

重楼皂苷 I 通过抑制 NF- κ B 信号通路减轻大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤

杨柳¹ 苑亚静² 吴越¹

¹ 大连医科大学第一附属医院麻醉科, 辽宁大连 116021; ² 天津医科大学肿瘤医院麻醉科 300000
通信作者: 吴越, Email: wuyue0903@126.com

【摘要】 目的 探讨重楼皂苷 I (PPI) 对大鼠心肌缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤的影响及作用机制。**方法** 按照随机数字表法将 6 月龄 SD 大鼠分为假手术 (Sham) 组、I/R 模型组以及 PPI 低、中、高剂量组, 每组 10 只。采用结扎冠状动脉左前降支 30 min、再灌注 120 min 制备大鼠心肌 I/R 模型; Sham 组仅开胸, 不进行结扎。PPI 低、中、高剂量组于制模前相应灌胃 PPI 75、150、300 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, 连续 4 周; I/R 模型组灌胃等量二甲亚砜 (DMSO)。于再灌注结束后, 采用氯化三苯四唑 (TTC) 和伊文思蓝 (EB) 染色检测心肌梗死面积 (IA), 采用原位末端缺刻标记法 (TUNEL) 检测心肌细胞凋亡率, 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达以及核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路中重要蛋白 P65 在细胞质和细胞核内的表达。**结果** 与 Sham 组比较, I/R 模型组心肌 IA 显著增加, 心肌细胞凋亡率显著升高, Bcl-2 表达量明显降低, 而 Bax 表达量显著增加, P65 核内转移量显著增加。与 I/R 模型组比较, 低、中、高剂量 PPI 预处理能够显著减小心肌 IA [(21.6 $\pm$ 0.9) %、(14.3 $\pm$ 1.6) %、(15.0 $\pm$ 0.8) % 比 (29.6 $\pm$ 1.4) %], 显著降低心肌细胞凋亡率 [(38.6 $\pm$ 1.9) %、(24.3 $\pm$ 2.6) %、(26.3 $\pm$ 2.8) % 比 (56.8 $\pm$ 2.4) %], Bcl-2 表达量显著增加, 而 Bax 表达量逐渐降低 (Bcl-2/GAPDH: 0.24 $\pm$ 0.07、0.36 $\pm$ 0.02、0.34 $\pm$ 0.09 比 0.13 $\pm$ 0.04, Bax/GAPDH: 0.39 $\pm$ 0.10、0.21 $\pm$ 0.08、0.23 $\pm$ 0.06 比 0.53 $\pm$ 0.12); 中、高剂量 PPI 预处理后 P65 核内转移量显著减少 (细胞核 P65/Histone 3: 0.49 $\pm$ 0.09、0.51 $\pm$ 0.06 比 0.83 $\pm$ 0.11, 细胞质 P65/GAPDH: 0.31 $\pm$ 0.03、0.30 $\pm$ 0.05 比 0.22 $\pm$ 0.07), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 其中 PPI 中剂量组与 PPI 高剂量组各指标比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。**结论** PPI 可能通过 NF- κ B 信号通路减轻大鼠心肌 I/R 损伤, 尤以 150 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ 的 PPI 作用最为显著。

【关键词】 重楼皂苷 I; 缺血 / 再灌注损伤, 心肌; 凋亡; 核转录因子- κ B

基金项目: 国家自然科学基金 (81501140)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.017

Polyphyllin I alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via nuclear factor- κ B signal pathway

