

右美托咪定对心肌缺血/再灌注损伤模型大鼠心肌损伤的保护作用及其机制

李爱梅, 韩静霏, 邓 莉, 陈思宇

(新疆医科大学第一附属医院麻醉科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘 要] **目的:** 探讨右美托咪定 (Dex) 对大鼠心肌缺血/再灌注损伤 (MIRI) 的保护作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 取 48 只 SD 大鼠, 随机分为对照组、模型组、Dex 组和 Dex+Compound C 组, 每组 12 只。采用冠状动脉左前降支结扎法构建 MIRI 模型, 利用超声心动图评估各组大鼠心功能, HE 染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现, 试剂盒检测各组大鼠血清中心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 水平和己糖激酶 (HK)、磷酸果糖激酶 (PFK) 及丙酮酸激酶 (PKM) 活性, 高效液相色谱 (HPLC) 法检测各组大鼠心肌能量代谢物三磷酸腺苷 (ATP)、二磷酸腺苷 (ADP) 和一磷酸腺苷 (AMP) 水平并计算能荷 (EC), 免疫组织化学法和 Western blotting 法检测各组大鼠心肌组织中 Toll 样受体 4 (TLR4)、巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF)、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 及磷酸化 AMPK (p-AMPK) 蛋白表达情况。**结果:** 与对照组比较, 模型组大鼠左心室射血分数 (EF)、缩短分数 (FS)、心输出量 (CO) 和每搏输出量 (SV) 均明显降低 ($P<0.05$); 血清中 cTnI 水平明显升高 ($P<0.05$), HK、PFK 和 PKM 活性明显降低 ($P<0.05$); 心肌组织中 ATP 和 ADP 水平及 EC 均明显降低 ($P<0.05$), AMP 水平明显升高 ($P<0.05$); 心肌组织中 TLR4 和 MIF 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), p-AMPK/AMPK 比值降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, Dex 组大鼠 EF、FS、CO 和 SV 均明显升高 ($P<0.05$); 血清中 cTnI 水平明显降低 ($P<0.05$), HK 和 PKM 活性明显升高 ($P<0.05$); 心肌组织中 ATP 和 ADP 水平及 EC 明显升高 ($P<0.05$); 心肌组织中 TLR4 和 MIF 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$), p-AMPK/AMPK 比值升高 ($P<0.05$)。与 Dex 组比较, Dex+Compound C 组大鼠 EF、FS、CO 和 SV 明显降低 ($P<0.05$), 血清中 cTnI 水平升高 ($P<0.05$), PKM 活性降低 ($P<0.05$); 心肌组织中 ATP 和 ADP 水平及 EC 明显降低 ($P<0.05$); 心肌组织中 TLR4 和 MIF 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), p-AMPK/AMPK 比值降低 ($P<0.05$)。**结论:** Dex 通过抑制 TLR4/MIF 信号通路并激活 AMPK 磷酸化, 进而改善 MIRI 后心肌能量代谢失衡及心肌功能障碍, 其疗效可被 AMPK 抑制剂 Compound C 拮抗, Dex 通过调控 TLR4/MIF/AMPK 信号通路发挥心肌保护作用。

[关键词] 右美托咪定; 心肌缺血再灌注损伤; Toll 样受体 4; 能量代谢; 一磷酸腺苷活化蛋白激酶

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-05-20 **[录用日期]** 2025-08-06

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金项目 (2022D01C229)

[作者简介] 李爱梅 (1987—), 女, 江苏省江阴市人, 副主任医师, 医学博士, 主要从事围术期心肌保护方面的研究。

[通信作者] 陈思宇, 副主任医师 (E-mail: 53615367@qq.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Protective effect of dexmedetomidine on myocardial injury in myocardial ischemia/reperfusion injury model rats

