

益气养阴活血中药减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤作用研究

李玉红, 李妍妍, 樊官伟, 周 昆, 段真珍, 于佳慧, 高秀梅*

天津中医药大学中医药研究院, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

摘要: 目的 研究益气养阴活血中药(参麦注射液与丹参注射液联合应用, YYH)通过激活 PI3K-Akt 与 ERK1/2 信号通路, 抑制 mPTP 开放, 减轻心肌缺血再灌注(I/R)损伤, 发挥心肌保护作用。方法 应用大鼠离体心脏 I/R 损伤模型, 灌流 2.5、5、10 $\mu\text{L/mL}$ YYH 及 PI3K 特异性抑制剂 LY294002, 检测心脏功能指标、灌流液肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)活性、TTC 染色观察心肌梗死面积、透射电镜观察心肌超微结构、Western blotting 检测相关蛋白表达。YYH 预处理离体心脏后进行 I/R, 分离心肌线粒体, 以 mPTP 特异性抑制剂环孢素 A(CsA)作对照, 检测线粒体通透性转换孔(mPTP)开放情况; 药物与线粒体孵育后检测 mPTP 开放。结果 YYH 10 $\mu\text{L/mL}$ 预处理能改善离体心脏功能指标, 减少心肌梗死面积, 减轻心肌组织超微结构损伤, 5、10 $\mu\text{L/mL}$ 降低心脏灌流液中 CK、LDH 活性; 其改善心功能指标、减少心肌梗死面积的作用被 LY294002 部分或完全抵消; YYH 处理后心肌组织 p-Akt、p-ERK1/2、p-GSK-3 β 蛋白表达上调, LY294002 阻断了 YYH 诱导的 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达上调; 在外源性钙刺激下, YYH 预处理组 mPTP 比模型组更容易开放; YYH、参麦注射液能够直接抑制 mPTP 开放。结论 YYH 预处理通过激活 PI3K-Akt 与 ERK1/2 信号通路, 抑制 mPTP 开放, 减轻心肌 I/R 损伤, 发挥心肌保护作用; 其抑制 mPTP 开放的作用机制与 CsA 不完全相同。

关键词: 参麦注射液; 丹参注射液; 心肌缺血再灌注损伤; 线粒体通透性转换孔; PI3K-Akt; ERK1/2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)02-0281-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.02.017

Cardioprotective effects of Yiqi Yangyin Huoxue Injection against ischemia-reperfusion injury in isolated hearts of rats

LI Yu-hong, LI Yan-yan, FAN Guan-wei, ZHOU Kun, DUAN Zhen-zhen, YU Jia-hui, GAO Xiu-mei

Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine Research, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To clarify the cardioprotective effects of Yiqi Yangyin Huoxue (YYH) Injection exert against ischemia-reperfusion (I/R) injury, and the mechanisms involving activation of specific survival signals reperfusion injury salvage kinase (PI3K-Akt pathway and ERK1/2 pathway), hence inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening (mPTP). **Methods** A Langendorff model of myocardial ischemia-reperfusion injury was employed. The rats were randomly divided into seven groups: control group, I/R group, YYH 2.5, 5, and 10 $\mu\text{L/mL}$ groups, LY294002 + YYH 10 $\mu\text{L/mL}$ group, and LY294002 group. The cardiac parameters of left ventricular developed pressure (LVDP), maximal rise/fall of left ventricular pressure ($\pm dp/dt_{\max}$), and rate-pressure product (RPP) were monitored. Creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) released from effluents were measured. Infarct size was estimated by TTC staining. Transmission electron microscopy (TEM) was performed to assess morphological difference between cardiac mitochondria isolated I/R rats and YYH pretreated rats. Western blotting was used to determine some protein expression. MPTP opening in mitochondria isolated from Langendorff rat hearts pretreated with YYH was measured. Incubation of isolated cardiac mitochondria with YYH and mPTP opening was measured. **Results** YYH 10 $\mu\text{L/mL}$ can significantly improve ventricular function, ameliorate the level of myocardial tissue lesions. YYH (5 and 10 $\mu\text{L/mL}$) reduced CK and LDH release. And these protections were accompanied by a significant increase in p-PKB/Akt, p-ERK1/2, and p-GSK-3 β (Ser-9). LY294002 abolished the protective effects of YYH on cardiac function and infarct size and inhibited YYH-induced phosphorylation of PKB/Akt and GSK-3 β . MPTP opening in mitochondria isolated from YYH-pretreated occurred more readily *in vitro* than I/R mitochondria. YYH (2.5, 5, 10, and 20 $\mu\text{L/mL}$), Shenmai injection (2.5, 5, 10, and 20 $\mu\text{L/mL}$)

收稿日期: 2015-06-15

基金项目: “973” 计划项目 (2012CB518404); 国家自然科学基金资助项目 (81202779)

作者简介: 李玉红(1976—), 女, 河北武安人, 副研究员, 研究方向为心血管、代谢性疾病中药药理。Tel: (022)59596163 E-mail: yhlctm@126.com

*通信作者 高秀梅 Tel: (022)59596168 E-mail: yanjiuyuanbangongshi@gmail.com

resulted in a significant inhibition of Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling. **Conclusion** YYH produces direct cardioprotective actions. Inhibition of mPTP is a key event by which it mediates myocardial protection against I/R injury. And this effects involve activation of PI3K-Akt and ERK1/2 signal pathway. The mechanism of its action is different from that of CsA.

