

盐酸戊乙奎醚对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制[△]

贾春媚*, 孟晨雪, 张宝慧, 韩 帅, 訾聪娜[#](河北北方学院附属第一医院麻醉科, 河北 张家口 075000)

中图分类号 R965;R542.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)24-3010-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.24.08



摘要 目的 基于巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)/腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(AMPK)信号通路探讨盐酸戊乙奎醚(PHC)对小鼠心肌缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用及潜在机制。方法 将雄性C57BL/6小鼠随机分为假手术组、I/R组、I/R+PHC组(PHC 20 μg/kg)、I/R+ISO-1组(MIF抑制剂 35 mg/kg)、I/R+PHC+ISO-1组(剂量同各单药组),每组8只。除假手术组外,其余各组均采用冠状动脉结扎法制备I/R损伤模型。于结扎前30 min,各药物组小鼠分别单次尾静脉注射相应药液1 mL。于再灌注120 min后,检测各组小鼠的心功能指标[心率、每搏输出量、射血分数、心输出量、收缩期末左室后壁厚度(LVPWs)、舒张期末左室后壁厚度(LVPWd)]和血清中炎症因子[白细胞介素6(IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子α(TNF-α)]水平,观察其心肌组织病理改变和超微结构,并检测心肌组织中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、磷酸化AMPKα(p-AMPKα)、MIF蛋白的表达水平。结果 与假手术组比较,I/R组小鼠心肌细胞排列松散,炎症细胞浸润严重,线粒体受损明显,其血清中IL-6、TNF-α水平和心肌组织中p-AMPKα蛋白的表达均显著升高或上调,心率、每搏输出量、射血分数、心输出量、LVPWd和血清中IL-10水平均显著降低($P<0.05$);与I/R组比较,I/R+PHC组小鼠心肌组织病变有所减轻,其血清中IL-6、TNF-α水平均显著降低,心率、每搏输出量、射血分数、心输出量、LVPWs、LVPWd、血清中IL-10水平以及心肌组织中Bcl-2、p-AMPKα、MIF蛋白的表达均显著升高或上调($P<0.05$);而I/R+ISO-1组小鼠心肌组织病变有所加重,多数定量指标显著恶化($P<0.05$);MIF抑制剂能普遍逆转PHC对I/R小鼠的保护作用($P<0.05$)。结论 PHC可改善I/R小鼠心功能,减轻其心肌组织炎症,恢复其心肌组织超微结构,上述作用可能与激活MIF/AMPK信号通路有关。

关键词 盐酸戊乙奎醚;心肌缺血再灌注;炎症反应;MIF/AMPK信号通路

Protective effects and mechanism of penehyclidine hydrochloride on myocardial ischemia-reperfusion injury in mice

JIA Chunmei, MENG Chenxue, ZHANG Baohui, HAN Shuai, ZI Congna (Dept. of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the protective effects and potential mechanism of penehyclidine hydrochloride (PHC) on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice through the macrophage migration inhibitory factor (MIF)/adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathways. **METHODS** Male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, I/R group, I/R+PHC group (PHC 20 μg/kg), I/R+ISO-1 group (MIF inhibitor 35 mg/kg), I/R+PHC+ISO-1 group (with the same dosage as each single drug group), with 8 mice in each group. Except for the sham operation group, the myocardial I/R injury model was prepared by coronary artery ligation. Thirty minutes before ligation, mice in each drug group were injected with 1 mL of the corresponding drug solution through the tail vein. After 120 min of reperfusion, the levels of cardiac function indexes [heart rate, stroke volume, ejection fraction, cardiac output, left ventricular posterior wall thickness in systole (LVPWs), left ventricular posterior wall thickness in diastole (LVPWd)], serum inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor-α (TNF-α)] in mice were detected in each group; the pathological changes and ultrastructure of myocardial tissue were observed, and the protein expressions of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), phosphorylated AMPKα (p-AMPKα) and MIF in myocardial tissue were detected. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the myocardial cells in the I/R group were loosely arranged, with severe infiltration of inflammatory cells and obvious mitochondrial damage. Serum levels of IL-6 and TNF-α and protein expression of p-AMPKα in myocardial tissue were significantly increased or upregulated, while heart rate, stroke volume, ejection fraction, cardiac output, LVPWd and serum level of IL-10 were significantly decreased ($P<0.05$).

