

曲美他嗪对心肌缺血再灌注损伤大鼠钙蛋白酶的调控及其对细胞凋亡的作用机制[△]

何文凤*, 薛 成, 郑健康, 帅 壮, 岳荣川(川北医学院附属医院心内科心血管疾病实验室, 四川 南充 637000)

中图分类号 R972+.3 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2023)01-0016-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2023.01.003



摘 要 目的:探讨美他嗪对心肌缺血再灌注损伤大鼠钙蛋白酶(Calpain)的调控及其对细胞凋亡的作用机制。方法:采用随机数字表法将30只SD大鼠分为假手术组(Sham组)、模型组和曲美他嗪干预组,每组10只。Sham组大鼠仅置缝线但不结扎冠状动脉,其余两组大鼠均采用手术结扎大鼠心肌冠状动脉左前降支(LAD)进行造模,造模期间,Sham组和模型组大鼠给予0.9%氯化钠溶液灌胃处理,曲美他嗪干预组大鼠给予曲美他嗪20 mg/kg灌胃处理。采用苏木精-伊红染色法观察各组大鼠心肌组织情况,以速率法对肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)等心肌酶指标水平进行测定;采用DNA原位末端标记(TUNEL)法检测心肌细胞凋亡情况,并应用免疫组织化学法检测心肌组织中Caspase-3、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)蛋白表达水平;通过荧光分光光度计测定荧光强度来体现Calpain活性,并采用蛋白质印迹法测定焦亡相关蛋白表达水平[核昔酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)、Caspase-1 P10蛋白、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和白细胞介素1 β (IL-1 β)]。结果:Sham组大鼠心肌细胞核清晰可辨,心肌纤维整齐排列,胞浆均匀着色;模型组大鼠心肌细胞核浓缩,心肌纤维排列混乱,细胞变性呈空泡状,且可伴有炎症细胞浸润;曲美他嗪干预组大鼠心肌细胞间质呈轻度水肿,心肌纤维排列无异常。Sham组大鼠未发生心肌梗死;曲美他嗪干预组大鼠心肌梗死面积较模型组显著缩小($P<0.05$)。模型组和曲美他嗪干预组大鼠心肌酶CK、LDH水平均明显高于Sham组,其中曲美他嗪干预组各项心肌酶指标水平均低于模型组($P<0.05$),差异均有统计学意义。Sham组中可见少量心肌细胞凋亡,模型组中心肌细胞呈弥漫分布,凋亡数量明显增多;经曲美他嗪干预后,心肌细胞凋亡明显减少。与Sham组相比,模型组大鼠Caspase-3蛋白表达水平明显升高,Bal-2蛋白水平明显降低($P<0.05$);与模型组相比,曲美他嗪干预组大鼠Caspase-3蛋白表达水平明显降低,Bal-2蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),差异均有统计学意义。模型组大鼠缺血/再灌注(I/R)心肌细胞Calpain活性明显高于Sham组和曲美他嗪干预组,差异有统计学意义($P<0.05$),Sham组与曲美他嗪干预组大鼠I/R心肌细胞Calpain活性的差异无统计学意义($P>0.05$)。模型组和曲美他嗪干预组大鼠NLRP3、IL-1 β 、ASC和Caspase-1 P10蛋白表达水平均明显高于Sham组,曲美他嗪干预组各项焦亡蛋白相关水平均低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:曲美他嗪可通过抑制Calpain活性来减轻细胞凋亡,进而起到减轻心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏损伤的作用。

关键词 曲美他嗪;心肌缺血再灌注损伤;钙蛋白酶;细胞凋亡

Regulation of Trimetazidine on Calpain in Rats with Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Its Mechanism of Action on Cell Apoptosis[△]

HE Wenfeng, XUE Cheng, ZHENG Jiankang, SHUAI Zhuang, YUE Rongchuan (Laboratory of Cardiovascular Diseases, Dept. of Cardiology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Sichuan Nanchong 637000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the regulation of trimetazidine on calpain in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury and its mechanism of action on cell apoptosis. **METHODS:** Thirty SD rats were randomly divided into the Sham operation group (Sham group), model group, and trimetazidine intervention group via the random number table method, with 10 rats in each group. Rats in the Sham group were only sutured but not subjected to coronary artery ligation. Rats in the remaining two groups were all modeled by surgical ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) of the rat myocardium. During the modeling, the Sham group and model group were treated with intragastric administration of 0.9% normal saline, while the trimetazidine intervention group was treated with intragastric administration of 20 mg/kg trimetazidine. Myocardial tissue of rats in each group was observed by Hematoxylin and Eosin staining, and the levels of myocardial enzymes such as creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured by rate method. The apoptotic status of myocardial cells was detected by DNA

