

粉防己碱激活 Akt/GSK-3 β 信号通路保护心肌 I/R 大鼠研究

张克清, 戴珍, 李彦萍

安阳市中医院心内科, 河南 安阳 455000

[摘要] 目的: 探究粉防己碱对心肌缺血/再灌注损伤 (Ischemia/Reperfusion injury, I/R) 大鼠的心肌梗塞面积、心脏功能蛋白激酶 B (Protein kinase B, Akt) /糖原合酶激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 信号通路的影响。方法: SPF 级健康雄性 SD 大鼠 180 只, 随机分为假手术组、模型组、辛伐他汀组及粉防己碱低、中、高剂量组。辛伐他汀组于造模前 14 天灌胃给予辛伐他汀 2.0 mg/(kg·d); 粉防己碱低、中、高剂量组于造模前 20 min 分别腹腔注射给予粉防己碱 1.5 mg/kg、3.0 mg/kg、6.0 mg/kg; 假手术组与模型组给予等体积生理盐水。通过结扎冠状动脉左前降支建立 I/R 大鼠模型。再灌注 24 h 后, 测定大鼠血清肌钙蛋白 T (cTnT) 含量及肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸盐脱氢酶 (LDH) 活性; 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 染色法测定心肌梗死面积; 超声心动图检测心脏功能; Western blot 检测心肌组织 Akt、pAkt、GSK-3 β 、pGSK-3 β 蛋白表达。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 cTnT 含量及 CK-MB、LDH 活性均显著升高, 心肌梗死面积显著增大, 心脏左室舒张末期内径 (Left ventricular internal diameter at diastole, LVIDd) 和左室收缩末期内径 (Left ventricular internal diameter at systole, LVIDs) 均显著增大, 心肌组织 pAkt/Akt、pGSK-3 β /GSK-3 β 比值均显著减小, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 粉防己碱中、高剂量组及辛伐他汀组大鼠血清 cTnT 含量及 CK-MB、LDH 活性均显著降低, 心肌梗死面积及心脏 LVIDd、LVIDs 均显著减小, 心肌组织 pAkt/Akt、pGSK-3 β /GSK-3 β 比值均显著增加, 且呈剂量依赖性, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 粉防己碱能明显减轻 I/R 大鼠的心肌损伤, 改善心脏功能, 其机制可能与 Akt/GSK-3 β 通路活化有关。

[关键词] 粉防己碱; 缺血/再灌注损伤 (I/R); 心脏功能; 丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶; 糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2018) 09-0012-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.09.004

Analysis on Tetrandrine Activating Akt/GSK-3 β Signal Pathway for Protecting Myocardial I/R Rats

ZHANG Keqing, DAI Zhen, LI Yanping

Abstract: Objective: To discuss the effect of tetrandrine on the myocardial infarction area and cardiac-function protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) signal pathway of rats with myocardial ischemia/reperfusion injury (I/R). **Methods:** 180 healthy male SD rats of SPF level were divided into the sham operation group, the model group, the simvastatin group and the groups of tetrandrine in low, middle and high doses randomly. 14 days before the model establishment, the simvastatin group was given simvastatin in 2.0mg/(kg·d) by gavage; 20 minutes before the model establishment, the groups of tetrandrine in low, middle and high doses were given tetrandrine in 1.5mg/kg, 3.0mg/kg and 6.0mg/kg by intraperitoneal injection respectively; the sham operation group and the model group were given saline of the same volume. Established the model of I/R rats by ligating the left anterior descending artery. After 24 hours of perfusion, measured the content of cardiac troponin T (cTnT) and the activity of creatine kinase isoenzyme (CK-MB) in serum and lactate dehydrogenase (LDH); measured the myocardial infarction area by nitrotetrazolum blue chloride (NBT) staining; detected cardiac function via echocardiography; detected the protein expression of Akt, pAkt, GSK-3 β and pGSK-3 β via Western blot. **Results:** Comparing with the sham operation group, the content of cTnT and the activity of CK-MB and LDH in serum of the model group were all significantly increased, the myocardial infarction area was significantly enlarged, left ventricular internal diameter at diastole (LVIDd) and left ventricular internal diameter at systole (LVIDs) were both increased evidently, and

