

度洛西汀对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响及机制

蔡茜茜 徐旭仲

摘要 **目的** 探讨度洛西汀对大鼠心脏缺血再灌注心律失常的影响及机制。**方法** 30 只 Sprague Dawley (SD) 大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、缺血再灌注组 (IR 组) 和度洛西汀组 (Dulo 组)。IR 组大鼠左前降支结扎 30min 后再灌注 120min, Dulo 组大鼠结扎左前降支 30min 前腹腔注射盐酸度洛西汀 40mg/kg, 之后处理同 IR 组, Sham 组仅暴露左前降支, 未行结扎。二导联心电监测并记录 3 组心律失常发生情况, 应用 LabChart8 软件分析心电图参数。Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色对比 IR 组及 Dulo 组大鼠心肌梗死面积。蛋白免疫印迹试验检测各组心脏组织 Akt、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, Erk)、caspase-3、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 1、SOD2 和连接蛋白 43 (connexin 43, Cx 43) 蛋白改变。**结果** 与 IR 组比较, 缺血期 Dulo 组大鼠室性期前收缩次数和室性心动过速次数减少 ($P < 0.05$); 再灌注期 Dulo 组的室性心动过速减少 ($P < 0.05$), 室性期前收缩次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。度洛西汀抑制缺血和再灌注所致校正后 Q-T 间期 (QTc) 的延长 ($P < 0.05$), 并减小心肌梗死面积 ($P < 0.05$)。度洛西汀抑制 Akt 和 Erk 蛋白的磷酸化, 减少 cleaved caspase-3、cytochrome C 蛋白表达并增加 SOD1、SOD2 和 Cx43 蛋白表达。**结论** 度洛西汀降低 Akt 和 Erk 蛋白磷酸化, 抑制氧化应激及细胞凋亡, 减轻心脏缺血再灌注损伤过程中室性心律失常发生, 减少梗死面积。

关键词 度洛西汀 缺血再灌注损伤 室性心律失常 氧化应激

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.006

Protective Effects of Duloxetine on Arrhythmia in Rats with Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. Cai Xixi, Xu Xuzhong. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To explore the protective effects of duloxetine on ventricular arrhythmia in rats with ischemia reperfusion injury. **Methods** Thirty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups: Sham group, ischemia reperfusion group (IR group), duloxetine-treated group (Dulo group). The rats in IR group were subjected to 30min-ischemia of left anterior descending artery ligation followed by 120min of reperfusion, while intraperitoneal injection of duloxetine 40mg/kg were give prior ischemia in Dulo group, and the remaining experiment protocols were same as IR group. The left anterior descending artery of rats in sham group was exposed without being clamped. Two biopotential leads ECG monitor was used to record the arrhythmia in each group, and ECG parameters were analyzed by LabChart 8 software. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) was used for determination of infarct area. The protein expressions of Akt, extracellular regulated protein kinases (Erk), caspase-3, superoxide dismutase (SOD) 1, SOD2 and Connexin 43 (Cx 43) were measured by western blot analysis. **Results** As compared to IR group, the incidences of both ventricular extrasystoles and tachycardia were decreased during ischemic period ($P < 0.05$), and the incidence of ventricular tachycardia was decreased with no significant changes in ventricular extrasystoles during reperfusion period in Dulo group ($P < 0.05$). Duloxetine decreased the prolonged QTc and infarcted area during IR injury ($P < 0.05$). Duloxetine inhibited the phosphorylation of Akt and Erk, and downregulated the protein expressions of cleaved caspase-3, cytochrome C, while upregulated SOD1, SOD2 and Cx 43 protein expression during I/R injury ($P < 0.05$). **Conclusion** Duloxetine decreases the phosphorylation of Akt and Erk, inhibits oxidative stress and apoptosis, exerts anti-arrhythmogenic effects and decreases the occurrence of ventricular arrhythmia and infarcted area induced by myocardial IR.

