

## 五味子乙素通过诱导线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤

卢长青, 贾合磊, 雷震, 王娟, 任冬冬, 杨敏华, 陈亚奇

**摘要** 目的 探究五味子乙素 (Sch B) 对心肌缺血再灌注 (MI/R) 损伤的作用及其机制。方法 将小鼠随机分为对照 (Sham) 组、Sham + Sch B 组、MI/R model 组和 MI/R model + Sch B 组; MI/R model 组和 MI/R model + Sch B 组采用冠状动脉结扎法复制小鼠 MI/R 模型, Sham + Sch B 组和 MI/R model + Sch B 组给予 Sch B (80 mg/kg/d), 记录小鼠心率, 30 d 后处死小鼠, 试剂盒检测血清乳酸盐脱氢酶 (LDH) 和肌酸激酶 (CK) 的含量; HE 染色检测心肌组织病理情况; qRT-PCR 和 Western blot 法检测线粒体自噬相关分子 mRNA 水平和蛋白表达水平; Western blot 检测腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) / 雷帕霉素靶蛋白 mTOR / ULK1 通路标记蛋白的表达。腺苷酸活化蛋白激酶- $\beta 1$  基因敲除 (AMPK- $\beta 1$  - / -) 小鼠重复上述实验。结果 Sch B 能显著降低 MI/R 小鼠心肌损伤指标 (血清 LDH 和 CK 的含量、心肌梗死面积)、加快 MI/R 小鼠心率, 并改善 MI/R 小鼠心肌病理损伤; 同时, Sch B 能显著升高线粒体自噬标记蛋白环氧化酶 I (COX

I) 和 COX IV 的 mRNA 水平和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 和 Beclin1 蛋白表达水平; Sch B 还可显著促进 p-AMPK 和 p-ULK1 的表达, 抑制 p-mTOR 的表达。AMPK- $\beta 1$  - / - 小鼠线粒体自噬明显被抑制, 导致心肌梗死面积明显增大, 心率显著降低。结论 Sch B 可通过诱导线粒体自噬减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤。

**关键词** 五味子乙素; 缺血再灌注; 线粒体自噬

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0418-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.016

急性心肌梗死是导致临床心血管病人死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。目前, 利用手术和药物快速有效地恢复冠脉血流是治疗缺血性心血管病的主要方法<sup>[2]</sup>。但心肌恢复血流灌注的同时又会造成心肌缺血再灌注 (myocardial ischemia/reperfusion, MI/R) 损伤, 使心肌损伤进一步加重<sup>[3]</sup>。MI/R 损伤涉及多个细胞及分子机制, 如氧化应激、炎症反应、钙超载及线粒体自噬等<sup>[4-5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明, 线粒体自噬在 MI/R 损伤过程中发挥着重要的作用, 线粒体自噬功能紊乱可加重小鼠 MI/R 损伤。五味子乙素 (schisan-

2018-12-12 接收

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (编号: 112102310198)

作者单位: 河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院) 急诊科, 郑州 450002

作者简介: 卢长青, 男, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: lcq\_6502@163.com

tion of endothelin-1 (ET-1) and its receptors in rat endothelial cells. **Methods** Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) was over-expressed or depleted in the rat endothelial cells. Overexpression was divided into blank group, GV230 group, GV230/HIF-1 $\alpha$  group, siRNA interference was divided into blank group, shRNA-NC group, shRNA/HIF-1 $\alpha$  group. Real-time PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, endothelin receptor A (ETA) and endothelin receptor B (ETB). The mRNA expression level was estimated by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  and analyzed by GraphPad Prism 5.0, and the protein expression level was analyzed by Quantity one. The differences among groups were analyzed by One-Way ANOVA method and LSD. **Results** The mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, ETA and ETB were significantly higher in the GV230/HIF-1 $\alpha$  group than that in the blank control group and the GV230 group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). However, the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, ETA and ETB were significantly lower in the shRNA/HIF-1 $\alpha$  group than that in the blank control group and the shRNA-NC group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences on the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, ETA and ETB between the blank control group and the GV230 group or the shRNA-NC group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  mediates the expression of ET-1 and its receptors in vascular endothelial cells and participates in the changes of vascular permeability under hypoxic conditions.

