

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.10.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220316.156.012.html\(2022-03-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220316.156.012.html(2022-03-17))

参附注射液诱导 H9C2 大鼠心肌细胞热休克蛋白 22 表达并减轻缺氧/复氧损伤的研究^{*}

曾圣强, 欧阳长生, 王 洪, 洪德志[△], 谭文亮, 徐成伟, 刘子铭, 王云霞

(江西省人民医院, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 观察参附注射液(SFI)对缺氧/复氧(A/R)损伤大鼠心肌细胞热休克蛋白 22(HSP22)表达的影响,探讨 SFI 对心肌缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用机制。**方法** 体外培养 H9C2 大鼠心肌细胞,予以 A/R 处理模拟心肌 I/R 损伤,分别以 1.5%、2.5% 和 3.5% 的 SFI 预处理心肌细胞,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同复氧时间对心肌细胞存活率的影响,探索最佳复氧时间,流式细胞术检测各组心肌细胞凋亡情况,荧光定量 RT-PCR 检测各组心肌细胞 HSP22 mRNA 表达,Western blot 检测 HSP22 蛋白的表达情况。**结果** 复氧 2 h、4 h、8 h 后 H9C2 心肌细胞存活率均显著低于对照组(均 $P < 0.05$); A/R+2.5% SFI 组细胞凋亡率显著低于 A/R 组、A/R+1.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组($P < 0.05$)。A/R+2.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组 HSP22 蛋白相对表达量均显著高于 A/R 组($P < 0.05$); A/R+3.5% SFI 组 HSP22 蛋白相对表达量显著高于 A/R 组、A/R+1.5% SFI 组、A/R+2.5% SFI 组($P < 0.05$)。**结论** SFI 在 H9C2 大鼠心肌细胞 A/R 损伤中可诱导 HSP22 表达上调,并减轻 A/R 损伤诱导的细胞凋亡。

[关键词] 参附注射液;缺氧/复氧损伤;心肌细胞;热休克蛋白 22**[中图法分类号]** R541.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)10-1643-06

Shenfu Injection induces heat shock protein 22 expression and alleviates anoxia/reoxygenation injury in H9C2 rat cardiomyocytes^{*}

ZENG Shengqiang, OUYANG Changsheng, WANG Hong, HONG Dezhi[△], TAN Wenliang,

XU Chengwei, LIU Ziming, WANG Yunxia

(Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Shenfu Injection (SFI) on the expression of heat shock protein 22 (HSP22) in myocardial cells injured by anoxia/reoxygenation (A/R), and to preliminarily explore the protective mechanism of SFI on ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** The H9C2 rat cardiomyocytes were cultured in vitro and treated with A/R to simulate myocardial I/R injury. The cardiomyocytes were pretreated with 1.5%, 2.5%, and 3.5% SFI. The tetramethylazazole blue method (MTT) was used to detect the effect of different reoxygenation times on H9C2 cell viability to explore the optimal reoxygenation time. The flow cytometry was used to detect cardiomyocyte apoptosis. RT-qPCR was used to detect the level of HSP22 mRNA expression. The Western blot was used to detect the level of HSP22 protein expression. **Results** The survival rate of the H9C2 cells after 2, 4, 8 h of reoxygenation was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The cell apoptotic rate in the A/R+2.5% SFI group was significantly lower than that of the A/R group, A/R+1.5% SFI group and A/R+3.5% SFI group ($P < 0.01$). The relative expression level of HSP22 protein in the A/R+2.5% SFI group and A/R+3.5% SFI group was significantly higher than that in the A/R group ($P < 0.01$). The relative expression of HSP22 protein in the A/R+3.5% SFI group was significantly higher than that in the A/R group, A/R+1.5% SFI group and A/R+2.5% SFI group ($P < 0.05$). **Conclusion** SFI could induce the up-regulation of HSP22 expression in H9C2 rat cardiomyocytes A/R injury and reduces apoptosis induced by A/R injury.

