

基础与实验研究

黄芩苷对再灌注心肌细胞保护作用及与心肌细胞自噬的相关性

王鹏, 马军军, 杜亚明

摘要

目的: 探讨黄芩苷对再灌注心肌细胞保护作用及与心肌细胞自噬的相关性。

方法: 将 48 只大鼠随机分为 4 组 ($n=12$): 假手术组, 假手术 + 黄芩苷组, 缺血再灌注组, 黄芩苷处理组。术前 7 天每日 1 次灌胃, 建立各组模型。统计各组同时时间点的血流动力学及再灌注 45 min 后心肌梗死面积情况, 免疫印迹试验 (Western blot) 测定再灌注 30 min 后心肌微管相关蛋白 (LC3-II) 及自噬体膜标记蛋白 (Becl-1) 表达情况, 再灌注 30 min 后检测线粒体膜通道转换孔 (mPTP) 开放情况。

结果: 假手术组和假手术 + 黄芩苷组心肌梗死面积小, 不便进行比较。缺血再灌注组心肌梗死面积 (41.32 ± 1.85)%, 黄芩苷处理组心肌梗死面积 (23.30 ± 1.60)%, 两组差异有统计学意义 ($P<0.001$)。再灌注 30 min 后 LC3-II 及 Becl-1 蛋白表达量, 缺血再灌注组 (LC3-II: 1.051 ± 0.005 , Becl-1: 1.169 ± 0.002) 和黄芩苷处理组 (LC3-II: 0.863 ± 0.009 , Becl-1: 0.943 ± 0.005) 较假手术组 (LC3-II: 0.763 ± 0.007 , Becl-1: 0.647 ± 0.014) 明显增加 ($P<0.01$); 黄芩苷处理组较缺血再灌注组明显下降 ($P<0.01$)。再灌注 30 min 后烟酰胺腺嘌呤 = 核苷酸 (NAD⁺) 含量 (nmol/mg), 缺血再灌注组 (6.02 ± 0.33) 和黄芩苷处理组 (9.56 ± 0.53) 较假手术组 (11.28 ± 0.37) 明显下降 ($P<0.01$); 黄芩苷处理组较缺血再灌注组明显增加 ($P<0.01$)。

结论: 黄芩苷对正常心肌细胞自噬无影响, 但能显著减少缺血再灌注心肌梗死面积, 降低再灌注后的过度自噬发生, 其机制可能通过抑制 mPTP 开放从而减少自噬的相关诱导因素发挥作用。

关键词 黄芩苷; 心肌再灌注; 保护; 自噬;

Protective Effect of Baicalin on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury and its Correlation to Myocardial Cell Autophagy in Experimental Rats

WANG Peng, MA Jun-jun, DU Ya-ming.

Department of Cardio-thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou (121001), Liaoning, China

Corresponding Author: DU Ya-ming, Email: duyaming521@163.com

Abstract

Objective: To study the protective effect of baicalin on myocardial ischemia reperfusion injury and its correlation to myocardial cell autophagy in experimental rats.

Methods: The animal models were established by intragastric infusion at 7 days prior operation in different groups. A total of 48 rats were divided into 4 groups: Sham operation group, Sham+baicalin group, Ischemia reperfusion (IR) group and Baicalin treatment group. $n=12$ in each group. Hemodynamics at different time points and myocardial infarction (MI) size at 45 min after reperfusion were recorded; protein expressions of LC3-II and autophagy-related Becl-1 at 30 min after reperfusion were examined by Western blot analysis; the opening condition of mitochondrial membrane channel transition pore (mPTP) was detected by NAD⁺ content.

Results: The MI sizes in Sham operation group and Sham+baicalin group were too small to compare; MI sizes in IR group and Baicalin treatment group were (41.32 ± 1.85)% vs (23.30 ± 1.60)%, $P<0.001$. Protein expressions of LC3-II in IR group and Baicalin treatment group were (1.051 ± 0.005) and (0.863 ± 0.009) which were both higher than Sham operation group (0.763 ± 0.007), $P<0.01$; Becl-1 were (1.169 ± 0.002) and (0.943 ± 0.005) which were both higher than Sham operation group (0.647 ± 0.014), $P<0.01$; LC3-II and in Becl-1 expressions in Baicalin treatment group were decreased than IR group, $P<0.01$. NAD⁺ contents (by nmol/mg) in IR group