**Key words** hypoxia-inducible factor 1; endothelial cells; endothelin-1

drin B, Sch B) 是中药五味子的有效成分之一, 具有抗炎、抗氧化及抗癌等活性, 还可减轻小鼠 MI/R 损伤<sup>[7]</sup>。但 Sch B 能否通过调控线粒体自噬减轻小鼠 MI/R 损伤还有待进一步研究。因此, 该文复制 MI/R 小鼠模型以探究 Sch B 对 MI/R 损伤的作用及其机制, 以期 Sch B 的临床应用提供实验支撑。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** Sch B 标准品购自上海哈灵生物科技有限公司; 乳酸盐脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatinase kinase, CK) 和 HE 染色试剂盒购自北京中山生物技术公司; TRIzol 试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; Beclin1、低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、一抗及 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司; 小鼠呼吸机及心电图仪购自成都太盟仪器公司; 低温离心机购自美国 ThermoFisher 公司。

**1.2 动物分组及模型建立** 60 只 3 月龄雄性清洁级 C57B/6J 小鼠 (18 ~ 22 g) 由新乡医科大学实验动物中心提供。饲养环境维持在室温 23 ~ 25 °C 内, 湿度 65%, 12 h 明暗交替, 自由饮食和进水。适应性饲养 3 d 后进行实验。将小鼠随机分为 Sham 组、Sham + Sch B 组、MI/R model 组和 MI/R model + Sch B 组, 用戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 麻醉小鼠, 仰卧位固定, 连接肢体心电图电极和呼吸机 (呼吸频率为 60 ~ 70 次/min), 记录 II 导联心电图, 分离左侧冠状动脉, Sham 组和 Sham + Sch B 组小鼠结扎左冠状动脉前降支, MI/R model 组和 MI/R model + Sch B 组小鼠结扎左冠状动脉前降支 45 min, 随后松开结扎线再灌注 2 h。以缺血时局部心肌组织苍白或发绀, 心电图 ST 段持续抬高, 再灌注时心肌变红润且 ST 段下降视为造模成功。模型复制成功后, Sham + Sch B 组和 MI/R + Sch B 组小鼠每天灌胃给予 Sch B (80 mg/kg/d), Sham 组和 Sham + Sch B 组小鼠每天给予等量溶媒 (无菌水), 连续灌胃 30 d 后处死小鼠进行后续实验。

**1.3 AMPK- $\beta$ 1 基因缺陷小鼠** 实验所用到的 45 只 SPF 级腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase- $\beta$ 1, AMPK- $\beta$ 1) 基因敲除 (AMPK- $\beta$ 1 - / -) C57BL/6J 雄性小鼠和 15 只 SPF 级野生型 C57BL/6J 雄性小鼠均由中国医学科学院动物研究所提供, 小鼠体质量为 18 ~ 20 g。将小鼠饲养于 SPF 级环境下, 自由进食, 光照时间

12 h, 温度 25 ~ 27 °C。以 15 只野生型 (wild type, WT) 小鼠为 Sham 组, AMPK- $\beta$ 1 - / - 小鼠分为 AMPK- $\beta$ 1 - / - Sham 组、AMPK- $\beta$ 1 - / - MI/R model 组和 AMPK- $\beta$ 1 - / - MI/R model + Sch B 组。AMPK- $\beta$ 1 - / - MI/R model 组和 AMPK- $\beta$ 1 - / - MI/R model + Sch B 组小鼠按照上述实验方法复制 MI/R 模型, Sham 组和 AMPK- $\beta$ 1 - / - Sham 组处理则同上述 Sham 组处理方法相同。模型复制成功后, AMPK- $\beta$ 1 - / - MI/R model + Sch B 组灌胃给予 Sch B, 连续 30 d, 其余组灌胃给予等量溶媒。

