

依那普利减轻肢体缺血-再灌注模型大鼠心肌损伤的作用机制

<https://doi.org/10.12307/2022.361>

投稿日期: 2020-11-19

送审日期: 2020-11-21

采用日期: 2021-01-07

在线日期: 2021-07-01

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2022)11-01747-05

文献标识码: B

邢宏昶¹, 曹建平¹, 朱静¹, 姚鲲²

文章快速阅读:

文章特点—

△验证了依那普利可通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 抑制细胞凋亡, 减轻大鼠肢体缺血-再灌注心肌损伤。

对照组

模型组

依那普利组

抑制剂组

建立肢体缺血再灌注模型

检测:

- (1) 心肌组织病理学改变;
- (2) 心肌组织细胞凋亡指数及凋亡基因蛋白表达;
- (3) 细胞传导通路蛋白表达。

文题释义:

肢体缺血再灌注损伤:是指组织器官缺血一段时间后, 重新恢复血流灌注时组织器官的损伤程度不但没有减轻反而较缺血时不断加重, 机体功能进一步恶化的综合征, 是一种临床上常见的、多发生于严重创伤后的复杂病理过程。肢体缺血再灌注损伤的病理机制至今仍未完全阐明, 目前医学界多认为其与脂质过氧化及氧自由基损伤、钙离子代谢紊乱、细胞凋亡、炎症反应损害等有关。

细胞信号传导通路:人体细胞之间的信息传导可通过相邻细胞的直接接触来实现, 但更重要也是更为普遍的则是通过细胞分泌各种化学物质来调节自身和其他细胞的代谢和功能, 因此在人体中, 信息传导通路通常是由分泌释放信息物质的特定细胞、信息物质(包含细胞间与细胞内的信息物质和运载体、运输路径等)以及靶细胞(包含特异受体等)等构成。

摘要

背景:有研究证实依那普利可以减轻肢体缺血再灌注导致的心肌损伤, 但对其作用机制的研究还没有报道。

目的:探讨依那普利减轻大鼠肢体缺血-再灌注心肌损伤的作用机制。

方法:健康成年雄性SD大鼠48只随机分为对照组、模型组、依那普利组和抑制剂组。除对照组外, 其余各组采用橡皮带环绕结扎大鼠双后肢根部3 h、再灌注3 h制备肢体缺血再灌注模型; 抑制剂组再灌注前30 min时静脉注射PI3K抑制剂LY294002 0.3 mg/kg, 依那普利组和抑制剂组再灌注即刻开始静脉输注依那普利13 μg/(kg·h)至再灌注结束; 其余两组再灌注即刻开始给予等量生理盐水溶液。再灌注3 h时麻醉下处死大鼠, 取心肌组织, 检测心肌组织病理学改变、心肌组织细胞凋亡指数及凋亡基因表达、细胞传导通路蛋白表达。实验方案由沈阳医学院实验动物伦理委员会于2019年10月批准, 批准号: 研伦审第(2019)85号。

结果与结论:①光镜下与模型组比较, 依那普利组心肌组织病理学损伤减轻; 与依那普利组比较, 抑制剂组心肌组织病理学损伤加重; ②与模型组比较, 依那普利组心肌组织细胞凋亡指数降低, Bax蛋白表达下调, PI3K、p-Akt和Bcl-2蛋白表达上调($P < 0.05$); ③与依那普利组比较, 抑制剂组心肌组织细胞凋亡指数升高, Bax蛋白表达上调, PI3K、p-Akt和Bcl-2蛋白表达下调($P < 0.05$); ④结果说明, 依那普利可通过激活PI3K/Akt信号通路, 抑制细胞凋亡, 减轻大鼠肢体缺血-再灌注心肌损伤。

关键词:依那普利; 再灌注损伤; 心肌; 1-磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 细胞凋亡; 炎症; 氧化应激

缩略语:磷脂酰肌醇3-激酶: phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶: protein-serine-threonine kinase, Akt

Mechanism by which enalapril alleviates myocardial injury in a rat model of limb ischemia-reperfusion

Xing Hongchang¹, Cao Jianping¹, Zhu Jing¹, Yao Kun²

¹Department of Anesthesiology, Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China; ²Department of Hematology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110021, Liaoning Province, China

Xing Hongchang, Master, Chief physician, Department of Anesthesiology, Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning Province, China

Corresponding author: Yao Kun, MD, Associate chief physician, Department of Hematology, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110021, Liaoning Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have confirmed that enalapril can alleviate myocardial injury caused by limb ischemia-reperfusion, but the mechanism of its action has not been reported.

OBJECTIVE: To investigate the effect mechanism of enalapril reduction of myocardial injury by ischemia-reperfusion in the rat limb.