Yang Liu¹, Yuan Yajing², Wu Yue¹

¹Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116021, Liaoning, China; ²Department of Anesthesiology, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, Tianjin 300000, China
Corresponding author: Wu Yue, Email: wuyue0903@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of Polyphyllin I (PPI) on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats and its mechanism. **Methods** The 6-month-old Sprague-Dawley (SD) rats were divided into sham operation group (Sham group), I/R model group, and low, medium, high dose PPI groups according to the random number table method, with 10 in each group. The rat myocardial I/R model was prepared by ligating the left anterior descending branch of the coronary artery by 30 minutes and reperfusion by 120 minutes. Sham group was exposure to open chest without ligation. Low, medium, high dose PPI groups were injected with PPI 75, 150, 300 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ in front of the film for 4 weeks; dimethyl sulfoxide (DMSO) was gastric infused in the I/R model group. After the end of reperfusion, the myocardial infarction area (IA) was determined by triphenyltetrazole (TTC) and Evans blue (EB) staining; the apoptosis of myocardial cells was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling stain (TUNEL); the expressions of apoptosis related protein (Bax, Bcl-2), and cytoplasmic and nucleus expressions of P65 in nuclear factor- κ B (NF- κ B) signal pathway were detected by Western Blot. **Results** Compared with the Sham group, the myocardial IA was significantly increased in the I/R model group, the apoptosis rate of myocardial cells was significantly increased, the expression of Bcl-2 was significantly decreased, and the expression of Bax was significantly increased, and the intranuclear transfer of P65 was significantly increased. Compared with the I/R model group, low, medium and high dose PPI pretreatment could significantly reduce the myocardial IA [(21.6 $\pm$ 0.9) %, (14.3 $\pm$ 1.6) %, (15.0 $\pm$ 0.8) % vs. (29.6 $\pm$ 1.4) %], the apoptosis rate of myocardial cells was significantly decreased [(38.6 $\pm$ 1.9) %, (24.3 $\pm$ 2.6) %, (26.3 $\pm$ 2.8) % vs. (56.8 $\pm$ 2.4) %], the protein expression of Bcl-2 was significantly increased, while the protein expression of Bax was significantly decreased (Bcl-2/GAPDH: 0.24 $\pm$ 0.07, 0.36 $\pm$ 0.02, 0.34 $\pm$ 0.09 vs. 0.13 $\pm$ 0.04; Bax/GAPDH: 0.39 $\pm$ 0.10, 0.21 $\pm$ 0.08, 0.23 $\pm$ 0.06 vs. 0.53 $\pm$ 0.12); and P65 nuclear transfer was significantly decreased after middle and high dose PPI pretreatment [nuclear P65/Histone 3: 0.49 $\pm$ 0.09, 0.51 $\pm$ 0.06 vs. 0.83 $\pm$ 0.11; cytoplasmic P65/GAPDH: 0.31 $\pm$ 0.03, 0.30 $\pm$ 0.05 vs. 0.22 $\pm$ 0.07], with statistically significant differences (all $P < 0.05$). However, there was no significant

difference in each index between the medium and high dose PPI groups (all $P > 0.05$). **Conclusion** PPI alleviates myocardial I/R injury in rats via NF- κ B signal pathway, and the PPI effect of $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ is most especially significant.

[Key words] Polyphyllin I; Myocardial ischemia/reperfusion injury; Apoptosis; Nuclear factor- κ B

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81501140)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.06.017

心肌缺血/再灌注(I/R)损伤常发生于冠状动脉(冠脉)溶栓、经皮冠脉腔内成形术和冠脉旁路移植术后,已成为阻碍缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效的主要难题^[1]。有研究表明,核转录因子- κ B(NF- κ B)参与了心肌I/R损伤,并促进炎症应答和细胞凋亡^[2]。NF- κ B信号通路的激活能够上调多种炎症相关基因的表达,如细胞因子和趋化因子^[3]。重楼(*Rhizoma Paridis Chonglou*)为百合科重楼属植物根茎,主要化学成分为甾体皂苷^[4]。重楼皂苷I(PPI)是重楼中的重要活性和抗肿瘤成分。前期实验表明,PPI对多种肿瘤具有抗肿瘤活性,包括宫颈癌、肺癌、卵巢癌、胃癌及成骨肉瘤^[5]。但是PPI对心肌I/R损伤的治疗作用及其作用机制鲜见研究报道。本实验旨在探讨PPI对心肌I/R损伤模型大鼠心肌梗死、细胞凋亡及NF- κ B信号通路重要蛋白表达的影响,为PPI的研发和临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、药品及主要试剂:6月龄SD大鼠50只,体重220~230 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2014-0004。PPI单体由国家药品和生物制品控制研究所提供。氯化三苯四唑(TTC)购于北京索莱宝生物科技股份有限公司;伊文思蓝(EB)购于美国Sigma公司;原位末端缺刻标记法(TUNEL)试剂盒购于德国罗氏公司;Bax、Bcl-2、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)及组蛋白3(Histone 3)一抗购于美国Proteintech公司;P65一抗购于美国Abcam公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购于美国Millipore公司。