[△] 基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81600232);川北医学院附属医院院级课题(No. 2019IC036)

* 主治医师,硕士。研究方向:动脉粥样硬化发病机制。E-mail:physician_hwf@163.com

in situ end labeling (TUNEL) method, and the expression levels of Caspase-3 and B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) proteins in myocardial tissues were detected by immunohistochemistry. Calpain activity was demonstrated by fluorescence intensity determination with a fluorescence spectrophotometer and expression levels of pyrophosphate-related proteins [nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), Caspase-1 P10 protein, apoptosis-related macular protein (ASC), and interleukin-1 β (IL-1 β)] by Western blotting. RESULTS: In the Sham group, the nuclei of myocardial cells were clear and distinguishable, the myocardial fibers were arranged neatly, and the cytoplasm was stained evenly. In the model group, the nuclei of myocardial cells were condensed, and the myocardial fibers were disorganized; the cells became denatured and became vacuolar, which could be accompanied by inflammatory cell infiltration. In the trimetazidine intervention group, myocardial intercellular substance showed mild edema, and there was no abnormal arrangement of myocardial fibers. No myocardial infarction was observed in the Sham group. The myocardial infarct size of rats in the trimetazidine intervention group was significantly smaller than that of model group ($P<0.05$); the levels of myocardial enzyme CK and LDH in the model group and the trimetazidine intervention group were significantly higher than those in Sham group, and the myocardial enzyme indicators in the trimetazidine intervention group were lower than those in the model group ($P<0.05$), with statistically significant differences. A small amount of cardiomyocyte apoptosis was observed in Sham group, while the cardiomyocytes in the model group were distributed diffusely, and the number of apoptosis increased significantly. After trimetazidine intervention, myocardial cell apoptosis decreased significantly. The expression level of Caspase-3 protein in the model group was significantly higher than that in the Sham group, and the level of Bal-2 protein decreased significantly ($P<0.05$); compared with the model group, the expression level of Caspase-3 protein in the trimetazidine intervention group was lower, and the expression level of Bal-2 protein was higher ($P<0.05$), with statistically significant differences. Calpain activity in ischemia/reperfusion (I/R) myocardial cells of rats in the model group was significantly higher than that in the Sham group and trimetazidine intervention group, with statistically significant differences ($P<0.05$). There was no significant difference in Calpain activity in I/R myocardial cells of rats between the Sham group and trimetazidine intervention group ($P>0.05$). The expression levels of NLRP3, IL-1 β , ASC and Caspase-1 P10 protein in the model group and trimetazidine intervention group were significantly higher than those in the Sham group, and the levels of pyroptosis-related proteins in the trimetazidine intervention group were lower than those in the model group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Trimetazidine can reduce cell apoptosis by inhibiting Calpain activity, and then play a role in alleviating the cardiac injury of rats with myocardial ischemia-reperfusion injury.

KEYWORDS Trimetazidine; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Calpain; Apoptosis

心肌梗死是导致心血管疾病人群死亡的主要原因,冠状动脉介入治疗和动脉旁路植入术等是目前临床治疗该类患者的主要措施,上述手术治疗措施虽可在短时间内快速开通患者的闭塞血管,但也会明显增加患者发生心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)的风险^[1-2]。目前,关于 MIRI 的具体发生机制尚未完全明确,多数研究结果认为钙离子超载、血管内皮细胞损伤、炎症反应、细胞自噬和细胞凋亡等因素与 MIRI 的发生密切相关^[3]。分子心血管病学研究结果已证实,细胞凋亡是心肌细胞损伤的主要形式,而此过程的发生与多种基因的调控作用密切相关^[4-5]。钙蛋白酶(Calpain)是一种普遍存在于哺乳动物细胞内的钙依赖的蛋白酶,当心肌缺血/再灌注(I/R)发生时,细胞内 Calpain 会被异常激活,进而促使凋亡物质大量释放,加重心肌细胞损伤^[6-7]。卢圣忠^[8]的研究结果发现,Calpain 对小鼠心肌细胞凋亡和心肌功能障碍的发生具有明显的促进作用,而抑制 Calpain 活性则可起到减轻 I/R 损伤的效果。大量临床证据已证实,曲美他嗪对 MIRI 具有明确的治疗效果,但其具体改善

