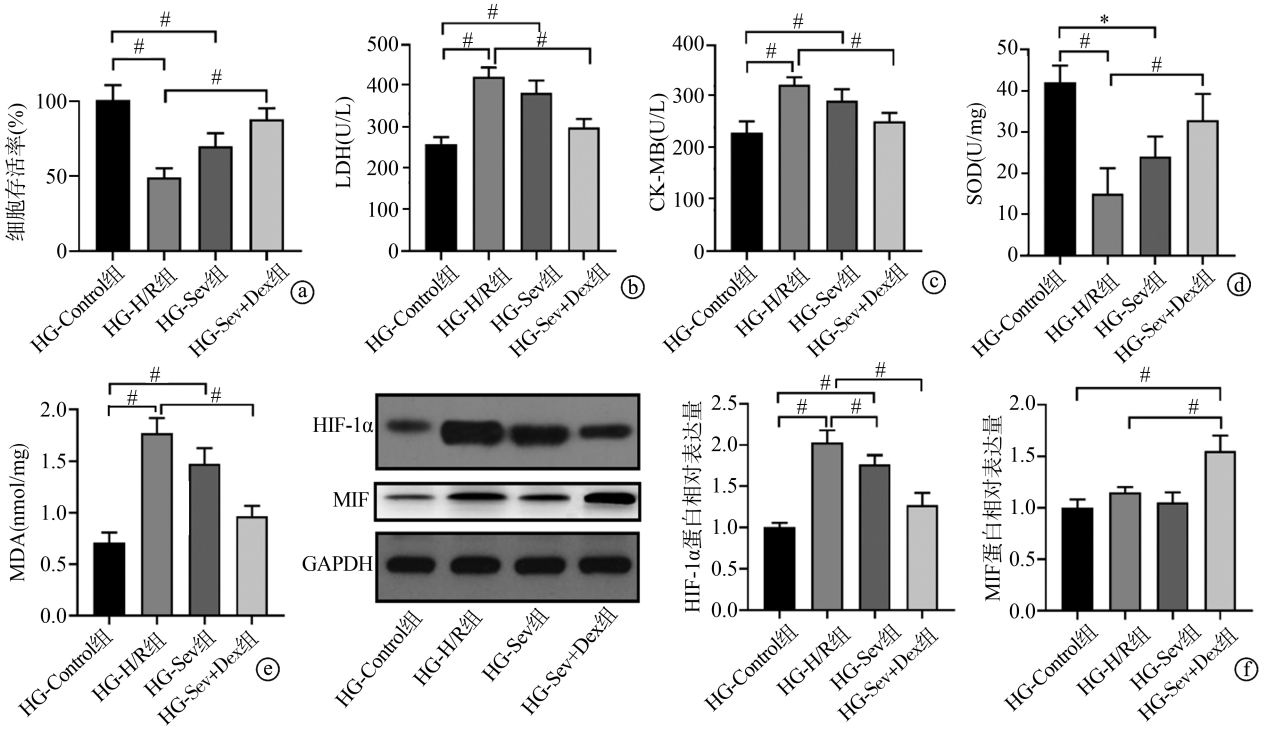
与 HG-Control 组相比,HG-H/R 组细胞存活能力显著降低($P<0.01$);与 HG-H/R 组相比,HG-Sev 组细胞存活能力无显著变化($P>0.05$),而 HG-Sev + Dex 组细胞存活能力显著提高($P<0.01$),见图 2a。与 HG-Control组相比,HG-H/R 组细胞 SOD 显著降低($P<0.01$),LDH、CK-MB、MDA 显著升高($P<0.01$);与 HG-H/R 相比,HG-Sev 组 LDH、CK-MB、MDA、SOD 水平无显著变化($P>0.05$),而 HG-Sev + Dex 组 LDH、CK-MB、MDA水平显著降低($P<0.01$),SOD水平升高



a:细胞存活率;b:LDH 水平;c:CK-MB 水平;d:SOD 水平;e:MDA 水平;f:HIF-1α 和 MIF 蛋白表达 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 1 低糖和高糖培养条件下 Sev 对心肌细胞 H/R 损伤的保护能力测定