LI Aimei, HAN Jingfei, DENG Li, CHEN Siyu

(Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the protective effect of dexmedetomidine (Dex) on myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI) in the rats, and to clarify its mechanism. **Methods:** Forty-eight SD rats were randomly divided into control group, model group, Dex group, and Dex+Compound C group, with 12 rats in each group. The MIRI model was established by ligation of left anterior descending coronary artery. Echocardiography was used to evaluate the cardiac function of the rats in various groups; HE staining was used to observe the pathomorphology of myocardium tissue of the rats in various groups; kits were used to detect the serum level of cardiac troponin I (cTnI) and the activities of hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), and pyruvate kinase (PKM) of the rats in various groups; high performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the levels of myocardial energy metabolites adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP) in myocardium tissue of the rats in various groups, and the energy charge (EC) was calculated; immunohistochemistry and Western blotting method were used to detect the expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), macrophage migration inhibitory factor (MIF), AMP-activated protein kinase (AMPK) and phosphorylated AMPK (p-AMPK) proteins in myocardium tissue of the rats in various groups. **Results:** Compared with control group, the left ventricular ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), cardiac output (CO), and stroke volume (SV) of the rats in model group were significantly decreased ($P<0.05$); the serum level of cTnI was significantly increased ($P<0.05$), and the activities of HK, PFK, and PKM were significantly decreased ($P<0.05$); the levels of ATP and ADP and EC in myocardium tissue were significantly decreased ($P<0.05$), while the level of AMP was significantly increased ($P<0.05$); the expression levels of TLR4 and MIF proteins in myocardium tissue were increased ($P<0.05$), and the p-AMPK/AMPK ratio was decreased ($P<0.05$). Compared with model group, the EF, FS, CO, and SV of the rats in Dex group were significantly increased ($P<0.05$); the serum level of cTnI was significantly decreased ($P<0.05$), and the activities of HK and PKM were significantly increased ($P<0.05$); the levels of ATP and ADP and EC in myocardium tissue were significantly increased ($P<0.05$); the expression levels of TLR4 and MIF proteins in myocardium tissue were decreased ($P<0.05$), and the p-AMPK/AMPK ratio was increased ($P<0.05$). Compared with Dex group, the EF, FS, CO, and SV of the rats in Dex+Compound C group were significantly decreased ($P<0.05$), the serum level of cTnI was increased ($P<0.05$), and the PKM activity was decreased ($P<0.05$); the levels of ATP and ADP and EC in myocardium tissue were significantly decreased ($P<0.05$); the expression levels of TLR4 and MIF proteins in myocardium tissue were increased ($P<0.05$), and the p-AMPK/AMPK ratio was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Dex improves the imbalance of myocardial energy metabolism and myocardial dysfunction after MIRI by inhibiting TLR4/MIF signaling and activating AMPK phosphorylation. Its therapeutic effect can be antagonized by the AMPK inhibitor Compound C; Dex plays the cardioprotective effect by regulating the TLR4/MIF/AMPK signaling pathway.

KEYWORDS Dexmedetomidine; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Toll-like receptor 4; Energy metabolism; Adenosine monophosphate-activated protein kinase

心肌缺血/再灌注损伤 (myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI) 作为心肌梗死常见预后不良反应, 其机制涉及氧化应激、钙超载、炎症反应和能量代谢失衡等^[1]。MIRI缺血期, 心肌细胞依赖无氧糖酵解供能, 导致乳酸堆积和三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 耗竭; 再灌注期, 线粒体功能受损, 能量代谢紊乱, 形成恶性循环^[2]。因此, 靶向调控能量代谢可成为改善 MIRI 新策略。

Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 及其下游炎症介质巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 在 MIRI 中明显激活^[3], 并通过抑制一磷酸腺苷 (adenosine monophosphate, AMP) 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 磷酸化来加重代谢失衡^[4]。AMPK作为能量代谢的“核心传感器”, 其具有重塑能量稳态作用, 近年来已成为 MIRI 治疗热门靶点。右美托咪定 (dexmedetomidine, Dex) 具有抗炎和抗氧化作用。研究^[5]显示: Dex可降低围术期心肌梗死风险, 降低心脏手术患者心肌酶水平, 并改善预后。动物研究^[6]显示: Dex可明显减少小鼠 MIRI 后梗死面积。然而, Dex改善作用机制是否与 TLR4/MIF/AMPK 信号通路调控的能量代谢相关, 仍待深入探讨。本研究探讨 Dex 通过调控 TLR4/MIF/AMPK 信号通路改善心肌能量代谢的核心机制, 为靶向代谢干预 MIRI 提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 48只SD大鼠, 6~8周龄, 雄性, SPF级, 体质量180~210 g, 购自新疆医科大学实验动物中心。所有大鼠饲养于 SPF 级动物房, 温度为 22℃~26℃, 湿度为 30%~70%, 12 h 昼夜循环, 并给予充足的辐照灭菌饲料和饮用水源。本研究动物实验通过本院伦理委员会审核批准 (伦理审批号: K202412-16)。Dex 注射液购自江苏恒瑞医药股份有限公司, AMPK 抑制剂 Compound C 购自美国 MCE 公司, HE 染色试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司; 心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 己糖激酶 (hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase, PFK) 和丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PKM) 试剂盒购自南京建成生