[Key words] Shenfu Injection; anoxia/reoxygenation; cardiomyocytes; heat shock protein 22^{*} 基金项目:江西省卫生计生委中医药科研课题(2018A365)。 作者简介:曾圣强(1989—),主治医师,硕士,主要从事冠心病临床研究。[△] 通信作者, E-mail:yunxia0501@126.com。

目前各种血运重建技术可及时有效地恢复心肌血流灌注,减轻心肌缺血损伤及坏死。然而心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤仍然严重制约着急性心肌梗死患者的预后。近年来药物性预处理及其作用机制研究已成为热点,中医药防治心肌 I/R 损伤的研究取得了一定进展。多项研究证实参附注射液(Shenfu Injection, SFI)对心肌 I/R 损伤有明显保护作用,具有缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)效应^[1-2]。既往研究均认为 SFI 的 IPC 效应可能与诱导热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)表达相关^[3-7],但未能证实 SFI 的 IPC 效应与 HSP70 直接相关。由于 HSP70 表达受到热休克蛋白 22(heat shock protein 22, HSP22)调控,多项研究已证实 HSP22 具有重要的抗心肌 I/R 损伤作用,该保护作用等同于 IPC。HSP22 作为一种较新的热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs),在心肌 I/R 损伤中的作用日益受到关注。SFI 同样具有 IPC 效应,它对 HSP22 的作用尚不清楚。本研究通过体外培养大鼠心肌细胞,予以缺氧/复氧(anoxia/reoxygenation, A/R)处理模拟心肌 I/R 损伤,观察 SFI 对 A/R 损伤大鼠心肌细胞 HSP22 表达的影响,探讨参附注射液对 A/R 损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

大鼠 H9C2 心肌细胞购自中国科学院细胞库。H9C2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37℃ 饱和湿度、含 5% CO₂ 的孵箱中培养。取处于对数生长期、生长状态良好的 H9C2 细胞用 0.25% 胰酶消化后,进行细胞计数。

1.2 仪器与试剂

DMEM 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,Trizol 购自美国 Invitrogen 公司(货号 GT1402),RIPA 裂解液(强)、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,RNase 抑制剂(货号 E00381)、三磷酸脱氧核糖核苷酸(deoxyribonucleotides, dNTPs)(货号 GD1102)、RevertAid 逆转录酶(货号 EP0441)购自美国赛默飞世尔科技公司,羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗购自美国 KPL(货号分别为 074-1806、074-1506),兔抗人 HSP22 一抗(货号 3059S)购自美国 CST 公司, β -actin(货号 66009-1-Ig)购自美国 Proteintech 公司,Realtime PCR Master Mix(SYBR Green)购自美国 Genview 公司(货号 GR1201),四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂购自广州鼎国生物技术有限,焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水(货号 40718)购自美国 Sigma 公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的 Annexin V(Annexin V-FITC)及碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Biolegend 公司,ECL 化学发光试剂盒

(货号 SQ201)购自上海雅酶生物科技有限公司,参附注射液购自北京雅安三九药业有限公司。

CO₂ 恒温培养箱购自美国美国赛默飞世尔科技公司,7500 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪购自美国应用生物系统公司,Clinx Chemi Scope 6000 化学发光仪购自上海勤翔科学仪器有限公司,Nano-200 超微量核酸分析仪购自杭州奥盛仪器有限公司,流式细胞仪购自美国 BD 公司(型号 FACSCalibur),DYCZ-24DN 双垂直电泳仪、DYCZ-40DN 转印电泳仪(槽)均购自北京六一生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 A/R 损伤模型的建立及分组

取处于对数生长期的 H9C2 细胞,接种于 6 孔培养板;每孔 3×10^5 个细胞,每孔最终的培养基总量 2 mL;分为 5 个组($n=3$):对照组、A/R 组、A/R+1.5% SFI 组、A/R+2.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组。按照分组加入 1.5% SFI, 2.5% SFI, 3.5% SFI 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h;在 5% CO₂ 和 95% N₂ 条件下培养 6 h, 95% 空气和 5% CO₂ 条件下继续培养 2 h(根据 MTT 检测确定最佳复氧时间为 2 h)后,收样检测。