Key words Duloxetine; Ischemic reperfusion injury; Ventricular arrhythmia; Oxidative stress

心血管疾病发生率和病死率占各类疾病之首,其

中冠状动脉功能异常导致致命性室性心律失常占死因的 1/4^[1]。心肌缺血再灌注后出现严重的心功能障碍和心肌损伤临床上较常见。心肌细胞在缺血再灌注后往往出现 ATP 耗竭、Ca²⁺ 蓄积以及活性氧产生^[2-4]。缺血再灌注导致氧化应激损伤与心律失常

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81470419)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院

通讯作者:徐旭仲,电子邮箱:xuzhong@263.net

发生密切相关,研究发现减轻氧化应激损伤及抑制细胞凋亡能够有效减少缺血/再灌注期间出现的室性心律失常^[5-7]。度洛西汀属于选择性5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)和去甲肾上腺素再摄取抑制药。度洛西汀通过抑制神经胶质的激活和氧化应激减少海马神经元在缺血再灌注中的损伤^[8]。目前,度洛西汀对心肌缺血再灌注损伤中的影响尚不清楚。本实验通过研究度洛西汀对心肌缺血/再灌注损伤氧化应激及细胞凋亡的影响,探讨度洛西汀在缺血/再灌注所致室性心律失常中的作用,初步明确抗抑郁药度洛西汀的心肌保护作用及机制。

材料与方法

1. 材料:6~8周龄雄性清洁级 Sprague Dawley (SD)大鼠30只,体重为250~300g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。实验用盐酸度洛西汀购自美国Sigma公司。Akt、磷酸化Akt(p-Akt)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, Erk)、磷酸化Erk(p-Erk)、cleaved caspase-3、cytochrome C、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)1和SOD2兔多克隆一抗购自英国Abcam公司,连接蛋白43(connexin 43, Cx-43)兔多克隆一抗购自美国Cell Signaling Technology公司。Triphenyltetrazolium chloride (TTC)、Evans Blue购自美国Sigma公司。PowerLab 8/36生物数据采集分析及LabChart 8生物数据采集分析软件购自美国AD Instruments公司。

2. 方法:(1)模型制备:SD大鼠随机分为3组:假手术组(Sham组)、IR组(IR组)、度洛西汀组(Dulo组),每组10只。IR组按照参考文献[6]制备缺血/灌注模型,无菌条件下戊巴比妥钠30mg/kg腹腔注射麻醉,机械通气,左侧胸前区剪开皮肤,逐层钝性分离肌肉,于第3或4肋剪开并剥离心包膜,用6-0缝线于左心耳下1mm处活结结扎左前降支,观察结扎处以下及心尖部心肌颜色变化,泛白者表明结扎左前降支位置正确。缺血30min后解开活结,再灌注120min。Dulo组按照参考文献[4,8]给予处理,大鼠结扎左前降支30min腹腔注射盐酸度洛西汀40mg/kg,之后处理同IR组。Sham组剥离心包膜后暴露左前降支,放置缝线并未行结扎。

(2)心电监护:于大鼠右上肢及左下肢埋入电极,二导联全程监护大鼠心电改变,记录缺血和再灌注期间心律失常发生的次数。提前出现的宽大畸形的QRS波视为1次室性期前收缩,超过6个连续的

室性期前收缩认为是1次室性心动过速^[9]。采用PowerLab 8/36生物数据采集分析系统记录大鼠心电图数据,LabChart 8生物数据采集分析软件分析大鼠心电图参数:心率(HR),RR间期,PR间期,QRS间期及QTc(采用Bazett formula法)。记录缺血期和再灌注期大鼠心电图参数的平均值。

(3)TTC染色:采用传统的染色方案^[10,11]。大鼠心肌再灌注结束后原位结扎大鼠左前降支,开腹,下腔静脉注射1%伊文斯蓝(Evans Blue)溶液2.5ml,循环3min至大鼠全身黏膜发蓝。取出心脏置于-70℃冰箱中20~25min。垂直心脏纵轴切取6片厚度约1mm的心肌。心肌切片展平后立即置于1%TTC-PBS溶液中,37℃恒温箱水浴20min,随后4%多聚甲醛中固定12~14h。用数码相机微距拍摄完成染色的心肌,经Image-Pro V6.0图像处理软件计算梗死面积(infarcted size, IS)和缺血区(area at risk size, RS)面积,计算梗死面积百分比(IS/RS)。