物工程研究所, ATP、二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 和 AMP 标准品购自美国阿拉丁生化科技有限公司, 抗大鼠 TLR4 蛋白抗体、抗大鼠 MIF 蛋白抗体、抗大鼠磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, p-AMPK) (Thr172) 蛋白抗体和抗大鼠 AMPK 蛋白抗体购自北京博奥森生物科技有限公司, 抗大鼠 β -actin 蛋白抗体购自武汉博士德生物科技有限公司。心电图检测仪 (型号: iMEC 10/12) 和超声成像系统 (型号: Resona 6/7/8) 购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司, 高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 仪 (型号: LC-2030/20240) 购自株式会社岛津制作所, 酶标仪 (型号: Fc) 购自美国 Thermo 公司, 化学发光成像仪 (型号: ChemiDoc XRS+) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 MIRI 模型构建和实验动物给药 48只大鼠随机分为对照组、模型组、Dex 组和 Dex+Compound C 组。采用冠状动脉左前降支结扎法构建大鼠 MIRI 模型^[6-7]。除对照组外, 其他各组大鼠禁食 12 h, 以 50 mg·kg⁻¹ 戊巴比妥钠麻醉, 于胸骨左侧纵行切开皮肤及皮下组织, 暴露第三、四肋间胸膜。以呼吸机通气维持呼吸。刀尖至左乳头间裂隙之间做切口, 分离肌肉进入肋间隙。在第三、四肋骨之间横向切开, 切除第四肋骨以暴露心脏。用生理盐水棉球保护肺部, 解剖心包, 定位左心房。将左前降支与 PVC 管短接并固定, 诱发缺血并记录变化。缺血后 30 min, 缓慢拉出结扎线, 恢复心肌血供。观察 ST 段抬高或 T 波异常, 确认 MIRI。对照组大鼠于麻醉后给予相同操作, 暴露心脏, 缝合伤口, 不作缺血再灌注处理。

对照组和模型组大鼠于造模前 30 min 腹腔注射生理盐水 (10 mL·kg⁻¹), MIRI 建模期间, 采用尾静脉滴注生理盐水至心肌缺血结束 (0.5 mL·kg⁻¹·h⁻¹)。Dex 组和 Dex+Compound C 组大鼠于建模前 30 min 腹腔注射 Dex, 负荷剂量为 5 μ g·kg⁻¹, 心肌缺血期维持剂量 0.5 μ g·kg⁻¹·h⁻¹ 至缺血结束。Dex+Compound C 组大鼠于建模前 1 h 腹腔注射 Compound C (0.5 mg·kg⁻¹)^[7]。

1.3 超声成像系统检测各组大鼠心功能指标 建模后 24 h, 各组大鼠经 50 mg·kg⁻¹ 戊巴比妥钠麻醉, 颈部和胸部毛发备皮, 采用超声成像系统检测各组大鼠心功能指标, 记录主动脉血流速度时间积分 (velocity time integral, VTI)、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)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD) 和心率 (heart rate, HR), 并分别计算每搏输出量 (stroke volume, SV)、左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、缩短分数 (fractional shortening, FS) 和心输出量 (cardiac output, CO)。 $SV = LVEDV - LVESV$; $LVEF = SV / LVEDV \times 100\%$; $FS = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100\%$; $CO = SV \times HR$ 。

1.4 HE染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现

超声心动图检测完成后, 各组大鼠经 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 戊巴比妥钠麻醉后放血处死。随机取4只大鼠心脏组织, 置于10%中性缓冲甲醛溶液中固定, 48 h后, 去除组织水分, 在梯度浓度乙醇溶液中脱水。将脱水后组织放入二甲苯中透化, 放入熔融的石蜡中包埋。将包埋好的组织块切成 $5 \sim 8 \mu\text{m}$ 切片, 进行脱蜡处理, 经梯度浓度乙醇溶液水化。将切片置入苏木精染液中染色 $3 \sim 5 \text{ min}$ 。流水冲洗切片, 去除多余的染液, 置入1%盐酸乙醇液中分化 $10 \sim 30 \text{ s}$ 。流水冲洗切片, 终止分化, 放入0.5%氨水中返蓝 $1 \sim 2 \text{ min}$ 。将切片置入伊红染液中染色 $1 \sim 2 \text{ min}$, 流水冲洗切片, 去除多余的染液。将染色后切片经梯度乙醇脱水、二甲苯透化, 置于玻片上, 中性树脂封片处理。于光学显微镜下观察大鼠心肌组织病理形态表现, 并采集数字化图像。

1.5 试剂盒检测各组大鼠血清中cTnI水平和心肌组织中HK、PFK及PKM活性 大鼠处死前, 收集各组大鼠血液, 室温静置2 h后, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集上清液。处死后, 收集各组大鼠左前降支供血区域心肌组织, 加入裂解液后, 低温条件下机械匀浆, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集上清液。严格按照ELISA试剂盒说明书操作, 检测各组大鼠血清中cTnI水平和心肌组织中HK、PFK及PKM活性。

1.6 HPLC法检测各组大鼠心肌组织中ATP、ADP和AMP水平 大鼠处死后, 收集各组大鼠左前降支供血区域心肌组织, -80°C 保存备用。取心肌组织精确称质量后剪碎, 与预冷的生理盐水混合后匀浆, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集上清液