1.2 实验动物分组、心肌I/R模型制备及处理:将大鼠置于温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、12 h昼夜光照环境中适应性喂养1周,按随机数字表法分为假手术(Sham)组、I/R模型组及PPI低、中、高剂量组,每组10只。使用10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,气管插管机械通气,打开动物胸腔,采用6-0无创缝合线结扎冠脉左前降支30 min,然后松开结扎线再灌注120 min,建立动物I/R损伤模型;Sham组只开胸,不结扎冠脉。PPI低、中、高剂量组于制模前相应灌胃PPI 75、150、300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续4周;I/R模型组灌胃等量二甲基亚砜(DMSO)。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,经大连医科大学第一附属医院动物伦理委员会审批(审批号:181220)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 TTC-EB染色检测心肌梗死:于再灌注结束后,将2 mL EB染液注入大鼠左心室;取出心脏组织,用预冷的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,剪去心房及心房底部血管,于 -20°C 冷冻30 min。自结扎线以下平行切片(片厚2 mm),置于 37°C 、1% TTC溶液中染色15 min。采用Image J软件计算心肌梗死面积(IA)。

1.3.2 TUNEL检测心肌细胞凋亡:取心脏组织于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋、切片(5 μm),严格按照TUNEL试剂盒说明书步骤操作,计算细胞凋亡率。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测心肌细胞凋亡蛋白及NF- κ B信号通路中重要蛋白P65的表达:用RIPA裂解液裂解心肌组织获取总蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心取上清液,BCA法检测蛋白浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将蛋白转移至PVDF膜,用含吐温20的缓冲液(TBST)洗膜,5%脱脂奶封闭1 h,分别加入Bax、Bcl-2、P65、GAPDH和Histone 3对应一抗溶液4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入二抗共同孵育2 h。用免疫化学荧光(ECL)显影系统在暗室中显影,Image J软件进行蛋白条带灰度分析,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示蛋白表达量。

1.4 统计学分析:每项实验重复3次,采用SPSS 22.0软件进行数据分析,统计结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PPI减少I/R所致的心肌IA(图1;表1):与Sham组相比,I/R模型组心肌IA显著增加($P < 0.05$)。与I/R模型组比较,PPI各剂量组心肌IA明显减小(均 $P < 0.05$),其中以PPI中剂量组作用最为显著,而PPI高剂量组与PPI中剂量组心肌IA比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明PPI预处理可改善心肌梗死。

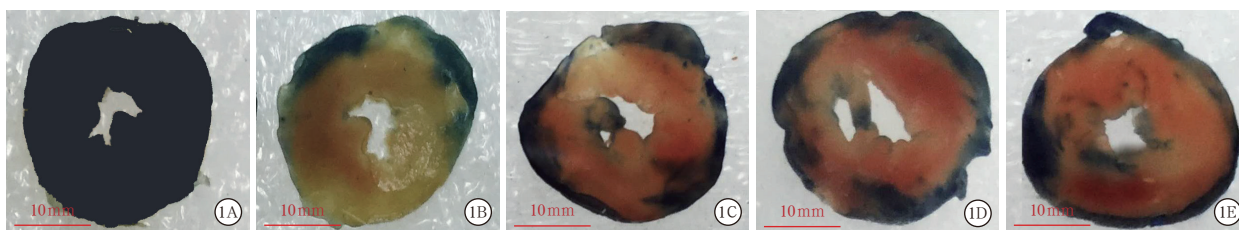


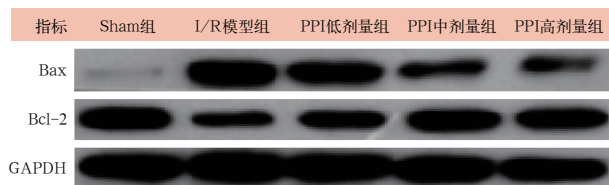
图1 各组大鼠心肌大体观察 深红色为非梗死心肌,蓝黑色为无风险区域,白色为梗死心肌。假手术(Sham)组(A)心肌组织正常;冠状动脉左前降支结扎致心肌缺血/再灌注(I/R)损伤模型组(B)心肌大面积梗死;75、150、300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 重楼皂苷 I 预处理组(PPI 低、中、高剂量组, C、D、E)心肌梗死面积明显减小,以 PPI 中剂量组(D)梗死面积最小 氯化三苯四唑(TTC)和伊文思蓝(EB)染色

