

· 实验研究 ·

地氟醚后处理对兔心肌缺血-再灌注损伤葡萄糖转运蛋白 4 表达的影响

陈莹 吴昆鹏 王德明 游晓星

【摘要】 目的 研究地氟醚后处理对心肌缺血-再灌注损伤葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 表达的影响。方法 选择雄性新西兰白兔 24 只, 体重 4.0~5.0 kg, 随机分为四组: 正常对照组(NC 组)、缺血-再灌注组(IR 组)、缺血-再灌注后处理组(IRP 组)和地氟醚后处理组(Des 组), 每组 6 只。结扎左冠脉左室支建立心肌缺血-再灌注模型。分别于缺血前即刻(T_0)、缺血后 30 min (T_1)、再灌注后 30 min (T_2)、60 min (T_3) 和 120 min (T_4) 时采集耳缘静脉血检测血糖、胰岛素浓度和心肌葡萄糖摄取率; 采用定量 RT-PCR 法检测心肌组织 GLUT4 mRNA 表达; 采用 Western blot 法检测细胞膜 GLUT4 蛋白表达。结果 $T_2 \sim T_4$ 时 IR 组血糖浓度明显高于 NC 组 ($P < 0.05$); $T_2 \sim T_4$ 时 Des 组血糖浓度明显低于 IR 组和 IRP 组 ($P < 0.05$)。 $T_1 \sim T_3$ 时 IR、IRP 和 Des 组胰岛素浓度明显高于 NC 组 ($P < 0.05$); T_1 、 T_2 时 IRP 组和 Des 组胰岛素浓度明显高于 IR 组 ($P < 0.05$), Des 组明显高于 IRP 组 ($P < 0.05$)。 $T_2 \sim T_4$ 时 IR 组心肌葡萄糖摄取率明显低于 NC 组、IRP 组及 Des 组 ($P < 0.05$), Des 组明显高于 IRP 组 ($P < 0.05$)。 IR、IRP 和 Des 组 GLUT4 mRNA 表达及 GLUT4 蛋白表达明显少于 NC 组 ($P < 0.05$); Des 组 GLUT4 mRNA 表达和 GLUT4 蛋白表达明显多于 IR 组和 IRP 组 ($P < 0.05$)。结论 地氟醚后处理能改善兔心肌缺血-再灌注后胰岛素抵抗, 提高心肌葡萄糖摄取, 可能与提高心肌 GLUT4 表达有关。

【关键词】 地氟醚; 后处理; 缺血-再灌注损伤; 葡萄糖转运蛋白 4

Effects of desflurane post-processing on the expression of glucose transporter 4 in myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits CHEN Ying, WU Kunpeng, WANG Deming, YOU Xiaoxing. Department of Anesthesiology, The Second Hospital Affiliated to South China University, Hengyang 421001, China

Corresponding author: WU Kunpeng, Email: iron_head@yeah.net

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of desflurane post-processing on the expression of glucose transporter 4 (GLUT4) in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** Twenty-four male New Zealand white rabbits were randomly divided into 4 groups ($n = 6$ each): normal control group (group NC), ischemic-reperfusion group (group IR), ischemic-reperfusion postconditioning group (group IRP), desflurane aftertreatment group (group Des). Myocardial ischemia-reperfusion model was established by ligating the left coronary artery. Plasma glucose, Insulin and myocardial glucose uptake rate were measured at the time point before ischemia (T_0), 30 min after ischemia (T_1), 30 min (T_2), 60 min (T_3) and 120 min (T_4) after reperfusion, for dynamic comparison; the expression of GLUT4 mRNA in myocardium was detected by quantitative RT-PCR, and GLUT4 protein was detected by Western blot. **Results** Compared with group NC, the levels of blood glucose at $T_2 \sim T_4$ increased in group IR ($P < 0.05$), but blood glucose in group Des was significantly lower than that in groups IR and IRP at $T_2 \sim T_4$ ($P < 0.05$). Compared with group NC, serum insulin levels in groups IR, IRP and Des were significantly higher at $T_1 \sim T_3$ ($P < 0.05$). The level of serum insulin in groups IRP and Des at T_1 and T_2 was significantly higher than that in group IR ($P < 0.05$), while that in group Des was higher than that in group IRP ($P < 0.05$). Blood glucose uptake rate in group IR at $T_2 \sim T_4$ was significantly lower than that in groups NC, IRP and Des ($P < 0.05$), while the blood glucose uptake rate was higher in group Des than that in group IRP ($P < 0.05$). Compared with group NC, the expression of GLUT4 mRNA and protein in groups IR, IRP and Des decreased ($P < 0.05$), but compared with groups IR and IRP, GLUT4 mRNA and protein expression increased in group Des