[△] 基金项目 张家口市科学技术局市级科技计划自筹经费项目 (No.2221189D)

* 第一作者 医师,硕士。研究方向:体外循环麻醉与心肌细胞缺血再灌注损伤。E-mail:jiachunmei94@163.com

通信作者 副主任医师,博士。研究方向:体外循环麻醉与心肌细胞缺血再灌注损伤。E-mail:zicongna868@163.com

Compared with the I/R group, the myocardial tissue lesions in the I/R+PHC group were alleviated; serum levels of IL-6 and TNF-α were decreased significantly, while heart rate, stroke volume, ejection fraction, cardiac output, LVPWs, LVPWd, serum level of IL-10, and protein expressions of Bcl-2, p-

AMPK α and MIF in myocardial tissue were significantly increased or upregulated ($P<0.05$). However, myocardial tissue lesions of mice in the I/R+ISO-1 group worsened, with most quantitative indicators significantly deteriorating ($P<0.05$); MIF inhibitor could generally reverse the protective effect of PHC on I/R mice ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** PHC can improve cardiac function, reduce myocardial inflammation, and restore the ultrastructure of myocardial tissue in I/R mice. These effects may be related to the activation of the MIF/AMPK signaling pathway.

KEYWORDS penhexylidene hydrochloride; myocardial ischemia-reperfusion; inflammatory response; MIF/AMPK signaling pathway

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是临床常见的缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD),及时、有效的血运重建是改善AMI患者预后的重要策略^[1]。但血运重建后的心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)可能对心肌造成一定损伤,且I/R损伤的发生与患者并发症发生率及死亡率的升高密切相关^[2-4]。

盐酸戊乙奎醚(penhexylidene hydrochloride, PHC)是一种新型选择性抗胆碱能药物,可选择性作用于毒蕈碱型乙酰胆碱受体(muscarinic acetylcholine receptor, mAChR),目前已被用于麻醉前干预、有机磷农药中毒救治、休克应急处理等多个临床领域^[5-7]。研究显示,PHC可通过稳定细胞膜、溶酶体、线粒体膜结构,减少溶酶体的释放,抑制花生四烯酸产物和休克因子的生成,从而发挥细胞保护作用;此外,PHC还可降低毛细血管壁通透性,减少炎症性渗出^[8-9]。体内实验证实,PHC能够通过降低血液黏度和纤维蛋白原水平、增加红细胞变形能力、抑制血栓素A(thromboxane A, TXA)合成和血小板聚集等多种途径来改善急性呼吸窘迫综合征模型大鼠的微循环^[10]。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种在心肌细胞和血管内皮细胞中表达的多效免疫调节因子,可调节炎症细胞的活化和多种促炎性细胞因子的释放,并可通过激活下游腺苷一磷酸活化的蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)来保护心脏免受I/R损伤^[11-12]。已有研究证实,PHC可抑制线粒体调控的凋亡通路,改善I/R所致的大鼠心肌损伤^[13-14],但其能否影响MIF/AMPK信号通路尚不清楚。为此,本研究通过结扎左冠状动脉构建小鼠心肌I/R损伤模型,基于MIF/AMPK信号通路初步探讨PHC的心肌保护作用及潜在机制,以期阐明其具体作用机制及后续开发应用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Vevo 770型高分辨率小动物超声影像系统(加拿大Visual Sonics公司),E200型生物显微镜(日本Nikon公司),ChemiDoc XRS+型凝胶

成像系统、680型酶标仪(美国Bio-Rad公司),DM500型电子显微镜(德国Leica公司)等。

1.2 主要药品与试剂

PHC注射液(批号20211003,规格1 mL:0.5 mg)购自锦州奥鸿药业有限责任公司;MIF抑制剂4,5-二氢-3-(4-羟基苯基)-5-异噁唑乙酸甲酯(简称“ISO-1”)的原料药(货号YZM018877,纯度99%)购自范德(北京)生物科技有限责任公司;兔源B细胞淋巴瘤2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(货号ab59348)、兔源MIF抗体(货号ab65869)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(货号ab205718)、HRP标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(货号ab205719)均购自英国Abcam公司;兔源磷酸化AMPK α (phosphorylated AMPK α , p-AMPK α)抗体(货号2535S)购自美国Cell Signaling Technology公司;鼠源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号100166-MM10)购自北京义翘神州科技股份有限公司;血清白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号分别为70-EK206/3-96、70-EK210/4-96、70-EK282/3-96)均购自杭州联科生物技术有限公司。