通过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤蛋白, 用于HPLC法分析。色谱条件: C18反相色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 流动相为磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 与甲醇混合液 (1:1), 梯度洗脱, 色谱流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 紫外检测器检测波长为 254 nm , 柱温 30°C 。每个样品进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。采用HPLC软件计算ATP、ADP和AMP的峰面积。使用ATP、ADP和AMP标准品配置不同浓度标准样品溶液, 相同条件下进样后记录峰面积, 绘制标准曲线。根据标准曲线计算各组大鼠心肌组织中ATP、ADP和AMP水平, 并计算能荷 (energy charge, EC)。 $EC = (ATP + 0.5 \times ADP) / (ATP + ADP + AMP)$ 。

1.7 免疫组织化学染色检测各组大鼠心肌组织中p-AMPK蛋白表达情况 将包埋好的各组大鼠心肌组织块切成厚度 $5 \sim 8 \mu\text{m}$ 切片, 进行脱蜡处理, 经梯度浓度乙醇溶液水化。将切片放入稀释好的p-AMPK一抗中, 4°C 孵育过夜。用PBS缓冲液洗去一抗, 加入相应的二抗, 室温孵育1 h。加入3, 3'-二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 试剂显色, 于显微镜下观察, 控制反应时间, 使阳性部位呈棕褐色。然后用苏木精复染细胞核。梯度乙醇脱水, 再用二甲苯透明, 最后用中性树脂封片。采用光学显微镜观察各组大鼠左前降支供血区域心肌组织中p-AMPK蛋白表达情况, 并拍照记录。

1.8 Western blotting法检测各组大鼠心肌组织中TLR4、MIF、p-AMPK和AMPK蛋白表达水平 各组大鼠处死后, 收集大鼠左前降支供血区域心肌组织, -80°C 保存备用。取心肌组织精确称取100 mg组织后剪碎, 加入 $500 \mu\text{L}$ 放射性免疫沉淀分析缓冲液 (radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA) 进行组织匀浆, 提取蛋白。 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集上清液, 加入上样缓冲液后, 煮沸制成待测样品。取十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶, 上样后开启电泳, 待上样缓冲液到达底部, 终止电泳。将凝胶上蛋白经湿法转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 经牛血清封闭后, 分别滴加一抗和二抗稀释液孵育。PVDF膜上滴加显影液, 在化学发光成像仪下显影, 获得目的蛋白条带, 采用Image J软件分析目

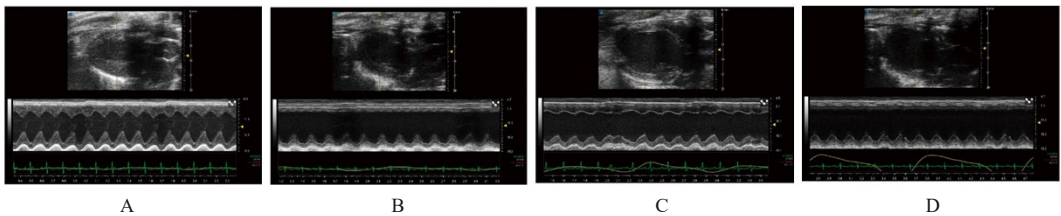
的蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。计算各组大鼠心肌组织中 p-AMPK/AMPK 比值。

1.9 统计学分析 采用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。各组大鼠 LVEF、FS、CO 和 SV, 心肌组织中 HK、PFK 和 PKM 活性, ATP、ADP 和 AMP 水平及 EC, 以及心肌组织中各蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组

间样本均数两两比较采用 Dunnett's 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌功能 与对照组比较, 模型组大鼠 LVEF、FS、CO 和 SV 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Dex 组大鼠 LVEF、FS、CO 和 SV 明显升高 ($P < 0.05$); 与 Dex 组比较, Dex+Compound C 组大鼠 LVEF、FS、CO 和 SV 明显降低 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 1。



A: Control group; B: Model group; C: Dex group; D: Dex+Compound C group.

图1 各组大鼠超声心动图图像

Fig. 1 Echocardiogram images of rats in various groups

表1 各组大鼠心功能指标

Tab. 1 Cardiac function indexes of rats in various groups (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	LVEF ($\eta/\%$)	FS ($\eta/\%$)	CO ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	SV ($\text{V}/\mu\text{L}$)
Control	79.38 $\pm$ 3.73	51.36 $\pm$ 3.28	104.19 $\pm$ 2.61	282.38 $\pm$ 11.31
Model	39.34 $\pm$ 4.70*	26.08 $\pm$ 2.39*	29.40 $\pm$ 3.39*	94.47 $\pm$ 7.70*
Dex	58.98 $\pm$ 5.27 Δ	38.98 $\pm$ 2.58 Δ	63.63 $\pm$ 4.23 Δ	196.13 $\pm$ 13.76 Δ
Dex+Compound C	40.62 $\pm$ 4.19 $\#$	30.60 $\pm$ 2.96 $\#$	36.73 $\pm$ 1.84 $\#$	106.45 $\pm$ 6.92 $\#$

