

文章编号 1006-8147(2018)02-0116-06

论 著

曲美他嗪预处理对缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡的抑制及机制研究

熊 果, 马康华

(四川省宜宾市第一人民医院心血管内科, 宜宾 644000)

摘要 目的:探讨曲美他嗪预处理对缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用及其可能机制。方法:实验大鼠60只被随机分为假手术组(Sham)、缺血再灌注组(I/R)及预处理缺血再灌注组(T+I/R)各20只,除Sham组外各组缺血45 min,再灌注180 min建模,后用TUNEL法检测各组心肌细胞凋亡;免疫组化检测p-CREB蛋白表达,免疫荧光检测Bcl-2与Caspase-3蛋白表达;RT-PCR法检测CREB、Bcl-2及Caspase-3基因表达,比较各组结果。结果:(1)I/R组细胞凋亡最多,T+I/R组细胞凋亡明显减少,但仍多于Sham组($P < 0.05$);(2)I/R组表达CREB最少、T+I/R组最高、Sham组居中($P < 0.05$);(3)Sham组p-CREB少量表达、I/R组增加、T+I/R组显著增加($P < 0.05$);(4)Sham组Bcl-2高表达、I/R组低表达、而T+I/R组居中($P < 0.05$);(5)I/R组Caspase-3表达显著上调、T+I/R组显著下调、Sham组最低($P < 0.05$)。结论:曲美他嗪预处理能显著抑制缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡,其机制可能与其活化CREB,上调p-CREB及Bcl-2的表达,下调Caspase-3的表达有关。

关键词 心肌;缺血/再灌注损伤;细胞凋亡;曲美他嗪;环磷酸腺苷反应蛋白结合元件;Bcl-2;Caspase-3;大鼠

中图分类号 R54

文献标志码 A

Inhibiting effect of preconditioning by trimetazidine on apoptosis of cardiocyte and its mechanism in rats during ischemia-reperfusion injury

XIONG Guo, MA Kang-hua

(Department of Cardiology, The First People's Hospital of Yibin City in Sichuan Province, Yibin 644000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the inhibiting effect and possible mechanism of preconditioning by trimetazidine (TMZ) on apoptosis of cardiocyte in rats during ischemia-reperfusion injury. **Methods:** A total of 60 SD rats were randomly divided into sham group, ischemia-reperfusion group (I/R group), preconditioning group by TMZ (T+I/R group) with 20 rats in each group. The models of ischemia-reperfusion injury were constructed after keeping ischemia for 45 min and followed by reperfusion for 180 min after feeding the rats for 14 days for each group. TUNEL stain was adopted to detect the apoptosis of myocardial cells of each group. Immunohistochemistry was used to check the expression of phosphated cAMP-response element binding (p-CREB) protein and immunofluorescence technique was used to analyze the levels of Bcl-2 and Caspase-3 proteins. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was adopted to detect mRNA levels of Bcl-2, Caspase-3 and cAMP-response element binding (CREB). **Results:** (1)The apoptosis index (AI) of cardiocytes of I/R group was higher than that of the other two groups ($P < 0.05$). The AI of cardiocytes of T+I/R group was higher than that of sham group ($P < 0.05$). (2)The expression of CREB protein in I/R group was lower than that in sham group. The expression of CREB protein in T+I/R group was higher than that in sham group ($P < 0.05$). (3)The expression of p-CREB protein in sham group was lower than that in I/R group, and the expression of p-CREB protein was significantly increased in T+I/R group compared with I/R group ($P < 0.05$). (4)The expression of Bcl-2 protein was the highest in sham group, and lowest in I/R group. The expression of Bcl-2 in T+I/R group was significantly increased compared with I/R group but lower compared with sham group (all $P < 0.05$). (5)Compared with I/R group, the expression of Caspase-3 was significantly decreased in T+I/R groups ($P < 0.05$) (but higher than that in Sham group). **Conclusion:** The preconditioning by TMZ has the inhibitory effect on apoptosis of cardiocyte in rats during ischemia-reperfusion process. And its possible mechanisms may be that CREB, p-CREB and Bcl-2, and Caspase-3 are activated, up-regulated and down-regulated by TMZ, respectively.