Key words: Shenmai Injection; Danshen Injection; myocardial ischemia reperfusion injury; mPTP; PI3K-Akt; ERK1/2

益气养阴活血中药(参麦注射液与丹参注射液联合应用, YYH) 临床常用于治疗休克、冠心病、心肌缺血再灌注(I/R) 损伤、心力衰竭、急性脑梗死等^[1-4]。研究显示, 急性心肌梗死患者冠状动脉介入治疗后早期联合应用参麦注射液与丹参注射液能够降低患者丙二醛(MDA) 水平、升高超氧化物歧化酶(SOD) 活性, 减少白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等细胞因子, 减轻炎症反应, 减轻心肌 I/R 损伤, 对缺血心肌具有一定的保护作用^[1]。

线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 是存在于线粒体内膜的一种非特异性通道, 众多研究证实, mPTP 开放是引起心肌 I/R 损伤的关键因素, 缺血心肌的功能恢复也与 mPTP 开放程度相关, 故抑制其开放成为心肌保护作用的最效应器^[5-6]。导致 mPTP 开放的因素主要包括线粒体钙超载、线粒体源性活性氧类物质爆发产生引起的脂质过氧化反应。PI3K-Akt 和 ERK1/2 信号通路成为心肌 I/R 损伤中介导心肌保护的重要信号转导通路^[7-8], 再灌注期间激活 PI3K-Akt 及 ERK1/2 信号通路, 能够抑制 mPTP 开放, 在线粒体水平发挥心肌保护作用^[9-10]。

大鼠离体心脏 I/R 损伤模型通过灌流液的调整或阻断模拟全心 I/R, 是常用的研究 I/R 的体外模型。本实验应用此模型, 观察 YYH 对心脏的保护作用, 及其通过激活 PI3K-Akt 与 ERK1/2 信号通路, 抑制 mPTP 开放, 发挥心肌保护作用的机制。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠, 体质量 300~340 g, 北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 合格证号 SCXK(京) 2009-0004。

1.2 药品与试剂

YYH, 即参麦注射液(批号 1107201)、丹参注射液(批号 1208162) 按 1:1 配制, 两种注射液均由正大青春宝药业有限公司提供。环孢素 A(CsA, 批号 C3662-5mg)、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)、PD98059、钙离子载体 A23187, Sigma-Aldrich 公司; 肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH) 试剂盒, 中生北控生物科技股份有限公司; Akt、p-Akt

(Ser-473)、ERK1/2、p-ERK1/2、GSK-3 β 、p-GSK-3 β (Ser-9) 抗体, Cell Signaling Technology, Inc.; PI3K 选择性抑制剂 LY294002(LY), Apollo Scientific 有限公司; 线粒体提取试剂盒、抗霉素, 北京索莱宝科技有限公司。

Krebs-Henseleit(K-H) 缓冲液(mmol/L): NaCl 118、 NaHCO_3 24.0、KCl 4.7、 MgSO_4 1.2、 KH_2PO_4 1.2、葡萄糖 11.1、 CaCl_2 2.5, 实验前 1~2 h 通入 95% O_2 、5% CO_2 混合气体, 维持 pH 值 7.2~7.4。

线粒体肿胀液(mmol/L): ① KSCN 150、3-(N-吗啉基)丙磺酸 20、Tris 10、次氨基三乙酸 2、鱼藤酮 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、抗霉素 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、A23187 2 $\mu\text{mol/L}$ (pH 值为 7.2)。② KCl 120、Tris 或 Tris-HCl 10、丙磺酸 20、 KH_2PO_4 5。

线粒体重悬液(mmol/L): 蔗糖 320、Tris-HCl 或 Tris 10(pH 值为 7.4)。

1.3 仪器

Langendorff 离体心脏灌流系统、MLP844 压力换能器, 澳大利亚 ADInstrument Pty 有限公司; 日立 7020 全自动生化分析仪, 日本 HITACHI 公司; Philips EM400ST 型透射电子显微镜, 荷兰 Philips Tecnai 公司; LKB-V 型超薄切片机, 瑞典 LKB 公司; UC750 超声波破碎仪, 美国 SONICS 公司; 蛋白电泳转印系统、多板制胶机, BIO-RAD; Enspire 多功能读板机, 美国 Perkinelmer 公司。

2 方法

2.1 大鼠离体心脏的制备

按照文献方法制备大鼠离体心脏^[11], 戊巴比妥钠(50 mg/kg, ip) 麻醉大鼠, 开胸迅速取出心脏, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ K-H 缓冲液中, 剥离残留的肺脏或周围组织, 立即将心脏连接到灌流装置, 并将主动脉与灌流装置针头固定, K-H 缓冲液逆行灌流。MLP844 压力换能器监测冠脉灌注压。将一自制的封闭球囊置于左心室, 进行等容心室内压力监测, 反映心脏功能^[12]。调节球囊大小, 使左心室舒张压(LVEDP) 维持在 0.66~1.33 kPa, 心脏功能用 LVEDP、左心室收缩压(LVSP)、左室发展压(LVDP)、左心室内压最大上升速率($+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)、左心室内压最大下降速率($-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$) 及心率压力乘积(RPP) 等指

标进行评价^[13]。调节冠脉流量在10~15 mL/min内,使灌注压维持在8.64 kPa左右,进行恒压灌注^[12]。

2.2 分组及 I/R 模型的制备

采用全心停灌30 min,再灌注60 min的方法建立I/R模型。具体灌流方法:对照组以K-H缓冲液灌流120 min;模型组以K-H缓冲液平衡心脏30 min,停止灌流30 min,再灌注60 min;YYH低、中、高剂量组以K-H缓冲液平衡心脏20 min,用含终体积分数为2.5、5、10 $\mu\text{L/mL}$ YYH的K-H缓冲液灌流心脏10 min,灌流冲洗,停灌、再灌注同模型组;YYH+LY组:心脏平衡15 min后,用含15 $\mu\text{mol/L}$ LY的K-H液灌流心脏15 min,后10 min同时灌流10 $\mu\text{L/mL}$ YYH,停灌、再灌注同模型组;LY组:心脏平衡15 min后,用含15 $\mu\text{mol/L}$ LY的K-H液灌流心脏15 min,停灌、再灌注同模型组;mPTP开放实验,设立阳性药组:心脏平衡25 min后,1 $\mu\text{mol/L}$ 的mPTP特异性抑制剂CsA灌流5 min,停灌、再灌注同模型组。停止灌流期间,心脏用37 $^{\circ}\text{C}$ K-H液恒温浸泡。