1.3 实验动物

40只健康雄性SPF级C57BL/6小鼠,体重18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2022-0052。所有动物均饲养于温度20~26 $^{\circ}$ C、相对湿度40%~70%、每12 h光照/黑暗循环的环境中,自由进食、饮水。本研究方案经我院医学伦理委员会审核批准(项目编号K2022097)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

小鼠经适应性喂养1周后,按随机数字表法分为假手术组、I/R组、I/R+PHC组、I/R+ISO-1组、I/R+PHC+ISO-1组,每组8只。除假手术组外,其余各组小鼠均参考相关文献^[12-13,15]以冠状动脉结扎法制备I/R损伤模型:小鼠经腹腔注射1%戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉后行气管插管并连接动物呼吸机控制通气(呼吸频率90~110次/min,潮气量0.3~0.4 mL);于胸骨左侧切开,钝性分离至心包

膜,在显微镜下可见左冠状动脉前降支,以6-0号结扎线穿入左心耳根部下方1~2 mm处,斜向右上方由肺动脉圆锥左缘出针,针距约3~4 mm,稳定3~5 min后,收紧结扎线造成缺血(以左心室和心前壁周围心肌组织运动减弱、心电图可见宽大的畸形QRS波为缺血成功);缺血60 min后,取出结扎线,实现再灌注120 min。假手术组小鼠只穿线不打结,其余操作相同。

于结扎前30 min时,I/R+PHC组、I/R+ISO-1组、I/R+PHC+ISO-1组小鼠分别单次尾静脉注射PHC(20 μg/kg)、ISO-1(35 mg/kg)、PHC和ISO-1(20 μg/kg+35 mg/kg),注射体积均为1 mL(注射剂量及频次参考相关文献^[12-13]设置);假手术组和I/R组小鼠单次尾静脉注射等体积生理盐水。

2.2 小鼠心功能指标检测

于再灌注120 min后,以异氟醚麻醉各组小鼠,采用小动物超声影像系统检测其心功能指标,包括心率、每搏输出量、射血分数、心输出量、收缩期末左室后壁厚度(left ventricle posterior wall thickness in systole, LVPWs)、舒张期末左室后壁厚度(left ventricle posterior wall thickness in diastole, LVPWd)。

2.3 小鼠血清中炎症因子水平检测

检测心功能指标后,采集各组小鼠尾静脉血适量,于4℃下以1 500 r/min离心10 min,取上层血清,根据相应ELISA试剂盒说明书操作,使用酶标仪检测其中IL-6、IL-10、TNF-α水平。

2.4 小鼠心肌组织病理改变观察

采用苏木精-伊红(HE)染色法观察。取血后,以颈椎脱臼法处死各组小鼠,剖取心脏,取心尖缺血组织(假手术组小鼠取左心室前壁组织,下同)适量,于4%多聚甲醛溶液中固定过夜后,行常规石蜡包埋、切片(厚约4 μm),依次以苏木精染色5 min、伊红染色1 min,脱水后封片,使用显微镜观察其心肌组织的病理改变。

2.5 小鼠心肌组织超微结构观察

使用Loh等^[16]的方法,取各组小鼠的心尖缺血组织(1 mm×1 mm×1 mm),采用电子显微镜进行超微结构观察并拍摄图像。

2.6 小鼠心肌组织中Bcl-2、p-AMPKα、MIF蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下各组小鼠的心尖缺血组织适量,加入RIPA缓冲液研磨后离心,提取总蛋白,以BCA法定量后作变性处理。取变性蛋白适量,进行8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上,于室温下用5%脱脂牛奶密封3 h;加入Bcl-2、p-AMPKα、MIF、β-actin一抗(稀释比例均为1:1 000),于4℃下孵育过夜;以TBST缓冲

液洗涤1 min×10次后,加入相应二抗(稀释比例均为1:2 000),于室温下孵育1 h;洗膜后,以化学发光法显色,并于凝胶成像系统下成像。以β-actin为内参,使用Image J软件对Bcl-2、p-AMPKα、MIF蛋白的表达水平进行定量分析。

2.7 统计学方法

采用SPSS 25、GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较使用方差分析,进一步两两比较使用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 PHC对小鼠心功能参数的影响

