

本文引用: 王盛华, 黄庆先, 李庆丰. 阿芬太尼调节 SphK1/S1P 信号通路保护心肌缺血再灌注损伤大鼠[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(5): 402-409. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.05.005.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2024)32-05-0402-08

阿芬太尼调节 SphK1/S1P 信号通路保护心肌缺血再灌注损伤大鼠

王盛华, 黄庆先, 李庆丰

南阳市第二人民医院麻醉科, 河南省南阳市 473000

[摘要] [目的] 探究阿芬太尼对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠的作用及在该过程中对鞘氨醇激酶1(SphK1)/鞘氨醇-1-磷酸(S1P)信号通路的调节机制。[方法] 将SPF级SD雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药物组(复方丹参组)和阿芬太尼低剂量组、阿芬太尼高剂量组、阿芬太尼高剂量+SphK1激动剂组(阿芬太尼+PMA组),每组20只。除假手术组,其余组均利用结扎左前降支冠状动脉后再灌注复制MIRI模型。全自动生物化学分析仪检测血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)和谷草转氨酶(AST)的活性;TTC检测大鼠心肌梗死面积;HE染色观察大鼠心肌组织形态学特征;TUNEL染色检测大鼠心肌细胞凋亡;ELISA检测血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1 β (IL-1 β)及S1P的水平;试剂盒检测心肌组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性;Western blot检测心肌组织SphK1蛋白表达。[结果] 相较于假手术组,模型组大鼠心肌组织病理损伤严重,血清中心肌损伤标志物LDH、CK和AST的活性,心肌梗死面积和心肌细胞凋亡率, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA、S1P水平及SphK1蛋白表达均升高, SOD活性降低($P<0.05$);相较于模型组,阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组大鼠心肌组织损伤减轻,血清中心肌损伤标志物LDH、CK和AST的活性,心肌梗死面积和心肌细胞凋亡率, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MDA、S1P水平及SphK1蛋白表达均降低, SOD活性升高($P<0.05$)。SphK1激动剂可逆转高剂量阿芬太尼对上述指标的影响($P<0.05$)。[结论] 阿芬太尼对MIRI大鼠发挥保护作用,其机制可能与抑制SphK1/S1P信号通路有关。

[关键词] 阿芬太尼; 鞘氨醇激酶1/鞘氨醇-1-磷酸信号通路; 心肌缺血再灌注损伤; 保护作用

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The protective effect of alfentanil on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by regulating the SphK1/S1P signaling pathway

WANG Shenghua, HUANG Qingxian, LI Qingfeng

Anesthesiology Department, Nanyang Second People's Hospital, Nanyang, Henan 473000, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of alfentanil on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats and its regulatory mechanism on the sphingosine kinase 1 (SphK1)/sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling pathway during this process. **Methods** SPF grade SD male rats were randomly divided into sham surgery group, model group, positive drug group (compound salvia miltiorrhiza group), low dose alfentanil group, high dose alfentanil group, and high alfentanil+SphK1 agonist group (alfentanil+PMA group), with 20 rats in each group. Except the sham operation group, the MIRI model was reproduced by ligating the left anterior descending coronary artery and reperfusion. The activities of serum lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by automatic biochemical analyzer; TTC was applied to detect the size of myocardial infarction in rats; HE staining was applied to observe the morphological characteristics of rat myocardial tissue; TUNEL staining was applied to detect myocardial cell apoptosis in rats; ELISA was applied to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and S1P; kits were applied to detect content of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in myocardial tissue; Western blot was applied to detect the expression level of SphK1 protein in myocar-

[收稿日期] 2023-10-10

[修回日期] 2023-12-19

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20191555)

[作者简介] 王盛华, 硕士, 副主任医师, 研究方向为麻醉和体外循环, E-mail: t5pougp@163.com。

dial tissue. **Results** Compared with the sham surgery group, the pathological damage to the myocardial tissue of rats was severe in the model group, the activities of serum central muscle injury markers LDH, CK, and AST, myocardial infarction area, myocardial cell apoptosis rate, the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , MDA, S1P and the expression of SphK1 protein all increased, the activity of SOD decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the myocardial tissue damage of rats was reduced in the positive drug group and the low and high dose alfentanil groups, the activities of serum central muscle injury markers LDH, CK, and AST, myocardial infarction area, myocardial cell apoptosis rate, the levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , MDA, S1P and the expression of SphK1 protein all decreased, the activity of SOD increased ($P < 0.05$). The SphK1 agonist was able to reverse the impact of high-dose alfentanil on the above indicators ($P < 0.05$).

Conclusion Alfentanil has protective effect on MIRI rats, and its mechanism may be related to the inhibition of SphK1/S1P signaling pathway.

