

氢溴酸加兰他敏介导AMPK α 1/Nrf2/HO-1通路对大鼠 心肌缺血再灌注损伤的保护作用*

曾 菲¹, 李 强², 曾 昇^{3△}, 李 希¹, 黄克力¹, 于 涛¹, 谭 今¹

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院 心脏外科中心(成都 610072); 2. 成都市第三人民医院 麻醉科(成都 610072);

3. 四川省医学科学院·四川省人民医院 康复医学科(成都 610072)

【摘要】 目的 研究氢溴酸加兰他敏(galantamine hydrobromide lycoremine, Gal)介导腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK) α 1/Nrf2/血红素加氧酶(heme oxygenase-1, HO-1)通路对心肌缺血再灌注(I/R)大鼠内质网应激型凋亡、心肌凋亡和纤维化的影响。**方法** 构建心肌I/R损伤大鼠模型,将大鼠随机分为5组:对照组、I/R模型组、Gal 1 mg/kg组、Gal 2 mg/kg组、Gal 4 mg/kg组进行后续实验。多普勒超声检测各组大鼠左室射血分数(LVEF)、左室舒张末期容积(LVEDV)、左室收缩末期容积(LVESV)、左室壁厚度(LVWT)、左室短轴缩短率(FS);HE染色检测心肌组织病理损伤程度;免疫组化检测Caspase-3阳性表达率;RT-PCR检测心肌Caspase-3 mRNA表达;蛋白免疫印迹检测内质网应激因子CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)、cleaved Caspase-12、生长抑制和DNA损伤诱导蛋白(growth arrest and DNA damage-inducible protein 34, GADD34)、免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy-chain-binding protein, BiP)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、Collagen I、AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白表达水平;并加入AMPK的抑制剂Compound C进行验证。**结果** 与I/R模型组比较, Gal 各组心肌组织病理损伤程度明显改善,cleaved Caspase-3阳性表达率和Caspase-3 mRNA水平表达降低($P<0.05$); Gal 2 mg/kg、Gal 4 mg/kg组LVWT、FS、LVEF升高($P<0.05$), LVEDV、LVESV降低($P<0.05$), CHOP、cleaved Caspase-12、 α -SMA、Collagen I、AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白表达降低($P<0.05$), GADD34、BiP蛋白表达升高($P<0.05$)。加入AMPK抑制剂Compound C后,与I/R模型组相比较, CC组AMPK α 1、Nrf2、HO-1、BiP蛋白水平降低($P<0.05$), CHOP、 α -SMA、Collagen I蛋白水平升高($P<0.05$), LVESV、FS降低($P<0.05$), Caspase-3 mRNA水平升高($P<0.05$)。与CC组比较, CC+Gal 4mg/kg组AMPK α 1、Nrf2、HO-1、BiP蛋白水平升高($P<0.05$), CHOP、 α -SMA、Collagen I蛋白水平降低($P<0.05$), LVESV、FS升高, Caspase-3 mRNA水平降低($P<0.05$)。**结论** 氢溴酸加兰他敏介导AMPK α 1/Nrf2/HO-1通路可调节心肌缺血再灌注大鼠内质网应激型凋亡、心肌凋亡和纤维化。

【关键词】 氢溴酸加兰他敏 心肌缺血再灌注 内质网应激 AMPK α 1/Nrf2/HO-1通路

The Regulation of AMPK α 1/Nrf2/HO-1 Pathway Mediated by Galantamine Hydrobromide Lycoremine in Myocardial Ischemia Reperfusion Rats ZENG Fei¹, LI Qiang², ZENG Bian^{3△}, LI Xi¹, HUANG Ke-li¹, YU Tao¹, TAN Jin¹. 1. Center of Cardiac Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 2. Department of Anesthesiology, the Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610072, China; 3. Rehabilitation Medicine Department, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

△ Corresponding author, E-mail: 604969280@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of AMPK α 1/Nrf2/heme oxygenase-1 (HO-1) pathway mediated by galantamine hydrobromide lycoremine (Gal) on endoplasmic reticulum stress apoptosis, myocardial apoptosis and fibrosis in rats with myocardial ischemia reperfusion (I/R). **Methods** A myocardial ischemia reperfusion injury rat model was established, and the rats were randomly divided into 5 groups: Control group, I/R model group, Gal 1 mg/kg group, Gal 2 mg/kg group and Gal 4 mg/kg group. Left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-systolic volume (LVESV), left ventricular wall thickness (LVWT), and left ventricular short-axis shortening rate (FS) were detected by doppler ultrasound. Hematoxylin eosin staining was used to detect the pathological damage of myocardial tissue. The expression of Caspase-3 was detected by immunohistochemistry. Protein expression levels of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), cleaved Caspase-12, growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34), immunoglobulin heavy-chain-binding protein (BiP), α -smooth muscle actin (α -SMA), Collagen I, AMPK α 1, Nrf2, and HO-1 were measured by western blot, and AMPK inhibitor Compound C was added for verification. **Results** Compared with the I/R model group, the grade of pathological damage of myocardial tissue in each group of Gal was improved, and cleaved Caspase-3 positive expression rate and Caspase-3

