

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research瑞芬太尼后处理减轻心肌缺血再灌注后炎症
反应和细胞凋亡及其机制研究Remifentanyl post-treatment against myocardial ischemia-reperfusion injury by
attenuating inflammatory and apoptosis in rats and its mechanism陈中青^{1a}, 侯丹丹^{1b}, 王晨晨^{1b}

(1. 宁夏医科大学 总医院, a. 老年与特需医学科;
b. 心脏中心内科, 宁夏回族自治区 银川
750004)

CHEN Zhong-qing, HOU Dan-dan,
WANG Chen-chen

(1. a. Department of Geriatrics and
Special Needs Medicine; b. Heart Centre,
Department of Cardiovascular, General
Hospital of Ningxia Medical University,
Yinchuan 750004, Ningxia Hui
Autonomous Region, China)

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目
(2024AAC03676)

作者简介: 陈中青 (1973 -), 女, 主任医师, 主
要从事冠心病心肌保护方面的工作
和研究

通信作者: 陈中青, 硕士生导师
MP: 13895078589

E-mail: czq6699@sina.com

摘要:目的 探讨磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B-核因子 E2 相关因子 2 (PI3K-Akt-Nrf2) 通路在瑞芬太尼后处理保护大鼠心肌缺血再灌注 (IR) 损伤中的作用。方法 用冠状动脉前降支结扎法, 建立 SD 大鼠心肌缺血再灌注损伤的模型。将成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组 (只穿线不结扎)、模型组 (心肌缺血 30 min 后再灌注 30 min)、实验组 (从大鼠缺血 25 min 至再灌注前 5 min 内, 连续输注瑞芬太尼 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)、LY294002 组 (给予瑞芬太尼干预的同时给予 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LY294002) 及 ML385 组 (给予瑞芬太尼干预的同时给予 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ML385)。用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测血清白介素 6 (IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度; 采用原末端转移酶标记法 (TUNEL) 检测凋亡指数 (AI); 实时荧光定量聚合酶链反应检测 PI3K、Akt 的表达水平。结果 对照组、模型组、实验组、LY294002 组和 ML385 组的 IL-6 水平分别为 0.76 ± 0.15 、 3.44 ± 0.35 、 1.46 ± 0.37 、 3.17 ± 0.28 和 3.07 ± 0.18 , IL-1 β 水平分别为 0.34 ± 0.08 、 1.18 ± 0.21 、 0.66 ± 0.28 、 0.94 ± 0.13 和 0.81 ± 0.25 , TNF- α 水平分别为 0.98 ± 0.17 、 2.38 ± 0.27 、 1.17 ± 0.21 、 2.27 ± 0.26 和 2.66 ± 0.16 , AI 水平分别为 0.95 ± 0.67 、 20.73 ± 1.63 、 10.20 ± 2.48 、 15.69 ± 2.41 和 16.31 ± 1.55 , PI3K mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 1.69 ± 0.15 、 1.90 ± 0.12 、 0.98 ± 0.14 和 1.78 ± 0.13 , Akt mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.09 、 1.56 ± 0.22 、 1.85 ± 0.13 、 0.87 ± 0.21 和 1.69 ± 0.31 , Nrf2 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 2.62 ± 0.16 、 3.11 ± 0.28 、 1.37 ± 0.25 和 1.03 ± 0.14 。实验组上述指标与模型组比较, LY294002 组及 ML385 组上述指标与实验组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$)。结论 瑞芬太尼后处理通过减少 IR 诱导的大鼠心肌细胞凋亡和炎症反应发挥对心肌 IR 损伤的保护作用, 并可能与 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路有关。

关键词: 瑞芬太尼; 心肌缺血再灌注损伤; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/核因子 E2 相关因子 2 通路; 细胞凋亡; 炎症

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.07.012

中图分类号: R541.4 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)07-0975-07

Abstract: Objective To investigate the role of the phosphatidylinositol-3 kinase / protein kinase B / nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (PI3K/Akt/Nrf2) pathway in remifentanyl postconditioning-induced protection against myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury in rats.