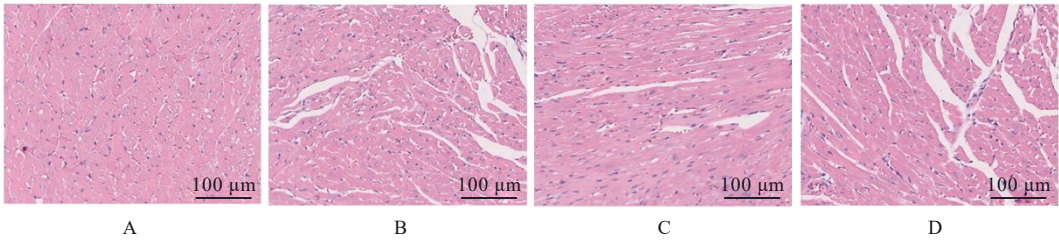
* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group; $\# P < 0.05$ vs Dex group.

2.2 各组大鼠心肌组织病理形态表现 对照组大鼠心肌细胞排列整齐, 细胞核形态规则 (无固缩或碎裂), 胞质染色均匀, 间质无水肿或炎性细胞浸润。模型组大鼠心肌细胞排列紊乱, 部分细胞边界模糊, 核固缩和间质水肿现象明显, 可见炎性细胞浸润及局灶性坏死区域。与模型组比较, Dex 组大鼠心肌细胞排列接近正常, 仅局部轻微紊乱, 核固缩比例降低, 间质水肿及炎性浸润减轻。与 Dex 组比较, Dex+Compound C 组大鼠心肌细胞排列紊乱程度加重, 核固缩比例回升, 间质水肿及炎性浸润未见明显改善。见图 2。

2.3 各组大鼠血清中 cTnI 水平和心肌组织中 HK、PFK 及 PKM 活性 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 cTnI 水平明显升高 ($P < 0.05$), 大鼠心肌组织中 HK、PFK 和 PKM 活性明显降低 ($P < 0.05$)。

与模型组比较, Dex 组大鼠血清中 cTnI 水平明显降低 ($P < 0.05$), 大鼠心肌组织中 HK 和 PKM 活性明显升高 ($P < 0.05$), PFK 活性有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Dex 组比较, Dex+Compound C 组大鼠血清中 cTnI 水平明显升高 ($P < 0.05$), 大鼠心肌组织中 PKM 活性明显降低 ($P < 0.05$), HK 和 PFK 活性有降低趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 各组大鼠心肌组织中 ATP、ADP 和 AMP 水平及 EC 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中 ATP 和 ADP 水平明显降低 ($P < 0.05$), AMP 水平明显升高 ($P < 0.05$), EC 明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Dex 组大鼠心肌组织中 ATP 和 ADP 水平明显升高 ($P < 0.05$), AMP 水平明显降低 ($P < 0.05$), EC 明显升高 ($P < 0.05$);



A:Control group; B:Model group; C:Dex group; D:Dex+Compound C group.

图2 各组大鼠心肌组织病理形态表现(HE)

Fig. 2 Pathomorphology of myocardium tissue of rats in various groups(HE)

表2 各组大鼠血清中cTnI水平和心肌组织中HK、PFK及PKM活性

Tab. 2 Levels of cTnI in serum and activities of HK, PFK, and PKM in myocardium tissue of rats in various groups (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	cTnI [$\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$]	HK [$\lambda_B/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$]	PFK [$\lambda_B/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$]	PKM [$\lambda_B/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$]
Control	0.22±0.08	0.45±0.07	0.49±0.06	5.78±0.87
Model	3.44±0.79*	0.34±0.03*	0.41±0.03*	4.61±0.52*
Dex	1.94±0.53 [△]	0.43±0.03 [△]	0.47±0.03	5.52±0.33 [△]
Dex+Compound C	3.04±0.71 [#]	0.37±0.05	0.41±0.05	4.55±0.29 [#]

*P<0.05 vs control group; [△]P<0.05 vs model group; [#]P<0.05 vs Dex group.

与Dex组比较，Dex+Compound C组大鼠心肌组织中ATP和ADP水平明显降低（ $P<0.05$ ），EC明显降低（ $P<0.05$ ）。见表3。

2.5 各组大鼠心肌组织中p-AMPK蛋白表达情况
与对照组比较，模型组大鼠心肌组织中p-AMPK

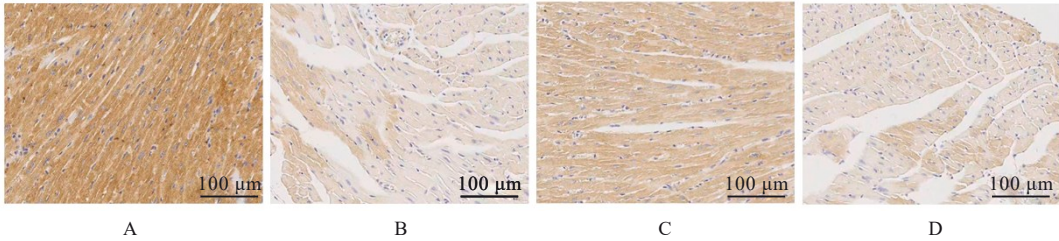
蛋白表达量降低；与模型组比较，Dex组大鼠心肌组织中p-AMPK蛋白表达量有所升高；与Dex组比较，Dex+Compound C组大鼠心肌组织中p-AMPK蛋白表达量降低。见图3。

