

· 经典名方 ·

基于PI3K/Akt/mTOR信号通路探讨炙甘草汤抗大鼠MIRI致室速和室颤的作用机制

郑旭颖, 麻春杰*, 陈永真, 任存霞, 牛仁秀, 莲花, 陈琨, 谭晓慧, 闫清支, 张星, 吴昊
(内蒙古医科大学, 呼和浩特 010110)

[摘要] 目的:通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,探讨炙甘草汤干预心肌缺血再灌注损伤(MIRI)致心律失常(室速和室颤)的作用及其机制。方法:将72只SD大鼠随机分为假手术组,模型组,炙甘草汤低、中、高剂量组(11.43,22.86,45.72 g·kg⁻¹),稳心颗粒组(2.43 g·kg⁻¹),连续给药干预10 d。末次给药2 h,采用结扎冠状动脉左前降支法制备大鼠MIRI模型,记录心电图的变化。造模成功后采集血液及心脏组织,检测血清中肌酸肌酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)及丙氨酸氨基转移酶(AST)的含量;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测心肌肌钙蛋白(CtnI)的含量;免疫组化法检测心肌PI3K,Akt,mTOR的表达;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌自噬相关蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC-3),自噬标志物Beclin1和PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达及磷酸化p-PI3K,p-Akt,p-mTOR的水平。结果:模型组大鼠100%发生室速,91.67%发生室颤;与假手术组比较,模型组大鼠血清CK,LDH,AST以及CtnI的含量显著升高($P<0.01$),心肌组织中PI3K,Akt,mTOR表达显著升高($P<0.01$),LC3-II/LC3-I与Beclin1的相对表达量显著升高($P<0.01$),p-PI3K/PI3K,p-Akt/Akt,p-mTOR/mTOR显著降低($P<0.01$);与模型组比较,炙甘草汤高剂量组室速、室颤发生率显著降低($P<0.01$),较其他给药组持续时间长($P<0.01$);炙甘草汤高剂量组CK,LDH,AST水平及CtnI含量显著降低($P<0.01$);炙甘草汤给药组的PI3K,Akt,mTOR的表达随剂量的增加而显著降低($P<0.01$);LC-3,Beclin1的表达随炙甘草汤各剂量组的增加有不同程度地下降($P<0.01$),而PI3K/Akt/mTOR相关蛋白表达比值明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:炙甘草汤预处理能使异常升高的心肌酶CK,LDH,AST,CtnI降低,抑制细胞的过度自噬,上调PI3K,Akt和mTOR的表达,说明炙甘草汤抗MIRI致心律失常的作用可能与PI3K/Akt/mTOR信号通路有关。

[关键词] 炙甘草汤; 心肌缺血再灌注损伤; 心律失常; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路

[中图分类号] R2-0;R289;R541.7 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)17-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201736

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200630.1138.001.html>

[网络出版日期] 2020-6-30 13:50

Based on PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway to Explore Mechanism of Zhigancao Tang Against MIRI-induced Ventricular Tachycardia and Ventricular Fibrillation in Rats

ZHENG Xu-ying, MA Chun-jie*, CHEN Yong-zhen, REN Cun-xia, NIU Ren-xiu, LIAN Hua,
CHEN Kun, TAN Xiao-hui, YAN Qing-zhi, ZHANG Xing, WU Hao
(Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

[Abstract] **Objective:** Through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian rapamycin target protein (mTOR) signaling pathway, explore the effect of Zhigancao Tang on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) The role and mechanism of arrhythmia (ventricular tachycardia

[收稿日期] 20191121(017)

[基金项目] 内蒙古自然科学基金项目(2017MS0801)

