

## 加减枳实薤白桂枝汤通过激活线粒体 ATP 敏感性钾通道抑制缺血再灌注心肌线粒体凋亡途径

张恒, 刘春晓, 李媛媛, 石月萍

(锦州医科大学附属第一医院中医科, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 加减枳实薤白桂枝汤; 心肌缺血再灌注; 线粒体 ATP 敏感性钾通道; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 探究加减枳实薤白桂枝汤能否在心肌缺血再灌注的过程中激活线粒体 ATP 敏感性钾通道产生线粒体保护作用, 进而抑制细胞凋亡的线粒体凋亡途径, 减轻心肌缺血再灌注损伤。**方法** 将 24 只 SD 大鼠随机分为三组: 假手术组 6 只, 模型组 9 只, 加减枳实薤白桂枝汤组 9 只, 给药 14 天后结扎冠状动脉前降支造模, 观察各组心电图 ST 段、心肌酶(肌酸激酶同工酶 MB、乳酸脱氢酶)及线粒体超微结构的改变, 采用伊文思蓝/红四氮唑双重染色比较模型组及加减枳实薤白桂枝汤组心肌梗死面积, 组织制备单细胞悬液后经罗丹明 123 染色, 以流式细胞仪检测各组线粒体膜电位, Western blot 检测各组大鼠线粒体中缝隙连接蛋白 43(Cx43)、蛋白激酶 C-ε 型(PKC-ε)及内向整流钾通道 6.2(Kir6.2)的表达, 甲基麝香草酚蓝微板法检测各组大鼠线粒体内钙含量。**结果** 加减枳实薤白桂枝汤能有效减轻心肌缺血再灌注导致的 ST 段及心肌酶的改变, 缩小心肌梗死面积, 减轻线粒体超微结构及膜电位的改变, 增强线粒体内 Cx43、PKC-ε 及 Kir6.2 的表达, 减轻线粒体钙超载。**结论** 加减枳实薤白桂枝汤能通过上调线粒体内 Cx43 及 PKC-ε 的表达激活线粒体 ATP 敏感性钾通道产生线粒体保护效应, 进而减少细胞色素 C 从线粒体释放, 抑制了天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶家族相关蛋白的级联反应进而降低心肌细胞凋亡率, 减轻心肌缺血再灌注损伤。

[中图分类号] R256.22; R5

[文献标识码] A

### Modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction inhibit myocardial mitochondrial apoptosis in ischemia-reperfusion by activating MitoK<sub>ATP</sub> channel

ZHANG Heng, LIU Chunxiao, LI Yuanyuan, SHI Yueping

(Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction; myocardial ischemia-reperfusion; MitoK<sub>ATP</sub>; apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction activates MitoK<sub>ATP</sub> channel during myocardial ischemia-reperfusion to produce mitochondrial protection, thereby inhibiting mitochondrial apoptosis pathway and alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group ( $n=6$ ), ischemia reperfusion model group (IR group,  $n=9$ ), modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction group (M group,  $n=9$ ). After 14 days of administration, coronary artery anterior descending was performed. The model was established, and the ST segment of myocardial electrocardiogram, myocardial enzyme (CK-MB, LDH) and mitochondrial ultrastructural changes were observed. The myocardial infarct size of IR group and M group was compared by Evans blue/TTC staining. After rhodamine 123 staining, the mitochondrial membrane potential was detected by flow cytometry. The expressions of connexin43 (Cx43), protein kinase C-ε (PKC-ε) and inward-rectifier potassium channel 6.2 (Kir6.2) subunits in mitochondria of each group were detected by Western blot. Methylthymol blue microplate assay was used to detect calcium content in mitochondria of rats in each group. **Results** Modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction can effectively alleviate ST segment and myocardial enzyme changes caused by myocardial

[收稿日期] 2018-11-23

[修回日期] 2019-01-16

[基金项目] 辽宁省科学技术基金资助项目(201602307)

[作者简介] 张恒, 硕士, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病, E-mail 为 zhh0531@outlook.com。通信作者石月萍, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合防治心血管疾病, E-mail 为 lnjzsy@163.com。

ischemia-reperfusion, reduce myocardial infarct size, reduce mitochondrial ultrastructure and membrane potential changes, enhance the expression of Cx43, PKC- $\epsilon$  and Kir6.2 in mitochondrial and mitigating mitochondrial calcium overload.

**Conclusion** Modified Zhishi Xiebai Guizhi decoction can activate MitoK<sub>ATP</sub> channel to activate mitochondrial protective effect by up-regulating the expression of Cx43 and PKC- $\epsilon$  in mitochondria, thereby reducing the release of cytochrome C from mitochondria, inhibiting the cascade response of caspase-related proteins to reduce myocardial cells apoptosis rate, and to reduce myocardial ischemia-reperfusion injury.