**1.4 血清 LDH 和 CK 含量的测定** 给予受试物 30 d 后, 进行摘眼球取血收集小鼠血液。将所收集血液室温静置 1 h 后, 以 3 000 r/min 的转速 4 °C 离心 15 min, 取上层血清根据试剂盒说明书检测各组小鼠血清 LDH 和 CK 的含量。

**1.5 心肌梗死面积的检测** 给予受试物 30 d 后, 处死小鼠, 取出心脏。垂直于心脏长轴, 由心尖向底部进行切片, 共 5 片。将切片置于 37 °C、pH 为 7.4 的 TTC 溶液中染色 15 min, 再用 4% 多聚甲醛固定。正常心肌颜色为红色, 缺血心肌颜色为灰白色, 计算心肌梗死面积并进行统计分析。

**1.6 HE 染色** 取心肌组织, 用 4% 多聚甲醛固定过夜后, 用不同浓度酒精进行梯度脱水, 二甲苯进行透明, 随后将组织置于石蜡中, 制作石蜡切片。最后根据 HE 染色试剂盒对组织切片进行 HE 染色。

**1.7 qRT-PCR** 根据 TRIzol 试剂盒说明书提取各组小鼠心肌组织总 RNA。用逆转录试剂盒合成 cDNA, 荧光定量 PCR 试剂盒检测 cDNA 含量, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法对数据进行定量分析。实验所用到的引物均由 Qiagen 公司设计合成。环氧氧化酶 I (cyclooxygenase I, COX I) 上游引物: CACATGAGCAAAAGCCCCT, 下游引物: ACGGCCGTAAGTGAGATGAA; 环氧氧化酶 IV (cyclooxygenase IV, COX IV) 上游引物: GACTACCCCTTGCCCTGATGT, 下游引物: ACACGTAGCTCTTT CCCAG。

**1.8 Western blot** 用 RIPA 裂解液提取各组小鼠心肌组织总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。将蛋白浓度调平后, 用 10% SDS-PAGE 将蛋白质分裂并转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 2 h, 2 h 后加入一抗 (HIF-1 $\alpha$ , 1 : 1 000; Beclin1, 1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。第二天清洗 PVDF 膜后加入对应二抗室温封闭 1 h, 滴加 ECL 显色液进行曝光显影。用 Image J 对蛋白质条带灰度值进行定量分析。

表1 Sch B 对 MI/R 小鼠心肌功能的影响 (n = 10  $\bar{x} \pm s$ )

组别	LDH (U/L)	CK (U/L)	梗死面积 (%)	心率(次/min)
Sham	243 ± 21	321 ± 43	7.2 ± 1.2	415 ± 22
Sham + Sch B	221 ± 38	308 ± 32	6.8 ± 1.1	427 ± 31
MI/R model	682 ± 55***	1 286 ± 55***	47.6 ± 5.2**	186 ± 12**
MI/R model + Sch B	328 ± 43##	654 ± 66##	23.8 ± 3.3#	328 ± 23#
F 值	271.10	818.51	363.72	233.24
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与 Sham 组比较: \*\* P < 0.01; 与 MI/R 组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。所有试验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析或 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 Sch B 对 MI/R 小鼠心肌功能的影响** 与 Sham 组比较, Sham + Sch B 组小鼠血清 LDH 和 CK 含量无明显变化,表明 Sch B 对小鼠心脏功能无明显毒副作用 (P > 0.05); MI/R model 组小鼠血清 LDH 和 CK 含量明显增多 (P < 0.001); 与 MI/R model 组比较, MI/R model + Sch B 组小鼠血清 LDH 和 CK 含量则明显降低,差异有统计学意义 (P < 0.01)。同时,缺血再灌注能显著增加 MI/R model 组小鼠心肌梗死面积,降低小鼠心率 (Heart rate, HR) (P < 0.01, 表 1); MI/R model + Sch B 组小鼠心肌梗死面积 (Infracion area, IA) 与 MI/R model 组小鼠比较明显减少,心率明显升高,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 1。

