基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1673-03

葛根素预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤及 PI3K/AKT 信号通路的作用

马亚飞,刘新伟,文婷婷,乔 欣
(重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察葛根素(Puerarin,Pue)预处理对缺血再灌注大鼠心肌的保护作用及其可能机制。方法:40 只 SD 大鼠随机分为 5 组(n=8):假手术组(SH 组);缺血再灌注组(I/R 组);葛根素预处理组(PU 组);葛根素预处理 +LY294002 组(PU+LY 组);缺血再灌注 +LY294002 组(I/R+LY 组)。结扎冠状动脉前降支 30 min,再灌注 120 min。于缺血前、缺血 30 min 以及再灌注 60、90、120 min 时,测定左室收缩压(Left ventricular systolic pressure,LVSP)、左心室舒张末压(Left ventricular end-diastolic pressure,LVEDP)、左室内压变化最大上升和下降速率(Maximum rate of left ventricular pressure development and decay, ± dp/dtmax);测定心肌梗死面积百分比、一氧化氮(Nitric oxide,NO)和一氧化氮合酶(Nitric-oxide synthase,NOS)的含量。结果:I/R 组较 SH 组各时间点的收缩及舒张功能显著降低,心肌梗死面积增加,NO 和 NOS 含量明显降低;与 I/R 组比较,PU 组各时间点的收缩及舒张功能下降程度明显减轻,心肌梗死面积明显减少,NO、NOS 含量明显增加;PU+LY 组与 PU 组相比各时点的收缩及舒张功能显著降低,心肌梗死面积增加,NO 和 NOS 含量明显降低;PU+LY 组、I/R+LY 组与 I/R 组相比以上指标差异均无显著意义。结论:葛根素预处理对缺血再灌注大鼠心肌有较好的保护作用,其作用机制可能与 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。

【关键词】葛根素;心肌;缺血再灌注;磷脂酰肌醇 -3 激酶;丝(苏)氨酸激酶
【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-06

Protective effect of PI3K/Akt signaling pathway in puerarin pretreatment against myocardial ischemia-reperfusion injury in rat

MA Ya-fei, et al
(*Department of Anaesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective effect of preconditioning with Puerarin on myocardial ischemia reperfusion in adult SD rats and its possible mechanism. *Methods*: Forty Male SD rats were divided randomly into five groups (n=8). The myocardial injury of rats ware produced by the ligation of left coronary artery for 30 min followed by 120 min reperfusion. LVSP, LVEDP, and ± dp/dtmax were recorded at ischemia 30 min, reperfusion 60, 90 and 120 min. The myocardial infarct size and the level of NO and NOS were observed. *Results*: In group I/R, the systolic and diastolic function were significantly reduced; myocardial infarct size was increased; NO and NOS were significantly lowered compared with those in group SH (P<0.05). The systolic and diastolic function were improved; myocardial infarct size was significantly smaller; the level of NO and NOS were increased significantly in group PU as compared with those in group I/R (P<0.05). All these parameters in group PU+LY were not improved compared with those in group PU (P<0.05). There was no significant difference among the parameters of groups PU+LY, I/R+LY, and I/R. *Conclusion*: Preconditioning with puerarin can significantly reduce myocardial ischemia-reperfusion injury, the mechanism of which is partly via PI3K-Akt signal transduction.

【Key words】Puerarin; Myocardium; Ischemia reperfusion; PI3K; AKT

葛根素(Puerarin,Pue)为豆科葛属植物葛的根中异黄酮的主要有效成分之一。临床上主要用于冠心病、心绞痛、心肌梗塞等心血管疾病,已发现其具有扩张冠状动脉、保护缺血心肌和抗心肌缺血再灌注损伤、减少急性心肌梗塞面积等多种作用,但其作用机制尚未彻底阐明。磷酸肌醇 3 激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(Phosphatidylinositol-3 kinase/serine-threonine kinase,PI3K/Akt)信号通路在抗心肌缺血再灌注损伤中发挥重要作用[1]。本研究采用大鼠心肌缺血再灌注实验模型,观察 Pue 预处理对心肌缺

作者介绍:马亚飞(1983-),男,硕士,
研究方向:心肌缺血再灌注损伤与心肌保护。
通讯作者:刘新伟,男,副教授,E-mail:xxwwliu@yahoo.com.cn。

血再灌注损伤（Ischemia and reperfusion injury，I/R）的保护作用与 PI3K/AKT 信号通路的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

