

阿卡地新对体外循环心肌缺血再灌注损伤模型犬心肌能量代谢的影响^Δ

张登沈^{1*}, 梁贵友^{1#}, 刘达兴¹, 张 建¹, 王 峰¹, 刘晓晨²(1.遵义医学院附属医院心血管外科, 贵州 遵义 563000; 2.新乡医学院第一附属医院心血管外科, 河南 新乡 453100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3918-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.09

摘要 目的:探讨阿卡地新对体外循环(CPB)心肌缺血再灌注损伤(MIRI)模型犬心肌能量代谢的影响。方法:将犬随机分为对照组、模型组和阿卡地新低、高剂量组(0.8、3.2 mg/kg),每组6只。所有犬行CPB术,除对照组外,其余各组犬建立MIRI模型,并于主动脉阻断60 min后灌注含相应药物的St.Thomas心脏停搏液。分别于转流前和再灌注15、60、90 min时检测并计算心肌葡萄糖和游离脂肪酸(FFA)摄取率、静脉窦血浆中肌酸激酶同工酶(CK-MB)含量、线粒体中三磷酸腺苷(ATP)含量;分析左心室收缩压(LVSP)和左心室舒张末期压(LVEDP);检测心肌组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK) mRNA表达和磷酸化AMPK(p-AMPK)蛋白表达。结果:各组犬转流前的所有指标差异均无统计学意义($P>0.05$);转流后,与对照组比较,模型组和各给药组犬3个时间点的心肌葡萄糖摄取率、FAA摄取率、ATP含量、AMPK mRNA表达、p-AMPK蛋白表达和LVSP均明显降低($P<0.05$),LVEDP和血浆中CK-MB含量均明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,各给药组犬3个时间点的心肌葡萄糖摄取率、FAA摄取率、ATP含量、AMPK mRNA表达、p-AMPK蛋白表达和LVSP均明显升高($P<0.05$),LVEDP和血浆中CK-MB含量均明显降低($P<0.05$),其中高剂量组较低剂量组变化更明显($P<0.05$)。结论:阿卡地新可促进AMPK磷酸化,有助于心肌葡萄糖和FFA的摄取,促使心肌线粒体中ATP增加,有助于减轻CPB术后MIRI。

关键词 阿卡地新;体外循环;犬;心肌缺血再灌注损伤;心肌能量代谢

ig 给药后大鼠对HB0314的吸收效果较理想。这提示在后期经过制剂设计研究,可以考虑将该药物制成口服剂。

参考文献

- [1] Pericolini E, Alunno A, Gabrielli E, *et al.* The microbial capsular polysaccharide galactoxylomannan inhibits IL-17A production in circulating T cells from rheumatoid arthritis patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53336.
- [2] 范鸣. 抗风湿性关节炎药Tofacitinib[J]. *药学进展*, 2011, 35(10):480.
- [3] Zerbini CA, Lomonte AB. Tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2012, 8(4):319-331.
- [4] Chaparro DMR, Rillo OL, Casalla L. Work productivity in rheumatoid arthritis: relationship with clinical and radiological features[J]. *Arthritis*, 2012, 2012(6):1-7.
- [5] 张群, 王竞秋. 类风湿性关节炎发病机制与临床治疗的研究进展[J]. *内蒙古中医药*, 2013, 32(21):148-149.
- [6] 王澳轩, 刘冰妮, 刘颖, 等. 抑制JAK3激酶的免疫抑制剂

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560058、81360035);贵州省科技计划项目(No.黔科合SZ字[2014]3022号);贵州省科技合作计划项目(No.黔科合LH字[2015]7507号)

* 主治医师, 硕士。研究方向:心肌缺血再灌注损伤。E-mail: 540229523@qq.com

通信作者:教授, 博士, 博士生导师。研究方向:心肌缺血再灌注损伤。E-mail: guiyou515@163.com

托法替尼[J]. *药物评价研究*, 2014, 30(2):169-172.