与假手术组比较,I/R组小鼠的心率、每搏输出量、射血分数、心输出量、LVPWd均显著降低($P<0.05$)。与I/R组比较,I/R+PHC组小鼠的心率、每搏输出量、射血分数、心输出量、LVPWs、LVPWd均显著升高($P<0.05$);I/R+ISO-1组小鼠的心率显著升高,而每搏输出量、射血分数、LVPWs、LVPWd均显著降低($P<0.05$);与I/R+PHC组比较,I/R+PHC+ISO-1组小鼠的心率显著升高,而每搏输出量、射血分数、心输出量、LVPWs、LVPWd均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠心功能参数比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	心率/ (次/min)	每搏输出量/ μL	射血分数/ %	心输出量/ (mL/min)	LVPWs/ mm	LVPWd/ mm
假手术组	509.84±46.82	22.02±2.01	66.32±10.58	11.35±2.02	1.61±0.21	1.39±0.29
I/R组	451.32±19.66 ^a	20.71±3.21 ^a	50.33±6.41 ^a	9.35±0.39 ^a	1.52±0.13	1.01±0.13 ^a
I/R+PHC组	529.93±75.86 ^b	25.82±2.77 ^b	78.46±10.86 ^b	13.62±2.12 ^b	1.79±0.28 ^b	1.19±0.15 ^b
I/R+ISO-1组	521.25±36.63 ^b	18.35±2.13 ^b	35.42±8.20 ^b	9.57±2.15	1.01±0.05 ^b	0.91±0.07 ^b
I/R+PHC+ISO-1组	562.18±42.69 ^c	19.75±3.86 ^c	54.46±10.63 ^c	11.39±1.44 ^c	1.37±0.15 ^c	0.95±0.16 ^c

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与I/R组比较, $P<0.05$;c:与I/R+PHC组比较, $P<0.05$ 。

3.2 PHC对小鼠血清中炎症因子水平的影响

与假手术组比较,I/R组小鼠血清中IL-6、TNF-α水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与I/R组比较,I/R+PHC组小鼠血清中IL-6、TNF-α水平均显著降低,IL-10水平显著升高($P<0.05$);而I/R+ISO-1组小鼠血清中IL-6、TNF-α水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.05$)。与I/R+PHC组比较,I/R+PHC+ISO-1组小鼠血清中IL-6、TNF-α水平均显著升高,IL-10水平显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

3.3 PHC对小鼠心肌组织病理形态的影响

假手术组小鼠心肌纤维细胞排列整齐、紧密,细胞质和细胞核染色均匀,无细胞坏死或炎症细胞浸润。与假手术组比较,I/R组小鼠心肌纤维排列松散、紊乱,出血水肿明显,部分心肌纤维断裂,炎症细胞严重浸润。与I/R组比较,I/R+PHC组小鼠心肌纤维细胞排列整齐、紧密,可见轻度水肿,出血少,细胞坏死少,炎症细胞浸

表2 各组小鼠血清中IL-6、IL-10、TNF- α 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{pg/mL}$)

组别	IL-6	IL-10	TNF- α
假手术组	6.11 \pm 3.03	128.34 \pm 12.48	43.58 \pm 10.06
I/R组	13.92 \pm 2.73 ^a	103.82 \pm 16.32 ^a	64.51 \pm 12.05 ^a
I/R+PHC组	8.92 \pm 1.57 ^b	130.97 \pm 17.34 ^b	45.72 \pm 13.35 ^b
I/R+ISO-1组	17.45 \pm 3.34 ^b	85.46 \pm 12.83 ^b	89.24 \pm 17.47 ^b
I/R+PHC+ISO-1组	16.34 \pm 2.16 ^c	101.52 \pm 11.02 ^c	61.66 \pm 16.42 ^c

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与I/R组比较, $P < 0.05$; c: 与I/R+PHC组比较, $P < 0.05$ 。

润少; 而I/R+ISO-1组小鼠心肌细胞坏死、水肿、炎症细胞浸润程度与I/R组类似。与I/R+PHC组比较, I/R+PHC+ISO-1组小鼠心肌纤维断裂、炎症细胞浸润等病理损伤略重。结果见图1。

