

• 实验研究 •

小檗碱对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体自噬及对 PINK1/Parkin 通路的影响

孙建利¹, 赵庆伟¹, 李朋朋¹, 魏 博²

1. 平煤神马医疗集团总医院 药品调剂科, 河南 平顶山 467000

2. 郑州大学 基础实验室, 河南 郑州 450001

摘 要: **目的** 探讨小檗碱对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体自噬及 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森病蛋白 (Parkin) 通路的影响。**方法** 建立心肌缺血再灌注损伤大鼠模型, 随机分组为模型组、小檗碱低、高剂量 (75、150 mg/kg) 组, 自噬抑制剂三甲基腺嘌呤 (3-MA, 100 mmol/L) 组、小檗碱+3-MA (150 mg/kg+100 mmol/L) 组, 每组 12 只, 另取 12 只正常大鼠设为假手术组。分组处理后, 超声检测大鼠左室功能, 记录左室收缩末期内径 (LVESD)、左室舒张末期内径 (LVEDD)、左心射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (FS); 三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色检测各组大鼠心肌梗死面积, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测各组大鼠血清中磷酸肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、肌钙蛋白 I (cTnI) 水平; HE 染色观察大鼠心肌组织病理变化; 透射电镜观察心肌细胞超微结构及线粒体自噬并分析线粒体损伤评分; 蛋白免疫印迹法检测各组大鼠心肌组织 PINK1、Parkin 蛋白及微管轻链蛋白 3B (LC3B)、线粒体自噬受体 p62 (p62)、泛素特异性蛋白酶 30 (USP30) 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌组织病理损伤严重, 线粒体肿胀及空泡化损伤较多, 线粒体损伤评分、心肌梗死面积、LVEDD、LVESD、CK-MB、cTnI 水平及 PINK1、Parkin、LC3B、p62 蛋白表达升高 ($P<0.05$), LVEF 及 FS、USP30 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 3-MA 组大鼠心肌组织及线粒体病理损伤加重, LVEF、FS、PINK1、Parkin、LC3B、p62 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 线粒体损伤评分、心肌梗死面积、LVEDD、LVESD、CK-MB、cTnI 水平、USP30 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 小檗碱低、高剂量大鼠心肌组织及线粒体病理损伤减轻, LVEF、FS、PINK1、Parkin、LC3B、p62、USP30 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 线粒体损伤评分、心肌梗死面积、LVEDD、LVESD、CK-MB、cTnI 水平降低 ($P<0.05$)。小檗碱+3-MA 组大鼠上述各项指标均与小檗碱高剂量组变化趋势相反, 且有统计学差异 ($P<0.05$)。**结论** 小檗碱可能通过激活 PINK1/Parkin/P62/LC3B 通路促进线粒体自噬, 升高 USP30 表达, 减少异常自噬, 缓解心肌缺血再灌注损伤。

关键词: 小檗碱; PTEN 诱导激酶 1; 帕金森病蛋白; 心肌缺血再灌注; 线粒体自噬

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)04-0637-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.04.001

Effects of berberine on mitochondrial autophagy and PINK1/Parkin pathway in rats with myocardial ischemia-reperfusion

SUN Jian-li¹, ZHAO Qing-wei¹, LI Peng-peng¹, WEI Bo²

1. Department of Pharmacy, Pingmei Shenma Medical Group General Hospital, Pingdingshan 467000, China

2. Basic Laboratory, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of berberine on mitochondrial autophagy and phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin pathway in rats with myocardial ischemia-reperfusion (MIR). **Methods** MIR rat model was established and randomly divided into model group, low-dose berberine group (75 mg/kg), high-dose berberine group (150 mg/kg), autophagy inhibitor trimethyladenine (3-MA, 100 mmol/L), berberine + autophagy inhibitor group (150 mg/kg + 100 mmol/L), with 12 rats in each group, and another 12 rats were set as Sham operation group. After grouping and

收稿日期: 2020-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603114)