2.3 心脏功能的测定

实验分组为对照组,模型组,YYH低、中、高剂量组,YYH+LY组,LY组,方法同“2.2”项。检测 $\pm dp/dt_{\max}$ 、LVSP、LVEDP、心率(HR),计算LVDP、RPP。

$$\text{LVDP} = \text{LVSP} - \text{LVEDP}$$

$$\text{RPP} = \text{LVDP} \times \text{HR}$$

2.4 心脏流出液 CK、LDH 活性的测定

实验分组为对照组,模型组,YYH低、中、高剂量组,方法同“2.2”项。分别在心脏灌注平衡20 min,再灌注5、10、20、30、60 min收集冠脉流出液,全自动生化分析仪测定CK、LDH活性。

2.5 TTC 染色观察心肌梗死面积

实验分组为模型组、YYH高剂量组、YYH+LY组,方法同“2.2”项。TTC染色法^[14]确定心肌梗死面积。−20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻心脏20 min,取出后沿心脏短轴切成横切面1~2 mm厚的切片。切片放入1% TTC (pH 7.4, 温度37 $^{\circ}\text{C}$)中染色15 min,10%甲醛固定隔夜,数码相机拍照。砖红色为正常区域,白色或灰白色为梗死区域。

2.6 心肌超微结构观察

实验分组为对照组、模型组、YYH高剂量组,方法同“2.2”项。取约1.5 mm³大小新鲜固定部位心尖部组织,3%戊二醛固定(0.1 mol/L PBS, pH 7.2,

4 $^{\circ}\text{C}$)过夜,磷酸缓冲液(0.1 mol/L PBS, pH 7.2, 4 $^{\circ}\text{C}$)漂洗10 min,共漂洗3次,用1%四氧化锇固定2 h,再用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L PBS, pH 7.2, 4 $^{\circ}\text{C}$)漂洗15 min,共漂洗3次,经30%~100%梯度乙醇(4 $^{\circ}\text{C}$)逐级脱水,以包埋剂SPI-PON 812环氧树脂包埋,40 $^{\circ}\text{C}$ 24 h浸透,60 $^{\circ}\text{C}$ 48 h聚合,LKB-V型超薄切片机制作超薄切片,柠檬酸铅-乙酸双氧铀双染色后,在Philips EM400ST型透射电子显微镜下观察心肌细胞超微结构。

2.7 Western blotting 检测心肌组织蛋白表达

再灌注10 min,迅速取下心脏,取左室组织约100 mg,置于预冷的组织裂解液中尽快剪碎,用组织匀浆机制成10%匀浆,匀浆液4 $^{\circ}\text{C}$,14 000 $\times g$ 离心15 min,吸取上清液,Bradford法进行蛋白浓度测定。每4 μL 蛋白样品加入1 μL SDS-PAGE蛋白上样缓冲液混合,沸水3~5 min,使蛋白充分变性,取40 μg 样品上样至12.5% SDS-PAGE凝胶电泳,随后电转膜至硝化纤维膜,Western封闭液封闭6 h,分别用Akt、p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2及GSK-3 β 、p-GSK-3 β 一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育24 h,二抗室温缓慢振荡孵育2 h,显色后底片进行数码拍摄,并用ImageJ 1.37软件进行半定量灰度分析。

2.8 心肌线粒体的制备

采用差速分级离心法分离线粒体^[15]。将大鼠左心室剪为碎块,匀浆,1 000 $\times g$ 离心5 min;取上清,1 000 $\times g$ 再次离心5 min;取上清12 000 $\times g$ 离心10 min,线粒体沉淀在管底;加入线粒体重悬液重悬沉淀,1 000 $\times g$ 离心5 min;取上清,12 000 $\times g$ 离心10 min,高纯度的线粒体沉淀在管底。所有操作均低温进行,考马斯亮蓝测定蛋白量。

2.9 无能量条件 mPTP 开放的检测

取下I/R心脏制备线粒体,mPTP的开放以线粒体在200 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂作用下肿胀产生的520 nm处吸光度(*A*)值的下降来反映^[16]。取线粒体用线粒体肿胀液①稀释至0.5 g/L蛋白,于25 $^{\circ}\text{C}$,200 $\mu\text{mol/L}$ CaCl₂作用于线粒体,连续观察*A*值的变化。该变化反映线粒体肿胀程度,提示mPTP的开放情况。当mPTP开放时,导致线粒体通透性增加,肿胀液中的溶质内流入线粒体基质,引起线粒体膨胀,体积增大,外膜破裂,*A*值下降^[17]。

提取对照组、缺血30 min/再灌注3、120 min心脏线粒体,进行线粒体在无能量条件下mPTP开放实验以确定再灌注时间;进而按照“2.2”项方法设置模

型组、YYH 高剂量组、阳性药组, 进行线粒体在无能量条件下 mPTP 开放实验(再灌注时间为 3 min)。

2.10 药物与线粒体孵育检测 mPTP 的开放

mPTP 的开放以线粒体肿胀产生的 A 值下降来反映^[15,17]。制备正常大鼠心脏线粒体, 取线粒体与 0、2.5、5、10、20 $\mu\text{L/mL}$ YYH 或参麦注射液、丹参注射液体外 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 和线粒体孵育 5 min 作为阳性药组。用线粒体肿胀液②稀释至 0.25 g/L 蛋白, 200 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 作用于线粒体诱发 mPTP 的开放, 连续观察 A 值的变化, 反映 mPTP 的开放情况。

2.11 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 统计软件, 多组间比较用单因素方差分析, 两组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 对离体心脏功能的影响

再灌注 5、10、20、30、40、60 min, 模型组 RPP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 绝对值、LVDP 显著降低。YYH 10 $\mu\text{L/mL}$ 组上述指标显著升高, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。YYH 与 LY 同时应用, YYH 对心脏功能指标的改善作用部分或完全抵消; LY 单独应用无显著影响, 结果见表 1~4。