[**KEY WORDS**] alfentanil; sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate signaling pathway; myocardial ischemia-reperfusion injury; protective effect

缺血性心脏病是严重威胁人类生命和健康的常见疾病之一,急性缺血性心脏病最有效的治疗方法是尽快恢复缺血组织的血流^[1]。然而,血流的突然恢复可能导致更强烈的心血管创伤,称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI),进而导致心肌细胞凋亡和坏死以及心脏停搏等严重后果,影响心肌缺血治疗的效果^[2]。MIRI的潜在机制复杂,主要涉及活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度产生、炎症反应、线粒体功能受阻和凋亡激活等^[3]。因此,深入探讨 MIRI 的发生机制对于寻找恢复血流并避免缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的方法至关重要。鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)是一种卵磷脂分子,由鞘氨醇(sphingosine, Sph)激酶(sphingosine kinase, SphK)催化合成,其中 SphK1 广泛分布在脑、心脏、肺和脾等组织中并高表达^[4]。SphK1/S1P 信号通路涉及多种病理生理反应,参与自身免疫性疾病、炎性疾病及肿瘤的发生和发展^[5]。研究显示, SphK1/S1P 信号通路被抑制能够缓解 I/R 介导的肝损伤和脑损伤^[6-7],但对 I/R 诱导的心肌损伤的作用机制还未明确。阿芬太尼(alfentanil)是一种短效合成阿片类药物,化学性质类似于芬太尼,它是一种 μ 受体激动剂,通常用于手术麻醉、疼痛手术的镇痛以及某些情况下用于控制中度至重度疼痛的姑息治疗^[8]。有研究证明其他阿片类镇痛剂舒芬太尼和瑞芬太尼均能够保护心脏免受 MIRI^[9-10]。此外,阿芬太尼也可以通过激活血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)/血管紧张素 1 (angiotensin 1, Ang-1) 信号通路对糖尿病大鼠 MIRI 发挥保护作用^[11]。因此,本研究旨在探讨阿芬太尼是否可以通过调节 SphK1/S1P 信号通路对 MIRI 大鼠发挥保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SD 大鼠,雄性,无特定病原体,7 周龄,体质量(200 \pm 20) g,购自河南省实验动物中心[许可证号:SCXK(豫)2022-0001]。将大鼠在 24~26 $^{\circ}$ C、湿度 50%~60% 的环境中适应性饲养 1 周,且 12 h 光照和 12 h 黑暗交替。本研究经动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器

阿芬太尼注射液(0.5 g/L,国药准字 H20203054)购于宜昌人福药业有限责任公司;SphK1 激动剂佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)(HY-18739)购于美国 Med Chem Express 公司;2% 氯化三苯基四唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色液(R20618)购于上海源叶生物公司;苏木精-伊红(hematoxylineosin, HE)染色液(R2855)购于北京康瑞纳生物公司;TUNEL 染色检测凋亡试剂盒(FY600017)购于上海弗元生物公司;丙二醛(malonaldehyde, MDA)(EKF60082)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)(EKU09415)酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒及 SphK1 兔多克隆抗体(PAB10391)均购于艾美捷科技公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)(E-EL-R2856c)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)(E-EL-R0015c)、IL-1 β (E-EL-R0012c)ELISA 检测试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物公司;S1P ELISA 检测试剂盒(JL20731)购于上海江莱生物公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(AP31L014)购于上海和元李记生物公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(PC0020)购于北京索莱宝科技公司;SpectraMax Gemini EM 荧光酶标仪购于上海美谷分子仪器公司;ckx53 倒置荧光显微镜购于日本奥林巴斯;ChemiDoc 全能型凝胶成像仪购于美

国伯乐。

1.3 MIRI 大鼠模型的建立

将所有大鼠在造模前禁食不禁水 12 h, 然后参照文献^[12]方法先通过腹膜内注射 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 进行胸骨切开术, 露出心脏后结扎冠状动脉左前降支 30 min, 该过程用标准导联 II 导联心电图全程监测, 当心电图显示 ST 段抬高时, 表明缺血发生。然后去除结扎线, 恢复血流, 再灌注 120 min 后, 心电图 ST 段下降 50% 及以上, 表明模型复制成功。假手术组大鼠接受开胸手术, 但不结扎冠状动脉。

1.4 动物分组与处理

将所有大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为假手术组、模型组、阳性药物组 (复方丹参组)、阿芬太尼低剂量组、阿芬太尼高剂量组、阿芬太尼高剂量 + SphK1 激动剂组 (阿芬太尼 + PMA 组), 每组 20 只。在大鼠再灌注前 30 min, 阳性药物组大鼠给予灌胃 300 mg/kg 的复方丹参混悬液^[13], 根据预实验结果, 阿芬太尼低、高剂量组大鼠分别腹腔注射 50 μ g/kg、100 μ g/kg 的阿芬太尼, 阿芬太尼 + PMA 组大鼠腹腔注射 100 μ g/kg 的阿芬太尼 5 min 后, 再次注射 10 μ g/kg 的 SphK1 激动剂 PMA^[14]。

1.5 全自动生物化学分析仪检测血清乳酸脱氢酶、肌酸激酶和谷草转氨酶活性

造模成功后, 将大鼠用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 然后通过腹主动脉采血至离心管中, 在 4 $^{\circ}$ C 下, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清冻存至 -20 $^{\circ}$ C 备用。取部分血清用全自动生物化学分析仪检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatinase, CK) 和谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 的活性。

