

· 基础研究 ·

## PARP-1在右美托咪定减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用

赵欣, 沈江, 洪涛, 李鑫, 高操, 徐青荣\*

苏州大学附属第三医院(常州市第一人民医院)麻醉科, 江苏 常州 213003

**[摘要]** 目的:评价聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1(PARP-1)在右美托咪定减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。方法:健康清洁级雄性成年SD大鼠48只,体重200~240 g,8~12周龄,采用随机数字表法分为3组( $n=16$ ):假手术组(S组)、缺血再灌注组(I/R组)和缺血再灌注+右美托咪定组(I/R+Dex组)。S组仅开胸穿线不结扎;I/R组和I/R+Dex组采用结扎冠状动脉左前降支30 min恢复再灌注120 min的方法制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型;I/R+Dex组于再灌注前15 min腹腔注射右美托咪定5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,S组和I/R组给予等容量生理盐水。分别于缺血前( $T_0$ )、缺血30 min( $T_1$ )、再灌注60 min( $T_2$ )和再灌注120 min( $T_3$ )时观察并记录平均动脉压(MAP)、心率(HR)和心率收缩压乘积(RPP);再灌注120 min时取左心室组织,称重并计算心肌梗死体积比率;采用Western blot法检测心肌组织PARP-1活化产物PAR和凋亡相关蛋白Caspase-3的表达;采用ELISA法测定心肌组织中TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量。结果:与 $T_0$ 时比较,I/R组和I/R+Dex组在 $T_1$ ~ $T_3$ 时MAP、HR和RPP水平降低( $P < 0.05$ );与S组比较,I/R组和I/R+Dex组在 $T_1$ ~ $T_3$ 时MAP、HR和RPP水平降低,梗死体积比率、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量升高,PAR和Caspase-3表达水平上调( $P < 0.05$ );与I/R组比较,I/R+Dex组在 $T_1$ 、 $T_2$ 时MAP、HR和RPP水平降低, $T_3$ 时水平升高,梗死体积比率、TNF- $\alpha$ 和IL-6含量降低,PAR和Caspase-3表达水平下调( $P < 0.05$ )。结论:右美托咪定可减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤,机制与降低PARP-1活化抑制炎症和凋亡有关。

**[关键词]** 右美托咪定;心肌再灌注损伤;聚ADP核糖聚合酶类;凋亡;炎症介导素类

**[中图分类号]** R364.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)12-1723-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20191204

## Role of PARP - 1 in attenuation of myocardial ischemia - reperfusion injury treated by dexmedetomidine in rats

Zhao Xin, Shen Jiang, Hong Tao, Li Xin, Gao Chao, Xu Qingrong\*

Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Soochow University (First People's Hospital of Changzhou), Changzhou 213003, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to evaluate the role of poly(ADP-ribose)polymerase-1(PARP-1) in attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury treated by dexmedetomidine in rats. **Methods:** Forty eight healthy male Sprague Dawley rats, 8~12 weeks old, weighing 200~240 g were selected. The rats were then randomly divided into 3 groups ( $n=16$ ): Sham operation group (S group), lung ischemia-reperfusion group (I/R group) and I/R+dexmedetomidine group (I/R+Dex group). In S group, the anterior descending branch was only exposed but not ligated; Myocardial I/R was induced by occlusion of anterior descending branch of left coronary artery for 30 min followed by 120 min of reperfusion in I/R group and I/R + Dex group. Dexmedetomidine 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  were injected intraperitoneally 15 min before reperfusion in I/R+Dex group while physiological saline was injected in S and I/R groups. The mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and heart rate systolic blood pressure product (RPP) were observe and recorded before ischemia ( $T_0$ ), 30 min of ischemia ( $T_1$ ) and reperfusion of 60 min ( $T_2$ ) and 120 min reperfusion ( $T_3$ ). At the end of 120 min reperfusion, hearts were removed for determination of the myocardial infarct size in the left ventricular myocardial tissues. The expression of PARP-1 activity markers (PAR) and apoptosis related protein Caspase-3 in myocardial tissue were investigated by Western blot. TNF- $\alpha$  and IL-6 levels were examined by ELISA. **Results:** Compared with the time point of  $T_0$ , the MAP, HR and RPP were significantly decreased at time point of  $T_1$ - $T_3$  in I/R group and I/R + Dex group ( $P < 0.05$ ). Compared with S group, MAP, HR and RPP were significantly

**[基金项目]** 常州市卫生计生委指导性科技项目(WZ201810)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qingrongx@163.com

decreased at time point of  $T_1$ - $T_3$ , myocardial infarct size, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels, PAR and Caspase-3 expressions were increased in I/R group and I/R+Dex group ( $P < 0.05$ ). Compared with I/R group, MAP, HR and RPP were significantly decreased at time point of  $T_1$ - $T_2$  while increased at  $T_3$ , myocardial infarct size, TNF- $\alpha$  and IL-6 levels, PAR and Caspase-3 expressions were decreased in I/R+Dex group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Dexmedetomidine can attenuate myocardial ischemia-reperfusion injury. The mechanism may be associated with reducing the activation of PARP-1, and then inhibit inflammation and apoptosis in myocardial tissue.

