

UQCRC1 对 H9c2 心肌细胞耐受缺氧/复氧损伤的影响*

易婷婷, 李洪[△], 吴潇潇, 杨天德

(第三军医大学新桥医院麻醉科, 重庆 400037)

摘要:目的 构建泛醌-细胞色素 C 还原酶核心蛋白 1(UQCRC1)重组腺病毒载体,探讨 UQCRC1 对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。方法 采用 PCR 法从 cDNA 文库中克隆 UQCRC1 基因,经 Sal I 和 Xba I 双酶切,插入腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV,将鉴定后的 pAdTrack-UQCRC1 转化 BJ 5183 菌,筛选阳性克隆后用脂质体介导转染 293T 细胞,整合包装成重组腺病毒并转染 H9c2 心肌细胞,观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达和 UQCRC1 基因与蛋白表达;并检测细胞活性和乳酸脱氢酶(LDH)的释放。结果 成功构建了 UQCRC1 重组腺病毒;UQCRC1 过表达能显著增加缺氧/复氧后 H9c2 心肌细胞的活性($P < 0.05$),减少 LDH 的释放($P < 0.05$)。结论 UQCRC1 对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤有保护作用,其重组腺病毒的构建为进一步研究 UQCRC1 在心肌保护中的作用及机制奠定了基础。

关键词:电子传递链复合物 III;重组腺病毒;心肌再灌注损伤;心肌保护;心肌细胞;心脏

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.11.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)11-1344-04

Influence of ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 1 on hypoxia/reoxygenation injury in cultured H9c2 cardiac myocytes*

Yi Tingting, Li Hong[△], Wu Xiaoxiao, Yang Tiande

(Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus vector containing ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 1(UQCRC1) and to investigate the protective role of UQCRC1 against hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiac myocytes. **Methods** UQCRC1 gene was obtained from the cDNA library by PCR, then was double-digested with restriction endonucleases Sal I and Xba I and inserted into pAd Track-CMV. The identified plasmid of pAd Track-UQCRC1 was transfected into BJ 5183 containing pAdEasy-1. After screening the positive clone, the plasmid was transfected into 293T cells with liposome to integrate and package the recombinant adenovirus. Finally, these adenoviruses were transfected into H9c2 cardiac myocytes. The expressions of green fluorescence protein(GFP), UQCRC1 gene and protein were observed by RT-PCR and Western blot analysis. The cell viability and the LDH release were detected. **Results** The recombinant adenovirus-UQCRC1 was constructed successfully. The overexpression of UQCRC1 increased the cell viability($P < 0.05$) and decreased the LDH release($P < 0.05$) from H9c2 cardiac myocytes after suffering hypoxia/reoxygenation injury. **Conclusion** UQCRC1 has the protective effect on hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiac myocytes, and the construction of recombinant adenovirus vector will lay the foundation for further studying the role of UQCRC1 in cardioprotection.

Key words: electron transport complex III; recombinant adenovirus vector; myocardial reperfusion injury; cardioprotection; myocytes, cardiac

随着人口老龄化和外科手术的发展,心脏手术患者和心脏病行非心脏手术的患者比例逐年上升,围术期心肌缺血/再灌注损伤仍是困扰临床医生的一大难题。其中,对心肌线粒体功能的保护越来越受到重视,它已成为心肌保护的重要靶点^[1-2]。泛醌-细胞色素 C 还原酶核心蛋白 1(ubiquinol-cytochrome C reductase core protein1, UQCRC1),也称细胞色素 bc1 复合体亚单位 1,是线粒体 bc1 复合体的重要功能亚单位之一,参与线粒体功能的调节^[2-5]。UQCRC1 的过表达会增加线粒体 bc1 复合体呼吸率^[4],而线粒体功能障碍时伴有 UQCRC1 的表达下调^[2]。由此,推测 UQCRC1 可能通过调节线粒体功能从而产生心肌保护效应^[5]。本研究构建 UQCRC1 重组腺病毒,并转染 H9c2 心肌细胞建立 UQCRC1 过表达模型,通过模拟缺血/再灌注损伤探讨 UQCRC1 对 H9c2 心肌细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞株、腺病毒载体 H9c2 大鼠心肌细胞株、腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV、大肠埃希菌 BJ5183 和 DH10B 购自重庆金麦生物公司,293T 细胞由第三军医大学新桥医院中心实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂 噻唑蓝(MTT)购自北京鼎国生物技术公司;乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;脂质体 LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司;各种限制性内切酶、T4DNA 聚合酶、KOD-plus 高保真酶分别购自 NEB、Promega 和 TOYOBO 公司;小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司。PCR 引物由上海申友生物工程有限公司合成。高糖 DMEM 培养基及胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自 HyClone 公司。UQCRC1 一