基金项目: 湖南省卫生计生委课题(C2016084)

作者单位: 421001 湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院麻醉科(陈莹、王德明), 重症医学科(吴昆鹏); 南华大学微生物研究所(游晓星)

通信作者: 吴昆鹏, Email: iron_head@yeah.net

($P < 0.05$). **Conclusion** Postconditioning of desflurane can improve myocardial ischemia-reperfusion insulin resistance and increase myocardial glucose uptake, which may be related to the increase of myocardial GLUT4 expression.

【Key words】 Desflurane; Post-processing; Ischemia-reperfusion injury; Glucose transporter 4

研究表明,心肺转流(cardiopulmonary bypass, CPB)心肌缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)过程中存在心肌胰岛素抵抗^[1,2]。其主要分子机制是心肌细胞葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4)表达下降,转位障碍,心肌摄取和利用葡萄糖的能力下降。而葡萄糖代谢异常是再灌注心肌功能障碍的重要原因^[3]。研究显示吸入麻醉药预处理在心肌保护方面有积极作用^[4]。地氟醚为含氟吸入麻醉药,它对循环系统的影响比其他吸入麻醉药小,对肝肾功能无损害。国内研究显示,地氟醚后处理能减轻缺血-再灌注损伤,对心肌具有保护作用^[5],但是其具体机制仍不明了,本研究拟建立动物实验模型,探讨吸入麻醉药地氟醚后处理对家兔心肌 GLUT4 的影响,从而揭示地氟醚可以减轻缺血-再灌注心肌损伤的可能机制,为临床使用提供理论依据。

材料与方 法

实验动物与分组 24 只成年新西兰白兔,体重 4.0~5.0 kg,由南华大学实验动物中心提供(许可证号:SYXK(湘)2015-0001),随机分为四组:正常对照组(NC 组)、缺血-再灌注组(IR 组)、缺血-再灌注后处理组(IRP 组)和地氟醚后处理组(Des 组),每组 6 只。白兔常规适应性饲养 1 周,高压灭菌饲料喂养,自由饮水,室温保持在 23℃,湿度保持在 60%。

模型制备 实验兔采用腹腔注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 进行麻醉,其后四肢仰卧固定在操作台上,剃毛消毒,沿前胸正中线偏左 0.5 cm 处切开第 4 肋至第 2 肋间皮肤,钝性分离胸部肌肉并割开肋间肌,剪断第 3 肋软骨,充分暴露胸腔,用镊子夹住心尖部心包膜轻轻提起,剪刀纵行剪开 1 cm 切口,用镊子轻轻上抬心脏暴露左心室及左冠前降支和左旋支。在左冠前降支起始部与心尖连线的起始位置用非吸收外科缝线结扎左冠脉左室支,按实验设计进行缺血-再灌注。实验完成后处死实验兔,摘取心脏留取左室组织。

实验方法 正常对照组不做处理;IR 组:缺血 30 min,再灌注 120 min;IRP 组:进行缺血-再灌注,缺血 30 min 后,即刻进行 3 个循环的 30 s

灌注和 30 s 的缺血,然后再进行 120 min 的再灌注;Des 组:再灌注前 3 min 至再灌注后 2 min 吸入地氟醚,维持呼气末地氟醚浓度为 1.0 最低肺泡有效浓度(MAC);

观察指标 分别于缺血前即刻(T_0)、缺血后 30 min (T_1)、再灌注后 30 min (T_2)、60 min (T_3) 和 120 min (T_4) 时记录兔的 HR 和 MAP,并采集耳缘静脉血检测血糖、胰岛素浓度和心肌葡萄糖摄取率,进行动态比较。采用定量 RT-PCR 法检测心肌组织 GLUT4 mRNA 表达;采用 Western blot 法检测细胞膜 GLUT4 蛋白表达。

统计分析 采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

$T_2 \sim T_4$ 时 IR 组血糖浓度明显高于 NC 组($P < 0.05$); $T_2 \sim T_4$ 时 Des 组血糖浓度明显低于 IR 组和 IRP 组($P < 0.05$)。 $T_1 \sim T_3$ 时 IR、IRP 和 Des 组胰岛素浓度明显高于 NC 组($P < 0.05$); T_1 、 T_2 时 IRP 组和 Des 组胰岛素浓度明显高于 IR 组($P < 0.05$),Des 组明显高于 IRP 组($P < 0.05$)。 $T_2 \sim T_4$ 时 IR 组心肌葡萄糖摄取率明显低于 NC 组、IRP 组及 Des 组($P < 0.05$),而 Des 组明显高于 IRP 组($P < 0.05$)(表 1)。