- [7] 胡若飞, 徐跃洋, 张二利, 等. 酪氨酸蛋白激酶JAK3抑制剂研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(9):1017-1023.
- [8] 杨智, 张生龙. JAK3抑制剂托法替尼治疗类风湿关节炎研究进展[J]. *国际骨科学杂志*, 2013, 34(5):326-328.
- [9] 王士伟, 谭初兵, 徐为人. 新型类风湿关节炎治疗药物托法替尼[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(14):1607-1609.
- [10] 李敬来, 崔梦珂, 张振清, 等. 药物代谢动力学在药物研发中的意义及作用[J]. *解放军药学报*, 2010, 26(3):258-261.
- [11] 李燕. 先导物药代特性评价与新药开发[M]. 北京:科学出版社, 2004:164-169.
- [12] 高坤, 陈凤菊, 孙进, 等. 高效液相色谱-质谱联用法测定大鼠血浆中多西他赛的含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(6):462-466.
- [13] 周于禄, 曾嵘, 裴奇, 等. 金银花提取物中绿原酸在大鼠体内药代动力学和生物利用度的研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(3):164-167.
- [14] 李灵, 陈晓辉, 毕开顺, 等. LC-MS/MS法测定大鼠体内多西他赛血药浓度及其药代动力学研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(5):398-401.
- [15] 张立康, 汪小珍, 李婉姝, 等. 姜黄素在大鼠体内药代动力学和生物利用度研究[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(10):1458-1462.

(收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-07-30)

(编辑:刘明伟)

Effects of Acadesine on Myocardial Energy Metabolism of Model Dogs with Myocardial Ischemia-reperfusion Injury after Cardiopulmonary Bypass

ZHANG Dengshen¹, LIANG Guiyou¹, LIU Daxing¹, ZHANG Jian¹, WANG Feng¹, LIU Xiaochen² (1. Dept. of Cardiovascular Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China; 2. Dept. of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Xinxiang 453100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effects of acadesine on myocardial energy metabolism of model dogs with myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) after cardiopulmonary bypass (CPB). **METHODS:** Dogs were randomly divided into control group, model group, acadesine low-dose, high-dose groups (0.8, 3.2 mg/kg), 6 in each group. All dogs received CPB. Except for control group, dogs in other groups were reduced for MIRI model, and perfused St. Thomas cardiac cardioplegia lipid containing relevant drugs 60 min after main artery block. The uptake rates of myocardial glucose and free fatty acid (FFA), creatine kinase isoenzyme (CK-MB) content in venous sinus plasma and adenosine triphosphate (ATP) content in mitochondria were detected and calculated before bypass and after 15, 60, 90 min of reperfusion. Left ventricular systolic pressure (LVSP) and left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) were analyzed, and mRNA expression of adenylate-activated protein kinase (AMPK) and protein expression of phosphorylated AMPK (p-AMPK) in myocardial tissue were detected. **RESULTS:** Before bypass, all indexes in each group had no statistic significances ($P > 0.05$). After bypass, compared with control group, uptake rates of myocardial glucose and FAA, ATP content, mRNA expression of AMPK and protein expression of p-AMPK and LVSP in 3 time points in model group and each administration group were obviously decreased ($P < 0.05$); LVEDP and CK-MB content in plasma were obviously increased ($P < 0.05$). Compared with model group, uptake rates of myocardial glucose and FAA, ATP content, mRNA expression of AMPK and protein expression of p-AMPK and LVSP in 3 time points in each administration group were obviously increased ($P < 0.05$); LVEDP and CK-MB content in plasma were obviously decreased ($P < 0.05$); and high-dose group showed more obvious change than that of low-dose group ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Acadesine can promote the AMPK phosphorylation, contribute to the myocardial glucose and FFA uptake to promote the increase of ATP in myocardial mitochondria and relieve MIRI after CPB.

KEYWORDS Acadesine; Cardiopulmonary bypass; Dogs; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Myocardial energy metabolism

心肌缺血再灌注损伤(Myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)是构成临床体外循环(Cardiopulmonary bypass, CPB)心脏手术、经皮腔内冠状动脉血管成形术、心绞痛及急性心肌梗死早期再灌注心功能障碍的主要原因^[1-2]。越来越多的研究显示,能量代谢紊乱可能是MIRI发生的基础环节,心肌能量代谢紊乱所涉及合成三磷酸腺苷(Triphosadenine, ATP)数量、质量与途径的改变可能为氧自由基爆发、钙超载、心律失常及细胞凋亡等的发生创造条件,从而加重甚至介导MIRI的形成^[3]。围绕体外循环MIRI心肌代谢紊乱,国内外学者做了大量的研究,并取得显著进展,但目前临床上仍缺乏理想的药物治疗。因此,进一步研究MIRI心肌代谢障碍防治药物的意义重大。阿卡地新(AICAR)化学名称为5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸,属于人体内源性物质,参与机体糖原、脂肪、蛋白质的合成与分解,维持机体能量代谢的稳态,因其可以活化腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)而备受关注。AMPK为机体能量感受器,在维持细胞能量稳态中扮演重要角色,有研究报道其还具有防治机体代谢紊乱、肥胖、2型糖尿病等作用^[4]。移植手术过程中,阿卡地新用于预防再灌注损伤已进入Ⅲ期临床试验^[5]。阿卡地新还可以增加运动能力,将其归类为代谢调节剂,因其副作用少,且能激活机体能量通路,具有较好的临床运用前景^[6]。本研究建立CPB MIRI模型