抗、二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 实验所用 H9c2、293T 细胞株于 37℃、95% 空气+5%CO₂ 的混合气体培养箱中培养,用含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基常规培养,0.02% EDTA+0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 目的基因扩增 参照已在 GenBank 上公布的 UQCRC1 序列设计引物,上游引物:5'-ACG CGT CGA CAT GGC GGC GTC CGC AGT C-3',下游引物:5'-GCT CTA GAC TAG AAG CGC AGC CAG AAC ATG C-3'。采用如下反应体系扩增目的基因:cDNA 2.00 μL,上、下游引物各 0.50 μL,10×KOD-plus Buffer 2.50 μL,MgSO₄ 1.00 μL,dNTPs 2.50 μL,KOD-plus 0.50 μL,ddH₂O 15.50 μL。热循环程序为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,35 个循环后,72℃再延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,按照胶回收试剂盒操作步骤纯化回收 DNA 片段。

1.2.3 pAdTrack-UQCRC1 穿梭质粒构建及鉴定 PCR 产物回收后,用 Sal I 和 Xba I 双酶切,获得 1 450 bp 的 UQCRC1 基因片段(图 1)。腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 亦用 Sal I 和 Xba I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收。目的基因与载体 DNA 在 16℃保温下经 T4DNA 连接酶连接 6 h,连接产物转化新鲜感受态大肠埃希菌 DH10B,接种卡那霉素平板培养过夜,挑取阳性克隆扩增培养,碱裂解法提取并纯化质粒,获得重组穿梭质粒 pAdTrack-UQCRC1。酶切鉴定:分别对重组 pAdTrack-UQCRC1 穿梭质粒和空载体 pAdTrack-CMV 进行 Sal I 和 Xba I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR 鉴定:分别以重组质粒和空载体为模板,用前面合成的上、下游引物进行 PCR 扩增,产物行琼脂糖凝胶电泳。为确保重组质粒 pAdTrack-UQCRC1 中插入序列及读码框架的正确性,送交重庆金麦生物公司进行测序鉴定。

1.2.4 pAdTrack-pAeasy-1-UQCRC1 同源重组及鉴定 将正确重组的 pAdTrack-UQCRC1 穿梭质粒用 Pme I 酶切线性化,转化包含腺病毒骨架质粒 pAeasy-1 的感受态 BJ5183 菌。卡那霉素选择性培养基筛选阳性克隆,扩增培养,提纯质粒。鉴定成功的重组子再次转化超级感受态 DH10B,筛选阳性克隆并提取纯化,得到 UQCRC1 的重组腺病毒质粒。设置阴性对照组为空载体 pAdTrack 用 Pme I 酶切线性化后与 pAeasy-1 同源重组。酶切鉴定:用 Pac I 分别酶切腺病毒骨架质粒 pAeasy-1 及 pAd-UQCRC1,琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 重组 UQCRC1 腺病毒的包装及滴度测定 取对数生长期 293T 细胞,接种至 6 孔板培养 24 h,重组质粒 pAd-UQCRC1 用 Pac I 酶切线性化后,经 Lipofectamine™ 2000 介导转染 6 孔培养板中的 293T 细胞(融合度 70%~80%),37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育,24 h 后换为新鲜培养基。7~12 d 后可观察到细胞病变效应(cytopathic effect,CPE),并可在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达。采用微量全细胞病变法测定病毒滴度,接种 293T 细胞于 6 孔板(10 000 个/孔),将倍比稀释后的腺病毒液(10⁻³~10⁻¹¹)感染 293T 细胞,同时设培养基对照(不含腺病毒),放入培养箱培养 36~48 h 观察细胞病变情况,并对 CPE 孔进行计数。