蛋白免疫印迹试验(Western blot):取各组左心室心肌200mg,加入含RIPA细胞裂解液1ml、蛋白酶抑制剂PMSF 1μl和磷酸蛋白酶抑制剂1μl的匀浆管中,匀浆15min,提取蛋白。通过标准BCA试剂盒测量蛋白浓度,并按照体积比1:5的比例与5×loading buffer配成20μg/ml的蛋白体系。蛋白通过10%SDS-PAGE分离并转至PVDF膜上。PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭,一抗4℃结合过夜,之后结合二抗。通过ECL化学显示剂显示蛋白。

3. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行统计分析。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的方式表示。3组数据间比较采用单因素方差分析,3组数据均数两两比较,方差齐采用LSD检验,方差不齐采用Dunnett's *t*检验。IR组与Dulo组的心肌梗死面积比较采用*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 度洛西汀减少室性心律失常发生率及缩短QTc:监测大鼠缺血再灌注过程中心电图变化(图1),可观察到Sham组在缺血和再灌注过程中均未出现室性期前收缩及室性心动过速。IR组在缺血和再灌注期间均出现较多的室性期前收缩及室性心动过速。与IR组比较,Dulo组在缺血期间的室性期前收缩和室性心动过速减少($P < 0.05$);在再灌注期间Dulo组的室性心动过速次数减少($P < 0.05$),室性期前收缩次数两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。通过测量心电图参数发现(表1),与Sham组比较,IR

组大鼠在缺血期和再灌注期间心率均加快 ($P < 0.05$),RR 间期均缩短 ($P < 0.05$),PR 间期和 QRS 波宽均未改变 ($P > 0.05$),QTc 延长 ($P < 0.05$)。与

IR 组比较,Dulo 组大鼠在缺血期和再灌注期间心率、RR 间期、PR 间期及 QRS 波宽均未改变 (P 均 > 0.05),QTc 缩短 ($P < 0.05$)。

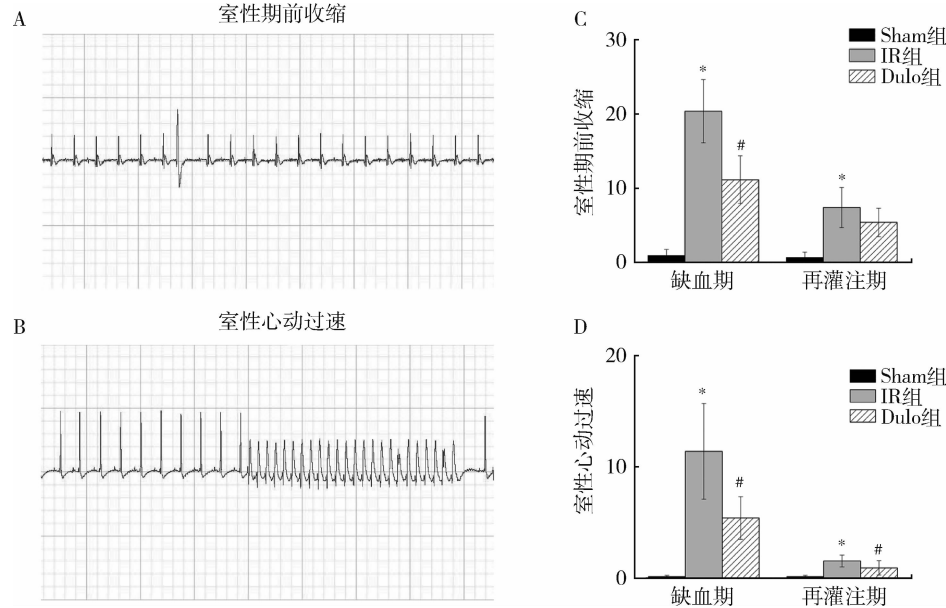


图 1 室性心律失常发生次数
A. 室性期前收缩示例;B. 室性心动过速示例;C. 室性期前收缩次数;D. 室性心动过速次数;
与 Sham 组比较,* $P < 0.05$;与 IR 组比较,# $P < 0.05$