犬,于心脏停搏液中加入阿卡地新给药,观察阿卡地新对模型犬心肌能量代谢的影响,以探讨其可能作用机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

RY- II B型麻醉工作站(江苏凯泰医疗设备有限公司);WEL-1000型人工心肺机(天津江康医用设备有限公司);BL-420E型四道生理记录仪(澳大利亚AD Instrument公司);AU-2700型生化分析仪、AU5400全自动生化分析仪(日本Olympus公司);Leica QWin V3型拍片系统(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

阿卡地新对照品(上海碧云天生物技术有限公司,批号:S1516,纯度:98%);戊巴比妥钠(美国Sigma公司,批号:69020100,规格:25 g,纯度:99.3%);兔源AMPK磷酸化(p-AMPK)多克隆抗体(武汉博士德工程有限公司);GTVision™ III抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(上海基因科技有限公司);实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒及AMPK引物设计与合成(大连宝生物工程有限公司);Trizol试剂盒(大连TaKaRa生物工程公司)。

1.3 动物

健康杂种实验犬24只,8~12月龄,♀♂不限,体质

量为(10.16±2.12) kg,由遵义医学院动物实验中心提供,使用许可证号为SYXK(黔)-2011-003。实验所涉及的操作及动物处理符合动物实验伦理审核标准,通过遵义医学院动物伦理委员会允许(No.2015[2-015])。

2 方法

2.1 建模

按前期研究方法,建立CPB术后MIRI模型^[7-8]。犬ip 2.5%戊巴比妥钠25 mg/kg麻醉,犬意识消失后,将其固定于手术台上,气管插管机械通气(潮气量12~15 mL/kg,呼吸频率15次/min),备皮进行体表心电图监测,左股静脉切开建立输液通道。胸部正中切口进胸,“人”型切开心包,悬吊心包,右心房内注射肝素3 mg/kg,依次行左锁骨下动脉、右心耳~下腔静脉双腔静脉管插管,建立体外循环。人工心肺机内以羟乙基淀粉500 mL及复方氯化钠1 000 mL预充,灌注量60 mL/(kg·min),维持平均动脉压(MBp)50~70 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。在心尖部行褥式缝合后,用麻醉常用的动脉穿刺管经心尖插入左心室,收紧,拔出内套,外接BL-420E生物记录仪记录心功能。转流,鼻咽温度降至32℃时阻断升主动脉,经灌注泵向升主动脉根部灌注4℃冷St. Thomas心脏停搏液(平衡液500 mL,10% KCl 7.5 mL,25% MgSO₄ 4 mL,5% NaHCO₃ 20 mL,2%利多卡因200 mg,20%甘露醇15 mL,地塞米松20 mg)100 mL 1次;鼻咽温度降至24℃停止降温,心脏表面置冰屑;待主动脉阻断60 min,复温,鼻咽温度至32℃时开放升主动脉,出现心室纤颤则电击(交流电120 V/s)除颤复跳。

2.2 分组与给药

24条犬随机分为对照组、模型组和阿卡地新低、高剂量组(0.8、3.2 mg/kg),每组6只。阿卡地新给药剂量按预实验结果设计。所有犬行CPB术,除对照组外,其余各组犬建立MIRI模型,并于主动脉阻断60 min前灌注1次含相应药物的St. Thomas心脏停搏液。实验中,意外死亡的犬予以剔除并及时补充,要求4组犬体表面积等资料差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 标本采集

分别在主动脉阻断前(CPB转流前)、阻断60 min后重新开放主动脉(再灌注)15、60、90 min时,取各组犬冠状静脉窦血标本4 mL,分离血清用于检测静脉血浆葡萄糖、游离脂肪酸(FFA)浓度;取颈动脉血标本2 mL,分离血清用于检测动脉血浆葡萄糖、FFA浓度。取左心室心尖部的大小约为0.2 cm×0.2 cm的心肌组织(需避开冠状动脉及其分支小血管),以生理盐水冲洗2~3次,分成一大一小两部分。小的部分剪碎放入去酶细胞冻存管(预先加Trizol液1 mL)中,保存至-80℃低温冰柜中;大的部分在室温下用10%甲醛固定,石蜡固定(72 h内),用于免疫组织化学法检测。