Methods Establishing a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) by left anterior descending coronary artery ligation. Subsequently, the rats were randomly assigned to the following groups:

control (only threading was performed without ligation), model (ischemia was induced for 30 minutes followed by 30 minutes of reperfusion), experimental (remifentanyl was continuously infused by a dose of $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ from 25 minutes of ischemia to 5 minutes before reperfusion), LY294002 (while receiving remifentanyl intervention, $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LY294002 was administered), and ML385 (while receiving remifentanyl intervention, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ML385 was administered). Serum levels of interleukin - 6 (IL - 6), IL - 1 β and tumor necrosis factor - α (TNF - α) were measured using enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). Apoptosis index (AI) of myocardial cells in each group was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression levels of phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K) and protein kinase B (Akt) were measured using real - time quantitative polymerase chain reaction. **Results** The measured parameters for the control, model, experimental, LY294002, and ML385 groups were as follows. Serum interleukin - 6 (IL - 6) were 0.76 ± 0.15 , 3.44 ± 0.35 , 1.46 ± 0.37 , 3.17 ± 0.28 and 3.07 ± 0.18 . IL - 1 β were 0.34 ± 0.08 , 1.18 ± 0.21 , 0.66 ± 0.28 , 0.94 ± 0.13 and 0.81 ± 0.25 , respectively. Serum tumor necrosis factor - α (TNF - α) were 0.98 ± 0.17 , 2.38 ± 0.27 , 1.17 ± 0.21 , 2.27 ± 0.26 and 2.66 ± 0.16 , respectively. Apoptosis index (AI) were 0.95 ± 0.67 , 20.73 ± 1.63 , 10.20 ± 2.48 , 15.69 ± 2.41 and 16.31 ± 1.55 , respectively. PI3K mRNA relative expression level were 1.00 ± 0.08 , 1.69 ± 0.15 , 1.90 ± 0.12 , 0.98 ± 0.14 and 1.78 ± 0.13 , respectively. Akt mRNA relative expression level were 1.00 ± 0.09 , 1.56 ± 0.22 , 1.85 ± 0.13 , 0.87 ± 0.21 and 1.69 ± 0.31 , respectively. Nrf2 mRNA relative expression level were 1.00 ± 0.08 , 2.62 ± 0.16 , 3.11 ± 0.28 , 1.37 ± 0.25 and 1.03 ± 0.14 , respectively. Statistically significant differences were observed for all the above parameters when comparing the experimental group with the model group, and when comparing the LY294002 and ML385 groups with the experimental group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$). **Conclusion** Remifentanyl postconditioning exerts a protective effect on myocardial IR injury by reducing IR - induced cardiomyocyte apoptosis and inflammatory response in rats, and may be related to the PI3K / Akt / Nrf2 signaling pathway.

Key words: remifentanyl; myocardial ischemia - reperfusion injury; phosphatidylinositol 3 - kinase / protein kinase B / nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 pathway; apoptosis; inflammatory

急性心肌梗死的高发病率、高死亡率是严重威胁人类生命健康的主要原因,常导致不可逆的心肌损伤。介入治疗是目前即刻开通阻塞冠状动脉的一种治疗方法,但却面临着心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)。MIRI可导致严重的心功能障碍和心肌组织受损,对患者的预后产生很大的影响^[1]。MIRI的发病机制复杂,涉及多因素参与,且与多种信号通路的失调密切相关,其中磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/核因子E2相关因子2(phosphatidylinositol 3 - kinase / protein kinase B / nuclear factor erythroid 2 - related factor 2, PI3K/Akt/Nrf2)信号通路备受关注,可作为一种新的治疗靶点,通过调控细胞凋亡、炎症等在MIRI中的保护中发挥重要作用。研究发现瑞芬太尼对MIRI具有很好的保护作用^[2-3],已有研究证实其具有抗氧化、抗细胞凋亡和抗炎作用^[4-6],但具体机制尚不完全清楚。本文旨在探讨瑞芬太尼后处理对大鼠心肌MIRI的保护作用及可能信号转导机制,明确PI3K/Akt/Nrf2信号通路在瑞芬太尼抗炎及抗细胞凋亡机制中的作用,从而

为瑞芬太尼的临床应用提供理论和实验依据。

材料和方法

1 材料

动物 雄性SD大鼠,体质量(200~250)g,鼠龄13~15周,购于宁夏医科大学动物实验中心。动物生产许可证号:SCXK(宁)2020-0001,动物使用许可证号:SYXK(宁)2020-0001。本研究经宁夏医科大学总医院动物伦理委员会审查批准(伦理批号:KYLL-2024-0260)。

药品与试剂 注射用盐酸瑞芬太尼,规格:每支1 mg,批号:10B09031,批准文号:国药准字H20030197,湖北宜昌人福药业有限责任公司生产;LY294002(PI3K/Akt抑制剂),规格:每支10 mg,纯度:>98%,批号:154447-36-6、ML385 Nrf2,规格:每支5 mg,纯度:>98%,批号:846557-71-9,均由美国Med Chem Express公司生产;ChamQ SYBR Green I实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real - time polymerase chain reaction, qPCR)预混液,