**2.2 Sch B 对 MI/R 小鼠心肌病理改变的影响** HE 染色结果显示,与 Sham 组比较, Sham + Sch B 组小鼠心肌组织无明显改变; MI/R model 组小鼠心肌组织心肌纤维排列紊乱,核固缩,心肌组织出现水肿,心肌间隙扩大。MI/R model + Sch B 组小鼠心肌组织心肌纤维排列紊乱程度及间质水肿程度较 MI/R model 组比较均有所改善,见图 1。

**2.3 Sch B 对 MI/R 小鼠线粒体自噬的影响** 与 Sham 组比较, MI/R model 小鼠心肌组织 COX I 和 COX IV mRNA 表达水平明显降低 (P < 0.05); MI/R model + Sch B 组小鼠心肌组织 COX I 和 COX IV mRNA 表达水平较 MI/R model 组比较明显升高,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 2。同时,与 Sham 组比较, MI/R model 组小鼠心肌组织自噬标记蛋白 HIF-1 $\alpha$  和 Beclin1 表达水平明显降低 (P < 0.05)。见图 2。MI/R model + Sch B 组小鼠心肌组织 HIF-1 $\alpha$  和 Beclin1 表达量明显高于 MI/R model

组,差异有统计学意义 (P < 0.05)。见图 2。

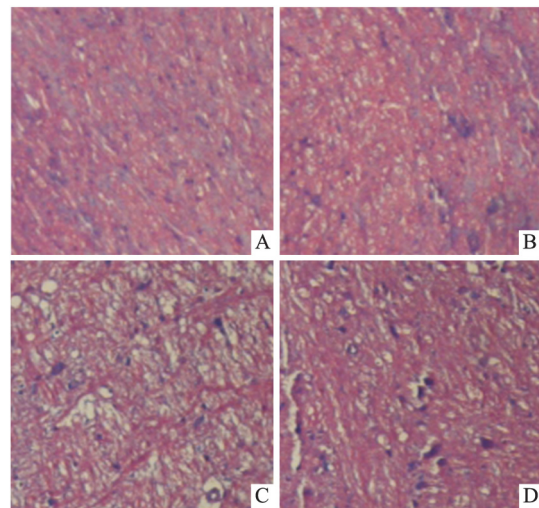


图1 Sch B 对 MI/R 小鼠心肌病理改变的影响 ×200

A: Sham 组; B: Sham + Sch B 组; C: MI/R model 组; D: MI/R model + Sch B 组

表2 Sch B 对 MI/R 小鼠线粒体功能的影响 (n = 10  $\bar{x} \pm s$ )

组别	COX I	COX IV
Sham	1 ± 0	1 ± 0
Sham + Sch B	0.95 ± 0.06	0.93 ± 0.09
MI/R model	0.61 ± 0.03*	0.45 ± 0.03*
MI/R model + Sch B	0.83 ± 0.04#	0.78 ± 0.06#
F 值	197.73	189.83
P 值	<0.001	<0.001

与 Sham 组比较: \* P < 0.05; 与 Sham 组比较: # P < 0.05; 与 MI/R model 组比较: # P < 0.05

**2.4 Sch B 对腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK) / 雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) / ULK1 信号通路的影响** 实验结果表明, MI/R model 组小鼠心肌组织 p-AMPK 和 p-ULK1 的蛋白表达水平较 Sham 组比较显著降低 (P < 0.05), p-mTOR 表达水平明显升高 (P < 0.05); 与 MI/R model 组比较, MI/R model + Sch B 组小鼠心肌组织 p-AMPK 和 p-ULK1 的蛋白表达水平明显升高 (P < 0.05), p-mTOR 表达水平明显降低 (P <

0.05) 表明 Sch B 可诱导 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路激活。见图 3。