($P<0.01$)，见图 2b ~ e。与 HG-Control 组相比，HG-H/R组细胞 HIF-1α 的表达显著升高($P<0.01$)；与 HG-H/R 组相比，HG-Sev 组 HIF-1α 的表达无显著变化($P>0.05$)，而 HG-Sev + Dex 组 HIF-1α 的表达显著下调($P<0.01$)。与 HG-Control 组相比，HG-H/R 组、HG-Sev 组细胞 MIF 的表达无显著变化($P>0.05$)，HG-Sev + Dex组 MIF 的表达显著上调($P<0.01$)。与 HG-H/R 组相比，HG-Sev 组 MIF 的表达无显著变化($P>0.05$)，HG-Sev + Dex 组 MIF 的表达显著上调($P<0.01$)，见图 2f。



a:细胞存活率;b:LDH 水平;c:CK-MB 水平;d:SOD 水平;e:MDA 水平;f:HIF-1α 和 MIF 蛋白表达 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

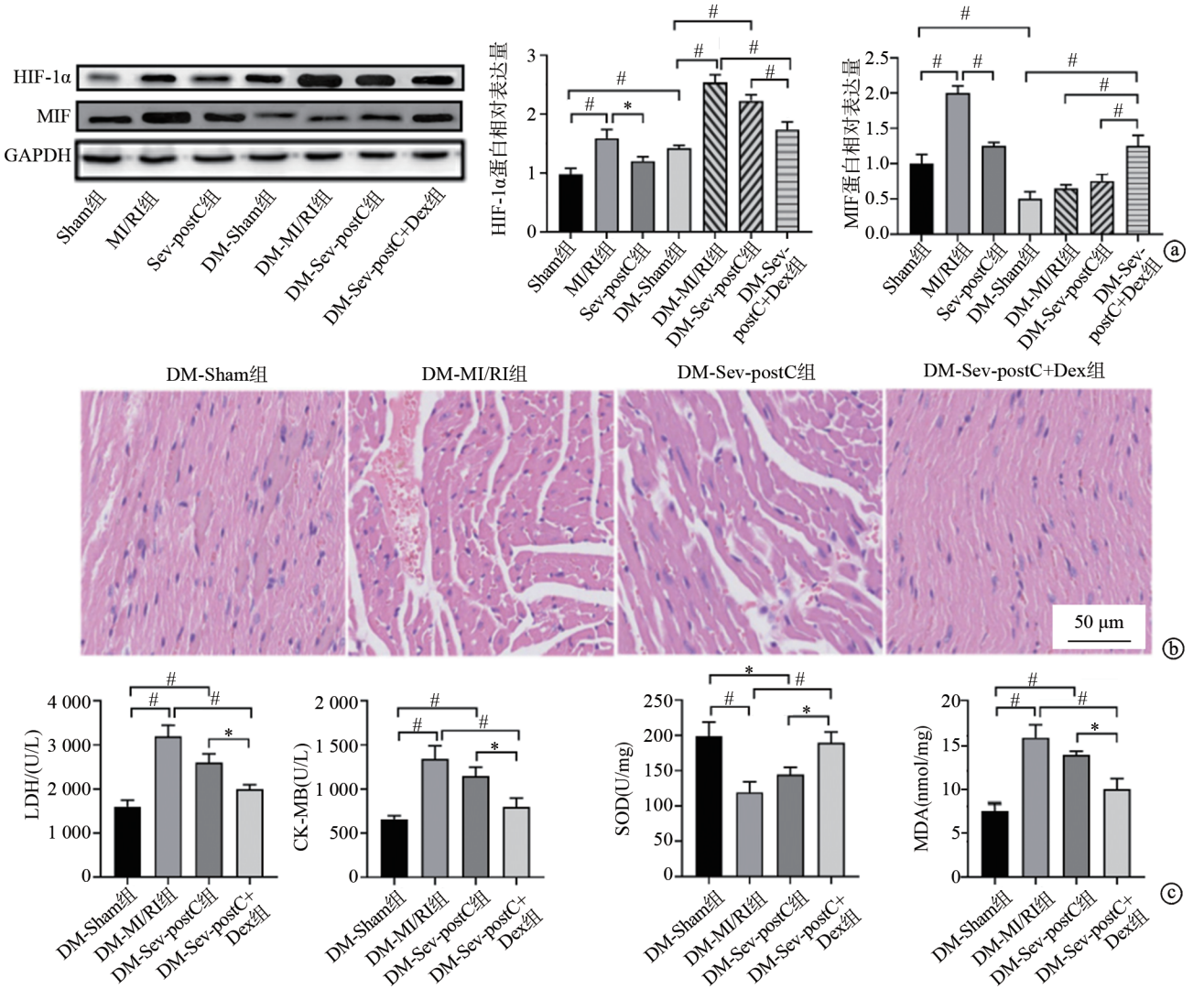
图 2 高糖培养条件下 Sev 联合 Dex 对心肌细胞 H/R 损伤的保护能力测定