1.6 TTC 检测大鼠心肌梗死面积

采血结束后断颈处死大鼠, 解剖并取出心脏用无菌 PBS 清洗。每组随机选取 5 个心脏组织横向切成厚度 2 mm 的切片, 然后用 TTC 染液在 37 $^{\circ}$ C 下染色 15 min。剩余心脏组织均冻存至 -80 $^{\circ}$ C。将染色后的切片 PBS 漂洗后, 整理平整并置于 4% 甲醛溶液中固定 24 h, 然后进行图像采集并通过 Image-Pro Plus 软件计算梗死面积。白色的心脏组织表示心肌梗死的大小, 而红色部分表示正常组织。

1.7 HE 染色观察大鼠心肌组织形态学特征

在 1.6 中冻存的心肌组织中每组随机选取 5 个, 剪下左心室固定于 4% 多聚甲醛中, 次日进行石蜡包埋和切片。随后用二甲苯、梯度乙醇对切片做

脱蜡水化处理, 脱蜡后的切片 HE 染色 5 min, 充分清洗后中性树脂封片, 光学显微镜观察各心肌组织的病理形态。

1.8 TUNEL 染色检测大鼠心肌细胞凋亡

取 1.7 中的石蜡切片进行脱蜡水化后, 放入 50 μ L TUNEL 反应混合物中, 在 37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 60 min, 然后清洗 3 次, 每次 5 min, 再将切片置于 DAPI 中孵育以检测细胞核, 最后用荧光显微镜观察, 凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数 / 细胞总数 \times 100%。

1.9 ELISA 检测血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 S1P 水平

取 1.5 保存的血清, 溶解后利用 ELISA 试剂盒检测血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、S1P 的水平, 所有步骤均参照说明书进行。

1.10 试剂盒测定心肌组织 MDA 含量和 SOD 活性

从 1.6 冻存的心肌组织中每组随机选取 5 个, 加入预冷的 PBS 研磨, 4 $^{\circ}$ C, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清。然后根据试剂盒操作步骤检测心肌组织中 MDA 含量和 SOD 活性。

1.11 Western blot 检测心肌组织 SphK1 蛋白表达

将心肌组织置于 RIPA 裂解缓冲液中, 研磨匀浆, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, BCA 法测定蛋白浓度。然后将提取的蛋白加入上样缓冲液进行煮沸变性, 并通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白并湿转至 PVDF 膜, 将膜封闭在 5% 脱脂牛奶中 1 h, 然后将其与一抗稀释液 (SphK1 抗体稀释倍数 1 : 1 000) 在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 再与羊抗兔 IgG 二抗稀释液 (稀释倍数 1 : 1 000) 在室温下孵育 1 h, 将膜放入显影剂中避光 10 min, 最后置于凝胶成像仪成像, Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.12 统计学分析

用 Graphpad Prism 8.0 软件分析研究数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异性比较采用单因素方差分析, SNK- q 检验用于两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿芬太尼对血清中 LDH、CK 和 AST 活性的影响

相较于假手术组, 模型组 LDH、CK 和 AST 活性分别升高 89.31%、76.08%、89.81% ($P < 0.05$); 相较于模型组, 阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组 LDH 活性分别降低 38.91%、20.33%、36.62%, CK

活性分别降低 32.73%、16.12%、30.49%，AST 活性分别降低 32.90%、17.75%、29.75% ($P < 0.05$)，且阿芬太尼高剂量组与阳性药物组差异无显著性 ($P > 0.05$)；相较于阿芬太尼高剂量组，阿芬太尼+PMA 组 LDH、CK 和 AST 活性分别升高 46.75%、32.60%、30.37% ($P < 0.05$ ，表 1)。

2.2 阿芬太尼对心肌梗死面积的影响

相较于假手术组，模型组大鼠出现心肌梗死，其梗死面积为 (28.37% ± 2.14%) ($P < 0.05$)；相较于模型组，阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组大鼠心肌梗死面积分别减小 75.96%、45.40%、70.88% ($P < 0.05$)，且阿芬太尼高剂量组与阳性药物组差异无显著性 ($P > 0.05$)；相较于阿芬太尼高剂量组，阿芬太尼+PMA 组大鼠心肌梗死面积增加 186.68% ($P < 0.05$ ，图 1)。

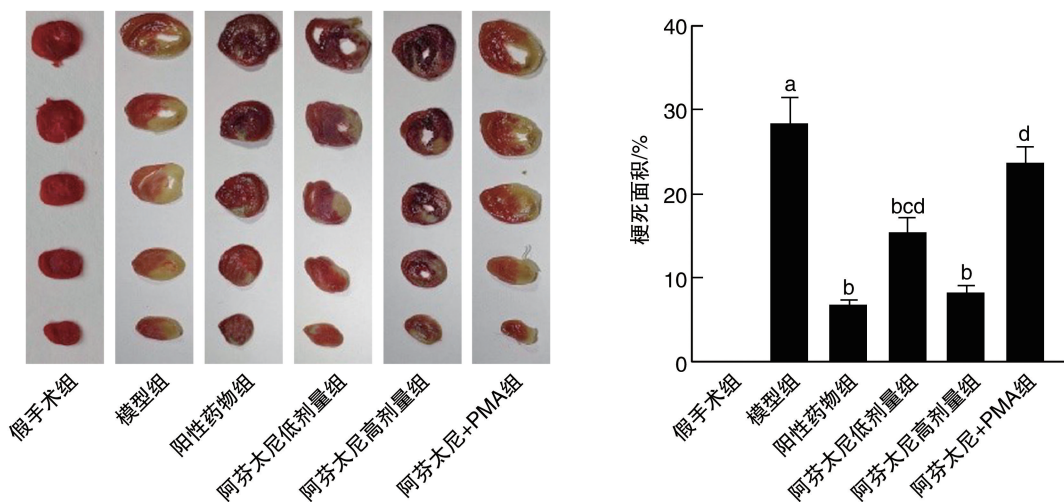


图 1. TTC 染色检测各组大鼠心肌梗死面积 ($n = 5$)