1.3.2 MTT 比色法检测各组细胞存活率

取处于对数生长期、生长状态良好的 H9C2 细胞接种到 96 孔板中,密度为 1×10^4 /孔,分组为:对照组, A/R(0 h) 组, A/R(2 h) 组, A/R(4 h) 组, A/R(8 h) 组, A/R(16 h) 组;按照分组在 5% CO₂ 和 95% N₂ 条件下培养 6 h, 95% 空气和 5% CO₂ 条件下分别培养 0 h、2 h、4 h、8 h、16 h。各组细胞在检测时间点时,每孔加 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h;吸弃孔内培养上清液。每孔加 150 μ L 二甲基亚砷。用酶标仪于波长 490 nm 处测定各孔吸光度(A)值,以得到的 A 值反映各组 H9C2 细胞的增殖能力。

1.3.3 流式细胞术检测各组心肌细胞凋亡率

各组细胞离心收集;用 4℃ 预冷 PBS 洗涤 2 次,然后用 500 μ L 结合缓冲液重悬细胞,调节其浓度为 10^6 /mL;然后取 100 μ L 细胞悬浮于 5 mL 流式管中,加入 Annexin V-APC 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色,于室温避光孵育 15 min;加样于流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.4 荧光定量 RT-PCR 检测各组心肌细胞 HSP22 mRNA 表达

分别收集各组细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。以超微量核酸分析仪测定 RNA 纯度和浓度,选取合格 RNA 样品逆转录合成 cDNA。以稀释的 cDNA 为模板,进行实时荧光定量 PCR。引物设计见表 1。扩增程序设置:95℃ 预变性 3 min、95℃ 变性 15 s、11 个循环,59℃ 退火 20 s、72℃ 延伸 30 s、40 个

循环,记录熔解曲线,扩增产物4℃保存。应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$

法分析各组 HSP22 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
HSP22	GGT GGG ATT GTC TCC AAG AA	CCT GGT TGT CTT GAG GAA GC
Gapdh	GCA AGT TCA ACG GCA CAG	GCC AGT AGA CTC CAC GAC AT

1.3.5 HSP22 蛋白表达的 Western blot 检测

各组细胞离心收集;加入细胞裂解液,置冰上提取各组细胞总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度,采用金属浴致蛋白变性。取 30 μg 蛋白样品,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白后电转至硝酸纤维素膜上。将膜移至 5%BSA 封闭液中封闭 1 h;特异性一抗用含 5%BSA 溶液稀释至适当浓度(根据抗体说明书提供的稀释比);4℃孵育过夜后,用 PBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次;二抗用 1×PBST 溶液稀释至适当浓度(根据抗体说明书提供的稀释比),室温下孵育 1~2 h 后,用 PBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次,进行化学发光反应。加入 ECL 化学发光液,显影、定影,凝胶成像系统成像拍照,采用 Quantity One 图像分析软件,以 β-actin 为内参,计算各组 H9C2 细胞中 HSP22 蛋白的表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组相比较若方差齐用 *t* 检验,若方差不齐则用秩和检验,多组间比较均用 ANOVA 方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义,检验水准为 α = 0.05。

2 结 果

2.1 复氧 2 h 后心肌细胞的增殖受到明显抑制

MTT 检测结果显示,复氧 2 h、4 h、8 h 后 H9C2 心肌细胞增殖率显著降低;复氧 2 h 后 H9C2 心肌细胞增殖率均显著低于其他各组,见表 2。故后续试验均采用复氧 2 h 建立 A/R 模型。