表 1 YYH 对大鼠离体心脏再灌注不同时间 RPP 的影响

Table 1 Effects of YYH on RPP at different time points after reperfusion of rat isolated heart

组别	剂量/ ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	n	RPP/(kPa·次·min ⁻¹)							
			基础水平		再灌注 5 min	再灌注 10 min	再灌注 20 min	再灌注 30 min	再灌注 40 min	再灌注 60 min
对照	—	6	2 824.4± 359.8	2 310.4±518.3	2 240.0±548.2	2 217.9±453.5	2 176.9±582.0	2 137.4±554.6	2 118.4±543.8	
模型	—	12	3 153.0± 806.8	215.1±141.9 ^{##}	232.7±212.2 ^{##}	363.3±270.0 ^{##}	430.5±307.6 ^{##}	421.0±359.7 ^{##}	413.3±249.5 ^{##}	
YYH	2.5	6	2 930.5±1 225.9	151.1± 66.0	266.6± 68.8	444.6±175.7	485.2±221.1	469.6±254.4	360.7±218.1	
	5	6	3 468.3±1 088.2	204.3± 29.3	212.1± 77.2	303.4±103.1	503.2±185.8	583.8±258.5	553.9±180.9	
	10	11	2 962.4± 504.1	559.7±522.0 [*]	668.3±415.8 [*]	795.1±402.6 [*]	842.4±517.4 [*]	860.5±590.2 [*]	772.3±480.2 [*]	
YYH+LY	10+15	6	2 881.3±1 015.5	380.8±198.4	425.4± 47.6	452.7±195.7	345.8±234.0 [▲]	338.3±232.6 [▲]	319.9±341.8 [▲]	
LY	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6	2 882.0± 567.4	229.5±139.0	253.6±211.3	280.2±219.7	270.1±202.3	367.1±307.6	461.6±415.3	

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 YYH 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: [▲] $P < 0.05$, 下同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs YYH 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, same as below

表 2 YYH 对大鼠离体心脏再灌注不同时间 $\pm dp/dt_{\max}$ 的影响

Table 2 Effects of YYH on $\pm dp/dt_{\max}$ at different time points after reperfusion of rat isolated heart

分组	剂量/ ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	n	(+dp/dt _{max})/(kPa·s ⁻¹)							
			基础水平		再灌注 5 min	再灌注 10 min	再灌注 20 min	再灌注 30 min	再灌注 40 min	再灌注 60 min
对照	—	6	275.7±43.4	255.4±60.0	248.5±60.0	246.4±54.8	243.9±47.7	237.8±45.4	237.3±44.2	
模型	—	12	292.2±77.6	19.9±11.7 ^{###}	20.1±13.5 ^{###}	31.3±21.5 ^{###}	40.7±32.2 ^{###}	45.0±39.4 ^{###}	40.1±27.2 ^{###}	
YYH	2.5	6	258.9±86.9	24.2±18.0	24.4±13.5	51.0±14.7	62.6±21.0	58.6±25.2	52.3±27.7	
	5	6	302.0±135.7	19.0±12.0	19.5±12.3	28.7±12.6	49.6±23.2	60.4±32.9	58.9±25.8	
	10	11	278.1±81.0	59.2±59.9 [*]	59.0±63.6 [*]	67.9±70.6 [*]	84.7±78.0 [*]	92.6±70.9 [*]	88.1±56.8 ^{**}	
YYH+LY	10+15	6	316.3±107.7	26.2±19.0	41.2±23.1	40.9±20.6	33.5±21.9 ^{▲▲}	32.1±18.7 ^{▲▲}	25.5±16.5 ^{▲▲}	
LY	15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6	280.9±43.6	26.5±19.7	27.0±23.4	26.8±23.6	37.4±24.8	43.7±36.4	58.6±50.2	

与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 YYH 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$, 下同

^{**} $P < 0.01$ vs model group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs YYH 10 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, same as below

3.2 对冠脉流出液中 CK、LDH 水平的影响

再灌注 5、10、20、30、60 min, 模型组 CK、LDH 释放量显著升高 ($P < 0.01$)。再灌注 60 min 时, YYH 5 $\mu\text{L/mL}$ 组 CK、LDH 释放量显著降低, 再灌注 20、60 min 时, YYH 10 $\mu\text{L/mL}$ 组 CK、LDH 释放量显著降低, 与模型组比较, 差异显著 ($P <$

0.05、0.01)。结果见图 1。

3.3 对心肌梗死面积的影响

1% TTC 染色后, 模型组心脏缺血区域呈白色或灰白色, YYH 10 $\mu\text{L/mL}$ 组白色或灰白色区域减少, 鲜红色或砖红色区域增多。YYH 与 LY 同时灌注, YYH 对心脏的保护作用被部分或完全抵消, 见图 2。

表 3 YYH 对大鼠离体心脏再灌注不同时间 $-dp/dt_{max}$ 的影响

Table 3 Effects of YYH on $-dp/dt_{max}$ at different time points after reperfusion of rat isolated heart