[第一作者] 郑旭颖, 硕士, 医师, 从事中医临床工作, E-mail: 71629618@qq.com

[通信作者] * 麻春杰, 博士, 教授, 从事中蒙医药防治心脑血管与脾胃病研究, E-mail: 13514819729@163.com

and ventricular fibrillation). **Method:** The 72 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Zhigancao Tang low, medium and high dose group (11.43, 22.86, 45.72 g·kg⁻¹), Wenxin granule group (2.43 g·kg⁻¹), continuous drug intervention for 10 days. Two hours after the last administration, the MIRI model of rat was prepared by ligating the left anterior descending coronary artery, and the changes of electrocardiogram were recorded. After successful modeling, blood and heart tissue were collected to detect the content of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum, the enzyme-linked immunoassay (ELISA) method was used to detect cardiac troponin (CtnI) content, immunohistochemical detection of myocardial PI3K, Akt, mTOR expression. Western blot was used to detect the myocardial autophagy-related protein microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC-3), autophagy markers Beclin1 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related protein expression and phosphorylated p-PI3K, p-Akt, p-mTOR levels. **Result:** In model group, 100% of ventricular tachycardia and 91.67% of ventricular fibrillation occurred. Compared with sham operation group, the serum levels of CK, LDH, AST, and CtnI in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), PI3K, Akt, mTOR AOD values in myocardial tissue were significantly increased ($P < 0.01$), the relative expression of the ratio of LC3- II/LC3- I and Beclin1 was significantly increased ($P < 0.01$), p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, the incidence of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation in the high-dose Zhigancao Tang group was significantly reduced ($P < 0.01$), and the duration was the shortest compared with other administration groups ($P < 0.01$), CK, LDH, AST level and CtnI content were significantly reduced ($P < 0.01$), the expression of PI3K, Akt and mTOR of Zhigancao Tang group was significantly decreased with increasing dose ($P < 0.01$), the expression of LC-3 and Beclin1 was accompanied by Zhigancao Tang increase of each dose group of soup had different degrees of decrease ($P < 0.01$), while the expression ratio of PI3K/Akt/mTOR-related protein was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Pretreatment of Zhigancao Tang can reduce the abnormally elevated cardiac enzymes CK, LDH, AST and CtnI, inhibit excessive autophagy of cells, and up-regulate the expression of PI3K, Akt and mTOR, indicating that the anti-MIRI arrhythmia effect of Zhigancao Tang may be related to the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

[Key words] Zhigancao Tang; myocardial ischemia-reperfusion injury; arrhythmia; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian rapamycin target protein (mTOR) signaling pathway

急性心肌梗死严重威胁着人类健康,目前的治疗手段是通过血管再通,实现心肌缺血再灌注,但是心肌缺血再灌注容易造成损伤即出现心律失常、心肌梗死面积增大等问题^[1]。再灌注损伤后发生的心律失常包括室性早搏、室性心动过速和心室纤颤等,在人类最常见的再灌注性心律失常是室性心动过速(VT),而室颤(VF)是缺血再灌注损伤患者死亡的主要原因^[2-3]。因此减轻再灌注损伤、减少心律失常的发生已成为抗心肌梗死的热点问题。由于心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的发病机制错综复杂,很多研究表明MIRI的发生机制与氧自由基增多、钙超载、炎症反应、细胞凋亡及自噬等有关^[4]。其中细胞自噬方面的研究成为近年的热点之一。大量研究表明,传统中医药治疗心肌缺血再灌注损伤致心律失常疗效显著,前景广阔,需进一步深入

探索^[5]。

炙甘草汤出自张仲景所著《伤寒杂病论》,有着极为广泛的临床应用和丰富的科学研究价值,尤其在心脏系统疾病治疗中,对心律失常、病毒性心肌炎、扩张型心肌病、病态窦房结综合征以及冠心病心绞痛等疾病效果明显^[6-7],特别是具有明显的抗心律失常作用^[8]。本实验在课题组研究炙甘草汤的基础上,拟通过观察炙甘草汤预处理后对大鼠MIRI的影响,明确炙甘草汤是否能够预防、减轻MIRI所致心律失常,对心脏起到保护作用,同时探讨其是否通过自噬以及调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路而发挥作用,为临床应用炙甘草汤预防或减少心肌缺血再灌注时心律失常的发生提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠72只,220~240 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(军)2012-0004。所有动物均在室温(23±2)℃,相对湿度50%~60%的实验室内饲养。本实验通过内蒙古医科大学实验动物伦理委员会批准,批号2016-032。

1.2 药物与试剂 炙甘草汤由炙甘草12 g,生姜9 g,桂枝9 g,人参片6 g,生地黄50 g,阿胶6 g,麦冬10 g,麻仁10 g,大枣10枚组成,由内蒙古医科大学附属蒙中医院中药房提供,全部经内蒙古医科大学中医学院中药教研室任常胜教授鉴定为正品。按上述比例将中药材分别倒入蒸馏水中浸泡1 h,武火煎煮至沸腾,然后用文火煎熬1 h,重复2次,把2次的药液合并,加入阿胶烊化,将过滤后的药液分别制备成含生药2.28,1.14,0.57 g·mL⁻¹的煎剂;步长稳心颗粒(山东步长制药股份有限公司,批准文号国药准字Z10950026);肌酸激酶(CK)试剂盒,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒,谷氨酸氨基转氨酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20180216,20180215,20180212);心肌肌钙蛋白(CtnI)试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司,批号201806);自噬标志物Beclin,PI3K,Akt,mTOR,磷酸化蛋白激酶B(p-Akt),磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR), β -actin(Santa Cruz公司,货号分别为sc-48341,sc-71891,sc-135829,sc-517464,sc-293125,sc-293132,sc-7210);PVDF膜(德国Merck Millipore公司)。