¹ 沈阳医学院附属中心医院麻醉科, 辽宁省沈阳市 110024; ² 中国医科大学附属盛京医院血液科, 辽宁省沈阳市 110021

第一作者: 邢宏昶, 男, 1975年生, 辽宁省营口市人, 汉族, 硕士, 主任医师, 主要从事围术期器官保护研究。

通讯作者: 姚鲲, 博士, 副主任医师, 中国医科大学附属盛京医院血液科, 辽宁省沈阳市 110021

<https://orcid.org/0000-0001-7830-0511> (邢宏昶)

基金资助: 辽宁省自然科学基金项目(2019-ZD-0325), 项目负责人: 邢宏昶; 沈阳医学院科学基金项目(20181029), 项目负责人: 邢宏昶

引用本文: 邢宏昶, 曹建平, 朱静, 姚鲲. 依那普利减轻肢体缺血-再灌注模型大鼠心肌损伤的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(11):1747-1751.



METHODS: Forty-eight healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, model group, enalapril group and inhibitor group. Except for the normal control group, rats were bundled around the ligation of the posterior limbs with a rubber band for 3 hours, followed by 3-hour reperfusion to establish the model of limb ischemia-reperfusion. Intravenous injection of 0.3 mg/kg LY294002 was given in the inhibitor group 30 minutes before reperfusion. Enalapril group and inhibitor group were given intravenous infusion of enalapril 13 $\mu\text{g/kg/h}$ immediately after reperfusion until the end of reperfusion. An equal amount of normal saline solution was given in the other two groups immediately after reperfusion. After 3 hours of reperfusion, the rats were killed and the myocardial tissue was taken. Myocardial histopathological changes, apoptotic index, apoptosis gene expression and cell conduction pathway protein expression were detected. The study was approved by the Laboratory Animal Ethical Committee of Shenyang Medical College in October 2019 with an approval No. (2019)85.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the model group, myocardial histopathological injury was reduced in the enalapril group. Compared with the enalapril group, myocardial histopathological injury was aggravated in the inhibitor group. Compared with the model group, myocardial apoptosis index (AI) was decreased, Bax expression was downregulated, PI3K, p-Akt and Bcl-2 expression was up-regulated in the enalapril group ($P < 0.05$). Compared with the enalapril group, myocardial apoptosis index was increased, Bax expression was up-regulated, PI3K, p-Akt and Bcl-2 expression was downregulated in the inhibitor group ($P < 0.05$). The mechanism by which enalapril reduces limb ischemia-reperfusion caused myocardial injury is related to activating PI3K/Akt signaling pathway and inhibiting cell apoptosis in rats.

Key words: enalapril; reperfusion injury; myocardium; 1-phosphatidylinositol 3-kinase; protein-serine-threonine kinases; cell apoptosis; inflammation; oxidative stress

Funding: Liaoning Provincial Natural Science Foundation Project, No. 2019-ZD-0325 (to XHC); Science Foundation Project of Shenyang Medical College, No. 20181029 (to XHC)

How to cite this article: XING HC, CAO JP, ZHU J, YAO K. Mechanism by which enalapril alleviates myocardial injury in a rat model of limb ischemia-reperfusion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(11):1747-1751.

0 引言 Introduction

肢体缺血再灌注损伤是临床常见的病理过程，不仅引起局部缺血组织损伤，还可导致远隔组织、器官的损伤，其中心肌是容易受累的组织之一^[1-2]。依那普利是二代血管紧张素转换酶抑制剂，其可减轻肢体缺血再灌注诱发的大鼠心肌损伤^[3]。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶 (protein-serine-threonine kinase, Akt) 信号通路是细胞内重要信号通路之一，参与调节机体细胞活化、凋亡、炎症反应和趋化等多种病理生理学过程^[4-5]。有研究证实依那普利可以减轻肢体缺血再灌注导致的心肌损伤，但对其作用机制还不清楚。此次研究拟探讨依那普利减轻大鼠肢体缺血-再灌注心肌损伤的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于 2019 年 9-12 月在沈阳医学院附属中心医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康成年雄性 SD 大鼠 48 只，体质量 200-250 g，适应性喂养 1 周，12 h 白天，12 h 黑夜，温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ ，湿度 45%-55%，自由进食水，由沈阳医学院动物实验室提供。