机制尚不明确。本研究推测曲美他嗪可能是通过调控 Calpain 和细胞焦亡过程来起到减轻心肌损伤的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:雄性 SD 大鼠 30 只,SPF 级,体重 200~250 g,由北京大学医学部实验动物科学部提供[合格证号:SCXK(京) 2016_0008]。

1.1.2 仪器:DY89-11 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);VCX130PB 型超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司);ES315 型自动蒸气消毒柜(日本 Tomy 公司);VS-1300L-U 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司);80-2 型低速台式离心机(上海百典仪器设备有限公司);Infinite M200 型多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司);LSM 780 型高灵敏度激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司);荧光分光光度计(美国 Cary Eclipse VARIAN 公司);电子天平(德国 Sartorius 公司);显微外科器械(宁波市成和显微器械厂);日立 7060 型全自动生化分析仪

(日本 Hitachi 公司)。

1.1.3 药品与试剂:盐酸曲美他嗪缓释片[施维雅(天津)制药有限公司,国药准字 H20100077,规格:35 mg],用蒸馏水配置为 30 mg/L 的混悬液备用。大鼠肌酸激酶(CK)测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司,批号:20200629);大鼠乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20200629);无菌磷酸缓冲盐溶液(PBS,武汉博士德生物工程有限公司,批号:16A20B21);DNA 原位末端标记(TUNEL)凋亡检测试剂盒(上海金畔生物科技有限公司,货号:22849);Caspase-1 活性检测试剂盒(美国 Biomol 公司,货号:KLPR2107);白细胞介素(IL)1 β 检测试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司,货号:FN-EM1624);核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)抗体、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)抗体(美国 Abcam 公司,货号:KLPR2107、2257223)。

1.2 方法

1.2.1 动物的喂养:在室内自然照明条件下对大鼠进行 7 d 适应性喂养,实验前后的动物喂养条件保持一致,本研究过程中对实验动物的处理均严格遵守动物伦理学中的相关规定。

1.2.2 动物分组和造模:将 30 只大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、模型组和曲美他嗪干预组。Sham 组大鼠仅置缝线,不对冠状动脉进行结扎。模型组和曲美他嗪干预组均采用手术结扎大鼠心肌冠状动脉左前降支(LAD)的方法进行造模,具体如下,采用戊巴比妥对大鼠进行麻醉,而后将其以仰卧位固定于操作台之上,并以加热等进行照射,确保直肠温度始终处于 36.5~37.5℃。气管插管后,以小型啮齿动物呼吸机进行通气,呼吸频率为 75 次/min,呼吸比为 1:1,潮气量为 20 mL;以左胸阔为手术切口,打开胸腔,于胸骨左边缘 2 mm 处和第二、第三肋骨点之间进行纵向切口,并将心包切开,使心脏外露;使用 8/0 尼龙线穿过 LAD 近端部分下方的心肌, LAD 系活结,并外露结扎末端;LAD 闭塞 30 min,打开活结恢复血流 2 h,而后使用捆扎前放置好的缝合线将大鼠胸部缝合。采用心电图对造模大鼠进行实时监测,若心电图 ST 段抬高 ≥ 0.3 mV 或 T 波迅速升高、局部心肌出现紫绀表示存在心肌缺血;心电图 ST 段降低或 T 波恢复至正常水平、心肌缺血区转红则表示 MIRI 模型造模成功。

1.2.3 给药方法:待造模完成进行给药,三组大鼠灌胃剂量根据成人每日常规用药剂量,按动物体表面积换算成大鼠日等效剂量。曲美他嗪干预组大鼠每日给药剂量为 20 mg/kg, Sham 组、模型组大鼠则应用相同剂量的 0.9%氯化钠溶液进行灌胃处理,1 d 1 次,持续 1 周。

1.2.4 取材:(1)大鼠血清。待再灌注结束时,采集大鼠腹主动脉血液,并于 4℃条件下以 4 000 r/min 进行离心,10 min 后,留取上清液并置于-80℃环境中待统一检测。(2)大鼠心肌组织。除伊文思蓝和氯化三苯基四氮唑法(TTC 法)染色的大鼠心脏外,其他大鼠均在收集血清样本后立即处死,切除心脏并以冷盐水进行充分洗涤后,在保持于 4%多聚甲醇中备用。