1.3 仪器 DG5033A型酶标仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司);BL-420F型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);HX-300S型动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);odyssey CLx型红外激光成像系统(美国LI-COR公司);DYY-8C型电泳仪(北京六一仪器厂);VE-386型蛋白电泳槽及转印槽(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 将72只雄性SD大鼠适应性饲养1周,采用随机数字表法分为假手术组(正常组),MIRI模型组,炙甘草汤低、中、高剂量组,阳性对照稳心颗粒组,每组12只。炙甘草汤低、中、高剂量组按1,2,4倍的成人用药剂量给药^[9],分别予以11.43,22.86,45.72 g·kg⁻¹灌胃,稳心颗粒组给药剂量为2.43 g·kg⁻¹;MIRI模型组和假手术组分别给予等体积蒸馏水。以10 mL·kg⁻¹大鼠体质量灌胃,每日

2次,持续给药10 d,末次给药2 h后紧急制备MIRI模型。各组大鼠在饲养及给药期间,身体灵活,精神状态良好,饮食及大小便均正常;在造模麻醉过程中因大鼠对麻药的不耐受和手术过程中剥离心脏时不慎损伤肺叶等原因导致死亡5只。即模型组2只,炙甘草汤高、中、低剂量组各1只。重新按照上面饲养方法补充。

2.2 大鼠MIRI模型建立及样本采集 参照文献制备模型^[10-11],末次给药2 h后,麻醉大鼠,四肢皮下连接心电图电极,实验全程采用BL-420F型生物机能实验系统记录II导联心电图。进行气管插管,连接动物呼吸机(潮气量30 mL·kg⁻¹,呼吸比1:2,呼吸频率70次/min)。切开大鼠左侧3,4肋骨处皮肤,暴露心脏,分离心包膜,在肺动脉圆锥左缘与左心耳下缘2 mm左右结扎冠状动脉左前降支。以心电图出现ST段抬高和/或T波高耸,缝线远端心外膜发绀为模型成功标志。假手术组只穿线不结扎。结扎30 min后,松线再灌注60 min。再灌注成功标准:抬高的ST段下降>50%,心外膜恢复原有色泽。样本采集:造模成功后,分离大鼠腹主动脉,取血5 mL(再灌注60 min后),提取血清,-20℃冰箱冻存备用;每组随机抽取6只大鼠左心室前壁缺血的心肌组织,剪去左心室前壁部分组织,用于心肌组织病理学的检测,其他部分放入冻存管,经液氮速冻后,移至-80℃冰箱冻存。

2.3 大鼠心电图监测 采用生物实验机能系统记录大鼠心电图,主要监测并记录II导联心电图PR间期,QRS间期以及ST段变化。结扎冠状动脉左前降支,观察II导联心电图结扎30 min,松开后再灌注60 min内VT的发生率及持续时间,VF的发生率及持续时间。

2.4 生化法检测CK,LDH,AST含量 取4 000 r·min⁻¹离心10 min后的血清,参照试剂盒说明书操作,采用全自动生化分析仪测定各组大鼠血清中CK,LDH,AST的含量。

2.5 ELISA检测CtnI的水平 取4 000 r·min⁻¹离心10 min后的血清,用酶标仪检测CtnI的水平,实验过程中严格按照ELISA试剂盒说明书操作。为了增强试剂盒的有效率,试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡15~30 min后方可使用。

2.6 免疫组化检测大鼠心肌PI3K,Akt,mTOR的表达 将固定好的心肌组织进行常规脱水,石蜡包埋,切片,片厚4 μ m。采用SP两步法进行PI3K,Akt,mTOR免疫组化检测。采用Image J图像分析

系统对各组大鼠心肌免疫组化切片行半定量分析。每组随机选取2张切片,每张切片随机选取3个视野,计算PI3K, Akt, mTOR的平均积分吸光度IA。在Olympus bx51显微镜下取细胞核和胞浆棕黄色颗粒作为判断阳性细胞的标准。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Beclin1, LC-3, PI3K, Akt, mTOR, p-PI3K, p-Akt, p-mTOR 蛋白表达 将大鼠心肌组织加液氮研磨后倒入离心管中,加入RIPA裂解液中裂解,放在冰上孵育30 min, 12 000×g离心30 min,取上清液于新的离心管中。BCA试剂盒测定蛋白浓度,将制备好的蛋白样品加入上样孔,电泳分离后转膜,封闭。加入Beclin, LC-3 (1:200), PI3K, Akt, mTOR, p-PI3K, p-Akt, p-mTOR (1:100)一抗以及内参β-actin (1:100)。于4℃孵育过夜,取出后TBST洗膜3次,每次10 min,加入相应二抗(1:1 000),摇床孵育1 h,

TBST洗膜3次,每次5 min,洗膜后显色曝光。使用odyssey CLx型红外激光成像系统计算目的蛋白与内参的条带灰度值比值。

2.8 统计学方法 主要采用SPSS 22.0软件进行数据分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,若数据符合正态分布且方差齐性,两组均数间差异比较采用t检验,多组间差异比较采用单因素方差分析;若不符合正态分布或各组数据方差不齐,则采用秩和检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对MIRI大鼠VT和VF的影响 假手术组大鼠的心电图均正常,未见心律失常的发生;模型组及其他各组的心电图有VT和VF的发生。在模型组中100%发生室速,91.67%发生室颤;与模型组比较,炙甘草汤高剂量组VT, VF的发生率有下降趋势,VT, VF持续时间显著缩短(P<0.01)。见表1。