IR、IRP 和 Des 组 GLUT4 mRNA 表达明显少于 NC 组($P < 0.05$);Des 组 GLUT4 mRNA 表达明显多于 IR 组和 IRP 组($P < 0.05$)(图 1)。

IR、IRP 和 Des 组 GLUT4 蛋白表达明显少于 NC 组($P < 0.05$);Des 组 GLUT4 蛋白表达明显多于 IR 组和 IRP 组($P < 0.05$)(图 2)。

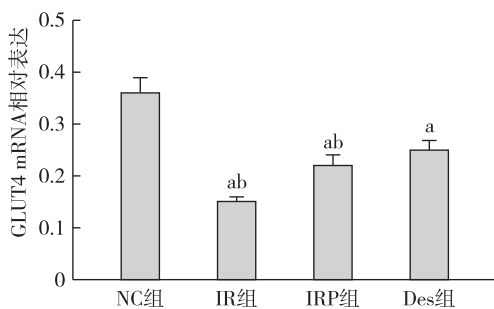
讨 论

大规模随机试验表明,缺血后处理可以减轻缺血-再灌注对心脏的损伤^[6,7]。葡萄糖代谢是心肌最重要的能量来源,心肌缺血-再灌注后存在对胰岛素介导的葡萄糖摄取和利用障碍,即存在明显的心肌胰岛素抵抗现象,而心肌胰岛素抵抗可能是引起

表 1 四组白兔不同时点血糖、胰岛素浓度和心肌糖摄取率的比较($\bar{x} \pm s$)

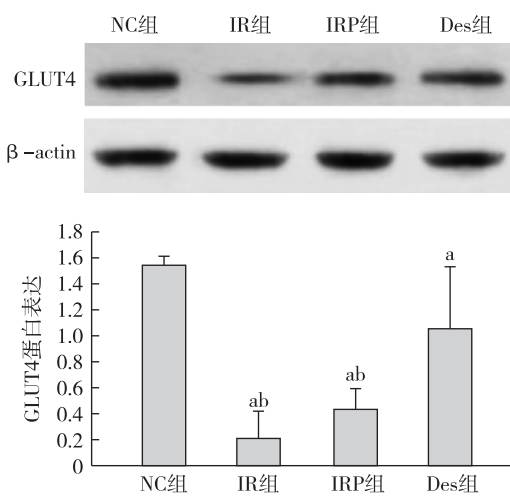
| 指标 | 组别 | 例数 | T ₀ | T ₁ | T ₂ | T ₃ | T ₄ |
|-----------------|-------|----|----------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| 血糖 (mmol/L) | NC 组 | 6 | 7.5±1.4 | 7.5±1.4 | 7.4±1.4 | 7.6±1.3 | 7.4±1.3 |
| | IR 组 | 6 | 7.5±1.5 | 13.6±2.2 | 23.5±3.5 ^a | 22.5±2.3 ^a | 17.2±3.4 ^a |
| | IRP 组 | 6 | 7.4±1.6 | 12.9±1.7 | 16.2±1.9 | 15.3±1.6 | 13.4±2.0 |
| | Des 组 | 6 | 7.4±1.3 | 10.5±1.6 | 13.6±1.2 ^{bc} | 10.0±1.1 ^{bc} | 8.5±1.2 ^{bc} |
| 胰岛素 (mIU/ml) | NC 组 | 6 | 8.5±1.2 | 8.6±1.1 | 8.5±0.9 | 8.6±0.6 | 8.6±0.9 |
| | IR 组 | 6 | 8.5±1.1 | 45.3±4.6 ^a | 34.8±2.9 ^a | 22.8±2.5 ^a | 15.1±2.2 |
| | IRP 组 | 6 | 8.7±1.2 | 133.1±22.5 ^{ab} | 107.0±12.2 ^{ab} | 15.3±4.4 ^a | 11.6±1.2 |
| | Des 组 | 6 | 8.5±1.1 | 305.5±39.1 ^{abc} | 212.3±36.5 ^{abc} | 12.6±3.2 ^a | 9.6±0.9 |
| 心肌葡萄糖 摄取率(%) | NC 组 | 6 | 15.7±6.1 | 15.9±6.0 | 16.0±6.0 | 15.2±5.8 | 15.4±6.0 |
| | IR 组 | 6 | 15.8±6.4 | 13.3±5.3 | 0 ^a | 0 ^a | 0 ^a |
| | IRP 组 | 6 | 15.7±6.3 | 14.7±5.3 | 5.7±1.2 ^b | 8.3±1.4 ^b | 9.6±1.4 ^b |
| | Des 组 | 6 | 15.4±5.8 | 15.4±5.7 | 9.8±2.9 ^{bc} | 12.6±3.1 ^{bc} | 14.6±4.5 ^{bc} |