[收稿日期] 2018-02-01

[基金项目] 河南省中医药科学研究专项课题 (2015ZY02087)

[作者简介] 张克清 (1980-), 男, 副主任医师, 研究方向: 心脑血管病的中西医结合预防、治疗和康复。

the ratios of pAkt/Akt and pGSK-3b/GSK-3b in myocardial tissue were evidently decreased, differences being significant ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the content of cTnT and the activity of CK-MB and LDH in serum of the simvastatin group and the groups of tetrandrine in middle and high doses were all significantly decreased, the myocardial infarction area was significantly reduced, LVIDd and LVIDs were both decreased evidently, and the ratios of pAkt/Akt and pGSK-3b/GSK-3b in myocardial tissue were evidently increased, which appeared dose-dependent, differences being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tetrandrine can significantly alleviate the myocardial injury of I/R rats and improve cardiac function; its mechanism may be related to the activation of Akt/GSK-3b signal pathway.

Keywords: Tetrandrine; Myocardial ischemia/reperfusion injury (I/R); Cardiac function; Serine-threonine protein kinase; Glycogen synthase kinase-3b (GSK-3b); Animal experiment; Rats

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是导致人类死亡的主要原因之一。据统计,全球每年超过2000万人死于冠心病,其中近一半死于急性心肌梗死(Acute myocardial infarction, AMI)或心源性猝死^[1]。AMI最有效的治疗手段为及时疏通病变血管以恢复心肌组织的血流灌注,但随之引发的心肌缺血/再灌注损伤(Ischemia/Reperfusion injury, I/R)成为临床治疗该病的难题,心肌I/R可导致心肌梗死面积进一步扩大,对远期预后造成很大影响^[2]。蛋白激酶B/糖原合酶激酶-3b(Protein kinase B/Glycogen synthase kinase-3b, Akt/GSK-3b)通路是机体中重要的信号转导通路,广泛参与细胞的增殖、存活、凋亡等生物学过程。研究发现,Akt磷酸化后可从胞膜上脱离,进入胞质与胞核中,调节GSK-3b、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、p70S6蛋白激酶(p70S6K)等的表达,进而发挥心肌保护作用^[3-4]。粉防己碱是从中药粉防己根部提取的生物碱,属于双苄基异喹啉衍生物。有关研究证实,粉防己碱具有抵抗心肌I/R的作用,但不清楚其具体保护机制^[5]。故本研究通过建立心肌I/R大鼠模型,探究粉防己碱对I/R大鼠心肌梗塞面积、心脏功能及Akt/GSK-3b通路的影响,以期为AMI的治疗寻求新的手段。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 SPF级健康雄性SD大鼠180只,体质量250~280g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXR(京)2015-0011。

1.2 实验药品 粉防己碱,分析标准品,纯度 $\geq 98\%$,购自上海源叶生物科技有限公司。辛伐他汀胶囊(理舒达),规格:20mg,批准文号:国药准字H20030103,购自远大医药(中国)有限公司。

1.3 试剂与仪器 水合氯醛(上海化学试剂公司);肌钙蛋白T(Cardiac troponin T, cTnT)、肌酸激酶同工酶(Creatine kinase MB, CK-MB)、乳酸盐脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(北京中生北控生物科技有限公司);氯化硝基四氮唑蓝(Nitro Blue Tetrazolium Chloride, NBT)(上海前进试剂厂);组织蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司);一抗兔抗鼠Akt、pAkt单克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司);一抗兔抗鼠GSK-3b、pGSK-3b多

克隆抗体(美国Santa Cruz公司);二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG溶液、超敏ECL化学发光试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所);TKR-200C小动物呼吸机(江苏省特力麻醉呼吸设备公司);COBAS-FARA II全自动生化分析仪(瑞士Roche公司);MICROM-HM340E病理组织切片机(德国Microm公司);DY89-I电动玻璃匀浆机(宁波新芝科器研究所);GE Vivid I彩色多普勒超声便携机(GE Healthcare公司)。

1.4 分组与给药处理 大鼠适应性饲养1周后,随机分为6组,包括假手术组、模型组、辛伐他汀组(阳性药组)以及粉防己碱低、中、高剂量组,每组30只。辛伐他汀组于造模前14天给予辛伐他汀2.0mg/(kg·d),连续灌胃14天;粉防己碱低、中、高剂量组于造模前20min分别一次性腹腔注射给予粉防己碱1.5mg/kg、3.0mg/kg、6.0mg/kg;假手术组与模型组于造模前20min一次性腹腔注射给予等体积生理盐水。