2.4 心肌代谢指标的检测

通过AU2700全自动生化分析仪采用氧化酶法检测血浆中葡萄糖浓度;AU5400全自动生化分析仪采用比色法检测血浆中FFA、肌酸激酶同工酶(CK-MB)含量;计算心肌葡萄糖与FFA摄取率,心肌葡萄糖摄取率(%)=(动脉血糖浓度-冠状静脉窦血糖浓度)/动脉血糖浓度×100%,心肌FFA摄取率(%)=(动脉FFA浓度-冠状静脉窦FFA浓度)/动脉FFA浓度×100%。剪取左心室心尖部位组织0.5 g,加入5 mL 4℃分离介质[210 mmol/L甘露醇,70 mmol/L蔗糖,5 mmol/L羟乙基哌嗪乙硫磺酸(Hepes),1 mmol/L乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA),0.1%牛血清白蛋白(BSA),KOH调节pH至7.4]中匀浆,差速离心(4℃800×g离心10 min取上清,10 000×g离心10 min弃上清),留沉淀,加入2 mL 4℃分离介质悬浮沉淀,再次10 000×g离心10 min取沉淀。该沉淀即为纯化的线粒体。沉淀用2 mL分离介质悬浮保存,采用高效液相色谱法^[9]检测三磷酸腺苷(ATP)含量。

2.5 心功能相关指标检测

通过BL-420E生物信号系统予左室内压波形自动分析,测定左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末期压(LVEDP)。

2.6 RT-PCR检测心肌组织AMPK mRNA的表达

取保存-80℃冰柜内Trizol液1 mL心肌组织,按Trizol试剂盒提取总RNA,反转录获得cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增。GeneBank查出引物序列,犬为其种属来源,引物由大连宝生物工程有限公司设计与合成。AMPK上游引物:5'-ACCAGCTTGCAGTGGCTTAT-3',下游引物:5'-CATCTCGCTTTAGGGCTGTC-3',片段长度:193 bp;β-肌动蛋白(β-actin)上游引物:5'-TG-GCCGAGGACTTTGATTG-3',下游引物:5'-AACGG-GGTGGCTTTTGG-3',片段长度:186 bp。按照RT-PCR试剂盒说明书配制PCR反应体系,扩增条件:95℃预变性3 min,95℃变性5 s,57℃退火30 s,40个循环后再延伸10 min。结果分析采用相对定量法(2^{-ΔΔC_t}法),以目的基因与内参基因β-actin表达的比值评价目的基因的相对表达量。

2.7 免疫组化法检测心肌组织中p-AMPK蛋白表达

左心室心尖部心肌组织10%甲醛固定,72 h内常制作成石蜡切片,4℃保存,常规脱蜡,常规梯度乙醇水化,抗原(6 min×2次)修复,6%血清封闭60 min;滴加兔源p-AMPK多克隆抗体(1:100)50 μL,4℃冰箱过夜(18 h);滴加二抗(1:100)50 μL,37℃温箱放置1 h;加入二氨基联苯胺(DAB)显色。光镜下观察,细胞核及细胞质或者细胞膜为黄色、黄褐色或棕褐色即是p-AMPK阳性显色。在显微镜下控制染色时间和程度,水洗,苏木精染色,再水洗、脱水、透明、封固,37℃烘烤30 min。采用Leica QWin V3图像系统拍片,应用IPP 6.0图象分

析系统测定 p-AMPK 蛋白免疫组化的积分光密度(IOD), 将所得结果取平均值作统计。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差比较不同的时间点的数据, 方差齐时, 采用 LSD 方法检验; 方差不齐时, 采用 Games-Howell 方法检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌代谢情况

各组犬转流前的所有指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 转流后, 与对照组比较, 模型组和各给药组犬 3 个时间点的心肌葡萄糖摄取率、FAA 摄取率和 ATP 含量均明显降低 ($P < 0.05$), 血浆中 CK-MB 含量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组犬 3 个时间点的心肌葡萄糖摄取率、FAA 摄取率和 ATP 含量均明显升高 ($P < 0.05$), 血浆中 CK-MB 含量明显降低 ($P < 0.05$), 其中高剂量组较低剂量组变化更明显 ($P < 0.05$)。各组犬心肌葡萄糖摄取率、FAA 摄取率、CK-MB 含量和 ATP 含量的测定结果见表 1。