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 因严重影响心肌梗死再灌注治疗的效果而逐渐成为一个研究热点。MIRI 的发生机制十分复杂, 其中细胞凋亡是一个重要的损伤机制, 而线粒体凋亡途径又在细胞凋亡中起决定性作用<sup>[1-3]</sup>。线粒体凋亡途径的中心环节是细胞色素 C 从线粒体中释放出来, 因此线粒体结构及功能的保护在对抗心肌缺血再灌注损伤中十分重要。本课题组前期的实验中发现加减枳实薤白桂枝汤能有效降低心肌细胞凋亡率, 其机制可能是抑制线粒体内细胞色素 C 的释放, 进而避免了天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteine-containing aspartate-specific proteases, Caspase) 家族相关蛋白的激活而产生抗凋亡作用<sup>[4]</sup>。本研究旨在在前期实验的基础上探讨加减枳实薤白桂枝汤能否通过激活线粒体 ATP 敏感性钾通道 (mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, MitoK<sub>ATP</sub>) 产生线粒体保护作用, 进而抑制线粒体凋亡途径, 减轻心肌缺血再灌注损伤。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 6 周龄, 体质量 180 ~ 220g, 由锦州医科大学动物实验中心提供。生产许可证号: SCXK(辽)2014-0004, 使用许可证号: SYXK(辽)2014-0002。

### 1.2 实验药物

加减枳实薤白桂枝汤: 枳实 12 g、薤白 9 g、瓜蒌 15 g、厚朴 12 g、桂枝 3 g、三七 9 g、人参 12 g。将上述药物换算为等效剂量的中药免煎颗粒, 混合后溶解。给药剂量按免煎颗粒换算标准及大鼠给药换算标准计算为每只大鼠每天 6.48 g/kg。免煎颗粒由北京康仁堂药业有限公司提供, 符合国家规定的药物质量标准 (枳实批号 K14817027432000005002415、薤白批号 K46517018103000010001207、瓜蒌批号 K16617019472000020005161、厚朴批号 K21917027932000005013636、桂枝批号 K1741800115300000

5001247、三七批号 K3581702166220000200005733、人参批号 K35418001051000010004130)。

### 1.3 试剂

伊文思蓝 (Evans blue) 染色剂 (北京索莱宝, E8010), 红四氮唑 (TTC) 染色剂 (北京索莱宝, T8170), 罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123) 染色剂 (北京金泰宏达, R1342)。线粒体蛋白提取试剂盒 (wla034a)、BCA 蛋白定量试剂盒 (wla004a)、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (wla013a) 均购自沈阳万类。Kir6.2 兔抗大鼠多克隆抗体 (武汉伊莱瑞特, E-AB-31876), Cx43 兔抗大鼠多克隆抗体 (沈阳万类, wl03003), PKC- $\epsilon$  兔抗大鼠多克隆抗体 (武汉博士德, BA1360), 电压依赖性阴离子通道蛋白 1 (voltage-dependent anion channel protein 1, VDAC1) 兔抗大鼠多克隆抗体 (沈阳万类, wl02790), HRP 标记山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (沈阳万类, wla023a), 高敏 ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天, P0018S), 钙检测试剂盒 (北京雷根, TC1021)。

### 1.4 仪器

心电图机 (上海医疗器械厂, ECG-6511), 动物呼吸机 (浙江大学医学仪器厂, DH-150), 全自动生化分析仪 (日立, 7600), 流式细胞分析仪 (BD, BD FACSCelesta), 透射电子显微镜 (日本电子株式会社, JEM 1200EX), 高速匀浆机 (IKA, T10 basic), 台式高速冷冻离心机 (Sigma, 3K15), 酶标仪 (TECAN, infinite 200 PRO), 垂直电泳仪 (Bio-Rad), 化学发光成像系统 (Bio-Rad, Chemidoc XRS+)。

### 1.5 实验分组及心肌缺血再灌注损伤模型复制

24 只 6 周龄雄性 SD 大鼠测体质量后随机分为 3 组: 假手术组 6 只, 模型组 9 只, 加减枳实薤白桂枝汤组 9 只 (因模型组与加减枳实薤白桂枝汤组需进行 Evans blue/TTC 染色实验, 染色后的大鼠不能用于其他实验, 因此本实验在每组 6 只的基础上对模型组及加减枳实薤白桂枝汤组额外增加 3 只大鼠以供 Evans blue/TTC 染色实验)。适应性饲养 7 天后按照每只大鼠每天 6.48 g/kg 的剂量配制药物 (前期的实验进行了加减枳实薤白桂枝汤 3.24 g/kg、6.48 g/kg 及 12.96 g/kg 三个剂量对缺血再灌注