1.5 动物模型制备 参考邓宇珺等^[6]方法建立心肌I/R大鼠模型。术前禁食不禁水12h,用10%水合氯醛(0.3mL/100g)腹腔麻醉大鼠,仰卧固定。检测并记录II导联心电图,颈、胸部备皮消毒,钝性分离颈部皮肤暴露气管,切开气管后立即行气管插管,连接小动物呼吸机,条件设置95%O₂、5%CO₂、中等湿度的混合气体以80次/min频率进行通气;于3~4肋间钝性开胸暴露心脏,于左心耳与肺动脉圆锥左侧交界下方2~3mm处穿6/0号缝合线,进针深1.5~2mm、宽2~3mm,并用“U形管”以压管法活结结扎左冠脉前降支,肉眼可见心脏左室壁变暗变紫,同时心电图显示ST段明显抬高(>0.25mV)代表结扎成功。心肌缺血30min后,再灌注24h,可见缺血区逐渐变红,心电图ST段降至0.15mV左右代表再灌注成功。假手术组仅穿线不结扎。

1.6 血清cTnT含量及CK-MB、LDH活性测定 再灌注24h后,于大鼠腹部主动脉采血,4℃、3000r/min离心10min,取上清液,分装后于-80℃冰箱保存备用。采用ELISA试剂盒检测血清cTnT含量,操作步骤严格按照试剂盒说明书;采用全自动生化分析仪测定血清CK-MB、LDH活性。

1.7 NBT染色法测定心肌梗死面积 采血后,剖胸取出大鼠心脏,用生理盐水洗去心腔残余血液,除去非心肌组织如脂

肪、血管等，沿冠状沟将心房切除，称量左心室湿重。沿房室沟方向将左心室横切至4~5片，浸入NBT磷酸缓冲液中，37℃恒温水浴染色，直至完全染色后取出。染色后，正常心肌组织呈紫黑色，梗死心肌组织无染色。将梗死心肌组织切下，称重，计算心肌梗死面积。心肌梗死面积 = 梗死心肌组织重量 / 左心室重量 × 100%。

1.8 超声检测心脏功能 再灌注24 h后，超声检测大鼠心脏功能。用10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔麻醉大鼠，仰卧固定于超声台，用小动物心脏彩色超声心动图检查仪测定大鼠的左室舒张末期内径(Left ventricular internal diameter at diastole, LVIDd)和左室收缩末期内径(Left ventricular internal diameter at systole, LVIDs)，并经电脑软件自动算出左室射血分数(Left ventricular ejection fraction, EF)。

1.9 Western blot 检测心肌组织 Akt、pAkt、GSK-3b、pGSK-3b 蛋白表达 取左室前壁心肌组织，剪成碎片，常规提取心肌组织蛋白，BCA法定量蛋白以调节浓度。每组取蛋白样品50 μg上样；SDS-PAGE电泳；转至NC膜，将膜置于含5%脱脂奶粉TBST中，避光封闭1 h；漂洗后，将膜置于一抗稀释液(Akt稀释比1:1 000、pAkt稀释比1:2 000、GSK-3b稀释比1:500、pGSK-3b稀释比1:500)中，4℃孵育过夜；漂洗后，将膜置于二抗稀释液(1:1 000)中，室温振荡孵育1 h；漂洗后，滴加ECL发光液，曝光3次，选取重叠值。用Image pro plus 7.0软件分析蛋白杂交条带灰度值，以β-actin作为内参蛋白。

1.10 统计学方法 本研究利用SPSS 20.0统计软件进行数据处理，计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示，*t*检验；计数资料用“率”描述，用 χ^2 检验。当 $P < 0.05$ 时，差异有统计学意义。