葛根素注射液（浙江康恩贝制药股份有限公司，40 mg/ml）、PI3K 信号通路抑制剂 LY294002（Cell signaling 公司）、一氧化氮和一氧化氮合酶试剂盒（南京建成生物工程研究所）、氯化三苯基四氮唑红（TTC，Sigma 公司）、BL-410 生物机能实验系统（成都泰盟科技有限公司）。

1.2 缺血-再灌注模型制备

健康雄性 SD 大鼠 40 只（由重庆医科大学实验动物中心提供），体重在 250～300 g。以 10%水合氯醛 3～4 ml/kg 腹作腹腔注射麻醉，将针形电极插入四肢皮下。分离左颈静脉置管用于注药，分离左颈总动脉插入一含 0.1%肝素生理盐水的导管至左心室，通过 BL-410 生物机能实验系统记录心电图和左心室血流动力学变化。气管插管接人工呼吸机作机械通气，沿胸骨左缘第 2～4 肋间隙开胸，自制拉钩拉开肋骨，在左心耳及肺动脉圆锥间找到冠状动脉左前降支（Left anterior descending coronary artery，LAD），在距其起始部 3～4 mm 处用 4-0 带线缝合针穿过，将一小段聚乙烯管（直径 1.5 mm）置于结扎线下，收紧结扎线以阻断 LAD 血流，阻断 30 min 后，松线再灌注 120 min。成功标准[2]：结扎 LAD 后心电图Ⅱ导联 ST 段出现弓背向上抬高，T 波高耸等为缺血成功；放松结扎线后，抬高的 ST 段下降 1/2 以上为再灌注成功。

1.3 实验分组

雄性 SD 大鼠 40 只随机分成 5 组，每组 8 只：（1）假手术组（SH 组）：开胸，在 LAD 下穿线但不结扎，在穿线前 15 min 经左颈静脉缓慢注射生理盐水（2.5 ml/kg），连续观察 150 min。（2）缺血再灌注组（I/R 组）：在结扎前 15 min 经左颈静脉缓慢注射生理盐水（2.5 ml/kg），缺血 30 min，再灌注 120 min。（3）葛根素预处理组（PU 组）：缺血前 15 min 经左颈静脉缓慢注射 Pue（2.5 ml/kg），余同 I/R 组。（4）葛根素 +LY29400 组（PU+LY 组）：给葛根素前 15 min 经左颈静脉缓慢注射 LY29400（0.3 ml/kg）[3]，余同 PU 组。（5）缺血再灌注 +LY294002 组（I/R+LY 组）：缺血前 15 min 经左颈静脉缓慢注射 LY29400（0.3 ml/kg），余同 I/R 组。

1.4 观察指标的测定

1.4.1 心功能 经 BL-410 生物机能实验系统观察缺血前、缺血 30 min、再灌 60 min、再灌 90 min、再灌 120 min 时左室收缩压（Left ventricular systolic pressure，LVSP）、左心室舒张末压（Left ventricular end-diastolic pressure，LVEDP）和左心室内压力最大上升和下降速率（Maximum rate of left ventricular pressure development and decay，$\pm dp/dt_{max}$）的变化。

1.4.2 一氧化氮（Nitric oxide，NO）和一氧化氮合酶（Nitric-oxide synthase，NOS）的含量 各组再灌注 120 min 从左颈总动脉取血，离心取血清备用，用一氧化氮和一氧化氮合酶试剂盒分别检测 NO 和 NOS 的含量。

1.4.3 心肌梗死面积 再灌注 120 min 时，重新结扎冠状动脉左降支，经右颈动脉快速注入 1～2 ml 伊文氏兰，取下心脏，在 4℃生理盐水中剪去心房、右心室游离壁，滤纸吸干，于 -20℃冰箱里冷冻 20 min，在结扎线以下沿左心室短轴横切为 6～7 片厚约 1～2 mm 的心肌片，置于 37℃的 0.5%氯化三苯基四氮唑红（TTC）磷酸缓冲液中，避光孵育 30 min，取出后放在 10%福尔马林固定 5 min。分别称重左心室梗死区（苍白色）、缺血区（砖红色），缺血区面积以缺血区心肌重量/左心室重量表示，心肌梗死面积以梗死区心肌重量/缺血区心肌重量表示进行面积测量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，血流动力学采用重复测定的方差分析，其余指标采用单因素方差分析，两两比较采用 SNK-q 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 葛根素预处理对缺血再灌注大鼠血流动力学的影响