作者简介: 孙建利 (1987—), 女, 河南平顶山人, 本科, 主管药师, 研究方向为药理学。E-mail: sk930113@163.com

treatment, left ventricular function was detected by echocardiography, left ventricular end systolic diameter (LVESD), left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short axis shortening (FS) were recorded. The infarct size was detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, and the levels of creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and troponin I (cTnI) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HE staining was used to observe the pathological changes of myocardium. The ultrastructure and mitochondrial autophagy of cardiomyocytes were observed by transmission electron microscopy (TEM), and mitochondrial damage score was analyzed. The protein expressions of PINK1, Parkin, microtubule associated protein 1 light chain 3B (LC3B), mitochondrial autophagy receptor p62 and ubiquitin specific protease 30 (USP30) were detected by Western blotting. **Results** Compared with those in the Sham operation group, the pathological damage of myocardial tissue in the model group was serious, and the swelling and vacuolation of mitochondria were more serious, the mitochondrial injury score, myocardial infarction area, LVEDD, LVESD, levels of CK-MB and cTnI, the protein expression levels of PINK1, Parkin, LC3B and p62 were higher ($P < 0.05$), but LVEF, the protein expression levels of FS and USP30 were lower ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the pathological damage of myocardial tissue and mitochondria in 3-MA group was aggravated, LVEF, FS, the protein expression levels of PINK1, Parkin, LC3B and p62 were lower ($P < 0.05$), the mitochondrial injury score, myocardial infarction area, LVEDD, LVESD, levels of CK-MB and cTnI and the protein expression level of USP30 were higher ($P < 0.05$). The pathological damage of myocardial tissue and mitochondria in rats in low and high dose berberine groups was alleviated, LVEF, FS, the protein expression levels of PINK1, Parkin, LC3B, p62 and USP30 were higher ($P < 0.05$), the mitochondrial damage score, myocardial infarction area, LVEDD, LVESD, levels of CK-MB and cTnI were lower ($P < 0.05$). The changes of the above indexes in berberine + 3-MA group were contrary to those in high-dose berberine group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Berberine may promote mitochondrial autophagy by activating PINK1/Parkin/p62/LC3B pathway, increase USP30 expression, reduce abnormal autophagy and alleviate MIR injury.

Key words: berberine; phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten-induced putative kinase 1; Parkin; myocardial ischemia reperfusion; mitochondrial autophagy

再灌注治疗是缺血性心脏病的常用治疗措施,但心肌缺血再灌注可诱发心律失常及心功能障碍,导致心肌出现不可逆损伤^[1]。采取积极有效措施防治心肌缺血再灌注损伤是目前临床研究的热点和重点之一^[2]。目前研究发现线粒体结构损伤及功能降低,是心肌缺血再灌注损伤的主要机制之一^[3],且线粒体自噬在心肌缺血再灌注损伤中的调控及保护作用越来越受到重视^[4]。研究证实 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森病蛋白 (Parkin) 可调节线粒体自噬,清除细胞中受损线粒体,维持细胞功能稳定^[5],参与冠心病、心力衰竭及心肌病等多种疾病的发生发展过程^[6]。近来研究发现, PINK1/Parkin 通路也是心、脑、肾等脏腑缺血再灌注损伤过程中调控线粒体自噬的经典通路^[7]。故探究心肌缺血再灌注损伤过程中 PINK1/Parkin 通路的调控作用对防治心肌缺血再灌注损伤有一定的临床价值。小檗碱为提取自黄连、黄柏等药材的生物碱类活性物质,具有多种抗心血管疾病作用^[8-9],可通过抑制炎症通路激活缓解心肌缺血再灌注损伤。但小檗碱是否能通过 PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬进而缓解心肌缺血再灌注损伤目前还不清楚。本研究建立心肌缺血再灌注

大鼠模型,观察小檗碱对模型大鼠 PINK1/Parkin 通路的影响,为其防治心肌缺血再灌注损伤提供参考和依据。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠 (上海斯莱克实验动物有限公司),质量合格证号: 2015000504404, 许可证号: SYXK(沪)2014-0005, 雄性, SPF 级, 体质量 220~240 g。饲养条件: 大鼠自由摄食、饮水, 自然光照, 恒温约 25 °C, 相对湿度为 50%, 定期添加饲料、饮用水、更换垫料, 并清理及消毒鼠笼, 保持动物房环境清洁、安静, 通风良好。动物实验遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

小檗碱 (质量分数 ≥ 98%, 货号: S90152, 北京索莱宝科技有限公司); 氯化三苯基四氮唑 (TTC, 货号: 17779, 美国 Sigma 公司); HE 染色试剂盒 (货号: C0105, 上海碧云天公司); 磷酸肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 及肌钙蛋白 I (cTnI) 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (货号分别为 ab187396、ab246529, 购自美国 Abcam 公司); 兔抗大鼠单克隆抗体 PINK1 (货号: 10006283, 购自美国 Cayman 公司); 兔抗大鼠单克隆抗体泛素特异性蛋白酶 30

(USP30, 货号: SAB4503385, 购自德国默克公司); 兔抗大鼠单克隆抗体 Parkin、微管轻链蛋白 3B (LC3B)、线粒体自噬受体 p62 (p62) 抗体 (货号: ab179812、ab192890、ab109012, 均购自美国 Abcam 公司); BL-420F 生物信号采集与分析系统 (购自成都泰盟软件有限公司); MouseDoppler 小动物超声多普勒血流仪 (购自广州市科之蓝仪器有限公司); 1659001 蛋白电泳仪、Trans-Blot SD 半干转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立及分组给药