注:与 NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与 IRP 组比较,^c $P < 0.05$



注:与 NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 Des 组比较,^b $P < 0.05$

图 1 四组白兔心肌 GLUT4 mRNA 表达的比较



注:与 NC 组比较,^a $P < 0.05$;与 Des 组比较,^b $P < 0.05$.

图 2 四组白兔心肌 GLUT4 蛋白表达的比较

动机制^[1,2]。增加心肌葡萄糖的利用可改善心脏功能,而 GLUT4 是调节心肌细胞糖代谢的主要膜蛋白,因而调节 GLUT4 的表达是改善心肌缺血-再灌注损伤重要的研究方向。

早期研究显示,心肌缺血-再灌注葡萄糖转运蛋白可用性和缺血后葡萄糖摄取之间存在差异,这可能是由于质膜中 GLUT4 的抑制造成的^[8]。进一步动物实验发现,在缺血期间,肌纤维膜 FAT/CD36 减少 32%,伴随脂肪酸氧化速率降低 95%,而心肌内脂质无变化。葡萄糖转运蛋白 GLUT4 的细胞膜含量在缺血期间增加 90%,与糖酵解速率增加 86%、糖原含量减少 45%、磷酸化 AMP 活化蛋白激酶增加 3 倍相关。在缺血期间,当 GLUT4 朝向肌膜移动时,FAT/CD36 从肌膜移开,与从脂肪酸氧化转变为糖酵解相关,同时防止了心肌内脂质积累^[9]。这表明心肌缺血-再灌注时葡萄糖摄取和利用下降是由于 GLUT4 表达下降所致。缺血后处理能减轻心肌缺血-再灌注的损伤,而这一作用是否与 GLUT4 有关有待进一步探究。随后有学者研究显示,异氟醚后处理缺血-再灌注损伤小鼠模型,保护心肌的主要机制是 GLUT4 的移位^[10]。而对另一种吸入麻醉药七氟醚的研究显示,七氟醚后处理能明显促进缺血-再灌注大鼠左心室功能和心肌功能的恢复,这种功能改善伴随 GLUT4 表达的明显增加。而且七氟醚增加葡萄糖代谢和降低脂肪酸代谢,其增强的葡萄糖摄取是通过 GLUT4 的表达增加来实现的^[11]。提示吸入麻醉药后处理对心肌缺血-再灌注的保护作用可能是由于影响了 GLUT4

心肌葡萄糖氧化减少造成心肌功能障碍的潜在始

的表达。

临床研究显示,挥发性麻醉药如七氟醚能减轻体外循环下心脏瓣膜置换术患者心肌损伤^[12];动物研究也显示,七氟醚对大鼠心肌缺血-再灌注损伤有减轻作用^[13]。地氟醚是在心脏手术中经常使用的挥发性麻醉药物,其对心脏的保护作用研究也由来已久^[14]。在小鼠心脏中,地氟醚有效地减少了实验性缺血-再灌注损伤后的心肌梗死面积^[15]。在进行冠状动脉旁路移植手术的患者中,地氟醚比其他挥发性麻醉药表现出更好的心肌保护作用^[16]。本研究通过地氟醚后处理兔心肌缺血-再灌注模型显示,地氟醚的作用之一是影响心肌的糖代谢,与对照组比较,地氟醚在缺血期间没有保护作用,再灌注后即显示出糖代谢增加,胰岛素浓度及糖摄取率均升高,与缺血-再灌注组和缺血-再灌注后处理组都有明显差异,表明地氟醚后处理保护心肌的机制之一是增加了心肌的葡萄糖代谢,且这一作用是发挥在再灌注之后,与文献报道一致^[17]。进一步研究显示,与缺血-再灌注组及缺血-再灌注后处理组比较,地氟醚组 GLUT4 mRNA 表达和蛋白表达均明显增加,表明地氟醚后处理增加了心肌缺血-再灌注后 GLUT4 的表达,这可能是其影响心肌糖代谢的机制之一。但有研究中显示,血糖、胰岛素浓度及葡萄糖摄取率随时间的变化幅度并不完全一致,是否有其他影响机制尚不清楚。地氟醚影响心肌葡萄糖代谢的最优剂量、开始影响的时间、持续时间有待研究。本研究并未指出地氟醚增加心肌 GLUT4 表达的分子机制,未分析在人体代谢中的差异。这些是本研究组今后需进一步解决的问题。