* 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(No.16PJ297)资助

△ 通信作者, E-mail: 604969280@qq.com

mRNA level were significantly reduced ($P<0.05$) as well. The results showed that LVWT, FS and LVEF in Gal 2 mg/kg and Gal 4 mg/kg groups were significantly increased ($P<0.05$), LVEDV and LVESV were significantly reduced ($P<0.05$) compared with I/R model group. CHOP, cleaved Caspase-12, α -SMA, Collagen I, AMPK α 1, Nrf2, HO-1 protein levels were significantly reduced ($P<0.05$), and GADD34 and BiP protein levels were significantly increased ($P<0.05$) in Gal 2 mg/kg and Gal 4 mg/kg groups. **Conclusion** The regulation of AMPK α 1/Nrf2/HO-1 pathway mediated by Gal on endoplasmic reticulum stress apoptosis, myocardial apoptosis and fibrosis in myocardial ischemia reperfusion rats.

【Key words】 Galantamine hydrobromide lycoremine Myocardial ischemia reperfusion Endoplasmic reticulum stress AMPK α 1/Nrf2/HO-1 pathways

心肌缺血再灌注损伤是指心肌缺血一定时间后,动脉再灌注会加重心肌损伤^[1]。这是由于在心肌缺血时心肌细胞凋亡增加,再灌注诱发的炎症会增强细胞凋亡。缺血再灌注损伤引起的心肌损伤是冠状动脉疾病的主要病理表现,制定针对缺血再灌注诱导的损伤的心脏保护策略非常重要^[2]。氢溴酸加兰他敏(galantamine hydrobromide lycoremine, Gal)是从石蒜科植物雪花莲、石蒜和近缘植物中分离出的一种可逆的竞争性乙酰胆碱酯酶抑制剂^[3],临床上主要用于治疗脊髓灰质炎、重症肌无力、术后肠肌麻痹、青光眼和阿尔茨海默氏病,也用于解箭毒药和非去极化肌松药的拮抗剂^[4]。Gal可能通过抑制胆碱酯酶,从而产生拟胆碱作用,包括M和N样作用^[5]。而激活烟碱型胆碱受体可对心肌缺血产生保护作用,并与线粒体保护、凋亡等机制相关^[6]。然而Gal对心肌缺血再灌注损伤的具体作用机制尚不清楚。本实验旨在研究Gal介导腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK) α 1/Nrf2/血红素加氧酶(heme oxygenase-1, HO-1)通路对心肌缺血再灌注(I/R)大鼠内质网应激型凋亡、心肌凋亡和纤维化的影响,为Gal应用于临床提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

60只SD大鼠购自广东省医学实验动物中心,雄性,8周龄,体质量(200 ± 10)g,许可证号:SCXK(粤)2018-0002,置于室温(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度 $50\%\pm 10\%$,12 h/12 h光暗循环饲养室内适应性喂养7 d。动物实验遵循我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892 2018)》提出的原则与要求。

1.2 试验药物和主要试剂

Gal(100050-200802)购自中国食品药品检定研究院,纯度为100%;AMPK抑制剂Compound C(S7840)购自美国Selleck公司;BCA试剂盒(P0012S)、HE染色试剂盒(C0105)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(A0208)购自碧云天生物技术研究;兔抗内质网应激因子CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)单克隆抗体(ab1044)、兔抗cleaved Caspase-12单克隆抗体

(ab62463)、兔抗生长抑制和DNA损伤诱导蛋白(growth arrest and DNA damage inducible protein 34, GADD34)单克隆抗体(ab9869)、兔抗免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy-chain-binding protein, BiP)(ab32618)单克隆抗体、兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体(ab32575)、兔抗Collagen I单克隆抗体(ab34710)、兔抗AMPK α 1单克隆抗体(ab3759)、Nrf2单克隆抗体(ab137550)、兔抗HO-1单克隆抗体(ab13243)购自美国Abcam公司。

1.3 试验仪器

全数字彩色多普勒超声诊断仪(DW-PE582)购自陕西凯思特电子科技有限公司;小动物呼吸机(DW-3000C)购自北京众实迪创科技发展有限公司;荧光显微镜(FR-2L)购自北京世纪科信科学仪器有限公司。

1.4 动物分组与模型建立^[7]

按照随机数字表法将大鼠分为5组:对照组、I/R模型组、Gal低剂量组(Gal 1 mg/kg组)、Gal中剂量组(Gal 2 mg/kg组)、Gal高剂量组(Gal 4 mg/kg组),每组12只。建立心肌缺血再灌注损伤模型:将大鼠用3.5%水合氯醛(0.35 mg/kg)腹腔注射麻醉,仰卧位固定,四肢连接心电图电极,行气管插管,连接小动物呼吸机。于大鼠左侧胸前第三、四肋间打开胸腔,暴露心脏,除对照组外其余4组均结扎左心耳下缘2 mm处,观察大鼠心尖部颜色及心电图变化,当大鼠心脏呈青紫色,心尖部明显苍白,心电图显示ST段明显抬高、T波高耸说明结扎准确,心肌缺血模型成功。解除结扎,恢复心脏血供后再灌注120 min,心脏表面颜色由青紫色逐渐恢复红色,心电图显示ST段逐渐压低、T波逐渐恢复则表明大鼠心肌缺血后成功恢复再灌注。模型建立后Gal低、中、高剂量组分别腹腔注射给药Gal 1、2、4 mg/kg, I/R模型组和对照组用同等体积生理盐水腹腔注射,每天1次,每次2 mL。所有大鼠均连续腹腔注射7 d。