表1 炙甘草汤对大鼠VT和VF的影响

Table 1 Effect of Zhigancao Tang on VT and VF induced in rats

组别	剂量/g·kg ⁻¹	VT持续时间($\bar{x}\pm s, n=12$)/s	VT发生率/%	VF持续时间($\bar{x}\pm s, n=12$)/s	VF发生率/%
假手术	-	0	0	0	0
模型	-	23.80±2.57 ²⁾	100.00 ²⁾	45.90±10.35 ²⁾	91.67 ²⁾
炙甘草汤	45.72	0.67±0.58 ^{4,6)}	25.00 ⁴⁾	1.00±1.41 ⁴⁾	16.67 ⁴⁾
	22.86	12.78±1.79 ^{4,6)}	83.33	18.13±4.12 ^{4,5)}	83.33 ⁵⁾
	11.43	18.44±2.07 ⁴⁾	91.67	27.63±5.78 ^{4,6)}	83.33 ⁵⁾
稳心颗粒	2.43	17.60±2.19 ²⁾	41.67 ²⁾	24.33±6.09 ²⁾	50.00

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01;与炙甘草汤高剂量比较⁵⁾P<0.05, ⁶⁾P<0.01(表2~4同)。

3.2 对MIRI大鼠再灌注60 min时血清中CK, LDH, AST水平及CtnI浓度的影响 与假手术组比较,模型组血清中的CK, LDH, AST的含量及CtnI含量明显升高(P<0.01);与模型组比较,炙甘草汤高

剂量组和稳心颗粒组血清中的CK, LDH, AST含量及CtnI均显著降低(P<0.01)。炙甘草汤高、中、低剂量组之间的作用效果以高剂量组较为明显(P<0.01),且高剂量效果优于稳心颗粒组P<0.05。见表2。

表2 炙甘草汤对MIRI大鼠血清中CK, LDH, AST, 含量及CtnI含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Zhigancao Tang on CK, LDH and AST in serum of MIRI rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CK/U·mL ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	CtnI/ng·L ⁻¹
假手术	-	0.96±0.11	4 909.00±615.45	118.67±9.79	226.33±16.81
模型	-	2.83±0.56 ²⁾	8 473.53±1 047.76 ²⁾	221.33±28.08 ²⁾	319.36±9.16 ²⁾
炙甘草汤	45.72	1.36±0.15 ⁴⁾	5 341.89±441.11 ⁴⁾	128.63±19.12 ⁴⁾	254.38±2.44 ⁴⁾
	22.86	2.40±0.49 ⁶⁾	7 467.29±530.58 ⁶⁾	195.43±16.62 ⁶⁾	292.13±3.34 ^{4,6)}
	11.43	2.74±0.27 ⁶⁾	7 618.81±1 182.12 ⁶⁾	214.10±28.24 ⁶⁾	305.05±3.62 ^{4,6)}
稳心颗粒	2.43	1.88±0.26 ^{4,5)}	6 413.81±831.58 ^{4,5)}	162.38±19.74 ^{4,5)}	274.16±4.96 ^{4,6)}

3.3 对MIRI大鼠心肌PI3K, Akt, mTOR表达的影响 与假手术组比较,模型组心肌组织中PI3K, Akt, mTOR的表达显著升高(P<0.01);与模型组比

较,炙甘草汤各剂量组和稳心颗粒组PI3K, Akt, mTOR的表达明显下降(P<0.05, P<0.01);炙甘草汤高剂量组PI3K, Akt, mTOR的表达降低最明显,表

明炙甘草汤高剂量组在降低心肌细胞 PI3K, Akt, mTOR 的阳性表达上有一定优势。见图 1~3。

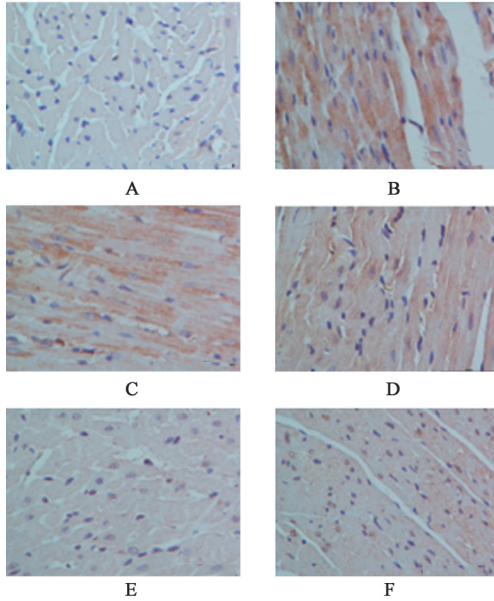


图 1 炙甘草汤对 MIRI 大鼠心肌 PI3K 表达的影响 (免疫组化, ×400)