1.3.2 药品与试剂 依那普利 (Enalapril, 批号: E129304)、LY294002 (批号: L124970)(均为阿拉丁公司); 全蛋白提取试剂盒 (WLA019)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (WLA004)、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (WLA013)、羊抗兔 IgG-HRP (WLA023)、ECL 发光液 (WLA003)、TUNEL 检测试剂盒 (WL029a)、Bcl-2 (WL01556)、Bax (WL01637)、苏木精-伊红染色试剂盒 (WLA051a)(均为 wanleibio, 中国); 一抗 (PI3K, Akt, p-Akt, Cell Signaling Technology); Triton X-100 (ST795, Beyotime, 中国); DAB 显色液 (DA1010)、苏木精 (H8070)、山羊血清 (SL038)(均为 Solarbio 中国); HRP 标记山羊抗兔 IgG (#31460, thermoFisher, 美国)。

1.3.3 仪器与设备 VMS-LDF1 型激光多普勒血流仪 (Moor 公司, 英国); 水平摇床 (WD-9405B)、双垂直蛋白电泳

仪 (DYCZ-24DN)、凝胶成像系统 (WD-9413B 型)(均为北京六一); 酶标仪 (ELX-800, BIOTEK 美国); 超速冷冻离心机 (H-2050R, 长沙, 湖南湘仪); 电热恒温鼓风干燥箱 (QH01-9030A, 精宏实验设备, 上海); 电热恒温培养箱 (DH36001B, 天津泰斯特, 天津); 显微镜拍照系统 (DP73, OLUMPUS, 日本); 超纯水系统 (NW10LVF Heal Force, 中国); 石蜡切片机 (RM2235, Leica, 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组、给药方法 取健康成年雄性 SD 大鼠 48 只，采用随机数字表法随机分为 4 组，对照组、模型组、依那普利组和抑制剂组，每组 12 只。模型组、依那普利组和抑制剂组建立大鼠肢体缺血再灌注模型；抑制剂组再灌注前 30 min 时静脉注射 PI3K 抑制剂 LY294002 0.3 mg/kg，依那普利组和抑制剂组再灌注即刻开始静脉输注依那普利 13 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ 至再灌注结束，其余两组再灌注即刻开始静脉输等量生理盐水溶液。

1.4.2 模型制备 用弹力橡皮带环绕结扎大鼠双后肢根部 3 h、再灌注 3 h，采用激光多普勒血流仪监测血流被阻断，建立肢体缺血再灌注模型；对照组给予大鼠双后肢松绕橡皮带，模拟捆扎。

动物造模过程中的相关问题

造模目的:	建立肢体缺血再灌注模型
借鉴已有标准实施	参照文献 [6] 介绍的方法建立大鼠肢体缺血再灌注模型
动物造模:	
选择动物的条件:	健康成年雄性 SD 大鼠，体质量 200-250 g
动物来源及品系:	SD 大鼠由沈阳医学院动物实验室提供
造模技术描述:	用弹力橡皮带环绕结扎大鼠双后肢根部 3 h，再灌注 3 h
动物数量及分组:	SD 大鼠 48 只随机分为对照组、模型组、依那普利组和抑制剂组，每组 12 只
造模成功评价指标:	激光多普勒血流仪监测血流被阻断
造模后动物处理:	实验结束，麻醉下处死大鼠后取心肌组织
伦理委员会批准:	沈阳医学院实验动物伦理委员会于 2019 年 8 月批准，批准号: 研伦审第 (2019)85 号

1.4.3 取材 实验结束麻醉下处死大鼠，开胸取心肌组织，模型组分别取心尖、左心室、右心室部位组织，其他组取心尖部位组织，用 40 g/L 多聚甲醛固定，各组剩余心肌组织用液氮冻存转移至 -70 °C 超低温冰箱保存。

1.4.4 病理切片 取固定心肌组织，石蜡包埋切片，切片脱蜡至水，苏木精-伊红染色，脱水、透明、封固，200 倍光镜下观察心肌组织病理学结果。

1.4.5 细胞通路蛋白表达的测定 Western blot 法检测 PI3K、Akt 和磷酸化 Akt(P-Akt) 的蛋白表达，将液氮中保存的心肌组织切成小块后，蛋白裂解，低温冷冻离心，分离的上清液依次进行蛋白质定量、SDS-PAGE、转印、封闭后，孵育一抗加入 PI3K(1 : 500)、Akt(1 : 500)，p-Akt(1 : 500)， β -actin(1 : 1 000) 单克隆抗体，4 °C 孵育，摇床过夜。洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔 IgG-HRP，37 °C 孵育 45 min，ECL 底物发光，暗室内曝光。将胶片进行扫描，用凝胶图象处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的灰度值。以灰度值的比值反映其表达水平。