Key words myocardium; ischemia-reperfusion injury; apoptosis; trimetazidine; CREB; Bcl-2; Caspase-3; rat

本文涉及的环磷酸腺苷反应蛋白结合元件(cAMP-response element binding protein, CREB)是真核细胞内核转录调节因子^[1],受多因素激活,G蛋白-环化单磷酸腺苷-蛋白激酶A系统(G蛋白-

cAMP-PKA)途径是CREB的经典调节通路,活化的PKA转入细胞核,磷酸化激活CREB;pser133-CREB是CREB的活性形式,p-CREB形成同源二聚体(有活性)或与其他蛋白形成异源二聚体(无活性),再与真核生物启动子中的CRE结合,并在其辅因子(CREB结合蛋白)协同作用下,通过调控凋亡

作者简介 熊果(1976-),男,主治医师,硕士,研究方向:冠心病发病机制;通信作者:马康华,E-mail: markcq111@yahoo.com.cn。

相关基因(如 Bcl-2, Caspase3 等)的表达,调控细胞凋亡^[2-3]。本研究通过构建大鼠缺血/再灌注心肌模型,旨在探讨曲美他嗪(trimetazidine, TMZ)抑制缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡的效果及其与 CREB、p-CREB、Bcl-2 及 Caspase-3 的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 成年雄性 SD 大鼠 60 只, 质量 260~300 g (重庆医科大学实验动物中心提供), 随机分成假手术组(Sham 组)、缺血/再灌注组(I/R 组), TMZ 预处理缺血/再灌注组(T+I/R 组), 3 组各 20 只。

1.2 动物模型构建 将大鼠固定在手术台上, 用 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), 气管插管后用小动物专用呼吸机辅助通气(频率 $80\text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$; 呼吸比 1:1; 潮气量 $4\sim5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$); 然后在其胸骨左缘 3、4 肋间打开胸腔暴露心脏, 在肺动脉圆锥与左心耳之间距主动脉根部约 3 mm 处用 6-0 带针丝线结扎左前降支(LAD)(垫以 3 mm 长橡皮筋), 待缺血 45 min 后松开结扎线, 再灌注 180 min。建模成功标准: 结扎 LAD 后缺血区立即变苍白, 心电图 II 导联 ST 段出现弓背样向上抬高, 表示心肌缺血; 松解 LAD 后缺血区由苍白渐变为红润, 抬高的 ST 段下降 1/2 以上, 表示再灌注成功, Sham 组只穿线不结扎。

T+I/R 组大鼠的曲美他嗪预处理方法: 本组在实验模型构建前给予曲美他嗪 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 喂养大鼠 14 d, 然后按上述办法造模。另外, 所有大鼠喂养相同专用饲料, 除 T+I/R 组灌胃曲美他嗪 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 外, Sham 组及 I/R 组灌胃等体积的生理盐水, 每天灌胃时间 15:30~16:00。

1.3 标本采集与制作 各组大鼠均在无菌条件下被分离出建模成功的心脏, 然后以冰焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水灌洗, 并剪去大血管、左右心房及右心室, 在结扎线以下将左心室分离成两部分: 一份用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 最后在 70% 乙醇中保存以备石蜡包埋切片; 在另一份中取 100 mg 左右心肌组织, 用无菌锡箔纸包裹, 经液氮冷冻 24 h 后在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存以备检测逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。

表 1 RT-PCR 引物序列、代码、碱基大小及退火温度

Tab 1 RT-PCR primer sequences, code, base sizes and annealing temperature

mRNA	引物序列(5'-3')	基因库代码	产物大小/bp	最佳退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
CREB	上: CCAGCCACAGATTGCCACATT	ASW33783	485	56
	下: TTGCTCCTCCCTGGGTAATGG	ASW33784		
Bcl-2	上: CCCTGGCATCTTCTCCTTCC	ASW33785	446	59
	下: CATCCCAGCCTCCGTTATCC	ASW33786		
Caspase-3	上: GCAGCCACAATACCATACCTC	ASW40831	333	50
	下: GCTACAGTGCTCCAACCTCTTC	ASW40832		
β -actin	上: CGGACT CAT CGT ACT CCT GCT	ASW08073	229	58.5
	下: CGTAAAGAC CTC TAT GCC AACA	ASW08074		