[Key words] dexmedetomidine; myocardial reperfusion injury; poly(ADP-ribose) polymerases; apoptosis; inflammation mediators

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(12): 1723-1727]

心肌缺血再灌注损伤是心肌梗死血运重建术、体外循环手术、心肺复苏术等临床常见的病理生理过程<sup>[1]</sup>,如何减轻损伤一直是研究的热点。右美托咪定是一种新型的镇静药物,可产生自然睡眠的镇静效果且不抑制呼吸,在临床麻醉中得到了广泛应用。研究表明,右美托咪定可减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤<sup>[2-3]</sup>,明确其机制对临床研究有重要意义。聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1(PARP-1)存在于多数真核细胞中,生理状态下发挥修复损伤DNA的作用。研究发现,应激状态下PARP-1过度激活可促进心肌缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>。本研究拟评价PARP-1在右美托咪定减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用,为明确其机制提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

盐酸右美托咪定注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司);戊巴比妥钠(Merck公司,德国);动物呼吸机(ALC-V9,上海奥尔科特生物科技有限公司);生物信号采集处理系统(MedLab-U/4C501H,南京美易科技公司);伊文思蓝(Sigma公司,美国);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,Sigma公司,美国);垂直电泳仪(Bio-Rad公司,美国);Image J软件(National Institutes of Health公司,美国);小鼠抗大鼠PAR-1抗(Enzo Life Sciences公司,美国);兔抗大鼠Caspase-3和actin-1抗(Abcam公司,英国);HRP标记山羊抗小鼠和抗兔二抗(江苏碧云天生物技术研究);ELISA试剂盒(Sigma公司,美国)。

### 1.2 方法

本研究获得苏州大学附属第三医院实验动物中心伦理委员会批准。健康清洁级雄性成年SD大鼠48只,体重200~240 g,8~12周龄。于术前1周购自苏州大学动物实验中心,饲养温度25℃,湿度50%,昼夜交替,术前禁食12 h,不禁水。采用随机数字表法分为3组,每组16只:假手术组(S组)、缺

血再灌注组(I/R组)和缺血再灌注+右美托咪定组(I/R+Dex组)。S组仅开胸穿线不结扎;I/R组和I/R+Dex组采用结扎冠状动脉左前降支30 min恢复再灌注120 min的方法制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型;I/R+Dex组于再灌注前15 min腹腔注射右美托咪定5  $\mu$ g/kg,S组和I/R组给予等容量生理盐水。

#### 1.2.1 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的制备

参考文献[5],腹腔注射戊巴比妥钠溶液50 mg/kg麻醉大鼠后固定于手术台上,接心电图机,右侧颈内动静脉穿刺置管监测血压和给药,气管切开插管后接小动物呼吸机(频率55次/min,潮气量2 mL/100 g)。开胸,于冠状动脉左前降支起始0.1~0.2 cm处以6-0无损伤缝合线穿线,平稳15 min后,用一硅胶管垫于血管和缝合线之间,结扎,缺血30 min后再灌注120 min。以结扎线远端心肌颜色发绀,心电图表现为R波高耸或ST段抬高为缺血成功标志;以松开结扎线恢复灌注,缺血部位心肌颜色恢复,抬高的ST段下降为再灌注成功标志。

#### 1.2.2 血流动力学指标的监测

分别于缺血前( $T_0$ )、缺血30 min( $T_1$ )、再灌注60 min( $T_2$ )和再灌注120 min( $T_3$ )时观察并记录平均动脉压(MAP)、心率(HR)和心率收缩压乘积(RPP)。

#### 1.2.3 心肌梗死体积比率的检测

各组随机选取8只大鼠,再灌注120 min末,再次阻断冠状动脉,通过颈内静脉快速注射1 mL 5%伊文氏蓝溶液使正常未缺血区域蓝染。迅速剪断大血管取出心脏并分离出左心室,用干冰速冻5 min后将其分割成6块2 mm厚的组织块。采用TTC染色法染色后,于4%多聚甲醛中过夜固定。取出心肌组织,吸干表面的水分后,置于立式显微镜下分成正常(蓝染区域)、缺血未梗死区(TTC染色后红色区域)和缺血梗死区(TTC染色后灰白色区域)3个部分。称重,分别计算缺血体积比率(缺血体积比率=缺血区心肌质量/整体质量 $\times$ 100%)和梗死体积