心肌保护作用的比较,实验发现 6.48 g/kg 及 12.96 g/kg 两个剂量保护作用区别不大,均明显强于 3.24 g/kg,而 6.48 g/kg 这一剂量在临床上较为常用,因此本实验选用的药物剂量为 6.48 g/kg),混匀后于超纯水中充分溶解。每只大鼠每天灌胃给药 2 mL,给药 14 天后手术造模。手术过程:将大鼠以 10% 乌拉坦溶液 5 mg/kg 腹腔注射麻醉后固定在动物手术台上,肢端皮下插入心电图机的电极,信号稳定后剪开颈部皮肤,钝性分离气管后行气管插管,连接动物呼吸机正压通气(潮气量 6 mL/100 g,频率 60 次/min,呼吸比 1:3)。以剪刀在胸骨左缘 3~4 肋处剪开皮肤,钝性分离肌肉、血管及神经,剪开肋骨并固定,暴露胸腔,可见肺被呼吸机节律吹起,剪开心包后,以 6-0 缝合线在左冠状动脉前降支(left anterior descending artery, LAD)起始部下方 2 mm 穿线结扎(假手术组只穿线,不结扎),以观察到 ST 段上抬高超过 0.1 mV 且左心室变暗为结扎成功的标志。结扎 30 min 后剪开结扎线,以观察到抬高的 ST 段逐渐回落为再灌注成功的标志,再灌注 120 min 后完成心肌缺血再灌注损伤造模。造模的过程中密切监视大鼠状态,持续心室颤动或死亡的大鼠做淘汰处理,并择日另取鼠补实验。

### 1.6 心电图记录

缺血 30 min 后描记缺血心电图,再灌注 120 min 后描记再灌注心电图,统计并分析各组 ST 段改变。

### 1.7 心肌酶检测

造模结束后剪开颈部皮肤,分离颈静脉并以一次性医用取血管取血。血液静置 30 min 后置入离心机,以 3 000 r/min 离心 10 min,血清移入 EP 管中,应用全自动生化分析仪测定各组血清中肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase MB, CK-MB)及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的含量。

### 1.8 Evans blue /TTC 双重染色

造模结束后,模型组及加减枳实薤白桂枝汤组取 3 只大鼠再次结扎 LAD,并从尾静脉注射 2 mL 2% Evans blue 溶液,待周身蓝染后迅速摘取心脏,以生理盐水灌洗后置入 -20 °C 冰箱中冷冻 10 min,取出后以手术刀垂直于心脏长轴将心脏迅速横切为 5 片,每片厚度约 2 mm,切片置入 1% TTC 溶液中,37 °C 水浴避光染色 20 min,取出后置入 10% 福尔马林溶液中固定 10 min,以数码相机拍照。使用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件分析各组心肌梗死面积(以 IS/AAR 表示,IS 为白色梗死区,AAR 为红色缺血区)。

### 1.9 线粒体超微结构观察

造模结束并取血后迅速剪下心脏,以生理盐水灌洗后在冰上分离左心室,取一小块组织置入 2.5% 戊二醛固定液中,并在固定液中迅速将其剪为体积约 1 mm<sup>3</sup> 的小块,经过脱水、渗透、包埋聚合、切片、醋酸双氧铀及柠檬酸铅染色等步骤,于透射电镜下找到心肌细胞内的线粒体进行观察并拍照。

### 1.10 线粒体膜电位测定

造模结束并取血后剪下心脏,以生理盐水迅速灌洗后在冰上分离左心室,取一块组织在冰上迅速剪碎,置入含 0.02% EDTA 的胰酶消化液中,37 °C 水浴消化,消化过程中每隔 30 s 用移液器吹打一次,观察无大块未消化组织后加入血清终止消化,清洗 3 次后离心收集细胞,并以磷酸盐缓冲溶液(PBS)重悬,经 200 目细胞筛过滤后以细胞计数板进行细胞计数,并收集 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> 个细胞转移至新的 EP 管中,加入 100 μL PBS 重悬,设置测试组及空白组,测试组加入 100 μL 浓度为 1 mg/L 的 Rh123 溶液,使终浓度为 0.5 mg/L,空白组加入 100 μL 的 PBS,37 °C 水浴避光孵育 20 min 后离心收集细胞,洗涤 2 次后以 600 μL PBS 重悬,再次过筛后以流式细胞仪检测 10<sup>5</sup> 个细胞(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm),以 Flowjo7.6 软件进行分析。横坐标为荧光强度,纵坐标为细胞数量,横坐标可见两个峰值,以高荧光强度细胞占比(M%)代表线粒体膜电位。