1.2.5 苏木精-伊红(HE)染色:将经 4%多聚甲醛固定 24 h 的心尖部组织进行石蜡包埋处理后,制成 5 μ m 切片,并以二甲苯、100%乙醇、75%乙醇梯度进行脱水处理后,以蒸馏水充分洗净;经苏木精染色、自来水清洗、盐酸乙醇分化处理后,浸泡于自来水中,加入伊红液,经 95%乙醇、100%乙醇、二甲苯依次处理后,以中性树胶进行封固,并于显微镜下观察组织情况。

1.2.6 心肌梗死面积估算:采用伊文思蓝和 TTC 双染色法确定大鼠心肌梗死和缺血区域。首先将切片置于 1% TTC 溶液中,并于 37℃条件下进行孵育,时间为 15 min。判断标准:非梗死区呈红色,梗死区不染色。使用数码相机拍摄照片,并通过专业图像分析软件(Sigma ScanPro v4.0,美国 Ashburn 公司)对心肌梗死面积的比例进行计算。梗死区域为心肌中未被 TTC 染色的灰白区域;非梗死心肌呈红色,红色和灰白色交界处为缺血区。以缺血区与左心室(LV)的百分比表示梗死危险区,以梗死区域占缺血区的百分比表示心肌梗死面积。

1.2.7 心肌酶检测:取部分备用血清样本,经解冻处理后,采用速率法检测血清 CK 和 LDH 水平。

1.2.8 心肌细胞凋亡检测:采用 TUNEL 法检测大鼠心肌细胞凋亡情况,取备用心肌组织,经常规脱蜡水化处理后,滴加 20 μ g/mL 蛋白酶 k,于 37℃环境中孵育 15 min,以 PBS 溶液冲洗 3 次后(每次 5 min),使用 0.3% H₂O₂ 进行封闭处理,37℃孵育 15 min,而后按照标记液与酶浓缩液 9:1 的比例配制 TUNEL 反应液(冰上操作)。制备完毕后,将组织切片放入湿盒,滴加 TUNEL 反应液,37℃避光孵育 1.5 h。PBS 溶液再次冲洗,每次 5 min,冲洗 3 次;滴加适量 Hoechst 33342 染色液,室温(25℃)、避光条件下孵育 5 min,再次使用 PBS 进行冲洗,共 3 次,每次 5 min;最后置于室温条件下风干组织切片,用抗荧光淬灭封片液封片,在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

1.2.9 Calpain 活性检测:SUC-LLVY-AMC 作为荧光底物,通过检测其降解产物 AMC 的量以评估 Calpain 活性。取部分心肌组织制备 150 μ L 心肌匀浆液,加入 1 mL 反应缓冲液,并置于 37℃恒温水浴箱中进行振荡,10 min 后再加入 150 μ L N-Scuccinyl-Leu-Tyr-AMC(500 μ mol/L),继续振荡 1 h。取 1 mL 加入比色皿中,使用荧光分光光度计进行检测,波长设定为 360 nm,测定 440 nm 处发射的荧光强度。以已知浓度的 AMC 制定标准曲线,以“ngAMC/min·(mg 蛋白)”表示检测结果。

1.3 统计学方法

用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验、单因素方差分析,多组间数据的比较以单因素方差(ANOVA)进行分析,组间两两比较用 SNK-*q* 检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

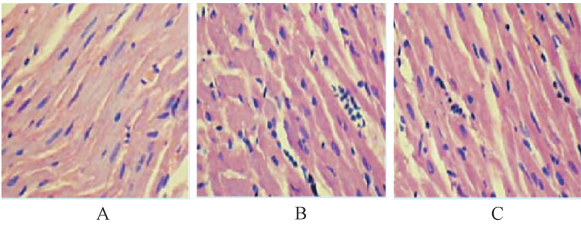
2 结果

2.1 各组大鼠心肌细胞 HE 染色结果

Sham 组大鼠心肌细胞核清晰可辨,心肌纤维整齐排列,胞浆均匀着色;模型组大鼠心肌细胞核浓缩,心肌纤维排列混乱,细胞变性呈空泡状,且可伴有炎症细胞浸润;曲美他嗪干预组大鼠心肌细胞间质轻度水肿,心肌纤维排列正常,见图 1。