2.2 SFI 显著降低 A/R 损伤诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡

流式细胞术检测结果显示,与对照组相比较,A/R 组、A/R+1.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组细胞凋亡率均显著升高(*P* < 0.05),提示 A/R 损伤可诱导心肌细胞凋亡;与 A/R 组相比较,A/R+1.5% SFI 组、A/R+2.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组细胞凋亡率均显著下降(*P* < 0.05),表明低中高浓度 SFI 均显著降低 A/R 损伤诱导的心肌细胞,见表 3、图 1。

2.3 SFI 对 H9C2 心肌细胞 HSP22 mRNA 表达的影响

荧光定量 RT-PCR 检测结果显示,与对照组相比,A/R 组、A/R+1.5% SFI 组、A/R+2.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组 HSP22 基因 mRNA 的表达水平均显著下降(*P* < 0.05);与 A/R 组相比,A/R+

1.5% SFI 组、A/R+2.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组 HSP22 基因 mRNA 的表达水平均无明显改变,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 4。

2.4 SFI 对 H9C2 细胞 HSP22 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组相比较,A/R 组、A/R+1.5% SFI 组、A/R+2.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组 HSP22 蛋白相对表达量显著下降(*P* < 0.05);与 A/R 组相比较,A/R+2.5% SFI 组、A/R+3.5% SFI 组 HSP22 蛋白相对表达量显著升高(*P* < 0.05);A/R+3.5% SFI 组 HSP22 蛋白相对表达量显著高于 A/R 组、A/R+1.5% SFI 组、A/R+2.5% SFI 组(*P* < 0.05),见图 2、表 5。

表 2 各组 H9C2 心肌细胞增殖率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	增殖率(%)
对照组	100.0 ± 0.0 ^b
A/R(0 h)组	96.1 ± 8.3 ^b
A/R(2 h)组	60.4 ± 4.9 ^a
A/R(4 h)组	78.4 ± 7.8 ^{ab}
A/R(8 h)组	82.7 ± 1.4 ^{ab}
A/R(16 h)组	96.7 ± 8.4 ^b

^a:*P* < 0.05,与对照组比较;^b:*P* < 0.05,与 A/R(2 h)组比较。

表 3 各组 H9C2 心肌细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

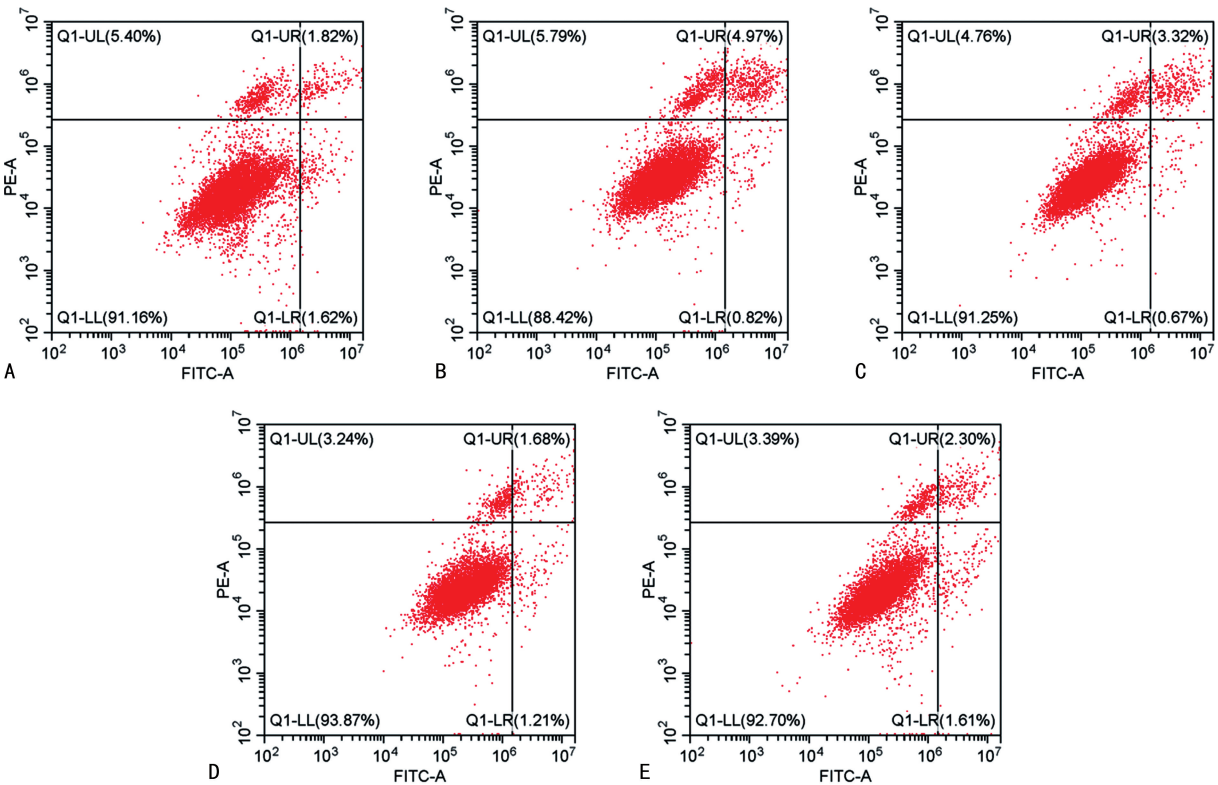
组别	凋亡率(%)
对照组	3.32 ± 0.17
A/R 组	5.69 ± 0.26 ^a
A/R+1.5% SFI 组	4.02 ± 0.08 ^{ab}
A/R+2.5% SFI 组	2.96 ± 0.06 ^b
A/R+3.5% SFI 组	3.90 ± 0.07 ^b