a 为 $P < 0.05$ ，与假手术组比较；b 为 $P < 0.05$ ，与模型组比较；c 为 $P < 0.05$ ，与阳性药物组比较；d 为 $P < 0.05$ ，与阿芬太尼高剂量组比较。

Figure 1. TTC staining was used to detect the myocardial infarction area of rats in each group ($n = 5$)

2.3 阿芬太尼对心肌组织病理形态的影响

假手术组大鼠心肌组织结构未见明显异常，模型组大鼠心肌组织结构异常，肌纤维松散排列，炎性细胞浸润明显；阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组心肌组织结构逐渐清晰，肌纤维整齐排列，炎性细胞浸润减少，损伤程度明显减轻；阿芬太尼+PMA 组大鼠心肌组织损伤比阿芬太尼高剂量组再次加重 (图 2)。

2.4 阿芬太尼对心肌细胞凋亡率的影响

相较于假手术组，模型组细胞凋亡率升高 1460.58% ($P < 0.05$)；相较于模型组，阳性药物组

表 1. 各组大鼠血清中 LDH、CK 和 AST 的活性 ($n = 20$)

分组	LDH	CK	AST
假手术组	246.97 ± 12.58	124.36 ± 8.97	91.06 ± 8.69
模型组	467.53 ± 24.93 ^a	218.97 ± 15.65 ^a	172.84 ± 13.38 ^a
阳性药物组	285.61 ± 15.76 ^b	147.31 ± 10.24 ^b	115.97 ± 9.10 ^b
阿芬太尼低剂量组	372.49 ± 18.95 ^{bcd}	183.68 ± 12.16 ^{bcd}	142.16 ± 10.83 ^{bcd}
阿芬太尼高剂量组	296.32 ± 21.37 ^b	153.72 ± 11.52 ^b	121.42 ± 9.49 ^b
阿芬太尼+PMA 组	434.84 ± 23.15 ^d	203.83 ± 17.24 ^d	158.29 ± 12.87 ^d

注：a 为 $P < 0.05$ ，与假手术组比较；b 为 $P < 0.05$ ，与模型组比较；c 为 $P < 0.05$ ，与阳性药物组比较；d 为 $P < 0.05$ ，阿芬太尼高剂量组比较。

和阿芬太尼低、高剂量组细胞凋亡率分别降低 81.58%、49.93%、78.35% ($P < 0.05$)，且阿芬太尼高剂量组与阳性药物组差异无显著性 ($P > 0.05$)；相较于阿芬太尼高剂量组，阿芬太尼+PMA 组细胞凋亡率升高 300.95% ($P < 0.05$ ，图 3)。

2.5 阿芬太尼对血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、S1P 水平的影响

相较于假手术组，模型组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、S1P 水平分别增加 235.94%、185.30%、173.61%、165.89% ($P < 0.05$)；相较于模型组，阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组 TNF- α 水平分别降低 62.72%、

26.31%、60.47%，IL-6 水平分别降低 58.69%、31.06%、56.90%，IL-1 β 水平分别降低 57.57%、25.93%、55.02%，S1P 水平分别降低 56.74%、17.60%、53.09% ($P < 0.05$)，且阿芬太尼高剂量组

与阳性药物组差异无显著性 ($P > 0.05$)；相较于阿芬太尼高剂量组，阿芬太尼+PMA 组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、S1P 水平分别增加 122.05%、110.38%、102.81%、95.90% ($P < 0.05$ ，表 2)。

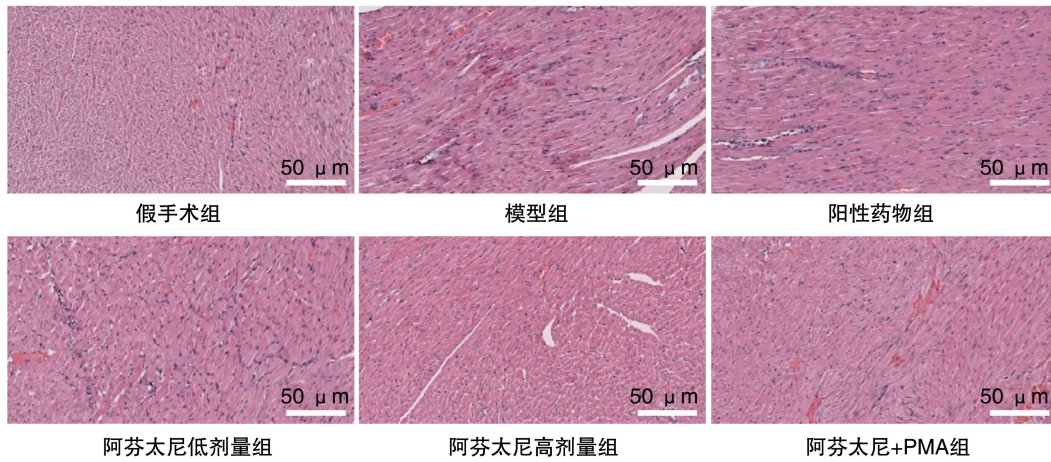


图 2. HE 染色检测各组大鼠心肌组织的病理变化 ($n = 5$)