表1 各组大鼠心肌 IA 及细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	IA (%)	凋亡率 (%)
Sham 组	10	2.6 ± 0.7	14.7 ± 6.8
I/R 模型组	10	29.6 ± 1.4^a	56.8 ± 2.4^a
PPI 低剂量组	10	21.6 ± 0.9^b	38.6 ± 1.9^b
PPI 中剂量组	10	14.3 ± 1.6^b	24.3 ± 2.6^b
PPI 高剂量组	10	15.0 ± 0.8^b	26.3 ± 2.8^b

注:Sham 组为假手术组, I/R 模型组为结扎冠状动脉左前降支致心肌缺血/再灌注损伤模型组, PPI 低、中、高剂量组为 75、150、300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 重楼皂苷 I 预处理组; IA 为梗死面积;与 Sham 组比较, $^aP < 0.05$; 与 I/R 模型组比较, $^bP < 0.05$

2.2 PPI 减少 I/R 引起的心肌细胞凋亡: TUNEL 染色结果显示(表 1),与 Sham 组相比, I/R 模型组心肌细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$)。经各剂量 PPI 预处理后心肌细胞凋亡率较 I/R 模型组显著降低,以 PPI 中剂量组效果最佳。Western Blot 结果显示(图 2; 表 2),与 Sham 组相比, I/R 模型组心肌组织 Bax 表达量显著增加, Bcl-2 表达量显著降低(均 $P < 0.05$)。与 I/R 模型组比较, PPI 各剂量组 Bax 表达量显著下降, Bcl-2 表达量显著增加(均 $P < 0.05$),其中以 PPI 中剂量组最为显著。表明 PPI 预处理对心肌细胞具有保护作用。



Sham 组为假手术组, I/R 模型组为结扎冠状动脉左前降支致心肌缺血/再灌注损伤模型组, PPI 低、中、高剂量组为 75、150、300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 重楼皂苷 I 预处理组; GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达

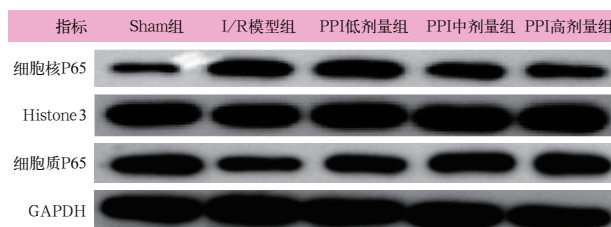
2.3 PPI 抑制 P65 从细胞质向细胞核转移(图 3; 表 3): 与 Sham 组相比, I/R 模型组细胞核中 P65 表达量显著增加,而细胞质中 P65 表达量明显减少(均 $P < 0.05$),表明在心肌 I/R 损伤中, NF- κ B 激活并转移至细胞核,从而促进炎症反应。与 I/R 模型

表2 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
Sham 组	10	0.15 ± 0.02	0.46 ± 0.11
I/R 模型组	10	0.53 ± 0.12^a	0.13 ± 0.04^a
PPI 低剂量组	10	0.39 ± 0.10^b	0.24 ± 0.07^b
PPI 中剂量组	10	0.21 ± 0.08^b	0.36 ± 0.02^b
PPI 高剂量组	10	0.23 ± 0.06^b	0.34 ± 0.09^b

注:Sham 组为假手术组, I/R 模型组为结扎冠状动脉左前降支致心肌缺血/再灌注损伤模型组, PPI 低、中、高剂量组为 75、150、300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 重楼皂苷 I 预处理组; GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与 Sham 组比较, $^aP < 0.05$; 与 I/R 模型组比较, $^bP < 0.05$

组比较, PPI 各剂量组细胞核中 P65 表达量减少,而细胞质中 P65 表达量增加,其中 PPI 中剂量组和高剂量组差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),表明 PPI 预处理能够抑制 NF- κ B 的激活从而发挥抗炎作用。



Sham 组为假手术组, I/R 模型组为结扎冠状动脉左前降支致心肌缺血/再灌注损伤模型组, PPI 低、中、高剂量组为 75、150、300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 重楼皂苷 I 预处理组; Histone 3 为组蛋白 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠心肌细胞核及细胞质中 P65 蛋白表达