### 1.11 线粒体钙含量检测

提取各组线粒体蛋白后,分别加入 96 孔板,设置标准孔、空白孔及待测孔。使用钙检测试剂盒检测线粒体钙含量。具体方法为:取等量钙分析缓冲液和 MTB 显色液混合后加入上述各孔,室温静置 10 min 后以酶标仪检测各孔在 610 nm 处的吸光度(absorbance, A),并以 BCA 法进行蛋白定量,以蛋白含量标记线粒体内钙含量(mmol/g),计算方法为:(A<sub>测定孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>)/(A<sub>标准孔</sub>-A<sub>空白孔</sub>)×2.5/样品蛋白浓度。

### 1.12 Western blot 测定线粒体蛋白含量

造模结束并取血后迅速剪下心脏,以生理盐水灌洗后在冰上分离左心室,取 200 mg 组织在冰上迅速剪碎,使用高速匀浆机破碎细胞,匀浆移入 EP 管中以线粒体蛋白提取试剂盒提取线粒体蛋白,BCA 法进行蛋白定量,全程低温操作。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育(Cx43、Kir6.2 稀释浓度为 1:1 000,PKC-ε、VDAC1 稀释浓度为 1:500)、洗膜、二抗孵育(HRP 标记山羊抗兔

IgG 稀释浓度 1 : 3 000)、显影等步骤后,使用化学发光成像系统曝光成像,以 ImageJ1. 8. 0 图像处理软件测量各组蛋白光密度,并根据内参蛋白光密度计算相对光密度(relative density, RelDen)。

### 1. 13 统计学分析

采用 SPSS 17. 0 统计处理软件分析数据,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析,以  $P < 0. 05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2. 1 心电图记录

模型组与加减枳实薤白桂枝汤组在心肌缺血 30 min 后心电图 ST 段均有明显改变,再灌注 120 min 后 ST 段也均显著下降,其中加减枳实薤白桂枝汤组在缺血 30 min 及再灌注 120 min 后 ST 段改变均显著轻于模型组,差异具有统计学意义( $P < 0. 01$ ; 表 1)。心电图的分析统计结果提示加减枳实薤白桂枝汤能显著减轻心肌缺血再灌注导致的 ST 段急性改变,降低心肌缺血急性损伤及再灌注损伤。

表 1. 缺血 30 min 与再灌注 120 min 心电图 ST 段改变( $n=6$ )

Table 1. Changes in ST segment of ECG for 30 minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion( $n=6$ )

分 组	缺血 30 min (mV)	再灌注 120 min (mV)
假手术组	0±0	0±0
模型组	0. 722±0. 094 <sup>a</sup>	0. 405±0. 066 <sup>a</sup>
加减枳实薤白桂枝汤组	0. 450±0. 085 <sup>ab</sup>	0. 259±0. 041 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0. 01$ , 与假手术组比较;b 为  $P < 0. 01$ , 与模型组比较。

### 2. 2 心肌酶检测结果

模型组及加减枳实薤白桂枝汤组 CK-MB 及

LDH 显著高于假手术组,且加减枳实薤白桂枝汤组 CK-MB 及 LDH 均低于模型组,差异具有统计学意义( $P < 0. 01$ ; 表 2)。心肌酶数值的统计显示加减枳实薤白桂枝汤能有效降低心肌缺血再灌注导致的心肌酶升高,提示加减枳实薤白桂枝汤能显著降低心肌缺血再灌注导致的急性心肌损伤。

表 2. 缺血再灌注后心肌酶改变( $n=6$ )

Table 2. Changes in myocardial enzymes after ischemia-reperfusion( $n=6$ )

分 组	CK-MB(U/L)	LDH(U/L)
假手术组	717. 4±59. 7	693. 0±59. 1
模型组	1943. 0±135. 9 <sup>a</sup>	1663. 1±53. 7 <sup>a</sup>
加减枳实薤白桂枝汤组	1203. 7±113. 4 <sup>ab</sup>	1183. 9±79. 0 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0. 01$ , 与假手术组比较;b 为  $P < 0. 01$ , 与模型组比较。

### 2. 3 Evans blue/TTC 双重染色观察心肌梗死面积

加减枳实薤白桂枝汤组心肌梗死面积( $23. 7\% \pm 5. 1\%$ )显著低于模型组( $58. 3\% \pm 5. 8\%$ ),差异具有统计学意义( $P < 0. 01$ ; 图 1)。Evans blue/TTC 双重染色结果提示加减枳实薤白桂枝汤能显著减少缺血再灌注过程中的心肌细胞死亡。