参照文献方法^[10]建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。SD 大鼠 ip 30 mg/kg 2.5%戊巴比妥钠溶液麻醉后, 仰卧固定在操作台上, 备皮消毒, 做气管插管, 监测大鼠心电图, 并连接小动物呼吸机。于大鼠左肋第 3、4 肋骨中间开胸, 暴露心脏, 小心分离左冠状动脉降支, 结扎其根部, 观察心电图, 若 ST 波升高, 左心室颜色由红变白时, 表明缺血完成, 结扎 30 min 后解开结扎线, 马上还纳心脏、逐层缝合切口, 若 ST 波下降且出现病理性 Q 波, 表明心肌再灌注成功。共造模 68 只, 成功 60 只, 随机分成模型组、小檗碱低剂量组 (75 mg/kg) 组、小檗碱高剂量 (150 mg/kg) 组、自噬抑制剂三甲基腺嘌呤 (3-MA, 100 mmol/L) 组、小檗碱+自噬抑制剂组 (150 mg/kg 小檗碱+100 mmol/L 3-MA), 每组 12 只。另取 12 只正常大鼠最为假手术组, 仅穿线而不结扎, 其余操作同模型组。小檗碱、3-MA 参照文献报道^[10-11]设置剂量, 按 10 mL/kg 的容积 ig 给予相应剂量小檗碱, 按 2 μ L/只 ip 3-MA, 模型组和对照组大鼠 ig 同剂量生理盐水, 并 ip 2 μ L/只 PBS 溶液, 每天 1 次, 持续给药 14 d。

2.2 超声检测大鼠左室功能

末次给药结束 24 h 后, 将大鼠麻醉。以小动物超声多普勒血流仪检测左心室功能, 至少检测 3 个连续、完整的心动周期, 指标为左室收缩末期内径 (LVESD)、左室舒张末期内径 (LVEDD)、左心射血分数 (LVEF)、左室短轴缩短率 (FS)。

2.3 标本采集及 TTC 染色检测心肌梗死面积

超声检测结束后, 经颈动脉取血约 2 mL, 3 000 r/min 条件下离心 10 min 取上清液, 储存在-80 °C 冰箱中备用。处死大鼠, 每组分别随机选取 6 只, 解剖分离心脏, 剪取约 0.5 g 匀浆后提取组织中蛋白, 储存在-80 °C 冰箱中备用; 剩余心肌组织分成

2 部分, 一部分切取 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 左心室组织, 经 2%戊二醛、10 g/L 锇酸固定、丙酮逐级脱水、包埋、切片、染色后用 HT7700 型透射电子显微镜观察心肌细胞超微结构及线粒体自噬变化。剩余组织迅速放入 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋后, 用切片机切成 5 μ m 切片备用。

每组剩余 6 只大鼠解剖后分离心脏, 沿冠状面将其切为 5 片, TTC 染液于 37 °C 水浴中避光染色 30 min, 再经 4%多聚甲醛固定后观察。正常心肌组织为红色, 梗死区域组织为淡白色, 拍照后以 Image pro 软件分析图像, 检测心肌梗死面积 (心肌梗死面积=全心脏梗死面积/全心脏切片面积)。

2.4 HE 染色检测心肌组织病理变化

对“2.3”项中的石蜡切片脱蜡后, 以高浓度到低浓度酒精依次浸泡, 使用 HE 染色试剂盒进行染色, 具体操作按照说明书进行, 经再次脱水、透明后封片, 在光学显微镜下观察心肌组织病理变化并拍照。

2.5 ELISA 法检测血清 CK-MB、cTnI 水平

“2.3”项中的血清置于 4 °C 冰箱中解冻, 采用 ELISA 试剂盒测定其中 CK-MB、cTnI 的水平, 具体操作参照说明书进行。

2.6 透射电镜观察心肌细胞中线粒体损伤情况

取“2.3”项中透射电镜标本, 电镜下随机取 5 个视野, 参照文献方法^[12]对线粒体损伤程度评分。

2.7 各组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、LC3B、p62、USP30 蛋白水平检测

以 BCA 试剂盒测定“2.3”项中心肌组织蛋白总浓度。各组取含 20 μ g 总蛋白的样品煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 使蛋白分离, 然后进行湿转, 将其全部转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上, 使用 5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h, 再以 1:1 000 的兔源 PINK1、Parkin、LC3B、Mfn2、USP30 一抗溶液及 GAPDH 内参抗体于 4 °C 条件下孵育过夜, 以 TBST 溶液漂洗 3 次, 加入 1:1 000 的羊抗兔二抗室温孵育 2 h, 再次以 TBST 漂洗 3 次以增强化学发光法显色, 拍摄图像并分析。

2.8 统计分析

以软件 SPSS 24.0 对实验数据进行统计分析, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步两两间比较行 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠心室功能比较

与假手术组相比,模型组大鼠 LVEDD、LVESD 显著升高($P<0.05$),LVEF、FS 显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,3-MA 组大鼠 LVEDD、LVESD 升高($P<0.05$),LVEF、FS 显著降低($P<0.05$);小檗碱低、高剂量组大鼠 LVEDD、LVESD 显著降低($P<0.05$),LVEF、FS 显著升高($P<0.05$)。与小檗碱高剂量组相比,小檗碱+3-MA 组大鼠 LVEDD、