1.4 心肌细胞凋亡的原位末端标记分析法(TUNEL) 试剂购于武汉博士德公司。把石蜡包埋的心肌组织切片($2\text{ }\mu\text{m}$), 脱蜡至水, 然后用 3% 双氧水及甲醇处理, 再经 PBS 漂洗 $3\times5\text{ min}$, 加入蛋白酶 K 工作液常温 20 min, 再次 PBS 漂洗 $3\times5\text{ min}$ 后, 加入 TUNEL 反应液 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒避光孵育 1 h, 又以 PBS 漂洗 $3\times5\text{ min}$ 后, 在 HRP 抗体 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒中避光孵育 30 min 后循环进行 PBS 漂洗 $3\times5\text{ min}$ 、DAB 显色 8 min、PBS 漂洗 $3\times5\text{ min}$ 、苏木素复染 5~10 s, 最后以流水冲洗后脱水, 用透明、中性树胶封片。其中, 上述实验阴性对照用 PBS 代替 HRP 抗体。

心肌细胞凋亡计数方法: 在缺血再灌注损伤区随机选取 5 个非重叠高倍视野($\times400$), 计数凋亡细胞数和心肌细胞总数, 心肌细胞凋亡指数(AI)=心肌细胞凋亡数/心肌细胞总数 $\times100\%$ 。

1.5 p-CREB 蛋白表达的免疫组化分析方法 按照 SP 试剂盒说明书操作(美国 ABCAM 公司)。抗 p-CREB 抗体稀释度为 1:250, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。其中, 棕黄色颗粒即为阳性表达(p-CREB 主要在胞核中表达)。在重庆医科大学医学病理图像分析系统中进行图像分析, 用标准灰度校正后, 每个标本随机取 5 个视野, 测量平均积分光密度值(IDP), 其均值为该标本所得值。

1.6 Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白表达的免疫荧光分析方法 操作步骤严格按照试剂(Santa Cruz 公司)说明书。抗 Bcl-2 及 Caspase 抗体稀释浓度均为 1:100, 同时以 PBS 代替一抗作阴性对照。标本中加入绿色荧光二抗(1:100), 经 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育后, 加胞核染色剂, 在激光共聚焦显微镜下成像。在北航计算机医学病理图像分析系统中进行图像分析, 标准灰度校正后, 每个标本随机取 5 个视野, 测量平均积分光密度值(IDP), 其均值为该标本所得值。

1.7 CREB、Bcl-2、Caspase-3 的 mRNA 表达的 RT-PCR 分析方法 以异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法提取心肌组织总 RNA, 并且进行逆转录, 以 cDNA 作为 PCR 反应模板, β -actin 为内参。引物、目的片段长度及核酸解链温度(T_m)见表 1。

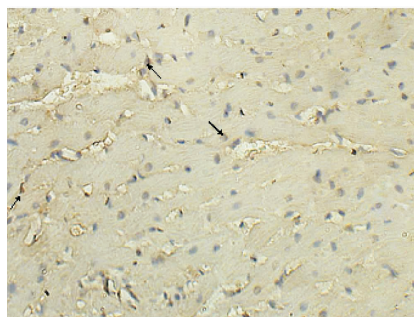
PCR 反应条件:94 ℃ 5 min (预变性),94 ℃ 50 s (变性),退火 50 s,72 ℃ 2 min(延伸),72 ℃ 5 min(再延伸),总共 35 个循环。取反应产物 10 μ L 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 凝胶成像分析系统处理,目的片段与内参 β -actin 吸光度比值为目的片段 mRNA 的相对表达量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件包处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统

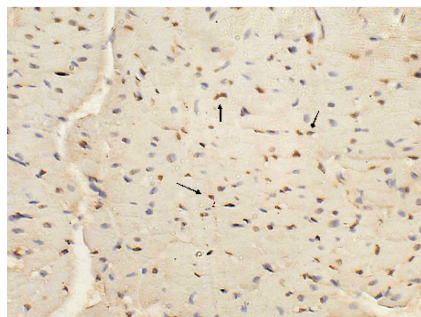
计学意义。

2 结果

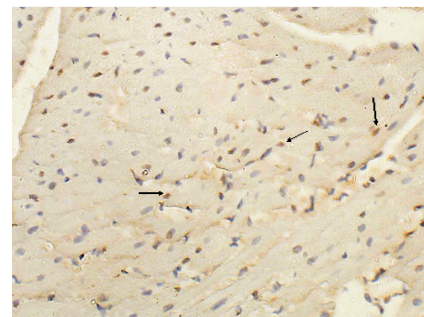
2.1 各组心肌细胞凋亡指数 Sham 组偶见心肌细胞凋亡,凋亡指数 2.20%(2.20 ± 0.15);I/R 组可见大量细胞凋亡,凋亡指数高达 36.5%(36.5 ± 2.45),与 Sham 组比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$);T+I/R 组细胞凋亡指数 16.5%(16.5 ± 1.25),高于 Sham 组($P < 0.01$),低于 I/R 组($P < 0.05$),差异均有统计学意义(图 1)。