基金项目: 辽宁省省直医院临床能力建设项目 (LNCCC-D29-2015); 辽宁省科技厅博士启动项目 (20141135)

作者单位: 121001 辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院 胸心外科 (王鹏、杜亚明), 组织工程重点实验室 (马军军)

作者简介: 王鹏 硕士研究生 研究方向为冠心病的诊断与治疗 Email: 297915691@qq.com 通讯作者: 杜亚明 Email: duyaming521@163.com

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2016) 07-0701-05 doi: 10.3969/j.issn.1000-3614.2016.07.019

and Baicalin treatment group were (6.02 ± 0.33) and (9.56 ± 0.53) which were both lower than Sham operation group (11.28 ± 0.37) , $P < 0.001$; NAD⁺ content in Baicalin treatment group was increased than IR group, $P < 0.01$.

Conclusion: Baicalin had no autophagy effect in normal myocardial cells, but it may decrease the MI size and reduce excessive autophagy in myocardial cells after IR which might be related to inhibiting mPTP opening.

Key words Baicalin; Myocardial reperfusion; Protection; Autophagy

(Chinese Circulation Journal, 2016, 31: 701.)

急性心肌梗死后尽早开通梗死相关血管是挽救濒死心肌关键。然而, 缺血心肌恢复血供后, 心肌细胞损伤会加重, 甚至产生更大范围的损伤。近年研究表明, 自噬在心肌缺血再灌注过程中发挥很重要的作用^[1], 适度的自噬有利于减轻细胞损伤, 过度自噬能加重心肌细胞损伤^[2, 3], 而心肌缺血再灌注过程中自噬被过度激活^[3], 同时线粒体膜通道转换孔(mPTP)开放能诱导细胞自噬死亡^[4]。实验研究表明, 在缺血-再灌注过程中, 黄芩苷能减少肝脏及脑组织梗死面积^[5-7], 而其在心肌缺血再灌注过程中的研究很少。本实验重点研究黄芩苷在心肌缺血再灌注中对心肌保护作用及其作用相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 230~250 g, 由辽宁医学院动物实验中心提供。灌流装置购于美国 RADNOTI 公司, MP150 多导生理记录分析系统购于美国 BIAPOC 公司, 克-亨氏(K-H)试剂购于西陇化工有限公司。左心室压力测定使用泰盟 BL-420S 生物机能实验系统, 2,3,5-氯化三苯基四唑(TTC)试剂购于北京科博赛而科技有限公司, 黄芩苷原料药购自浙江江北药业。

1.2 实验分组及模型建立

将 48 只大鼠随机分为 4 组, 假手术组, 假手术+黄芩苷组, 缺血再灌注组, 黄芩苷处理组, 每组 12 只。本实验采用的体外模拟缺血再灌注模型参照了 Hernando 等^[8]诱导心肌细胞死亡的模型。20%乌拉坦(5 μl/g)麻醉, 肝素静脉注射, 迅速开胸, 取出心脏放至 4℃预冷的 K-H 液中, 经主动脉逆行插管悬挂于 Langendorff 灌流装置, 用 K-H 液(恒压 80 cm H₂O, 恒温 37℃, 通以 95%O₂+5%CO₂混合气)灌注。K-H 液成分(g/L): NaCl₂ 6.896, KCl 0.343, CaCl₂·H₂O 0.4115, MgSO₄·7H₂O 0.296, KH₂PO₄ 0.1635,

NaHCO₃ 2.1005, EDTA·2Na 0.372, 葡萄糖 1.000, 去离子水配制, 调 pH 值为 7.4。术前 7 天每日 1 次灌胃: 假手术组、缺血再灌注组用 2 ml 生理盐水, 假手术+黄芩苷组、黄芩苷处理组用 100 mg/kg 的黄芩苷与 2 ml 生理盐水混匀灌胃; 取出心脏后假手术组、假手术+黄芩苷组分别随机 7 只用 K-H 液持续灌流 90 min, 另外 5 只用 K-H 液持续灌流 105 min; 缺血再灌注组、黄芩苷处理组用 K-H 液稳定灌流 30 min, 37℃水浴中缺血 30 min, 分别随机 7 只再灌注 30 min, 另外 5 只再灌注 45 min。