LVESD 显著升高($P<0.05$),LVEF、FS 显著降低($P<0.05$),见表1。

3.2 各组大鼠心肌梗死情况比较

与假手术组相比,模型组大鼠心肌梗死面积显著增加($P<0.05$)。与模型组相比,3-MA 组大鼠心肌梗死面积显著增加($P<0.05$);小檗碱低、高剂量组大鼠心肌梗死面积显著减少($P<0.05$)。与小檗碱高剂量组相比,小檗碱+3-MA 组大鼠心肌梗死面积显著增加($P<0.05$),见图1和表2。

表1 各组大鼠心室功能比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 1 Comparison of ventricular function of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量	LVEDD/mm	LVESD/mm	LVEF/%	FS/%
假手术	—	5.61±0.43	3.36±0.34	85.12±4.03	49.82±4.76
模型	—	8.68±0.62*	5.92±0.58*	62.11±3.01*	27.87±2.73*
3-MA	100 mmol·L ⁻¹	9.98±0.72 [#]	7.63±0.74 [#]	38.86±1.13 [#]	10.62±1.01 [#]
小檗碱	75 mg·kg ⁻¹	6.83±0.54 [#]	4.45±0.46 [#]	73.90±3.43 [#]	36.12±3.04 [#]
	150 mg·kg ⁻¹	5.93±0.54 [#]	3.45±0.37 [#]	79.90±3.23 [#]	42.12±4.04 [#]
小檗碱+3-MA	150 mg·kg ⁻¹ +100 mmol·L ⁻¹	7.97±1.87 [▲]	5.98±1.12 [▲]	61.03±3.01 [▲]	26.51±2.02 [▲]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与小檗碱 150 mg/kg 组比较: [▲] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Sham operation group; [#] $P<0.05$ vs model group; [▲] $P<0.05$ vs 150 mg/kg berberine group

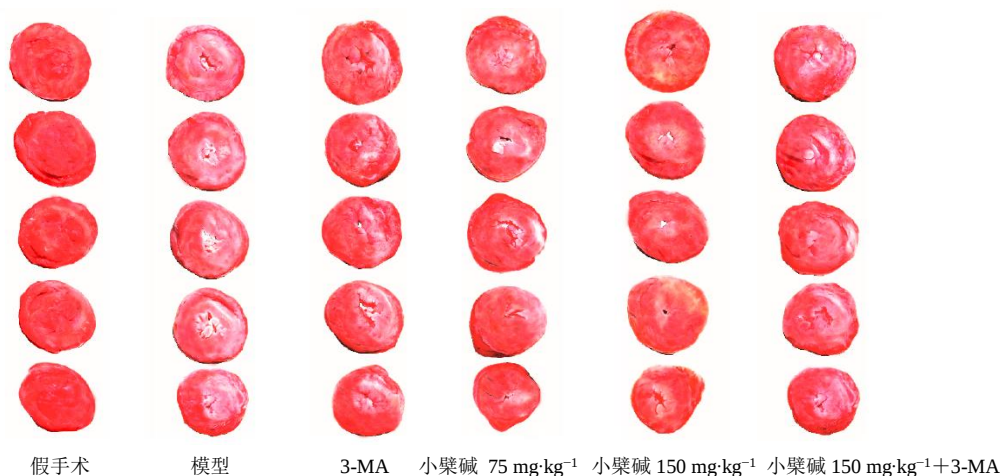


图1 心肌 TTC 染色结果

Fig.1 Myocardial TTC staining image results

3.3 各组大鼠心肌组织病理变化比较

假手术组大鼠心肌结构完整清晰,无损伤;模型组大鼠心肌组织纤维变性、断裂、排列紊乱,间质水肿及炎性细胞浸润等病理损伤严重;与模型组相比,3-MA 组大鼠心肌组织上述病理损伤加重;小檗碱低、高剂量组大鼠心肌组织上述病理损伤减轻;与小檗碱高剂量组相比,小檗碱+3-MA 组大鼠心肌组织上述病理损伤加重,见图2。

3.4 各组大鼠血清 CK-MB、cTnI 水平比较

与假手术组相比,模型组大鼠血清中 CK-MB、cTnI 水平升高($P<0.05$)。与模型组相比,3-MA 组大鼠血清中 CK-MB、cTnI 水平升高($P<0.05$);小檗碱低、高剂量组大鼠血清中 CK-MB、cTnI 水平降低($P<0.05$)。与小檗碱高剂量组相比,小檗碱+3-MA 组大鼠血清中 CK-MB、cTnI 水平升高($P<0.05$),见表3。