1.4.6 心肌凋亡细胞的检测 采用 TUNEL 法检测心肌凋亡细胞。取固定的心肌组织，常规石蜡包埋、切片，脱蜡水化，组织透化，过氧化氢封闭，酶标记，POD 标记，DAB 显色、复染、封固，高倍镜下进行观察，细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞。随机取 3 张切片，每张切片于缺血区随机选取 5 个高倍视野($\times 400$)，计算凋亡细胞数占总细胞数的百分比，取平均值即为细胞凋亡指数(AI)。

1.4.7 凋亡基因蛋白表达的测定 采用免疫组化法测定凋亡基因(Bcl-2、Bax)蛋白的表达。取固定的心肌组织，石蜡包埋、切片，抗原修复，体积分数 3% 过氧化氢孵育，山羊血清封闭，一抗孵育，兔抗鼠 Bcl-2、Bax 抗体，PBS 1 : 100 稀释，湿盒内 4 °C 过夜，PBS 浸泡 5 min，重复 3 次。HRP 标记二抗孵育，山羊抗兔抗体，PBS 1 : 500 稀释，湿盒内 37 °C 孵育 60 min，PBS 浸泡 5 min，重复 3 次。DAB 显色，苏木精复染，脱水、透明、封固，镜下观察。细胞核膜、胞质出现棕黄色颗粒为阳性表达。取 3 张连续切片，每张切片随机选择 5 个高倍视野($\times 400$)，用 Image-Pro Plus 图像分析软件计算吸光度值，取其平均值反映 Bcl-2 和 Bax 的表达。

1.5 主要观察指标 ①心肌组织病理学改变；②心肌组织细胞凋亡指数及 Bax、Bcl-2 蛋白表达；③心肌组织 PI3K、Akt 及 P-Akt 蛋白的表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析，正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 48 只大鼠随机分为对照组、模型组、依那普利组，抑制剂组，各 12 只。实验过程中没有动物死亡，全部进入结果分析。

2.2 肢体缺血再灌注对大鼠心肌组织病理的影响 光镜下模型组心肌心尖、左心室、右心室各部位心肌组织细胞肿胀，

细胞核减少，可见坏死纤维断裂，纤维间隙增宽，大量炎性细胞浸润，损伤程度接近，见图 1。

2.3 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织病理的影响 光镜下对照组心尖部心肌纤维排列整齐，细胞核均匀一致，纹理较清楚；模型组心尖部心肌细胞肿胀，细胞核减少，可见坏死纤维断裂，纤维间隙增宽，大量炎性细胞浸润；依那普利组心尖部心肌纤维排列较整齐，间隙减小，细胞轻度肿胀，病理学损伤较模型组明显减轻；抑制剂组心尖部心肌细胞中度肿胀，心肌纤维排列不整齐，间隙增宽，炎性细胞浸润，病理学损伤较依那普利组加重，见图 2。

2.4 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织细胞凋亡的影响 光镜下对照组大鼠心尖部心肌细胞核基本正常；模型组大鼠心尖部心肌细胞核黄染的凋亡细胞明显增加；依那普利组大鼠心尖部心肌细胞核黄染的凋亡细胞较模型组明显减少；抑制剂组大鼠心尖部心肌细胞核黄染的凋亡细胞较依那普利组增加，见图 3。

2.5 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织细胞凋亡基因蛋白表达的影响 与对照组比较，其他 3 组心肌组织细胞凋亡指数明显升高，Bax 表达明显上调，Bcl-2 表达明显下调($P < 0.05$)；与模型组比较，依那普利组心肌组织细胞凋亡指数明显下降，Bax 表达明显下调，Bcl-2 表达明显上调($P < 0.05$)；与依那普利组比较，抑制剂组心肌组织细胞凋亡指数明显升高，Bax 表达明显上调，Bcl-2 表达明显下调($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 | 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织细胞凋亡蛋白表达的影响
Table 1 | Effect of enalapril on apoptotic protein expression in myocardial tissue of rats with limb ischemia-reperfusion

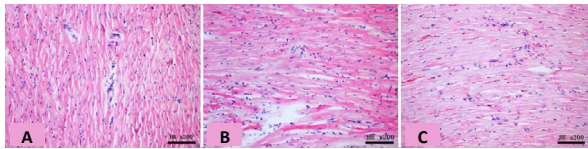
组别	细胞凋亡指数 (%)	Bax(吸光度值)	Bcl-2(吸光度值)
对照组	3.5 $\pm$ 1.1	0.196 $\pm$ 0.026	0.554 $\pm$ 0.023
模型组	30.5 $\pm$ 8.1 ^a	0.596 $\pm$ 0.126 ^a	0.154 $\pm$ 0.033 ^a
依那普利组	8.1 $\pm$ 1.9 ^{ab}	0.360 $\pm$ 0.163 ^{ab}	0.355 $\pm$ 0.068 ^{ab}
抑制剂组	16.6 $\pm$ 3.5 ^{abc}	0.573 $\pm$ 0.089 ^{bc}	0.141 $\pm$ 0.109 ^{bc}

