

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.23.005

基于 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路研究瑞马唑仑对心肌缺血再灌注损伤大鼠铁死亡的影响 *

王德勇 涂英兵 袁 娟 张 珏 张 禾

(苏州市中西医结合医院麻醉科 江苏 苏州 215101)

摘要 目的:基于蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路探究瑞马唑仑对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠铁死亡的影响。**方法:**将 90 只 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组、MIRI 组、低剂量-瑞马唑仑组(L-瑞马唑仑组, 5 mg/kg)、高剂量-瑞马唑仑组(H-瑞马唑仑组, 20 mg/kg)、H-瑞马唑仑+PERK 抑制剂组(瑞马唑仑 20 mg/kg+GSK2606414 1 mg/kg), 每组 18 只。采用结扎冠状动脉左前降支(LAD)0.5 h、再灌注 2 h 制备 MIRI 大鼠模型, 于再灌注 2 h 后即刻尾静脉注射给药, 再灌注 24 h 后进行组织取材。酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清心肌损伤标志物[肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)]水平; HE 染色观察心肌组织病理改变; Tunel 染色检测心肌细胞凋亡; 透射电镜观察心肌细胞超微结构变化; 检测心肌组织中铁死亡相关标志物[铁、活性氧(ROS)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)]水平; 蛋白质印迹法(Western Blot)检测心肌组织中 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达。**结果:**与 Sham 组相比, MIRI 组心肌结构受损, 纤维排列紊乱, 线粒体呈现显著的铁死亡特征(膜固缩, 膜密度增加, 嵴减少), 血清中 CK-MB、cTnI 水平, 心肌细胞凋亡率及心肌组织中铁、ROS、MDA 水平升高($P<0.05$), 心肌组织中 GSH 水平及 p-PERK/PERK、核 Nrf2/Nrf2、HO-1 蛋白表达降低($P<0.05$); 与 MIRI 组相比, L-瑞马唑仑组和 H-瑞马唑仑组心肌组织上述病理改变明显减轻, 血清 CK-MB、cTnI 水平, 心肌细胞凋亡率及心肌组织中铁、ROS、MDA 水平降低($P<0.05$), 心肌组织中 GSH 水平及 p-PERK/PERK、核 Nrf2/Nrf2、HO-1 蛋白表达升高($P<0.05$); 与 H-瑞马唑仑组相比, H-瑞马唑仑+PERK 抑制剂组心肌组织上述病理改变加重, 血清 CK-MB、cTnI 水平, 心肌细胞凋亡率及心肌组织中铁、ROS、MDA 水平升高($P<0.05$), 心肌组织中 GSH 水平及 p-PERK/PERK、核 Nrf2/Nrf2、HO-1 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论:**瑞马唑仑可通过抑制铁死亡减轻大鼠 MIRI, 可能通过激活 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路而实现。

关键词:心肌缺血再灌注损伤; 瑞马唑仑; 铁死亡; PERK/Nrf2/HO-1 信号通路

中图分类号:R-33; R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)23-4427-07

Effect of Remazolam on Ferroptosis in Rats with Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury was Studied Based on PERK/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway*

WANG De-yong, TU Ying-bing, YUAN Juan, ZHANG Jue, ZHANG He

(Department of Anesthesiology, Suzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Suzhou, Jiangsu, 215101, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of remazolam on ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) rats based on protein kinase R-like ER kinase (PERK)/nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods:** 90 SD rats were randomly grouped into sham operation (Sham) group, MIRI group, low-dose-remazolam group (L-remazolam group, 5 mg/kg), high-dose-remazolam group (H-remazolam group, 20 mg/kg), H-remazolam + PERK inhibitor group (remazolam 20 mg/kg + GSK2606414 1 mg/kg) with 18 rats in each group. The MIRI rat model was established by ligating the left anterior descending branch (LAD) of coronary artery for 0.5 h and reperfusion for 2 h. The drug was injected into the tail vein immediately after reperfusion for 2 h, and tissue samples were collected 24 h after reperfusion. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was applied to detect the levels of serum myocardial injury markers [creatinine kinase isoenzyme (CK-MB), cardiac troponin I (cTnI)]. HE staining was applied to observe the pathological changes of myocardial tissue. Tunel staining was applied to detect cardiomyocyte apoptosis. Transmission electron microscopy was applied to observe the ultrastructural changes of cardiomyocytes. The levels of ferroptosis-related markers [iron, reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA)] in myocardial tissue were detected. Western blotting (Western Blot) was applied to measure the expression of PERK/Nrf2/HO-1 signaling pathway related proteins in myocardial tissue. **Results:** Compared with the Sham group, the MIRI group had damaged myocardial structure, disordered fiber arrangement, and mitochondria showed obvious ferroptosis (membrane pyknosis, increased membrane density, and decreased cristae), the levels of serum CK-MB and cTnI, the apoptosis rate of cardiomyocytes and the levels of iron, ROS and MDA in myocardial tissue were increased ($P<0.05$).