分组	剂量/ ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	n	$(-dp/dt_{max})/(\text{kPa}\cdot\text{s}^{-1})$						
			基础水平	再灌注 5 min	再灌注 10 min	再灌注 20 min	再灌注 30 min	再灌注 40 min	再灌注 60 min
对照	—	6	-173.9 ± 37.1	-169.1 ± 51.2	-163.3 ± 50.1	-158.6 ± 43.9	-156.2 ± 40.8	-149.6 ± 40.8	-144.8 ± 40.0
模型	—	12	-191.4 ± 57.8	$-17.3\pm 8.8^{\#}$	$-17.2\pm 10.3^{\#}$	$-24.4\pm 14.6^{\#}$	$-29.9\pm 21.7^{\#}$	$-31.7\pm 24.6^{\#}$	$-29.0\pm 16.0^{\#}$
YYH	2.5	6	-186.0 ± 62.0	-24.1 ± 13.7	-25.5 ± 17.6	-40.1 ± 15.0	-47.9 ± 15.9	-45.6 ± 18.5	-42.4 ± 21.1
	5	6	-221.9 ± 82.9	-17.8 ± 8.3	-16.4 ± 4.8	-23.4 ± 7.9	-34.7 ± 14.9	-39.0 ± 16.7	-37.2 ± 12.0
	10	11	-205.0 ± 53.4	$-41.5\pm 29.4^*$	$-47.6\pm 37.8^*$	$-51.5\pm 41.8^*$	$-55.9\pm 43.5^*$	$-60.4\pm 38.0^*$	$-56.8\pm 30.0^*$
YYH+LY	10+15	6	-200.6 ± 74.7	-29.8 ± 23.7	-40.3 ± 14.5	-36.6 ± 13.8	$-27.1\pm 15.6^{\Delta}$	$-27.1\pm 17.5^{\Delta}$	$-22.0\pm 15.7^{\Delta}$
LY	$15\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6	-178.8 ± 29.1	-18.3 ± 10.2	-19.2 ± 14.4	-20.3 ± 15.6	-27.4 ± 16.6	-31.2 ± 21.0	-44.0 ± 30.3

表 4 YYH 对大鼠离体心脏再灌注不同时间 LVDP 的影响

Table 4 Effects of YYH on LVDP at different time points after reperfusion of rat isolated heart

分组	剂量/ ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	n	LVDP/kPa						
			基础水平	再灌注 5 min	再灌注 10 min	再灌注 20 min	再灌注 30 min	再灌注 40 min	再灌注 60 min
对照	—	6	9.6 ± 1.2	8.6 ± 2.0	8.3 ± 2.0	8.2 ± 1.7	8.1 ± 1.5	8.0 ± 1.6	7.8 ± 1.6
模型	—	12	$11.2\pm 3.3^{\#\#}$	$1.4\pm 0.8^{\#}$	$1.2\pm 0.6^{\#}$	$1.6\pm 0.9^{\#}$	$1.9\pm 1.3^{\#}$	$2.1\pm 1.5^{\#}$	$1.8\pm 1.0^{\#}$
YYH	2.5	6	10.4 ± 3.6	1.9 ± 1.1	1.7 ± 1.2	2.7 ± 0.8	3.2 ± 0.9	3.1 ± 1.2	2.9 ± 1.4
	5	6	11.2 ± 3.6	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.7	1.5 ± 0.7	2.1 ± 1.4	2.1 ± 1.2	2.0 ± 1.1
	10	11	10.7 ± 2.6	$3.8\pm 2.7^{**}$	$3.6\pm 2.7^{**}$	$2.9\pm 1.3^*$	$3.7\pm 2.7^*$	$4.0\pm 2.4^{**}$	$3.7\pm 1.9^{**}$
YYH+LY	10+15	6	11.2 ± 3.2	2.2 ± 1.8	2.9 ± 1.4	2.9 ± 1.3	$2.0\pm 1.3^{\Delta}$	$2.2\pm 1.2^{\Delta}$	$2.0\pm 1.0^{\Delta}$
LY	$15\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6	9.9 ± 2.6	2.0 ± 1.0	1.8 ± 1.0	1.8 ± 1.1	2.2 ± 1.1	2.3 ± 1.4	3.4 ± 1.5

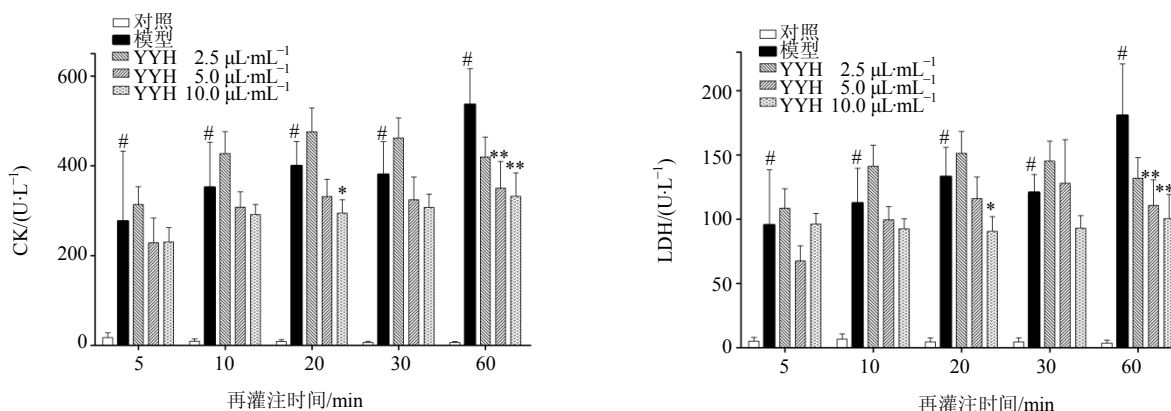


图 1 YYH 对大鼠离体心脏冠脉流出液体 CK 和 LDH 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 1 Effects of YYH on CK and LDH levels in coronary effluent of rat isolated heart ($\bar{x}\pm s, n=6$)



图 2 离体大鼠心脏 TTC 染色

Fig. 2 TTC staining of rat isolated heart

3.4 对心肌超微结构的影响

对照组大鼠心肌微观结构基本正常, 细胞无水肿, 细胞核无肿胀, 核膜完整, 异染色质和常染色质清晰可见。肌纤维排列较整齐, 肌丝和肌小节结构清晰, 可见 A 带、I 带与 H 带及 M 线与 Z 线; 线粒体膜完整, 聚集在一起, 嵴密集; 糖原颗粒较多; 心肌间小血管结构正常, 偶有肌膜肿胀呈指状突起现象。模型组心肌细胞水肿, 肌浆网扩张, 空泡化; 细胞核固缩、周边凝集, 核染色质溶解; 肌小节明暗带模糊不清, 肌丝多发性灶性坏死、溶解