由江苏南京诺唯赞生物科技有限公司生产;肌酸激酶同工酶(creatine kinase - MB, CK - MB)、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、白细胞介素 - 1 β (interleukin - 1 β , IL - 1 β)、白细胞介素 - 6 (interleukin - 6, IL - 6) 和肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α) 酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒,均由上海酶联生物科技有限公司生产。

仪器 CFX96 Touch 实时定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪, 美国 Bio - Rad 公司产品;MultiskanTM FC 酶标仪, 美国 ThermoFisher 公司产品。

2 实验方法

2.1 实验动物模型的制备^[3]

通过结扎大鼠冠状动脉前降支 30 min, 随后恢复灌注 30 min 的方法进行心肌缺血再灌注损伤模型制备。

2.2 动物分组与处理^[7]

将造模成功大鼠随机分为 5 组, 每组 8 只。对照组: 只穿线, 但不结扎冠状动脉前降支, 给予等量生理盐水; 模型组: 结扎前降支 30 min, 随后再灌注 30 min, 于灌注前 5 min, 给予等量生理盐水; 实验组: 缺血 25 min 至再灌注前 5 min 持续静脉输注 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 瑞芬太尼; LY294002 组: 在给予瑞芬太尼干预的同时静脉注射 0.3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LY294002 (溶于 1% 二甲亚砜)。ML385 组: 在给予瑞芬太尼干预的同时腹腔注射 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ML385。

2.3 血清 CK - MB 和 cTnI 水平的测定^[8]

再灌注 30 min 时, 经大鼠股动脉取血 3 mL 装入预备的无菌肝素抗凝管中, 离心后采用 ELISA 检测试剂盒分别检测 CK - MB 及 cTnI 浓度。

2.4 超声心动图测各组大鼠心功能变化^[9]

再灌注 30 min 后, 大鼠经胸部备皮, 固定于左倾 30° 体位。使用 14 MHz 电子相控阵超声探头的超声心动图诊断仪进行超声心动图检查。仪器自动计算获得左心室收缩末期内径 (left ventricular internal dimension at systole, LVIDs)、左心室舒张末期内径 (left ventricular internal dimension at Diastole, LVIDd)、左心室舒张末期容积 (left ventricular end - diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩末期容积 (left ventricular end - systolic volume, LVESV) 和左室射血分数 (left ventricular ejection fractions, LVEF)。

2.5 2,3,5 - 氯化三苯基四氮唑 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色测定大鼠心肌梗死面积^[10]

再灌注 30 min 后, 每组随机取 6 只大鼠, 向主动

脉注入 2 mL 2 % 伊文思蓝染料。所有大鼠均被颈椎脱位处死。迅速摘除心脏、清洗、冷冻, 并从交界部位的顶端切成大约五个横截面 (每 1 ~ 2 mm 厚)。TTC 法检测左室心肌梗死面积。使用 imageJ 软件对梗死面积 (infarct size, IS) 和危险面积 (area at risk, AAR) 进行量化。以 IS 占 AAR 的百分比 (IS/AAR%) 评价缺血范围。

2.6 用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察大鼠的心肌超微结构改变^[6]

心肌组织经 2.5 % 戊二醛前固定和 1 % 锇酸后固定, 磷酸缓冲液冲洗后, 通过梯度丙酮脱水、渗透, 环氧树脂包埋后超薄切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色后, 于 TEM ($\times 4\,000$) 下观察各组心肌组织的改变。

2.7 ELISA 法测各组炎症因子 IL - 6、IL - 1 β 、TNF - α 的水平^[8]

再灌注 30 min 后, 剪开股动脉取血约 2 mL, 分离血清, eppendorf 管 (Eppendorf tube, EP) 分装后于 -20 °C 保存备用。应用 ELISA 检测试剂盒分别检测 IL - 6、IL - 1 β 及 TNF - α 水平。

2.8 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TdT - mediated dUTP nick - end labeling, TUNEL) 法检测心肌组织细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI)^[11]

再灌注结束时, 收集心脏组织用 4 % 聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切成 3.5 μm 厚的切片, 按试剂盒说明书行 TUNEL 法检测后光学显微镜观察。AI = 凋亡阳性心肌细胞核数 $\div$ 总心肌细胞核数 $\times 100\%$, 求平均值。