2 结果

2.1 I/R 大鼠模型制备成功情况 I/R模型制备总成功率为67.33%，模型组19只合格，辛伐他汀组22只合格，粉防己碱低剂量组20只合格，粉防己碱中剂量组19只合格，粉防己碱高剂量组21只合格。

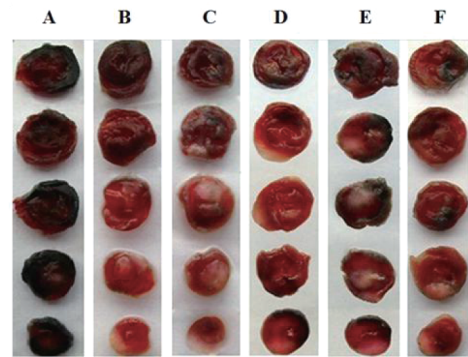
2.2 各组大鼠血清 cTnT 含量及 CK-MB、LDH 活性检测结果比较 见表1。与假手术组比较，模型组血清cTnT含量及CK-MB、LDH活性均显著升高($P < 0.05$)；与模型组比较，粉防己碱中、高剂量组及辛伐他汀组血清cTnT含量及CK-MB、LDH活性均显著降低($P < 0.05$)，而粉防己碱低剂量组差异无统计学意义；随着粉防己碱给药浓度的升高，血清cTnT含量及CK-MB、LDH活性逐渐降低，呈剂量依赖性($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠心肌梗死面积检测结果比较 见图1，表2。NBT染色后正常心肌组织呈紫黑色；梗死心肌组织呈苍白色，定量分析发现，与假手术组比较，模型组心肌梗死面积显著增大($P < 0.05$)；与模型组比较，粉防己碱中、高剂量组及辛伐他汀组心肌梗死面积均显著减小($P < 0.05$)，而粉防己碱低剂量组差异不具有统计学意义；随着粉防己碱给药浓度的升高，心肌梗死面积逐渐减小，呈剂量依赖性($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠血清 cTnT 含量及 CK-MB、

组别	n	LDH 活性检测结果($\bar{x} \pm s$)		
		cTnT(ng/mL)	CK-MB(U/mL)	LDH(U/mL)
假手术组	10	0.83 ± 0.08	752.46 ± 104.24	1 119.48 ± 213.56
模型组	10	1.62 ± 0.17 ^①	1 053.37 ± 215.32 ^①	1 594.62 ± 315.22 ^①
粉防己碱低剂量组	10	1.48 ± 0.15 ^①	891.65 ± 164.77 ^①	1 458.34 ± 205.36 ^①
粉防己碱中剂量组	10	1.34 ± 0.20 ^{①②}	862.42 ± 126.83 ^{①②}	1 332.45 ± 212.98 ^{①②}
粉防己碱高剂量组	10	1.16 ± 0.18 ^{①②}	842.94 ± 156.61 ^②	1 288.34 ± 186.03 ^②
辛伐他汀组	10	1.12 ± 0.22 ^{①②}	833.15 ± 173.65 ^②	1 275.16 ± 145.59 ^②