2.2 各组大鼠心肌损伤程度比较

Sham 组大鼠未发生心肌梗死;曲美他嗪干预组大鼠心肌



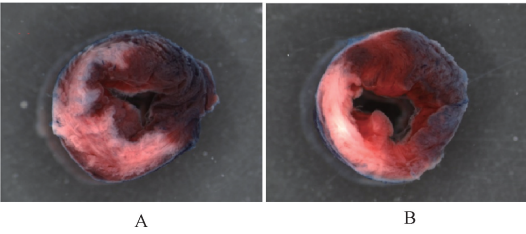
A. Sham 组; B. 模型组; C. 曲美他嗪干预组

A. Sham group; B. model group; C. trimetazidine intervention group

图 1 各组大鼠心肌细胞 HE 染色结果 (×400)

Fig 1 HE staining results of myocardial cells of rats in each group (×400)

梗死面积为 (13.53±4.18)%, 较模型组的 (25.87±6.85)% 显著缩小, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 模型组和曲美他嗪干预组大鼠心肌酶 CK、LDH 水平明显高于 Sham 组, 其中曲美他嗪干预组各项心肌酶指标水平均低于模型组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 提示曲美他嗪干预可明显减轻 I/R 损伤, 见图 2—3。

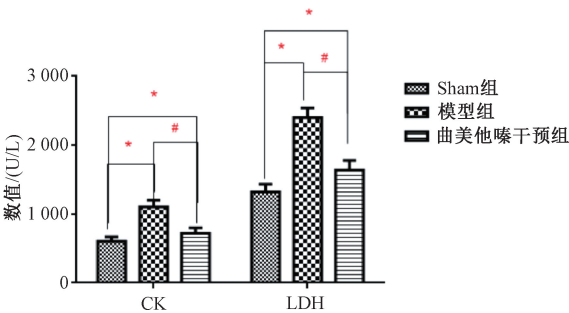


A. 模型组; B. 曲美他嗪干预组

A. model group; B. trimetazidine intervention group

图 2 模型组和曲美他嗪干预组小鼠心脏伊文思蓝和 TTC 染色结果

Fig 2 Evans Blue and TTC staining results of heart of mice in model group and trimetazidine intervention group



与 Sham 组对比, * $P<0.05$; 与模型组对比, # $P<0.05$

vs. Sham group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$

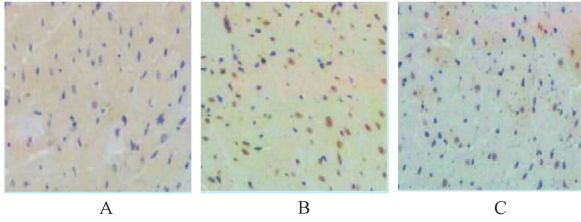
图 3 各组大鼠心肌酶指标水平比较

Fig 3 Comparison of myocardial enzyme indicators in each group

2.3 曲美他嗪对 I/R 心肌细胞凋亡的影响

Sham 组中可见少量心肌细胞凋亡; 模型组中心肌细胞呈弥漫分布, 凋亡数量明显增多; 经曲美他嗪干预后, 心肌细胞凋亡明显减少, 见图 4。模型组 Caspase-3 蛋白表达水平较

Sham 组明显升高, Bal-2 蛋白水平显著降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型组相比, 曲美他嗪干预组 Caspase-3 蛋白表达水平偏低, Bal-2 蛋白表达水平较高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 曲美他嗪干预组与 Sham 组 Caspase-3、Bal-2 蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示曲美他嗪可抑制 I/R 心肌细胞的凋亡, 起到保护作用, 见表 1。



A. Sham 组; B. 模型组; C. 曲美他嗪干预组

A. Sham group; B. model group; C. trimetazidine intervention group

图 4 各组大鼠心肌细胞凋亡情况

Fig 4 Cardiomyocyte apoptosis in each group

表 1 各组大鼠 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达灰度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of gray values of Bcl-2 and Caspase-3 protein expression among different groups ($\bar{x}\pm s$)

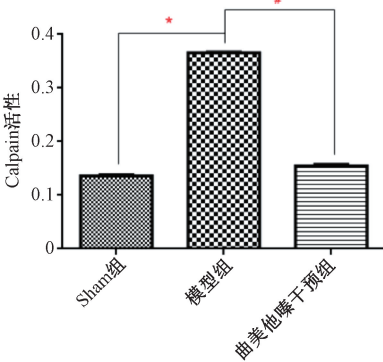
组别	Caspase-3	Bal-2
Sham 组 (n=10)	109.04±8.26	163.37±29.36
模型组 (n=10)	136.04±3.27 *	114.05±13.06 *
曲美他嗪干预组 (n=10)	115.08±9.71 #	151.42±9.58 #