断裂, 部分细胞肌膜崩解; 线粒体肿胀、嵴溶解, 可见灶性空化, 基质内有钙盐样致密颗粒。YYH 10 $\mu\text{L/mL}$ 组病变显著减轻, 肌原纤维排列整齐, 偶见小区域灶性溶解, 肌小节结构清晰, 线粒体稍肿胀, 嵴规则致密; 肌浆网轻度扩张。结果见图 3。

3.5 对 Akt、ERK1/2、GSK-3 β 及其磷酸化蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 各组 Akt、ERK1/2、GSK-3 β 蛋白表达无显著差异。与对照组比较, 模

型组 p-Akt/Akt、(p-ERK1/2)/ERK1/2 蛋白表达升高; YYH 预处理后 p-Akt/Akt、(p-ERK1/2)/ERK1/2、p-GSK-3 β /GSK-3 β 升高, 提示 YYH 能上调 3 种蛋白磷酸化表达; YYH+LY 组 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达显著降低, 提示 LY 阻断了 YYH 诱导的 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达上调, 结果见图 4。

3.6 对 mPTP 开放的影响

3.6.1 YYH 预处理对离体 I/R 心脏分离的线粒体无能量条件下 mPTP 开放的影响 对照组心脏线粒体

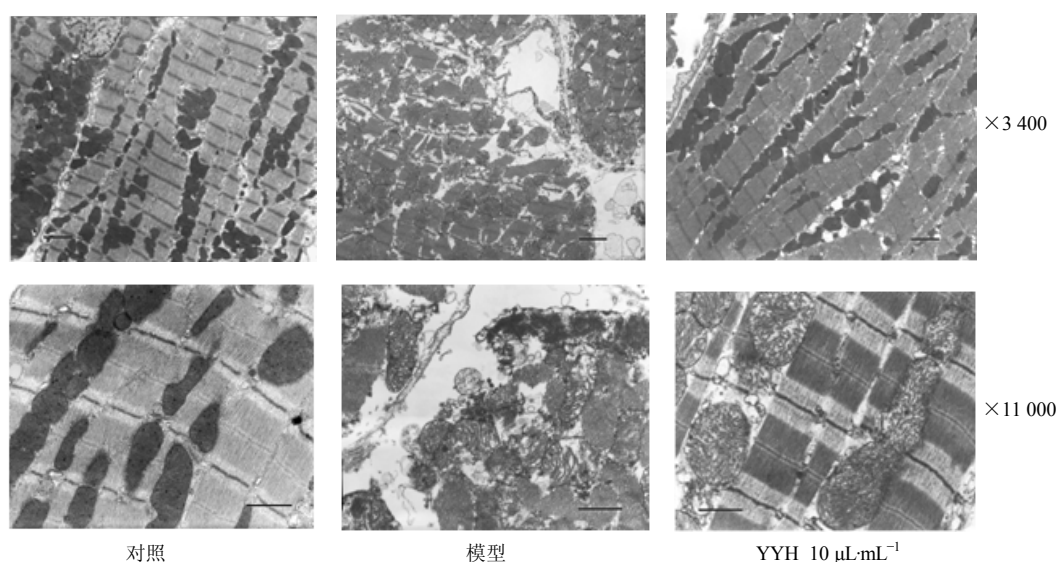


图 3 透射电镜观察心肌超微结构改变

Fig. 3 Transmission electron micrographs of myocardial ultrastructure

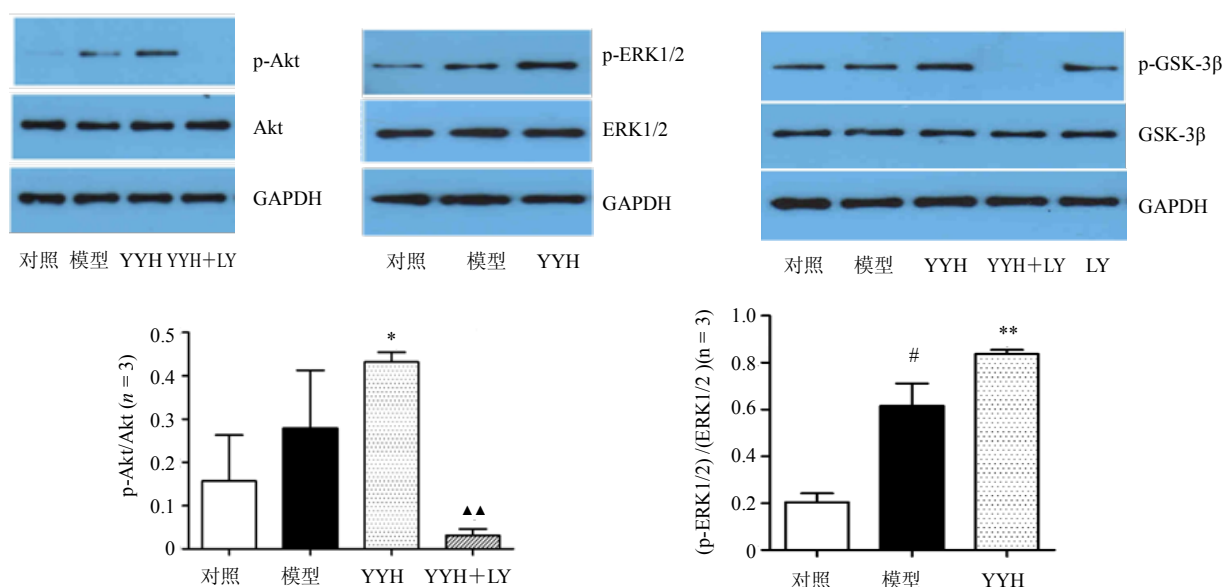


图 4 离体大鼠心脏 p-Akt、Akt、ERK1/2、p-ERK1/2、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 蛋白表达