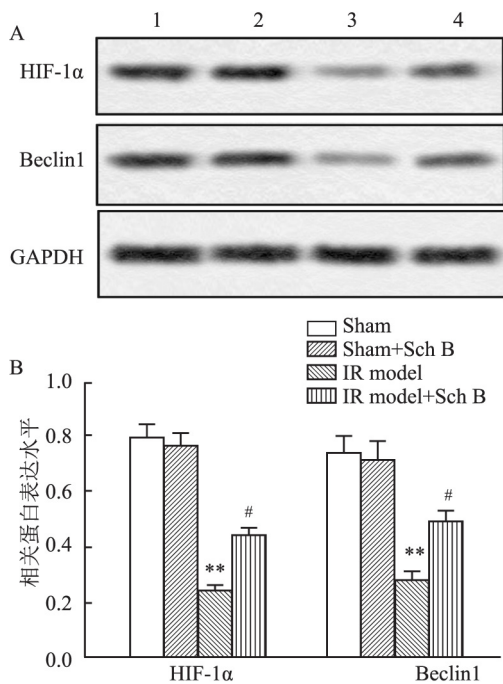


图 2 Sch B 对 MI/R 小鼠线粒体自噬的影响

1: Sham 组; 2: Sham + Sch B 组; 3: IR model 组; 4: IR model + Sch B 组; 与 Sham 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MI/R model 组比较: #  $P < 0.05$

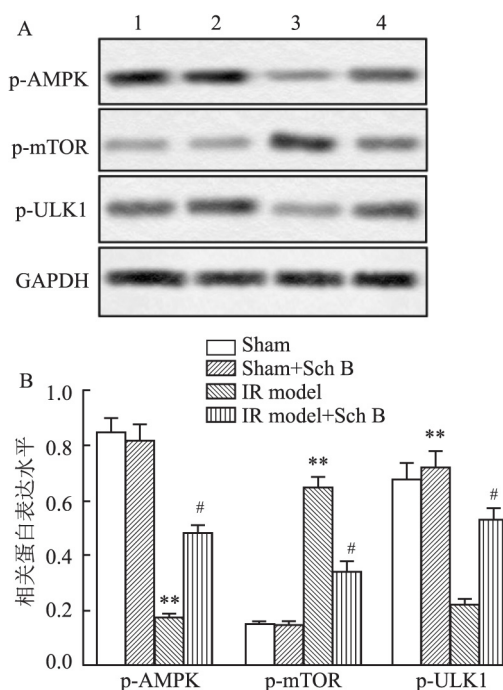


图 3 Sch B 对 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路的影响

1: Sham 组; 2: Sham + Sch B 组; 3: IR model 组; 4: IR model + Sch B 组; 与 Sham 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MI/R model 组比较: #  $P < 0.05$

**2.5 敲除 AMPK 对心肌损伤的影响** 敲除 AMPK-β1 能显著增加小鼠心肌梗死面积,降低小鼠心率,并抑制线粒体自噬相关蛋白 HIF-1α 和 Beclin1 表达 ( $P < 0.05$ )。见表 3、图 4; 缺血再灌注可进一步增加 AMPK-β1 - / - 小鼠的心肌梗死面积,降低小鼠心率及 HIF-1α 和 Beclin1 的表达,与 AMPK-β1 - / - Sham 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。见表 3、图 4,表明 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路参与了 MI/R 损伤的调控; Sch B 能显著缩小 MI/R 损伤 AMPK-β1 - / - 小鼠的心肌梗死面积,明显升高小鼠心率及 HIF-1α 和 Beclin1 蛋白表达水平,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3、图 4。

lin1 表达 ( $P < 0.05$ )。见表 3、图 4; 缺血再灌注可进一步增加 AMPK-β1 - / - 小鼠的心肌梗死面积,降低小鼠心率及 HIF-1α 和 Beclin1 的表达,与 AMPK-β1 - / - Sham 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。见表 3、图 4,表明 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路参与了 MI/R 损伤的调控; Sch B 能显著缩小 MI/R 损伤 AMPK-β1 - / - 小鼠的心肌梗死面积,明显升高小鼠心率及 HIF-1α 和 Beclin1 蛋白表达水平,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3、图 4。