表注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ；与依那普利组比较，^c $P < 0.05$

2.6 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织细胞通路蛋白表达的影响 与对照组比较，模型组及抑制剂组心肌组织 PI3K、P-Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$)；与模型组比较，依那普利组心肌组织 PI3K、P-Akt 蛋白表达明显上调($P < 0.05$)；与依那普利组比较，抑制剂组心肌组织 PI3K、P-Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$)，见图 4。

3 讨论 Discussion

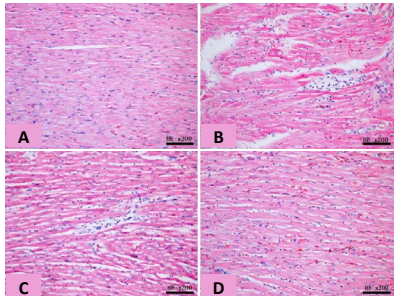
此次研究参照文献 [6] 采用橡皮带环绕结扎大鼠双后肢 3 h、再灌注 3 h 的方法建立大鼠肢体缺血再灌注损伤模型，病理结果表明，模型组心尖部、左心室、右心室心肌组织均细胞肿胀，细胞核减少，可见坏死纤维断裂，纤维间隙增宽，大量炎性细胞浸润，提示大鼠心肌各部均受到损伤且损伤程度接近，大鼠肢体缺血再灌注损伤模型制备成功。



图注：图 A-C 分别为心尖部、左心室、右心室心肌组织。结果可见各部位心肌组织均有损伤并且损伤程度接近

图 1 | 肢体缺血再灌注模型大鼠心肌组织病理表现 (苏木精-伊红染色, $\times 200$)

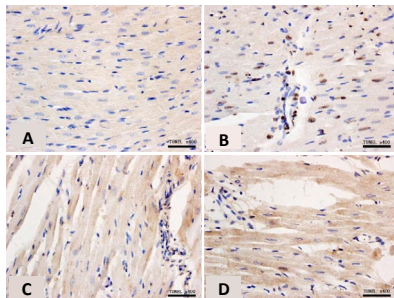
Figure 1 | Effect of limb ischemia-reperfusion on myocardial histopathology in rats (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)



图注：图 A 为对照组，大鼠心肌组织未见异常改变；B 为模型组，可见大鼠心肌组织明显损伤；C 为依那普利组，可见大鼠心肌组织损伤较模型组明显减轻；D 为抑制剂组，可见大鼠心肌组织损伤较依那普利组加重

图 2 | 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织病理的影响 (苏木精-伊红染色, $\times 200$)

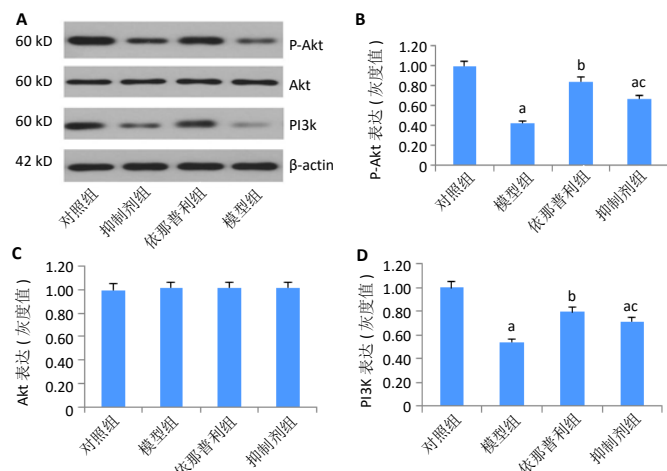
Figure 2 | Effect of enalapril on myocardial histopathology in rats with limb ischemia-reperfusion (hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)



图注：图 A 为对照组，大鼠心肌细胞核未见异常改变；B 为模型组，大鼠心肌细胞核大量黄染 (为凋亡细胞)；C 为依那普利组，大鼠心肌细胞核黄染数量较模型组明显减少；D 为抑制剂组，大鼠心肌细胞核黄染数量较依那普利组增加

图 3 | 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, $\times 400$)

Figure 3 | Effect of enalapril on apoptosis of myocardial tissue in rats with limb ischemia-reperfusion (TUNEL staining, $\times 400$)



图注：图 A 为 PI3K/Akt 通路相关蛋白条带；B 为 P-Akt 蛋白表达水平；C 为 Akt 蛋白表达水平；D 为 PI3K 蛋白表达水平。与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ ；与依那普利组比较，^c $P < 0.05$