Fig. 4 Expression of p-Akt, Akt, ERK1/2, and p-ERK1/2 protein in rat isolated heart

A 值显著下降, 线粒体肿胀率很高, 提示在外源性钙刺激下 mPTP 大量开放; 再灌注 120 min 组线粒体肿胀率较低, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。再灌注 3 min 组线粒体肿胀率较高, 与对照组比较, 差异不显著。结果见图 5。选择再灌注 3 min 进行接下来的实验。

10 $\mu\text{L/mL}$ YYH 组心脏分离线粒体, A 值显著下降, 与模型组比较, 更容易开放, 差异显著 ($P < 0.01$); CsA 部分抑制了 A 值显著下降, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 结果见图 6。

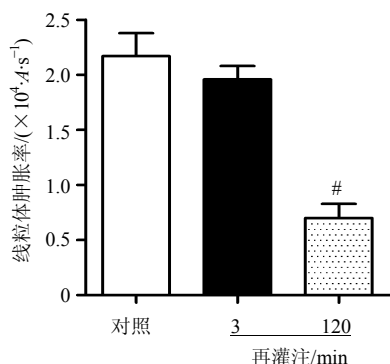


图 5 缺血再灌注损伤心肌线粒体去能量条件下 mPTP 开放实验 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 5 mPTP opening in isolated de-energized mitochondria with I/R injured myocardia ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

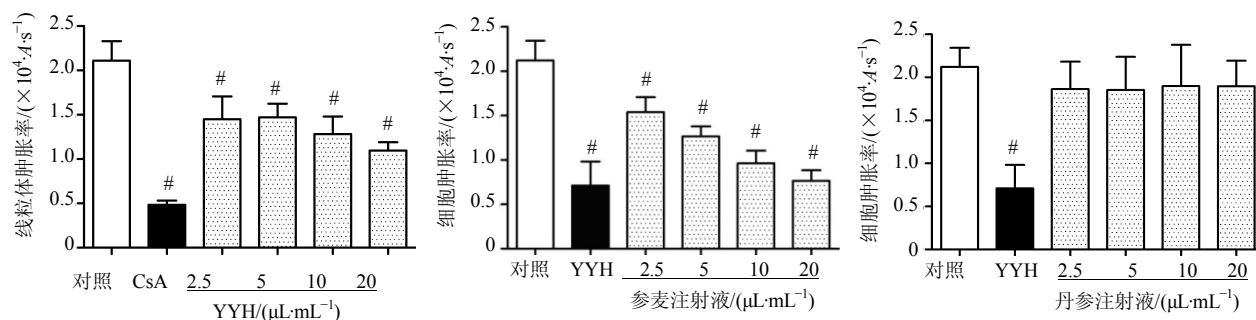


图 7 YYH、参麦注射液和丹参注射液体外对正常心肌线粒体 mPTP 开放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effects of YYH, Shenmai Injection, and Danshen Injection on mPTP opening in isolated mitochondria ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

益气养阴、活血化瘀的功效, 符合祖国医学“扶正祛邪”的治疗原则。药物处理后的离体心脏提取线粒体, 常用“无能量条件 mPTP 开放实验”, 考察药物对 mPTP 的抑制情况, 文献报道^[19], 心脏遭受 I/R 损伤后提取的线粒体在 Ca^{2+} 诱发下, A 值显著下降, 而心脏保护药物、缺血预处理、低温预处理能显著抑制 A 值下降, 抑制 mPTP 的开放。也有文献报道^[20], 缺血预处理后提取的心脏线粒体在体外更容易开放。

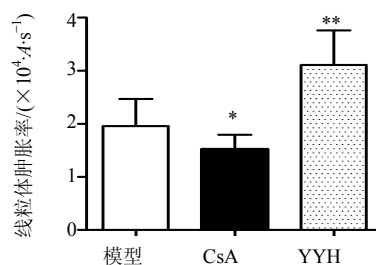


图 6 YYH 对缺血再灌注损伤心肌线粒体 mPTP 开放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effects of YYH treatment of perfused rat hearts on mPTP opening in subsequently isolated mitochondria ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.6.2 YYH、参麦注射液、丹参注射液与线粒体孵育对 mPTP 开放的影响 CsA、YYH (2.5、5、10、20 $\mu\text{L/mL}$)、参麦注射液 (2.5、5、10、20 $\mu\text{L/mL}$) 均显著抑制 A 值下降, 线粒体肿胀率与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。丹参注射液 (2.5、5、10、20 $\mu\text{L/mL}$) 对线粒体肿胀率无显著影响。结果见图 7。

4 讨论

参麦注射液可以显著降低急性心肌梗死患者病死率、心衰发生率、再灌注心律失常发生率等^[18]。丹参具有抑制血小板聚集、降低血黏度、改善微循环、保护缺血缺氧心肌细胞的作用。二者合用具有

故首先提取了未经缺血、缺血后再灌注 3 min、再灌注 120 min 心脏线粒体, 进行了 mPTP 开放实验, 结果提示, 未经缺血的心脏线粒体, 在外源性钙刺激下 A 值急剧降低、mPTP 大量开放; 再灌注 120 min 的线粒体 A 值下降不明显, 可能由于 mPTP 在体时已经基本全部开放, 细胞已经发生凋亡或坏死。并参考相关文献报道^[19,21], 故选取了缺血 30 min/再灌注 3 min 进行离体心脏给药后 mPTP 开放实验。结果表明, YYH 处理的离体心脏

mPTP 更容易开放,表明其含有较多未开放的线粒体,提示 YYH 在体时可能减少了诱发 mPTP 开放的因素,如再灌注期间活性氧类物质的产生及线粒体钙超载,从而“间接”抑制了 mPTP 开放,减少了其凋亡或坏死的发生,保护了线粒体完整性;而 CsA 抑制 mPTP 开放的机制可能是 CsA 通过和 CyP-D 的结合,抑制 CyP-D 氨基脯氨酸顺反异构酶活性,阻止 CyP-D 和 ANT 的结合,防止了有利于 mPTP 开放的 ANT 胞浆构象的形成,因而其处理过的体外分离的线粒体对外源性 Ca^{2+} 不敏感^[22],即使在体外 mPTP 也不容易开放。结果提示,YYH 抑制 mPTP 开放的作用机制可能与 CsA 不完全相同。