Figure 2. Pathological changes of myocardial tissue in rats of each group were detected by HE staining ($n = 5$)

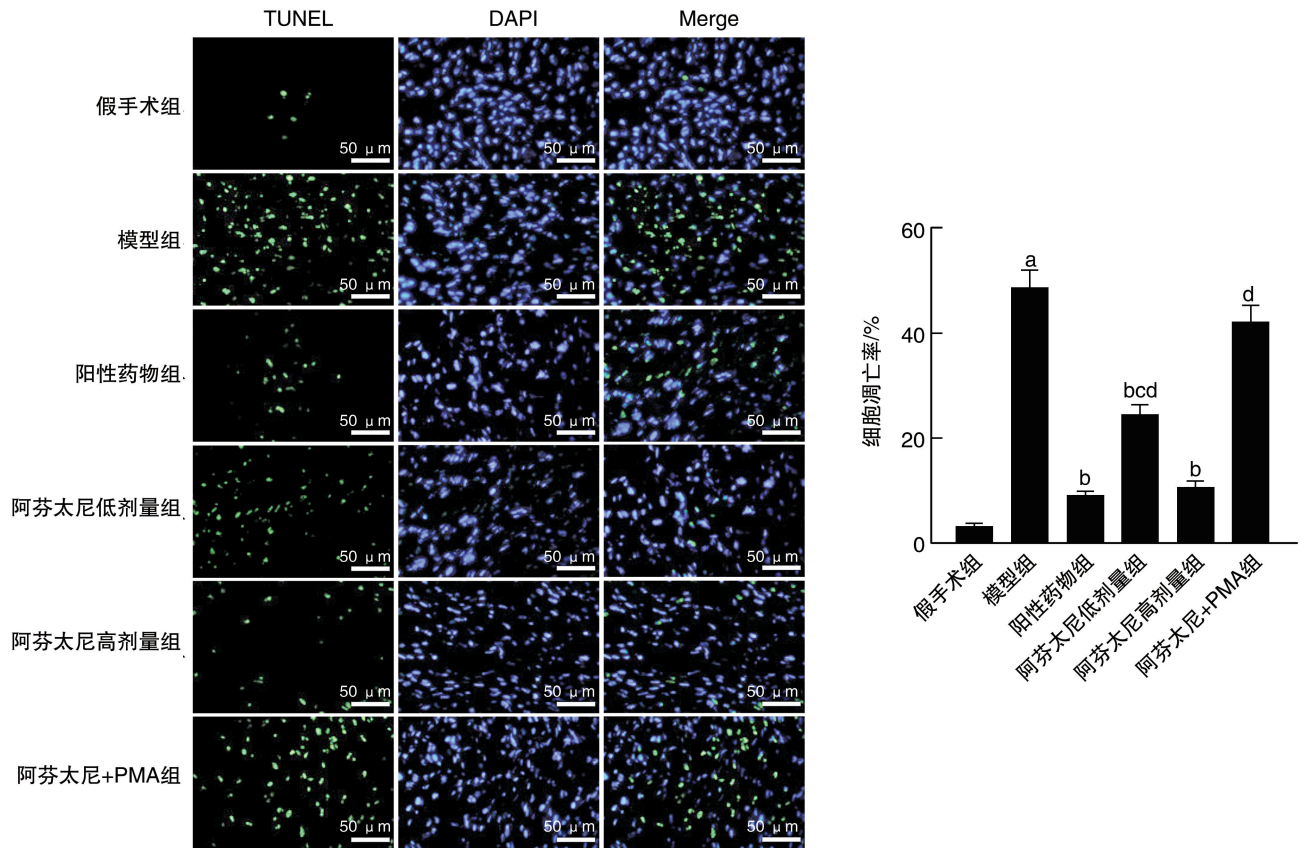


图 3. TUNEL 染色检测各组大鼠心肌细胞凋亡情况 ($n = 5$)

a 为 $P < 0.05$ ，与假手术组比较；b 为 $P < 0.05$ ，与模型组比较；c 为 $P < 0.05$ ，与阳性药物组比较；d 为 $P < 0.05$ ，与阿芬太尼高剂量组比较。

Figure 3. TUNEL staining was used to detect myocardial apoptosis in rats of each group ($n = 5$)

表 2. 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β、S1P 的水平 (n=20)

Table 2. Levels of TNF-α, IL-6, IL-1β and S1P in serum of rats in each group (n=20) 单位:ng/L