所有组灌流 20 min 时测冠状动脉流量, 再灌后 30、45 min 2 个时间点测冠状动脉流量。左心室压力检测: 心脏挂至灌流装置后, 插入球囊, 球囊内注有 2.5 ml 生理盐水, 另一端连接换能器, 记录左心室发展压(LVDP), 左心室内压变化速率($\pm dp/dt_{max}$)及心率。随着时间推移及心肌再灌注损伤的作用, 心肌功能逐渐降低, 进行不同时间点各组内比较误差较大, 故只进行相同时点各组间的比较。上述所有实验组中, 每组 5 个心脏, 采集血流动力学指标。

1.3 心肌切片染色

用 TTC 染色法^[9,10]来确定心肌梗死面积。心脏再灌注 45 min 后立即取下心脏于 -20℃冷冻 1 h 后切片, 薄而均匀, 1% TTC 37℃避光染色 5 min, 然后 10% 福尔马林固定 10 min, 观察梗死区(白色)和存活区(红色), 用图象分析仪处理得面积百分比。本组使用心脏为各组检测完灌流指标的 5 个心脏。

1.4 免疫印迹试验(Western blot)检测心肌微管相关蛋白(LC3-II), 自噬体膜标记蛋白(Becl-1)蛋白表达量

通过测定 LC3-II, Becl-1 蛋白表达量, 有助于了解自噬的发生情况^[11]。再灌注 30 min 时取左心室心尖部加入组织裂解液裂解, 离心取蛋白沉淀。BCA 法^[12]测蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳后, 蛋白转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶粉封闭硝酸纤

纤维素膜 2 h, 洗膜后加入 LC3- II (北京博奥森生物技术有限公司)、Becl-1 (Abgent 公司) 一抗, 4℃反应过夜, 次日洗膜, 随后加入辣根过氧化物酶标记二抗 (生兴生物技术有限公司), 室温反应 1 h。洗膜, 利用辣根过氧化物酶的化学显色反应 (HRP-ECL) X 片显影。以 β 肌动蛋白 (β-actin) 为内参。用 Quality One 图象分析软件, 根据光密度定量分析。用凝胶图像分析系统分析灰度值 (n=3)。

1.5 mPTP 开放性检测

组织中 90 % 以上的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD+) 存在于线粒体内, 心肌缺血后再灌注时, NAD+ 通过开放的 mPTP 从失活的及功能不全的线粒体中被灌注液冲洗掉, 因此, 心肌组织中的 NAD+ 含量的高低能反映 mPTP 的开放程度, 含量越低说明 mPTP 的开放程度越大, 线粒体损伤程度越重^[13, 14]。NAD+/NADH 检测试剂盒是基于乙醇脱氢酶的循环反应。NAD 可被乙醇脱氢酶还原为 NADH, NADH 通过吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 的递氢作用, 使氧化型噻唑蓝 (MTT) 还原为甲瓚。通过在 565 nm 条件下测定 MTT 的还原速度 (吸光度值变化) 可反映出 NAD+ 的含量。本研究中, 缺血后再灌注 30 min 取左心室心肌组织约 20 mg 的心肌组织, 用 4℃ PBS 缓冲液清洗。进行匀浆化。置于 1.5 ml Eppendorf 管中, 加入 100 μl NAD+ 提取缓冲液, 在 60℃水浴下热提取约 5 min。然后加入 20 μl 检测缓冲液和 100 μl NADH 提取缓冲液以中和提取物, 充分混匀。在 17000 g 离心力下离心 5 min, 取上清液进行测定。制备不同浓度的 NAD+ 标准品。在 96 孔板中, 每孔加入 40 μl 样品或标准品。后每个孔内迅速加入 80 μl 工作液, 混匀。用酶标仪在 565 nm 条件下测定 OD₀ (反应开始时刻的吸光度值), 室温孵育 15 min 后, 测定 OD₁₅。根据标准曲线, 计算 NAD+ 的含量 (n=4)。

1.6 统计学分析

应用 SPSS statistics 17.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采取 t 检验, 方差分析方法比较各组间数据。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌再灌注期间心功能监测指标的比较 (表 1)