表 1 3 组缺血期和再灌注期间心电图参数

时期	组别	HR (次/分)	RR (ms)	PR (ms)	QRS (ms)	QTc (ms)
缺血期	Sham 组	296 ± 15	203 ± 10	52.1 ± 1.2	26.0 ± 1.2	145 ± 9
	IR 组	354 ± 19 *	170 ± 9 *	54.2 ± 1.1	27.1 ± 1.3	177 ± 8 *
	Dulo 组	363 ± 10	166 ± 5	52.5 ± 1.4	25.4 ± 1.4	158 ± 4 #
再灌注期	Sham 组	294 ± 15	205 ± 10	52.8 ± 1.6	27.1 ± 1.2	145 ± 9
	IR 组	251 ± 13 *	241 ± 13 *	54.6 ± 1.3	26.8 ± 0.9	173 ± 4 *
	Dulo 组	264 ± 27	229 ± 23	52.2 ± 0.9	25.4 ± 1.5	157 ± 4 #

与 Sham 组比较,* $P < 0.05$;与 IR 组比较,# $P < 0.05$

2. 度洛西汀抑制氧化应激、细胞凋亡:蛋白免疫印迹检测 SOD1、SOD2、cleaved caspase - 3、cytochrome C 及 Cx43 (图 2)。与 Sham 组比较,IR 组 SOD1、SOD2 蛋白表达下调及 cleaved caspase - 3、cytochrome

C 蛋白表达上调;Cx43 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较,Dulo 组大鼠 SOD1、SOD2 和 Cx43 蛋白表达上调,cytochrome C、cleaved caspase - 3 蛋白表达减少 ($P < 0.05$)。

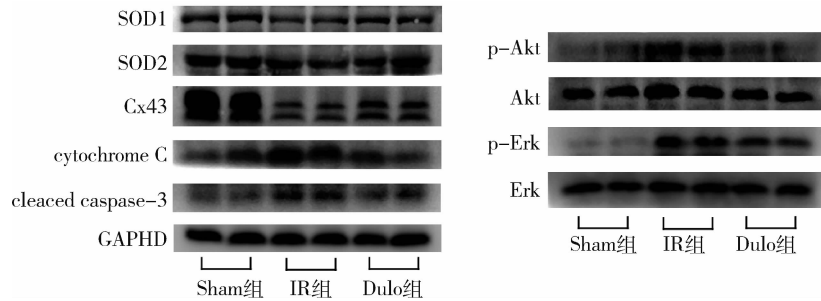


图 2 蛋白免疫印迹检测

3. 度洛西汀减少心肌梗死面积:TTC 染色比较心肌梗死面积(图3)。与 IR 组比较,Dulo 组大鼠心肌梗死面积百分比(IS/RS)减少($P < 0.05$)。

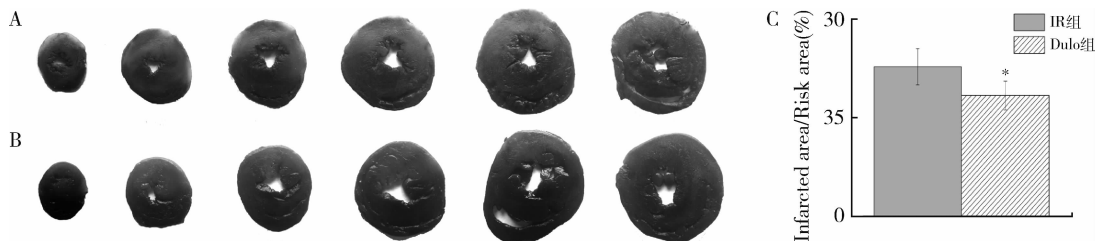


图3 心肌各层面 TTC 染色

A. IR 组心肌; B. Dulo 组心肌; C. 梗死面积百分比 (IS/RS); 与 IR 组比较, * $P < 0.05$

4. 度洛西汀抑制 Akt、Erk 磷酸化:蛋白免疫印迹检测 Akt、p-Akt、Erk 及 p-Erk(图2)。与 Sham 组比较,IR 组 p-Akt 及 p-Erk 蛋白表达上调。与 IR 组比较,Dulo 组 Akt 及 Erk 的磷酸化减少,即 p-Akt 及 p-Erk 蛋白表达减少。各组间总 Akt 和 Erk 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