图 4 | 依那普利对肢体缺血再灌注大鼠心肌组织细胞通路蛋白表达的影响

Figure 4 | Effect of enalapril on the expression of cell pathway proteins in myocardial tissue in rats with limb ischemia-reperfusion

肢体缺血再灌注致远隔组织、器官损伤的机制十分复杂，目前医学界多认为其与脂质过氧化及氧自由基损伤、细胞凋亡、炎症反应损害等有关^[7-9]。临床和实验研究发现，肢体缺血再灌注损伤不仅存在于缺血组织，尚可造成远隔器官即非缺血受累区域组织器官功能的损伤^[10]，这些功能异常相互联动，甚至引起全身炎症反应综合征的发生，导致多器官的功能衰竭^[11]，影响患者预后恢复甚至危及生命，因此有必要对肢体缺血再灌注损伤的基础与临床进行研究。目前研究发现肢体缺血再灌注导致心肌损伤主要涉及以下几方面：①氧自由基介导性心肌损伤^[12-14]；②中性粒细胞介导性心肌损伤，中性粒细胞激活是中性粒细胞介导再灌注损伤的关键步骤^[15]；③继发性低灌注、低血压和再灌注损伤；④可能与自由基和前列腺素 II 等激活肥大细胞引起组织损伤有关；⑤细胞凋亡，在缺血再灌注损伤中细胞的死亡形式除了坏死外，凋亡也起着很大的作用^[16]。

心肌损伤主要表现在以下方面：①对蛋白质的损伤：丙二醛可使蛋白质发生交联聚合、蛋白质变性及其他不可逆的损害^[17]；②对核酸和 DNA 的损伤：OH·可从 DNA 的核糖中提氢，使 DNA 的核糖成为自由基，引起蛋白质合成障碍^[17]；③对线粒体的损伤^[18]；④对生物膜的损伤^[19]。

依那普利为 2 代血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI)，为转换酶抑制剂前体药，不含巯基^[20]。口服依那普利后约 1 h 达血药浓度峰值，与剂量呈线性关系。近年研究发现血管紧张素转换酶抑制剂兼具氧自由基的清除作用，保护损伤的心肌；又可强化内皮源舒张因子 (EDRF) 的作用，促使血管扩张^[21]。血管紧张素转换酶抑制剂可抑制血小板的聚集，对由肾上腺素、二磷酸腺苷 (ADP)、胶原等诱导的血小板聚集和血栓烷 (TXA) 的释放均可抑制，这也是血管紧张素转换酶抑制剂可保护心脏另一作用^[22]。现有研究证实，依那普利后处理可减轻肢体缺血再灌注诱发心肌损伤^[23]，但其机制尚未阐明。

PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要信号通路之一，通过影响下游多种效应分子的活化状态，在细胞内发挥着抗凋亡、促细胞生存等功能，既有抗凋亡作用又有促凋亡作用，以抗细胞凋亡为主^[24]。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶，可被受体酪氨酸激酶或 G2 蛋白耦联受体激活，其产物 PIP2 和 PIP3 都是细胞内重要的第二信使，作用于 PI3K/Akt 通路，在细胞的增殖、凋亡、代谢等过程中起重要的作用。丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt，又称为蛋白激酶 PKB，它是 PI3K 信号转导通路中一个重要的下游靶点^[25]。当细胞受到细胞外信号的刺激后，PI3K 活化产生的 PIP3 与 AktN 端的 pH 结构域结合，使 Akt 向质膜转位而激活，后者催化其自身的 Ser124 和 Thr450 磷酸化，同时使 PIP3 依赖激酶 PDK1、PDK2 分别催化 Akt 的 Thr308 和 Ser473 磷酸化，进一步激活 Akt，从而引起级联反应^[26]。研究证实 Akt 的活化与许多人类疾病如癌症、白血病、糖尿病、精神分裂等密切相关^[27]。

PI3K/Akt 通路参与调节机体细胞活化、凋亡、炎症反应和趋化等多种病理生理学过程^[28-29]。LY294002 可特异地阻断 PI3K/Akt 细胞通路的磷酸化过程，进而抑制该通路的激

活^[30-31]。此次结果显示,与模型组比较,依那普利组心肌组织 PI3K、p-Akt 蛋白表达有统计学意义 ($P < 0.05$);与依那普利组比较,抑制剂组心肌组织 PI3K、p-Akt 蛋白表达有统计学意义 ($P < 0.05$),提示依那普利通过激活 PI3K/Akt 信号通路,发挥抗凋亡作用,促进细胞生存,减轻大鼠肢体缺血再灌注心肌损伤。