缺血前各组血流动力学指标差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 SH 组比较，其余各组各时点 LVSP 和 +dp/dtmax 呈进行性下降，LVEDP 和 $-dp/d_{max}x$ 呈进行性升高（$P<0.05$）。与 I/R 组比较，PU 组各时点 LVSP、$+dp/dt_{max}$ 升高，LVEDP、$-dp/dt_{max}$ 降低（$P<0.05$），PU+LY 组和 I/R+LY 组差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 PU 组比较，PU+LY 组和 I/R+LY 组各时间点的 LVSP、$+dp/dt_{max}$ 明显降低（$P<0.05$），LVEDP、$-dp/dt_{max}$ 明显升高（P<0.05）。见表 1。

2.2 葛根素预处理对 NO 和 NOS 含量的影响

与 I/R 组比较，PU 组 NO 和 NOS 的含量明显增加（$P<0.05$）；PU+LY 组和 I/R+LY 组差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 PU 组比较，PU+LY 组和 I/R+LY 组 NO 和 NOS 的含量明显降低（$P<0.05$）。见表 2。

2.3 葛根素预处理对心肌梗死面积的影响

与 I/R 组比较，PU 组心肌梗死面积明显减小（$P<0.05$）；PU+LY 组和 I/R+LY 组差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 PU 组比较，PU+LY 组和 I/R+LY 组梗死区面积明显增加（$P<0.05$）。见表 3。

3 讨 论

研究表明葛根素可以提高氧自由基清除剂的活力、增强心肌抗氧化能力、抑制心肌脂质过氧化，抑制钙超载，使冠脉扩张，减少血小板聚集，改善微循环，改善血管内皮功能和提高心肌组织能源储备等多方面达到对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[4,5]。本实验结果显示，IR 组较 SH 组各时点 LVSP、$+dp/dt_{max}$ 呈进行性下降，LVEDP、$-dp/dt_{max}$ 呈进行性升高，心肌梗死面积明显增加，提示 IR 可明显降低心肌的舒缩

表 1 各组不同时间点血流动力学参数的比较(n=8, $\bar{x}\pm s$)

指标	分组	缺血前	缺血 30 min	再灌注 60 min	再灌注 90 min	再灌注 120 min
LVSP(mmHg)	SH 组	125.88 ± 8.42	124.60 ± 8.17	123.62 ± 7.89	122.92 ± 7.71	122.20 ± 7.77
	I/R 组	124.90 ± 7.75	110.78 ± 7.91#	104.71 ± 7.75#	100.47 ± 7.67#	96.88 ± 7.92#
	PU 组	125.59 ± 7.50	120.36 ± 6.93*#	115.23 ± 7.42*#	113.48 ± 8.25*#	111.68 ± 9.01*#
	PU+LY 组	125.37 ± 7.25	111.15 ± 6.36#Δ	105.81 ± 6.13#Δ	101.92 ± 6.24#Δ	98.62 ± 6.73#Δ
	I/R+LY 组	124.28 ± 7.31	110.30 ± 6.56#Δ	103.58 ± 5.67#Δ	99.44 ± 5.33#Δ	95.69 ± 5.20#Δ
LVEDP(mmHg)	SH 组	4.88 ± 1.74	5.29 ± 1.76	5.84 ± 1.81	6.16 ± 1.74	6.36 ± 1.67
	I/R 组	4.97 ± 1.50	10.42 ± 1.52#	12.96 ± 0.98#	13.99 ± 1.01#	14.94 ± 1.15#
	PU 组	4.50 ± 1.98	7.59 ± 1.54*#	8.76 ± 1.95*#	9.37 ± 1.93*#	9.96 ± 1.84*#
	PU+LY 组	4.57 ± 1.24	9.58 ± 1.42#Δ	11.81 ± 1.35#Δ	12.83 ± 1.39#Δ	13.85 ± 1.54#Δ
	I/R+LY 组	4.86 ± 1.49	10.44 ± 1.46#Δ	13.39 ± 1.56#Δ	14.70 ± 1.51#Δ	15.96 ± 1.14#Δ
$+dp/dt_{max}$(mmHg/s)	SH 组	4 611.71 ± 333.69	4 510.19 ± 320.32	4 454.09 ± 322.89	4 410.73 ± 319.54	4 356.82 ± 308.07
	I/R 组	4 582.08 ± 281.79	3 494.93 ± 252.64#	3 176.41 ± 292.98#	3 055.09 ± 276.09#	2 939.40 ± 272.25#
	PU 组	4 514.89 ± 297.52	4 032.43 ± 292.88*#	3 835.73 ± 261.27*#	3 765.14 ± 255.19*#	3 695.51 ± 252.59*#
	PU+LY 组	4 628.80 ± 238.77	3 696.96 ± 197.47#Δ	3 381.54 ± 155.59#Δ	3 238.39 ± 187.06#Δ	3 126.20 ± 157.98#Δ
	I/R+LY 组	4 489.81 ± 303.76	3 393.40 ± 301.74#Δ	3 058.07 ± 272.94#Δ	2 950.12 ± 285.86#Δ	2 849.31 ± 276.53#Δ
$-dp/dt_{max}$(mmHg/s)	SH 组	−4 293.65 ± 390.13	−4 230.22 ± 390.48	−4 177.95 ± 397.28	−4 135.11 ± 399.16	−4 092.38 ± 409.95
	I/R 组	−4 338.17 ± 321.84	−3 367.27 ± 307.67#	−3 218.33 ± 318.90#	−3 132.40 ± 332.59#	−3 053.46 ± 330.93#
	PU 组	−4 305.74 ± 483.69	−3 812.52 ± 457.42*#	−3 748.31 ± 454.70*#	−3 686.45 ± 441.74*#	−3 622.44 ± 426.95*#
	PU+LY 组	−4 326.62 ± 398.58	−3 408.35 ± 266.67#Δ	−3 271.81 ± 272.62#Δ	−3 192.58 ± 264.84#Δ	−3 114.68 ± 272.98#Δ
	I/R+LY 组	−4 257.86 ± 327.65	−3 272.16 ± 298.29#Δ	−3 087.67 ± 300.96#Δ	−2 982.78 ± 308.76#Δ	−2 878.73 ± 318.17#