1.2.6 H9c2 细胞 UQCRC1 过表达模型建立及鉴定 取对数

生长期 H9c2 细胞,接种至 96 孔板或 6 孔板,培养 24 h 后按感染复数(multiplicity of infection,MOI)30、50、80 加入重组腺病毒 Ad-UQCRC1 和重组空病毒对照,2 h 后更换新鲜培养基继续培养。24 h 后观察 GFP 的表达和细胞生长状况,以 MOI 50 最佳,按此感染 H9c2 细胞,24 h 后观察 GFP 的表达,提取总 RNA 进行 RT-PCR、琼脂糖凝胶电泳检测 UQCRC1 基因表达水平和提取总蛋白行 Western-blot 检测 UQCRC1 蛋白表达水平,48 h 后进行免疫荧光验证 UQCRC1 蛋白表达和后续实验。

1.2.7 实验分组 按每孔含 1 500 个细胞的细胞悬液 100 μL,每组 10 个复孔接种细胞至 96 孔板,分组:空病毒常氧对照组(常氧对照组)、UQCRC1 过表达缺氧/复氧组(过表达 I/R 组)、空病毒缺氧/复氧组(空病毒 I/R 组),同时设空白孔调零,放入孵箱常规培养 24 h 后按分组加入相应重组腺病毒,培养 36 h 后换为无血清培养基,再培养 12 h 后进行缺氧/复氧实验,常氧对照组常氧培养相应时间。

1.2.8 缺氧/复氧模型的建立 取对数生长期的细胞,缺氧前用无血清培养基培养 12 h,将缺氧各组换为无糖台氏液(含 10 mmol/L 2-脱氧-D-葡萄糖和 10 mmol/L 连二亚硫酸钠)后放入缺氧气室(Chamber,为缺氧装置),通入 95% N₂+5% CO₂ 混合气至出气口氧浓度降至 0 时夹闭进、出气口,放置 Chamber 于 37℃恒温箱中缺氧培养 1 h。常氧对照组换为含糖的标准台氏液(含 140 mmol/L NaCl,6 mmol/L KCl,1 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L CaCl₂,5 mmol/L HEPES,5.80 mmol/L glucose,pH 7.40),在 95% 空气+5% CO₂ 培养箱中培养相应时间。复氧时,取出培养板,更换为无血清的 DMEM 高糖培养基,放入 95% 空气+5% CO₂ 培养箱中培养 2 h。

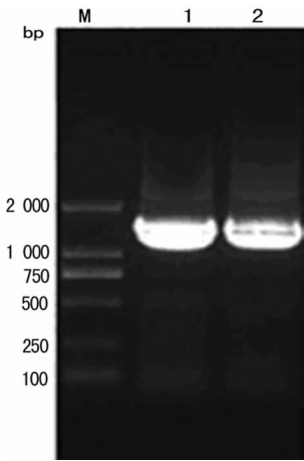
1.2.9 细胞活性检测 按照试剂盒说明书进行操作。复氧结束时换为按体积 1:9 混合的 MTT(5 mg/mL)与无血清培养基混合液继续放入细胞培养箱孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内细胞培养上清液,每孔再加 100 μL 二甲亚砜(DMSO),振荡 10 min 以使结晶物充分溶解,选择 570 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光吸收(OD)值并记录结果,减去各孔调零值后计算细胞存活率(各孔存活率=各孔 OD 值/对照组平均 OD 值×100%)。

1.2.10 LDH 释放测定 按照试剂盒说明书进行。分别于缺氧和复氧结束时吸取每孔上清液各 50 μL 混匀后,加入 LDH 检测工作液 60 μL,混匀,避光孵育 30 min 后,选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔 OD 值并记录结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较运用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