分组	TNF-α	IL-6	IL-1β	S1P
假手术组	25.68±2.11	41.51±3.54	35.62±2.81	31.46±2.47
模型组	86.27±5.78 ^a	118.43±7.96 ^a	97.46±6.12 ^a	83.65±5.21 ^a
阳性药物组	32.16±2.57 ^b	48.92±3.81 ^b	41.35±3.21 ^b	36.19±2.65 ^b
阿芬太尼低剂量组	63.57±4.21 ^{bcd}	81.65±6.57 ^{bcd}	72.19±5.40 ^{bcd}	68.93±4.72 ^{bcd}
阿芬太尼高剂量组	34.10±2.86 ^b	51.04±4.25 ^b	43.84±3.52 ^b	39.24±3.50 ^b
阿芬太尼+PMA 组	75.72±5.26 ^d	107.38±7.73 ^d	88.91±6.05 ^d	76.87±4.92 ^d

注:a 为 P<0.05,与假手术组比较;b 为 P<0.05,与模型组比较;c 为 P<0.05,与阳性药物组比较;d 为 P<0.05,与阿芬太尼高剂量组比较。

2.6 阿芬太尼对心肌组织中 MDA 含量和 SOD 活性的影响

相较于假手术组,模型组 MDA 含量增加 286.26%,SOD 活性降低 67.57% (P<0.05);相较于模型组,阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组 MDA 含量分别降低 58.89%、37.77%、53.99%,SOD 活性分别升高 167.23%、85.88%、149.74% (P<0.05),且阿芬太尼高剂量组与阳性药物组差异无显著性 (P>0.05);相较于阿芬太尼高剂量组,阿芬太尼+PMA 组 MDA 含量增加 67.95%,SOD 活性降低 44.99% (P<0.05,表 3)。

表 3. 各组大鼠心肌组织中 MDA 的含量和 SOD 活性 (n=5)

Table 3. MDA content and SOD activity in myocardial tissue of rats in each group (n=5)

分组	MDA/(μmol/g)	SOD/(kU/g)
假手术组	5.97±0.72	42.15±3.24
模型组	23.06±2.23 ^a	13.67±1.43 ^a
阳性药物组	9.48±0.89 ^b	36.53±2.67 ^b
阿芬太尼低剂量组	14.35±1.28 ^{bcd}	25.41±2.13 ^{bcd}
阿芬太尼高剂量组	10.61±1.15 ^b	34.14±2.82 ^b
阿芬太尼+PMA 组	17.82±1.41 ^d	18.78±1.56 ^d

注:a 为 P<0.05,与假手术组比较;b 为 P<0.05,与模型组比较;c 为 P<0.05,与阳性药物组比较;d 为 P<0.05,与阿芬太尼高剂量组比较。

2.7 阿芬太尼对心肌组织中 SphK1 蛋白表达的影响

相较于假手术组,模型组 SphK1 蛋白表达升高 130.23% (P<0.05);相较于模型组,阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组 SphK1 蛋白表达分别降低 41.92%、22.22%、37.88% (P<0.05),且阿芬太尼高剂量组与阳性药物组差异无显著性 (P>0.05);相较于阿芬太尼高剂量组,阿芬太尼+PMA 组 SphK1

蛋白表达升高 43.09% (P<0.05,图 4)。

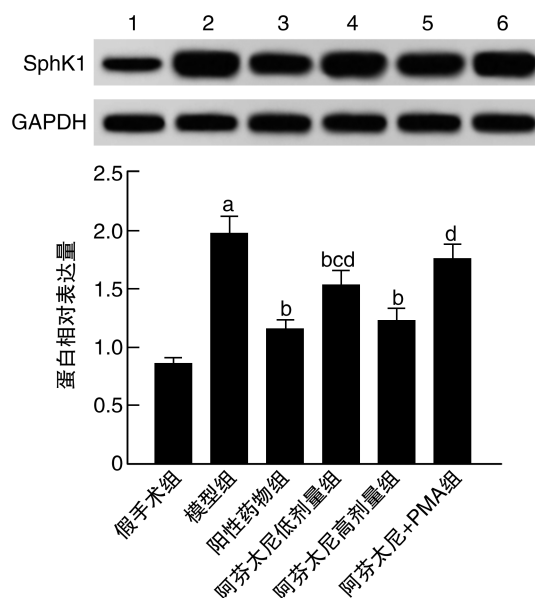


图 4. 各组大鼠心肌组织中 SphK1 蛋白表达 (n=5)

1 为假手术组,2 为模型组,3 为阳性药物组,4 为阿芬太尼低剂量组,5 为阿芬太尼高剂量组,6 为阿芬太尼+PMA 组。

a 为 P<0.05,与假手术组比较;b 为 P<0.05,与模型组比较;c 为 P<0.05,与阳性药物组比较;d 为 P<0.05,与阿芬太尼高剂量组比较。

Figure 4. Expression of SphK1 protein in myocardial tissue of rats in each group (n=5)

3 讨论

MIRI 是指急性冠状动脉闭塞后,再灌注导致缺血本身更严重的心肌损伤,包括缺血诱导损伤和再灌注损伤。血流再灌注可对未受累心肌细胞造成损伤,也可加重受累心肌细胞的损伤^[15]。MIRI 可被描述为心脏修复后明显的结构和功能损伤,其与氧化应激、炎症、凋亡及线粒体功能等多种机制的显著变化密切相关^[16],因此,预防和减轻 MIRI 是