表 1 各组犬心肌葡萄糖摄取率、FAA 摄取率、CK-MB 含量和 ATP 含量的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 Determination results of uptake rates of myocardial glucose and FAA, CK-MB, ATP content of dogs in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标	组别	转流前	再灌注		
			15 min	60 min	90 min
葡萄糖摄取率, %	对照组	15.97 ± 2.01	16.52 ± 1.67	17.24 ± 1.82	16.37 ± 1.73
	模型组	17.61 ± 1.56	0.57 ± 0.15*	2.05 ± 0.88*	2.86 ± 0.96*
	阿卡地新低剂量组	16.80 ± 2.03	1.45 ± 0.82**	3.12 ± 1.17**	4.32 ± 1.39**
	阿卡地新高剂量组	16.48 ± 1.95	3.27 ± 0.98*** ^Δ	6.47 ± 1.15*** ^Δ	9.15 ± 1.73*** ^Δ
FAA 摄取率, %	对照组	26.12 ± 2.39	25.52 ± 2.55	24.61 ± 2.87	24.39 ± 2.61
	模型组	24.02 ± 2.01	1.29 ± 0.16*	5.82 ± 0.64*	10.81 ± 1.32*
	阿卡地新低剂量组	25.14 ± 2.34	15.34 ± 1.23**	20.21 ± 2.67**	20.54 ± 2.28**
	阿卡地新高剂量组	25.73 ± 2.31	21.62 ± 2.12*** ^Δ	31.92 ± 3.21*** ^Δ	33.33 ± 2.67*** ^Δ
CK-MB, mmol/L	对照组	368.52 ± 44.31	388.34 ± 45.62	390.34 ± 40.28	405.21 ± 46.33
	模型组	392.61 ± 43.27	925.39 ± 102.47* ^Δ	1 023.71 ± 117.48* ^Δ	1 257.64 ± 130.55* ^Δ
	阿卡地新低剂量组	389.65 ± 41.84	725.67 ± 81.24**	834.67 ± 94.61**	889.16 ± 100.73**
	阿卡地新高剂量组	402.37 ± 49.26	534.17 ± 63.89*** ^Δ	579.64 ± 76.31*** ^Δ	625.37 ± 81.25*** ^Δ
ATP 含量, %	对照组	152.32 ± 14.27	153.67 ± 13.47	152.39 ± 12.81	153.25 ± 12.47
	模型组	152.61 ± 12.64	52.64 ± 7.92*	62.38 ± 6.38*	68.61 ± 8.15*
	阿卡地新低剂量组	150.32 ± 13.18	70.19 ± 6.56**	75.64 ± 7.21**	80.26 ± 10.17**
	阿卡地新高剂量组	149.65 ± 15.13	81.25 ± 11.26*** ^Δ	84.64 ± 11.99*** ^Δ	100.27 ± 9.32*** ^Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$; 与阿卡地新低剂量组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$; vs. acadesine low-dose group, ^Δ $P < 0.05$

3.2 心功能情况

各组犬转流前的所有指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 转流后, 与对照组比较, 模型组和各给药组犬 3 个时间点的 LVSP 均明显降低 ($P < 0.05$), LVEDP 均

明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组犬 3 个时间点的 LVSP 均明显升高 ($P < 0.05$), LVEDP 均明显降低 ($P < 0.05$), 其中高剂量组较低剂量组变化更明显 ($P < 0.05$)。各组犬 LVSP、LVEDP 的测定结果见表 2。

表 2 各组犬 LVSP、LVEDP 的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab 2 Determination results of LVSP and LVEDP in plasma of dogs in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标	组别	转流前	再灌注		
			15 min	60 min	90 min
LVSP, mmHg	对照组	145.21 ± 9.24	143.12 ± 7.69	138.82 ± 10.24	139.24 ± 12.31
	模型组	140.10 ± 11.24	50.48 ± 5.72*	55.25 ± 6.19*	65.72 ± 9.55*
	阿卡地新低剂量组	138.92 ± 9.89	72.09 ± 5.14**	80.60 ± 6.71**	90.13 ± 8.18**
	阿卡地新高剂量组	139.75 ± 10.14	81.67 ± 10.95**	92.63 ± 12.66**	114.28 ± 14.99*** ^Δ
LVEDP, mmHg	对照组	5.38 ± 0.72	5.61 ± 0.81	5.37 ± 0.57	5.92 ± 0.64
	模型组	5.47 ± 0.88	40.71 ± 4.89*	32.70 ± 3.82*	28.98 ± 4.38*
	阿卡地新低剂量组	5.77 ± 0.61	35.18 ± 4.19**	26.99 ± 4.29**	19.00 ± 2.50**
	阿卡地新高剂量组	5.87 ± 0.76	26.77 ± 1.83*** ^Δ	20.25 ± 2.67*** ^Δ	15.17 ± 1.80*** ^Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$; 与阿卡地新低剂量组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$; vs. acadesine low-dose group, ^Δ $P < 0.05$