* 基金项目:江苏省卫生健康委医学科研立项项目(ZDX2021-262)

作者简介:王德勇(1969-),男,本科,主任医师,主要从事心肌缺血麻醉与保护方向的研究, E-mail: Wangdeyong32@163.com

(收稿日期:2023-03-20 接受日期:2023-04-04)

05), the level of GSH and expressions of p-PERK/PERK, nuclear Nrf2/Nrf2 and HO-1 protein in myocardial tissue decreased ($P<0.05$). Compared with MIRI group, the above-mentioned pathological changes in myocardial tissue of L-Remazolam group and H-Remazolam group were significantly reduced, the levels of serum CK-MB and cTnI, the apoptosis rate of myocardial cells and the levels of iron, ROS and MDA in myocardial tissue were decreased ($P<0.05$), and the levels of GSH and the expressions of p-PERK/PERK, nuclear Nrf2/Nrf2 and HO-1 proteins in myocardial tissue were increased ($P<0.05$). Compared with H-Remazolam group, the above pathological changes in myocardial tissue were aggravated in H-Remazolam+PERK inhibitor group, the levels of serum CK-MB and cTnI, the apoptosis rate of myocardial cells and the levels of iron, ROS and MDA in myocardial tissue were increased ($P<0.05$), and the levels of GSH and the expressions of p-PERK/PERK, nuclear Nrf2/Nrf2 and HO-1 proteins in myocardial tissue were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Remazolam can reduce MIRI rats by inhibiting ferroptosis, which may be achieved by activating PERK/Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: Myocardial ischemia-reperfusion injury; Remazolam; Ferroptosis; PERK/Nrf2/HO-1 signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)23-4427-07

前言

缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)已成为严重威胁人类生命健康的疾病, IHD最有效的治疗方法是尽快恢复缺血组织的血流, 但研究发现, 随着血流灌注的重建, 心脏的功能并没有恢复, 反而损伤加重, 称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)^[1-2]。如何尽快恢复缺血组织的血流, 同时避免 MIRI 的发生, 是 IHD 治疗的关键。越来越多的研究显示, 许多麻醉剂有助于减轻 MIRI, 如右美托咪定、异丙酚、七氟醚等^[3-5]。瑞马唑仑是一种新型苯二氮卓类药物, 其可稳定血流动力学, 同时提供快速麻醉和苏醒, 对呼吸的抑制作用较小, 具有良好的临床应用前景^[6-7]。有研究报道, 瑞马唑仑可对脑缺血再灌注损伤大鼠发挥保护作用^[8], 鉴于缺血再灌注的病理机制的相似性, 因此, 本研究对瑞马唑仑在 MIRI 中的作用及潜在机制进行探讨。铁死亡是一种独特的细胞调控死亡形式, 其由铁积累和脂质过氧化驱动, 并以活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积为特征, 铁死亡在 MIRI 的发生和发展中起着重要的调控作用^[9,10]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)/血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)信号通路被认为是调控铁死亡的关键性信号通路之一, 该通路激活后可调节细胞内的铁和脂质代谢, 抑制脂质过氧化反应, 进而保护细胞免受铁死亡^[11,12]。此外, 有研究报道, Nrf2/HO-1 信号通路的激活在一定程度上依赖于蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)的活化^[13]。基于上述内容, 本研究通过结扎冠状动脉左前降支(left anterior descending, LAD)0.5 h、再灌注 2 h 制备大鼠 MIRI 模型, 探究瑞马唑仑在大鼠 MIRI 中的作用及其与铁死亡的关系, 揭示 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路能否作为其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 7 周龄, 体重 240~260 g, 购自宁波科瑞特动物药业有限公司(许可证号: SYXK(浙)2021-0045)。喂养环境: 光照/黑暗各 12 h 交替模式, 温度 22~26 °C, 湿度 40%~55%, 自由摄食、进水。适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 主要药物、试剂、仪器

甲苯磺酸瑞马唑仑(国药准字 H20217078)购自江苏恒瑞

医药股份有限公司; PERK 抑制剂 GSK2606414 (货号 HY-18072, 美国 MedChemExpress 公司); 大鼠肌酸激酶同工酶(creatine kinase MB isoenzyme, CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, Elisa)检测试剂盒(货号 FN-ER0841、ER0870)购自武汉菲恩生物科技有限公司; 铁检测试剂盒(货号 ab83366, 英国 Abcam 公司); ROS、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(货号 S0033S、S0052、S0131S, 购自上海碧云天生物技术有限公司); HE 染色试剂盒、Tunel 凋亡检测试剂盒(货号 PC2187、PR1846, 购自北京普非生物科技有限公司); 兔源一抗 anti-PERK、anti-p-PERK(货号 PA5-79193、PA5-40294, 美国 Invitrogen 公司); 兔源一抗 anti-Nrf2、anti-HO-1、anti-Lamin B1、anti-GAPDH(货号 ab92946、ab68477、ab16048、ab181602, 购自英国 Abcam 公司); 山羊抗兔二抗(货号 WLA023, 购自沈阳万类生物科技有限公司)。LS-20 ECG 动物心电图记录分析仪(美国 iWorx 公司); Multi-skan GO 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); BX61 光学显微镜(日本 Olympus 公司); HT7800 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司); Tanon5200 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及 MIRI 模型构建 90 只大鼠随机分为假手术(Sham)组、MIRI 组、低剂量 - 瑞马唑仑组(L-瑞马唑仑组, 5 mg/kg)、高剂量 - 瑞马唑仑组(H-瑞马唑仑组, 20 mg/kg)、H-瑞马唑仑 + PERK 抑制剂组(瑞马唑仑 20 mg/kg + GSK2606414 1 mg/kg), 每组各 18 只。