综上所述,地氟醚后处理有明显的抗心肌缺血-再灌注损伤,对心肌具有保护作用。地氟醚后处理能改善兔心肌缺血-再灌注后胰岛素抵抗,提高心肌葡萄糖摄取,可能与提高心肌 GLUT4 表达有关。

参 考 文 献

- [1] Chen Q, Xu T, Li D, et al. JNK/PI3K/Akt signaling pathway is involved in myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats; effects of salvianolic acid A intervention. *Am J Transl Res*, 2016, 8(6): 2534-4258.
- [2] Wang F, Liang GY, Liu DX, et al. Effect of Si-RNA-silenced HIF-1 α gene on myocardial ischemia-reperfusion-induced insulin resistance. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15514-15520.
- [3] Kanwal A, Kasetti S, Putchu UK. Protein kinase C-mediated sodium glucose transporter 1 activation in precondition-induced cardioprotection. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 2929-2938.
- [4] 于静, 严敏. 吸入麻醉药后处理心肌保护作用机制的研究进展. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2011, 32(3): 369-373.
- [5] 刘涛. 吸入地氟醚后处理对兔心肌缺血-再灌注损伤中蛋白激酶 C 通路的影响. *武汉大学学报 (医学版)*, 2013, 34(5): 686-690.
- [6] Kaasbøll OJ, Moe IT, Ahmed MS, et al. CTGF/CCN2 postconditioning increases tolerance of murine hearts towards ischemia-reperfusion injury. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149000.
- [7] Liu SH, Huo YE, Jia XW, et al. Effects of ischemic postconditioning on expressions of pentraxin-related protein 3 and neutrophil CD11b in the plasma of patients with acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention. *Pak J Med Sci*, 2016, 32(2): 427-430.
- [8] Zaha V, Nitschke R, Göbel H, et al. Discrepancy between GLUT4 translocation and glucose uptake after ischemia. *Mol Cell Biochem*, 2005, 278(1-2): 129-137.
- [9] Heather LC, Pates KM, Atherton HJ, et al. Differential translocation of the fatty acid transporter, FAT/CD36, and the glucose transporter, GLUT4, coordinates changes in cardiac substrate metabolism during ischemia and reperfusion. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(5): 1058-1066.
- [10] Tsutsumi YM, Kawaraguchi Y, Horikawa YT, et al. Role of caveolin-3 and glucose transporter-4 in isoflurane-induced delayed cardiac protection. *Anesthesiology*, 2010, 112(5): 1136-1145.
- [11] Lucchinetti E, Wang L, Ko KW, et al. Enhanced glucose uptake via GLUT4 fuels recovery from calcium overload after ischaemia-reperfusion injury in sevoflurane-but not propofol-treated hearts. *Br J Anaesth*, 2011, 106(6): 792-800.
- [12] 岑晴云, 王晟, 余守章. 七氟醚全凭吸入麻醉对体外循环下心脏瓣膜置换术患者心肌酶的影响. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(6): 535-537.
- [13] 韩冲芳, 贺建东, 王晓鹏. 七氟醚预处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(6): 592-596.
- [14] Lemoine S, Tritapepe L, Hanouz JL, et al. The mechanisms of cardio-protective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion: anaesthetic post-conditioning potentially translatable to humans? *Br J Anaesth*, 2016, 116(4): 456-475.
- [15] Jazbutyte V, Stumpner J, Redel A, et al. Aromatase inhibition attenuates des-flurane-induced preconditioning against acute myocardial infarction in male mouse heart in vivo. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42032.
- [16] Sivanna U, Joshi S, Babu B, et al. A comparative study of pharmacological myocardial protection between sevoflurane and desflurane at anaesthetic doses in patients undergoing off pump coronary artery bypass grafting surgery. *Indian J Anaesth*, 2015, 59(5): 282-286.
- [17] Harissh R, Chiari P, Villedieu C, et al. Cyclophilin d modulates the cardiac mitochondrial target of isoflurane, sevoflurane, and desflurane. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 69(5): 326-334.

(收稿日期: 2017-02-05)