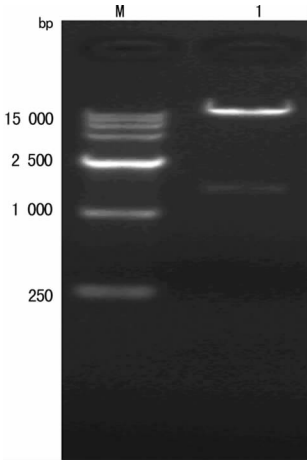
2 结果

2.1 pAdTrack-UQCRC1 穿梭质粒及 pAd-UQCRC1 的鉴定 酶切鉴定:分别对重组 pAdTrack-UQCRC1 穿梭质粒和空载体 pAdTrack 进行 Sal I 和 Xba I 双酶切,前者得到约 1 450 bp 和 9 260 bp 的两个片段(图 2),与插入的目的片段大小一致;PCR 鉴定:分别以重组质粒和空载体为模板,用合成的上、下游引物进行 PCR 扩增,得到约 1 450 bp 的目的片段,产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定。测序鉴定:为确保重组质粒 pAdTrack-UQCRC1 中插入序列及读码框架的正确性,送交重庆金麦生物公司进行测序鉴定。所得测序结果与基因库 GenBank 文献报道一致。用 Pac I 分别酶切腺病毒骨架质粒 pAeasy-1 及 pAd-UQCRC1,后者得到 30 000、4 500 bp 两个片段,见图 3。



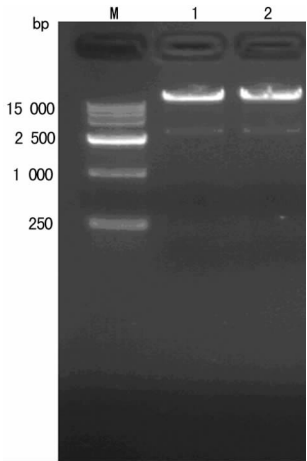
1、2:PCR 产物;M:标记物。

图 1 PCR 钓取 UQCRC1 基因



1:pAd Track-UQCRC1;M:标记物。

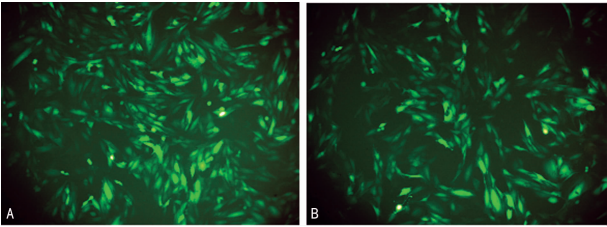
图 2 穿梭质粒 pAd-UQCRC1



1、2:pAd-UQCRC1;M:标记物。

图 3 重组质粒 pAd-UQCRC1

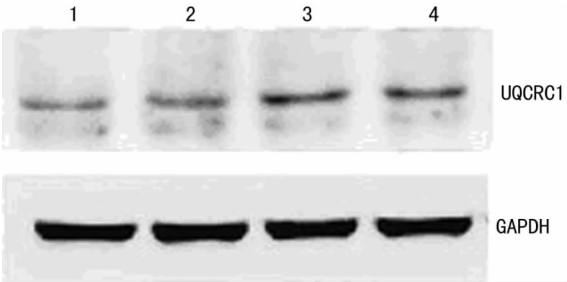
2.2 重组 UQCRC1 腺病毒的包装及滴度测定 Pac I 酶切 pAd-UQCRC1 产物用脂质体转染 293T 细胞,培养 1 周后出现细胞呈空泡样病变,并逐渐呈悬浮生长,且可见 GFP 的表达。将重组腺病毒在 293T 细胞中大量扩增后,收集细胞,反复冻融、离心后收集含病毒的上清分装,贮存于-80℃备用。滴度测定计算公式:病毒滴度(PFU/mL)=GFP 阳性细胞数(感染后 24 h)×稀释倍数/感染用体积数(mL)^[6]。本次实验计算病毒滴度为 4×10⁹ PFU/mL。