^a:*P* < 0.05,与对照组比较;^b:*P* < 0.05,与 A/R 组比较。

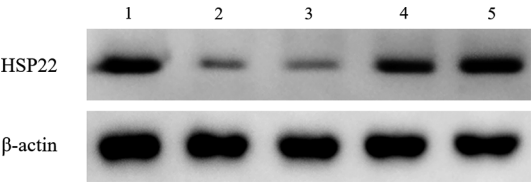
表 4 各组 H9C2 心肌细胞 HSP22 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对表达量
对照组	1.00 ± 0.29
A/R 组	0.31 ± 0.17 ^a
A/R+1.5% SFI 组	0.08 ± 0.09 ^a
A/R+2.5% SFI 组	0.35 ± 0.22 ^a
A/R+3.5% SFI 组	0.37 ± 0.00 ^a

^a:*P* < 0.05,与对照组比较。



A:对照组;B:A/R组;C:A/R+1.5% SFI组;D:A/R+2.5% SFI组;E:A/R+3.5% SFI组。
图1 流式细胞术检测SFI对各组H9C2心肌细胞凋亡的影响



1:对照组;2:A/R组;3:A/R+1.5% SFI组;4:A/R+2.5% SFI组;5:A/R+3.5% SFI组。
图2 Western blot检测SFI对H9C2心肌细胞HSP22蛋白表达的影响

表5 各组H9C2心肌细胞HSP22蛋白相对表达量
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HSP22
对照组	0.61±0.02
A/R组	0.14±0.01 ^a
A/R+1.5% SFI组	0.18±0.03 ^{ac}
A/R+2.5% SFI组	0.46±0.06 ^{ab}
A/R+3.5% SFI组	0.66±0.05 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与A/R组比较;^c: $P<0.05$,与A/R+2.5% SFI组比较。

3 讨论

急性心肌梗死是全球范围内致死和致残的重要疾病之一。在过去20余年,通过药物或血运重建技术恢复心肌血流灌注,可显著减轻心肌缺血坏死,已成为治疗急性心肌梗死的标准程序^[8]。然而缺血心肌血流再灌注后,受损心肌功能并未得到恢复,心肌损伤反而进一步加重,甚至出现梗死面积扩大等不可