1.5 超声心动图检查

造模前24 h及最后一次腹腔注射24 h后将大鼠用3%水合氯醛麻醉,左侧卧位,采用全数字彩色多普勒超声诊断仪DW-PE582检测大鼠左室射血分数(left

ventricular ejection fraction, LVEF)、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)、左心室壁厚度(left ventricular wall thickness, LVWT)、左室短轴缩短率(fraction shortening, FS)。

1.6 RT-PCR检测心肌Caspase-3 mRNA表达

用Trizol法从心肌组织中提取总RNA,用Nanodrop分光光度计测定吸光度值(A_{260}/A_{280}),按试剂盒说明书进行cDNA合成和PCR扩增并进行检测。引物序列: Caspase-3 F为5'-GCGGTTGTAGAAGAGTTTCGTG-3', R为5'-CTCACGGCCTGGGATTTCAA-3'; GAPDH F为5'-TGTGGGCATCAATGGATTTGG-3', R为5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3'。引物由上海生工生物工程有

1.7 左心室心肌组织HE染色

超声心动图检测完毕后,处死大鼠,取出心脏,生理盐水冲洗后选择左心室心肌组织,甲醛溶液固定并进行石蜡包埋切片,采用苏木素伊红染液,将石蜡切片脱蜡,蒸馏水润湿组织,核染液染色5 min,水洗5 s,浆染液染色30 s,水洗后,滤纸吸干,无水乙醇脱水2次后封片,在荧光显微镜下观测。

1.8 免疫组化检测心肌组织Caspase-3表达

取部分心肌组织,石蜡切片,常规脱蜡至水。3%过氧化氢于室温下孵育10 min;切片置于盛枸橼酸盐缓冲液的容器中,95℃左右持续10 min后室温冷却;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗3次,5%牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)封闭液37℃孵育30 min;滴加一抗(1:400),37℃孵育1 h;PBS洗3次;加生物素标记的抗体,37℃孵育30 min;PBS洗3次,加链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC),37℃孵育30 min;PBS洗3次,显微镜下显色并控制反应时间,苏木素复染后脱水透明,中性树胶封片。使用软件Image J分析阳性细胞占比。

1.9 Western blot检测心肌组织CHOP、cleaved Caspase-12、GADD34、BiP、 α -SMA、Collagen I、AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白表达

取各组大鼠心肌组织加入裂解缓冲液,玻璃匀浆器匀浆后,超声继续裂解至澄清。12 000 r/min离心10 min,取上清。BCA检测上清蛋白浓度,等量蛋白样品用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜,脱脂牛奶封闭,一抗:CHOP(1:1 000)、cleaved Caspase-12(1:1 000)、GADD34(1:1 000)、BiP(1:1 000)、 α -SMA(1:1 000)、Collagen I(1:1 000)、AMPK α 1(1:1 000)、Nrf2(1:1 000)、

HO-1(1:1 000)4℃孵育过夜,洗膜,二抗(1:10 000)室温下孵育2 h,洗膜后显影。拍照后用Image-Pro plus6.0分析蛋白条带灰度。以目的条带和内参条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.10 AMPK抑制剂Compound C对心肌缺血再灌注大鼠的影响

另取60只SD大鼠,将大鼠随机分为5组:对照组、I/R模型组、Gal 4 mg/kg组、CC组、CC+Gal 4 mg/kg组,每组12只。参照方法1.4建立心肌缺血再灌注损伤模型, Gal 4 mg/kg组腹腔注射给药Gal 4 mg/kg, CC组腹腔注射给药Compound C 10 mg/kg, CC+Gal 4 mg/kg组腹腔注射给药Gal 4 mg/kg及Compound C 10 mg/kg。每天1次,每次2 mL,连续7 d。采用Western blot检测各组大鼠AMPK α 1、Nrf2、HO-1、CHOP、BiP、 α -SMA、Collagen I蛋白表达水平,超声心动图检测LVESV及FS, RT-PCR检测Caspase-3 mRNA表达水平,方法同前。

1.11 统计学方法

正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gal对I/R大鼠LVWT、FS、LVEF、LVEDV和LVESV的影响

各组大鼠超声心动图检查结果如图1所示。与对照组相比, I/R模型组、Gal 1 mg/kg组LVWT、FS、LVEF降低($P < 0.05$), LVEDV、LVESV升高($P < 0.05$); Gal 2 mg/kg组LVESV升高($P < 0.05$), FS、LVEF降低($P < 0.05$)。Gal 2 mg/kg、Gal 4 mg/kg组LVWT、FS、LVEF高于I/R模型组($P < 0.05$), LVEDV、LVESV低于I/R模型组($P < 0.05$)。