再灌注 20 min 时, 各组心功能差异无统计学意

义 (P>0.05)。再灌注 30 min, 45 min 时, 与假手术组相比, 缺血再灌注组、黄芩苷处理组心功能明显降低, 差异有统计学意义 (P<0.01); 与缺血再灌注组相比, 黄芩苷处理组心功能明显升高, 差异有统计学意义 (P<0.01)。

表 1 各组大鼠心肌再灌注期间心功能监测指标的比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

| 项目 | 再灌注 20 min | 再灌注 30 min | 再灌注 45 min |
|--------------------|------------|--------------------------|--------------------------|
| 心率 (次/min) | | | |
| 假手术组 | 271 ± 3 | 267 ± 5 | 270 ± 7 |
| 假手术 + 黄芩苷组 | 272 ± 7 | 272 ± 9 | 272 ± 5 |
| 缺血再灌注组 | 269 ± 6 | 188 ± 7* | 178 ± 6* |
| 黄芩苷处理组 | 275 ± 5 | 235 ± 8* [△] | 239 ± 5* [△] |
| 冠状动脉流量 (ml/min) | | | |
| 假手术组 | 10.1 ± 0.5 | 9.9 ± 0.8 | 9.3 ± 0.4 |
| 假手术 + 黄芩苷组 | 10.1 ± 0.3 | 10.1 ± 0.5 | 9.2 ± 0.4 |
| 缺血再灌注组 | 10.2 ± 0.6 | 5.5 ± 0.4* | 4.7 ± 0.3* |
| 黄芩苷处理组 | 10.4 ± 0.5 | 7.6 ± 0.5* [△] | 7.5 ± 0.4* [△] |
| LVDP (mmHg) | | | |
| 假手术组 | 81.1 ± 2.5 | 80.5 ± 2.0 | 83.3 ± 1.9 |
| 假手术 + 黄芩苷组 | 78.5 ± 5.4 | 81.3 ± 2.3 | 81.6 ± 1.0 |
| 缺血再灌注组 | 81.6 ± 2.6 | 46.8 ± 1.5* | 46.2 ± 0.8* |
| 黄芩苷处理组 | 79.5 ± 3.5 | 62.0 ± 1.8* [△] | 60.6 ± 1.9* [△] |
| +dp/dtmax (mmHg/s) | | | |
| 假手术组 | 2652 ± 67 | 2572 ± 50 | 2533 ± 58 |
| 假手术 + 黄芩苷组 | 2630 ± 111 | 2584 ± 85 | 2593 ± 31 |
| 缺血再灌注组 | 2708 ± 109 | 1238 ± 89* | 1197 ± 76* |
| 黄芩苷处理组 | 2616 ± 128 | 1763 ± 94* [△] | 1642 ± 72* [△] |
| -dp/dtmax (mmHg/s) | | | |
| 假手术组 | 1728 ± 77 | 1668 ± 123 | 1713 ± 127 |
| 假手术 + 黄芩苷组 | 1746 ± 80 | 1635 ± 104 | 1784 ± 103 |
| 缺血再灌注组 | 1730 ± 55 | 648 ± 52* | 686 ± 24* |
| 黄芩苷处理组 | 1709 ± 82 | 1143 ± 83* [△] | 1087 ± 107* [△] |

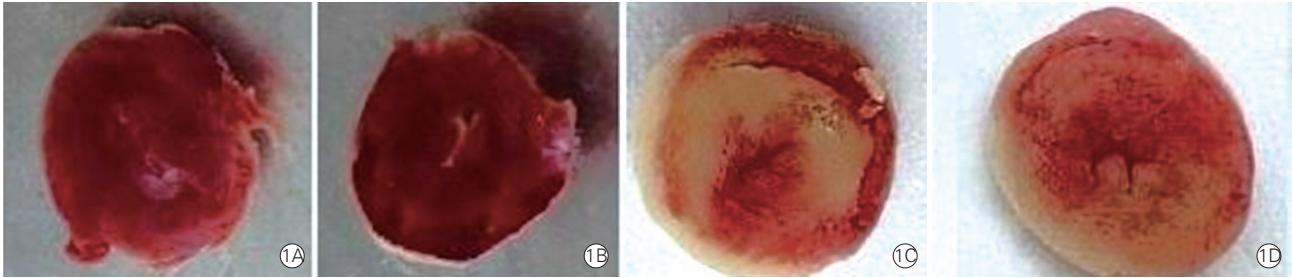
注: LVDP: 左心室发展压; +dp/dtmax: 左心室内压最大上升速率; -dp/dtmax: 左心室内压最大下降速率; 1 mmHg=0.133 kPa。与假手术组比 *P<0.01; 与缺血再灌注组比[△] P<0.01。