A. 假手术组; B. 模型组; C. 炙甘草汤低剂量组; D. 炙甘草汤中剂量组; E. 炙甘草汤高剂量组; F. 稳心颗粒组 (图 2~5 同)

图 1 炙甘草汤对 MIRI 大鼠心肌 PI3K 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Zhigancao Tang on PI3K expression in myocardium of MIRI rats (IHC, ×400)

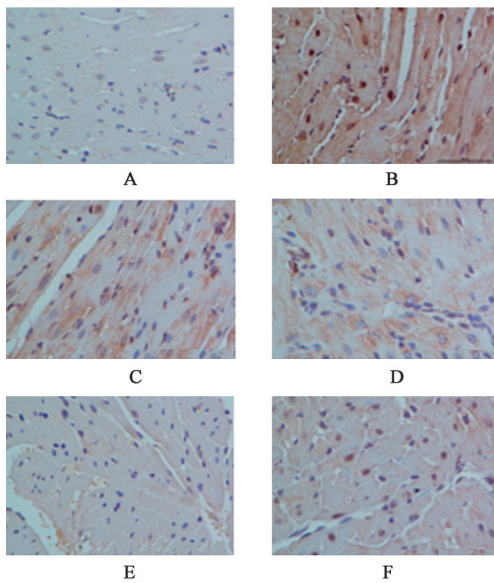


图 2 炙甘草汤对 MIRI 大鼠心肌 Akt 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Zhigancao Tang on myocardial Akt expression in MIRI rats (IHC, ×400)

3.4 对 MIRI 大鼠心肌 LC-3, Beclin1 蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组 LC3- II /LC3- I 与 Beclin1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$); 表明在 MIRI 时引起了细胞的过度自噬。与模型组比较, 炙

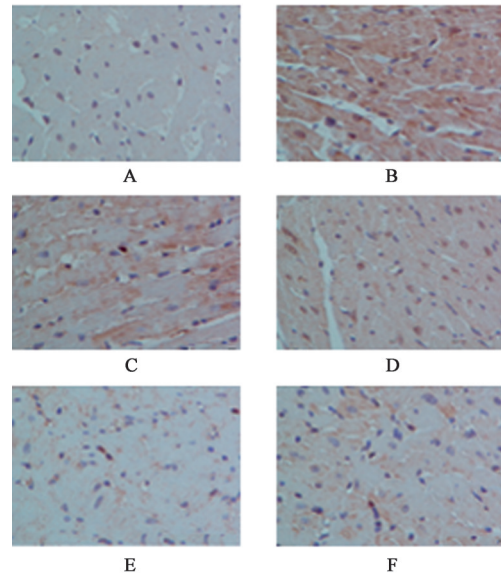


图 3 炙甘草汤对 MIRI 大鼠心肌 mTOR 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Zhigancao Tang on expression of myocardial mTOR in MIRI rats (IHC, ×400)

甘草汤各剂量组和稳心颗粒组 LC3- II /LC3- I 与 Beclin1 的蛋白表达均有所下降, 其中炙甘草汤高剂量显著降低 ($P < 0.01$), 表明炙甘草汤高剂量组对 MIRI 的过度自噬有抑制作用。见图 4, 表 3。

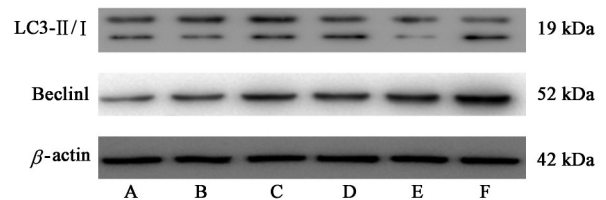


图 4 MIRI 大鼠心肌组织 LC3 和 Beclin1 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Zhigancao Tang on expression of LC3 and Beclin1 in MIRI rat myocardium

表 3 炙甘草汤对大鼠心肌 LC3 和 Beclin1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Effect of Zhigancao Tang on expression of LC3 and Beclin1 in rat myocardium ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	LC3- II /LC3- I	Beclin1/ β -actin
假手术	-	1.48±0.05	0.32±0.10
模型	-	3.39±0.21 ²⁾	0.83±0.14 ²⁾
炙甘草汤	45.72	1.65±0.20 ⁴⁾	0.37±0.11 ⁴⁾
	22.86	3.17±0.11 ⁶⁾	0.69±0.12 ⁶⁾
	11.43	3.23±0.15 ⁶⁾	0.81±0.14 ⁶⁾
稳心颗粒	2.43	2.43±0.19 ⁴⁾	0.54±0.10 ⁴⁾

3.5 对 MIRI 大鼠心肌 PI3K, Akt, mTOR 信号通路及磷酸化相关蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR 显