与 I/R 组比较,*P<0.05;与 SH 组比较,#P<0.05;与 PU 组比较,ΔP<0.05

表 2 各组 NO 和 NOS 含量的比较(n=8, $\bar{x}\pm s$)

分组	NO(μmol/L)	NOS(U/ml)
SH 组	40.26 ± 3.77	23.30 ± 3.03
I/R 组	20.22 ± 4.29	12.49 ± 2.20
PU 组	56.64 ± 5.85*	34.04 ± 3.33*
PU+LY 组	22.57 ± 4.51Δ	13.90 ± 2.70Δ
I/R+LY 组	16.82 ± 3.18Δ	11.35 ± 2.18Δ

与 I/R 组比较,*P<0.05;与 PU 组比较,ΔP<0.05

表 3 各组心肌梗死面积的比较(n=8, $\bar{x}\pm s$)

分组	缺血区面积(%)	梗死区面积(%)
I/R 组	46.70 ± 2.14	42.87 ± 2.58
PU 组	45.69 ± 2.37	27.20 ± 3.12*
PU+LY 组	46.21 ± 1.91	39.92 ± 2.47Δ
I/R+LY 组	46.42 ± 2.27	45.04 ± 2.39Δ

与 I/R 组比较,*P<0.05;与 PU 组比较,ΔP<0.05

功能和心肌损伤,表明本模型建立成功。葛根素预处理干预 IR 组,发现葛根素预处理组较 I/R 组各时点 LVSP、$+dp/dt_{max}$ 明显升高,LVEDP、$-dp/dt_{max}$ 明显降低,心肌梗死面积也明显缩小,提示葛根素预处理能改善缺血再灌注心肌的功能,减轻心肌损伤,具有明显的心肌保护效应,与文献报告一致[6]。

本研究发现,在给予 PI3K/Akt 信号通路阻断剂 LY 294002 后(即 PU+LY 组),与 PU 组相比,心肌梗塞面积扩大,心功能降低明显;而 PU+LY 组和 I/R+LY 组与 I/R 组差异无统计学意义。提示 PI3K/AKT 信号通路的激活可能在葛根素的药物预处理心肌保护机制中发挥了重要作用。研究证实,PI3K/Akt 信号转导通路在抗心肌缺血再灌注损伤中发挥重要作用[7],该通路的活化,通过磷酸化的 AKT,能够向细胞质或细胞核转运,使底物蛋白特定部位的丝、苏氨酸发生磷酸化,通过多种机制影响心肌细胞的抗凋亡机制的活化,减少细胞凋亡[8]。因此,葛根素预处理的心肌保护作用可能与其激活 PI3K/AKT 信号通路,进一步促进心肌细胞存活和抗凋亡,改善缺血再灌注心肌功能有关。