3.3 心肌组织中 AMPK mRNA、p-AMPK 蛋白表达情况

各组犬转流前的所有指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 转流后, 与对照组比较, 模型组和各给药组犬 3 个时间点心肌组织中 AMPK mRNA 表达、p-AMPK 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组犬 3 个时间点心肌组织中 AMPK mRNA 表达、p-AMPK 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.05$), 其中高剂量组较低剂量组变化更明显 ($P < 0.05$)。各组犬心肌组织中 AMPK mRNA、p-AMPK 蛋白表达的测定结果见表 3, AMPK 蛋白表达的免疫组化图见图 1。

表 3 各组犬心肌组织中 AMPK mRNA、p-AMPK 蛋白表达的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 3 Determination results of mRNA expression of AMPK and protein expression of p-AMPK in myocardium of dogs in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标	组别	转流前	再灌注		
			15 min	60 min	90 min
AMPK mRNA	对照组	1.55 ± 0.14	1.59 ± 0.12	1.61 ± 0.17	1.49 ± 0.10
	模型组	1.52 ± 0.15	0.31 ± 0.10*	0.37 ± 0.11*	0.44 ± 0.09*
	阿卡地新低剂量组	1.57 ± 0.21	0.57 ± 0.12**	0.62 ± 0.08**	0.71 ± 0.13**
	阿卡地新高剂量组	1.58 ± 0.14	0.74 ± 0.15*** ^Δ	0.77 ± 0.11*** ^Δ	0.98 ± 0.16*** ^Δ
p-AMPK	对照组	261.27 ± 15.00	257.31 ± 0.12	251.37 ± 17.10	252.88 ± 15.24
	模型组	250.52 ± 15.82	42.36 ± 11.33*	57.50 ± 10.13*	64.62 ± 13.49*
	阿卡地新低剂量组	252.84 ± 15.98	132.34 ± 14.61**	140.67 ± 9.63**	156.54 ± 11.25**
	阿卡地新高剂量组	260.38 ± 12.59	157.02 ± 18.78*** ^Δ	159.30 ± 21.94*** ^Δ	175.95 ± 26.75*** ^Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$; 与阿卡地新低剂量组比较, ^Δ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, ** $P < 0.05$; vs. acadesine low-dose group, ^Δ $P < 0.05$

4 讨论

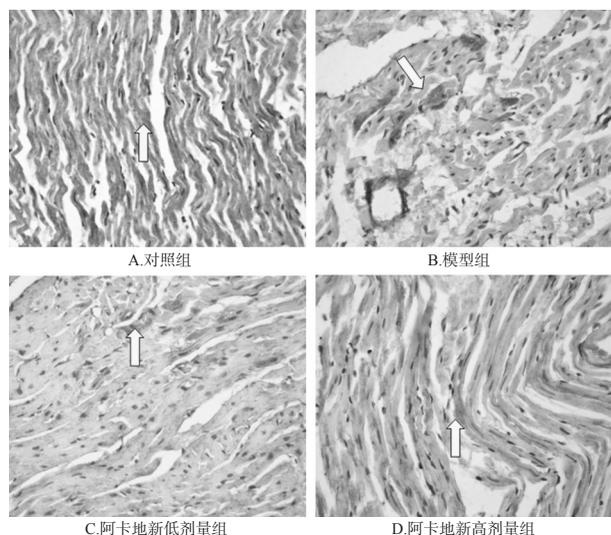


图1 各组犬心肌组织中AMPK蛋白表达的免疫组化图($\times 400$ 倍)

Fig 1 Immunohistochemistry of protein expression of AMPK in myocardium of dogs in each group ($\times 400$)