与假手术组比较，^① $P < 0.05$ ；与模型组比较，^② $P < 0.05$



A: 假手术组；B: 模型组；C: 粉防己碱低剂量组；D: 粉防己碱中剂量组；E: 粉防己碱高剂量组；F: 辛伐他汀组

图1 各组大鼠心肌梗死情况

表2 各组大鼠心肌梗死面积检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

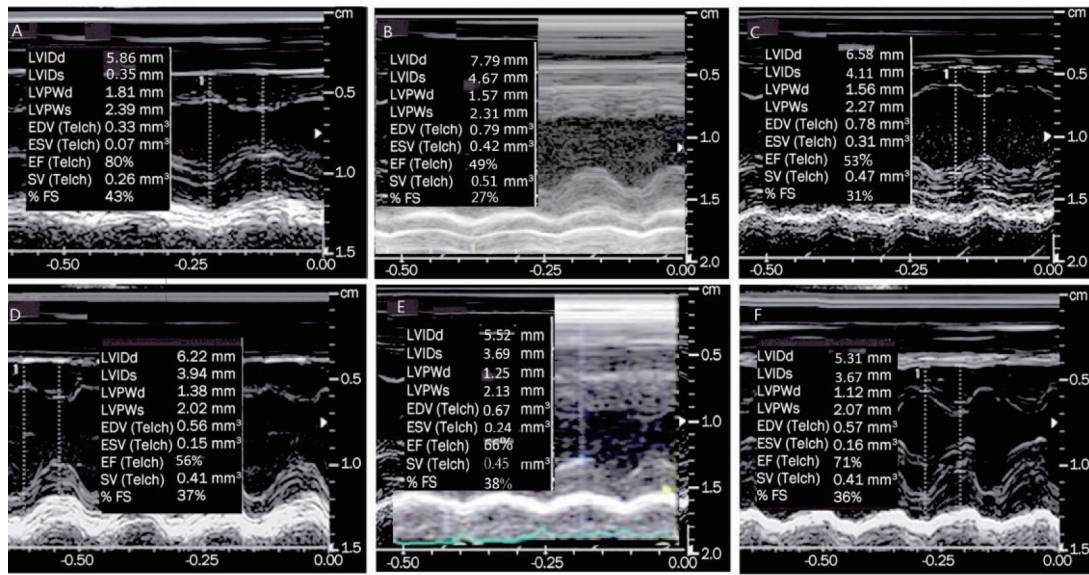
组别	n	梗死面积比例(%)
假手术组	6	0
模型组	6	23.64 ± 4.29 ^①
粉防己碱低剂量组	6	18.57 ± 3.86 ^①
粉防己碱中剂量组	6	14.83 ± 4.10 ^{①②}
粉防己碱高剂量组	6	7.64 ± 0.89 ^{①②}
辛伐他汀组	6	6.57 ± 1.27 ^{①②}

与假手术组比较，^① $P < 0.05$ ；与模型组比较，^② $P < 0.05$

2.4 各组大鼠心脏功能检测结果比较 见图2、表3。超声心动图检测结果显示，与假手术组比较，模型组心脏LVIDd、LVIDs均显著增大($P < 0.05$)；与模型组比较，粉防己碱低、中、高剂量组及辛伐他汀组心脏LVIDd、LVIDs均显著减小($P < 0.05$)；随着粉防己碱给药浓度的升高，心脏LVIDd、LVIDs逐渐减小，呈剂量依赖性($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠心肌组织 Akt、pAkt、GSK-3b、pGSK-3b 蛋白表达结果比较 见图3、表4。Western blot结果显示，与假手术组比较，模型组心肌组织pAkt/Akt、pGSK-3b/GSK-3b比值显著减小($P < 0.05$)；与模型组比较，粉防己碱低、中、高剂量组及辛伐他汀组心肌组织pAkt/Akt、pGSK-3b/GSK-3b比值均显著增加($P < 0.05$)；随着粉防己碱给药浓度的升高，心肌组织

pAkt/Akt、pGSK-3b/GSK-3b 比值逐渐增加，呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。



A: 假手术组; B: 模型组; C: 粉防己碱低剂量组; D: 粉防己碱中剂量组; E: 粉防己碱高剂量组; F: 辛伐他汀组

图2 各组 I/R 大鼠心脏功能检测结果

表3 各组大鼠超声心动图检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVIDd(cm)	LVIDs(cm)	EF(%)
假手术组	8	0.59 ± 0.07	0.36 ± 0.05	77.72 ± 12.51
模型组	8	0.78 ± 0.04 ^①	0.47 ± 0.03 ^①	49.24 ± 8.67 ^①
粉防己碱低剂量组	8	0.66 ± 0.02 ^{①②}	0.42 ± 0.02 ^{①②}	53.06 ± 5.94 ^①
粉防己碱中剂量组	8	0.61 ± 0.03 ^{①②}	0.39 ± 0.02 ^{①②}	56.73 ± 6.23
粉防己碱高剂量组	8	0.56 ± 0.02 ^{①②}	0.37 ± 0.02 ^{①②}	65.92 ± 3.55 ^②
辛伐他汀组	8	0.53 ± 0.04 ^②	0.36 ± 0.03 ^{①②}	72.65 ± 3.48 ^②

与假手术组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

表4 各组大鼠心肌组织 pAkt/Akt 蛋白相对表达灰度值($\bar{x} \pm s$)