NOS 是 NO 合成的限速酶,对调节 NO 合成具有重要作

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1676-03

丹参酮ⅡA磺酸镁对大鼠急性心肌梗死的保护作用及机制

张玉方[1],赵春景[2]

(1.重庆市江北区第一人民医院药剂科,重庆 400020;2.重庆医科大学附属第二医院药剂科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨丹参酮ⅡA磺酸镁(Magnesium tanshinone ⅡA sulfonate,MTS)对急性心肌梗死的保护作用及其作用机制。方法:用冠状动脉结扎法制备大鼠急性心肌梗死模型,并将成功模型大鼠随机分为5%葡萄糖溶液对照组、丹参酮ⅡA磺酸钠组、丹参酮ⅡA磺酸镁低、中、高剂量组。结扎后5 min通过尾静脉分别给予相应剂量的药物并于4 h后测定大鼠心肌梗死范围以及血清和心肌组织中酶的活性。结果:与对照组比较,丹参酮ⅡA磺酸镁能剂量依赖性降低模型血清肌酸激酶(Creatine phosphokinase,CK)和乳酸脱氢酶(Lactic acid dehydrogenase,LDH)活性;减少心肌梗死范围;提高心肌组织超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)活性,同时降低丙二醛(Malondiadehyde,MDA)含量。结论:丹参酮ⅡA磺酸镁对急性心肌梗死有保护作用,其保护机制与抗氧自由基作用有关。

【关键词】丹参酮ⅡA磺酸镁;心肌梗死;心肌保护;氧自由基

【中国图书分类法分类号】R965.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-05

Protective effects of magnesium tanshinone ⅡA sulfonate on acute myocardial infarction in rats

ZHANG Yu-fang, et al

(*Department of Pharmacy, the First people's Hospital Jiangbei District in Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective effects and its protective mechanism of Magnesium tanshinone ⅡA sulfonate (MTS) on acute myocardial infarction. *Methods*: The acute myocardial infarction model in rats were performed by the ligation of the left coronaryartery and the successful models were randomly assigned to either a control group (5% glucose solutions) sodium tanshinone ⅡA sulfonate (STS)group(5 mg/kg), combined MTS group(1,5,15 mg/kg). The corresponding dosages medicine were given to that rats 5 minutes after ligationing through the vena caudalis; The

作者介绍:张玉方(1982-),女,硕士,研究方向:临床药理学。

通讯作者:赵春景,男,教授,E-mail:zhaocj6547@sina.com。

用。NO合成后弥散至附近的靶细胞内,通过靶细胞的介导与受体结合,激活靶细胞膜上的鸟苷酸环化酶,继而使cGMP合成增加,扩张血管,改善细胞灌注。另外,NO还可降低细胞内钙离子、扩张血管、抑制血小板聚集与粘附、减少氧自由基的产生。本实验结果显示,葛根素预处理组明显增加NOS和NO的含量,给予PI3K/Akt信号通路阻断剂LY294002后NOS和NO的含量明显降低,提示葛根素预处理的心肌效应还与其能增加缺血再灌注心肌NOS和NO含量水平有关。

综上所述,葛根素预处理对心肌缺血再灌注损伤具有保护效应,其机制可能与其激活PI3K/AKT信号通路,提高心肌NOS和NO水平有关。

参 考 文 献

[1] Hausenloy D J, Yellon D M. New directions for protecting the heart against ischemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase(RISK) pathway[J]. Cardiovasc Res,2004,61(3):448-460.

[2] 陈玉培,牟崇明,季道如,等.参附注射液预干预对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J].重庆医科大学学报,2005,30(2):220-228.

[3] Ravingerová T, Matejíková J, Neckár J, et al. Differential role of PI3K/Akt pathway in the infarct size limitation and antiarrhythmic protection in the rat heart [J]. Mol Cell Biochem, 2007,297 (1-2): 111-120.

[4] 鲍晓梅,李 珍,秦小同,等.葛根素预处理对离体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].实用临床医药杂志,2007,11(6):15-18.

[5] 孙 鹏,刘金龙.葛根素对组织缺血再灌注损伤保护机制的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2006,15(3):405-407.

[6] 卢金萍,任江华,姚述远.葛根素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国现代应用药学杂志,2004,21(4):268-271.

[7] Hausenloy D J, Yellon D M. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection[J]. Heart Fail Rev, 2007, 12 (3-4):217-234.

[8] Hausenloy D J, Wynne A M, Yellon D M. Ischemic preconditioning targets the reperfusion phase[J]. Basic Res Cardiol,2007, 102(5):445-452.

(责任编辑:关蕴良)