2.9 qPCR 法检测 PI3K、AKT 和 Nrf2 基因的表达水平^[6]

再灌注结束时, 取大鼠心肌组织, 按照试剂盒方法先提取总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA)。qPCR 检测 PI3K、AKT、Nrf2 基因的表达情况。

3 统计学处理

用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。在方差齐性检验后, 对多组间的差异进行单因素方差分析, 2 组间比较、多组间比较及两两比较分别行独立样本 t 检验。

结 果

1 各组大鼠血清 CK - MB 和 cTnI 水平的比较

与对照组比较, 模型组、实验组的 CK - MB、cTnI 均显著升高 (均 $P < 0.0001$), 而实验组显著低于模型组 (均 $P < 0.01$)。与实验组比较, LY294002

组的CK-MB、cTn I均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.0001$),其中cTn I显著低于模型组($P < 0.0001$),ML385组的CK-MB、cTn I也均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.0001$),但仍显著低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.0001$),见表1。

2 各组大鼠心脏超声指标比较

与对照组比较,模型组、实验组、LY294002组与ML385组的LVIDs、LVIDd、LVEDV、LVESV均显著升高,LVEF则显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$);实验组的LVIDs、LVIDd、LVEDV、LVESV均低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.0001$),LVEF则高于模型组($P < 0.0001$);LY294002组与ML385组的LVIDs、LVIDd、LVEDV、LVESV高于实验组,仍低于模型组,LVEF低于实验组,高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$),见表2。

3 各组大鼠心肌梗死面积的比较

各组大鼠间的AAR在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$),说明各组间结扎血管部位相同,具有可比性。与模型组比较,其余各组IS重量和IS/AAR均降低(均 $P < 0.0001$),心肌梗死面积明显减少。与实验组比较,LY294002组与ML385组心肌梗死范围扩大(均 $P < 0.0001$),见表3。

4 电镜下心肌超微结构观察

对照组心肌细胞和染色质均匀,致密,肌纤维排列整齐,线粒体嵴无损伤。模型组心肌细胞核

染色质聚集,边集;肌纤维疏松,线粒体嵴断裂,溶解,甚至消失,形成灶性空泡。实验组肌纤维排列较整齐,线粒体轻度、局部嵴溶解,线粒体肿

表1 各组大鼠血清肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase isoenzymes MB, CK-MB)和心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTn I)比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the contents of creatine kinase isoenzymes MB(CK-MB) and cardiac troponin I (cTn I) in serum among rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CK-MB (U · L ⁻¹)	cTnI (ng · mL ⁻¹)
Control	8	512.15 ± 92.67	51.51 ± 6.08
Model	8	2 986.73 ± 986.63 ****	275.01 ± 13.19 ****
Experimental	8	1 843.20 ± 235.48 ****▲	152.11 ± 8.10 ****▲
LY294002	8	2 348.69 ± 536.41 △	208.60 ± 11.18 ▲▲▲▲△△△△
ML385	8	1 989.10 ± 453.32 ▲△	192.41 ± 9.0 ▲▲▲▲△△△△

Control group: Without coronary artery ligation; Model group: Ligated at left anterior descending (LAD) for 30 min and then recirculation; Experimental group: Ischemia-reperfusion (IR) model animals were achieved by continuous infusion of remifentanyl 10 μg · kg⁻¹ · min⁻¹ from 25 min of ischemia to the first 5 min of reperfusion; LY294002 group: LY294002 (dissolved in 1% dimethyl sulphoxide, 0.3 mg · kg⁻¹) was injected via tail vein while administering remifentanyl intervention; ML385 group: ML385 (30 mg · kg⁻¹) was underwent by intraperitoneal injection at the same time administering remifentanyl intervention; Compared with control group, **** $P < 0.0001$; Compared with model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.0001$; Compared with experimental group, △ $P < 0.05$, △△△△ $P < 0.0001$.