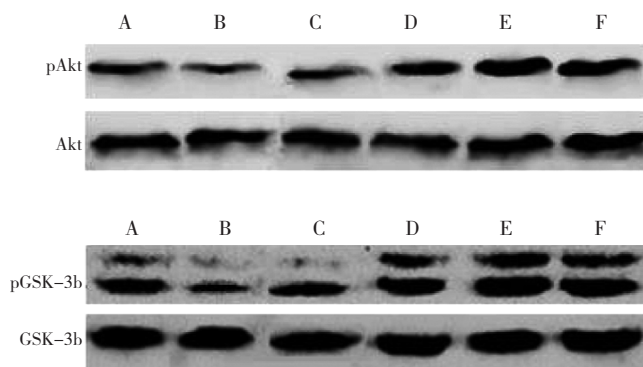
组别	n	pAkt/Akt	pGSK-3b/GSK-3b
假手术组	8	0.618 ± 0.036	0.638 ± 0.037
模型组	8	0.284 ± 0.043 ^①	0.312 ± 0.031 ^①
粉防己碱低剂量组	8	0.436 ± 0.032 ^{①②}	0.506 ± 0.034 ^{①②}
粉防己碱中剂量组	8	0.784 ± 0.041 ^{①②}	0.752 ± 0.039 ^{①②}
粉防己碱高剂量组	8	0.967 ± 0.048 ^{①②}	1.073 ± 0.048 ^{①②}
辛伐他汀组	8	0.884 ± 0.044 ^{①②}	0.914 ± 0.042 ^{①②}

与假手术组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

AMI 的发生主要是由于冠状动脉阻塞而引起的心肌缺血, 40~60 岁的中老年人易患心肌缺血。尽快恢复缺血心肌组织的血流供应是临床治疗 AMI 的有效方法, 但 I/R 所引起的心肌损伤严重影响患者的预后。I/R 易造成心肌超微结构及代谢发生变化, 反而扩大了心肌梗死面积, 并加剧了心脏功能障碍^[7-8]。粉防己碱作为一种生物碱, 具有多种生物学功能^[9]。本研究通过结扎冠状动脉左前降支成功建立了 I/R 大鼠模型, 从血清心肌酶活性、心肌梗死面积、心脏功能等方面, 探讨了粉防己碱对大鼠 I/R 的影响以及相关机制。

I/R 会破坏细胞膜脂质双份子层, 增加胞膜透性, 进而造成细胞中众多酶 CK-MB、LDH 等进入血液^[10-11]。随着心肌损伤程度加重, 血清心肌酶及 cTnT 有一定程度的上升^[12-14]。本研究结果显示, 模型组血清 cTnT 含量、CK-MB 活性、LDH 活性均显著高于假手术组, 提示 I/R 大鼠心肌组织出现损伤。经粉防己碱治疗后 cTnT、CK-MB、LDH 活性降低, 说明粉防



A: 假手术组; B: 模型组; C: 粉防己碱低剂量组; D: 粉防己碱中剂量组; E: 粉防己碱高剂量组; F: 辛伐他汀组

图3 各组大鼠心肌组织 Akt、pAkt、GSK-3b、pGSK-3b 蛋白表达结果比较

己碱有助于保护 I/R 大鼠心肌细胞,减轻心肌细胞膜受损程度以及心肌酶的释放。NBT 染色发现,正常心肌组织呈紫黑色,梗死心肌组织呈苍白色;经定量分析发现,模型组心肌梗死面积较假手术组显著增大,经粉防己碱治疗后心肌梗死面积显著减小,说明粉防己碱有助于减少 I/R 大鼠的心肌梗死面积。心肌梗死后会造成心脏功能下降,受损程度与心肌梗死面积呈正相关^[15]。模型组心脏 LVIDd、LVIDs 较假手术组均显著增大,经粉防己碱治疗后心脏 LVIDd、LVIDs 显著减小,说明粉防己碱能保护心肌 I/R 损伤后的心脏功能,与辛伐他汀效果相当。