表 3 敲除 AMPK 对小鼠 MI/R 损伤的影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别	梗死面积 (%)	心率 (次/min)
Sham	7.5 ± 2.3	418 ± 36
AMPK-β1 - / - Sham	23.4 ± 5.4*	243 ± 30*
AMPK-β1 - / - IR model	64.2 ± 6.2##	125 ± 25#
AMPK-β1 - / - IR model + Sch B	35.7 ± 4.4 <sup>§</sup>	298 ± 32 <sup>§</sup>
F 值	249.00	154.10
P 值	< 0.001	< 0.001

与 Sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 Sham + Sch B 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; 与 MI/R model 组比较: <sup>§</sup>  $P < 0.05$

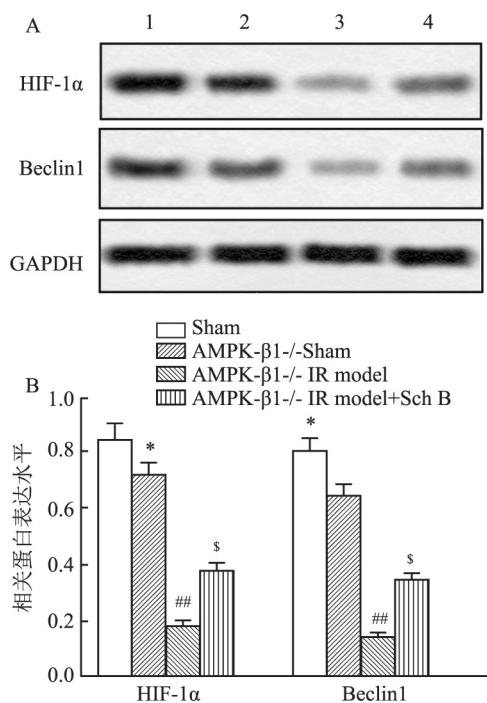


图 4 敲除 AMPK 对线粒体自噬作用的影响

1: Sham 组; 2: AMPK-β1 - / - Sham 组; 3: AMPK-β1 - / - IR model 组; 4: AMPK-β1 - / - IR + Sch B 组; 与 Sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AMPK-β1 - / - Sham 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 AMPK-β1 - / - MI/R model 组比较: <sup>§</sup>  $P < 0.05$

### 3 讨论

缺血性心血管病是最常见的心血管疾病<sup>[8]</sup>。

缺血后血流再通的一段时间内,患者临床可发生血压骤降、心功能不全、心律减慢甚至猝死等一系列病情恶化的现象,是导致缺血性心血管病人死亡的主要原因<sup>[9]</sup>。虽然 MI/R 损伤的机制已经明确,但目前仍然只有较少的药物能影响 MI/R 预后<sup>[10]</sup>。因此,寻找新的药物及治疗方案减轻 MI/R 损伤是降低缺血性心血管病死亡率的关键。

本研究显示 Sch B 能显著降低 MI/R 模型小鼠血清 LDH 和 CK 的含量,缩小 MI/R 小鼠的心肌梗死面积,表明其具有明显的心脏保护作用,可对抗 MI/R 损伤。同时,HE 染色实验表明 Sch B 还能明显改善 MI/R 损伤引起的心肌组织病理改变,表明 Sch B 可缓解 MI/R 诱导的心肌损伤。已有研究<sup>[11]</sup>表明, Sch B 能够减轻 MI/R 损伤,具有较强的心肌保护作用。Zhang et al<sup>[10]</sup> 研究显示, Sch B 可通过调控内质网应激抑制 MI/R 模型大鼠心肌细胞凋亡。Sch B 还可通过增强心肌谷胱甘肽抗氧化作用减轻 MI/R 损伤<sup>[7]</sup>。本研究结果与之前研究一致,进一步证明 Sch B 具有明确的心肌保护作用。此外,本文对 Sch B 抗 MI/R 损伤的作用机制进行了探讨。