3.4 PHC对小鼠心肌组织超微结构的影响

假手术组小鼠心肌组织超微结构正常, 线粒体体积较小、分布致密。与假手术组比较, I/R组小鼠可见明显的心肌坏死、线粒体肥大、线粒体空隙减少、线粒体嵴结构紊乱或断裂, 且内部出现亮区或空泡。与I/R组比较, I/R+PHC组小鼠心肌组织超微结构正常, 线粒体体积较小, 无明显心肌细胞肿胀和空泡形成; 而I/R+ISO-1组小鼠心肌线粒体不规则, 病变程度较高。与I/R+PHC组比较, I/R+PHC+ISO-1组小鼠心肌线粒体形状不规则、线粒体嵴结构紊乱或断裂等病理改变略重。结果见图2。

3.5 PHC对小鼠心肌组织中Bcl-2、p-AMPK α 、MIF蛋白表达的影响

与假手术组比较, I/R组小鼠心肌组织中p-AMPK α 蛋白的表达显著上调 ($P < 0.05$); 与I/R组比较, I/R+PHC组小鼠心肌组织中Bcl-2、p-AMPK α 、MIF蛋白的表达均显著上调, 而I/R+ISO-1组小鼠心肌组织中Bcl-2、MIF蛋白的表达均显著下调 ($P < 0.05$); 与I/R+PHC组比较,

I/R+PHC+ISO-1组小鼠心肌组织中Bcl-2、p-AMPK α 、MIF蛋白的表达均显著下调 ($P < 0.05$)。结果见表3、图3。

4 讨论

I/R损伤是影响动脉搭桥术、冠脉溶栓治疗、经皮腔内冠脉血管成形术、心脏外科体外循环、心肺复苏等众多心脏疾病治疗效果和患者预后的主要原因^[2]。尽管I/R损伤的具体机制尚未完全阐明, 但目前学界认为其发生涉及炎症反应、活性氧生成、钙超负荷等多个环节^[2-3]。近年来, I/R损伤、炎症因子释放致心肌损伤、缺血状态下机体内源性保护已成为相关研究的热点^[2]。既往研究表明, PHC可一定程度地改善I/R小鼠的心脏收缩和舒张功能, 扩张冠状动脉, 增加心肌血流量, 改善微循环, 从而减轻其心肌I/R损伤^[9, 13-14], 但具体作用机制尚不清楚。

超声心动图是评估心功能的重要工具, 具有无创、快捷的特点。本研究通过小动物超声影像系统检测各组小鼠的心率、每搏输出量、射血分数、心输出量、LVPWd、LVPWs, 以评价其心功能。结果显示, 与假手术组比较, I/R组小鼠的心功能指标(除LVPWs外)均显著降低, 提示I/R对小鼠心功能造成较大影响, 这可能与I/R后心肌细胞钙离子失衡、氧化应激和炎症反应发生等多种因素有关^[2]。而经PHC干预后, 小鼠的心功能有所恢复, 提示该成分可改善I/R损伤小鼠的部分心功能参数。

过度炎症反应是导致I/R损伤的原因之一, 主要表现为IL-6、TNF- α 等促炎性细胞因子的释放增加。其中, TNF- α 可促进氧自由基产生、诱导细胞凋亡; IL-6主要由巨噬细胞及成纤维细胞产生, 是炎症调控的关键因

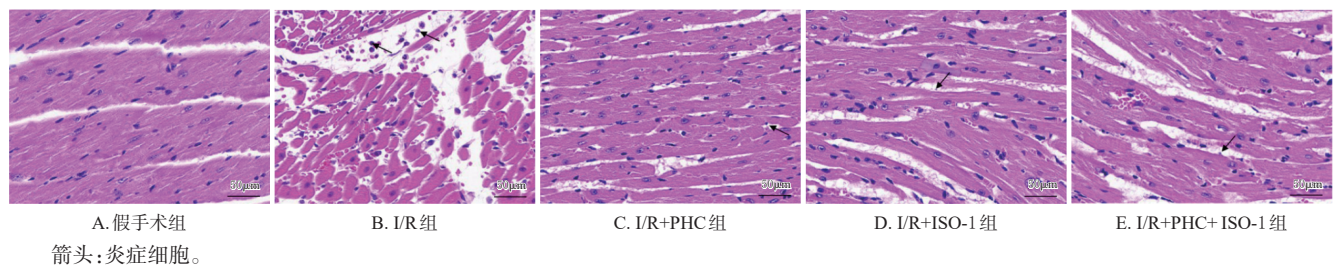


图1 各组小鼠心肌组织病理变化的显微图(HE染色)