目前临床和基础研究的重点。据了解,阿片类药物不仅具有镇痛、麻醉的作用,也能够通过激活阿片受体发挥心肌保护作用,包括舒芬太尼、瑞芬太尼、羟考酮等合成类药物^[17-18]。阿芬太尼作为一种合成的短效 μ 阿片类激动剂,其引起的呼吸抑制和术后呕吐等现象轻于芬太尼^[19],但其对MIRI的具体作用还尚未了解。因此,本研究通过结扎冠状动脉左前降支建立MIRI大鼠模型来探讨阿芬太尼在MIRI中的作用,结果显示,模型组大鼠血清中心肌损伤标志物LDH、CK和AST的活性高于假手术组,且心肌梗死面积显著大于假手术组,揭示模型组大鼠出现心肌损伤,模型复制成功。已知复方丹参是临床上用于防治MIRI的中成药,其作用机制与抗炎、抗氧化应激以及抗凋亡等有关,因此将其作为阳性药物对照^[13]。研究结果发现,阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组大鼠血清中心肌损伤标志物LDH、CK和AST的活性较模型组均降低,心肌梗死面积也较模型组减小,且阿芬太尼高剂量组与阳性药物组差异无统计学意义。进一步观察心肌组织的病理形态发现,阳性药物组和阿芬太尼各剂量组中心肌组织结构逐渐清晰,肌纤维整齐排列,炎性细胞浸润减少,损伤程度明显轻于模型组,心肌细胞凋亡率也较模型组降低。揭示了阿芬太尼与复方丹参的作用保持一致,均能够抑制MIRI大鼠的心肌损伤,减轻心肌细胞凋亡。

越来越多的证据表明,MIRI能够导致心肌氧化应激和炎症,最终引发心肌细胞凋亡,炎症可能是MIRI整个病理生理过程中的一个重要因素,缺血后不久,大量炎性细胞渗入病变区域,TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的释放会加重心肌损伤,导致细胞凋亡^[20]。除此之外,氧化应激也是导致MIRI的主要病理过程,ROS的过度产生以及清除ROS能力的降低会进一步导致心肌细胞凋亡^[3]。膜脂质过氧化反应的最终产物MDA是反映脂质过氧化反应的程度,SOD是抗氧化酶类的重要成员,是生物体内有效清除ROS的主要酶之一,两者均为氧化应激的主要标志物^[21]。本研究结果发现,阳性药物组和阿芬太尼低、高剂量组大鼠血清中促炎因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 含量及心肌组织中MDA含量较模型组降低,SOD活性较模型组升高。揭示阿芬太尼可以抑制MIRI大鼠的心肌炎症反应和氧化应激,进而减轻心肌损伤和细胞凋亡,但其中的作用机制还需深入了解。

据了解,SphK1是鞘脂代谢中的关键限速酶和细胞内信号转导酶,作为一种脂质激酶,SphK1将

Sph磷酸化为具有生物活性的S1P,S1P通过结合G蛋白偶联受体成员S1P受体(S1P receptor,S1PR)激活细胞内信号^[22]。SphK1/S1P途径可由TNF- α 、IL-1 β 等多种细胞因子和生长因子激活,异常表达的SphK1及其产物S1P参与炎症反应的调节和多种免疫细胞的功能管理^[23]。研究已经证明SphK1/S1P信号通路被抑制后能够改善心肌梗死大鼠的炎症反应和心肌纤维化,同时也可以保护脑I/R诱导的神经元细胞损伤^[24-25]。本研究结果显示,MIRI模型大鼠SphK1和S1P的水平均升高,而阳性药物组和阿芬太尼组SphK1和S1P水平降低,表明阿芬太尼能够抑制SphK1/S1P信号通路的激活。然而为了进一步探讨SphK1/S1P通路在阿芬太尼治疗MIRI中的作用,本研究在阿芬太尼治疗的同时加入SphK1激活剂进行干预,结果发现SphK1激活剂逆转了高剂量阿芬太尼对MIRI大鼠心肌组织损伤的缓解作用。揭示了阿芬太尼对MIRI大鼠的保护机制可能是通过抑制SphK1/S1P信号通路,进而减轻氧化应激和炎症反应。

综上所述,阿芬太尼可能通过抑制SphK1/S1P信号通路对MIRI大鼠发挥保护作用。本研究为缓解再灌注引起的损伤提供了新的药物和理论依据。但关于阿芬太尼在MIRI临床上的应用以及如何使该药物发挥有效的治疗作用还有待进一步深入探索。

[参考文献]

- [1] LI T, TAN Y, OUYANG S, et al. Resveratrol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuating ferroptosis[J]. *Gene*, 2022, 808: 145968.
- [2] 钟小兰, 班努·库肯, 景江新. 过表达Bax抑制剂1通过抑制线粒体通透性转换孔开放及细胞凋亡减轻心肌缺血再灌注损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(3): 222-231.
ZHONG X L, BANNU · KUKEN, JING J X. Overexpression of Bax inhibitor-1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening and apoptosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(3): 222-231.
- [3] LV D Y, LUO M H, CHENG Z, et al. Tubeimoside I ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5577019.
- [4] LIU K, SUN T, LUAN Y, et al. Berberine ameliorates erectile dysfunction in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus through the attenuation of apoptosis by inhibiting the SphK1/S1P/S1PR2 and MAPK pathways[J].