A:空病毒 I/R 组;B:过表达 I/R 组。

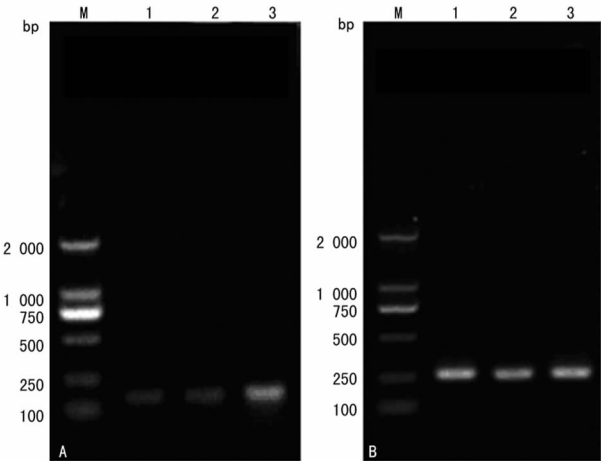
图 4 H9c2 细胞感染重组腺病毒 24 h 观察绿色荧光情况

过表达 I/R 组 UQCRC1 mRNA 和蛋白表达水平明显升高(图 5、6);转染 48 h 后,进行免疫荧光实验,观察 UQCRC1 表达情况,也同样发现过表达 I/R 组 UQCRC1 荧光强度明显强于空病毒 I/R 组,见图 7。



1、2:空病毒 I/R 组;3、4:过表达 I/R 组。

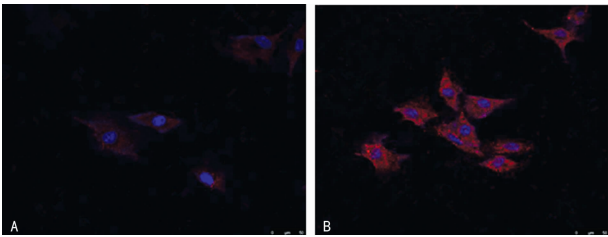
图 6 Western blot 检测 UQCRC1 蛋白表达



A: UQCRC1;B: GAPDH;1:常氧对照组;2:空病毒 I/R 组;3:过表达 I/R 组。

图 5 RT-PCR 检测 UQCRC1 mRNA 表达

2.3 转染重组腺病毒后 UQCRC1 在 H9c2 细胞中的不同表达水平 H9c2 细胞转染重组腺病毒 24 h 后(图 4),分别行 RT-PCR 检测 UQCRC1 mRNA 水平和 Western blot 检测 UQCRC1 蛋白表达水平,与常氧对照组和空病毒 I/R 组比较,

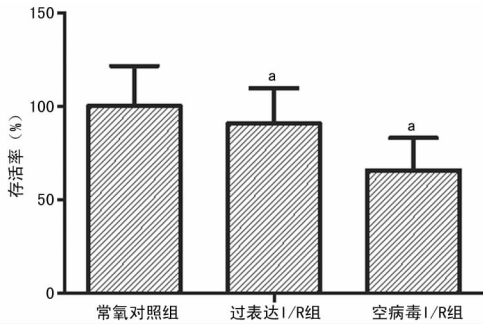


A:空病毒 I/R 组;B:过表达 I/R 组。

图 7 免疫荧光观察 UQCRC1 表达情况

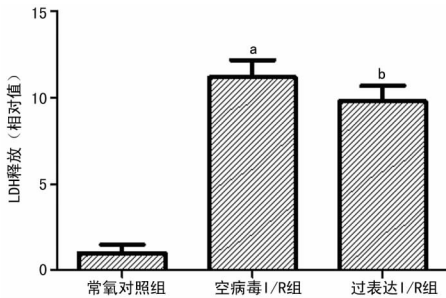
2.4 UQCRC1 过表达对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤后活性的影响 H9c2 心肌细胞缺氧 1~2 h 后,心肌细胞存活率明显降低。与常氧对照组比较,空病毒 I/R 组心肌细胞存活率明显降低($P<0.05$),而过表达 I/R 组心肌细胞存活率明显高于空病毒 I/R 组[(90.74±18.93)% vs. (65.82±17.26)%, $P<0.05$],见图 8。