2.2 Gal下调I/R大鼠心肌组织CHOP、cleaved Caspase-12、 α -SMA、Collagen I蛋白表达,上调GADD34、BiP蛋白表达

Western blot检测结果如图2所示,与对照组相比, I/R模型组、Gal 1 mg/kg组、Gal 2 mg/kg组心肌组织CHOP、cleaved Caspase-12、 α -SMA、Collagen I蛋白表达水平升高($P < 0.05$), GADD34、BiP蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。Gal 2 mg/kg、Gal 4 mg/kg组CHOP、cleaved Caspase-12、 α -SMA、Collagen I蛋白表达水平低于I/R模型组($P < 0.05$), GADD34、BiP蛋白表达水平高于I/R模型组($P < 0.05$)。

2.3 Gal降低I/R大鼠心肌组织cleaved Caspase-3阳性表达率

如图3所示, cleaved Caspase-3的免疫组化阳性染色主要位于细胞浆内,少数也见于胞核,呈棕褐色。与对照组比较, I/R模型、Gal 1 mg/kg、Gal 2 mg/kg组心肌组织

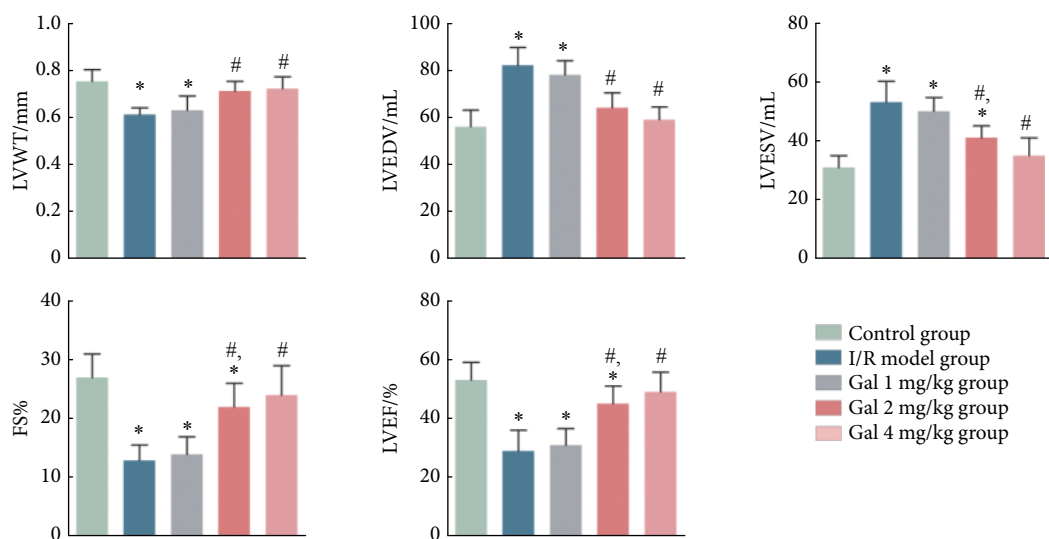


图 1 超声心动图检查

Fig 1 Echocardiography examination

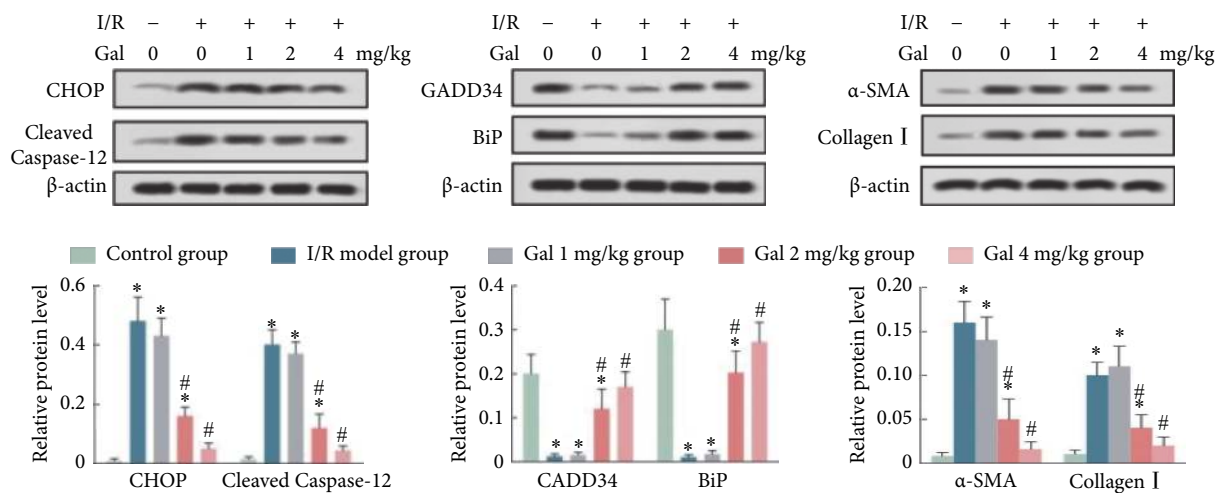
* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. I/R model group