异氟醚吸入法麻醉大鼠, 行气管插管, 连接呼吸机。于胸骨左缘第 4 肋间隙切开肌层, 暴露血管, 于左心耳右缘、肺动脉左缘穿线结扎冠状动脉 LAD 0.5 h, 全程记录心电图变化, 以心电图 II 导联 ST 段抬高、T 波高耸视为缺血成功。0.5 h 后解除结扎, 再灌注 2 h, 以抬高的 ST 段逐渐回落, T 波逐渐恢复视为再灌注成功。Sham 大鼠只穿线, 而不结扎冠状动脉 LAD, 其余同 MIRI 模型大鼠。再灌注 2 h 后即刻, L-瑞马唑仑组、H-瑞马唑仑组大鼠分别尾静脉注射 5、20 mg/kg 瑞马唑仑, H-瑞马唑仑 + PERK 抑制剂组大鼠尾静脉注射 20 mg/kg 瑞马唑仑和 1 mg/kg GSK2606414, Sham 组、MIRI 组尾静脉注射等体积生理盐水。再灌注 24 h 后进行组织取材。

1.3.2 酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清心肌损伤标志物水平

每组随机选取 6 只大鼠,经腹主动脉取血,静置 2 h 后离心、收集血清,采用 CK-MB、cTnI ELISA 检测试剂盒测定血清中 CK-MB、cTnI 含量,严格按照说明书操作。

1.3.3 HE 染色观察心肌组织病理改变 取血后分离左心室缺血心肌组织,部分置于 4%多聚甲醛中固定 24 h,随之乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片(4 μm 厚),将切片脱蜡、水化后进行常规 HE 染色,于显微镜下观察心肌组织病理改变。剩余心肌组织浸于 2.5%戊二醛中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。

1.3.4 TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡 取 1.3.3 制作的石蜡切片,脱蜡至水后置于蛋白酶 K 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,随之置于 3% H_2O_2 中室温封闭 20 min,置于 TUNEL 反应液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,DAB 显色后于显微镜下观察,利用 Image J 软件计算心肌细胞凋亡率。心肌细胞凋亡率(%)=TUNEL 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.5 透射电镜观察心肌细胞超微结构变化 将 1.3.3 固定于 2.5%戊二醛中的心肌组织取出,浸于 1%锇酸中室温固定 2 h,乙醇梯度脱水后浸于丙酮溶液中渗透,而后进行包埋、超薄切片(70 nm),醋酸铀、柠檬酸铅各染色 15 min,于 HT7800 透射电镜下观察、拍照。

1.3.6 检测心肌组织中铁死亡相关标志物水平 每组随机选取 6 只大鼠,取左心室缺血心肌组织,剪碎、匀浆,离心收集上清,利用相应检测试剂盒测定上清中铁、ROS、MDA、GSH 水平,依据说明书操作。

1.3.7 蛋白质印迹法(Western Blot)检测心肌组织中 PERK/Nrf2/

HO-1 信号通路相关蛋白表达 取每组剩余 6 只大鼠的左心室缺血心肌组织,剪碎后利用 RIPA 裂解液提取总蛋白或核蛋白抽提试剂盒提取核蛋白,BCA 法测定浓度,经 2 $\times$ loading buffer 定量后进行热变性处理,利用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,随后裁胶、转膜,5%脱脂奶粉封闭,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育兔源一抗 anti-PERK (1:1 000)、anti-p-PERK (1:500)、anti-Nrf2 (1:1 000)、anti-HO-1 (1:1 000)、anti-Lamin B1 (1:1 000)、anti-GAPDH (1:2 000)(过夜),次日于室温孵育山羊抗兔二抗(1:2 000)2 h,滴加 ECL 发光液后置于 Tanon5200 凝胶成像仪中拍照,经软件 Image J 进行灰度分析。Lamin B1 为核蛋白 Nrf2 的内参蛋白;GAPDH 为细胞质蛋白(PERK、p-PERK、HO-1)的内参蛋白。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较行 One-way ANOVA 检验,进一步两两比较行 SNK-q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清心肌损伤标志物水平