著降低 ($P < 0.01$), 表明 MIRI 发生时抑制 PI3K, Akt, mTOR 蛋白的磷酸化; 与模型组比较, 炙甘草汤各给药组和稳心颗粒组的 PI3K, Akt, mTOR 蛋

白的磷酸化随着剂量的增加有不同程度地升高, 其中炙甘草汤高剂量组升高明显 ($P < 0.01$)。见表 4, 图 5。

表 4 炙甘草汤对大鼠心肌 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, P-mTOR/mTOR 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Zhigancao Tang on expression of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR in rat myocardium ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-mTOR/mTOR
假手术	-	1.56±0.13	1.62±0.09	2.66±0.22
模型	-	0.70±0.08 ¹⁾	0.52±0.08 ¹⁾	0.57±0.10 ¹⁾
炙甘草汤	45.72	1.42±0.11 ⁴⁾	1.49±0.13 ⁴⁾	2.44±0.16 ⁴⁾
	22.86	1.20±0.13 ^{4,6)}	1.20±0.09 ^{4,6)}	1.10±0.07 ^{4,6)}
	11.43	0.90±0.07 ^{4,6)}	0.60±0.07 ^{3,6)}	1.10±0.07 ^{4,6)}
稳心颗粒	2.43	1.29±0.12 ^{4,5)}	1.27±0.07 ^{3,6)}	1.93±0.14 ^{4,6)}

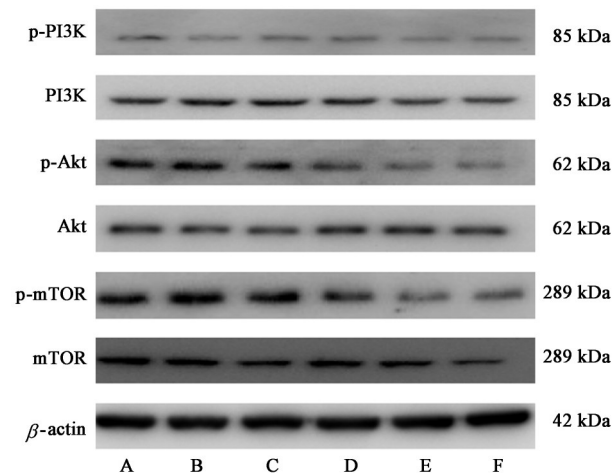


图 5 MIRI 大鼠心肌组织 PI3K, Akt, mTOR, p-PI3K, p-Akt, P-mTOR 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of PI3K, Akt, mTOR, p-PI3K, p-Akt, p-mTOR protein expression in myocardium of MIRI rats

4 讨论

随着社会经济的发展, 国民生活方式发生了深刻的变化, 尤其是人口老龄化及城镇化进程的加速, 中国心血管疾病危险因素流行趋势明显, 导致了心血管病的患病人数持续增加。心血管病患者的数量将在未来 10 年继续快速增长^[12]。因此, 需要寻求安全、高效的药物来控制心脑血管患者数量的增长。中医中药经过了千百年实践积累, 对中华民族和世界的生存和繁衍作出了巨大的贡献; 现在中医药及其文化在我们生活中也发挥着重要的作用。其中以副作用小、安全、高效得到人们越来越多的重视。

炙甘草补气健脾, 复脉益心, 生地黄滋阴补血, 两者重用, 共为君药, 益气养血以复脉。人参片、大枣益心气, 补脾气, 以资气血生化之源, 生地黄、麦冬、阿胶、麻仁养心血、滋心阴, 以充血脉, 共为臣

药; 佐以桂枝振奋心阳, 生姜温通血脉; 药用清酒煎服, 可增强诸药通经络、利血脉的作用, 为使药。诸药合用, 滋而不腻, 温而不燥, 使气血充足, 阴阳调和, 则心动悸、脉结代, 皆得其平。本实验以稳心颗粒为阳性对照组, 组方为党参、黄精、甘松、三七、琥珀五味中药, 具有定悸复脉、宁心安神、益气养阴、活血化瘀、抗心律失常等作用^[13]。其中炙甘草汤是临床常用的传统经典方剂, 因效果显著, 作用稳定、无明显毒副作用等特点, 被广泛应用于心律失常的治疗^[14]。炙甘草汤又名复脉汤, 是气血双补、阴阳同调之剂, 作为“脉结代, 心动悸”的主方, 运用于冠心病、心律失常等心血管疾病^[15]。有的学者通过动物实验证实, 炙甘草汤能通过清除体内活性氧, 减少膜脂质过氧化, 增强左心室的功能, 从而保护 MIRI^[16]。并且曾晓会等^[17]研究发现稳心颗粒可能通过保持缺血-再灌注心肌细胞膜稳定性、改善缺血心肌能量代谢障碍来发挥其抗心律失常作用, 表明稳心颗粒对 MIRI 致心律失常具有一定的防治作用。