Sham



I/R



T+I/R

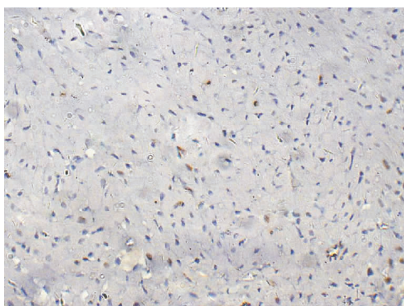
箭头所指系心肌细胞凋亡

图 1 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡($\times 400$)

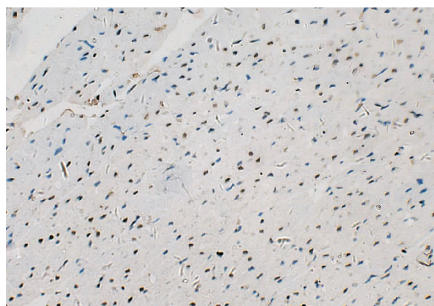
Fig 1 Cardiocyte apoptosis detected by TUNEL($\times 400$)

2.2 各组心肌 CREB、Bcl-2、Caspase-3 蛋白及 mRNA 的表达 CREB 蛋白及 mRNA 在 Sham 组蛋白有一定量表达,在 I/R 组表达最少,T+I/R 组表达最高,差异有统计学意义;p-CREB 蛋白及 mRNA 在 Sham 组少量表达,在 I/R 组表达适当增加,在 T+I/R 组表达最多($P < 0.05$)。Sham 组的 Bcl-2 在蛋白

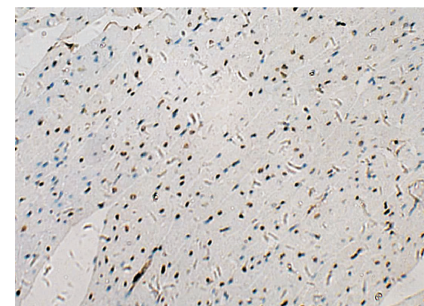
与基因水平均高表达,在 I/R 组呈低表达,在 T+I/R 组表达水平较 I/R 组显著增加($P < 0.05$),仍明显少于 Sham 组($P < 0.05$)。Sham 组的 Caspase-3 在基因及蛋白水平少量表达,在 I/R 组呈高表达,在 T+I/R 组表达水平较 I/R 组低,但仍高于 Sham 组($P < 0.05$) (图 2~5,表 2,3)



Sham



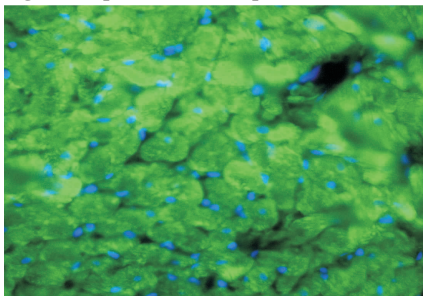
I/R



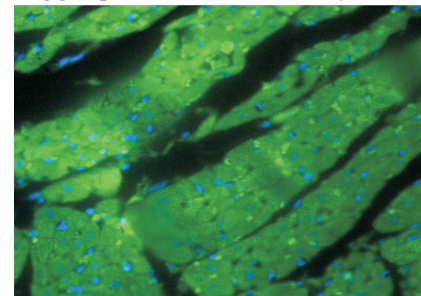
T+I/R

图 2 各组 p-CREB 免疫组化表达的比较($\times 400$)

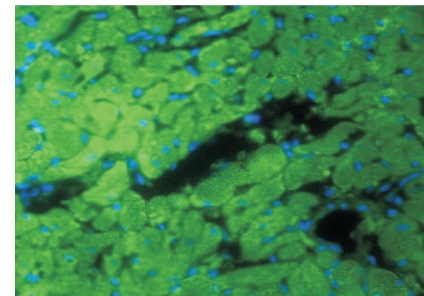
Fig 2 Comparison of the expression of CREB among groups (immunohistochemistry, $\times 400$)



Sham



I/R



T+I/R

图 3 各组 Bcl-2 免疫荧光表达的比较($\times 400$)