### 2. 4 线粒体超微结构观察

透射电镜下可见假手术组线粒体形态、大小正常,嵴结构清晰可见、排列整齐,基质均匀未见高密度电子颗粒;模型组线粒体肿胀、变形严重,膜结构模糊,嵴结构变浅、紊乱,基质颜色变深,可见多量深色高密度电子颗粒;加减枳实薤白桂枝汤组膜结构模糊,嵴结构清晰,略紊乱,基质改变较模型组减轻,可见少量深色高密度电子颗粒(图 2)。透射电镜照片提示加减枳实薤白桂枝汤可以有效减轻心肌缺血再灌注造成的线粒体超微结构的损伤。

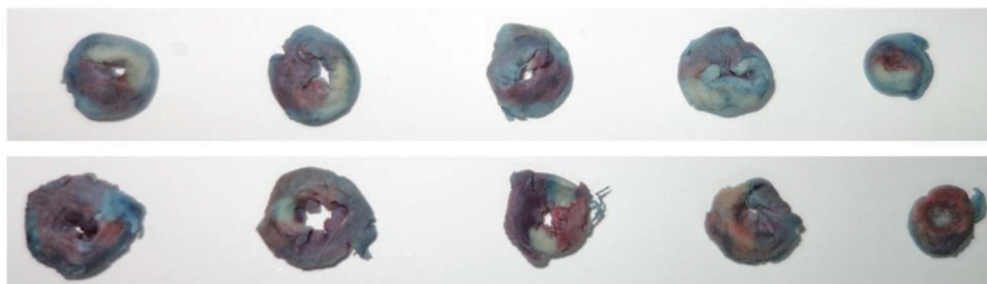


图 1. 心肌梗死面积比较 上图为模型组,下图为加减枳实薤白桂枝汤组。

Figure 1. Comparison of myocardial infarct size

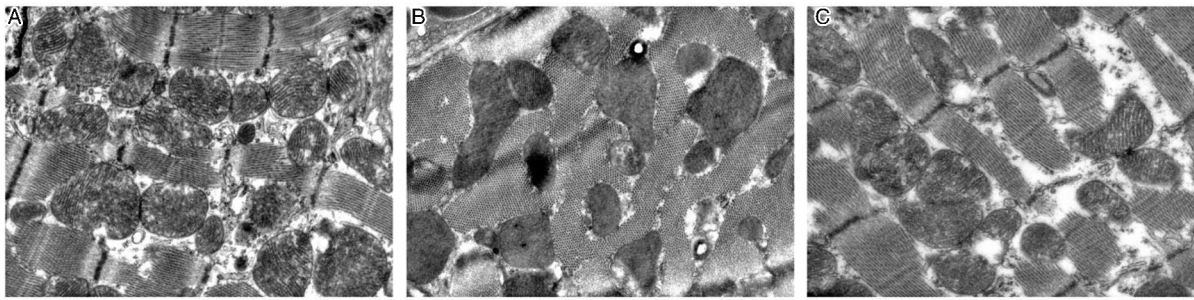


图 2. 缺血再灌注后线粒体超微结构(30 000×) A 为假手术组, B 为模型组, C 为加减枳实薤白桂枝汤组。

Figure 2. Mitochondrial ultrastructure after ischemia-reperfusion(30 000×)

2.5 线粒体膜电位改变

流式数据分析显示模型组高荧光峰值显著左移,模型组罗丹明 123 染色的阳性细胞率显著低于假手术组,而加减枳实薤白桂枝汤组阳性细胞率显著高于模型组( $P<0.01$ );模型组线粒体膜电位低于假手术组,加减枳实薤白桂枝汤组线粒体膜电位高于模型组(表 3 和图 3)。线粒体膜电位测定结果提示加减枳实薤白桂枝汤在心肌缺血再灌注过程中发挥了明显的线粒体保护作用,有效地保护了线粒体膜电位。

表 3. 线粒体膜电位改变( $n=6$ )

Table 3. Changes in mitochondrial membrane potential ( $n=6$ )

分 组	线粒体膜电位(%)
假手术组	96.3±2.7
模型组	45.9±9.1 <sup>a</sup>
加减枳实薤白桂枝汤组	75.4±5.8 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与假手术组比较;b 为  $P<0.01$ ,与模型组比较。