表2 各组大鼠心脏超声指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of cardiac ultrasound indexes in rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	LVIDs (mm)	LVIDd (mm)	LVEDV (mL)	LVESV (mL)	LVEF (%)
Control	8	5.09 ± 0.22	3.51 ± 0.18	0.83 ± 0.05	0.18 ± 0.01	78.84 ± 0.75
Model	8	5.89 ± 0.45 ****	6.01 ± 0.39 ****	0.93 ± 0.05 **	0.54 ± 0.03 ****	41.82 ± 3.03 ****
Experimental	8	5.27 ± 0.28 ▲▲	4.11 ± 0.16 ▲▲▲▲	0.84 ± 0.04 ▲▲	0.26 ± 0.03 ▲▲▲▲▲▲	68.88 ± 4.16 ▲▲▲▲▲▲
LY294002	8	5.48 ± 0.41	5.86 ± 0.18 ****▲△△△	0.87 ± 0.04 ▲	0.33 ± 0.04 ▲▲▲▲▲▲▲△	61.95 ± 5.92 ▲▲▲▲▲▲△
ML385	8	5.39 ± 0.32 ▲	5.39 ± 0.32 ****▲▲△△	0.86 ± 0.06 ▲	0.31 ± 0.03 ▲▲▲▲▲▲△△	63.21 ± 6.07 ▲▲▲▲▲▲△

Compared with control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; Compared with model group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.0001$; Compared with experimental group, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$, △△△ $P < 0.001$, △△△△ $P < 0.0001$.

表3 各组大鼠心肌梗死范围的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of myocardial infarction range in rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	AAR	IS	IS/AAR (%)
Control	8	0	0	0
Model	8	0.45 ± 0.02	0.18 ± 0.01	41.37 ± 2.73
Experimental	8	0.46 ± 0.02	0.11 ± 0.01 ▲▲▲	23.87 ± 2.11 ▲▲▲
LY294002	8	0.46 ± 0.01	0.15 ± 0.01 ▲▲▲▲△△△	32.94 ± 1.02 ▲▲▲▲△△△
ML385	8	0.46 ± 0.01	0.14 ± 0.01 ▲▲▲▲△△△	30.67 ± 1.41 ▲▲▲▲△△△

Compared with model group, ▲▲▲ $P < 0.0001$; Compared with experimental group, △△△△ $P < 0.0001$.

胀介于对照组和模型组之间,心肌细胞损伤明显减轻。LY294002 组与 ML385 组肌纤维排列较整齐,线粒体嵴有溶解、断裂现象;大鼠心肌损伤程度介于实验组和模型组。各组心肌超微结构见图 1。

5 各组炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 浓度的比较

与对照组比较,模型组,实验组、LY294002 组与 ML385 组的 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$)。实验组 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平低于模型组($P < 0.001$, $P < 0.0001$); LY294002 组与 ML385 组的大鼠血清 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平显著高于实验组($P < 0.05$, $P < 0.0001$),仍显著低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表 4。

6 各组大鼠心肌细胞凋亡检测结果

与对照组比较,模型组,实验组、LY294002 组与 ML385 组的 AI 均显著升高(均 $P < 0.0001$)。与模型组比较,实验组、LY294002 组与 ML385 组的 AI 降低($P < 0.001$, $P < 0.0001$)。与实验组比较,LY294002 组与 ML385 组的 AI 均显著升高($P < 0.001$, $P < 0.0001$),见表 5。

表 5 各组大鼠心肌细胞凋亡指数(AI)的比较($\bar{x} \pm s$, %)

Table 5 Comparison of apoptotic index(AI) in myocardial among rats of each group ($\bar{x} \pm s$, %)

Group	n	AI
Control	8	0.95 $\pm$ 0.67
Model	8	20.73 $\pm$ 1.63 ****
Experimental	8	10.20 $\pm$ 2.48 *****
LY294002	8	15.69 $\pm$ 2.41 ***** $\Delta\Delta\Delta$
ML385	8	16.31 $\pm$ 1.55 ***** $\Delta\Delta\Delta\Delta$

AI: Apoptotic index; Compared with control group, **** $P < 0.0001$; Compared with model group, **** $P < 0.0001$, ***** $P < 0.0001$; Compared with experimental group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$.

7 各组大鼠心肌 PI3K、Akt、Nrf2 的 mRNA 表达的比较

与对照组比较,模型组与实验组的 PI3K、Akt 和 Nrf2 的 mRNA 表达水平均显著升高,且实验组显著高于模型组(均 $P < 0.0001$); LY294002 组的 PI3K、Akt 和 Nrf2 的 mRNA 表达水平均低于模型组及实验组(均 $P < 0.0001$); ML385 组的 PI3K 和 Akt 的 mRNA 表达水平与模型组及实验组的比较,在统计学上差异均无统计学意义($P > 0.05$),而 Nrf2 的 mRNA 表达水平低于模型组及实验组(均 $P < 0.0001$),见表 6。

表 4 各组大鼠血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平的比较($\bar{x} \pm s$, ng $\cdot$ mL $^{-1}$)