表2 各组大鼠心肌梗死面积比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 2 Comparison of myocardial infarction area of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量	心肌梗死面积/%
假手术	—	0.06 ± 0.01
模型	—	29.03 ± 3.28*
3-MA	100 mmol·L ⁻¹	47.83 ± 0.56 [#]
小檗碱	75 mg·kg ⁻¹	12.31 ± 2.87 [#]
	150 mg·kg ⁻¹	6.31 ± 1.76 [#]
小檗碱+3-MA	150 mg·kg ⁻¹ +100 mmol·L ⁻¹	26.03 ± 3.18 [▲]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与小檗碱 150 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs 150 mg·kg⁻¹ berberine group

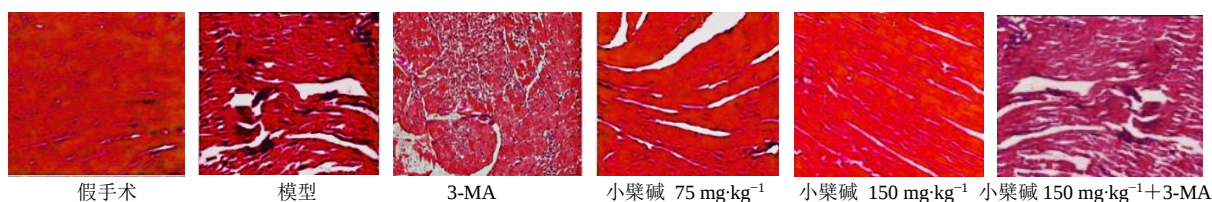


图2 HE染色检测各组大鼠心肌组织病理变化 (×100)

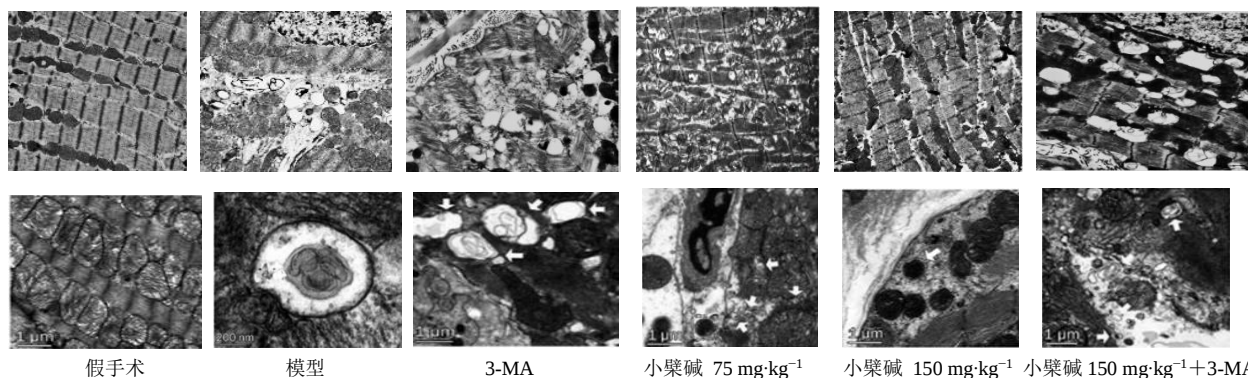
Fig.2 HE staining to detect the pathological changes of myocardial tissue of rats in each group (×100)

表3 各组大鼠血清中CK-MB、cTnI水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)Table 3 Comparison of CK-MB and cTnI levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量	CK-MB/(ng·mL ⁻¹)	cTnI/(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	45.31 ± 7.16	9.03 ± 1.26
模型	—	117.14 ± 24.05*	36.36 ± 6.18*
3-MA	100 mmol·L ⁻¹	198.89 ± 30.16 [#]	93.02 ± 13.07 [#]
小檗碱	75 mg·kg ⁻¹	83.31 ± 10.26 [#]	21.09 ± 3.02 [#]
	150 mg·kg ⁻¹	52.42 ± 11.45 [#]	11.02 ± 2.01 [#]
小檗碱+3-MA	150 mg·kg ⁻¹ +100 mmol·L ⁻¹	119.92 ± 23.38 [▲]	38.24 ± 6.08 [▲]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与小檗碱 150 mg·kg⁻¹ 组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs 150 mg·kg⁻¹ berberine group



假手术

模型

3-MA

小檗碱 75 mg·kg⁻¹小檗碱 150 mg·kg⁻¹小檗碱 150 mg·kg⁻¹+3-MA

箭头所示为双层膜结构的自溶酶体或晚期/降解性自噬泡

The arrow shows double membrane structure of autolysosome or late / degradable autophagy vesicle

图3 心肌细胞线粒体超微结构 (×15 000, A) 和心肌细胞线粒体自噬 (×30 000, B)

Fig. 3 Mitochondria ultrastructure of cardiomyocytes (×15 000, A) and mitophagy of cardiomyocytes (×30 000, B)