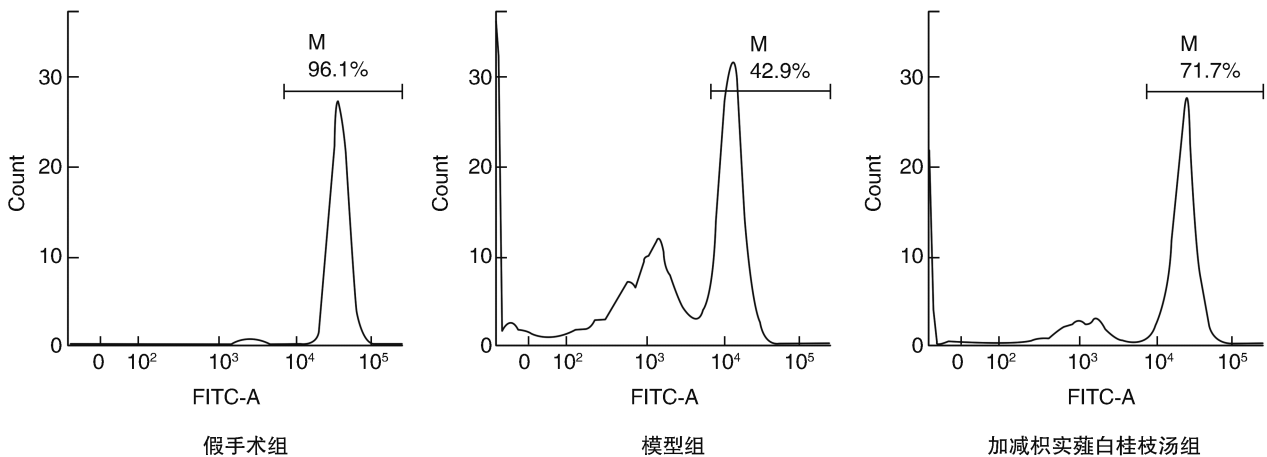


图 3. 线粒体膜电位改变

Figure 3. Mitochondrial membrane potential changes

2.6 线粒体钙含量变化

钙含量检测结果显示模型组及加减枳实薤白桂枝汤组线粒体内钙含量显著高于假手术组,且加减枳实薤白桂枝汤组钙含量显著低于模型组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ;表 4)。提示加减枳实薤白桂枝汤在心肌缺血再灌注的过程中产生线粒体保护作用,有效降低了缺血再灌注导致的线粒体钙超载。

表 4. 线粒体内钙含量( $n=6$ )

Table 4. Mitochondrial calcium content ( $n=6$ )

分 组	钙含量(mmol/g)
假手术组	0.055±0.016
模型组	0.203±0.027 <sup>a</sup>
加减枳实薤白桂枝汤组	0.129±0.035 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与假手术组比较;b 为  $P<0.01$ ,与模型组比较。

## 2.7 Western blot 测定线粒体内蛋白表达

模型组 Cx43、PKC- $\epsilon$  表达显著低于假手术组 ( $P < 0.01$ ), Kir6.2 的表达略低于假手术组 ( $P < 0.05$ ); 加减枳实薤白桂枝汤组 Cx43、PKC- $\epsilon$  的表达均显著高于模型组 ( $P < 0.01$ ), Kir6.2 的表达显著高于假手术组及模型组 ( $P < 0.01$ ), 差异具有统计学意义(图

4)。Western blot 结果分析显示加减枳实薤白桂枝汤能明显上调缺血再灌注心肌细胞线粒体内 Cx43、PKC- $\epsilon$  及 Kir6.2 的表达, 提示加减枳实薤白桂枝汤在缺血再灌注过程中通过上调 Cx43 及 PKC- $\epsilon$  激活了 MitoK<sub>ATP</sub> 通道。