表3 各组大鼠心肌组织中ATP、ADP和AMP水平及EC

Tab. 3 Levels of ATP, ADP and AMP and EC in myocardium tissue of rats in various groups (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	ATP [$m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$]	ADP [$m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$]	AMP [$m_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$]	EC
Control	305.71±16.55	192.72±8.33	44.87±3.50	0.74±0.01
Model	160.27±30.14*	124.95±30.18*	85.96±14.62*	0.60±0.04*
Dex	280.05±17.54 [△]	174.18±12.52 [△]	55.06±8.64 [△]	0.72±0.02 [△]
Dex+Compound C	195.88±43.77 [#]	137.50±11.73 [#]	61.92±9.98	0.67±0.05 [#]

*P<0.05 vs control group; [△]P<0.05 vs model group; [#]P<0.05 vs Dex group.



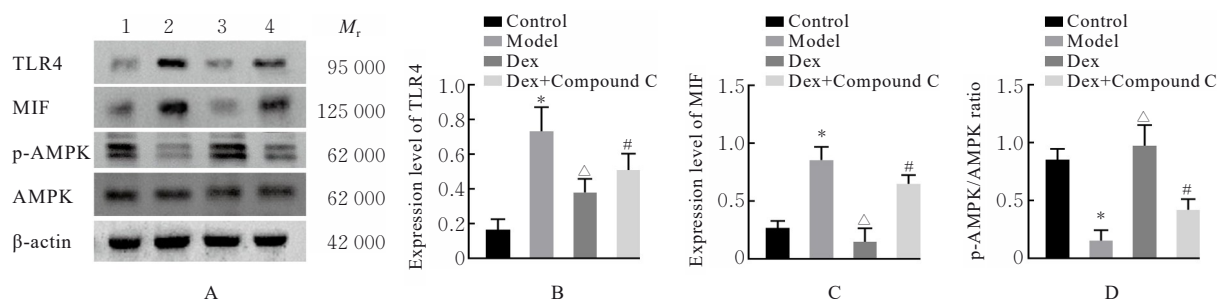
A:Control group; B:Model group; C:Dex group; D:Dex+Compound C group.

图3 各组大鼠心肌组织中p-AMPK蛋白表达情况(免疫组织化学)

Fig. 3 Expressions of p-AMPK protein in myocardium tissue of rats in various groups(Immunohistochemistry)

2.6 各组大鼠心肌组织中 TLR4/MIF/AMPK 信号通路蛋白表达水平 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中 TLR4 和 MIF 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), p-AMPK/AMPK 比值明显降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, Dex 组大鼠心肌组织中

TLR4 和 MIF 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), p-AMPK/AMPK 比值明显升高 ($P<0.05$)。与 Dex 组比较, Dex+Compound C 组大鼠心肌组织中 TLR4 和 MIF 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$), p-AMPK/AMPK 比值明显降低 ($P<0.05$)。见图 4。



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: Dex group; Lane 4: Dex+Compound C group. * $P<0.05$ vs control group; $^{\Delta}P<0.05$ vs model group; $^{\#}P<0.05$ vs Dex group.

图4 各组大鼠心肌组织中 TLR4/MIF/AMPK 信号通路蛋白表达电泳图(A)和直条图(B~D)

Fig. 4 Electrophoresis(A) and histograms(B-D) of expressions of TLR4/MIF/AMPK signaling pathway proteins in myocardium tissue of rats in various groups

3 讨论

本研究结果显示: MIRI发生时, 与对照组比较, 模型组大鼠心肌组织中 TLR4 和 MIF 蛋白表达水平明显升高, 同时 p-AMPK/AMPK 比值明显降低。TLR4 作为固有免疫系统关键受体, 其过度表达可能通过下游炎症因子 MIF 干扰 AMPK 的生理性磷酸化, 从而削弱细胞能量稳态的调控能力^[3-4]。然而, AMPK 作为能量代谢核心调节器, 其过度激活也可能引发能量代谢失调^[8]。研究^[9]显示: AMPK 可提高代谢相关基因的表达, 抑制内质网应激, 减少线粒体分裂和细胞凋亡, 从而保护心肌组织免受 MIRI。研究^[10]显示: 在癫痫机制研究中, AMPK 可通过多途径提高三羧酸循环周转率, 发挥能量稳态调节作用以维持神经元-胶质细胞通讯、减轻线粒体损伤和抑制炎症反应, 从而缓解癫痫症状。本研究结果显示: Dex 干预后, 与模型组比较, Dex 组大鼠心肌组织中 TLR4 和 MIF 蛋白表达水平明显降低, 同时 p-AMPK/AMPK 比值升高, 表明 Dex 可通过抑制 TLR4/MIF 信号轴, 解除其对 AMPK 活性的抑制作用。AMPK 抑制剂 Compound C 则可完全逆转 Dex 的心肌保护效应, 进一步验证 AMPK 激活是 Dex 发挥作用的关键通路。