Table 4 Comparison of the contents of interleukin-6(IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum among rats of each group ($\bar{x} \pm s$, ng $\cdot$ mL $^{-1}$)

Group	n	IL-6	IL-1 β	TNF- α
Control	8	0.76 $\pm$ 0.15	0.34 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.17
Model	8	3.44 $\pm$ 0.35 ****	1.18 $\pm$ 0.21 ****	2.38 $\pm$ 0.27 ****
Experimental	8	1.46 $\pm$ 0.37 *****	0.66 $\pm$ 0.28 *****	1.17 $\pm$ 0.21 *****
LY294002	8	3.17 $\pm$ 0.28 ***** $\Delta\Delta\Delta$	0.94 $\pm$ 0.13 ***** Δ	2.27 $\pm$ 0.26 ***** $\Delta\Delta\Delta\Delta$
ML385	8	3.07 $\pm$ 0.18 ***** $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.81 $\pm$ 0.25 *****	2.66 $\pm$ 0.16 ***** $\Delta\Delta\Delta\Delta$

Compared with Control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; Compared with Model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$; Compared with Experimental group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$, $\Delta\Delta\Delta\Delta P < 0.0001$.

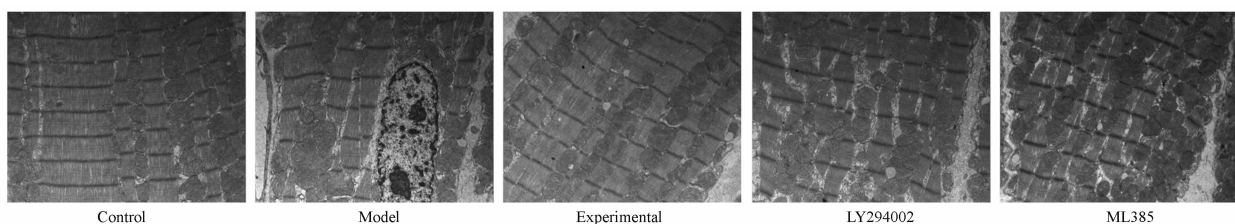


图 1 各组大鼠心肌超微结构变化($\times 4000$)

Figure 1 Changes of myocardial ultrastructure in rats of each group ($\times 4000$)

表 6 各组大鼠心肌磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、核因子 E2 相关因子 2 通路(Nrf2)的 mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of mRNA expression of phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), protein kinase B(Akt) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) in myocardial tissue among rats of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	<i>PI3K</i>	<i>Akt</i>	<i>Nrf2</i>
Control	8	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08
Model	8	1.69 ± 0.15****	1.56 ± 0.22****	2.62 ± 0.16****
Experimental	8	1.90 ± 0.12▲▲▲▲▲	1.85 ± 0.13▲▲▲▲▲	3.11 ± 0.28▲▲▲▲▲
LY294002	8	0.98 ± 0.14▲▲▲▲△△△△	0.87 ± 0.21▲▲▲▲△△△△	1.37 ± 0.25▲▲▲▲△△△△
ML385	8	1.78 ± 0.13	1.69 ± 0.31	1.03 ± 0.14▲▲▲▲△△△△

Compared with Control group, *****P* < 0.0001; Compared with Model group, ▲▲▲*P* < 0.001, ▲▲▲▲*P* < 0.0001; Compared with Experimental group, △△△△*P* < 0.0001.

讨 论

MIRI 是 AMI 经皮冠状动脉介入治疗后影响患者预后的关键因素。近年来,为减少心肌缺血再灌注损伤,相继提出了缺血预处理、缺血后处理、药物预处理及药物后处理等方法来解决这一难题。瑞芬太尼因作用效果快,作用时间短、镇痛作用强、剂量易控制等优点被广泛应用于临床。前期研究已证实瑞芬太尼后处理可改善 MIRI^[3-4,7]。对瑞芬太尼保护心肌细胞的作用机制的研究,有助于降低急性心肌梗死患者死亡率和致残率。MIRI 是一个复杂的病理生理过程,发病机制复杂多样,涉及活性氧(reactive oxygen species,ROS)、细胞凋亡、炎症、自噬、线粒体功能障碍和免疫反应^[12-13]。细胞凋亡在急性心肌梗死患者的心肌细胞死亡过程中起着关键作用。MIRI 的早期阶段,心肌细胞凋亡是其主要表现形式,并直接决定了最终梗死面积的大小与患者预后^[14]。因此,抑制心肌细胞的凋亡可能改善心功能,减轻心肌缺血再灌注损伤。有研究发现心肌的缺血再灌注损伤,促炎因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 等增多^[10,15]。这些炎症因子通过调控细胞凋亡、扰乱微循环等多重机制产生协同效应,显著加剧了心肌缺血再灌注损伤的病理进程^[16]。而研究表明,瑞芬太尼在 MIRI 中具有抗细胞凋亡及抗炎等特性^[4-6]。本研究结果表明,瑞芬太尼后处理不仅能显著降低血清心肌损伤标志物(CK-MB、cTnI)水平,改善左室收缩功能(LVEF),还能有效减少心肌梗死面积并维持心肌超微结构的完整性,同时能显著减少心肌缺血再灌注诱导的心肌细胞凋亡。这一发现与既往研究中瑞芬太尼具有抗氧化、抗凋亡特性的结论相一致^[5-6,17-18]。同时,本研究进一步揭示了瑞芬太尼后处理能够抑制心肌的炎