新近的研究发现,组织缺血时 5-HT 蓄积且降解显著减少,而再灌注期间 5-羟色胺降解增加且依赖于单胺氧化酶的作用^[12]。5-HT 及代谢物与单胺氧化酶相互作用,调控缺血及再灌注期间的氧化应激反应,因此调节 5-HT 浓度具有潜在的治疗作用^[12, 13]。目前发现作为选择性的 5-HT 再摄取抑制剂的抗抑郁药物氟西汀和度洛西汀,在神经元缺血再灌注损伤时抑制炎症诱导的凋亡,减少氧化应激,发挥保护作用^[8, 14]。文献报道选择性 5-HT 再摄取抑制剂氟伏沙明在离体心脏缺血再灌注模型中,抑制钙超载所致的心肌凋亡,减少氧化应激损伤^[15]。

心肌缺血再灌注期间出现的大量自由基及细胞凋亡加剧室性心律失常^[7]。心肌缺血所致连接蛋白 Cx43 的缺失直接导致室性心律失常的发生^[16]。心肌缺血再灌注损伤期间 QTc 延长与室性心律失常的发生密切相关^[17]。本研究发度洛西汀能够减少缺血期间的室性期前收缩和室性心动过速的次数,减少再灌注期间室性心动过速的次数,而对再灌注期间室性期前收缩没有影响。在 IR 组大鼠,超氧化物歧化酶 SOD1、SOD2 较 Sham 组显著降低,Dulo 组大鼠 SOD1、SOD2 较缺血再灌注组升高。心肌组织中 SOD1 及 SOD2 的改变提示心肌氧化应激的损伤程度^[18],度洛西汀提高缺血再灌注心肌组织中的 SOD1 及 SOD2 发挥抗氧化作用。缺血再灌注损伤中线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放直接导致 caspase-3

和 cytochrome C 的增加,cytochrome C 的增加依赖于 caspase 信号通路^[7]。度洛西汀减少缺血再灌注损伤时的 caspase-3 和 cytochrome C,发挥抗细胞凋亡的作用。因此,度洛西汀减少缺血再灌注导致的室性心律失常是通过抑制氧化应激,减少细胞凋亡。同时度洛西汀能够减小心肌缺血再灌注损伤引起的梗死面积。度洛西汀显著抑制缺血再灌注损伤时 Cx43 蛋白的丢失,缩短缺血再灌注损伤导致的 QTc 的延长,提示度洛西汀发挥抗心律失常作用依赖于 Cx43 的改变及缩短延长的 QTc。在信号通路方面,本研究发度洛西汀能够抑制 Akt、Erk 的磷酸化,其发挥作用涉及 Akt 和 Erk 信号转导通路。

综上所述,度洛西汀降低 Akt 和 Erk 蛋白磷酸化,抑制氧化应激及细胞凋亡,减少心脏缺血再灌注损伤过程中连接蛋白 Cx43 表达和室性心律失常发生,减小心肌梗死面积。本研究揭示了 5-HT 再摄取抑制剂度洛西汀抑制大鼠心肌缺血再灌注心律失常的发生,为心脏缺血再灌注心律失常的治疗提供新的思路。

参考文献

- Nattel S, Duker G, Carlsson L. Model systems for the discovery and development of antiarrhythmic drug [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2008, 98: 328 - 339
- Kurian GA, Raman A, Padikkala J. Antioxidant effects of ethyl acetate extract of desmodium gangeticum root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts [J]. Chin Med, 2010, 5: 3 - 10
- Tao J, Zhu W, Li Y, et al. Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301: H1471 - 1486
- Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, et al. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury [J]. Basic Res Cardiol, 2007, 102: 518 - 528
- Chen LW, Wu G, Lv L, et al. Cardioprotective effects of combined