随着对细胞凋亡研究不断深入,发现 bcl-2 家族是在细胞凋亡中有重要作用的一类蛋白质^[32]。Bcl-2 家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素之一,在细胞凋亡信号转导途径中发挥重要作用^[33]。Bcl-2 和 bax 分别是 bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡和促进凋亡基因,并且 bax 是 bcl-2 活性的主要调控因子^[34]。Bcl-2 和 bax 在肿瘤细胞凋亡中具有重要的调控作用。Bax 是 Bcl-2 家族中研究最广泛的促凋亡蛋白^[35]。Bax 定位于细胞浆,自身可形成同源二聚体或与 Bcl-2 形成异源二聚体。许多细胞凋亡中有 bax 表达升高^[36]。转染 bax 不仅能诱导许多细胞自发凋亡,而且促进多种因素诱导的多种细胞凋亡。此次研究结果显示,与模型组比较,依那普利组心肌组织细胞凋亡指数值、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达有统计学意义 ($P < 0.05$);与依那普利组比较,抑制剂组心肌组织细胞凋亡指数值、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达有统计学意义 ($P < 0.05$),提示依那普利减轻大鼠肢体缺血再灌注心肌损伤的机制与抑制细胞凋亡有关。

综上所述,依那普利可通过激活 PI3K/Akt 信号通路,抑制细胞凋亡,减轻大鼠肢体缺血-再灌注心肌损伤。

作者贡献: 实验设计由第一作者和通讯作者完成,实验实施由第一至第三作者完成,论文撰写由第一作者和通讯作者完成,评估由所有作者完成,均接受过正规训练。

经费支持: 该文章接受了“辽宁省自然科学基金项目 (2019-ZD-0325)”及“沈阳医学院科学基金项目 (20181029)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经沈阳医学院动物实验伦理委员会批准,批准号为研伦理第 (2019)85 号。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经沈阳医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] KIHIC Y, ÖZERR A, TATAR T, et al. Effect of picoside II on hind limb ischemia reperfusion injury in rats. *J Drug Des Devel Ther*. 2017;11: 1917-1925.
- [2] CHENG Y, DI S, FAN C, et al. SIRT1 activation by pterostilbene attenuate the skeletal muscle oxidative stress injury and mitochondrial dysfunction induced by ischemia reperfusion injury. *J Apoptosis*. 2016; 21(8):905-916.
- [3] 邢宏昶,姚鲲,赵宏,等.依那普利对大鼠肢体缺血-再灌注心肌细胞的影响[J].医药导报,2013,32(7):861-864.
- [4] DING Y, DU J, CUI F, et al. The protective effect of ligustrazine on rats with cerebral ischemia-reperfusion injury via activating PI3K/Akt pathway. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(10):1168-1177.
- [5] CHEN S, LI X, WANG Y, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia/reperfusion-induced inflammation and oxidative stress via activation of the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2019; 19(5):3633-3641.