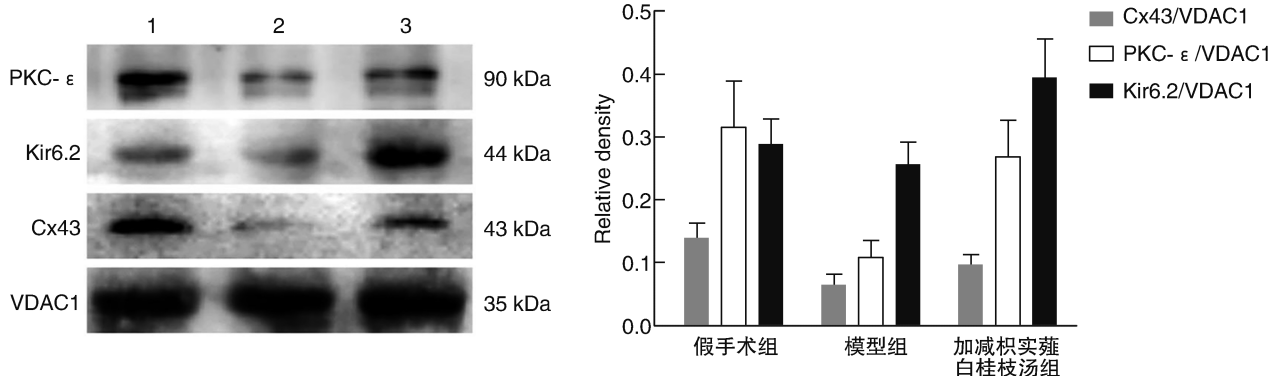


图 4. 线粒体内蛋白表达 1 为假手术组, 2 为模型组, 3 为加减枳实薤白桂枝汤组。

Figure 4. Expression of mitochondrial protein

## 3 讨论

心肌细胞内存在膜 ATP 敏感性钾通道 (sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel, SarcK<sub>ATP</sub>) 及 MitoK<sub>ATP</sub> 通道两种 ATP 敏感性钾通道 (ATP-sensitive potassium channel, K<sub>ATP</sub>), 其中 MitoK<sub>ATP</sub> 通道在干预心肌缺血再灌注损伤中起关键作用。MitoK<sub>ATP</sub> 通道在生理状态下介导了线粒体的 K<sup>+</sup> 摄取及 K<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> 交换, 维持了线粒体内 K<sup>+</sup> 平衡, 从而控制线粒体基质容积的改变, 促进了正常的线粒体功能<sup>[5]</sup>。在心肌缺血再灌注的状况下, MitoK<sub>ATP</sub> 通道的开放有助于维持线粒体膜电位, 减轻线粒体钙超载, 是缺血预处理及药物预处理对抗心肌缺血再灌注损伤的终末效应器<sup>[6]</sup>。

大量的研究表明 MitoK<sub>ATP</sub> 通道的激活受多种因素调控, 其中线粒体 Cx43 及 PKC- $\epsilon$  起重要作用。Cx43 是心肌细胞膜上的一种跨膜蛋白, 其参与构成细胞间缝隙连接, 是心肌细胞间电偶联及化学偶联的结构基础<sup>[7-8]</sup>。近年来的研究发现 Cx43 也存在于线粒体内, 其主要定位于线粒体内膜<sup>[9]</sup>, 参与了缺血预处理及缺血后处理对心肌缺血再灌注损伤的保护<sup>[10-11]</sup>。研究发现 Cx43 基因缺陷及给予 Cx43 阻断剂的小鼠在给予二氮嗪 (MitoK<sub>ATP</sub> 通道激活剂) 后 MitoK<sub>ATP</sub> 通道的激活显著减少, 同时缺血预适应与药物预适应的细胞保护作用也被取消, 因此线粒

体内的 Cx43 介导了 MitoK<sub>ATP</sub> 通道的激活, 同时 PKC- $\epsilon$  也参与了这一过程<sup>[12]</sup>, Hassouna 的研究发现 PKC- $\epsilon$  是激活 MitoK<sub>ATP</sub> 通道的上游蛋白<sup>[13]</sup>, MitoK<sub>ATP</sub> 通道激活后线粒体膜发生去极化, 阻止了线粒体膜电位的崩溃, 减轻线粒体损伤<sup>[6]</sup>, 进而抑制细胞色素 C 的释放, 抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

K<sub>ATP</sub> 是由内向整流钾通道 (inward-rectifier potassium channel, Kir) 和磺酰脲类受体 (sulfonylurea receptor, SUR) 两个亚基组成的复合体, Kir6.1 及 Kir6.2 形成中心离子孔道, SUR1 及 SUR2 (SUR2A、SUR2B) 调节通道功能及敏感性, 心肌细胞的 SarcK<sub>ATP</sub> 通道由 Kir6.2 和 SUR2A 组成, 但是关于 MitoK<sub>ATP</sub> 通道的亚基组成尚不明确。Lacza 等的研究<sup>[15]</sup>证明 MitoK<sub>ATP</sub> 通道由 Kir6.1 及 Kir6.2 组成, 黄益民等的研究<sup>[16]</sup>发现 Kir6.2 基因敲除小鼠的 MitoK<sub>ATP</sub> 通道失活, 佟宇等的研究<sup>[17]</sup>发现 MitoK<sub>ATP</sub> 通道抑制剂 5-HD 抑制了 Kir6.2 的表达, 因此本实验以 Kir6.2 标记 MitoK<sub>ATP</sub> 通道, 通过 Western blot 检测 Kir6.2 的表达标记 MitoK<sub>ATP</sub> 通道的激活。

加减枳实薤白桂枝汤 (前期命名温阳通脉方) 是石月萍教授在《金匱要略》所载枳实薤白桂枝汤的基础上加入益气活血的人参及三七所成, 临床常以此方治疗冠心病、心绞痛, 疗效显著<sup>[18]</sup>, 前期研究发现加减枳实薤白桂枝汤能下调腺苷酸环化酶/环