比率(梗死体积比率=梗死区质量/缺血区质量×100%)。

#### 1.2.4 Western blot法检测心肌组织PARP-1活化产物PAR和凋亡相关蛋白Caspase-3的表达

各组取余8只大鼠,再灌注120 min末,处死大鼠,分离左心室心前区心肌,-80℃保存备用。取组织,按每10 mg组织加200 μL裂解液(RIPA:PMSF=99:1),超声裂解,取上清,BCA法测定蛋白浓度,95℃变性5 min,-20℃冻存。上样量为40 μg,电泳后转膜。脱脂奶粉溶液室温封闭1 h后分别加入PAR抗体、Caspase-3抗体和actin抗体(1:1 000),4℃孵育过夜,清洗后,加入相应二抗(1:3 000),室温下摇荡孵育1 h后显色曝光。分析目标条带,以目的蛋白与内参蛋白灰度值比值反映目的蛋白表达水平。

#### 1.2.5 测定心肌组织TNF-α和IL-6的含量

再灌注结束后,收集大鼠心肌组织,剪碎研磨后4℃下制成匀浆(浓度为10%),离心后取上清,按照试剂盒说明采用ELISA法测定心肌组织中TNF-α和IL-6的含量。

#### 1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),均数间多重比较通过Tukey检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠血流动力学指标的比较

各组大鼠在 $T_0$ 时MAP、HR和RPP差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与 $T_0$ 时比较,I/R组和I/R+Dex组在 $T_1 \sim T_3$ 时MAP、HR和RPP水平降低( $P < 0.05$ );与S组比较,I/R组和I/R+Dex组在 $T_1 \sim T_3$ 时MAP、HR和RPP水平降低( $P < 0.05$ );与I/R组比较,I/R+Dex组在 $T_1$ 、 $T_2$ 时MAP、HR和RPP水平降低, $T_3$ 时水平升高( $P < 0.05$ ,表1)。

### 2.2 各组大鼠心肌梗死体积比率的比较

表1 各组大鼠不同时点血流动力学指标的比较

Table 1 Comparison of hemodynamic parameters at different time points in each group

组别	$(n=16, \bar{x} \pm s)$			
	$T_0$	$T_1$	$T_2$	$T_3$
MAP(mmHg)				
S组	129 ± 16	121 ± 14	113 ± 14	116 ± 16
I/R组	125 ± 19	102 ± 11 <sup>ab</sup>	96 ± 14 <sup>ab</sup>	73 ± 10 <sup>ab</sup>
I/R+Dex组	123 ± 13	72 ± 14 <sup>abc</sup>	77 ± 9 <sup>abc</sup>	89 ± 13 <sup>abc</sup>
HR(次/min)				
S组	387 ± 29	382 ± 43	386 ± 48	391 ± 37
I/R组	396 ± 41	355 ± 31 <sup>ab</sup>	357 ± 37 <sup>ab</sup>	308 ± 53 <sup>ab</sup>
I/R+Dex组	381 ± 35	314 ± 29 <sup>abc</sup>	334 ± 57 <sup>abc</sup>	358 ± 34 <sup>abc</sup>
RPP (mmHg/min×103)				
S组	49 ± 6	48 ± 7	46 ± 7	47 ± 8
I/R组	51 ± 8	41 ± 7 <sup>ab</sup>	39 ± 6 <sup>ab</sup>	29 ± 6 <sup>ab</sup>
I/R+Dex组	48 ± 9	31 ± 5 <sup>abc</sup>	33 ± 6 <sup>abc</sup>	38 ± 4 <sup>abc</sup>

与 $T_0$ 时比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与S组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与I/R组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

各组大鼠心肌缺血体积比率差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与S组比较,I/R组和I/R+Dex组心肌梗死体积比率升高( $P < 0.05$ );与I/R组比较,I/R+Dex组心肌梗死体积比率降低( $P < 0.05$ ,图1,表2)。

### 2.3 各组大鼠心肌组织PAR和Caspase-3表达水平、TNF-α和IL-6含量的比较

与S组比较,I/R组和I/R+Dex组PAR和Caspase-3表达水平上调,TNF-α和IL-6含量升高( $P < 0.05$ );与I/R组比较,I/R+Dex组PAR和Caspase-3表达水平下调,TNF-α和IL-6含量降低( $P < 0.05$ ,图2,表3)。