图 2 CHOP、cleaved Caspase-12、GADD34、BiP、α-SMA、Collagen I 蛋白水平

Fig 2 Levels of CHOP, cleaved Caspase-12, GADD34, α-SMA, Collagen I and BiP

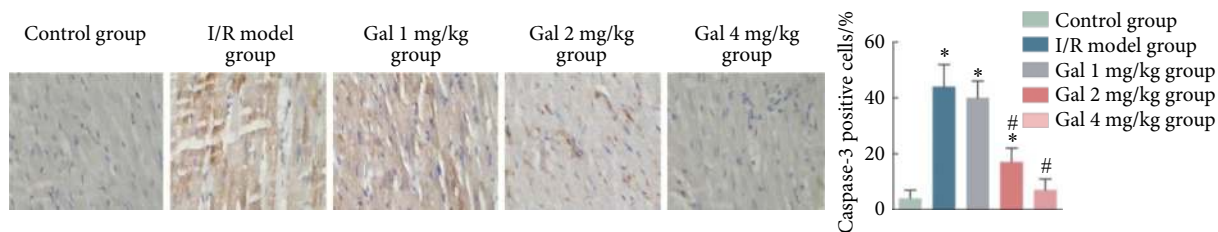
* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. I/R model group

图 3 Cleaved Caspase-3 阳性表达率。SABC × 200

Fig 3 Cleaved Caspase-3 expression rate. SABC × 200

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. I/R model group

cleaved Caspase-3 阳性表达率升高 ($P < 0.05$), Gal 2 mg/kg、Gal 4 mg/kg 组 cleaved Caspase-3 阳性表达率低于 I/R 模型组 ($P < 0.05$)。

2.4 Gal 降低 I/R 大鼠 Caspase-3 mRNA 表达水平

RT-PCR 检测各组大鼠 Caspase-3 mRNA 表达结果如图 4 所示: I/R 模型、Gal 1 mg/kg、Gal 2 mg/kg 组 Caspase-3

mRNA水平高于对照组($P < 0.05$), Gal 2 mg/kg、Gal 4 mg/kg组Caspase-3 mRNA表达低于I/R模型组($P < 0.05$), 与免疫组化检测结果一致。

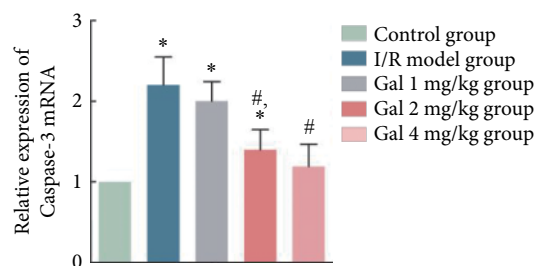


图4 Caspase-3 mRNA表达水平

Fig 4 Caspase-3 mRNA level

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. I/R model group

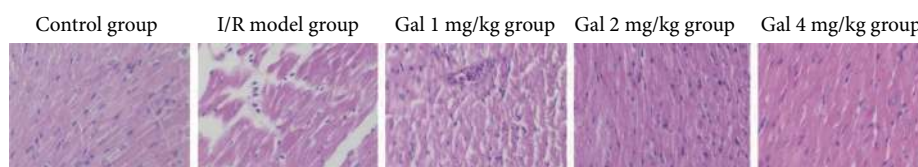


图5 心肌组织结构病理损伤程度。HE $\times 200$

Fig 5 Degree of pathological damage of myocardial tissue structure. HE $\times 200$

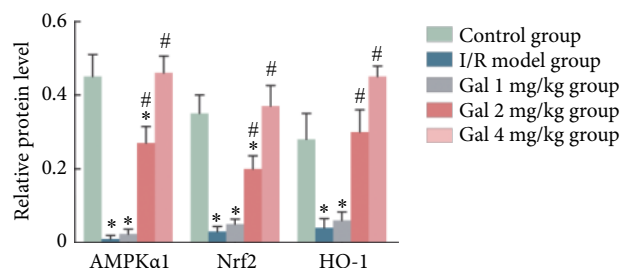
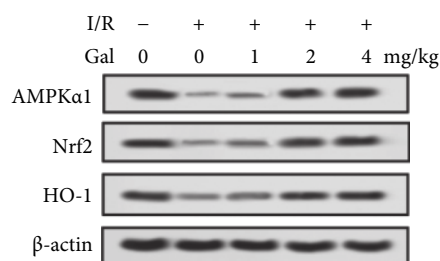