Fig 3 Comparison of the expression of Bcl-2 among groups (immunofluorescence, $\times 400$)

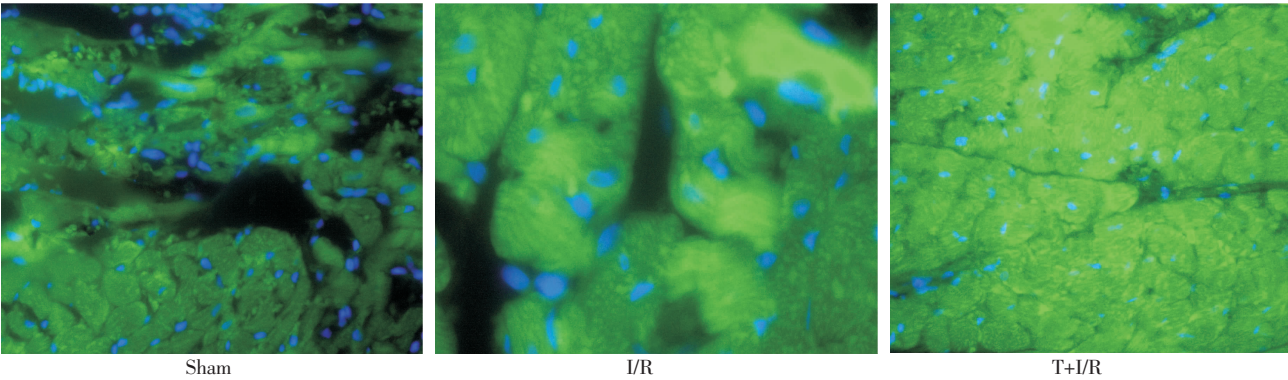
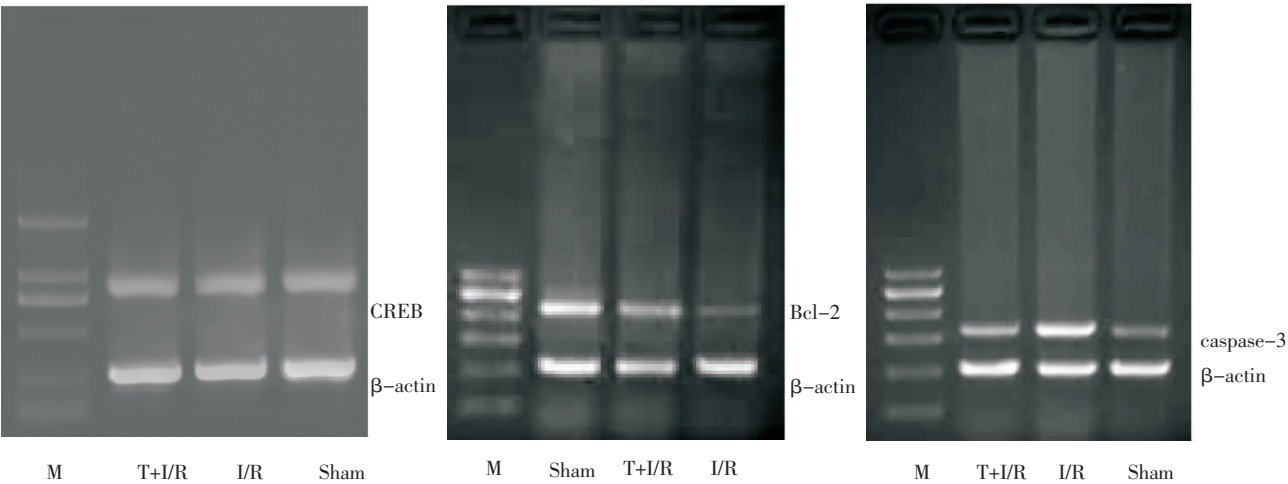


图 4 各组 Caspase-3 免疫荧光表达的比较(×400)

Fig 4 Expression of Caspase-3 among groups (immunofluorescence,×400)



M 为 maker,条带长度(bp)自上而下分别为 600, 500, 400, 300,200, 100, β-actin 为内参

图 5 各组 CREB、Bcl-2、Caspase-3 的 mRNA 表达情况

Fig 5 Comparison of the mRNA expression of CREB, Bcl-2 and Caspase-3 among groups(RT-PCR)