本研究结果显示: MIRI 导致心肌组织中 HK、

PFK 和 PKM 等糖酵解限速酶表达下调, ATP 和 ADP 耗竭, 且 EC 明显降低, 提示能量代谢从缺血期的“无氧糖酵解依赖”向再灌注期的“代谢崩溃”转变; Dex 干预后, 与模型组比较, Dex 组大鼠心肌组织中糖酵解酶活性明显恢复, ATP 和 ADP 水平及 EC 同步升高, 该现象与 AMPK 磷酸化水平升高有密切关联。AMPK 作为能量代谢核心调控因子, 其激活可通过多种途径促进糖酵解。研究^[11]显示: AMPK 可激活磷酸果糖激酶 2 (phosphofructokinase-2, PFK2), 提高果糖-2, 6-二磷酸水平, 进而激活磷酸果糖激酶 1 (phosphofructokinase-1, PFK1) 以加速糖酵解通量。此外, AMPK 也可促进葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 转位至细胞膜, 增强葡萄糖摄取^[12]。研究^[13]显示: AMPK 可通过抑制乙酰辅酶 A 活性, 减少丙二酰辅酶 A 生成, 间接缓解脂肪酸氧化对糖酵解的竞争性抑制。上述机制共同揭示了 Dex 依赖 AMPK 通路恢复能量代谢的分子机制。AMPK 磷酸化调控通常被认为与细胞内 AMP 水平有关联。本研究结果显示: 模型组大鼠心肌组织中 AMP 水平明显升高, 但免疫组织化学法和 Western blotting 法结果均表明模型组大鼠心肌组织中 p-AMPK 表达水平呈下调趋势。上述矛盾现象提示: 除经典 AMP 依赖调控通路外, AMPK 磷酸化过程中可能存在其他关键调控途径

参与。上游激酶肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1) 失活可能是导致 AMPK 磷酸化水平降低的重要机制。研究^[14]显示: 在 *LKB1* 基因敲除的心肌细胞中, 即使 AMP 水平明显升高, AMPK 的 Thr172 磷酸化仍被完全抑制, 表明 LKB1 的活性对 AMPK 激活至关重要。此外, 氧化应激也可能通过半胱氨酸残基的氧化修饰直接抑制 AMPK 活性。研究^[15]显示: 在 MIRI 模型中, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可诱导 AMPK α 亚基的 Cys-313 位点氧化, 从而阻断其与上游激酶 LKB1 的结合, 导致磷酸化水平降低。这种氧化修饰与 AMP 水平无关, 提示氧化应激可能是独立于 AMP 的调控机制。这些发现为解析 AMPK 磷酸化的复杂调控网络提供了新视角, 也为心肌缺血的治疗策略提供了潜在靶点。

本研究结果显示: Dex 对心功能 (EF 和 CO 等指标) 及心肌结构 (细胞排列、核固缩和炎症浸润) 的改善与其调控能量代谢的效应高度同步。EC 的恢复既可维持离子泵功能, 缓解钙超载及细胞水肿^[16], 又可保障内质网应激修复蛋白的 ATP 依赖性折叠, 减少未折叠蛋白反应引发的凋亡信号^[17], 并抑制线粒体膜通透性转换孔开放, 阻断再灌注期氧化应激与细胞死亡的恶性循环, 从而减轻 MIRI^[18]。此外, 血清中 cTnI 水平的降低进一步证实了 Dex 可通过调控能量代谢途径减轻心肌细胞膜完整性的损伤。

Dex 已知的抗炎特性^[19]与本研究揭示的代谢调控作用可能存在协同效应。TLR4/MIF 信号抑制不仅可直接减轻炎症损伤, 还可通过解除 AMPK 活性抑制间接改善代谢微环境。这种双重作用机制使其在 MIRI 中表现出优于单一靶点药物的潜力。此外, Compound C 对 Dex 效应的完全逆转作用提示 AMPK 激活是其心肌保护效应的核心枢纽。

然而, 本研究仍存在一定的局限性。首先, TLR4/MIF 与 AMPK 的相互作用机制尚未完全明确, 需要进一步通过 *TLR4* 基因敲除模型进一步验证; 第二, AMPK 下游效应网络的调控细节对 MIRI 的影响仍需深入解析; 第三, 能量代谢中, Dex 对线粒体氧化磷酸化及脂肪酸代谢的长期影响仍待评估。未来研究可结合代谢组学、转录组学和活体能量代谢成像技术, 进一步揭示 Dex 干预下的能量代谢重编程过程。