2.5 UQCRC1 过表达对 H9c2 细胞缺氧/复氧后 LDH 释放的影响 缺氧/复氧损伤后,心肌细胞释放大量的 LDH 到培养基中。与常氧对照组比较,空病毒 I/R 组和过表达 I/R 组 LDH 释放明显升高,分别为常氧对照组的(11.17±0.94)倍和(9.87±0.76)倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。与空病毒 I/R 组相比,过表达 I/R 组 LDH 释放明显降低($P<0.05$),见图 9。



a: $P < 0.05$, 与常氧对照组比较。

图 8 缺氧/复氧后 H9c2 心肌细胞的活性变化



a: $P < 0.05$, 与常氧对照组比较; b: $P < 0.05$, 与空病毒 I/R 组比较。

图 9 3 组 H9c2 心肌细胞 LDH 释放比较

3 讨 论

基因治疗中目的基因的转移工具以逆转录病毒载体和腺病毒载体最为常用。腺病毒针对大多数细胞约有 100% 的感染效率,包括分裂和不分裂细胞及原代细胞,不整合到宿主细胞,整合突变致癌可能性小,基因毒性低,但是构建和包装操作相对复杂^[7]。实验所使用腺病毒 Ad EasyXLTM 系统,其骨架质粒 pAdEasy-1(氨苄西林抗性)带有病毒的大部分基因组,已经被转化到 BJ5183 细胞即 BJ 5183-AD-1 中,该特性显著降低了由于非重组穿梭质粒所引起的背景,使其更容易获得含有重组腺病毒质粒的克隆^[8]。另外,穿梭质粒 pAd Track(卡那霉素抗性)具有左右臂同源区,借助 E. coli BJ 5183 细菌内高效的同源重组机制并进行抗生素筛选,可以在很短的时间内得到重组腺病毒质粒。再用人工创建的 Pac I 酶切去此质粒上的复制起始序列 ori 和卡那霉素抗性基因,暴露其反省末端重复 ITRs 序列,即可用来转染适当的包装细胞如 293 或 911 细胞,得到表达外源基因的重组腺病毒,该方法简化了实验步骤,缩短了载体构建周期^[8]。本实验成功构建了携带 UQCRC1 基因的重组腺病毒载体,并获得了较高的病毒滴度,为进一步研究 UQCRC1 对 H9c2 细胞耐受缺氧/复氧损伤的作用及其机制奠定了基础。

防治围术期心肌缺血/再灌注损伤、为心肌缺血患者提供完善的心肌保护一直是医学上力求攻克的难题。越来越多的研究表明,UQCRC1 可能通过调节线粒体功能而产生心肌保护效应。Kriaucionis 等^[4]使神经细胞瘤细胞过表达 UQCRC1,引起了线粒体 bc1 复合体呼吸率显著增加;Shibanuma 等^[2]发现,氧化应激所引起的线粒体功能障碍时伴有 UQCRC1 的特异性减少;Aguilera-Aguirre 等^[9]使用豚草花粉提取物(ragweed pollen extract, RWE)作用于气道上皮细胞引起线粒体功能障碍的同时,也导致了 UQCRC1 的表达下调。

这些研究都表明,UQCRC1 表达变化可直接影响线粒体功能,然而线粒体功能的保护在心肌保护中非常重要,是多条心肌保护信号通路如缺血预处理、缺血后处理等信号通路的共同作用靶点^[10]。UQCRC1 表达变化可直接影响线粒体功能,提示 UQCRC1 可能通过调节线粒体功能来参与心肌保护作用。此外,一些与心肌保护相关的蛋白质组学研究发现,UQCRC1 的表达上调或下调参与了心肌保护效应,如采用具有心肌保护效应的葡萄子原花青素(grape seed proanthocyanidin extracts, GSPE)喂养大鼠以及腺苷预处理、缺血预处理,以及 GSK-3 抑制剂预处理都会引起 UQCRC1 发生表达变化^[11-14]。