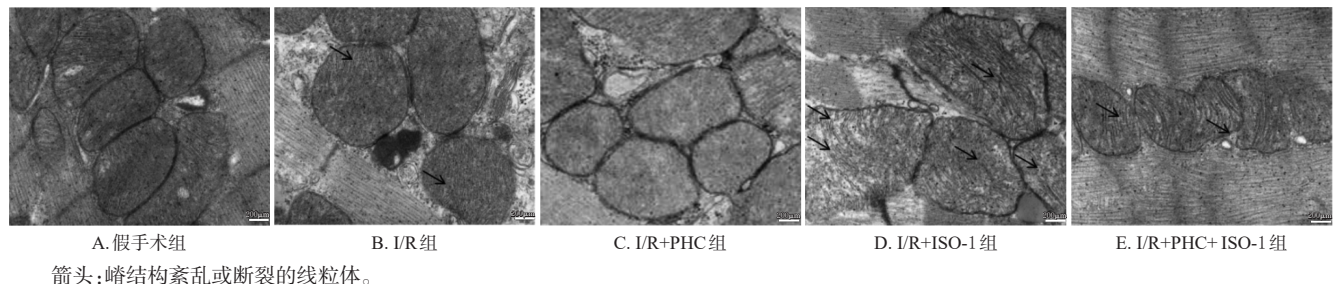
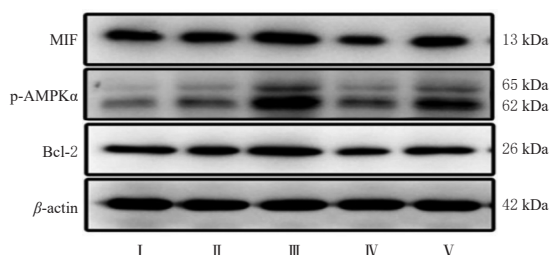


图2 各组小鼠心肌组织超微结构的显微图

表3 各组小鼠心肌组织中 Bcl-2、p-AMPK α 、MIF 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	Bcl-2	p-AMPK α	MIF
假手术组	0.78 \pm 0.07	0.31 \pm 0.05	0.81 \pm 0.04
I/R组	0.74 \pm 0.07	0.52 \pm 0.19 ^a	0.83 \pm 0.06
I/R+PHC组	1.19 \pm 0.34 ^b	1.16 \pm 0.29 ^b	1.13 \pm 0.37 ^b
I/R+ISO-1组	0.59 \pm 0.06 ^b	0.58 \pm 0.06	0.56 \pm 0.05 ^b
I/R+PHC+ISO-1组	0.81 \pm 0.05 ^c	0.96 \pm 0.13 ^c	0.84 \pm 0.14 ^c

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与 I/R 组比较, $P < 0.05$; c: 与 I/R+PHC 组比较, $P < 0.05$ 。



I: 假手术组; II: I/R组; III: I/R+PHC组; IV: I/R+ISO-1组; V: I/R+PHC+ISO-1组。

图3 各组小鼠心肌组织中 MIF、p-AMPK α 、Bcl-2 蛋白表达的电泳图

子,可促进心肌细胞凋亡;IL-10具有拮抗炎症反应的作用,可有助于减轻 I/R 损伤^[12]。本研究结果显示,与假手术组比较,I/R 组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平均显著升高,IL-10 水平显著降低,HE 染色和电子显微镜观察可见炎症细胞浸润、线粒体受损等典型的心肌 I/R 损伤病理特征;而 PHC 可显著降低 I/R 小鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平,显著升高 IL-10 水平,并可减轻上述心肌 I/R 损伤病理改变,提示该成分可一定程度上减轻 I/R 所导致的心肌炎症损伤。

抗凋亡蛋白 Bcl-2 在凋亡的发生过程中起着门控开关的作用,是调控心肌 I/R 损伤致细胞凋亡的重要分子,其表达上调可有助于减轻心肌 I/R 损伤^[13]。本研究通过 Western blot 检测发现,I/R 小鼠心肌组织中 Bcl-2 蛋白的表达虽较假手术组无明显变化,但 PHC 可使该蛋白的表达显著上调,提示该成分可能通过上调 Bcl-2 蛋白的表达来发挥心肌保护作用。