注: 与 Sham 组对比, * $P<0.05$; 与模型组对比, # $P<0.05$

Note: vs. Sham group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$

2.4 各组大鼠 I/R 心肌细胞 Calpain 活性比较

模型组大鼠 I/R 心肌细胞 Calpain 活性明显高于 Sham 组和曲美他嗪干预组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); Sham 组与曲美他嗪干预组大鼠 I/R 心肌细胞 Calpain 活性的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示曲美他嗪对 I/R 心肌细胞的 Calpain 活性具有明显的抑制作用, 见图 5。



与 Sham 组对比, * $P<0.05$; 与模型组对比, # $P<0.05$

vs. Sham group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$

图 5 各组大鼠 I/R 心肌细胞 Calpain 活性比较

Fig 5 Comparison of Calpain activity in I/R myocardial cells among different groups

3 讨论

多数学者认为, 心肌细胞凋亡与 MIRI 的发生存在着密切

联系,心肌细胞凋亡可加速心脏结构重构,并对心肌梗死面积也有着一定的影响,而 MIRI 的发生也会导致心肌细胞凋亡的发生^[9-10]。有报道指出,再灌注可有效阻止心肌坏死的进一步加剧,但无法阻止已坏死的心肌细胞发生凋亡^[11]。曲美他嗪是欧洲心脏学会专家组推荐使用的抗心绞痛类药物,可有效维护细胞内环境稳定,维持细胞在缺氧缺血状态下的能量代谢,对 MIRI 所致的心肌损伤具有明确改善效果^[12-13]。

由于 SD 大鼠的遗传基因与人体的相似率较高,且 LAD 是大鼠左心主要的供血管,故本研究以 SD 大鼠为研究对象,并通过对其 LAD 进行结扎构建 MIRI 模型。本研究结果显示,模型组大鼠心肌细胞发生明显改变,且伴有炎症细胞浸润;而曲美他嗪干预组大鼠心肌纤维排列无明显异常,仅细胞间质发生轻度水肿,且曲美他嗪干预组大鼠心肌梗死面积明显小于模型组,其心肌酶 CK/LDH 水平低于模型组。这表明曲美他嗪可明显减轻心肌细胞损伤。当 MIRI 发生时,可导致细胞膜通透性增加,继而导致心肌胞浆中的酶类大量释放进入血液,其含量的改变可间接反映心肌细胞的损伤程度,尤其是 CK/LDH 这 2 种特异性酶,现已成为临床评估心肌损伤程度和心肌梗死范围的定量指标^[14]。此外,Bal-2、Caspase-3 蛋白均与细胞凋亡密切相关,其中 Bal-2 被称为抗凋亡蛋白,对多种因素所致的细胞凋亡具有明显的抑制作用^[15];Caspase-3 可促进细胞凋亡^[16]。本研究结果显示,曲美他嗪干预组细胞凋亡较模型组明显减少,Caspase-3 蛋白表达水平较模型组明显降低,Bal-2 蛋白表达水平较模型组显著升高,表明曲美他嗪治疗可有效减少心肌细胞凋亡。由此可见,曲美他嗪对 MIRI 的临床疗效确切,与既往研究结论相符。

Calpain 在人体的多种生理病理过程中起着重要作用^[17-18]。研究结果显示,抑制 Calpain 活性可对小鼠心脏 I/R 损伤起到细胞保护作用^[19]。也有研究结果发现,在 Calpain 转基因小鼠的心肌细胞中,NLRP3 炎症小体被活化,进而导致心功能不全的发生,提示 Calpain 的表达与心肌细胞焦亡存在一定的联系^[20]。卢圣忠^[8]也得出了类似的结论,即 Calpain 过表达会进一步加重心肌细胞损伤,但值得注意的是,Calpain 对焦亡通路起到单向激活的作用,但不受 NLRP3/ASC、Caspase-1 通路的反馈调节。本研究结果显示,模型组大鼠 I/R 心肌细胞 Calpain 活性明显高于 Sham 组和曲美他嗪干预组,表明 MIRI 的发生可导致 Calpain 活性增强。而 Sham 组与曲美他嗪干预组大鼠 I/R 心肌细胞 Calpain 活性的差异无统计学意义($P>0.05$),表明曲美他嗪对 Calpain 的活性具有明显的抑制作用。