表 2 各组大鼠心肌细胞 CREBmRNA、p-CREB 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 2 Expression of CREBmRNA and p-CREB protein in rats cardiocyte among three groups ($\bar{x}\pm s$, %)

组别	n	CREB(mRNA)	p-CREB 蛋白
Sham	20	27.5±2.0 ^a	20.8±2.4 ^a
I/R	20	24.5±1.6	4.1±2.3
I/R+T	20	30.5±2.5 ^{ab}	28.6±2.0 ^{ab}

vs I/R group, ^aP<0.05, ^bP<0.05

表 3 各组大鼠心肌细胞 Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白及 mRNA 的比较 ($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 3 Comparison of the protein and mRNA expression of Bcl-2 and Caspase-3 in rats cardiocyte among three groups

组别	n	Bcl-2	Caspase 3	Bcl-2(mRNA)	Caspase-3(mRNA)
Sham	20	61.9±2.9 ^a	38.1±4.5 ^a	37.0±2.0 ^a	6.2±0.9 ^a
I/R	20	21.4±3.2	72.8±5.7	11.0±2.0	25.5±4.8
T+I/R	20	49.7±3.1 ^{ab}	47.2±5.1 ^{ab}	25.0±3.0 ^{ab}	14.4±3.6 ^{ab}

vs I/R group, ^aP<0.05, ^bP<0.05

3 讨论

3.1 曲美他嗪抗心肌缺血及抑制缺血/再灌注心肌细胞凋亡的效果 曲美他嗪是临床上用于缺血性心肌病的一种改善心肌能量代谢的药物,主要机制是通过抑制脂肪酸 β 氧化,促进葡萄糖氧化代谢,提高心肌细胞产能效率,从而缓解心肌缺血,减少心肌细胞凋亡^[4-6]。在心肌缺血再灌注损伤时细胞发生凋亡的机制^[7]主要包括氧化损伤、影响线粒体功能和能量代谢、钙稳态失衡等,而曲美他嗪抗心肌缺血具体环节是选择性的作用于线粒体酶-长链 3-酮酰辅酶 A-硫解酶(3-KAT)、增进葡萄糖氧化(低耗氧产能途径),提高心肌细胞氧的利用率,从而增加 ATP 的合成^[8],与此同时还能显著减轻细胞内酸中毒、减轻 Ca²⁺超载、减少自由基损害、减少细胞凋亡以及抑制白介素的抗炎效应,从而起到保护心肌细胞的作用^[9]。

本实验的短期曲美他嗪预处理对照发现,

TUNEL 法检测 Sham 组有少量心肌细胞凋亡,缺血再灌注组心肌细胞凋亡明显,而曲美他嗪预处理组心肌细胞凋亡明显减少,但仍显著高于 Sham 组,证实曲美他嗪预处理能明显抑制缺血再灌注损伤所致的心肌细胞凋亡,与 Ma 等^[10]、Şentürk 等^[5]、Liu 等^[11]的动物实验和 McCarthy 等^[12]、Zhang 等^[13]报道的患者临床研究结果一致。国内仅见个别曲美他嗪预处理对大鼠^[14-15]、家兔^[16]心肌酶学保护及提高体内自由基清除能力、减轻脂质过氧化等机制从而减轻缺血再灌注损伤的作用报道,但是还罕见涉及曲美他嗪抗凋亡的问题。

3.2 曲美他嗪抑制缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡的可能机制 尽管已经有不少研究明确了曲美他嗪预处理具有抑制缺血再灌注损伤所致的心肌细胞凋亡作用,但曲美他嗪抗凋亡的确切机制目前仍未完全释清,CREB 和 p-CREB 是否参与曲美他嗪对心肌细胞的保护作用,目前少见报道。

本实验发现,Sham 组 CREB 及 p-CREB 均有一定量表达,I/R 组 CREB 表达减少,p-CREB 表达明显减少,而曲美他嗪组 CREB 及 p-CREB 表达则明显增加,提示曲美他嗪预处理上调了 CREB 和 p-CREB 表达水平,这可能是其减少心肌细胞凋亡的主要作用机制之一。因为基础研究已经发现 p-CREB 与真核生物启动子中的 CRE 结合后在其辅因子(CREB 结合蛋白)协同作用下,能够调控凋亡相关基因(如 Bcl-2, Caspase-3 等)的表达,发挥调控细胞凋亡的作用;而本实验同时研究看到了曲美他嗪预处理组下游环节发生了 Bcl-2 上调(产生抗凋亡作用)、Caspase-3(具有致凋亡作用)下调的相应效应改变,再加上上述曲美他嗪预处理组心肌凋亡明显减少的直接结果,初步说明了曲美他嗪对 CREB 和 p-CREB 表达水平的影响就是其抗凋亡机制或者环节的假设;而 I/R 组心肌细胞 CREB 表达减少可能与该区域心肌细胞坏死或凋亡增加有关,这一组缺乏曲美他嗪预处理保护的结果就是上述结论的强有力的阴性对照说明。

