

PI3K/Akt 信号转导通路在人参皂甙 Rb1 预先给药减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用

吴洋 夏中元 赵博 侯家保 孟庆涛 刘慧敏

【摘要】 目的 探讨磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号转导通路在人参皂甙 Rb1 预先给药减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。方法 雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,采用腹腔注射链脲佐菌素的方法制备糖尿病模型,造模成功的糖尿病大鼠 48 只,饲养 8 周后,采用随机数字表法,将其随机分为 4 组($n=12$):心肌缺血再灌注组(I/R 组)、人参皂甙 Rb1 预先给药组(R 组)、人参皂甙 Rb1 预先给药 + PI3K 抑制剂渥曼青霉素组(RW 组)和渥曼青霉素组(W 组)。采用结扎左冠状动脉前降支 30 min 再灌注的方法建立心肌缺血再灌注损伤模型。RW 组和 W 组于缺血前 20 min 静脉注射渥曼青霉素 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$,R 组和 RW 组于缺血前 10 min 静脉注射人参皂甙 Rb1 40 mg/kg 。再灌注 120 min 时采集动脉血样,测定血清肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)的活性;然后处死大鼠,取心肌组织,采用四氮唑法测定心肌梗死面积;采用 TUNEL 染色法检测心肌细胞凋亡,计算心肌细胞凋亡指数(AI);采用 Western blot 法测定心肌组织 Akt 和磷酸化 Akt(p-Akt)表达。结果 与 I/R 组比较,R 组血清 CK 和 LDH 活性、心肌梗死面积和心肌细胞 AI 降低,心肌组织 p-Akt 表达上调($P<0.05$);与 R 组比较,RW 组血清 CK 和 LDH 活性、心肌梗死面积和心肌细胞 AI 升高,心肌组织 p-Akt 表达下调($P<0.05$)。结论 人参皂甙 Rb1 预先给药通过 PI3K/Akt 信号转导通路减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。

【关键词】 1-磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 人参皂甙; 心肌再灌注损伤; 糖尿病

Role of PI3K/Akt signal pathway in ginsenoside Rb1 pretreatment-induced attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats WU Yang, XIA Zhong-yuan, ZHAO Bo, HOU Jia-bao, MENG Qing-tao, LIU Hui-min. Department of Anesthesiology, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China
Corresponding author: XIA Zhong-yuan, Email: xiazhongyuan2005@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein-serine-threonine kinases (Akt) signal pathway in ginsenoside Rb1 pretreatment-induced attenuation of myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury in diabetic rats. **Methods** Male SD rats weighing 250-300 g were used in this study. Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal streptozotocin and confirmed by fasting blood glucose ≥ 16.7 mmol/L. Eight weeks after diabetes mellitus was induced, 48 rats were randomly divided into 4 groups ($n=12$ each): group myocardial I/R (group I/R); group ginsenoside Rb1 (group R); group ginsenoside Rb1 + wortmannin (PI3K inhibitor) (group RW) and group wortmannin (group W). Myocardial I/R was induced by occlusion of anterior descending branch of left coronary artery for 30 min followed by 120 min reperfusion. Ginsenoside Rb1 40 mg/kg was injected iv at 10 min before ischemia in groups R and RW, while in groups RW and W wortmannin 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was injected iv at 20 min before ischemia. Arterial blood samples were collected at the end of 120 min reperfusion for determination of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) activities. The rats

were then sacrificed. The infarct size was measured by tetrazolium method. Myocardial apoptosis was detected by TUNEL and apoptotic index (the number of apoptotic myocardial cells/the total number of myocardial cells) was calculated. The expression of Akt and phosphorylated Akt (p-Akt) was determined by Western blotting. **Results** Ginsenoside Rb1 pretreatment significantly reduced the infarct size, myocardial cell apoptotic index and serum CK and LDH activities and up-regulated p-Akt expression in group R as compared with group I/R. The protective effects of ginsenoside Rb1 against myocardial I/R injury were significantly attenuated by wortmannin pretreatment in group RW compared with group R. **Conclusion** PI3K/Akt signal pathway is involved in the protective effects of ginsenoside Rb1 against myocardial I/R injury in diabetic rats.