- [6] 赵立军,门秀丽,董淑云,等.骨骼肌缺血预适应对肢体缺血再灌注后心肌的远端保护作用[J].中国医科大学学报,2008,37(2):168-170.
- [7] LIU Y, QIN XY, LU XF, et al. Effects of inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on the pain of sciatic endometriosis in a rat mode. *Cana J Physiol Phar*. 2019;97(10):963-970.
- [8] STEIGER AK, PARDUE S, KEVIL CG, et al. Self-immolative thiocarbamates provide access to triggered H2S donors and analyte replacement fluorescent probes. *J Am Chem Soc*. 2016;138(23):7256-7259.
- [9] ÖZTURK L, DOĞAN HT, KILICARSLAN A, et al. Effect of different doses of pregabalin on skeletal muscle ischaemia-reperfusion injury in rats. *Bratisl Lek Listy*. 2017;118(7):417-422.
- [10] CHENG W, WANG M, PENG L, et al. Protective Effects of Dexmedetomidine and Oxycodone in Patients Undergoing Limb Ischemia-Reperfusion. *Med Sci Mon*. 2019;25:9073-9084.
- [11] MANGUM LC, GARCIA GR, AKERS KS, et al. Duration of extremity tourniquet application profoundly impacts soft-tissue antibiotic exposure in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Injury*. 2019; 50(12):2203-2214.
- [12] HEEL K, BLENNERHASSETT L, KONG SE, et al. Influence of ischaemia-reperfusion injury on CD44 expression in rat small intestine. *Br J Surg*. 1998;85(8):1086-1089.
- [13] GRACE PA. Ischaemia reperfusion. *Br J Surg*. 1994;81(5):637-647.
- [14] KNOWLES R, KEEPING H, GRAEBER T, et al. Cytokine control of PMN phagocytosis: regulatory effects of hypoxemia and hypoxemia-reoxygenation. *Am J Physiol*. 1997;272(41):1352-1364.
- [15] LUM H, ROEBUCK KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(4):C719-C741.
- [16] KUN Y, HONG CX, BIN W, et al. Effect of TIEG1 on apoptosis and expressions of Bcl-2/Bax and pten in leukemic cell lines. *Genet Mol Res*. 2015;14(1):1968-1974.
- [17] BEYERSDORF F. The use of controlled reperfusion strategies in cardiac surgery to minimize ischaemia/reperfusion damage. *Cardiovasc Res*. 2009;83(2):262-268.
- [18] YASUDA S, KOBAYASHI H, IWASA M, et al. Antidiabetic drug pioglitazone protects the heart via activation of PPAR receptors, PI3-kinase, Akt, and eNOS pathway in a rabbit model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(5):H1558-H1565.
- [19] HOOLE SP, HECK PM, SHARPLES L, et al. Cardiac remote ischemic preconditioning in coronary stenting (CRISP Stent) study: a prospective, randomized control study. *Circulation*. 2009;119:820-827.
- [20] 徐叔云. 中华临床药理学 (上册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:811.
- [21] SRINIVASAN J, JAYADEV S, KUMARAN D, et al. Effect of losartan and enalapril on cognitive deficit caused by Goldblatt induced hy-pertension. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(3):241.
- [22] WINER N, FOLKER A, MURPHY JA, et al. Effect of fixed dose ACE inhibitor/calcium channel blocker combination therapy vs ACE inhibitor monotherapy on arterial compliance in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Prev Cardiol*. 2005; 8(2):87.
- [23] 邢宏昶,姚鲲,赵宏,等.依那普利后处理对肢体缺血再灌注诱发大鼠心肌损伤的影响[J].中华麻醉学杂志,2013,33(3):360-362.
- [24] DUDEK H, DATTA SR, FRANKE TF, et al. Regulation of neuronal survival by the serine/threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275(5300): 661-665.
- [25] SHAW RJ, CANTLEY LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006;441(7092): 424-430.
- [26] CHAN TO, RITTENHOUSE SE, TSICHLIS PN. Phosphoinositide 3-kinase signalling - which way to target. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:366-376.
- [27] LI GC, QIN XL, SONG HH, et al. Upregulated microRNA-15b alleviates ovarian cancer through inhibition of the PI3K/Akt pathway by targeting LPAR3. *J Cel Phy*. 2019;234(12):22331-22342.
- [28] FERNANDEZ MC, YU A, MOAWAD AR, et al. Peroxiredoxin 6 regulates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway to maintain human sperm viability. *Mol Hum Rep*. 2019;25(12):787-796.
- [29] SUN GQ, LI YB, JI ZY, et al. Up-regulation of MIAT aggravates the atherosclerotic damage in atherosclerosis mice through the activation of PI3K/Akt signaling pathway. *Drug Del*. 2019;26(1):641-649.
- [30] LU YZ, LI LH, WANG GY, et al. Effect of PI3K/Akt Signaling Pathway on PRAS40Thr246 Phosphorylation in Gastric Cancer Cells. *Ira J Pub Health*. 2019;48(12):2196-2204.
- [31] LUO X, LIN B, GAO YG, et al. Genipin attenuates mitochondrial-dependent apoptosis, endoplasmic reticulum stress, and inflammation via the PI3K/AKT pathway in acute lung injury. *Int Immun*. 2019;76: 105842.
- [32] ROSSE T, OLIVIER R, MONNEY L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after bax-induced release of cytochrome c. *Nature*. 1998;391(6666):496-499.
- [33] MORRIS DL, KASTNER DW, JOHNSON S, et al. Humanin induces conformational changes in the apoptosis regulator BAX and sequesters it into fibers, preventing mitochondrial outer-membrane permeabilization. *J Bio Chem*. 2019;294(50):19055-19065.
- [34] LIU SP, ZHU YY, YAN SS, et al. Phenethyl isothiocyanate induces IPEC-J2 cells cytotoxicity and apoptosis via S-G 2/M phase arrest and mitochondria-mediated Bax/Bcl-2 pathway. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2019;226:108574.
- [35] WON M, LUO YY, LEE DH, et al. BAX is an essential key mediator of AP5M1-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Biochemical Biophysical Res Commun*. 2019;518(2):368-373.
- [36] EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. *Bio Res Commun*. 2018;500(1):26-34.

(责任编辑: WZH, ZN, SX)