## 3 讨论

本研究参照文献[5]通过缺血30 min再灌注120 min的方法制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,模型稳定,成功率高。本研究结果显示,与C组比较,I/R组和I/R+Dex组心肌梗死体积比率升高,表

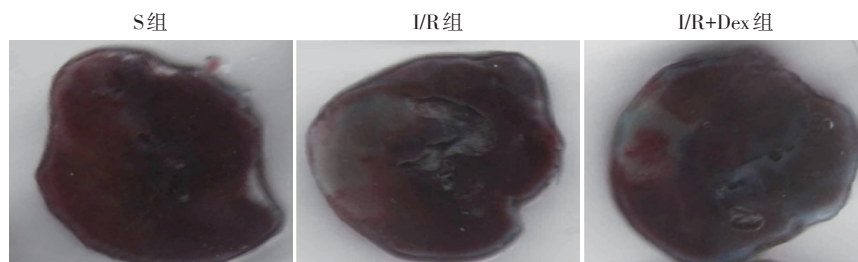


图1 各组大鼠心肌梗死体积

Figure 1 Volume of myocardial infarction in each group

表2 各组大鼠心肌梗死体积比率的比较

Table 2 Comparison of volume ratio of myocardial infarction in each group (% ,  $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	心肌缺血体积比率	心肌梗死体积比率
S组	40.7 ± 4.1	2.6 ± 0.8
I/R组	39.4 ± 3.2	51.4 ± 11.3 <sup>a</sup>
I/R+Dex组	40.1 ± 2.3	35.7 ± 9.1 <sup>ab</sup>

与S组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与I/R组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05。

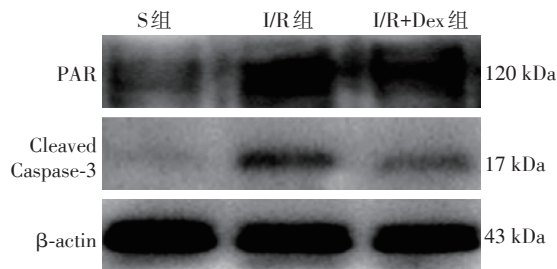


图2 各组 Western blot 检测结果

Figure 2 Western blot results in each group

表3 各组 PAR、Caspase-3、TNF-α 和 IL-6 表达水平的比较

Table 3 Comparison of PAR, caspase-3, TNF-α and IL-6 expression levels in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n=8)

组别	PAR (%)	Caspase-3 (%)	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
S组	0.47 ± 0.16	0.21 ± 0.09	39 ± 7	82 ± 11
I/R组	1.83 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.21 <sup>a</sup>	101 ± 31 <sup>a</sup>	201 ± 37 <sup>a</sup>
I/R+Dex组	1.04 ± 0.17 <sup>ab</sup>	0.44 ± 0.13 <sup>ab</sup>	79 ± 17 <sup>ab</sup>	132 ± 26 <sup>ab</sup>

与S组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与I/R组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05。

明缺血再灌注导致了心肌损伤,模型制备成功。此外,结果显示,与S组比较,I/R组和I/R+Dex组在T<sub>1</sub>~T<sub>3</sub>时MAP、HR和RPP水平降低,考虑是损伤的心肌失去正常功能,心脏各部分舒张和收缩功能不协调,射血分数降低,心输出量降低,此改变加重心肌损伤,出现恶性循环,进一步表明模型制备成功。

右美托咪定临床常用剂量为0.5~1.0 μg/kg,泵注10 min,依据等效剂量换算关系(临床剂量=0.162×大鼠剂量),计算得出大鼠给药剂量为3.1~6.2 μg/kg。同时,有研究发现右美托咪定5 μg/kg具有显著心肌保护作用<sup>[6]</sup>,因此本研究选择此剂量给药。参照文献<sup>[7]</sup>于再灌注前15 min腹腔注射右美托咪定,结果显示,与I/R组比较,I/R+Dex组在T<sub>3</sub>时MAP、HR和RPP水平升高,心肌梗死体积比率降低,表明右美托咪定减轻了大鼠心肌缺血再灌注损伤。此外,结果显示,与I/R组比较,I/R+Dex组在T<sub>1</sub>,T<sub>2</sub>时MAP、HR和RPP水平降低。黄强等<sup>[8]</sup>研究表明大鼠MAP不小于60 mmHg时对心脑血管组织灌注影响较小,病理损伤轻微。本研究I/R+Dex组最低