3.5 各组大鼠线粒体结构及损伤评分比较

假手术组线粒体结构正常。与假手术组相比,模型组大鼠可见肌原纤维紊乱、断裂、线粒体肿胀、基质密度降低、嵴突紊乱及空泡化严重,且有自噬体、双层膜结构内包裹线粒体样细胞器形成,线粒体损伤评分升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,3-MA组大鼠线粒体肿胀及空泡化严重,自噬体及双层膜结构内包裹线粒体样细胞器形成较少,线粒体损伤评分升高 ($P < 0.05$); 小檗碱低、高剂量组大鼠线粒体肿胀、空泡化减轻,自噬体形成较多,线粒体结构损伤评分降低 ($P < 0.05$)。与小檗碱高剂量组相比,小檗碱+3-MA组线粒体损伤评分升高 ($P < 0.05$), 见图3和表4。

表 4 各组大鼠线粒体损伤程度评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 4 Scores of mitochondrial damage in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量	线粒体损伤程度评分
假手术	—	0.31 ± 0.06
模型	—	3.14 ± 0.16*
3-MA	100 mmol·L ⁻¹	3.89 ± 0.19 [#]
小檗碱	75 mg·kg ⁻¹	2.31 ± 0.15 [#]
	150 mg·kg ⁻¹	1.42 ± 0.10 [#]
小檗碱+3-MA	150 mg·kg ⁻¹ +100 mmol·L ⁻¹	3.22 ± 0.18 [▲]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与小檗碱 150 mg/kg 组比较: [▲] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Sham operation group; [#] $P<0.05$ vs model group; [▲] $P<0.05$ vs 150 mg/kg berberine group

3.6 各组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、LC3B、p62、USP30 蛋白表达比较

与假手术组比,模型组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、LC3B、p62 蛋白表达升高 ($P<0.05$), USP30 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 3-MA 组大鼠心肌组织 PINK1、Parkin、LC3B、p62 蛋白表达降低 ($P<0.05$), USP30 升高 ($P<0.05$); 小檗碱低、高剂量大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、

LC3B、p62 蛋白表达升高 ($P<0.05$), USP30 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与小檗碱高剂量组相比, 小檗碱+3-MA 组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、LC3B、p62 蛋白表达降低 ($P<0.05$), USP30 降低 ($P<0.05$), 见图 4 和表 5。

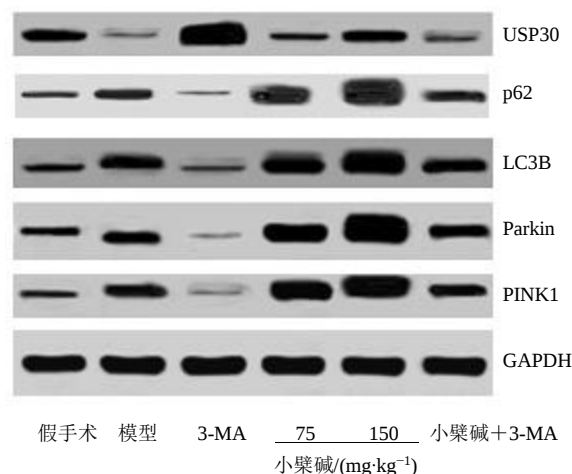


图 4 各组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、LC3B、p62、USP30 蛋白表达免疫印迹检测结果

Fig. 4 Western blotting detection results of PINK1, Parkin, LC3B, p62, USP30 protein expression in myocardial tissue of rats in each group

表 5 各组大鼠心肌组织中 PINK1、Parkin、LC3B、p62、USP30 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Comparison of PINK1, Parkin, lc3b, p62 and USP30 protein expression in myocardial tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量	PINK1/GAPDH	Parkin/GAPDH	LC3B/GAPDH	p62/GAPDH	USP30/GAPDH
假手术	—	0.42 ± 0.20	0.46 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.56 ± 0.03	0.76 ± 0.03
模型	—	0.79 ± 0.07*	0.73 ± 0.13*	0.83 ± 0.13*	0.81 ± 0.13*	0.21 ± 0.13*
3-MA	100 mmol·L ⁻¹	0.19 ± 0.02 [#]	0.24 ± 0.22 [#]	0.18 ± 0.22 [#]	0.23 ± 0.22 [#]	1.33 ± 0.22 [#]
小檗碱	75 mg·kg ⁻¹	1.02 ± 0.02 [#]	1.02 ± 0.02 [#]	1.12 ± 0.02 [#]	1.09 ± 0.02 [#]	0.43 ± 0.02 [#]
	150 mg·kg ⁻¹	1.36 ± 0.19 [#]	1.43 ± 0.04 [#]	1.43 ± 0.04 [#]	1.39 ± 0.04 [#]	0.69 ± 0.04 [#]
小檗碱+3-MA	150 mg·kg ⁻¹ +100 mmol·L ⁻¹	0.81 ± 0.10 [▲]	0.74 ± 0.12 [▲]	0.84 ± 0.12 [▲]	0.80 ± 0.12 [▲]	0.26 ± 0.12 [▲]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与小檗碱 150 mg/kg 组比较: [▲] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs Sham operation group; [#] $P<0.05$ vs model group; [▲] $P<0.05$ vs 150 mg/kg berberine group