2.2 各组大鼠心脏再灌注 45 min 后心肌 TTC 染色结果 (图 1)

假手术组和假手术 + 黄芩苷组心肌梗死面积积极小, 不便进行比较。缺血再灌注组心肌梗死面积 (41.32 ± 1.85) %, 黄芩苷处理组心肌梗死面积 (23.30 ± 1.60) %, 两组差异有统计学意义 (P<0.001)。

2.3 各组大鼠心肌再灌注 30 min 后 LC3- II, Becl-1 蛋白表达量及 NAD+ 含量的比较 (表 2, 图 2)

再灌注 30 min 后 LC3- II 及 Becl-1 蛋白表达量, 缺血再灌注组和黄芩苷处理组较假手术组明显增加 (P<0.01); 黄芩苷处理组较缺血再灌注组明显下降 (P<0.01)。再灌注 30 min 后 NAD+ 含量, 缺血再灌注组和黄芩苷处理组较假手术组明显下降 (P<0.01); 黄芩苷处理组较缺血再灌注组明显增加 (P<0.01)。



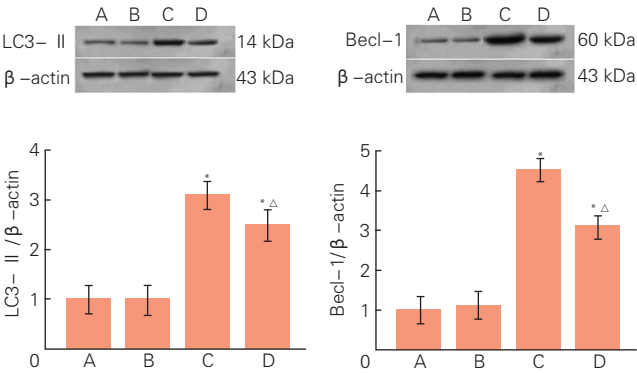
注:1A:假手术组;1B:假手术+黄芩苷组;1C:缺血再灌注组;1D:黄芩苷处理组

图 1 各组大鼠心肌再灌注 45 min 后心肌 2,3,5- 氯化三苯基四唑染色结果

表 2 各组大鼠心肌再灌注 30 min 后 LC3- II、Becl-1 蛋白表达量及 NAD+ 含量比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | LC3- II (n=3) | Becl-1 (n=3) | NAD+ 含量 (n=4, nmol/mg) |
|----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术组 | 0.763±0.007 | 0.647±0.014 | 11.28±0.37 |
| 假手术+黄芩苷组 | 0.763±0.012 | 0.606±0.006 | 11.50±0.73 |
| 缺血再灌注组 | 1.051±0.005* | 1.169±0.002* | 6.02±0.33* |
| 黄芩苷处理组 | 0.863±0.009* [△] | 0.943±0.005* [△] | 9.56±0.53* [△] |

注:LC3- II: 心肌微管相关蛋白;Becl-1: 自噬体膜标记蛋白;NAD+: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。与假手术组比 * $P<0.01$; 与缺血再灌注组比[△] $P<0.01$



注: A: 假手术组; B: 假手术+黄芩苷组; C: 缺血再灌注组; D: 黄芩苷处理组; LC3- II: 心肌微管相关蛋白; Becl-1: 自噬体膜标记蛋白; β -actin: β 肌动蛋白。纵坐标数值以假手术组为 1。与假手术组比 * $P<0.01$; 与缺血再灌注组比[△] $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠心肌再灌注 30 min 时心肌 LC3- II、Becl-1 蛋白含量比较