本研究通过重组腺病毒 Ad-UQCRC1 转染 H9c2 心肌细胞,成功建立了 UQCRC1 过表达模型。研究表明,缺氧/复氧损伤后,缺氧/复氧各组较对照组细胞活性均明显降低、LDH 释放均明显增加,说明本实验体系能客观地反映缺氧/复氧损伤,可作为评价 UQCRC1 在缺氧/复氧损伤中作用的实验手段。通过缺氧/复氧损伤,发现了 UQCRC1 的过表达能提高 H9c2 心肌细胞存活率,减少缺氧/复氧损伤引起的 LDH 释放,使 H9c2 细胞对缺氧/复氧损伤耐受力提高,证实了 UQCRC1 在 H9c2 细胞缺氧/复氧损伤中起保护作用,而其具体作用机制尚不清楚,有待于进一步研究。总之,本研究成功构建了 UQCRC1 过表达载体,为进一步研究 UQCRC1 在心肌保护中的作用及其机制奠定了基础;并首次证实了 UQCRC1 在 H9c2 细胞缺氧/复氧损伤中起保护作用,为开发心肌保护药物提供了新靶点。

参考文献:

- [1] Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1767(8): 1007-1031.
- [2] Shibanuma M, Inoue A, Ushida K, et al. Importance of mitochondrial dysfunction in oxidative stress response: A comparative study of gene expression profiles[J]. Free Radic Res, 2011, 45(6): 672-680.
- [3] Iwata S, Lee J, Okada K, et al. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex[J]. Science, 1998, 281(5373): 64-71.
- [4] Kriaucionis S, Paterson A, Curtis J, et al. Gene expression analysis exposes mitochondrial abnormalities in a mouse model of Rett syndrome[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(13): 5033-5042.
- [5] 易婷婷, 李洪. 锌在缺血和药物预处理心肌保护中作用的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2013, 34(7): 620-623.
- [6] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha[J]. Exp Med Volume, 1994, 179(4): 1109-1118.
- [7] 张亚辉, 钱航, 张志峰, 等. 过表达腺病毒载体构建及在血管平滑肌细胞中的表达[J]. 湖北医药学院学报, 2012, 31(3): 181-185.

用,甚至出现血压下降、心动过缓等情况^[14]。而氯胺酮具有镇痛作用强、意识消失迅速及对吸和心脏影响小等特点,联合应用速眠新Ⅱ与氯胺酮可减少两种药物总用量,麻醉效果理想。但氯胺酮偶有引起谵妄、苏醒期精神错乱、血压升高、心率增快、颅内压升高及呼吸道分泌物增多等不良反应^[15]。使用氯胺酮与速眠新Ⅱ前,可适量应用具有镇静催眠、肌肉松弛、抗惊厥、抗焦虑和顺行性遗忘等作用的咪达唑仑,以减少麻醉药物的不良反应。咪达唑仑不但能加强中枢抑制作用,减少氯胺酮的精神症状及其引起的血压升高、心率增快等不良反应,而且不增加速眠新Ⅱ的呼吸抑制作用^[16],使得本组麻醉方案安全可控。

家兔股骨髁骨缺损修复手术过程约 30~40 min,本实验中咪达唑仑与氯胺酮/速眠新Ⅱ复合起效明显快于戊巴比妥钠与乌拉坦,麻醉持续时间适中,苏醒时间短,满足手术需要的同时大大提高了实验的效率。

综上所述,本研究认为在兔股骨髁骨缺损手术中,联合应用咪达唑仑、氯胺酮与速眠新Ⅱ行肌肉注射的麻醉方法安全有效,麻醉持续时间适宜,苏醒时间短,利于术后恢复。该麻醉方法不仅降低实验动物在术中躁动和挣扎的发生率,同时降低了实验动物术后远期病死率,有利于实验相关数据采集和实验的顺利进行,值得推广。

参考文献:

- [1] 孙煦化,李敏,王莉,等.几种麻醉剂在家兔脊柱手术中的效果比较[J]. 吉林医学,2011,32(2):211-213.
- [2] Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, et al. Mice anesthesia, analgesia, and aare, Part II: Anesthetic considerations in preclinical imaging studies[J]. ILAR J, 2012, 53(1): E70-81.
- [3] Yi-Ming W, Shu H, Miao C, et al. Asynchronism of the recovery of baroreflex sensitivity, blood pressure, and consciousness from anesthesia in rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2004, 43(1): 1-7.
- [4] Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, et al. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats[J]. Nature Pro-

toc, 2008, 3(9): 1422-1434.