与 Sham 组相比,MIRI 组血清中 CK-MB、cTnI 水平升高($P<0.05$);与 MIRI 组相比,L-瑞马唑仑组、H-瑞马唑仑组血清中 CK-MB、cTnI 水平降低($P<0.05$);与 H-瑞马唑仑组相比,H-瑞马唑仑+PERK 抑制剂组血清中 CK-MB、cTnI 水平升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组血清心肌损伤标志物水平($\bar{x}\pm s$,n=6)

Table 1 Levels of serum myocardial injury markers in each group($\bar{x}\pm s$,n=6)

Groups	CK-MB/(ng/mL)	cTnI/(ng/mL)
Sham group	1.53 $\pm$ 0.63	0.19 $\pm$ 0.05
MIRI group	12.38 $\pm$ 0.95 ^a	1.41 $\pm$ 0.08 ^a
L-remazolam group	9.16 $\pm$ 0.89 ^b	1.03 $\pm$ 0.06 ^b
H-remazolam group	4.92 $\pm$ 0.75 ^b	0.52 $\pm$ 0.05 ^b
H-remazolam + PERK inhibitor group	7.53 $\pm$ 0.84 ^c	0.84 $\pm$ 0.06 ^c
<i>F</i>	151.992	353.661
<i>P</i>	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, ^a $P<0.05$; Compared with MIRI group, ^b $P<0.05$; Compared with H-remazolam group, ^c $P<0.05$.

2.2 各组心肌组织病理改变

Sham 组心肌结构完整,心肌纤维排列整齐;MIRI 组心肌结构受损,纤维排列紊乱,部分心肌横纹消失,心肌细胞肿胀;与 MIRI 组相比,L-瑞马唑仑组、H-瑞马唑仑组心肌组织上述病理改变明显减轻;H-瑞马唑仑+PERK 抑制剂组心肌组织损伤较 H-瑞马唑仑组有所加重,见图 1。

2.3 各组心肌细胞凋亡情况

与 Sham 组相比,MIRI 组心肌细胞凋亡率升高($P<0.05$);与 MIRI 组相比,L-瑞马唑仑组、H-瑞马唑仑组心肌细胞凋亡率降低($P<0.05$);与 H-瑞马唑仑组相比,H-瑞马唑仑+PERK 抑制剂组心肌细胞凋亡率升高($P<0.05$),见图 2、表 2。

2.4 各组心肌细胞超微结构变化

Sham 组心肌细胞线粒体膜完整,嵴清晰;MIRI 组心肌细胞线粒体呈现显著的铁死亡特征,线粒体膜固缩,膜密度增加,嵴减少;与 MIRI 组相比,L-瑞马唑仑组、H-瑞马唑仑组心肌细胞线粒体铁死亡明显减轻;H-瑞马唑仑+PERK 抑制剂组心肌细胞线粒体铁死亡较 H-瑞马唑仑组有所加重,见图 3。

2.5 各组心肌组织中铁死亡相关标志物水平

与 Sham 组相比,MIRI 组心肌组织中铁、ROS、MDA 水平升高,GSH 水平降低($P<0.05$);与 MIRI 组相比,L-瑞马唑仑组、H-瑞马唑仑组心肌组织中铁、ROS、MDA 水平降低,GSH 水平升高($P<0.05$);与 H-瑞马唑仑组相比,H-瑞马唑仑+PERK 抑制剂组心肌组织中铁、ROS、MDA 水平升高,GSH 水平降低($P<0.05$),见表 3。

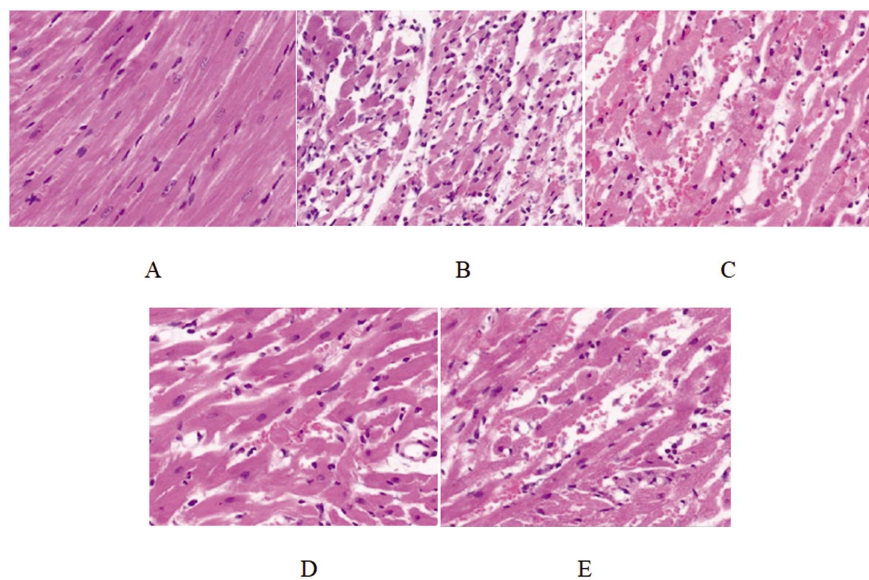


图 1 各组心肌组织形态改变(HE 染色, ×200)

Fig.1 Morphological changes of myocardial tissue in each group (HE staining, ×200)

Note: A: Sham group; B: MIRI group; C: L-remazolam group; D: H-remazolam group; E: H-remazolam + PERK inhibitor group.