上述机制可用基础研究结果解释:组织缺血再灌注后氧化应激增加主要归因于线粒体功能的损害^[17],导致细胞损伤和死亡,而死亡的主要形式有肿胀坏死、坏死性凋亡、细胞凋亡和自噬;关于凋亡,线粒体功能受损时,线粒体膜肿胀,膜通透性增高,使线粒体内促凋亡分子如抑制细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)、凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)等释放,启动细胞凋亡机制^[17]。细胞凋亡过程受多种基因的调控,其中最重要的是 Bcl-2 与 Caspase-3。Bcl-2 也

可通过干扰细胞色素 C 的释放而阻断上游 Caspase 蛋白酶的激活,抑制细胞凋亡^[18],Bcl-2 基因家族是目前公认与凋亡密切相关的基因^[19],Bcl-2 基因产物主要位于线粒体膜、核膜及内质网膜上,Bcl-2 基因可抑制许多因素引起的细胞凋亡,成为抗凋亡主要蛋白^[19]。这与本实验 Sham 组细胞凋亡最少,但是 Bcl-2 表达最高;缺血再灌注组细胞凋亡最多,但是 Bcl-2 呈低水平表达;而曲美他嗪预处理组 Bcl-2 表达虽低于 Sham 组,但明显高于缺血再灌注组的结果完全契合,这是曲美他嗪预处理减少凋亡的机制环节之二,也与 Cook 等^[20]报道相似。另外,Caspase-3 是细胞凋亡的最终执行者,一旦被激活便激发下游的级联反应,启动细胞凋亡^[21]。本研究异曲同工地发现曲美他嗪预处理能显著下调 Caspase-3 的蛋白及基因表达水平,从而使心肌细胞凋亡显著减少,强烈提示曲美他嗪抑制缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡机制之三是抑制 Caspase-3 活化,下调 Caspase-3 表达。

3.3 本实验的不足及临床应用建议 本研究仅仅是一个横断面的初步、短期预处理的实验研究,其价值具有初步阐明曲美他嗪预处理对心肌缺血再灌注损伤之心肌凋亡有抑制作用及其具有分子水平的可能机制的意义,但是因为本实验样本量偏小,尚需大样本的动物实验及基础、临床研究,进一步研究他们之间是否确切存在上下游调控关系,以及相关的具体信号通路之间是如何更加细致地实现调控的;今后还需要中长期的研究、随访进一步证明该作用是否具有持久性。临床上可以观察冠心病患者分成常规治疗组及加用曲美他嗪治疗组发生急性心肌梗死后相同处理方法的不同心肌存活、临床转归差异来加以诠释。

参考文献:

- [1] Noda T, Minami K, Kojima A, et al. Expression patterns of the activator type of cAMP-responsive element modulator in testicular germ cells of Japanese Black bulls[J]. Theriogenology, 2014,81(8):1012
- [2] Yang J, Fan Z, Yang J, et al. MicroRNA-22 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via an anti-inflammatory mechanism in rats[J]. Exp Ther Med, 2016,12(5):3249
- [3] Li W, Suwanwela N C, Patumraj S. Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NFκB, I-CAM-1, MMP-9 and caspase-3 expression[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4):4710
- [4] Yang Q, Yang K, Li A Y. Trimetazidine protects against hypoxia-reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by increasing microRNA-21 expression[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015,8(4):3735
- [5] Şentürk T, Şavun S, Avcı B, et al. Effective inhibition of cardiomyocyte apoptosis through the combination of trimetazidine and N-