逆损伤,该现象称为心肌I/R损伤^[9]。目前临床上仍然无法有效避免心肌I/R损伤,严重影响着患者预后^[10]。

SFI组方来源于中医著名古方“参附汤”^[11],主要成分是人参皂甙和乌头类生物碱^[12],能显著增加血管灌注量、改善心肌能量代谢,具有抗凋亡、抗炎、抗心肌I/R损伤等作用^[11,13-16]。本研究通过建立H9C2大鼠心肌细胞A/R损伤模型,应用不同浓度SFI预处理心肌细胞,发现随着SFI浓度升高可显著减轻A/R损伤诱导的心肌细胞凋亡,表明SFI具有减轻H9C2大鼠心肌细胞A/R损伤的抗凋亡作用。

既往研究发现SFI的多器官保护作用与诱导HSPs相关。SFI预处理可增加HSP70表达并减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,具有IPC效应^[4]。王峰等^[5]通过建立大鼠心肌I/R损伤模型,观察到SFI预处理可诱导HSP70 mRNA及其蛋白的表达,并发挥抗心肌I/R损伤作用。陈玉培等^[7]同样观察到在大鼠心肌I/R损伤模型中,SFI预处理可诱导心肌HSP70表达上调,同时还可增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性、减少丙二醛(malondialdehyde,MDA)生成,具有抗氧自由基及抗脂质过氧化反应的心肌保护作用。因此,既往研究认为SFI的IPC效应可能与诱导HSP70表达相关,但并未证实SFI的IPC效应与HSP70直接相关。由于HSP70在细胞受到应激刺激后生成明显增多,以往研究多关注于SFI对HSP70的诱导表达作用。由于HSP70的

表达受到 HSP22 的调控,HSP22 可诱导 HSP70 表达上调^[17-18],提示 HSP22 可能在 SFI 的 IPC 效应中有重要作用。

热休克蛋白是机体细胞在应激状态下诱导产生的一类重要的内源性保护蛋白,主要通过“管家”作用使受损蛋白恢复正常结构和功能,促进细胞存活^[19]。其中相对分子质量为 $(12\sim 43)\times 10^3$ 的热休克蛋白被称为小热休克蛋白(small heat shock proteins, sHSPs)^[17]。HSP22 又称 HSPB8、H11K,属于 sHSPs 超家族成员之一^[17],在改善心肌细胞线粒体能量代谢^[17,21]、抗心肌缺血^[17-18,22-23]、抑制心肌重构^[22,24]及抗心肌细胞凋亡^[18,25]等方面有着积极的作用。

研究证实 HSP22 具有抗心肌 I/R 损伤作用,其保护作用等同于 IPC^[18,26]。DEPRE 等^[18]发现 HSP22 过表达小鼠与 IPC 小鼠心肌梗死面积无明显差异,HSP22 可激活参与 IPC 效应的主要生存激酶,包括 Akt 及 AMP 依赖的蛋白激酶[adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]。HSP22 直接与 Akt 和 AMPK 结合,并激活来自细胞质和细胞核的存活机制,主要包括抑制促凋亡效应因子(糖原合酶激酶 3 β 、Bad 及 Foxo),激活抗凋亡效应子(PKC ϵ 、内皮和诱导型 NO 合酶亚型以及 HSP70),上调缺氧诱导因子 1 的表达及促进基因组向葡萄糖利用的转换。因此,HSP22 激活生存途径可预先触发对缺血的抗凋亡和代谢反应,并赋予完全等同于 IPC 的心脏保护作用。

在本研究中,与对照组相比,A/R 组大鼠心肌细胞 HSP22 mRNA 及 HSP22 蛋白表达均明显下调,同时细胞凋亡率显著增加。A/R 损伤时,SFI 可显著增加大鼠心肌细胞 HSP22 蛋白的翻译并减轻细胞凋亡,但对 HSP22 mRNA 的转录无明显影响,表明 SFI 可能通过促进 HSP22 表达发挥抗大鼠心肌细胞 A/R 损伤作用。既往研究证实在心肌 I/R 损伤中 HSP22 通过诱导 HSP70 表达上调及激活发挥 IPC 效应^[17-18],因此,笔者认为在心肌 I/R 损伤中,SFI 对 HSP70 的诱导表达作用可能受到 HSP22 的调控,HSP22 在 SFI 的 IPC 作用中起关键作用。