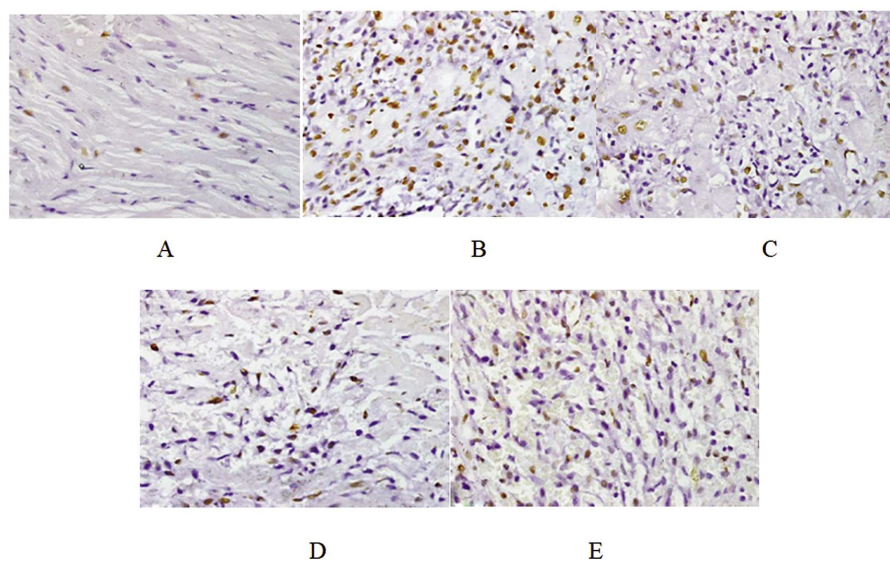


图 2 各组心肌组织形态改变(Tunel 染色, ×200)

Fig. 2 Morphological changes of myocardial tissue in each group (Tunel staining, ×200)

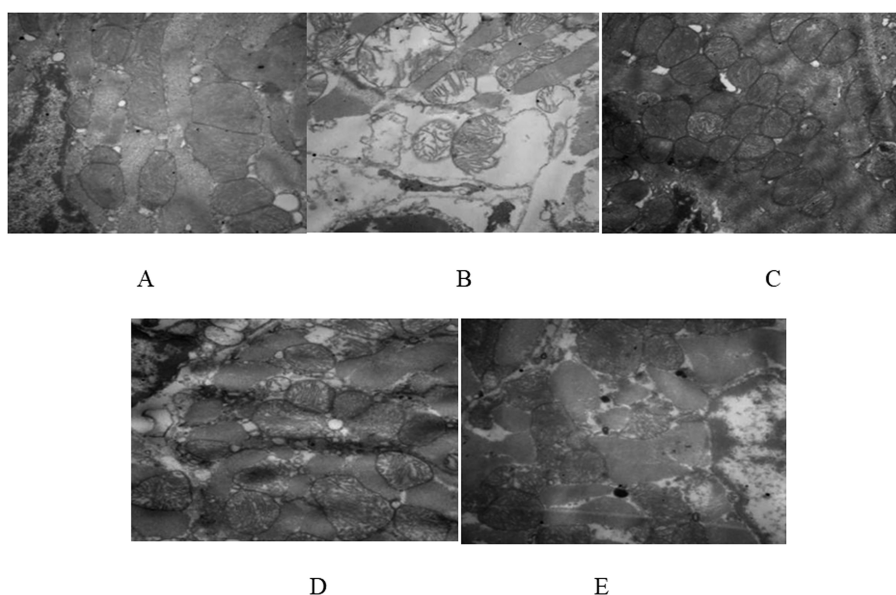
Note: A: Sham group; B: MIRI group; C: L-remazolam group; D: H-remazolam group; E: H-remazolam + PERK inhibitor group.

表 2 各组心肌细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$, n=6)

Table 2 Apoptosis rate of myocardial cells in each group($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	Apoptosis rate(%)
Sham group	5.46±1.32
MIRI group	35.83±3.61 ^a
L-remazolam group	27.59±3.45 ^b
H-remazolam group	13.92±2.94 ^b
H-remazolam + PERK inhibitor group	21.65±3.18 ^c
F	91.674
P	<0.001

Note: Compared with Sham group, ^a $P<0.05$; Compared with MIRI group, ^b $P<0.05$; Compared with H-remazolam group, ^c $P<0.05$.