[Key words] 1-Phosphatidylinositol 3-kinase; Protein-serine-threonine kinases; GINSENSIDE; Myocardial reperfusion injury; Diabetes mellitus

心血管疾病是糖尿病患者死亡的主要原因,糖尿病患者并发缺血性心脏疾病后,接受经皮冠状动脉介入治疗或冠状动脉旁路移植术时可导致心肌缺血再灌注损伤,但是治疗效果不及非糖尿病患者。本课题组的前期研究结果表明,人参皂甙 Rb1 可减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤^[1];其机制与激活内皮型一氧化氮合酶(eNOS),促进 NO 生成有关^[2]。心肌细胞表达 eNOS, eNOS 是生成 NO 的限速酶,且作为磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号转导通路的下游效应分子。本研究拟探讨 PI3K/Akt 信号转导通路在人参皂甙 Rb1 预先给药减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用。

材料与方法

动物选择及分组 雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,2 月龄,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。大鼠禁食 12 h 后,腹腔注射链脲佐菌素 65 mg/kg,72 h 后测定空腹血糖,连续 8 周,以后每周测定一次血糖,空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L,即为 1 型糖尿病模型制备成功。取造模成功的糖尿病大鼠 48 只,采用随机数字表法,将其随机分为 4 组($n = 12$):心肌缺血再灌注组(I/R 组)、人参皂甙 Rb1 预先给药组(R 组)、人参皂甙 Rb1 预先给药 + PI3K 抑制剂渥曼青霉素组(RW 组)和渥曼青霉素组(W 组)。

心肌缺血再灌注损伤模型的制备 腹腔注射巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉下,行气管切开后,接动物呼吸机,行机械通气。置皮下电极监测 II 导联心电图,右侧股静脉穿刺置管,用于给药。左胸第四肋间行开胸后,切除心包膜暴露心脏,距左心耳下缘 2 mm 以 6-0 尼龙线结扎左冠状动脉前降支。结扎成功的标准为:左心室变白,心电图示 ST 段抬高。结扎 30 min 后,松开结扎线以恢复血流,再灌注成功的标准为:ST 段回落,左心室恢复红润。RW 组和 W 组于

缺血前 20 min 静脉注射渥曼青霉素(批号:SI952,南通市碧云天生物技术研究)15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3],R 组和 RW 组于缺血前 10 min 静脉注射人参皂甙 Rb1(批号:110704,中国药品生物制品检定所)40 mg/kg^[2]。

指标测定 (1)再灌注 120 min 时采集动脉血样 2 ml,离心后取血清,采用 Au2700 型全自动生化分析仪(Olympus 公司,日本)检测 CK 和 LDH 的活性。(2)取完血样后,再次结扎左冠状动脉前降支,经股静脉注射 2 ml 1%伊文思蓝,非缺血区呈蓝色,取出心脏。冷冻后,垂直于心脏长轴切 2 mm 厚心肌片,置于四氮唑溶液室温孵育 15 min,缺血区心肌呈砖红色,梗死区心肌呈灰白色。照相,采用 Imag-Pro 软件(Media Cybernetics 公司,美国)分析梗死区与缺血区面积,计算心肌梗死面积(心肌梗死区 \div 缺血区 $\times 100\%$)。(3)取缺血区心肌组织,制备石蜡切片,采用 TUNEL 法(试剂盒购自美国 Roche 公司)检测心肌细胞凋亡情况。随机选取 1 张切片,光镜下($\times 400$)计数凋亡心肌细胞,细胞核呈棕黄色者为阳性细胞,每一切片选择 10 个视野,以阳性心肌细胞数占心肌细胞总数的百分比作为心肌细胞凋亡指数(AI)。(4)取 100 mg 左心室缺血区心肌组织,采用 1000 μl RIPA 裂解液裂解,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 14 000 转/min 离心 15 min,离心半径 5 cm,取上清,采用 Bradford 方法测定蛋白浓度。免疫印迹时加上样缓冲液,并煮沸 5 min,然后 10%分离胶/5%积层胶上进行电泳,应用电转仪将电泳分离后的蛋白转移至 NC 膜上。TBST 洗涤,5 min $\times 3$,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,然后用兔抗鼠 Akt 和磷酸化 Akt (p-Akt)单克隆抗体(稀释度 1:1000,Cell Signal 公司,美国)分别 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日用 HRP 标记的羊抗兔二抗(稀释度 1:2000,Cell Signal 公司,美国)室温孵育 1 h,ECL 显影。采用凝胶成像系统(UVP 公司,美国)进行分析,以目的蛋白条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值的比值反映 Akt 和 p-Akt 的表达。