SFI 对大鼠心肌细胞的保护作用与浓度相关。在 SFI 干预实验中,本研究分别使用浓度为 1.5%、2.5%及 3.5%的 SFI 预处理心肌细胞,观察到 SFI 可减少 A/R 损伤诱导的心肌细胞凋亡,并且 A/R+2.5% SFI 组心肌细胞凋亡率显著低于 A/R+1.5% SFI 组及 A/R+3.5% SFI 组,表明 2.5% SFI 抗心肌细胞凋亡作用最强,因此体外实验中 SFI 培养大鼠心肌细胞的最适宜浓度为 2.5%。同时本研究还观察到 SFI 对 HSP22 的诱导表达作用呈浓度依赖性。

本研究中与对照组相比,A/R 组 H9C2 心肌细胞 HSP22 mRNA 和蛋白表达显著下调,而细胞凋亡率

显著升高。然而,笔者观察到 HSP22 在 SFI 给药后蛋白质水平上调,但 mRNA 水平上调。SFI 可显著增加 H9C2 细胞中 HSP22 蛋白的翻译,但对 HSP22 mRNA 的转录无显著影响。Western blot 结果与 PCR 结果不一致可能有 3 个原因:首先,基因表达分为转录和翻译水平,即 mRNA 水平和蛋白质水平。HSP22 表达的转录和翻译的时间和位点之间存在时间和空间差距;其次,转录后会进行转录后加工、转录产物降解、翻译、翻译后加工和修饰。SFI 可能作用于 HSP22 表达的翻译水平。最后,不同的检测时间点也可能导致结果不一致。

本研究尚存在一定的不足。首先,仅通过心肌 A/R 损伤细胞模型得到体外实验结果,其证明力度还不够充分,有待在心肌 I/R 损伤动物模型的体内实验中进一步验证;其次,I/R 损伤是通过多种信号通路作用,下游信号分子可以重叠,仅研究单一信号通路不够全面,本实验尚不能证实 SFI 的抗心肌细胞 A/R 损伤作用与诱导 HSP22 表达直接相关,SFI 是否通过 HSP22 调控 HSP70 表达尚有待进一步研究。

综上所述,SFI 在大鼠心肌细胞 A/R 损伤中可诱导 HSP22 表达上调,并减轻 A/R 损伤诱导的细胞凋亡,为临床上应用 SFI 治疗心肌 I/R 损伤提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] WU Y,XIA Z Y,MENG Q T,et al. Shen-Fu injection preconditioning inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats: activation of eNOS via the PI3K/Akt pathway[J]. J Biomed Biotechnol,2011,2011:384627.
- [2] ZHENG S,SUN J,ZHAO X,et al. Protective effect of shen-fu on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Am J Chin Med,2004,32(2):209-220.
- [3] 欧春元,李艳美. 大剂量参附注射液对重症急性胰腺炎合并脓毒症休克患者 HSP70 及 IL-10 表达的影响[J]. 右江民族医学院学报,2018,40(1):48-51.
- [4] 李扬,杨博,陈绍洋,等. 参附注射液预处理对大鼠脑缺血-再灌注损伤后 HSP70 和 HSP90 表达的影响[J]. 临床麻醉学杂志,2010,26(1):51-53.
- [5] 王峰,尚立芝,曹珊,等. 参附注射液预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤后 HSP70 基因表达的影响[J]. 河南中医学院学报,2007,14(1):36-38.
- [6] 王曾庚,聂祥碧,郭经华,等. 参附对急性肺损伤大鼠热休克蛋白 70 表达的影响[J]. 南昌大学学报(医学版),2011,51(10):22-24.