大量研究显示, Akt/GSK-3 β 信号通路在拮抗心肌缺血梗死方面发挥关键作用^[16-18]。Akt 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它可协同磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1/2 促进三磷酸磷脂酰肌醇与其自身结合, Akt 由胞浆转移至质膜,同时 Akt 位点 Ser473 与 Thr308 发生磷酸化, Akt 蛋白激酶活性开启,被激活的 Akt 可活化下游一系列蛋白,如 GSK-3 β 。GSK-3 也是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为糖原合成代谢的关键限速酶。GSK-3 包括 GSK-3 α 和 GSK-3 β 两种亚型, GSK-3 α 定位于染色体 19q13.2 上,其编码蛋白的分子量为 51 kDa; GSK-3 β 定位于染色体 3q13.3 上,其编码蛋白的分子量为 47 kDa。GSK-3 高度保守,其两种亚型的同源性高达 84%。GSK-3 不仅参与糖原的合成,而且在细胞增殖、运动、分化、凋亡等方面发挥重要作用^[19]。研究显示 GSK-3 β 是位于 Akt 通路下游的一个重要信号蛋白, Akt 通路能够使 GSK-3 β 的 ser9 发生磷酸化,进而导致 GSK-3 β 失去活性激活下游的靶分子,减少心肌梗死面积,抑制心肌细胞凋亡,发挥保护心脏功能^[20]。本研究结果显示,模型组心肌组织 Akt/pAkt、pGSK-3 β /GSK-3 β 比值显著减小,经粉防己碱治疗后心肌组织 pAkt/Akt、pGSK-3 β /GSK-3 β 比值逐渐增加,说明 Akt/pAkt、pGSK-3 β /GSK-3 β 与 I/R 大鼠心肌损伤有关,且粉防己碱保护 I/R 大鼠心肌组织可能与激活 Akt/GSK-3 β 信号通路有关。然而心肌 I/R 发生发展机制复杂,粉防己碱缓解心肌 I/R 的具体作用机理还需深入探究。

[参考文献]

- [1] Zhu KF, Wang YM, Zhu JZ, et al. National prevalence of coronary heart disease and its relationship with human development index: A systematic review[J]. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2016, 23(5): 530-543.
- [2] Anzell AR, Maizy R, Przyklenk K, et al. Mitochondrial quality control and disease: Insights into ischemia-reperfusion injury[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 39(9): 1-18.
- [3] Muñoz-Montaño JR, Moreno FJ, Avila J, et al. Downregulation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) protein expression during neuroblastoma IMR-32 cell differentiation[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2015, 55(3): 278-285.
- [4] Zhou C, Bai J, Jiang C, et al. Geranylgeranylacetone attenuates myocardium ischemic/reperfusion injury through HSP70 and Akt/GSK-3 β /eNOS pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(2): 386-395.
- [5] 王蓉, 马腾茂, 刘飞, 等. 防己的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 634-639.
- [6] 邓宇珺, 符永恒, 谭宁, 等. 大鼠活体心肌缺血再灌注损伤模型的建立与综合评估[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(2): 412-416.
- [7] Ayanian JZ, Guadagnoli E, Mcneil BJ, et al. Treatment and outcomes of acute myocardial infarction among patients of cardiologists and generalist physicians[J]. *Archives of Internal Medicine*, 2016, 157(157): 2570-2576.
- [8] Huang Z, Han Z, Ye B, et al. Berberine alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 762(9): 1-10.
- [9] 钟毓杰, 刘忠民, 黄勇平, 等. 乌司他丁联合粉防己碱预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2017, 29(2): 134-137.
- [10] 潘彩英, 李竞春, 龙振洪, 等. 2 项心肌标志物与 2 项心肌酶在急性心肌梗死诊断和疗效判断的特异性、敏感度、相关性研究[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(1): 185-188.
- [11] Liu X, Tao Y, Wang F, et al. Kudiezi injection mitigates myocardial injury induced by acute cerebral ischemia in rats[J]. *Bmc Complementary & Alternative Medicine*, 2017, 17(1): 8-10.
- [12] Toda H, Nakamura K, Nakagawa K, et al. Diastolic dysfunction is a risk of perioperative myocardial injury assessed by high-sensitivity cardiac troponin T in elderly patients undergoing non-cardiac surgery[J]. *Circulation Journal*, 2017, 77(747): 1-8.
- [13] Abdeldaim MM, Ghazy EW, Fayez M. Synergistic protective role of mirazid (Commiphora molmol) and ascorbic acid against tilmicosin-induced cardiotoxicity in mice[J]. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, 2015, 93(1): 45-51.
- [14] Lu S, Huang Y, Wang N, et al. Cardioprotective effect of electroacupuncture pretreatment on myocardial ischemia/reperfusion injury via antiapoptotic signaling[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2016(25): 1-9.
- [15] Maranhão RC, Guido MC, Lima ADD, et al. Methotrexate carried in lipid core nanoparticles reduces myocardial infarction