图6 AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白表达水平

Fig 6 Expression levels of AMPK α 1, Nrf2 and HO-1 proteins

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. I/R model group

2.7 加入AMPK抑制剂Compound C对心肌缺血再灌注大鼠的影响

Western blot检测各组大鼠AMPK α 1、Nrf2、HO-1、CHOP、Bip、 α -SMA、Collagen I蛋白表达水平结果如图7所示。与对照组比较, I/R模型组AMPK α 1、Nrf2、HO-1、BiP蛋白水平降低($P < 0.05$), CHOP、 α -SMA、Collagen I蛋白水平升高($P < 0.05$)。Gal 4 mg/kg组AMPK α 1、Nrf2、HO-1、BiP蛋白水平高于I/R模型组($P < 0.05$), CHOP、 α -SMA、Collagen I蛋白水平低于I/R模型组($P < 0.05$)。CC组AMPK α 1、Nrf2、HO-1、BiP蛋白水平低于I/R模型组($P < 0.05$), CHOP、 α -SMA、Collagen I蛋白水平高于I/R模型组($P < 0.05$)。CC+Gal 4 mg/kg组

2.5 Gal改善I/R大鼠心肌病理损伤程度

如图5所示。对照组心肌细胞形态正常, 心肌纤维排列整齐, 无炎性细胞浸润。I/R模型组心肌纤维排列紊乱, 出现断裂, 间隙增大, 横纹消失, 可见大量炎性细胞浸润。Gal不同剂量处理后, 心肌细胞变性及炎性细胞浸润不同程度减轻, 心肌组织损伤明显改善。

2.6 Gal上调I/R大鼠AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白表达水平

Western blot检测各组大鼠AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白表达水平结果如图6所示。与对照组相比较, I/R模型、Gal 1 mg/kg组AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白水平降低($P < 0.05$), Gal 2 mg/kg组AMPK α 1、Nrf2蛋白水平降低($P < 0.05$), Gal 2 mg/kg、Gal 4 mg/kg组AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白水平高于I/R模型组($P < 0.05$)。

AMPK α 1、Nrf2、HO-1、BiP蛋白水平高于CC组($P < 0.05$), CHOP、 α -SMA、Collagen I蛋白水平低于CC组($P < 0.05$)。超声心动图检查结果(图7)显示, I/R模型组LVESV、FS低于对照组($P < 0.05$), Gal 4 mg/kg组LVESV、FS高于I/R模型组($P < 0.05$), CC组LVESV、FS低于I/R模型组($P < 0.05$), CC+Gal 4 mg/kg组LVESV、FS高于CC组($P < 0.05$)。RT-PCR检测各组大鼠Caspase-3 mRNA水平结果(图7)显示, I/R模型组Caspase-3 mRNA水平高于对照组($P < 0.05$), Gal 4 mg/kg组Caspase-3 mRNA水平低于I/R模型组($P < 0.05$), CC组Caspase-3 mRNA水平高于I/R模型组($P < 0.05$), CC+Gal 4 mg/kg组Caspase-3 mRNA水平低于CC组($P < 0.05$)。

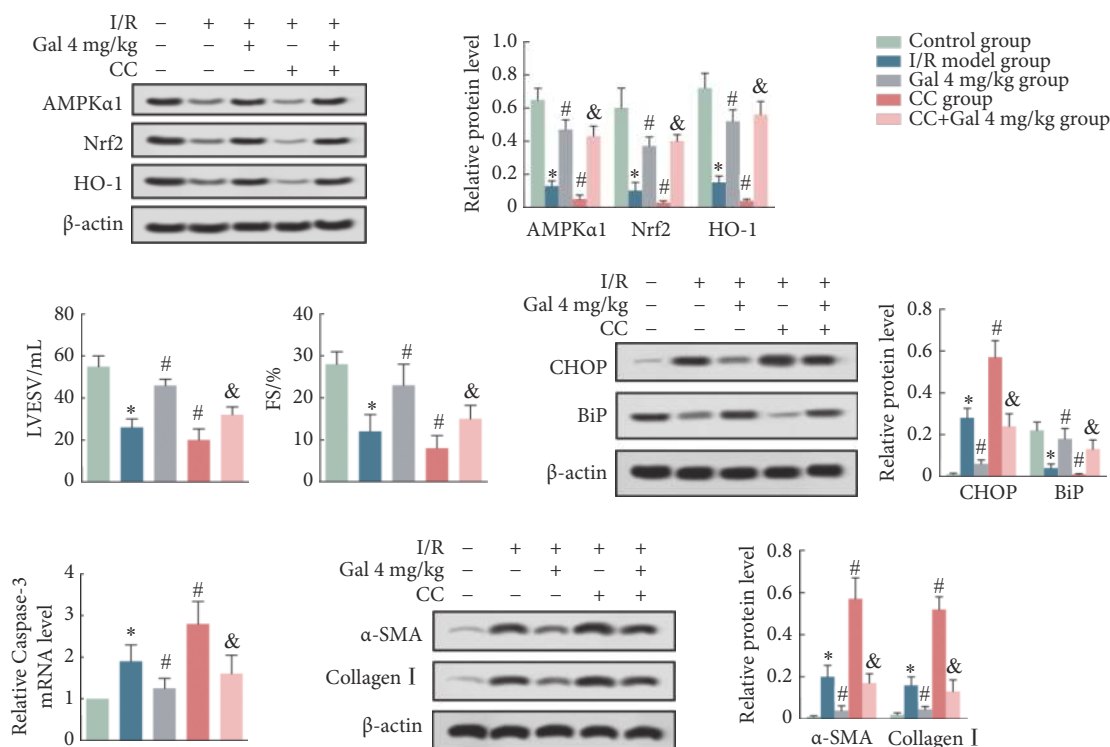


图 7 加入AMPK的抑制剂Compound C对心肌缺血再灌注大鼠的影响

Fig 7 Effects of Compound C, an inhibitor of AMPK, on myocardial ischemia reperfusion in rats