图3 各组心肌细胞超微结构变化($\times 20000$)Fig. 3 Ultrastructural changes of myocardial cells in each group($\times 20000$)

Note: A: Sham group; B: MIRI group; C: L-remazolam group; D: H-remazolam group; E: H-remazolam + PERK inhibitor group.

表3 各组心肌组织中铁死亡相关标志物水平($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Levels of ferroptosis-related markers in myocardial tissue of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Iron(nmol/mg prot)	ROS(%Sham)	MDA(nmol/mg prot)	GSH(nmol/mg prot)
Sham group	0.48 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.12	8.65 $\pm$ 1.24	1.51 $\pm$ 0.16
MIRI group	2.81 $\pm$ 0.19 ^a	3.48 $\pm$ 0.35 ^a	21.38 $\pm$ 2.79 ^a	0.39 $\pm$ 0.07 ^a
L-remazolam group	2.15 $\pm$ 0.16 ^b	2.91 $\pm$ 0.26 ^b	17.26 $\pm$ 2.18 ^b	0.78 $\pm$ 0.09 ^b
H-remazolam group	0.81 $\pm$ 0.10 ^b	1.32 $\pm$ 0.16 ^b	10.52 $\pm$ 1.46 ^b	1.42 $\pm$ 0.11 ^b
H-remazolam + PERK inhibitor group	1.76 $\pm$ 0.15 ^c	2.46 $\pm$ 0.23 ^c	16.24 $\pm$ 2.15 ^c	0.85 $\pm$ 0.09 ^c
<i>F</i>	277.801	113.256	38.732	112.117
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

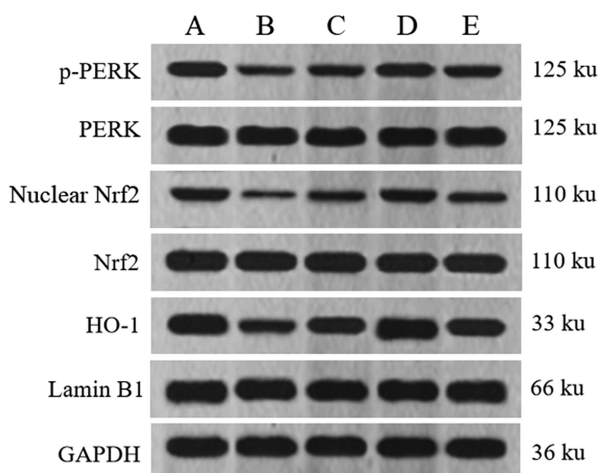
Note: Compared with Sham group, ^a $P<0.05$; Compared with MIRI group, ^b $P<0.05$; Compared with H-remazolam group, ^c $P<0.05$.

图4 各组心肌组织中 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达

Fig. 4 Expression of PERK/Nrf2/HO-1 signaling pathway related proteins in myocardial tissue of each group

2.6 各组心肌组织中 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达与 Sham 组相比, MIRI 组心肌组织中 p-PERK/PERK、核

Nrf2/Nrf2 和 HO-1 蛋白水平降低($P<0.05$);与 MIRI 组相比, L-瑞马唑仑组、H-瑞马唑仑组心肌组织中 p-PERK/PERK、核 Nrf2/Nrf2 和 HO-1 蛋白水平升高($P<0.05$);与 H-瑞马唑仑组相比, H-瑞马唑仑 + PERK 抑制剂组心肌组织中 p-PERK/PERK、核 Nrf2/Nrf2 和 HO-1 蛋白水平降低($P<0.05$), 见图4、表4。

3 讨论

MIRI 发生于 IHD 患者接受静脉溶栓、介入手术、外科搭桥手术等再灌注治疗过程中, 其是影响患者预后的重要危险因素^[14,15]。最近研究表明, 围手术期应用的麻醉剂如右美托咪定、异丙酚、七氟醚等可在一定程度上预防或减轻 MIRI^[3-5]。瑞马唑仑是一种静脉麻醉剂, 其不仅起效快、恢复快, 且低血压、呼吸抑制等副作用小^[16,17]。然而, 同为麻醉剂的瑞马唑仑在 MIRI 中的作用尚不清楚。据报道, 瑞马唑仑对脑缺血再灌注损伤大鼠有保护作用, 可改善其神经功能障碍, 减轻神经元损伤^[8]。由于 MIRI 和脑缺血再灌注损伤具有相似的病理机制, 即主要是缺

表 4 各组心肌组织中 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Expression of PERK/Nrf2/HO-1 signaling pathway-related proteins in myocardial tissue of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	p-PERK/PERK	Nuclear Nrf2/Nrf2	HO-1/GAPDH
Sham group	0.64±0.07	0.46±0.05	1.12±0.07
MIRI group	0.23±0.03 ^a	0.13±0.02 ^a	0.38±0.04 ^a
L-remazolam group	0.34±0.04 ^b	0.22±0.03 ^b	0.62±0.07 ^b
H-remazolam group	0.55±0.07 ^b	0.40±0.05 ^b	1.03±0.08 ^b
H-remazolam + PERK inhibitor group	0.38±0.04 ^c	0.27±0.02 ^c	0.71±0.06 ^c
<i>F</i>	58.856	80.284	129.070
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, ^a*P*<0.05; Compared with MIRI group, ^b*P*<0.05; Compared with H-remazolam group, ^c*P*<0.05.