2.3 Dex 通过上调 MIF 增强 Sev-postC 对糖尿病小鼠 MI/RI 的心肌保护作用

小鼠在体实验结果显示，与 Sham 组相比，MI/RI 组、DM-Sham 组小鼠心肌 HIF-1α 表达水平显著升高($P<0.01$)；与 MI/RI 组相比，Sev-postC 组 HIF-1α 表达水平明显降低($P<0.05$)；与 DM-Sham 组相比，DM-MI/RI组 HIF-1α 表达水平明显升高($P<0.01$)；与 DM-MI/RI 组相比，DM-Sev-postC 组 HIF-1α 表达水平无显著变化($P>0.05$)，DM-Sev-postC + Dex 组 HIF-1α表达水平明显下调($P<0.01$)。与 Sham 组相比，MI/RI 组 MIF 表达水平显著升高($P<0.01$)，DM-Sham组MIF表达水平显著降低($P<0.01$)；与 MI/RI 组相比，Sev-postC 组 MIF 表达水平显著降低($P<0.01$)；与 DM-MI/RI 组相比，DM-Sham 组和 DM-Sev-postC组 MIF 表达水平无显著变化($P>0.05$)，而 DM-Sev-postC + Dex 组 MIF 表达水平显著升高($P<0.01$)，见图 3a。HE 染色结果显示，DM-Sham 组小鼠心肌细胞排列整齐有序，心肌纤维无断裂及结构破坏；DM-MI/RI 组小鼠心肌细胞排列杂乱，心肌纤维断裂和结构破坏严重；与 DM-MI/RI 组小鼠相比，DM-Sev-postC组小鼠心肌损伤无明显缓解，而 DM-Sev-postC + Dex 组小鼠心肌损伤明显缓解，心肌细胞排列较为整齐有序，心肌纤维无断裂，结构破坏不明显(图 3b)。与 DM-Sham 组相比，DM-MI/RI 组 LDH、CK-MB 和 MDA 水平显著升高($P<0.01$)，SOD 水平显著降低($P<0.01$)；与 DM-MI/RI 组相比，DM-Sev-postC 组 LDH、CK-MB、MDA、SOD 水平无显著变化($P>0.05$)，DM-Sev-postC + Dex 组 LDH、CK-MB 和 MDA 水平明显降低($P<0.01$)，SOD 水平明显升高($P<0.01$)，见图 3c。

3 讨论

对于 ST 段抬高型心肌梗死患者，通过直接经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention，PCI)进行快速再灌注是目前限制梗死面积的最佳干预措施[16]，然而缺血和再灌注会引起 I/R 损伤。在动物实验和临床研究中，氧气和血液供应恢复导致的再灌注损伤面积可占最终心肌梗死面积的50%[16]。



a:心肌组织中 HIF-1α 和 MIF 蛋白表达;b:心肌组织 HE 染色;c:心肌组织中 LDH、CK-MB、SOD 和 MDA 水平 *:$P<0.05$;#:$P<0.01$

图 3 Dex 联合 Sev-postC 对 MI/RI 的保护能力测定

尽管及时再灌注,仍然会导致明显的心肌坏死,这种 I/R 损伤的程度是 PCI 后预后的主要决定因素。已有不同的心脏保护方法来限制 ST 段抬高型心肌梗死患者在直接 PCI 期间的梗死面积,其中通过向静脉或冠状动脉内注射药物或细胞已被证明是安全有效的,但仍需要进一步的研究以获得满意的临床结果。

多数临床前和临床数据表明,糖尿病是急性冠状动脉综合征患者的重要合并症;糖尿病患者的心脏最容易受到 I/R 损伤;有糖尿病存在的情况下,缺血预处理和药物等对心脏的保护作用会削弱。因此糖尿病患者发生急性心血管事件的可能性更大,而且心脏保护措施减少梗死面积的可能性更有限[16]。本研究也显示,高糖培养条件下对细胞进行 H/R 处理后,给予 Sev 治疗的效果没有低糖培养条件下对细胞进行相同处理时明显。