- [7] 陈玉培, 牟崇明, 季道如, 等. 参附注射液预干预对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 35(2): 220-223.
- [8] TOMA Y. How to bail out patients with severe acute myocardial infarction[J]. Heart Fail Clin, 2020, 16(2): 177-186.
- [9] DAVIDSON S M, FERDINANDY P, ANDREAD OU I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury: jacc review topic of the week[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(1): 89-99.
- [10] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对减小猪急性心肌梗死面积的作用[J]. 重庆医学, 2010, 39(5): 522-523, 526.
- [11] GUO Z J, WU C J, LI C S. Shen-Fu Injection alleviates post-resuscitation myocardial dysfunction by up-regulating expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase[J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(7): 503-509.
- [12] 李桂琼, 柯大智. 参附注射液对 β 淀粉样蛋白所致阿尔茨海默病大鼠认知行为和脑组织氧化应激的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(2): 156-158.
- [13] CHEN R J, RUI Q L, WANG Q, et al. Shenfu injection attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial inflammation and apoptosis in rats[J]. Chin J Nat Med, 2020, 18(3): 226-233.
- [14] XU P, ZHANG W Q, XIE J, et al. Shenfu injection prevents sepsis-induced myocardial injury by inhibiting mitochondrial apoptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 261: 113068.
- [15] YUAN W, WU J, ZHANG Q, et al. Shen-fu injection alleviates acute renal injury by reducing cytokine levels and modulating apoptosis in a porcine hemorrhagic shock model[J]. Acta Cir Bras, 2021, 36(4): e360405.
- [16] HUANG J, WANG Y, HUANG S, et al. A critical overview of systematic reviews of shenfu injection for heart failure[J]. Cardiovasc Ther, 2021, 2021: 8816590.
- [17] LAURE L, LONG R, LIZANO P, et al. Cardiac H11 kinase/Hsp22 stimulates oxidative phosphorylation and modulates mitochondrial reactive oxygen species production: involvement of a nitric oxide-dependent mechanism [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(11/12): 2168-2176.
- [18] DEPREE C, WANG L, SUI X, et al. H11 Kinase prevents myocardial infarction by preemptive preconditioning of the heart[J]. Circulation Research, 2006, 98(2): 280-288.
- [19] ZENG S, WANG H, CHEN Z, et al. Effects of geranylgeranylacetone upon cardiovascular diseases [J]. Cardiovasc Ther, 2018, 36(4): e12331.
- [20] KIM M V, SEIT-NEBI A S, MARSTON S B, et al. Some properties of human small heat shock protein Hsp22 (H11 or HspB8)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315(4): 796-801.
- [21] MARUNOUCHI T, ABE Y, MURATA M, et al. Changes in small heat shock proteins HSPB1, HSPB5 and HSPB8 in mitochondria of the failing heart following myocardial infarction in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(4): 529-539.
- [22] HEDHLI N, WANG L, WANG Q, et al. Proteasome activation during cardiac hypertrophy by the chaperone H11 Kinase/Hsp22[J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(3): 497-505.
- [23] WU W, LAI L, XIE M, et al. Insights of heat shock protein 22 in the cardiac protection against ischemic oxidative stress[J]. Redox Biol, 2020, 34: 101555.
- [24] DEPREE C, HASE M, GAUSSIN V, et al. H11 kinase is a novel mediator of myocardial hypertrophy in vivo[J]. Circ Res, 2002, 91(11): 1007-1014.
- [25] SUI X, LI D, QIU H, et al. Activation of the bone morphogenetic protein receptor by H11kinase/Hsp22 promotes cardiac cell growth and survival[J]. Circ Res, 2009, 104(7): 887-895.
- [26] CHEN L, LIZANO P, ZHAO X, et al. Preemptive conditioning of the swine heart by H11 kinase/Hsp22 provides cardiac protection through inducible nitric oxide synthase[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(4): H1303-1310.

(收稿日期: 2021-09-18 修回日期: 2022-02-08)