磷酸腺苷(adenylate cyclase/cyclic adenosine monophosphate, AC/cAMP) 通路抑制水通道蛋白(aquaporin, AQP) 1、AQP4 mRNA 及蛋白的表达,改善缺血再灌注后的心肌病理损伤<sup>[19]</sup>,并通过磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/内皮型一氧化氮合酶(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase, PI3K/Akt/eNOS) 通路上调一氧化氮/环磷酸鸟苷/蛋白激酶 G(nitric oxide / cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G, NO/cGMP/PKG) 信号通路减轻心肌过氧化损伤<sup>[20]</sup>,以及通过抑制细胞色素 C 与 Caspase-9 及 Caspase-3 的表达,降低缺血再灌注后心肌组织的细胞凋亡率<sup>[4]</sup>等。本实验通过心电图、心肌酶及 Evans blue/TTC 染色证明加减枳实薤白桂枝汤能有效保护缺血再灌注后的心肌,通过检测线粒体膜电位、线粒体钙含量及透射电镜观察线粒体超微结构三个方面证明加减枳实薤白桂枝汤能在缺血再灌注的情况下有效保护线粒体的结构及功能,通过 Western blot 检测线粒体蛋白发现加减枳实薤白桂枝汤能使线粒体内 Cx43、PKC- $\epsilon$  及 Kir6.2 表达增加,同时前期研究发现加减枳实薤白桂枝汤能有效抑制心肌缺血再灌注后心肌细胞内细胞色素 C 及 Caspase-3 的表达、显著降低心肌细胞凋亡率<sup>[4]</sup>,共同说明了加减枳实薤白桂枝汤能在心肌缺血再灌注的过程中通过上调线粒体 Cx43 及 PKC- $\epsilon$  的表达激活 MitoK<sub>ATP</sub> 通道的开放,使线粒体膜去极化,在维持线粒体膜电位的同时减少线粒体内钙离子堆积,减轻线粒体钙超载,保护了线粒体的功能及结构,进而减少了线粒体内细胞色素 C 的释放,抑制了 Caspase-9 及 Caspase-3 的级联反应,使细胞凋亡率降低,产生抗心肌缺血再灌注的作用。

#### [参考文献]

- [1] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1997, 95(2): 320-323.
- [2] Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(6): 390-397.
- [3] 杨胜利. 细胞凋亡与冠心病[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(4): 379-381.
- [4] 刘春晓, 石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤对大鼠心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡及 Caspase 相关蛋白的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017(1): 11-14.
- [5] Inoue I, Nagase H, Kishi K, et al. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane[J]. *Nature*, 1991, 352(6332): 244-247.
- [6] Murata M, Akao M, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection[J]. *Circ Res*, 2001, 89(10): 891-898.
- [7] Jongsma HJ, Wilders R. Gap junctions in cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2000, 86(12): 1193-1197.
- [8] 珠勒皮亚·司马义, 娜儿娜·吾格提, 布海力且木·买买提. 大鼠心肌梗死后左心室重构、电重构和交感神经重构的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(5): 404-408.
- [9] Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, et al. Mitochondrial connexin43 as a new player in the pathophysiology of myocardial ischaemia-reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 77(2): 325-333.
- [10] Rodriguezsinovas A, Boengler K, Cabestrero A, et al. Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection[J]. *Circ Res*, 2006, 99(1): 93-101.
- [11] 何燕, 曾志羽, 钟国强, 等. 线粒体连接蛋白 43 参与缺血后处理对兔急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38(4): 357-362.
- [12] Rottlaender D, Boengler K, Wolny M, et al. Connexin 43 acts as a cytoprotective mediator of signal transduction by stimulating mitochondrial KATP channels in mouse cardiomyocytes[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(5): 1441-1453.
- [13] Hassouna A, Matata BM, Galiñanes M. PKC-epsilon is upstream and PKC-alpha is downstream of mitoKATP channels in the signal transduction pathway of ischemic preconditioning of human myocardium[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(5): 1418-1425.
- [14] Wakiyama H, Cowan DB, Toyoda Y, et al. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, 21(3): 424-433.
- [15] Lacza Z, Snipes J A, Miller A W, et al. Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K<sup>+</sup> channels[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(11): 1339-1347.
- [16] 黄益民, 张颖, 辛毅, 等. mitoK<sub>ATP</sub> 通道经 FOXO1-PGC1 $\alpha$  通路调节后负荷过载小鼠心肌线粒体的代谢功能[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(7): 1306-1310.
- [17] 佟宇, 王晶. mitoK<sub>ATP</sub> 在黄芪甲苷抑制心肌细胞肥大中的作用[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(3): 51-54.
- [18] 石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤治疗冠心病心绞痛[J]. *辽宁中医杂志*, 2009, 36(6): 962-963.
- [19] 李楠楠, 石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤通过 AC/cAMP 通路对缺血再灌注大鼠心肌组织水通道蛋白表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(3): 237-244.
- [20] 徐萍, 石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤对大鼠心肌缺血再灌注过氧化损伤的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 14-18.

(此文编辑 许雪梅)