糖尿病患者对 I/R 损伤的易感性增加是由多种机制引发的,包括心肌细胞促存活信号通路的激活不足、心肌细胞线粒体能量代谢的改变、活性氧自由基的异常产生以及各种胞内和胞外位点抗氧化能力受损,而且持续的高血糖还会减少一氧化氮的产生和释放[16]。有研究显示,无论是在缺血前还是在再灌注前给予 Dex,都能够提高肾细胞的存活能力,Dex 通过抑制 PI3K-Akt 通路和 ERK 通路的磷酸化和活化,实现促缺血缺氧细胞存活能力的功效[17-19]。同时,Dex 还能通过抑制缺氧细胞的氧化应激保护肾组织[20]。但是对于 Dex 作用于心肌细胞是否有类似的效果,目前尚不清楚。本研究结果显示,在高糖培养条件下,对心肌细胞仅给予 Sev 治疗无明显效果,而给予 Sev + Dex 后,可显著提高 HG-H/R 处理后心肌细胞的 LDH、CK-MB、SOD 和 MDA 水平;同时,还可降低 HG-H/R

处理后心肌细胞中 LDH、CK-MB、SOD 和 MDA 水平,从而减轻氧化应激。

HIF-1α 是一种氧敏感转录因子,可通过转录激活 200 多个基因使生物体适应缺氧,被认为是缺氧和缺血信号转导激活的主要开关,其通过调节细胞内氧稳态、血管生成、心脏干细胞分化发挥保护作用[7]。研究发现 HIF-1α 可上调 MIF 的表达,而 MIF 可激活促存活信号通路(如 AMPK 磷酸化)以发挥心脏保护作用;缺血预处理通过 MIF 激活 RISK 和 AMPK 信号通路,减少心肌梗死面积和心肌细胞凋亡,抑制活性氧自由基产生和细胞的炎症浸润,维持内皮细胞功能,改善由 MI/RI 引起的心功能障碍,在心肌保护中发挥关键作用[8]。还有研究表明,MIF 能抑制 JNK 介导的细胞凋亡,并通过其抗氧化能力在 MI/RI 期间发挥心肌保护作用[9]。但是 MIF 的表达是否受高血糖的影响仍未可知。本研究结果显示,MIF 的表达在高糖条件下被抑制;同时,Sev-postC 无法发挥心肌保护作用;在 Sev-postC + Dex 治疗后,能够上调 MIF,并且发挥心肌保护作用。由此可以看出,高糖抑制了 MIF 的表达,Sev-postC 对糖尿病小鼠的心肌保护作用消失,说明 MIF 很可能在其中发挥关键的作用。进一步研究发现,Dex 在高血糖情况下依然能够上调 MIF 的表达,抵消高血糖抑制 MIF 表达的作用。对这一结果可能的解释有:①Dex 能够稳定糖尿病小鼠的血糖波动[21];②Dex 具有在高血糖情况下显著抑制 MI/RI 引起的氧化应激的能力[22]。后者在本研究结果中也得到了证实,Sev-postC + Dex 处理能够显著抑制 DM-MI/RI 引起的氧化应激水平。

本研究初步证明了 Dex 联合 Sev-postC 能够明显缓解糖尿病小鼠心肌 I/R 引起的损伤。然而,本研究尚未对 Dex 通过何种途径提高 MIF 的表达进行深入探讨,Dex 是否能够通过影响 miRNAs 发挥上调 MIF 保护心肌的作用,这是我们今后将要深入开展的研究方向,从而为深入理解 Dex 保护心肌免受 I/R 损伤的机制和临床上安全应用 Dex 进行针对性的治疗提供参考。

[参考文献]

[1] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the international diabetes federation diabetes Atlas[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 57: 107843. doi: 10. 1016/j. diabres. 2019. 107843.

[2] 李思源,刘振兵. 氧化应激在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. 山东医药,2021,61(22):92 - 95. doi:10. 3969/j. issn. 1002 - 266X. 2021. 22. 024.

[3] Aniskevich S, Renew JR, Chadha RM, et al. Pharmacology and perioperative considerations for diabetes mellitus medications[J]. Curr Clin Pharmacol, 2017, 12(3): 157 - 163. doi: 10. 2174/1574884712666170810115847.