本研究显示,缺血缺氧环境可明显降低线粒体标记蛋白 COX I 和 COX IV 的 mRNA 水平,表明缺血缺氧能下调线粒体功能。Sch B 能显著升高 MI/R 小鼠心肌组织 COX I 和 COX IV 的 mRNA 水平,同时还能诱导缺血缺氧后心肌组织 HIF-1 $\alpha$  和 Beclin1 的表达。研究<sup>[12]</sup>表明,缺氧环境可导致线粒体功能障碍,从而导致三磷酸腺苷产生不足及活性氧(ROS)过度产生,过多的 ROS 可诱导心肌细胞凋亡并进一步加重线粒体损伤。COX I 和 COX IV 是线粒体呼吸过程中的重要限速酶,参与了线粒体损伤导致细胞凋亡的过程<sup>[13]</sup>。线粒体自噬是监测线粒体功能、清除受损线粒体的重要机制<sup>[14]</sup>。研究<sup>[15]</sup>显示,线粒体自噬在 MI/R 损伤过程中具有心肌保护作用,其可能是通过清除受损线粒体调控线粒体功能、减少 ROS 产生,从而抑制心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用。已有研究<sup>[6]</sup>表明,缺氧环境可通过诱导线粒体自噬调控线粒体功能抑制心肌细胞凋亡。结合本实验结果表明, Sch B 可能通过诱导心肌组织线粒体自噬减轻 MI/R 损伤。

研究<sup>[16]</sup>表明, AMPK/mTOR/ULK1 可调控心肌细胞自噬抑制缺氧损伤诱导的心肌细胞凋亡。Sch B 能促进 MI/R 小鼠心肌组织 p-AMPK 和 p-ULK1 的表达,抑制 p-mTOR 的表达,表明 Sch B 可促进 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路激活。此外,敲除

AMPK 基因 MI/R 小鼠脑梗死面积明显增多,心率明显降低,表明激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路有利于减轻 MI/R 损伤。同时 AMPK 基因敲除小鼠经心肌缺血再灌注损伤处理后心肌组织 HIF-1 $\alpha$  和 Beclin1 表达水平较野生型小鼠明显减少,提示 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路参与了 MI/R 损伤后线粒体自噬的调控。

## 参考文献

- [1] Zununi Vahed S, Barzegari A, Zuluaga M, et al. Myocardial infarction and gut microbiota: an incidental connection [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 129: 308-17.
- [2] 朱娟霞,孔令恒,张超锋,等.辣椒素降低线粒体氧化应激水平拮抗心脏缺血再灌注损伤的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2017, 48(5): 716-20.
- [3] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-35.
- [4] Yao B J, He X Q, Lin Y H, et al. Cardioprotective effects of anisodamine against myocardial ischemia/reperfusion injury through the inhibition of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1253-60.
- [5] 李俊平,郭丽丽,陈中,等.钙超载与心肌缺血再灌注损伤及中药干预策略 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(11): 2168-73.
- [6] Zhang W, Ren H, Xu C, et al. Hypoxic mitophagy regulates mitochondrial quality and platelet activation and determines severity of I/R heart injury [J]. *Elife*, 2016, 5. pii: e21407
- [7] Yim T K, Ko K M. Schisandrin B protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by enhancing myocardial glutathione antioxidant status [J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 196(1-2): 151-6.
- [8] Duehrkop C, Rieben R. Ischemia/reperfusion injury: effect of simultaneous inhibition of plasma cascade systems versus specific complement inhibition [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(1): 12-22.
- [9] 潘蓉,李玲.丹参水提物对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心率及心肌酶谱的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4): 232-4.
- [10] Zhang W, Sun Z, Meng F. Schisandrin B ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 1903-11.
- [11] Chiu P Y, Ko K M. Time-dependent enhancement in mitochondrial glutathione status and ATP generation capacity by schisandrin B treatment decreases the susceptibility of rat hearts to ischemia-reperfusion injury [J]. *Biofactors*, 2010, 19(1-2): 43-51.
- [12] Crack P J, Taylor J M. Reactive oxygen species and the modulation of stroke [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(11): 1433-44.
- [13] Li N, Qin S, Xie L, et al. Elevated serum potassium concentration alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury via mitochondrial