笔者前期研究表明,CPB缺血再灌注后存在明显的心肌代谢紊乱,FFA和葡萄糖浓度明显升高^[10],提示此时心肌细胞对FFA与葡萄糖的摄取是减少的。然而葡萄糖和FFA是心肌细胞最重要的能量底物,其中60%~70%ATP由FFA氧化代谢产生,另外30%~40%ATP来源于葡萄糖氧化产生。心肌细胞离子转运、心脏收缩与舒张都需要消耗能量,心肌的生理功能依赖于ATP的充足供应。MIRI期间ATP水平是决定心肌细胞发生凋亡的主要因素之一,而心肌细胞凋亡越严重,心功能损伤越严重^[11]。由此可见,MIRI期间能量底物代谢的ATP水平是再灌注心肌功能恢复的主要决定因素^[12]。心肌损伤后,溶酶体破裂,细胞膜受损,一些酶渗漏至外周血,可作为心肌损伤标志物,其中以CK-MB敏感性及其特异性均较高。本实验结果表明,MIRI后15 min,心肌ATP含量减少了65.68%,冠状静脉窦CK-MB含量持续升高,因为CK-MB半衰期长,累积至再灌注90 min仍未减少;与此相对应,LVSP明显升高、LVEDP明显下降,提示CPB心脏收缩功能及心肌损伤严重,并为心肌ATP代谢障碍所致。

AMPK属于丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员,其 α 亚基主要在肌细胞表达,在维持肌细胞能量稳态中具有重要作用。 α 亚单位Thr172位点的磷酸化为AMPK活化必备^[13]。AMPK是细胞能量状态的调节器,其活性受一磷酸腺苷(AMP)/ATP比值调控。当细胞受到任何引起ATP生成减少的应激刺激时,AMPK则被激活,通过抑制能量消耗途径并激活能量生成途径,使细胞中ATP生成增多,维持AMP与ATP的稳态。因为阿卡地新进入细胞后被磷酸化为5-氨基咪唑-4-氨甲酰核(ZMP),ZMP

结构类似于AMP,故可激活AMPK,产生生物学效应^[14]。有研究显示,AMPK作为能量监控器在维持心脏能量代谢稳态及诱导适应性反应中同样发挥了重要作用^[15]。本实验结果表明,在CPB MIRI过程中,在心脏停搏液中加入低剂量的阿卡地新给药,能促进AMPK磷酸化,有助于心肌葡萄糖及FFA的摄取,降低循环中葡萄糖、FFA浓度,促使心肌线粒体合成ATP增加,减轻CPB术后MIRI,进而对心肌起到保护作用。

参考文献

- [1] Dwaich KH, AI-Amran FG, AI-Sheibani BI, *et al.* Melatonin effects on myocardial ischemia-reperfusion injury: impact on the outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 221(1):977-986.
- [2] Xia Z, Li H, Iewin MG, *et al.* Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans[J]. *Br J Anaesth*, 2016, 117(2):44-62.
- [3] Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting malonyl CoA inhibition of mitochondrial fatty acid uptake as an approach to treat cardiac ischemia/reperfusion[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(2):203-210.
- [4] Jeyabalan J, Shah M, Viollet B, *et al.* AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism[J]. *J Endocrinol*, 2012, 212(3):277-290.
- [5] Newman MF, Ferguson TB, White JA, *et al.* Effect of adenosine-regulating agent acadesine on morbidity and mortality associated with coronary artery bypass grafting: the RED-CABG randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2012, 308(2):157-164.
- [6] 洪宇,徐友宣.阿卡地新(AICAR)的LC-MS/MS检测方法的建立及应用[J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(3):274-278.
- [7] Liu B, Liang GY, Xu G, *et al.* Intervention of rosiglitazone on myocardium Glut-4 mRNA expression during ischemia-reperfusion injury in cardio-pulmonary bypass in dogs[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 373(2):279-284.
- [8] 梁贵友,宋宣统,蔡庆勇,等. BQ123对体外循环缺血再灌注心肌胰岛素抵抗干预作用的实验研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(28):2179-2181.
- [9] 邱燕,黄瀚,刘进,等.乳白异氟醚心脏停跳液对犬心肌损伤的保护作用[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2010, 41(4):703-705.
- [10] Liang GY, Wu HS, Li J, *et al.* Role of insulin receptors in myocardial ischemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass[J]. *Acta Cardiol*, 2011, 66(3):323-331.
- [11] Hou JY, Liu Y, Liu L, *et al.* Protective effect of hyperoside on cardiac ischemia reperfusion injury through inhibition of ER stress and activation of Nrf2 signaling[J]. *Asian*

西酞普兰联合石杉碱甲对老年抑郁模型大鼠的改善作用[△]