研究指出,MIF 的表达水平与心肌损伤的严重程度密切相关,MIF/AMPK 信号通路激活可增加葡萄糖转运蛋白活性和葡萄糖代谢,从而减轻 I/R 损伤^[17];此外,MIF 还可通过激活下游 AMPK 信号通路来抑制氧化应激和 Jun 激酶介导的细胞凋亡,从而发挥改善心肌 I/R 损伤的作用^[18]。AMPK 信号通路在维持机体能量代谢平衡和调控氧化应激、内质网应激、细胞凋亡方面具有重要作用,其中 p-AMPK α 是 AMPK 信号通路激活的重要标志^[12]。与假手术组比较,I/R 组小鼠心肌组织中 p-AMPK α 蛋白的表达显著上调,提示 I/R 损伤后 AMPK 信号通路被激活;而 PHC 可进一步增加 MIF、p-AMPK α 蛋

白的表达水平,提示 PHC 的心肌保护作用可能与激活 MIF/AMPK 信号通路有关^[17]。为验证 MIF/AMPK 信号通路在 I/R 损伤及 PHC 干预中的作用,本研究同时设置了 I/R+ISO-1 组和 I/R+PHC+ISO-1 组。结果显示,单用 ISO-1 时,ISO-1 对小鼠各指标的干预作用普遍与 PHC 相反;而联用 PHC 和 ISO-1 时,ISO 可逆转 PHC 对多数指标的改善作用,提示 PHC 可能通过激活 MIF/AMPK 信号通路来发挥心肌保护作用。需要注意的是,单用 ISO-1 时,并未发现 p-AMPK α 蛋白表达的变化,提示可能存在多个影响 AMPK 蛋白磷酸化的因素或存在其他信号通路;此外,单用或加用 ISO-1 后,小鼠心率均明显升高,可能与抑制剂进一步加重心肌 I/R 损伤,进而诱发室性心动过速等再灌注性心律失常有关^[2]。

PHC 属于选择性抗胆碱药,主要作用于 M1 和 M3 受体,对 M2 受体无明显作用,且不影响患者心率^[3]。冠状动脉内皮细胞主要表达 M3 受体,而冠状动脉平滑肌则同时表达 M2、M3 受体,这为 PHC 改善冠脉血供、减轻心肌 I/R 损伤奠定了理论基础^[6]。当然,PHC 对心肌 I/R 损伤的保护作用还可能涉及其他通路^[19-20],仍需要更多研究进一步探索。

综上所述,PHC 可改善 I/R 小鼠心功能,减轻其心肌组织炎症,恢复其心肌组织超微结构,上述作用可能是通过激活 MIF/AMPK 信号通路来实现的。

参考文献

- [1] 颜红兵,向定成,刘红梅,等. ST 段抬高型急性心肌梗死院前溶栓治疗中国专家共识[J]. 中国介入心脏病学杂志,2018,26(4):181-190.
YAN H B, XIANG D C, LIU H M, et al. China expert consensus on pre-hospital thrombolytic therapy for ST-segment elevation acute myocardial infarction[J]. Chin J Interv Cardiol, 2018, 26(4): 181-190.
- [2] 洪名扬,富路. 冠心病心肌缺血再灌注损伤机制研究的进展[J]. 心血管康复医学杂志,2022,31(2):241-245.
HONG M Y, FU L. Research progress on mechanism of myocardial ischemia-reperfusion injury in coronary heart disease[J]. Chin J Cardiovasc Rehabil Med, 2022, 31(2): 241-245.
- [3] MARIN W, MARIN D, AO X, et al. Mitochondria as a therapeutic target for cardiac ischemia-reperfusion injury: review[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(2):485-499.
- [4] 孙芳芳,崔哲,张富洋,等. 心室负荷卸载防治心肌缺血再灌注损伤的应用及机制[J]. 心脏杂志,2023,35(6):700-704.
SUN F F, CUI Z, ZHANG F Y, et al. Application and mechanism of ventricular unloading in prevention and treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury[J].