- Andrology, 2022, 10(2): 404-418.
- [5] YIN S C, MIAO Z F, TAN Y E, et al. SphK1-induced autophagy in peritoneal mesothelial cell enhances gastric cancer peritoneal dissemination[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(4): 1731-1743.
- [6] CHEN L, LIN B, YANG J R, et al. Hydrogen sulfide alleviates ischemia induced liver injury by repressing the SphK1/SIP pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2023, 11(2): 73.
- [7] LV M H, LI S, JIANG Y J, et al. The SphK1/SIP pathway regulates angiogenesis via NOS/NO synthesis following cerebral ischemia-reperfusion[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(5): 538-548.
- [8] FERRAZ GONÇALVES J A, SOUSA F, ALVES L, et al. Use of alfentanil in palliative care[J]. *Pharmacy (Basel)*, 2020, 8(4): 240.
- [9] WU Q L, SHANG Y, BAI Y L, et al. Sufentanil preconditioning protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via miR-125a/DRAM2 axis[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(4): 383-391.
- [10] ZHANG D Y, WANG Q, QIU X B, et al. Remifentanil protects heart from myocardial ischaemia/reperfusion (I/R) injury via miR-206-3p/TLR4/NF-κB signalling axis[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(2): 282-291.
- [11] 王静, 杨路宗, 燕枫. 阿芬太尼对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤及 VEGFA/Ang-1 通路的影响[J]. *中国药师*, 2021, 24(5): 845-849.
- WANG J, YANG L Z, YAN F. Effects of alfentanil on myocardial ischemia-reperfusion injury and VEGFA/Ang-1 pathway in diabetic rats[J]. *China Pharm*, 2021, 24(5): 845-849.
- [12] ZHAO W, WU Y Y, YE F H, et al. Tetrandrine ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through miR-202-5p/TRPV2[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8870674.
- [13] 金少举, 黄亚男, 李盘欣, 等. 荔枝草水提物预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏的保护作用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2022, 41(4): 238-244.
- JIN S J, HUANG Y N, LI P X, et al. Protective effects of water extract of *Salvia plebeian* R. Br. preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Chin J New Drugs Clin Remed*, 2022, 41(4): 238-244.
- [14] HOU S, SHEN P P, ZHAO M M, et al. Mechanism of mitochondrial connexin 43's protection of the neurovascular unit under acute cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 679.
- [15] 韦天文, 杜冲, 孙嘉腾, 等. MNK2 通过激活 cAMP/PKA-CREB 通路促进小鼠心肌缺血再灌注损伤后修复功能及机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(5): 386-394.
- WEI T W, DU C, SUN J T, et al. The function and mechanism research of mitogen-activated protein kinase-interacting kinase-2 in promoting cardiac repair after ischemia/reperfusion injury in mice by activating cAMP/PKA-CREB pathway[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(5): 386-394.
- [16] RAMLI F F, ALI A, IBRAHIM N. Molecular-signaling pathways of ginsenosides Rb in myocardial ischemia-reperfusion injury: a mini review[J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(1): 65-73.
- [17] PALOMINO J, ECHAVARRIA R, FRANCO-ACEVEDO A, et al. Opioids preconditioning upon renal function and ischemia-reperfusion injury: a narrative review[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55(9): 522.
- [18] 易菁, 段宏伟, 曾庆繁, 等. 心肌缺血再灌注损伤中阿片受体的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(5): 835-837.
- YI J, DUAN H W, ZENG Q F, et al. Research progress of opioid receptors in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *The J Pract Med*, 2019, 35(5): 835-837.
- [19] ZHAO N, ZENG J, FAN L, et al. The effect of alfentanil on emergence delirium following general anesthesia in children: a randomized clinical trial[J]. *Pediatr Drugs*, 2022, 24(4): 413-421.
- [20] ZHANG Q H, PENG Y F, LIU J Y, et al. 7-Hydroxyflavone alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by regulating inflammation[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5371.
- [21] TIAN H, XIONG Y H, ZHANG Y, et al. Activation of NRF2/FPN1 pathway attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats by regulating iron homeostasis and ferroptosis[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 27(2): 149-164.
- [22] BU Y H, WU H, DENG R, et al. Therapeutic potential of SphK1 inhibitors based on abnormal expression of SphK1 in inflammatory immune related-diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 733387.
- [23] GONG W Y, LI J, CHEN W Y, et al. Resveratrol inhibits lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat glomerular mesangial cells by SphK1/S1P2/NF-κB pathway[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 4495-4505.
- [24] WU X K, XU J W, LI X Y, et al. Inhibition of SphK1/S1P signaling pathway alleviates fibrosis and inflammation of rat myocardium after myocardial infarction[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 5985375.
- [25] CONG D W, YU Y L, MENG Y, et al. Dexmedetomidine (Dex) exerts protective effects on rat neuronal cells injured by cerebral ischemia/reperfusion via regulating the SphK1/S1P signaling pathway[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2023, 32(1): 106896.

(此文编辑 许雪梅)