- acetylcysteine in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *Atherosclerosis*, 2014,237(2):760
- [6] 郭丽蓉,孙常青.盐酸曲美他嗪对心肌缺血再灌注大鼠 Fas、FasL 基因表达的影响[J].*中国生化药物杂志*, 2014, 34(9):27
- [7] Wei B R,Young R F, Shen X, et al. Brief myocardial ischemia produces cardiac troponin I release and focal myocyte apoptosis in the absence of pathological infarction in swine[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2017,2(2):105
- [8] Tsioufis K, Andrikopoulos G, Manolis A. Trimetazidine and cardioprotection: facts and perspectives[J]. *Angiology*, 2015,66(3):204
- [9] Danikiewicz A, Szkodziński J, Hudzik B, et al. Effects of trimetazidine on interleukin-2 and interleukin-8 concentrations in patients with coronary artery disease[J].*Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(6):759
- [10] Ma N, Bai J, Zhang W, et al. Trimetazidine protects against cardiac ischemia/reperfusion injury via effects on cardiac miRNA Θ 21 expression, Akt and the Bcl2/Bax pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5):4216
- [11] Liu Z, Chen J M, Huang H, et al. The protective effect of trimetazidine on myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK and ERK signaling pathway[J]. *Metabolism*, 2016,65(3):122
- [12] McCarthy C P, Mullins K V, Kerins D M. The role of trimetazidine in cardiovascular disease: beyond an anti-anginal agent[J]. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2016, 2(4):266
- [13] Zhang N, Lei J, Liu Q, et al. The effectiveness of preoperative trimetazidine on myocardial preservation in coronary artery bypass graft patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cardiology*, 2015,131(2):86
- [14] 赵艳芳,秦永文,王学敏,等.曲美他嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24(3):324
- [15] 颜永进,张跃明,陆洋,等.曲美他嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *江苏医药*, 2011, 37(1):20
- [16] 王健,黄元伟,魏经汉,等.曲美他嗪对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].*浙江大学学报医学版*, 2003, 32(3):219
- [17] Maximilian Buja L. Mitochondria in ischemic heart disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 982:127
- [18] Li Q, Guo Y, Li X, et al. The interference of picoside II on the expressions of caspase-3 and PARP following cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010,26(3):342
- [19] Kumar P,Coltas I K,Kumar B, et al. Bcl-2 protects endothelial cells against gamma-radiation via a Raf-MEK-ERK surviving signaling pathway that is independent of cytochrome c release[J]. *Cancer Res*, 2007,67(3):1193
- [20] Cook A S, Sugden P H, Clerk A. Regulation of Bcl-2 family protein during development and in response to oxidative stress in cardiac myocyte: association with changes in mitochondrial membrane potential[J]. *Circ Res*, 1999,85:940
- [21] Sun J P, Liu J H, Recent advance of Apaf-1, Caspase-9 and apoptotic mechanisms[J]. *China J General Practice*, 2013,11(7):1102

(2017-08-16 收稿)

.....

(上接第 115 页)

- to TCR-stimulation and ConA, but not PHA in primary porcine splenocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35375
- [7] Jamall I S, Finelli V N, Que Hee S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[J]. *Anal Biochem*, 1981, 112(1): 70
- [8] Chen B, Lu Y, Chen Y, et al. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries[J]. *J Endocrinol*, 2015, 225(3): 83
- [9] Tell G, Gustincich S. Redox state, oxidative stress, and molecular mechanisms of protective and toxic effects of bilirubin on cells[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(25): 2908
- [10] Farina M, Avila D S, Da Rocha J B, et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(5): 575
- [11] Fireman E. Ultrafine and nanoparticles-induced oxidative stress: the role of heme oxygenase-1 and carbon monoxide as anti-inflammatory pathways[J]. *J Asthma*, 2012, 49(1): 8
- [12] Wang H X, Liu M, Weng S Y, et al. Immune mechanisms of concanavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(2): 119
- [13] 邢伟,孔维涵,方步武.葛鳖养阴软坚方对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用[J].*中草药*, 2010, 10(41): 1667
- [14] 寇咏梅,刘洁莹,方步武.葛鳖养阴软坚方抗小鼠血吸虫病肝纤维化及其机制的研究[J].*现代药物与临床*, 2013, 3(28): 288
- [15] 赵敏,郭娟,方步武,等.葛鳖养阴软坚方对大鼠酒精性肝损伤的预防作用[J].*时珍国医国药*, 2010, 11(21): 2887
- [16] 杨凤蕊,娄建石,方步武.葛鳖养阴软坚方抗 CCL₄ 复合因素所致大鼠肝纤维化的作用[J].*中草药*, 2011, 3(42): 530

(2017-07-11 收稿)