MAP为72 mmHg,因此右美托咪定未引起低灌注导致的大鼠心肌组织损伤,进一步表明了右美托咪定的安全性。同时,右美托咪定通过中枢抗交感作用降低了心率和血压,在再灌注早期减少了心肌做功,维持血流动力学稳定,发挥了保护作用。

PARP-1是一种具有催化活性的蛋白酶,可以修复损伤的DNA,但这种作用具有多面性。当DNA损伤轻微时,PARP-1识别并结合到DNA断裂处,阻止核酸酶降解,维护DNA完整性,同时可防止正常的DNA分子与受损的DNA进行重组<sup>[9]</sup>;当DNA损伤严重时,PARP-1被过度水解活化,导致NAD<sup>+</sup>/ATP大量消耗,细胞能量大量耗竭而死亡<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,与S组比较,I/R组PAR表达水平上调,表明缺血再灌注使得PARP-1激活导致了大鼠心肌损伤,与之前的研究结果相符<sup>[11]</sup>。结果显示,与I/R组比较,I/R+Dex组PAR表达水平下调,表明右美托咪定减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤与抑制PARP-1激活有关。

PARP-1对细胞凋亡和炎症反应具有重要的调控作用。凋亡是心肌缺血再灌注损伤后重要的病理生理改变,其凋亡过程多数依赖凋亡蛋白Caspase的激活,而Caspase-3是最主要的终末剪切酶<sup>[12]</sup>。炎症反应与缺血再灌注后心肌损伤的发生与发展关系密切。TNF-α是免疫反应的始动因子,可促进细胞间黏附分子、白介素的表达释放,级联放大炎症损伤效应,反应炎症反应程度<sup>[13]</sup>。IL-6由巨噬细胞、T细胞和单核细胞等产生,在损伤早期可快速高表达,介导心肌重构和心功能不全,促进炎症反应<sup>[14]</sup>。因此,本研究选择Caspase-3、TNF-α和IL-6作为凋亡和炎症反应指标进行研究。结果显示,与S组比较,I/R组Caspase-3表达水平上调,TNF-α和IL-6含量升高,表明心肌缺血再灌注损伤与诱导细胞凋亡和炎症反应有关。给予右美托咪定后,与I/R组比较,I/R+Dex组Caspase-3表达水平下调,TNF-α和IL-6含量降低,表明右美托咪定通过抑制凋亡和炎症反应减轻了大鼠心肌缺血再灌注损伤。

综上所述,右美托咪定可减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤,机制与降低PARP-1活化抑制炎症和凋亡有关。

[参考文献]

[1] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. J Clin Invest, 2013, 123(1):92-100  
[2] Cheng XY, Hu J, Wang Y, et al. Effects of dexmedetomi-

- dine postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats: role of the PI3K/Akt-dependent signaling pathway [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 3071959
- [3] 陆沁源,邵东华. 右美托咪定预处理对缺血再灌注损伤大鼠心肌线粒体功能的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(10): 1198-1201
- [4] Feng W, Jin LY, Xie QY, et al. Eugenol protects the transplanted heart against ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting the inflammatory response and apoptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3464-3470
- [5] Xie H, Xu Q, Jia J, et al. Hydrogen sulfide protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by activating AMP-activated protein kinase to restore autophagic flux [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(3): 632-638
- [6] 苏玲,屠伟峰,陈茜,等. 右美托咪定及其联合舒芬太尼预先给药对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33(5): 622-625
- [7] 李超,朱康生,申军梅,等. mito-KATP通道在右美托咪定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*, 2017, 37(11): 1318-1321
- [8] 黄强,陈自力,李剑. 失血性休克大鼠不同血压时相心脑血管病理改变的研究[J]. *中国急救医学*, 2011, 31(3): 224-226
- [9] de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly (ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7303-7307
- [10] Henning RJ, Bourgeois M, Harbison RD. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors: mechanisms of action and role in cardiovascular disorders [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2018, 18(6): 493-506
- [11] 宋兆峰,杜波季,晓平多. 二磷酸腺苷-核糖聚合酶在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用及其对核转录因子 $\kappa$ B活性和炎症因子表达的调节[J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 12(40): 997-1002
- [12] Liu S, Wu N, Miao J, et al. Protective effect of morin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1379-1390
- [13] He X, Schuchman EH. Ceramide and ischemia/reperfusion injury [J]. *J Lipids*, 2018, 2018: 3646725
- [14] Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, et al. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(1): 26-36

[收稿日期] 2019-04-03



欢迎关注本刊微博、微信公众号!