- therapy with diltiazem and superoxide dismutase on myocardial ischemia – reperfusion injury in rats[J]. *Life Sci*,2017,183: 50 – 59
- 6 Thummasorn AN, Kerdphoo S, Shinlapawittayatorn K, *et al*. Humatin exerts cardioprotection against cardiac ischemia/reperfusion injury through attenuation of mitochondrial dysfunction [J]. *Cardiovasc Ther*,2016,34(6): 404 – 414
- 7 Roy FJ, Oger C, Farah C, *et al*. Non – enzymatic oxidized metabolite of DHA, 4(RS) – 4 – F4t – neuroprostane protects the heart against reperfusion injury[J]. *Free Radic Biol Med*,2017,102: 229 – 239
- 8 Lee TK, Ahn JH, Shin MC, *et al*. Pretreated duloxetine protects hippocampal CA1 pyramidal neurons from ischemia – reperfusion injury through decreases of glial activation and oxidative stress[J]. *J Neurol Sci*,2016,370: 229 – 236
- 9 Tan N, Rouleau JL. Postinfarction survival and inducibility of ventricular arrhythmias in the spontaneously hypertensive rat effects of ramipril and hydralazine[J]. *Circulation*,1998,98: 2074 – 2080
- 10 Chen O, Ye Z, Cao Z, *et al*. Methane attenuates myocardial ischemia injury in rats through antioxidative, anti – apoptotic and anti – inflammatory actions[J]. *Free Radic Biol Med*,2015,90(2016): 1 – 11
- 11 李粮辉,陈文华,郑宏. 改进的 TTC 染色法显示大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. *中国实验动物学报*,2014, 22: 75 – 78
- 12 Du CK, Zhan DY, Akiyama T, *et al*. Myocardial interstitial levels of serotonin and its major metabolite 5 – hydroxyindole acetic acid during ischemia – reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2017, 312: H60 – H67
- 13 Mialet – Perez J, Bianchi P, Kunduzova O, Parini A. New insights on receptor – dependent and monoamine oxidase – dependent effects of serotonin in the heart [J]. *J Neural Transm: Vienna*,2007, 114: 823 – 827
- 14 Shan H, Bian Y, Shu Z, *et al*. Fluoxetine protects against IL – 1beta – induced neuronal apoptosis via downregulation of p53 [J]. *Neuropharmacology*,2016,107: 68 – 78
- 15 Muto T, Yamamura A, Yoshida K, *et al*. Protective effects of fluvoxamine against ischemia/reperfusion injury in isolated, perfused guinea – pig hearts[J]. *Biol Pharm Bull*,2014,37(5): 731 – 739
- 16 Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, *et al*. Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia – induced arrhythmias by preserving connexin43 protein[J]. *Circulation*,2005,112: 164 – 170
- 17 Owecki M, Nikisch E, Sowiński J. Prolonged ventricular repolarization measured by corrected QT interval (QTc) in subclinical hyperthyroidism[J]. *Horm Metab Res*,2006, 38(1): 44 – 47
- 18 Wu SZ, Tao LY, Wang JN. Amifostine pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis and oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2017,2017: 4130824

(收稿日期:2017 – 07 – 29)

(修回日期:2017 – 08 – 15)

PGR 基因多态性与复发性自然流产的关联性研究

于皓臣 李可可 白春月 霍正浩 陆 宏

摘 要 **目的** 探讨孕酮受体基因(PGR)rs590688、rs1042838、rs11224592 3 个单核苷酸位点与复发性自然流产(RSA)的关联性。**方法** 采用 TaqMan 探针基因分型方法检测并比较 RSA 患者(病例组 212 例)和正常女性(对照组 197 名)的 PGR 基因 3 个 SNPs 位点基因型及等位基因频率的分布情况。**结果** PGR 基因 rs590688、rs1042838、rs11224592 位点基因型及等位基因频率在病例组和对照组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);PGR 基因 rs590688、rs11224592;2 个位点构建的 GC 单倍型($P < 0.05$)及 PGR 基因 rs590688、rs11224592、rs1042838 3 个位点构建的 GCG 单倍型($P < 0.05$) 在病例组和对照组间比较,差异有统计学意义。**结论** PGR 基因 rs590688、rs11042838、rs11224592 位点的基因多态性与宁夏汉族女性 RSA 的易感性无关;PGR 基因 rs590688、rs11224592 两个位点构建的 GC 单倍型及 PGR 基因 rs590688、rs11224592、rs1042838 3 个位点构建的 GCG 单倍型可能是 RSA 的保护性因素。

关键词 孕酮受体基因(PGR) 复发性自然流产(RSA) 基因多态性

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.007

Association of PGR Polymorphism with Recurrent Spontaneous Abortion. Yu Haochen, Li Keke, Bai Chunyue, *et al*. Ningxia Medical University, Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education/Department of Medical Genetic and Cell Biology/ Key Laboratory of Reproduction and Genetics in Ningxia, Ningxia 750004, China

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31460272,31360257);宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ14073)

作者单位:750004 银川,宁夏医科大学、教育部生育力保持省部共建重点实验室/医学遗传与细胞生物学系、宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室

通讯作者:陆宏,教授,电子信箱:chuan773@126.com