- size and improves cardiac function in rats [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12(17): 3767–3784.
- [16] Xie Q, Sun Z, Chen M, et al. IL-8 up-regulates proliferative angiogenesis in ischemic myocardium in rabbits through phosphorylation of Akt/GSK-3 β (ser9) dependent pathways [J]. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, 2015, 8(8): 12498–12508.
- [17] Wang D, Zhang X, Li D, et al. Kaempferide protects against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017(7): 1–11.
- [18] Wang Y, Wu CY, Han B, et al. Dexmedetomidine attenuates repeated propofol exposure-induced hippocampal apoptosis, PI3K/Akt/Gsk-3 β signaling disruption, and juvenile cognitive deficits in neonatal rats [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(1): 769–775.
- [19] Mury FB, Lugon MD, DA Fonseca RN, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 is involved in glycogen metabolism control and embryogenesis of *Rhodnius prolixus* [J]. *Parasitology*, 2016, 143(12): 1569–1579.
- [20] Li J, Ruffenach G, Kararigas G, et al. Intralipid protects the heart in late pregnancy against ischemia/reperfusion injury via Caveolin2/STAT3/GSK-3 β pathway [J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2017, 102(1): 108–116.
- (责任编辑: 冯天保, 钟志敏)

表没食子儿茶素没食子酸酯对 D-半乳糖诱导的 AD 模型小鼠 A β 生成作用的研究

王会敏¹, 何柯新², 尚陈宇¹, 刘冬冬¹, 徐建华¹

1. 广东省中医院二沙岛分院, 广东 广州 510130; 2. 广州市惠爱医院, 广东 广州 510370

[摘要] 目的: 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 对 D-半乳糖诱导的阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 模型小鼠 β 淀粉样肽 (Amyloid- β peptide, A β) 生成作用的影响。方法: 将 60 只昆明小鼠随机分为对照组、模型组、VE 阳性组、EGCG 低剂量组、EGCG 中剂量组、EGCG 高剂量组, 每组 10 只。注射 D-半乳糖建立 AD 小鼠模型后, 对照组和模型组灌胃等量双蒸水; VE 阳性组每天灌胃 5.6% VE 1 次; EGCG 低、中、高剂量组分别按每天 2 mg/kg 灌胃 0.04% EGCG、4 mg/kg 灌胃 0.08% EGCG 和 6 mg/kg 灌胃 0.12% EGCG 1 次; 持续给药 28 天后通过避暗试验和 Morris 水迷宫试验观察小鼠动物行为学变化; ELISA 法检测小鼠脑匀浆中白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 A β 水平; 苏木精-伊红 (HE) 染色观察海马内神经元的变化。结果: EGCG 能明显延长 AD 模型小鼠跳台潜伏期、减少跳台错误次数、缩短通过迷宫的时间和减少进入盲端的错误次数; 且能显著减轻 D-半乳糖诱导的 AD 模型小鼠海马神经元的损伤及降低其脑内 IL-6、TNF- α 和 A β 表达水平, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: EGCG 可能通过降低 D-半乳糖诱导的 AD 模型小鼠脑内 A β 的含量, 来抑制神经细胞凋亡, 从而改善学习记忆障碍。

[关键词] 阿尔茨海默病 (AD); 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG); β 淀粉样肽 (A β); 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 09-0017-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.09.005

Study on Generating Effect of EGCG on A β of Model Mice with Alzheimer's Disease Induced by D-galactose

WANG Huimin, HE Kexin, SHANG Chenyu, LIU Dongdong, XU Jianhua

Abstract: Objective: To explore the generating effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on amyloid- β peptide (A β) of model mice with Alzheimer's disease (AD) induced by D-galactose. **Methods:** Divided 60 cases of mice from Kunming

[收稿日期] 2018-02-02

[基金项目] 广东省中医药局科研项目 (20161092)

[作者简介] 王会敏 (1981-), 女, 主管技师, 研究方向: 临床血液和体液研究。

[通信作者] 徐建华, E-mail: whm69255114@163.com。