*P<0.05, vs. control group; #P<0.05, vs. I/R model group; &P<0.05, vs. CC group

3 讨论

心肌缺血再灌注是指是指细胞因缺血发生可逆性、可存活的损伤,在再灌注后这种损伤反而加重并引起细胞死亡或进一步的功能障碍^[8]。针对心肌缺血再灌注损伤发生的分子机制采取适当的治疗措施,可在一定程度上使其损伤的程度降低,这是一种缓解心肌损害、使患者心功能得以改善的有效方法,同时也可依据此寻找治疗的药物。Gal是从石蒜属植物中分离出的一种生物碱,是一个可逆性、选择性和竞争性胆碱酯酶抑制剂,具有抑制乙酰胆碱酯酶和调节烟碱乙酰胆碱受体的双重作用^[9]。本研究心动图实验证明, Gal可以升高左心室壁厚度、左室短轴缩短率、左室射血分数,降低左心室舒张末期容积、左心室收缩末期容积,明显改善心功能。

心肌缺血再灌注会引起内质网功能紊乱,即内质网应激^[10]。CHOP无论在体内还是体外都涉及到由内质网应激诱导的细胞凋亡中^[11]。Caspase-12是内质网应激诱导凋亡的特异性蛋白酶^[12]。大量研究已经证实CHOP和Caspase-12参与内质网应激介导的细胞凋亡^[13],在内质网应激进程中发挥了重要作用。MALI等^[14]研究发现通过抑制内质网应激可以减轻心肌缺血再灌注损伤。GADD34是在内质网应激过程中低表达的一类蛋白,能够通过恢

复蛋白质合成促进细胞存活; BiP能促进内质网稳态的恢复,抑制内质网应激诱导的细胞凋亡。本研究发现, Gal具有下调CHOP、cleaved Caspase-12蛋白水平的作用,上调GADD34、BiP蛋白水平。说明Gal通过调控内质网应激,可能减少缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡。

Caspase级联反应是细胞凋亡的中心环节,其中Caspase-3是细胞凋亡过程的主要执行者,其活化形式为cleaved Caspase-3,导致细胞内重要蛋白质降解及失活^[15]。因此减少Caspase-3的表达对于抑制缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡、改善心室功能具有重要意义。谢亚芹等^[16]研究发现瑞舒伐他汀通过降低心肌缺血再灌注大鼠心肌组织Caspase-3蛋白表达和mRNA水平抑制心肌细胞凋亡。本研究表明, Gal降低cleaved Caspase-3阳性表达率和Caspase-3 mRNA水平。说明Gal减轻心肌缺血再灌注后心肌细胞凋亡程度。

心肌缺血再灌注损伤会导致心肌纤维化,正常心肌间质是由细胞和非细胞结构组成,各组胶原成分共同构成胶原纤维网络,影响心脏的结构和功能,心肌纤维化主要表现为间质中胶原沉积增多,各型胶原比例失调和排列紊乱^[17]。心肌缺血再灌注损伤后心脏成纤维细胞增殖并分化为肌成纤维细胞,表达α-SMA分泌胶原,参与组织修复。Collagen I占细胞外基质的85%, I型胶原蛋白增

加时, 心房纤维化明显^[18]。本研究显示, Gal具有改善心肌缺血再灌注大鼠心肌病理损伤程度, 下调 α -SMA、Collagen I蛋白水平的作用。说明Gal通过调节心肌缺血再灌注后心肌纤维化程度, 改善心肌损伤。

AMPK是AMP依赖的蛋白激酶, 是生物能量代谢调节的关键分子, 含有一个催化亚基(α 亚基)和2个调节亚基(β 和 γ 亚基), 其中AMPK α 1在细胞中广泛表达^[19]。李霞等^[20]研究发现莫诺昔可抑制AMPK α 1表达的增强, 改善糖尿病缺血再灌注大鼠心肌损伤。Nrf2是一种转录因子, 能调节抗氧化应激相关的很多种基因的表达, 如过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶等^[21]。SHI-AO等^[22]研究发现上调Nrf2表达可减少氧化应激导致的心肌损伤。HO-1是一种在细胞应激过程中激活细胞保护作用的最关键的因子, HO-1基因的调控是一个极其复杂的过程, 涉及多种细胞内信号转导通路^[23]。黄新宇等^[24]研究发现白藜芦醇可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路降低心肌缺血再灌注损伤大鼠炎症和氧化应激。本研究发现, Gal具有上调心肌缺血再灌注大鼠AMPK α 1、Nrf2、HO-1蛋白表达水平, 且具有抵消AMPK抑制剂Compound C的作用, 提示Gal通过介导AMPK α 1/Nrf2/HO-1通路对心肌缺血再灌注大鼠心肌具有保护作用。