血缺氧导致能量生成的减少,钙离子进入细胞增多,氧自由基生成增加,抗氧化酶活性下降,诱导细胞损伤,进一步加重组织损伤^[18,19]。因此,推测瑞马唑仑可能对 MIRI 具有保护作用。在本研究中,MIRI 大鼠经 L- 瑞马唑仑、H- 瑞马唑仑给药干预后,其血清中 CK-MB、cTnI 水平和心肌细胞凋亡率降低,同时心肌组织病理损伤减轻,表明瑞马唑仑可对 MIRI 大鼠发挥保护作用,缓解其心肌损伤。

大量证据表明,铁死亡在 MIRI 的病理生理过程中起着重要作用,抑制铁死亡有助于减轻 MIRI^[20,21]。铁死亡为一种铁依赖的脂质过氧化物积累引发的细胞死亡形式,伴有特征性的形态学变化,包括线粒体皱缩,膜密度增加,嵴数量减少或消失,生化表现主要有 ROS 堆积,毒性脂质过氧化产物 MDA 大量产生,同时伴随 GSH 抗铁死亡介质的耗竭^[22,23]。本研究通过透射电镜观察显示,MIRI 大鼠心肌细胞线粒体呈现显著的铁死亡特征,线粒体膜固缩,膜密度增加,嵴减少,同时铁、ROS、MDA 水平升高,GSH 水平降低,表明 MIRI 大鼠心肌细胞发生了铁死亡。而经 L- 瑞马唑仑、H- 瑞马唑仑给药干预后,MIRI 大鼠心肌细胞铁死亡程度明显减轻,表明瑞马唑仑可通过抑制铁死亡发挥心肌保护作用。

Nrf2/HO-1 信号通路是调控铁死亡的重要通路^[24,25]。Nrf2 是抗氧化系统的关键调节因子,其在正常条件下锚定于胞质中,而在氧化刺激条件下 Nrf2 发生核易位而活化,启动 HO-1 抗氧化基因转录,调节铁代谢、脂质代谢,以保护细胞免受铁死亡^[26,27]。据报道,激活 Nrf2/HO-1 信号通路可通过抑制铁死亡减轻糖尿病小鼠和 MIRI 大鼠的心肌损伤^[28,29]。此外,Fujiki T 等^[30]人的报道发现在慢性肾病小鼠模型中,PERK 磷酸化后可激活 Nrf2/HO-1 抗氧化途径改善小鼠肾功能;Wang J 等^[31]人的研究显示,激活 PERK/Nrf2/HO-1 通路可通过改善内质网应激保护小鼠心肌组织免受缺血再灌注损伤;以上研究表明 PERK 磷酸化后能够直接诱导 Nrf2 活化,促进抗氧化和细胞保护蛋白的表达。因此,激活 PERK/Nrf2/HO-1 通路对抑制铁死亡的发生有重要意义。为了探究瑞马唑仑抑制心肌铁死亡对 MIRI 大鼠发挥保护作用是否与激活 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路有关,本研究首先检测了经 L- 瑞马唑仑、H- 瑞马唑仑给药干预后 MIRI 大鼠心肌组织中 p-PERK、核 Nrf2/HO-1 蛋白表达变化,结果显示三者表达均升高。然后本研究在 H- 瑞马唑仑干预的基础

上增加 PERK 抑制剂干预,结果发现,PERK 抑制剂可明显减弱 H- 瑞马唑仑对 MIRI 大鼠心肌损伤和铁死亡的抑制作用。这两部分结果共同表明瑞马唑仑抑制心肌铁死亡对 MIRI 大鼠发挥保护作用与激活 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路有关。

综上所述,瑞马唑仑可通过抑制铁死亡减轻大鼠 MIRI,可能通过激活 PERK/Nrf2/HO-1 信号通路而实现,期望本研究可为揭示瑞马唑仑的心肌保护作用提供参考依据。本研究从铁死亡的角度初步探讨了瑞马唑仑对心肌损伤的保护作用,但由于 MIRI 的发病机制复杂,瑞马唑仑能否通过其他通路或靶点发挥心肌保护作用,仍需进一步探索。

参考文献(References)