3 讨论

冠心病是 21 世纪人类面临的重要挑战, 其主要发病原因是心脏血液供应障碍导致心肌梗死。目前, 治疗心肌梗死主要采用溶栓治疗和急诊经皮冠状动脉介入治疗 (PCI), 以开通闭塞血管, 挽救缺血、濒死心肌^[15]。然而, 心肌缺血与再灌注均可导致心肌细胞损伤、甚至坏死, 是引起冠心病患者发生心力衰竭的主要原因。随着科学的进步, 人们逐渐发现缺血再灌注时除了引起心肌细胞的坏死和凋

亡外, 还引发心肌细胞自噬现象^[16]。

自噬由自噬相关基因 (Atg) 进行调控, 大多数 Atg 参与自噬的形成。在适宜的条件下生长因子信号与酪氨酸激酶受体 (TKR) 结合, 能活化 I 类磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 蛋白, 后者通过 AKT 信号通路激活雷帕霉素靶蛋白 (mTOR), 活化的 mTOR 能抑制诱导细胞自噬的关键信号分子 Atg1 的表达, 从而起到抑制细胞自噬的作用。营养条件不适宜时 (如缺血、缺氧等), mTOR 不被激活, Atg1 的抑制因素缺失, Atg1 与 Atg11、Atg13、Atg17 形成复合物, 成为细胞自噬的诱导信号, 进一步激活 Atg6 (Becl 1)、III 类 PI3K 复合物及 Atg14, 激活 Atg12、Atg16、Atg5、Atg7 复合物, 从而募集 Atg8 (LC3) 形成自噬体。其中 LC3 可以一直存在于自噬体中, 可作为自噬体形成的标志^[3]。Matsui 等^[2]进行的大鼠研究表明, 在心肌再灌注阶段, Becl1 表达大幅度上调, Becl 1 为细胞自噬发生过程中的重要 Atg, 其表达的明显增加提示心肌细胞自噬现象的大量出现。

心肌缺血实质上属于营养物质的不足, 当心肌缺血发生时自噬现象增加, 关于心肌自噬现象, 很多年前人们就进行过报道。近年来, 关于心脏缺血再灌注时诱发自噬的因素我们进行大量的研究, 其包括缺血、低氧、ATP 耗竭和缺血预适应、内质网应激、活性氧簇 (ROS) 等, 损伤的细胞器对诱发自噬也具有重要作用^[4, 17]。缺血再灌注损伤能引起线粒体功能障碍, 包括心肌能量合成受阻, 离子稳态失衡及自由基的大量产生等^[18]。mPTP 是缺血再灌注后心肌细胞损伤的一个重要因素。最近的研究发现, 在再灌注开始的前几分钟, mPTP 开放的抑制在缺血预适应心肌保护中发挥重要的作用^[19, 20]。一些 mPTP 开放的抑制剂如环孢素 A (CsA) 已经证明具有保护心肌对抗缺血再灌注的作用^[21]。同时多项研究报道表明, 线粒体的碎裂和损伤可以诱发自噬,

心肌细胞缺血再灌注损伤后 mPTP 的开放同样可以诱导自噬^[4]。

黄芩苷是从黄芩根中提取分离出来的一种黄酮类化合物,具有显著的生物活性,具有抗炎、抗变态及解痉作用^[22]。黄芩苷在各种病理生理条件下被广泛研究^[23-25]。黄芩苷及其苷元黄芩素体外保护心肌损伤作用也得到很好的证实^[26, 27]。而黄芩苷作用于缺血心肌细胞有关自噬的情况和 mPTP 是否介导黄芩苷抗心肌缺血再灌注损伤尚少见报道。

本实验通过体外循环灌流装置,除外神经、体液及自身前后负荷的等各方面影响,验证黄芩苷能够对缺血再灌注心肌细胞发挥保护作用,同时进一步研究其发挥保护作用的机制,测定 LC3-II, Becl-1 蛋白量成功反映出其通过抑制过度自噬而对心肌细胞发挥保护作用,为研究其在心肌保护中的作用提供新思路。但是,本实验结果没能证实黄芩苷在非缺血心肌细胞刺激自噬的发生。mPTP 的开放能诱导自噬发生,通过对 NAD⁺ 的检测,客观的反应再灌注过程中 mPTP 开放情况,从而提出在黄芩苷作用于再灌注心肌,减轻过度自噬发生是否与抑制 mPTP 的开放有关,为其作用机制的研究提供新的方向。其进一步的作用机制值得更深层次的研究。