综上所述, Gal能减轻心肌缺血再灌注损伤, 可能通过介导AMPK α 1/Nrf2/HO-1通路调节内质网应激、心肌凋亡和纤维化而实现。

参 考 文 献

- [1] YELLON D M, HAUSENLOY D J. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-1135.
- [2] LI X, LIU M, SUN R, *et al*. Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3823-3829.
- [3] PATEL A V, PATEL V J, PATEL A V, *et al*. Determination of galantamine hydrobromide in bulk drug and pharmaceutical dosage form by spectrofluorimetry. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013, 5(4): 314-317.
- [4] 邓伟杰, 张春风, 赵树进, 等. 氢溴酸加兰他敏贴剂体外释药性和经皮渗透性能研究. *广东药学院学报*, 2009, 25(3): 237-241.
- [5] 王丙建. 胆碱酯酶抑制剂的药物分析. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 15(66): 250-254.
- [6] 贾宝辉, 张瑞星, 徐宏平, 等. 烟碱激活胆碱能抗炎通路治疗心肌缺血再灌注损伤的实验研究. *中国医药指南*, 2012, 10(24): 4-6.
- [7] 杨进, 马水根, 徐朝军, 等. 基于pi3k/akt信号通路研究胰岛素对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用. *中国医师杂志*, 2019, 21(3): 364-367.
- [8] GUO J, WANG S B, YUAN T Y, *et al*. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation. *Atherosclerosis*, 2013, 231(2): 384-391.
- [9] SAMOCHOCKI M, HOFFLE A, FEHRENBACHER A, *et al*. Galanthamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 305(7): 1024-1036.
- [10] BELAIDI E, THOMAS A, BOURDIER G, *et al*. Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: Its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int J Cardiol*, 2016, 210: 45-53.
- [11] YIFANG C, DINGKUN G, JIANGUO C, *et al*. Down-regulation of perk-atf4-chop pathway by astragaloside IV is associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic rats. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(6): 1975-1987.
- [12] ZHU H, ZHU H, XIAO S, *et al*. Activation and crosstalk between the endoplasmic reticulum road and jnk pathway in ischemia-reperfusion brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 2012, 154(7): 1197-1203.
- [13] SOVOLYOVA N, HEALY S, SAMALI A, *et al*. Stressed to death - mechanisms of er stress-induced cell death. *Biol Chem*, 2014, 395(1): 1-13.
- [14] MALI V R, ALI M, HADDOX S, *et al*. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and endoplasmic reticulum stress protects myocardial from ischemia - reperfusion injury in type 2 diabetic mice. *FASEB J*, 2016, 30(S1): 723-729.
- [15] 闫宇, 肖坤, 梁晓飞, 等. 毒胡萝卜素对小鼠肺成纤维细胞内钙离子水平及caspase-3蛋白表达的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2018, 49(3): 380-383.
- [16] 谢亚芹, 李秀芬, 赵娟, 等. 不同剂量瑞舒伐他汀对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及caspase-3的影响. *重庆医学*, 2019, 48(1): 27-30.
- [17] DÍAZ I, CALDERÓN-SÁNCHEZ E, TORO R D, *et al*. miR-125a, miR-139 and miR-324 contribute to urocortin protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8898.
- [18] 汤宝鹏, 甘天翔, 许国军, 等. 慢性心房颤动心房间质纤维化的分子机制研究. *中华心律失常学杂志*, 2009, 13(5): 369-372.
- [19] KIM P, PIRAINO G, O'CONNOR M, *et al*. Metformin exerts beneficial effects in hemorrhagic shock in an ampka1-independent manner. *Shock*, 2018, 49(3): 277-287.
- [20] 李霞, 张铁军, 封亚丽. 莫诺昔通过AMPK α /PGC-1 α /GLUT4通路对糖尿病大鼠缺血再灌注损伤的保护作用. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(7): 990-995.
- [21] SYKIOTIS G P, BOHMANN D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal*, 2010, 3(112): 104-110.
- [22] 丁士骞, 梅举, 鲍春荣, 等. 草酰乙酸对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2016, 22(3): 274-279.
- [23] ABDELBASETISMAIL A, BORKOWSKARZESZOTEK S, KUBIS E, *et al*. Activation of the complement cascade enhances motility of leukemic cells by downregulating expression of heme oxygenase 1 (HO-1). *Leukemia*, 2017, 31(2): 446-458.
- [24] 黄新宇, 刘永林. 白藜芦醇激活Nrf2/ARE信号通路降低心肌缺血再灌注损伤大鼠炎症和氧化应激. *中华中医药学刊*, 2017, 35(6): 1516-1520.

(2020-02-07收稿, 2020-04-17修回)

编辑 汤 洁