4 讨论

冠心病、心肌梗死严重威胁人类生命健康^[13]。药物溶栓、冠状动脉支架置入术和冠状动脉旁路移植术等方法使冠心病、心肌梗死患者心脏恢复血液供应的同时,会造成心脏再灌注损伤^[14]。结扎左冠状动脉前降支 30 min 后恢复血液供应,能够引起大鼠心肌组织损伤、心肌梗死面积增加及心肌损伤标

记物 CK-MB、cTnI 大量释放^[15]。与此一致,本研究亦观察到,结扎大鼠左冠状动脉前降支 30 min 后恢复血液供应可造成大鼠心肌组织出现纤维变性、间质水肿及炎性细胞浸润等病理损伤,引起心肌梗死并伴随血清 CK-MB 及 cTnI 大量释放,且左心室功能指标 LVEDD、LVESD 升高, LVEF、FS 降低。心肌缺血再灌注后氧供恢复,钙超载与活性氧暴增

会改变线粒体膜通透性,引起细胞色素和蛋白激酶激活,致使线粒体肿胀甚至凋亡,最终导致细胞凋亡及功能丧失^[16-17]。本研究发现,模型组大鼠心肌细胞线粒体肿胀、嵴突紊乱、空泡等结构损伤严重,可见少量线粒体自噬体形成,线粒体损伤评分异常升高,提示心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞出现线粒体结构破坏及少量线粒体自噬现象。

小檗碱又称黄连素,是黄连、黄柏中主要的活性成分,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多种药理作用^[18]。近来研究发现,小檗碱具有多种抗心血管疾病作用,且能通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路、单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/mTOR 信号通路、活性氧(ROS)/c-Jun 氨基末端激酶(JNK)通路和 ROS/AMPK/mTOR 等通路调控心肌细胞自噬发挥缺血性心脏病的治疗^[8]。但小檗碱对心肌缺血再灌注过程中线粒体自噬的作用及机制研究较少。本研究发现,心肌缺血再灌注大鼠经小檗碱低、高剂量治疗后,心肌细胞线粒体肿胀、空泡等损伤明显缓解,且心肌组织病理损伤程度、心肌梗死面积、血清 CK-MB 及 cTnI 水平及左心室功能损伤指标均显著降低,表明小檗碱可改善心肌缺血再灌注损伤作用,并能缓解心肌细胞线粒体结构损伤。

线粒体自噬增强或抑制在心肌缺血再灌注损伤过程中的保护作用仍存在争议,适当线粒体自噬可及时清除受损线粒体,避免受损线粒体释放大量氧自由基而加重细胞损伤^[19]。PINK1 可迅速聚集在受损线粒体外膜表面,一方面能通过募集自噬受体如 P62,并与 LC3B 结合形成自噬体,促进受损线粒体被自噬体吞噬^[20];另一方面可通过直接激活 Parkin 并介导线粒体泛素链合成,诱导线粒体自噬的发生^[6]。本研究发现,模型组大鼠心肌组织中 PINK1、P62、LC3B、Parkin 表达明显高于假手术组,推测 PINK1/Parkin 通路激活可能介导线粒体自噬参与心肌缺血再灌注损伤过程,这可能是机体应对外界损伤做出的保护性应激反应。另外 Parkin 与 USP30 之间存在靶向关系,USP30 可去除线粒体外膜 Parkin 结合的泛素链,减少线粒体外膜对 Parkin 的募集,抑制线粒体自噬^[21];还可阻止泛素链在线粒体堆积,抑制线粒体异常自噬^[22]。而本研究发现,模型组大鼠心肌组织中 USP30 水平明显低于假手术组,USP30 水平不足可能预示着心肌缺血再灌注大鼠心肌组织中线粒体存在异常自噬行为,这可能

是心肌缺血再灌注大鼠心肌组织线粒体自噬激活而心肌损伤仍然严重的重要原因。本研究结果显示,小檗碱低、高剂量组 PINK1、P62、LC3B、Parkin 表达进一步升高的同时,USP30 水平回升且趋于正常值,推测小檗碱在促进 PINK1/Parkin/P62/LC3B 自噬通路激活过程,可能对 USP30 进行调控,这可能是小檗碱调控线粒体自噬发挥心肌保护作用的可能机制。而本研究采用自噬抑制剂 3-MA 抑制线粒体自噬后,大鼠心肌损伤加重,PINK1/Parkin/P62/LC3B 自噬通路蛋白表达降低,USP30 表达异常增高,推测 USP30 可能参与 3-MA 抑制 PINK1/Parkin 线粒体自噬激活过程,USP30 水平过高或过低都可能预示着自噬的异常。本研究还发现,3-MA 可逆转小檗碱对心肌缺血再灌注大鼠 PINK1/Parkin/P62/LC3B 通路、USP30 蛋白表达、线粒体损伤及心肌损伤的调节作用,证实小檗碱可能通过激活 PINK1/Parkin/P62/LC3B 通路促进线粒体自噬,升高 USP30 表达,减少异常自噬,缓解心肌缺血再灌注损伤。