统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与 I/R 组比较,R 组血清 CK 和 LDH 的活性、心肌梗死面积和心肌细胞 AI 降低 ($P < 0.05$);与 R 组比较,RW 组血清 CK 和 LDH 的活性、心肌梗死面积和心肌细胞 AI 升高 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 四组大鼠心肌梗死指标的比较($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	CK (U/L)	LDH (U/L)	心肌梗死面积 (%)	心肌细胞 AI (%)
I/R 组	2264 ± 201	2097 ± 310	53 ± 6	31 ± 5
R 组	1574 ± 295 ^a	1468 ± 258 ^a	42 ± 7 ^a	26 ± 3 ^a
RW 组	2389 ± 177 ^b	2154 ± 22 ^b	56 ± 7 ^b	31 ± 4 ^b
W 组	2366 ± 449 ^b	2217 ± 344 ^b	54 ± 6 ^b	34 ± 4 ^b

注:与 I/R 组比较,^a $P < 0.05$ 与 R 组比较,^b $P < 0.05$

4 组大鼠心肌组织 Akt 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 I/R 组比较,R 组心肌组织 p-Akt 表达上调 ($P < 0.05$);与 R 组比较,RW 组心肌组织 p-Akt 表达下调 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 四组大鼠心肌组织 Akt 和 p-Akt 表达水平的比较
($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	Akt	p-Akt
I/R 组	108 ± 18	90 ± 13
R 组	114 ± 20	154 ± 33 ^a
RW 组	114 ± 34	97 ± 15 ^b
W 组	109 ± 28	73 ± 17 ^b

注:与 I/R 组比较,^a $P < 0.05$ 与 R 组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

本研究参照课题组的前期研究[1-2],采用腹腔注射链脲佐菌素的方法制备大鼠糖尿病模型,结果表明,造模后大鼠血糖 ≥ 16.7 mmol/L,提示糖尿病模型制备成功。

糖尿病并发心血管病与病程有关,因此本研究于糖尿病模型制备成功后 8 周制备心肌缺血再灌注损伤模型。CK 和 LDH 在心肌细胞损伤时,释放入血,因此血 CK 和 LDH 的活性可反映心肌细胞的损

伤程度。本研究结果表明,I/R 组心肌梗死灶明显,血 CK 和 LDH 的活性升高,提示糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤模型制备成功。渥曼青霉素是 PI3K 的特异性抑制剂,可以抑制 PI3K 的激活,渥曼青霉素和人参皂甙 Rb1 剂量及给药时点,均参照本课题组前期研究[2]及文献[3]。

PI3K 可磷酸化肌醇环上的 3 位羟基,生成三磷酸磷脂酰肌醇,三磷酸磷脂酰肌醇作为第二信使,使 Akt 磷酸化后激活。Akt 可激活 eNOS,促进心肌细胞合成 NO,产生心肌保护作用[4]。

本研究结果提示,人参皂甙 Rb1 预先给药通过 PI3K/Akt 信号转导通路减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。人参皂甙 Rb1 具有和性激素类似的结构,可作为性激素受体的配体[5]。性激素受体激活时可激活 PI3K/Akt 信号转导通路[6]。推测性激素受体介导了人参皂甙 Rb1 预先给药减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。

综上所述,人参皂甙 Rb1 预先给药通过 PI3K/Akt 信号转导通路减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤。

参 考 文 献

[1] 张力,夏中元. 人参皂苷 Rb1 预处理对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用. 中国医药导刊,2010,12(3):446-449.

[2] 张力,夏中元,吴洋,等. 一氧化氮在人参皂甙 Rb1 预先给药减轻糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用. 中华麻醉学杂志,2010,30(10):1168-1171.

[3] Shinohara T, Takahashi N, Ooe T, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of akt, an essential signal for hyperthermia-induced heat-shock protein 72, is attenuated in streptozotocin-induced diabetic heart. Diabetes,2006,55(5):1307-1315.

[4] Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, et al. Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. Cardiovasc Res,2006,72(1):152-162.

[5] Yu J, Eto M, Akishita M, et al. Signaling pathway of nitric oxide production induced by ginsenoside Rb1 in human aortic endothelial cells: a possible involvement of androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun,2007,353(3):764-769.

[6] Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, et al. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. J Biol Chem,2001,276(5):3459-3467.

(收稿日期:2011-12-27)

(本文编辑:刘玉华)