[4] 田 浩,熊永红,张 艺,等. NRF2 在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用:与铁死亡的关系[J]. 中华麻醉学杂志,2021,41(3):348 - 352. doi:10. 3760/cma. j. cn131073. 20201027. 00322.

[5] Xu F, Liu Y, Zhu X, et al. Protective effects and mechanisms of vaccarin on vascular endothelial dysfunction in diabetic angiopathy[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4587. doi: 10. 3390/ijms20184587.

[6] Pasqualin RC, Mostarda CT, de Souza LE, et al. Sevoflurane preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion reduces infarct size and preserves autonomic control of circulation in rats[J]. Acta Cir Bras, 2016, 31(5): 338 - 345. doi: 10. 1590/S0102 - 86502016005000 0008.

[7] Dong J, Xu M, Zhang W, et al. Effects of sevoflurane pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury through the Akt/hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1α)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 3100 - 3107. doi: 10. 12659/MSM. 914265.

[8] Jankauskas SS, Wong DWL, Bucala R, et al. The evolving complexity of MIF signaling[J]. Cell Signal, 2019, 57: 76 - 88. doi: 10. 1016/j. cellsig. 2019. 01. 006.

[9] Voss S, Krüger S, Scherschel K, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression increases during myocardial infarction and supports pro-inflammatory signaling in cardiac fibroblasts[J]. Biomolecules, 2019, 9(2): 38. doi: 10. 3390/biom9020038.

[10] Torregroza C, Raupach A, Feige K, et al. Perioperative cardioprotection: general mechanisms and pharmacological approaches[J]. Anesth Analg, 2020, 131(6): 1765 - 1780. doi: 10. 1213/ANE. 0000000000005243.

[11] Hasegawa S, Tanaka T, Saito T, et al. The oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor enarodustat counteracts alterations in renal energy metabolism in the early stages of diabetic kidney disease[J]. Kidney Int, 2020, 97(5): 934 - 950. doi: 10. 1016/j. kint. 2019. 12. 007.

[12] Qiao SG, Sun Y, Sun B, et al. Sevoflurane postconditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by restoring autophagic flux via an NO-dependent mechanism[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(1): 35 - 45. doi: 10. 1038/s41401 - 018 - 0066 - y.

[13] Lempiäinen J, Finckenberg P, Mervaala EE, et al. Dexmedetomidine preconditioning ameliorates kidney ischemia-reperfusion injury[J]. Pharmacol Res Perspect, 2014, 2(3): e00045. doi: 10. 1002/prp2. 45.

[14] He J, Zhao H, Liu X, et al. Sevoflurane suppresses cell viability and invasion and promotes cell apoptosis in colon cancer by modulating exosome-mediated circ-HMGCS1 via the miR-34a-5p/SGPP1 axis[J]. Oncol Rep, 2020, 44(6): 2429 - 2442. doi: 10. 3892/or. 2020. 7783.

[15] Li JJ, Zhao Y, Zhou N, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetes mellitus by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. J Diabetes Res, 2019: 7869318. doi: 10. 1155/2019/7869318.

[16] Russo I, Penna C, Musso T, et al. Platelets, diabetes and myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16(1): 71. doi: 10. 1186/s12933 - 017 - 0550 - 6.

doi:10.11659/jjssx.05E022009

·基础研究·

LncRNA ZFAS1 影响骨关节炎软骨细胞增殖和凋亡的机制研究

吴 昊[1],黄 震[2],李 磊[2] (1.恩施州中心医院关节外科,湖北 恩施 445000;2.恩施慧宜中西医结合风湿医院骨与关节外科,湖北 恩施 445000)