小檗碱可能通过促进 PINK1/Parkin/P62/LC3B 通路及 Parkin/USP30 蛋白表达,调控线粒体自噬,缓解心肌缺血再灌注大鼠心功能损伤,可能为阐明线粒体自噬参与心肌缺血再灌注保护的机制及完善小檗碱改善心肌损伤的机制提供一定参考。但 Parkin/USP30 抑制线粒体泛素化降低自噬异常的机制复杂,还需后续深入验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen Y H, Lin H, Wang Q, et al. Protective role of silibinin against myocardial ischemia/reperfusion injury-induced cardiac dysfunction [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 1972-1988.
- [2] 王紫蓝, 张立民, 赵自刚, 等. 心肌缺血再灌注损伤研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(6): 1532-1536.
- [3] Wang J, Toan S, Zhou H, et al. New insights into the role of mitochondria in cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury [J]. *Angiogenesis*, 2020, 23(3): 299-314.
- [4] Yang X, Pan W, Xu G, et al. Mitophagy: A crucial modulator in the pathogenesis of chronic diseases [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 502(1): 245-254.
- [5] Wu M, Lu G, Lao Y Z, et al. Garciesculenxanthone B induces PINK1-Parkin-mediated mitophagy and prevents ischemia-reperfusion brain injury in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 10(38): 1401-1420.

- [6] 张明军, 罗俊一, 杨毅宁, 等. PINK1, Parkin 与泛素协同调控线粒体自噬的研究进展 [J]. 医学综述, 2020, 26(10): 1887-1892.
- [7] Wang H, Chen S, Zhang Y, *et al.* Electroacupuncture ameliorates neuronal injury by Pink1/Parkin-mediated mitophagy clearance in cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Nitric Oxide*, 2019, 91(1): 23-34.
- [8] 林道斌, 张 明. 小檗碱对缺血性心脏病中细胞自噬的调控机制研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 239-243.
- [9] 庄 微, 刘挺松, 张成成, 等. 小檗碱对波动性高糖诱导的人冠状动脉内皮细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1365-1371.
- [10] 张 童. 黄连素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 四川医学, 2018, 39(4): 393-396.
- [11] 叶 亮, 袁 淼, 肖文峰, 等. 脑损伤模型大鼠 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬作用 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(11): 1695-1700.
- [12] 王 艳, 卢晓娥, 赵 品, 等. 过表达前脑啡肽原 (PPENK) 增强线粒体自噬减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(10): 1335-1340.
- [13] Vallabhajosyula S, Vallabhajosyula S, Burstein B, *et al.* Epidemiology of in-hospital cardiac arrest complicating non-ST-segment elevation myocardial infarction receiving early coronary angiography [J]. *Am Heart J*, 2020, 223(1): 59-64.
- [14] Horan D P, O'Malley T J, Weber M P, *et al.* Repair of ischemic ventricular septal defect with and without coronary artery bypass grafting [J]. *J Card Surg*, 2020, 35(5): 1062-1071.
- [15] Li L, Liu T, Liu L, *et al.* Metabolomics analysis of the effect of hydrogen-rich water on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2020, 52(4): 257-268.
- [16] Yu Z, Li Q, Wang Y, *et al.* A potent protective effect of baicalein on liver injury by regulating mitochondria-related apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2020, 25(5-6): 412-425.
- [17] Boulghobra D, Coste F, Geny B, *et al.* Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury: A central role for mitochondria [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152(1): 395-410.
- [18] 刘 昊, 周志斌. 小檗碱调脂的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1676-1679.
- [19] Kulek A R, Anzell A, Wider J M, *et al.* Mitochondrial Quality Control: Role in cardiac models of lethal ischemia-reperfusion injury [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 214-216.
- [20] Yu M, Yang J, Gao X, *et al.* Lanthanum chloride impairs spatial learning and memory by inducing $[Ca^{2+}]_m$ overload, mitochondrial fission-fusion disorder and excessive mitophagy in hippocampal nerve cells of rats [J]. *Metallomics*, 2020, 12(4): 592-606.
- [21] Deol K K, Eyles S J, Strieter E R, *et al.* Quantitative middle-down MS analysis of parkin-mediated ubiquitin chain assembly [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, 31(5): 1132-1139.
- [22] Marcassa E, Kallinos A, Jardine J, *et al.* Dual role of USP30 in controlling basal pexophagy and mitophagy [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(7): 455-459.

[责任编辑 刘东博]