综上所述,曲美他嗪可通过抑制 Calpain 活性来抑制心肌细胞凋亡和焦亡,从而起到心肌损伤的作用。本研究还存在不足之处,未能明确曲美他嗪治疗 MIRI 的最佳剂量,且本研究仅为动物实验,仍需进一步研究深入探讨。

参考文献

[1] ZHAO T J, WU W, SUI L H, et al. Reactive oxygen species-based nanomaterials for the treatment of myocardial ischemia reperfusion injuries[J]. *Bioact Mater*, 2022, 7: 47-72.

[2] GUNATA M, PARLAKPINAR H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury: pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment [J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39(2): 190-217.

[3] NIE C Q, DING X, A R, et al. Hydrogen gas inhalation alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by the inhibition of oxidative stress and NLRP3-mediated pyroptosis in rats[J]. *Life Sci*, 2021, 272: 119248.

[4] 周刚, 吴辉, 刘滴, 等. 细胞焦亡在心肌缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(6): 524-528.

[5] 李妍怡, 李俊俊, 戈福星, 等. 心肌细胞损伤的体外模型研究新进展[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(13): 3257-3269.

[6] 宋兆峰, 陈东育, 王秀, 等. 大鼠心脏缺血再灌注损伤中 μ -钙蛋白酶通过凋亡诱导因子和 Bid 调节心肌细胞凋亡[J]. *中国心血管病研究*, 2020, 18(11): 1015-1018.

[7] WANG S, ZHOU Y, LUO Y Y, et al. SERCA2a ameliorates cardiomyocyte T-tubule remodeling via the calpain/JPH2 pathway to improve cardiac function in myocardial ischemia/reperfusion mice [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 2037.

[8] 卢圣忠. 钙蛋白酶在小鼠心肌细胞缺氧复氧损伤中的作用与机制研究[D]. 南充: 川北医学院, 2020.

[9] 蒋先训, 张凯, 张鹰. 薯蓣皂苷元对心肌缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡的影响及相关机制的分析[J]. *中国循环杂志*, 2022, 37(5): 526-532.

[10] 宋丽茹, 孙晨, 马佳乐, 等. Canopy2 对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35(2): 159-163, 169.

[11] 朱雪梅. 曲美他嗪对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠的治疗效果及对 Bcl_2、Caspase_3 蛋白表达的影响[J]. *心脑血管病防治*, 2018, 18(1): 4-6, 9, 封3.

[12] 张怀鹏, 张颖. 曲美他嗪联合阿托伐他汀对心肌梗死和心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. *中国处方药*, 2021, 19(9): 141-143.

[13] 王海涛, 黄鹏, 张明龙, 等. 芪苈强心胶囊联合曲美他嗪保护心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(5): 1163-1167.

[14] 刘耀武. 逆逆汤联合溶栓治疗急性心肌梗死缺血再灌注损伤及对患者动态心电图和 SOD、CK-MB、LDH 的影响[J]. *陕西中医*, 2019, 40(7): 858-860.

[15] 向莉, 刘飞, 陈秋, 等. 黄芪多糖通过 miR-193a-3p/STMN1 轴对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. *遵义医科大学学报*, 2022, 45(6): 727-735.

[16] LIANG H Q, LI F J, LI H X, et al. Overexpression of lncRNA HULC attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rat models and apoptosis of hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes via targeting miR-377-5p through NLRP3/caspase-1/IL-1 β signaling pathway inhibition[J]. *Immunol Invest*, 2021, 50(8): 925-938.

[17] GUAN L C, CHE Z M, MENG X D, et al. MCU up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy inhibition [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7830-7843.

[18] AHMAD S, MASJOAN JUNCOS J X, AHMAD A, et al. Bromine inhalation mimics ischemia-reperfusion cardiomyocyte injury and calpain activation in rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(1): H212-H223.

[19] 张双. Calpain 介导小鼠心肌缺血/再灌注氧化应激诱导的细胞凋亡机制研究[D]. 南充: 川北医学院, 2014.

[20] 吉晨. 靶向抑制线粒体 calpain 减轻心肌缺血再灌注损伤的作用[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.

(收稿日期:2022-09-26 修回日期:2022-10-19)