- [1] 王根弟,田心,张军茹. 心肌缺血再灌注损伤的代谢组学研究进展[J]. 宁夏医科大学学报, 2023, 45(1): 99-105
- [2] Cai W, Liu L, Shi X, et al. Alox15/15-HpETE Aggravates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Cardiomyocyte Ferroptosis[J]. Circulation, 2023,147(19): 1444-1460
- [3] Ren J, Li C, Liu Y, et al. Protective effect of dexmedetomidine against myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. Acta Cir Bras, 2018, 33(1): 22-30
- [4] Chen X, Wang Y, Xiao ZY, et al. Effect of propofol on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through JAK/STAT signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(14): 6330-6338
- [5] Ma N, Dai X, Zhan H. Sevoflurane improves myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via SIRT1-ERK1/2 pathway [J]. Minerva Med, 2021, 112(5): 666-667
- [6] Keam SJ. Remimazolam: first approval [J]. Drugs, 2020, 80 (6): 625-633
- [7] 金宝伟,蒋宗明,郭建荣. 瑞马唑仑的临床应用与研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(12): 1444-1448
- [8] Shi M, Chen J, Liu T, et al. Protective effects of remimazolam on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting of NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 413-423
- [9] Zhao WK, Zhou Y, Xu TT, et al. Ferroptosis: opportunities and challenges in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 9929687
- [10] 叶宇恒,钱玲玲,王如兴,等. 心肌缺血再灌注损伤中铁死亡的调控机制研究进展[J]. 心血管病学进展, 2023, 44(5): 416-419

- [11] Liu XJ, Lv YF, Cui WZ, et al. Icarin inhibits hypoxia/reoxygenation-induced ferroptosis of cardiomyocytes via regulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. FEBS Open Bio, 2021, 11 (11): 2966-2976
- [12] 丁虹,吴紫陆,蔡纪堂. 基于 PERK/Nrf2 信号通路研究山豆根提取物诱导鼻咽癌细胞铁死亡作用机制[J]. 中草药, 2023, 54(8): 2471-2479
- [13] Wang J, Lu L, Chen S, et al. PERK overexpression-mediated Nrf2/HO-1 pathway alleviates hypoxia/reoxygenation-induced injury in neonatal murine cardiomyocytes via improving endoplasmic reticulum stress[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 6458060
- [14] Zhou M, Yu Y, Luo X, et al. Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: Therapeutics from a Mitochondria-Centric Perspective [J]. Cardiology, 2021, 146(6): 781-792
- [15] Mokhtari-Zaer A, Marefati N, Atkin SL, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2018, 234(1): 214-222
- [16] Oka S, Satomi H, Sekino R, et al. Sedation outcomes for remimazolam, a new benzodiazepine [J]. J Oral Sci, 2021, 63 (3): 209-211
- [17] 贾涛,刘辉,滕金亮. 瑞马唑仑的药理特点、安全性及联合用药研究进展[J]. 中国药房, 2023, 34(8): 1020-1024
- [18] 侯凯,谭昊宇,刘静,等. 心肌缺血再灌注损伤的防治新靶点寻找及其研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(2): 164-170
- [19] 夏君彦,李冬. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(21): 3329-3334
- [20] Lillo-Moya J, Rojas-Solé C, Muñoz-Salamanca D, et al. Targeting ferroptosis against ischemia/reperfusion cardiac injury [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(5): 667
- [21] Li T, Tan Y, Ouyang S, et al. Resveratrol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuating ferroptosis[J]. Gene, 2022, 808: 145968
- [22] Wu X, Li Y, Zhang S, et al. Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease[J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3052-3059
- [23] Zhang Y, Xin L, Xiang M, et al. The molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cardiovascular disease [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 145: 112423
- [24] 谭雄,陈洁,熊国祚,等. 毛蕊异黄酮通过 Nrf2/HO-1 信号途径诱导人甲状腺癌 FTC-133 细胞发生铁死亡[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30 (18): 3269-3274
- [25] 王艳,孙照阳,任欣会,等. 姜黄素通过 Nrf2/HO-1 通路抑制高糖诱导的 Neuro-2a 细胞铁死亡的作用 [J]. 福建医科大学学报, 2023, 57 (2): 79-88
- [26] Ma H, Wang X, Zhang W, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 9067610
- [27] Chen Y, Zhang P, Chen W, et al. Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Immunol Lett, 2020, 225: 9-15
- [28] 杨素清,何天乐,苏军华,等. 五味子乙素调控 Nrf2/HO-1/GPX4 铁死亡途径减轻糖尿病小鼠心肌损伤的机制研究 [J]. 中药材, 2022, 45(7): 1714-1722
- [29] 陈玉,苏建军,韩允,等. 富马酸二甲酯调控 Nrf2-GPX4 介导的铁死亡途径对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用研究 [J]. 天津医药, 2022, 50(6): 601-607
- [30] Fujiki T, Ando F, Murakami K, et al. Tolvaptan activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway through PERK phosphorylation [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9245
- [31] Wang J, Lu L, Chen S, et al. Up-regulation of PERK/Nrf2/HO-1 axis protects myocardial tissues of mice from damage triggered by ischemia-reperfusion through ameliorating endoplasmic reticulum stress[J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2020, 10(3): 500-511