表3 各组大鼠心肌细胞核及细胞质中 P65 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	细胞核 P65/Histone 3	细胞质 P65/GAPDH
Sham 组	10	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.09
I/R 模型组	10	0.83 ± 0.11^a	0.22 ± 0.07^a
PPI 低剂量组	10	0.68 ± 0.07	0.26 ± 0.11
PPI 中剂量组	10	0.49 ± 0.09^b	0.31 ± 0.03^b
PPI 高剂量组	10	0.51 ± 0.06^b	0.30 ± 0.05^b

注:Sham 组为假手术组, I/R 模型组为结扎冠状动脉左前降支致心肌缺血/再灌注损伤模型组, PPI 低、中、高剂量组为 75、150、300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 重楼皂苷 I 预处理组; Histone 3 为组蛋白 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与 Sham 组比较, $^aP < 0.05$; 与 I/R 模型组比较, $^bP < 0.05$

3 讨论

再灌注是治疗心肌缺血的必经途径,但不可避免地会造成心肌细胞凋亡及不可逆转的心肌损伤^[6]。尽管粒细胞集落刺激因子被证明具有潜在的心肌保护作用,然而大多数临床试验结果都不尽人意。

PPI 是重楼中的重要活性和抗肿瘤成分。前期研究表明 PPI 具有抗肿瘤活性^[5],但其对心肌 I/R 损伤的治疗作用及其作用机制鲜见报道。在缺血过程中,心肌细胞会在坏死的同时出现部分凋亡,而再灌注后恢复血液供应的细胞则会出现大量凋亡^[7]。细胞凋亡是细胞的一种程序性死亡模式,线粒体参与细胞凋亡过程,该过程是 Bcl-2 家族促凋亡成员导致线粒体外膜完整性丧失的结果^[8]。Bcl-2 蛋白具有抑制凋亡的作用,发生凋亡的情况下, Bcl-2 表达量会显著下降^[9]。Bax 作为 Bcl-2 家族的成员,能与 Bcl-2 蛋白形成异二聚体并降低 Bcl-2 蛋白的抗凋亡作用。前期研究显示, Bax 基因敲除小鼠并不会导致心肌组织中 Bcl-2 蛋白表达,但在心肌 I/R 损伤时, Bax 的缺失能够减轻心肌细胞损伤^[9-10]。单味中药倒卵叶五加总皂苷能够显著降低心肌 I/R 损伤心肌细胞的凋亡指数,减少 Bax 蛋白表达,并增加 Bcl-2 蛋白表达^[11]。本研究显示, PPI 预处理能降低损伤心肌的细胞凋亡率,降低心肌细胞中 Bax 表达量,增加 Bcl-2 表达量,表明 PPI 对心肌 I/R 损伤具有抗凋亡作用,并对心肌细胞具有保护作用。

P65 是 NF- κ B 的一个重要亚基。在未激活状态下, P65 与 NF- κ B 抑制因子(I κ B)结合并存在于细胞质中。I κ B 的磷酸化和泛素化会激活 NF- κ B 从而转移至细胞核中^[12]。NF- κ B 细胞核的转移会增加多种炎症因子的表达,而炎症因子的表达在心肌细胞损伤中具有重要的作用^[13-14]。有研究表明,腺苷预处理减轻大鼠心肌 I/R 损伤可能与抑制受损心肌组织中 NF- κ B 过度表达有关^[15]。本研究显示,在心肌 I/R 损伤细胞中细胞核 P65 表达量明显增加,而细胞质中 P65 表达量明显降低,表明在损伤状态下, P65 激活并转移到了细胞核。经过 PPI 预处理后细胞核中 P65 表达量下降而细胞质中 P65 表达量增加,表明 PPI 能够抑制 NF- κ B 的激活从而减轻心肌 I/R 损伤。其中以中剂量 PPI 作用最为显著。