参考文献

- [1] Mughal W, Dhingra R, Kirshenbaum LA. Striking a balance: autophagy, apoptosis, and necrosis in a normal and failing heart. *Curr Hypertens Rep*, 2012, 14: 540-547.
- [2] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin1 in mediating autophagy. *Circ Res*, 2007, 100: 914-922.
- [3] 李嫚, 张涛, 张飞彩. 自噬在心肌缺血再灌注中作用的研究进展. *实用心脑血管病杂志*, 2009, 22: 1-4.
- [4] Yan WJ, Dong HL, Xiong LZ. The protective roles of autophagy in ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34: 636-643.
- [5] Kim SJ, Moon YJ, Lee SM. Protective effects of baicalin against ischemia / reperfusion injury in rat liver. *J Nat Prod*, 2010, 73: 2003-2008.
- [6] Xue X, Qu XJ, Yang Y, et al. Baicalin attenuates focal cerebral ischemic reperfusion injury through inhibition of nuclear factor kappaB p65 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 403: 398-404.
- [7] Cao Y, Mao X, Sun C, et al. Baicalin attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. *Brain Res Bull*, 2011, 85: 396-402.
- [8] Hernando V, Inseste J, Sartorio CL, et al. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49: 271-279.
- [9] Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, et al. Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology*, 2004, 100: 581-588.
- [10] Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, et al. Isoflurane preconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability

transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta. *Anesthesiology*, 2005, 103: 987-995.

- [11] 刘艺, 徐卫娟, 柯丽, 等. 自噬在缺血预适应减少急性心肌梗死-再灌注损伤中的作用. *微循环学杂志*, 2013, 23: 16-22.
- [12] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985, 150: 76-85.
- [13] Di LF, Menabo R, Canton M, et al. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *Biol Chem*, 2001, 276: 2571-2575.
- [14] Di LF, Ziegler M. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD(+) metabolism. *FEBS Lett*, 2001, 492: 4-8.
- [15] 孙经武, 王艳艳, 房灿. 藏红花酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤中炎症反应和细胞凋亡的影响及其机制. *中国循环杂志*, 2015, 30: 172-175.
- [16] Zhang ZL, Fan Y, Liu ML. Ginsenoside Rg1 inhibits autophagy in H9c2 cardiomyocytes exposed to hypoxia/reoxygenation. *Mol Cell Biochem*, 2012, 365: 243-250.
- [17] Przyklenk K, Dong Y, Undyala VV, et al. Autophagy as a therapeutic target for ischemia/reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. *Cardiovasc Res*, 2012, 94: 197-205.
- [18] Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, et al. Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation. *Cardiovasc Res*, 2012, 93: 445-453.
- [19] Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-babu S, et al. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287: H841-H849.
- [20] 赵亚玲, 敖虎山. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展. *中国循环杂志*, 2011, 26: 396-398.
- [21] Duan X, Ji B, Yu K, et al. Pharmacological preconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury: the role of mitochondrial permeability transition pore. *ASAIO J*, 2011, 57: 197-202.
- [22] Zhang K, Lu J, Mori T, et al. Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activating the ERR[alpha]/PGC-1[alpha] pathway. *Cardiovasc Res*, 2011, 89: 426-435.
- [23] Gao Z, Huang K, Yang X, et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1472: 643-650.
- [24] Gao Z, Huang K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria Baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacol Res*, 2001, 43: 173-178.
- [25] Srinivas NR. Baicalin, an emerging multi-therapeutic agent: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and considerations from drug development perspectives. *Xenobiotica*, 2010, 40: 357-367.
- [26] Lin L, Wu XD, Davey AK, et al. The anti-inflammatory effect of baicalin on hypoxia / reoxygenation and TNF-alpha induced injury in cultured rat cardiomyocytes. *Phytother Res*, 2010, 24: 429-437.
- [27] Tu IH, Yen HT, Cheng HW, et al. Baicalein protects chicken embryonic cardiomyocyte against hypoxia-reoxygenation injury via mu- and delta- but not kappa-opioid receptor signaling. *Eur J Pharmacol*, 2008, 588: 251-258.

(收稿日期: 2015-12-27)

(编辑: 王宝茹)