谭攀攀^{1*}, 刘蒙², 李秀英¹, 张朋艳¹, 杜雨辰^{3#} (1.濮阳市卫生学校教务处基础教研室, 河南濮阳 457000; 2.濮阳市卫生学校科研处, 河南濮阳 457000; 3.濮阳市人民医院药剂科, 河南濮阳 457000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)28-3923-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.10

摘要 目的:研究西酞普兰联合石杉碱甲对老年抑郁大鼠的改善作用。方法:将老年大鼠随机分为空白对照组、模型组、石杉碱甲组(0.3 mg/kg)、西酞普兰组(5 mg/kg)及联用组(石杉碱甲0.3 mg/kg+西酞普兰5 mg/kg),每组10只。除空白对照组外,其余各组大鼠采用慢性不可预知温和应激方式建立抑郁模型,成模后每天ig给予相应药物1次,连续给药2周。通过旷场实验、糖水消耗实验、悬尾实验、强迫游泳实验、Morris水迷宫实验观察各组大鼠的抑郁和学习记忆行为变化。结果:与空白对照组比较,模型组大鼠水平穿梭次数和直立次数、糖水偏好率、站台穿梭次数、目标象限路程百分比、目标象限时间百分比均明显减少或降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),悬尾不动时间、游泳不动时间和逃避潜伏期均明显延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,西酞普兰组和联用组大鼠抑郁相关指标均明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中联用组效果更好;联用组大鼠学习记忆相关指标均明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),石杉碱甲组和西酞普兰组大鼠仅站台穿梭次数明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其他学习记忆相关指标无明显变化($P > 0.05$)。结论:西酞普兰联合石杉碱甲能明显改善老年抑郁模型大鼠的抑郁行为和学习记忆能力,效果优于单用西酞普兰。
关键词 西酞普兰;石杉碱甲;联合治疗;老年大鼠;抑郁;学习记忆

Improvement Effects of Citalopram Combined with Huperzine A in Aged Depression Model Rats

TAN Panpan¹, LIU Meng², LI Xiuying¹, ZHANG Pengyan¹, DU Yuchen³ (1.Dept. of Basic Teaching and Research, Office of Academic Affairs, Health School of Puyang City, Henan Puyang 457000, China; 2.Office of Scientific Research, Health School of Puyang City, Henan Puyang 457000, China; 3.Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Puyang City, Henan Puyang 457000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of citalopram combined with huperzine A in aged depression model rats. METHODS: Aged rats were randomly divided into blank control group, model group, huperzine A group (0.3 mg/kg), citalopram group (5 mg/kg), and combination group (huperzine A 0.3 mg/kg+citalopram 5 mg/kg), 10 in each group. Except for blank control group, rats in other groups received chronic unpredictable mild stress to reduce depression model. After modeling, rats were intragastrically administrated relevant drugs once a day, for 2 weeks. The depression, learning and memory behavior changes of rats in each group were observed by using open-field test, sucrose consumption test, tail suspension test, forced swimming test and Morris water maze test. RESULTS: Compared with blank control group, the horizontal crossing number, uprightness number, sucrose preference rate, crossing number in platform, percentages of target quadrant distance and time of rats in model group were ob-

- Pac J Trop Med*, 2016, 9(1): 76-80.
- [12] 方华,李昌熙,王泉云,等.体外循环应用吡咯二硫氨基甲酸酯对犬心肌能量代谢的影响[J].南方医科大学学报, 2008, 28(8): 1387-1390.
- [13] Szkudelski T, Szkudelski K. Effects of AMPK activation on lipolysis in primary rat adipocytes: studies at different glucose concentrations[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2017, 123(1): 43-49.

△基金项目:河南省科技攻关项目(No.152102310019)
*助理讲师,硕士。研究方向:老年疾病。电话:0393-6519196。
E-mail: happytanpanpan@126.com
#通信作者:主管药师。研究方向:药物研究。电话:0393-4689988。E-mail: auauppp@163.com

- [14] Vitzel KF, Bikopoulos G, Hung S, et al. Loss of the anorexic response to systemic 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside administration despite reducing hypothalamic AMP-activated protein kinase phosphorylation in insulin-deficient rats[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71944.
- [15] Ussher JR, Wang W, Gandhi M, et al. Stimulation of glucose oxidation protects against acute myocardial infarction and reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 359-369.

(收稿日期:2017-01-01 修回日期:2017-04-02)
(编辑:邹丽娟)