(下转第 428 页)

amine the pathological morphologies of nigrostriatums. Tunel staining was used to detect the cell apoptosis in nigrostriatums. **Results** Compared with the saline group, the duration and times of the rotation for rats increased in Nurr1 group and negative control group; the level of Nurr1, DAT mRNA and protein and TH protein in nigrostriatums were decreased, while the expression of  $\alpha$ -syn was enhanced; pathological features were obvious and the rate of apoptosis was increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the negative control group, the times and duration of rotation in Nurr1 group were decreased; the expressions of Nurr1, DAT mRNA and protein and TH protein in nigrostriatums were enhanced, while the levels of  $\alpha$ -syn mRNA and protein were decreased. The pathological feature was improved and the apoptosis rate was decreased (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of Nurr1 human amnion-derived mesenchymal stem cells can alleviate the symptoms of Parkinson disease rats, increase the content of DAT and TH and inhibit apoptosis in nigrostriatums.

**Key words** Parkinson; nigrostriatum; nuclear associated receptor factor 1; human amnion-derived mesenchymal stem cells

(上接第 422 页)

- preservation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(4): 1664 - 74.
- [14] Rugarli E I, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons [J]. *EMBO J*, 2012, 31(6): 1336 - 49.
- [15] Anzell A R, Maizy R, Przyklenk K, et al. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2547 - 64.
- [16] Xiao Q, Yang Y, Qin Y, et al. AMP-activated protein kinase-dependent autophagy mediated the protective effect of sonic hedgehog pathway on oxygen glucose deprivation-induced injury of cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457(3): 419 - 25.

## Schisandrin B alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via maintaining mitophagy

Lu Changqing, Jia Helei, Lei Zhen, et al

[Dept of Emergency Henan Province Hospital of TCM (The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine), Zhengzhou 450002]

**Abstract Objective** To investigate the effects and mechanism of schisandrin B (Sch B) on myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury. **Methods** Mice were divided into Sham, Sham + Sch B, MI/R model and MI/R model + Sch B groups. Replication of mouse MI/R model by coronary artery ligation and mice in Sham + Sch B and MI/R model + Sch B group were treated with Sch B, and recorded the heart rate at the same time. Mice were sacrificed after administering with Sch B for 30 days. The serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) were detected by reagent cases, and pathologic lesions were measured by HE staining. The mRNA and protein levels of mitophagy related proteins were calculated by qRT-PCR and Western blot. Adenosine monophosphate activated protein kinase/mammalian target of rapamycin/ULK1 (AMPK/mTOR/ULK1) pathway related proteins also were detected by Western blot. The above-mentioned tests were repeated by using AMPK- $\beta$ 1 gene knockout (AMPK- $\beta$ 1 -/-) mice. **Results** Sch B treatment decreased the indexes of cardiac injury (serum LDH, CK and the myocardial infarct area), increased the heart rate and alleviated the pathological changes. Meanwhile, Sch B maintained mitophagy by up-regulating the mRNA levels of cyclooxygenase I (COX I), COX IV and increasing protein levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), Beclin 1. In addition, Sch B increased the expression of p-AMPK, p-ULK1 and decreased the expression of p-mTOR induced by MI/R injury. Furthermore, knockout AMPK- $\beta$ 1 inhibited mitophagy, thus resulted in the increasing infarct area and decreasing heart rate. **Conclusion**

Sch B alleviates MI/R injury via maintaining mitophagy mediated by AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway.

**Key words** schisandrin B; ischemia/reperfusion injury; mitophagy