[摘 要] **目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)锌指蛋白反义链 1(ZFAS1)在骨关节炎(OA)中的作用及其潜在分子机制。**方法** 将于恩施州中心医院进行膝关节置换术的 OA 患者软骨组织样本作为 OA 组,将同期外伤急诊截肢患者的正常膝关节组织样本作为对照(Control)组,RT-qPCR 实验检测 OA 软骨组织中 lncRNA ZFAS1 和 miR-590 的表达。将 Vector 和 pcDNA-ZFAS1 转染到原代软骨细胞后,MTT 实验和流式细胞术分别检测 OA 软骨细胞增殖和凋亡情况。双荧光素酶报告基因实验分别验证 ZFAS1 和 miR-590 以及 miR-590 和转化生长因子-β 受体 2(TGFβR2)的靶向关系。将 miR-590 mimic 或 NC mimic 与 Vector 和 pcDNA-ZFAS1 共转染到原代软骨细胞,检测细胞增殖和凋亡,RT-qPCR 实验检测软骨细胞中 TGFβR2 mRNA 表达水平,Western blot 检测软骨细胞中 TGFβR2 蛋白的表达。**结果** 与 Control 组比较,OA 组软骨组织中的 lncRNA ZFAS1 表达显著下调($P<0.05$),miR-590 表达显著上调($P<0.05$)。与Vector组比较,pcDNA-ZFAS1 组软骨细胞中 lncRNA ZFAS1 表达水平显著升高,miR-590 表达水平显著降低,软骨细胞增殖能力增强,细胞凋亡率降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。MiR-590 与 ZFAS1 存在互补的结合位点,TGFβR2 与 miR-590 也存在互补的结合位点。与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 和 3'UTR-ZFAS1-WT 共转染组的细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$),而 miR-590 mimic 和 3'UTR-ZFAS1-MUT 共转染组的细胞荧光素酶活性无统计学差异($P>0.05$)。此外,与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 和 3'UTR-TGFβR2-WT 共转染组的细胞荧光素酶活性显著降低($P<0.05$)。与 NC mimic 组比较,miR-590 mimic 组细胞中 TGFβR2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与 pcDNA-ZFAS1 + NC mimic 组比较,pcDNA-ZFAS1 + miR-590 mimic 组软骨细胞中 miR-590 表达水平显著升高,软骨细胞增殖能力减弱,细胞凋亡率升高,TGFβR2 mRNA和蛋白的表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** LncRNA ZFAS1 通过调控 miR-590/TGFβR2 轴促进 OA 中软骨细胞增殖,并抑制细胞凋亡。

[关键词] 骨关节炎;软骨细胞;lncRNA ZFAS1;凋亡;增殖
[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-05-05

Mechanism of lncRNA ZFAS1 affecting proliferation and apoptosis of osteoarthritis chondrocytes

WU Hao[1], HUANG Zhen[2], LI Lei[2] (1. Department of Joint Surgery, Enshi Central Hospital, Enshi Hubei 445000, China; 2. Department of Bone and Joint Surgery, Enshi Huiyi Rheumatology Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Enshi Hubei 445000, China)

Abstract: Objective To explore the role of long non-coding RNA (lncRNA) zinc finger protein antisense strand 1 (ZFAS1) in osteoarthritis (OA) and its underlying molecular mechanism. **Methods** Cartilage tissue samples of OA patients who underwent knee replacement

[基金项目] 湖北省卫生健康委科研立项项目(WJ2019H466)
[通信作者] 李 磊,E-mail:Ming_0429@163.com

[17] Kim SH, Jun JH, Oh JE, et al. Renoprotective effects of dexmedetomidine against ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0198307. doi: 10.1371/journal.pone.0198307.
[18] Meng L, Li LY, Lu S, et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF-κB and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. Mol Immunol, 2018, 94: 7 - 17. doi: 10.1016/j.molimm.2017.12.008.
[19] Kim SH, Jun JH, Oh JE, et al. Dexmedetomidine alleviates hepatic ischaemia-reperfusion injury via the PI3K/AKT/Nrf2-NLRP3 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(21): 9983 - 9994. doi: 10.1111/jcmm.16871.
[20] Chen YP, Feng XJ, Hu XY, et al. Dexmedetomidine ameliorates acute stress-induced kidney injury by attenuating oxidative stress and apoptosis through inhibition of the ROS/JNK signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 4035310. doi: 10.1155/2018/4035310.
[21] Yun SH, Choi YS. The effects of dexmedetomidine administration on postoperative blood glucose levels in diabetes mellitus patients undergoing spinal anesthesia: a pilot study[J]. Anesth Pain Med, 2016, 6(6): e40483. doi: 10.5812/aapm.40483.
[22] Wu ZL, Davis JRJ, Zhu Y. Dexmedetomidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by ameliorating oxidative stress and cell apoptosis through the trx1-dependent Akt pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 8979270. doi: 10.1155/2020/8979270.

(编辑:贺绍梅)