心肌缺血再灌注损伤导致心肌细胞内的 AST, LDH, CK 等酶漏出并释放入血, 故心肌受损程度与血清中心肌酶含量多少呈正相关^[18]。心律失常的发生与 CtnI 的水平变化有关, 当心肌细胞膜受损时, CtnI 会大量释放, 其水平显著升高^[19]。本实验显示, 在再灌注 60 min 时, 模型组中 CK, LDH, AST, CtnI 的含量明显高于假手术组, 表明在发生 MIRI 时会造成心肌损伤, 发生心律失常, 而炙甘草汤各给药组血清中 CK, LDH, AST, CtnI 含量与模型组相比显著降低。因此可见, 炙甘草汤可减轻心肌细胞的损伤, 对大鼠的 MIRI 起到预防、保护作用。

自噬的调节被认为与心血管系统疾病相关, 研

究表明自噬现象在MIRI中有重要作用^[20]。LC3是自噬常用检测分子,主要分为I型和II型。I型为常规表达,II型用于自噬水平的检测,LC3-II蛋白的表达及LC3-II/LC3-I为反映整个自噬水平的重要标志,其具体表现为LC3-II/LC3-I上升,自噬活性会相应提升^[21-22]。Beclin1既是调控自噬的关键因子之一,又是自噬重要基因表达蛋白之一^[23],在自噬发生进程中起正调控的作用^[24-25]。

自噬的调节还涉及了多条通路^[26],mTOR信号通路是调节自噬最重要的一条通路,mTOR上游会涉及到PI3K/Akt信号通路^[27]。当PI3k的活性被启动后,能够启动并上调Akt磷酸化水平。Akt则通过磷酸化作用启动其下游靶蛋白mTOR^[28-29]。mTOR是PI3K/Akt信号传导必要的下游,保护心脏免受I/R的损伤^[30]。Akt和mTOR的上游激酶是PI3K,2种蛋白的磷酸化形式反映了该信号通路的活性,通过适当的干预使PI3K/Akt/mTOR信号通路被启动,起到对心肌MIRI的保护作用^[31]。mTOR与自噬的诱导关系密切^[32],在缺血期,mTOR被抑制使细胞存活;再灌注期mTOR被启动防止过度自噬。通过降低Beclin1,LC3-II/LC3-I的表达,抑制心肌细胞的自噬,达到对MIRI的保护作用。上调PI3K的表达,从而使Akt和mTOR的磷酸化进一步上调,抑制心肌细胞的过度自噬,达到对MIRI保护作用的目的^[33]。实验结果显示,在MIRI时引起了细胞的过度自噬,给予炙甘草汤后能使LC3-II/LC3-I与Beclin1的相对表达量显著降低,表明炙甘草汤能够有效抑制MIRI的过度自噬。同时本研究免疫组化检测PI3K,Akt,mTOR表达的结果表明,与模型组相比,炙甘草汤各给药组的阳性表达明显降低,起到了对MIRI的保护作用。同时Western blot检测结果也显示,模型组的Beclin1,LC3-II/LC3-I的表达量显著高于假手术组,炙甘草汤各剂量组比模型组Beclin1,LC3-II/LC3-I的表达量显著降低。通过观察心电图,发现MIRI导致的大鼠心律失常主要是室速和室颤的两种类型,在发生MIRI时,心肌细胞Beclin1的表达量LC3-II/LC3-I降低及信号通路PI3K/Akt/mTOR的表达降低,室速和室颤的发生率及持续时间也明显减少,表明了炙甘草汤能够上调大鼠心肌内PI3K蛋白的表达,而且对Akt以及mTOR的磷酸化水平起正向调节作用;同时还能够使PI3K,Akt以及mTOR基因转录水平显著升高,抑制心肌细胞的过度自噬,保护心肌细胞,减少心律失常的发生。