综上所述, Dex 通过抑制 TLR4/MIF 信号通路, 解除其对 AMPK 活性的抑制作用, 进而激活 AMPK 依赖性糖酵解代谢, 恢复能量稳态, 最终改善 MIRI 后的心功能和心肌结构。这一发现不仅深化了对 Dex 多靶点药理机制的理解, 也为临床开发基于能量代谢调控的 MIRI 治疗策略提供了新方向。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李爱梅参与实验设计和论文撰写及修改, 韩静霏和邓莉参与实验操作及数据处理, 陈思宇参与论文审阅。

[参考文献]

- [1] DHALLA N S, OSTADAL P, TAPPIN P S. Involvement of oxidative stress and antioxidants in modification of cardiac dysfunction due to ischemia-reperfusion injury[J]. *Antioxidants*, 2025, 14(3): 340.
- [2] CONSEGAL M, NÚÑEZ N, BARBA I, et al. Citric acid cycle metabolites predict infarct size in pigs submitted to transient coronary artery occlusion and treated with succinate dehydrogenase inhibitors or remote ischemic preconditioning [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4151.
- [3] MAJID Z, MUHAMMAD-BAQIR B, AL-SHIMERTY D F, et al. The possible cardioprotective effect of ghrelin during experimental endotoxemia in mice[J]. *J Med Life*, 2024, 17(5): 486-491.
- [4] MENG F Q, LI D L, SONG B F, et al. Impaired myocardial MIF/AMPK activation aggravates myocardial ischemia reperfusion injury in high-fat diet-induced obesity[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2019, 19(7): 1046-1054.
- [5] DONG A L, ZHANG Y J, LU S J, et al. Influence of dexmedetomidine on myocardial injury in patients with simultaneous pancreas-kidney transplantation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7196449.
- [6] CHEN Z R, HONG Y, WEN S H, et al. Dexmedetomidine pretreatment protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating STAT3 signaling[J]. *Anesth Analg*, 2023, 137(2): 426-439.
- [7] XU G P, MA Y K, JIN J, et al. Activation of AMPK/p38/Nrf2 is involved in resveratrol alleviating myocardial

- ischemia-reperfusion injury in diabetic rats as an endogenous antioxidant stress feedback[J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(16): 890.
- [8] YANG B, XU Y, YU J Z, et al. Salidroside pretreatment alleviates ferroptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion through mitochondrial superoxide-dependent AMPK α 2 activation [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155365.
- [9] TIAN X, HUANG Y, ZHANG X F, et al. Salidroside attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury *via* AMPK-induced suppression of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial fission [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 448: 116093.
- [10] SMELAND O B, HADERA M G, MCDONALD T S, et al. Brain mitochondrial metabolic dysfunction and glutamate level reduction in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(7): 1090-1097.
- [11] YU Y H, ZHANG P, WANG C L, et al. Panax quinquefolium saponin optimizes energy homeostasis by modulating AMPK-activated metabolic pathways in hypoxia-reperfusion induced cardiomyocytes[J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(8): 613-620.
- [12] FAN X Y, WEI X Q, WANG W D, et al. Cardioprotective effects of the Jiming formula on myocardial metabolism in mice with myocardial infarction *via* the AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway[J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156727.
- [13] SRIVASTAVA R A K, PINKOSKY S L, FILIPPOV S, et al. AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(12): 2490-2514.
- [14] MUNG K L, ECCLESHALL W B, SANTION M, et al. PIM kinases inhibit AMPK activation and promote tumorigenicity by phosphorylating LKB1 [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 68.
- [15] SHAO D, OKA S I, LIU T, et al. A redox-dependent mechanism for regulation of AMPK activation by Thioredoxin1 during energy starvation[J]. *Cell Metab*, 2014, 19(2): 232-245.
- [16] LKHAGVA B, LIN Y K, CHEN Y C, et al. ZFHx3 knockdown dysregulates mitochondrial adaptations to tachypacing in atrial myocytes through enhanced oxidative stress and calcium overload[J]. *Acta Physiol*, 2021, 231(4): e13604.
- [17] BHARADWAJ P, SHET S M, BISHT M, et al. Suitability of adenosine derivatives in improving the activity and stability of cytochrome c under stress: Insights into the effect of phosphate groups[J]. *J Phys Chem B*, 2024, 128(1): 86-95.
- [18] CHEN W, LV L W, NONG Z H, et al. Hyperbaric oxygen protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through inhibiting mitochondria dysfunction and autophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5): 4254-4264.
- [19] SUO L Y, WANG M Y. Dexmedetomidine attenuates oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced inflammation through the miR-17-5p/TLR4/NF- κ B axis[J]. *BMC Anesthesiol*, 2022, 22(1): 126.