综上所述,本研究证实 PPI 预处理能够通过抑制 NF- κ B 信号通路减轻 I/R 对大鼠心肌细胞的损伤,中剂量 PPI 预处理作用尤为显著,为临床治疗心肌 I/R 损伤提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 祁秀茹,王春亮,王颖,等.丙泊酚对 SD 大鼠心肌缺血再灌注时自噬的影响[J].实用医学杂志,2016,32(10):1580-1583. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.10.009.
- [2] Qi XR, Wang CL, Wang Y, et al. Effect of propofol on autophagy in rat heart during ischemia-reperfusion injury [J]. J Pract Med, 2016, 32(10): 1580-1583. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2016.10.009.
- [3] Kim YS, Kim JS, Kwon JS, et al. BAY 11-7082, a nuclear factor- κ B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model [J]. Int Heart J, 2010, 51(5): 348-353. DOI: 10.1536/ihj.51.348.
- [4] Matsui N, Kasajima K, Hada M, et al. Inhibition of NF- κ B activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats [J]. J Toxicol Sci, 2005, 30(2): 103-110. DOI: 10.2131/jts.30.103.
- [5] 罗敏,顾琳慧,冯建国,等.重楼皂苷 I 作用于人卵巢癌细胞株体外生物学效应研究[J].实用肿瘤学杂志,2012,26(4):293-297. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3070.2012.04.002.
- [6] Luo M, Gu LH, Feng JG, et al. The biological effect on Polyphyllins I to human ovarian cancer cells line *in vitro* [J]. Prac Oncol J, 2012, 26(4): 293-297. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3070.2012.04.002.
- [7] Li GB, Fu RQ, Shen HM, et al. Polyphyllin I induces mitophagic and apoptotic cell death in human breast cancer cells by increasing mitochondrial PINK1 levels [J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 10359-10374. DOI: 10.18632/oncotarget.14413.
- [8] Xia Z, Li H, Irwin MG. Myocardial ischaemia reperfusion injury: the challenge of translating ischaemic and anaesthetic protection from animal models to humans [J]. Br J Anaesth, 2016, 117: ii44-62. DOI: 10.1093/bja/aew267.
- [9] 冯津萍,卢奕,赵炳让,等.黄芪抑制家兔心肌缺血再灌注时细胞凋亡的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(1):13-15. DOI: 10.3321/j.issn.1008-9691.2001.01.004.
- [10] Feng JP, Lu Y, Zhao BR, et al. The inhibitory effect of Astragalus Membranaceus on the apoptosis induced by myocardial ischemiareperfusion [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2001, 8(1): 13-15. DOI: 10.3321/j.issn.1008-9691.2001.01.004.
- [11] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. Dev Cell, 2011, 21(1): 92-101. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.06.017.
- [12] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis [J]. Jpn Heart J, 2001, 42(6): 759-770. DOI: 10.1536/jhj.42.759.
- [13] Hochhauser E, Kivity S, Offen D, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(6): H2351-2359. DOI: 10.1152/ajpheart.00783.2002.
- [14] 张艳玲,周苏宁.细胞凋亡与心肌缺血/再灌注损伤及中医药研究[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(3):187-189. DOI: 10.3321/j.issn.1008-9691.2005.03.030.
- [15] Zhang YL, Zhou SN. Study on apoptosis and myocardial ischemia/reperfusion injury and traditional Chinese medicine [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2005, 12(3): 187-189. DOI: 10.3321/j.issn.1008-9691.2005.03.030.
- [16] Norman DA, Yacoub MH, Barton PJ. Nuclear factor NF- κ B in myocardium: developmental expression of subunits and activation by interleukin-1 beta in cardiac myocytes *in vitro* [J]. Cardiovasc Res, 1998, 39(2): 434-441.
- [17] Liang Z, Liu LF, Yao TM, et al. Cardioprotective effects of Guanxinshutong (GXST) against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. J Geriatr Cardiol, 2012, 9(2): 130-136. DOI: 10.3724/SP.J.1263.2011.11261.
- [18] 王丽,严虹,李建国,等.烟碱对心肌缺血/再灌注损伤大鼠炎症细胞因子的影响[J].中华危重病急救医学,2010,22(10):624-627.前插 8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.10.017.
- [19] Wang L, Yan H, Li JG, et al. Protective effects of nicotine on inflammatory cytokines in myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Chin Crit Care Med, 2010, 22(10): 624-627, forward 8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.10.017.
- [20] 张良清,徐军发,蔡康荣,等.腺苷预处理对缺血/再灌注心肌细胞凋亡及核因子- κ B 表达的影响[J].中华危重病急救医学,2004,16(3):158-160. DOI: 10.3760/j.issn.1003-0603.2004.03.008.
- [21] Zhang LQ, Xu JF, Cai KR, et al. Effects of adenosine preconditioning on cardiac myocyte apoptosis and expression of nuclear factor- κ B in ischemia/reperfusion rats [J]. Chin Crit Care Med, 2004, 16(3): 158-160. DOI: 10.3760/j.issn.1003-0603.2004.03.008.

(收稿日期:2019-03-15)