- Chin Heart J, 2023, 35(6):700-704.
- [5] 亢旭明, 吴霜婷, 倪坤强, 等. 术前雾化吸入盐酸戊乙奎醚对单肺通气时非通气侧肺损伤的影响及作用机制研究[J]. 中国临床新医学, 2023, 16(8):805-811.
- KANG X M, WU S T, NI K Q, et al. A study on the effect of preoperative aerosol inhalation of penethylidene hydrochloride on non-ventilated lung injury during one-lung ventilation and its mechanisms of action[J]. Chin J New Clin Med, 2023, 16(8):805-811.
- [6] WANG Y G, GAO Y F, MA J. Pleiotropic effects and pharmacological properties of penethylidene hydrochloride[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12:3289-3299.
- [7] 胡乃元, 欧阳华, 徐巧精, 等. 盐酸戊乙奎醚预处理对失血性休克致急性肺损伤大鼠肺组织保护作用及对炎症因子的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(1):124-128.
- HU N Y, OUYANG H, XU Q J, et al. Protective effect of penethylidene hydrochloride pretreatment on lung tissue and inflammatory factors in rats with acute lung injury induced by hemorrhagic shock[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(1):124-128.
- [8] XIAO H T, SHI T T, HAN L Z, et al. Mechanism of penethylidene hydrochloride on a dysmenorrhea rat model[J]. Drug Dev Res, 2019, 80(3):325-332.
- [9] TAN H B, CHEN L, MA J. Penethylidene hydrochloride post-conditioning reduces ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis in rats[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5):4272-4278.
- [10] ZHAO H Y, WANG P, MA C G, et al. Smoking attenuates efficacy of penethylidene hydrochloride in acute respiratory distress syndrome induced by lipopolysaccharide in rats[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:7295-7305.
- [11] CHEN S Y, YU Q W, SONG Y D, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppresses apoptosis signal-regulating kinase 1 to protect against liver ischemia/reperfusion injury[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:951906.
- [12] CHEN S Y, WU J J, LI A M, et al. Effect and mechanisms of dexmedetomidine combined with macrophage migration inhibitory factor inhibition on the expression of inflammatory factors and AMPK in mice[J]. Clin Exp Immunol, 2023, 212(1):61-69.
- [13] 谭红保, 林多茂, 马骏. 盐酸戊乙奎醚预先给药对大鼠心肌缺血再灌注时线粒体调控凋亡通路的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(10):1267-1270.
- TAN H B, LIN D M, MA J. Effect of preconditioning with penethylidene hydrochloride on mitochondria-dependent pathway of apoptosis during myocardial ischemia-reperfusion in rats[J]. Chin J Anesthesiol, 2017, 37(10):1267-1270.
- [14] WANG Z Q, LIN D M, ZHANG L, et al. Penethylidene hydrochloride prevents anoxia/reoxygenation injury and induces H9c2 cardiomyocyte apoptosis via a mitochondrial pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 797:115-123.
- [15] 卢志强, 张艳军, 崔广智, 等. 心肌缺血模型的制作方法研究进展[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8):1053-1057.
- LU Z Q, ZHANG Y J, CUI G Z, et al. Progress in preparation methodology of animal models of myocardial ischemia[J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28(8):1053-1057.
- [16] LOH H K, SAHOO K C, KISHORE K, et al. Effects of thalidomide on isoprenaline-induced acute myocardial injury: a haemodynamic, histopathological and ultrastructural study[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007, 100(4):233-239.
- [17] SONG S S, XIAO Z P, DEKKER F J, et al. Macrophage migration inhibitory factor family proteins are multitasking cytokines in tissue injury[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(2):105.
- [18] FARR L, GHOSH S, MOONAH S. Role of MIF cytokine/CD74 receptor pathway in protecting against injury and promoting repair[J]. Front Immunol, 2020, 11:1273.
- [19] 谭红保, 马骏, 陈莉, 等. 盐酸戊乙奎醚后处理对心肌缺血-再灌注大鼠心功能的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2022, 38(1):72-75.
- TAN H B, MA J, CHEN L, et al. Effects of penethylidene hydrochloride postconditioning on cardiac function in rats with myocardial ischemia-reperfusion[J]. J Clin Anesthesiol, 2022, 38(1):72-75.
- [20] LU Y, ZI C N, ZHANG L, et al. Penethylidene hydrochloride protects rat cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury by platelet-derived growth factor-B[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2023, 26(6):1204-1213.

(收稿日期:2024-04-11 修回日期:2024-11-06)

(编辑:张元媛)