综上所述,炙甘草汤能够预防或减轻MIRI导致的心律失常,特别是室速和室颤的发生。其中炙甘草汤高剂量组室速和室颤的发生率及持续时间也明显减少,也使血清中的CK,LDH,AST,CtnI含量降低较稳心颗粒组更为明显。同时炙甘草汤高剂量组能够有效抑制细胞的过度自噬。其作用机制可能是通过自噬以及调控PI3K/Akt/mTOR信号通路而发挥作用,为临床应用炙甘草汤防治MIRI所致心律失常提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 李海艳,迟艳飞.远志皂苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤及高迁移率族蛋白B1表达的影响[J].中成药,2019,41(5):1165-1168.
- [2] GOLDBERG S, GREENSPON A J, UTHAN P L, et al. Reperfusion arrhythmia: a marker of restoration of antegrade flow during intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction [J]. Am Heart J, 2013, 105(1):26-32.
- [3] TZIVONIID, KEREN A, GRANOT H, et al. Ventricular fibrillation caused by myocardial reperfusion in Prinzmetal's angina [J]. Am Heart J, 2014, 105(1):26-32.
- [4] TURER A T, HILL J A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. Am J Cardiol, 2010, 106(3):360-368.
- [5] 李冀,王秀珍,李在斯.中药治疗心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J].中医药学报,2015,43(2):107-109.
- [6] 乔丹,周亚滨.炙甘草汤在心系疾病中的临床应用[J].中国中医急症,2017,26(10):1775-1776.
- [7] 王进,杨晓艳,王晓东.炙甘草汤治疗冠心病不稳定型心绞痛临床疗效观察[J].湖北中医药大学学报,2017,19(6):67-69.
- [8] 郑旭颖,麻春杰.炙甘草汤治疗心律失常的研究进展[J].现代中医药,2018,38(4):119-121.
- [9] 谢秀琼.中药新制剂开发与应用[M].2版.北京:人民卫生出版社,2002:412.
- [10] 李明,鲁卫星,崔现军,等.提高大鼠心肌缺血再灌注损伤模型成功率的方法探析[J].辽宁中医杂志,2010,37(9):1699-1700.
- [11] 李延珍,李忠辉,李良,等.银杏二萜内酯葡胺注射液对心肌缺血再灌注所致心律失常模型大鼠的影响[J].中国中医急症,2018,27(10):1761-1764.
- [12] 罗成贵,刘伟.炙甘草汤[M].北京:中国医药科技出版社,2013.
- [13] 郭力,李彧,赵福建,等.稳心颗粒抗实验性大鼠心律失常作用的研究[J].北京中医药大学学报,2013,36

- (7):472-475.
- [14] 刘硕年. 炙甘草汤治疗心律失常综述[J]. 中国中医药远程教育, 2012, 10(1): 160-162.
- [15] 白蓝邴, 刘莉, 刘渊. 炙甘草汤对心血管系统作用的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2013, (1): 126-127.
- [16] 袁杰. 炙甘草汤对大鼠在体心肌缺血-再灌注损伤后左心功能及抗氧化酶的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 411-412.
- [17] 曾晓会, 周瑞玲, 陈玉兴, 等. 步长稳心颗粒对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响[J]. 临床心血管病杂志, 2006, 22(12): 742-743.
- [18] QUAN W, YIN Y, XI M, et al. Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(1): 85-91.
- [19] 张俊杰. 稳心颗粒治疗老年慢性心律失常的疗效及对血清 cTnI、BNP、NF- κ B、CysC 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 7(15): 1743-1745.
- [20] CAO D J, GILLETTE T G, HILL J A. Cardiomyocyte autophagy: remodeling, repairing, and reconstructing the heart [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2009, 11 (6) : 406-411.
- [21] 王智华, 田首元, 王建刚, 等. 自噬及 PI3K、Akt 通路在舒芬太尼后处理心肌缺血再灌注损伤保护中的作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(4) : 415-418.
- [22] 谭成富, 王超, 杜琳, 等. 电针、艾灸预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌自噬相关蛋白 LC3、Beclin1 表达的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(1): 1-7.
- [23] 刘斌, 孙静, 张晋霞, 等. 自噬及自噬相关蛋白在帕金森病模型大鼠黑质纹状体中的表达及意义[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2014, 21(3): 187-191.
- [24] LIRA V A, OKUSTSU M, ZHANG M, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance [J]. *Faseb J*, 2013, 27(10) : 4184-4193.
- [25] 刘宇, 赵雅宁, 刘孜卓, 等. LC3-II 和 Beclin1 在糖尿病缺血后处理大鼠海马 CA1 区表达及意义[J]. 医学研究生报, 2016, 29(1): 46-51.
- [26] 张升, 吴友苹, 顾利强, 等. 细胞自噬进程的分子信号通路研究进展[J]. 生命的化学, 2018, 38(2): 213-223.
- [27] 孙晓伟, 高营, 王新宇, 等. 针刺对脑缺血再灌注损伤神经细胞自噬影响的研究概况 [J]. 中医药信息, 2019, 36(2): 122-126.
- [28] SONG G, OUYANG G, BAO S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(1): 59-71.
- [29] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K-Akt 信号通路 with 肿瘤细胞凋亡关系的研究进展 [J]. 癌症, 2008, 27(3) : 331-336.
- [30] AOYAGI T, KUSAKARI Y, XIAO C Y, et al. Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart C*, 2012, 303 (1) : H75-85.
- [31] CARROLL B, DUNLOP E A. The lysosome: a crucial hub for AMPK and m TORC1 signalling [J]. *Biochem J*, 2017, 474(9): 1453-1466.
- [32] ZHANG J, WANG C, YU S, et al. Sevoflurane postconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(4): 7317-7328.
- [33] 闫清支, 麻春杰, 郝蔷薇, 等. 蒙药额尔敦乌日勒预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织自噬相关蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(4): 333-338.

[责任编辑 孙丛丛]