症反应。我们观察到,模型组大鼠血清中 IL-6、IL-1β 及 TNF-α 等促炎因子显著升高,而瑞芬太尼实验组上述炎症因子水平显著下调,且心肌细胞 AI 明显降低。这提示瑞芬太尼的心肌保护作用并非单一机制,而是通过抑制炎症反应与抗细胞凋亡的共同作用实现的。

MIRI 的发病机制涉及多种信号通路,如 PI3K/Akt 信号通路^[19-20]、Janus 激酶/信号转导和转录激活物通路^[21]、Nrf2^[7,22] 等。研究证实,PI3K/Akt 可作为一种新的治疗靶点在 MIRI 中的保护中发挥重要作用,其机制主要涉及到调控细胞凋亡、炎症、氧化应激等病理生理过程,同时可促进 Nrf2 的激活^[23]。为了阐明瑞芬太尼发挥上述保护作用的分子机制,本研究对 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路进行了研究。本研究结果显示模型组的 *PI3K*、*Akt* 与 *Nrf2* 的 mRNA 表达水平均升高,提示在心肌缺血再灌注损伤中激活了 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路,可能原因是机体在应激状态下存在自我代偿机制,但这一内源性保护不足以对抗严重的再灌注损伤。而瑞芬太尼后处理能进一步显著增强 *PI3K*、*Akt* 和 *Nrf2* 的 mRNA 表达,表明瑞芬太尼可能作为外源性刺激剂,特异性激活了该通路的转录表达。更为重要的是,本研究通过使用特异性抑制剂进行了反向验证。当使用 LY294002 抑制 PI3K/Akt 通路后,心功能恶化、心肌坏死标志物升高、梗死范围扩大、细胞凋亡与炎症反应均加剧,且 *PI3K*、*Akt* 与 *Nrf2* 的 mRNA 表达均被显著抑制,表明瑞芬太尼的心肌保护作用依赖于 PI3K/Akt 通路的激活。值得注意的是,当使用 ML385 抑制 Nrf2 后,虽然同样观察到细胞凋亡与炎症反应的加剧,但 *PI3K* 与 *Akt* 的 mRNA 水平并未受到明显影响,仅有 Nrf2 的表达被特异性下调。这进一步表明,瑞芬太尼可能通过 PI3K/Akt 通路激活 Nrf2 发挥其抗细胞凋亡及炎症进而干预 MIRI

的作用。

本研究提示:瑞芬太尼后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤可能通过激活 PI3K/Akt/ Nrf2 信号通路,进而发挥其抗凋亡与抗炎作用,为临床瑞芬太尼保护 MIRI 提供了坚实的理论依据和新的分子靶点。然而,本研究尚存在一定局限性:首先,本研究仅从 mRNA 水平证实 PI3K/Akt/Nrf2 通路的激活,缺乏蛋白水平的验证;其次,瑞芬太尼通过激活 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路发挥抗凋亡与抗炎作用尚缺乏直接证据。未来需要更完善的证据链来支持这一结论。

参考文献:

- [1] MOKHTARI - ZAER A, MAREFATI N, ATKIN S L. The protective role of curcumin in myocardial ischemia - reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1):214—222.
- [2] KUNECKI M, OLEKSY T, MARTYNÓW J, *et al.* Remifentanyl but not sufentanil induces cardioprotection in human ischemic heart muscle *in vitro*[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2023, 24(1):25.
- [3] 陈中青, 杨华. 瑞芬太尼后处理对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响[J]. 宁夏医学杂志, 2014, 36(9):798—800.
- [4] 陈中青, 陶虹, 刘雅娟, 等. 瑞芬太尼后处理对大鼠心肌缺血再灌注细胞凋亡的影响[J]. 中国急救医学, 2014, 34(10):942—944.
- [5] LI J, HU H P, LI Y, *et al.* Influences of remifentanyl on myocardial ischemia - reperfusion injury and the expressions of Bax and Bcl - 2 in rats[J/OL]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22:8951—8960. 2018 - 12 - 18 [2026 - 01 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30575939/>.
- [6] 侯瑜. 不同剂量瑞芬太尼预处理对犬心肌缺血再灌注时血浆 TNF - α 、ICAM - 1 的影响[D]. 山西 太原:山西医科大学, 2009.
- [7] 陈中青, 侯丹丹, 王伟. 瑞芬太尼通过核因子 E2 相关因子通路增强自噬改善大鼠心肌缺血再灌注损伤的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(1):47—51.
- [8] XU Y, CAO L, ZOU W, *et al.* Panax notoginseng saponins inhibits NLRP3 inflammasome - mediated pyroptosis by downregulating lncRNA - ANRIL in cardiorenal syndrome type 4[J]. *Chin Med*, 2023, 18(1):50.
- [9] 陈婷婷, 廖献杉, 曾兰, 等. 应用新型超声诊断仪检测大鼠心功能[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(11):106—110.
- [10] 曹亚选. 舒血宁注射液对缺血再灌注损伤后大鼠心肌细胞凋亡的影响及相关机制研究[D]. 河南 郑州:河南中医药大学, 2022.
- [11] 钟文娟. 脑心通联合双联抗栓防治冠脉内微栓塞的动物实验研究[D]. 福建 福州:福建医科大学, 2010.
- [12] DENG R M, ZHOU J, DENG R M, *et al.* The role of PI3K/AKT signaling pathway in myocardial ischemia - reperfusion injury[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 123:110714. 2023 - 07 - 29 [2026 - 01 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37523969/>.
- [13] FEDE M S, DAZIANI G, TAVOLETTA F, *et al.* Myocardial ischemia/reperfusion injury: Molecular insights, forensic perspectives, and therapeutic horizons[J]. *Cells*, 2025, 14(19):1509.
- [14] GUO J, WANG S B, YUAN T Y, *et al.* Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 231(2):384—391.
- [15] MUTAILIFU D, AINI A, AIBIBULA A, LIU Z, Maimaitiaili A. Herbal munziq ameliorates myocardial ischemia - reperfusion injury by inhibiting inflammation [J/OL]. *J Vis Exp*, 2025, (215):e67179. 2025 - 01 - 10 [2026 - 01 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39878931/>.
- [16] BURNE - TANEY MJ, YOKOTA N, RABB H. Persistent renal and extrarenal immune changes after severe ischemic injury[J]. *Kidney Int*, 2005, 67(3):1002—1009.
- [17] DAVARI M, KHANSARI M, HOSSEINI S, *et al.* The Impact of Opioids on Epigenetic Modulation in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury: Focus on Non - coding RNAs[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2025, 18(6):1667—1680.
- [18] YOU Y, CHEN S, DENG H, *et al.* Remifentanyl represses oxidative stress to relieve hepatic ischemia/reperfusion injury via regulating BACH1/PRDX1 axis [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2024, 48(8):102422.
- [19] LI X, TAO Z, HUANG R, *et al.* Corilagin alleviates cardiac ischemia - reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via PI3K/AKT pathway [J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 1006:178158. 2025 - 11 - 05 [2026 - 01 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40962010/>.
- [20] LI J, GUO Y, YANG Y, *et al.* Preconditioning with acteoside ameliorates myocardial ischemia - reperfusion injury by targeting HSP90AA1 and the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2025, 31(3):77.
- [21] SAWASHITA Y, HIRATA N, YOSHIKAWA Y, *et al.* Remote ischemic preconditioning reduces myocardial ischemia - reperfusion injury through unacylated ghrelin - induced activation of the JAK/STAT pathway[J]. *Basic Res. Cardiol*, 2020, 115(4):50.
- [22] SHEN Y, LIU X, SHI J, *et al.* Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury [J/OL]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125:496—502. 2018 - 11 - 20 [2026 - 01 - 01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30468811/>.
- [23] GUAN B F, DAI X F, HUANG Q B, *et al.* Icariside II ameliorates myocardial ischemia and reperfusion injury by attenuating inflammation and apoptosis through the regulation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(4):3151—3160.

(本文编辑:王珊 收稿日期 2026 - 01 - 06)