- [5] Schulz DW, Macdonald RL. Barbiturate enhancement of GABA-mediated inhibition and activation of chloride ion conductance: correlation with anticonvulsant and anesthetic actions[J]. Brain Res, 1981, 209(1): 177-188.
- [6] 周小林,唐秋姗,雷艳,等.戊巴比妥钠联合速眠新Ⅱ在犬手术中的麻醉效果[J]. 华南国防医学杂志, 2012, 26(4): 313-315.
- [7] 周荣波. 动物麻醉中乌拉坦的安全使用[J]. 卫生职业教育, 2009, 27(9): 109-110.
- [8] 万洁,许崇泰. 乌拉坦在生理科学实验中对家兔麻醉效果的研究[J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(6): 504-505, 510.
- [9] 周昆,刘静,刘跃鹏. 乌拉坦和戊巴比妥钠对大鼠血液流变学的影响[J]. 北京大学学报: 医学版, 2005, 37(2): 186.
- [10] 于小玲,刘凤,王宝娃,等. 乌拉坦静脉注射所致的溶血现象及其对血液流变性的影响[J]. 微循环学杂志, 1997, 7(3): 22-23.
- [11] 张引国,魏洁. 乌拉坦麻醉深度与家兔心脏自主神经功能的关系[J]. 心脏杂志, 2006, 18(6): 626-628, 635.
- [12] 王春晓,曹荣月,蔡曼玲,等. 乌拉坦和戊巴比妥钠对手术后长期饲养动物的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(21): 2559-2564.
- [13] 吴刚明,莫利群,刘力,等. 丙泊酚复合速眠新Ⅱ在高强度聚焦超声手术实验用犬麻醉中的应用研究[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(5): 612-615.
- [14] 马兰芝,赵源,尚玉璞,等. 氯胺酮联用速眠新Ⅱ对食蟹猴麻醉效果观察[J]. 实验动物科学, 2009, 26(3): 60-62.
- [15] 王文胜. 麻醉中氯胺酮联合用药的相关研究[J]. 天津药学, 2008, 20(1): 57-60.
- [16] 李春宝,刘玉杰,齐玮,等. 兔咪唑安定基础麻醉下手术全麻效果的实验观察[J]. 武警医学院学报, 2011, 20(4): 266-268.

(收稿日期:2013-09-10 修回日期:2013-12-14)

(上接第 1347 页)

- [8] 李红,刘友生,王长松,等. 人 survivin 基因重组腺病毒载体的构建及其在 DCs 中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 821-824.
- [9] Aguilera-Aguirre L, Bacsí A, Saavedra-Molina A, et al. Mitochondrial dysfunction increases allergic airway inflammation[J]. J Immunol, 2009, 183(8): 5379-5387.
- [10] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: role of mitochondria and reactive oxygen species[J]. World J Cardiol, 2011, 3(6): 186-200.
- [11] Lu WD, Qiu J, Zhao GX, et al. Quantitative mitochondrial proteomics study on protective mechanism of grape seed proanthocyanidin extracts against ischemia/reperfusion heart injury in rat[J]. Chem Res Chin Univ, 2012, 28(6):

1035-1040.

- [12] Arrell DK, Elliott ST, Kane LA, et al. Proteomic analysis of pharmacological preconditioning: novel protein targets converge to mitochondrial metabolism pathways[J]. Circ Res, 2006, 99(7): 706-714.
- [13] Wong R, Aponte AM, Steenbergen C, et al. Cardioprotection leads to novel changes in the mitochondrial proteome[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(1): H75-91.
- [14] Kim HK, Thu VT, Heo HJ, et al. Cardiac proteomic responses to ischemia-reperfusion injury and ischemic preconditioning[J]. Expert Rev Proteomics, 2011, 8(2): 241-261.

(收稿日期:2013-10-16 修回日期:2013-12-29)