除“间接”抑制 mPTP 开放外,YYH 也可能通过作用于 mPTP 的结构蛋白,提高了线粒体对引起 mPTP 开放因素刺激的耐受性,从而“直接”抑制 mPTP 开放,如同 CsA 一样。为了进一步研究 YYH 对 mPTP 的抑制作用及发挥主要作用的主要药物,进行了 YYH、参麦及丹参注射液与线粒体孵育后 mPTP 开放检测。结果显示,YYH、参麦注射液与线粒体孵育能直接抑制 mPTP 开放。

mPTP 开放是引起心肌 I/R 损伤的关键因素,PI3K-Akt 和 ERK1/2 通路是在其损伤中介导心肌保护的重要信号转导通路,再灌注期间激活 PI3K-Akt 及 ERK1/2 信号通路,能够抑制 mPTP 开放,在线粒体水平发挥心肌保护作用。结果显示,YYH 能够改善离体心脏 I/R 后血流动力学恢复,降低 CK、LDH 的释放,减少心肌梗死面积,减轻心肌组织超微结构损伤。当 YYH 与 PI3K 选择性抑制剂 LY 同时应用时,YYH 改善血流动力学、减少心肌梗死面积的作用被部分或完全消除,YYH 能上调心肌 p-Akt、p-ERK1/2、p-GSK-3 β 蛋白表达,而 LY 阻断了 YYH 诱导的 p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达上调,可见增加 Akt、ERK1/2 及 GSK-3 β 磷酸化蛋白表达可能在 YYH 减轻心脏 I/R 损伤中发挥了重要作用。

综上所述,YYH 可能主要通过激活 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路,抑制 mPTP 的开放,在线粒体水平发挥心肌保护作用,从而减轻心脏 I/R 损伤;其抑制 mPTP 开放的作用机制与 CsA 不完全相同;发挥直接抑制 mPTP 开放的药物是参麦注射液。

参考文献

[1] 耿庆信,朱兴雷,张兴华,等.参麦注射液及复方丹参注射液合用对急性心肌梗死患者介入治疗后再灌注损伤的影响[J].中国中西医结合杂志,2004,24(6):

496-499.

- [2] 崔文鹏,杜冰,曲锐.参麦与丹参注射液治疗冠心病心绞痛的 Meta 分析[J].时珍国医国药,2010,21(11):2990-2991.
- [3] 张存林,董耀荣.参麦注射液联合丹参注射液治疗心力衰竭的疗效观察[J].中国实用医药,2008,3(18):137-138.
- [4] 舒建中,王恰如.参麦注射液和复方丹参注射液治疗急性脑梗死的 Meta 分析[J].现代中西医结合杂志,2008,17(7):973-976.
- [5] Halestrap A P, Clarke S J, Javadov S A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 372-385.
- [6] Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the holy grail of cardioprotection[J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(2): 151-154.
- [7] Hausenloy D J, Tsang A, Yellon D M, et al. The reperfusion injury salvage kinase pathway: A common target for both ischemic preconditioning and postconditioning[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2005, 15(2): 69-75.
- [8] Hausenloy D J, Tsang A, Mocanu M M, et al. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(2): 971-976.
- [9] Bopassa J C, Ferrera R, Gateau-Roesch O, et al. PI3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(1): 178-185.
- [10] Davidson S M, Hausenloy D, Duchene M R, et al. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase(RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(3): 414-419.
- [11] Morrison R R, Teng B, Oldenburg P J, et al. Effects of targeted deletion of A1 adenosine receptors on postischemic cardiac function and expression of adenosine receptor subtypes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(4): H1875-H1882.
- [12] Meng X, Ao L, Brown J M, et al. Nitric oxide synthase is not involved in cardiac contractile dysfunction in a rat model of endotoxemia without shock[J]. *Shock*, 1997, 7(2): 111-118.
- [13] Boles Ponto L L, O'Leary D S, Koeppel J, et al. Effect of acute marijuana on cardiovascular function and central nervous system pharmacokinetics of [^{15}O] water: effect in occasional and chronic users[J]. *J Clin Pharmacol*, 2004,

- 44(7): 751-766.
- [14] Freeman I, Grunwald M A, Robin B, *et al.* Effect of early reperfusion on use of triphenyltetrazolium chloride to differentiate viable from non-viable myocardium in area of risk [J]. *Cardiovasc Res*, 1990, 24(2): 109-114.
- [15] Tanonaka K, Iwai T, Motegi K, *et al.* Effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfused heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(2): 416-425.
- [16] Halestrap A P, Woodfield K Y, Connern C P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(6): 3346-3354.
- [17] Baines C P, Song C X, Zheng Y T, *et al.* Protein kinase Ce interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria [J]. *Circ Res*, 2003, 92(8): 873-880.
- [18] 黄美施. 参麦注射液对急性心肌梗死病死率及其并发症影响的 Meta 分析 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [19] Townsend P A, Davidson Sean M, Clarke Samantha J, *et al.* Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(2): H928-H938.
- [20] Javadov S A, Clarke S, Das M, *et al.* Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart [J]. *J Physiol*, 2003, 549(Pt 2): 513-524.
- [21] Clarke S J, Khaliulin I, Das M, *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation [J]. *Circ Res*, 2008, 102(9): 1082-1090.
- [22] Halestrap A P, Mcstay G P, Clarke S J. The permeability transition pore complex: another view [J]. *Biochimie*, 2002, 84(23): 153-166.