

川陈皮素后处理减轻心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡

陈才¹, 吴继雄¹, 王靓², 何非¹

摘要 目的 研究川陈皮素后处理对小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制。方法 选择健康雄性 C57BL/6 小鼠 48 只, 随机均等分为 4 组: 假手术组 (Sham 组)、缺血再灌注组 (I/R 组)、川陈皮素后处理组 (NOB 组)、川陈皮素后处理 + PI3K 特异性抑制剂 LY294002 组 (NL 组)。通过结扎小鼠左冠状动脉前降支 30 min, 再灌注 120 min, 制作小鼠心肌缺血再灌注模型。采用 Evans Blue 和 TTC 双重染色法测量心肌缺血危险区及梗死区面积; TUNEL 染色法检测各组小鼠心肌细胞凋亡指数; 硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定丙二醛

(MDA) 浓度, 黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; Western blot 检测各组心肌的 Akt、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达量, 计算 Bcl-2/Bax 比值。结果 与 Sham 组相比, I/R 组心肌梗死面积及心肌细胞凋亡显著增加, 心肌 Akt、Bcl-2 下调, Bax、Caspase-3 上调, Bcl-2/Bax 下降, MDA 显著升高, SOD 显著降低 ($P < 0.001$)。与 I/R 相比, NOB 组心肌梗死面积、心肌细胞凋亡显著减少, 心肌 Akt、Bcl-2 上调, Bax、Caspase-3 下调, Bcl-2/Bax 升高, MDA 显著降低, SOD 显著升高 ($P < 0.001$)。与 NOB 组相比, NL 组心肌梗死面积及凋亡显著升高, 心肌 Akt、Bcl-2 下调, Bax 和 Caspase-3 上调, Bcl-2/Bax 下降, MDA 显著升高, SOD 显著降低 ($P < 0.001$)。结论 川陈皮素可减轻心肌缺血再灌注损伤, 减少心肌细胞凋亡, 其机制与 PI3K-Akt 通路激活降低氧化应激有关。

关键词 川陈皮素; PI3K/Akt; 心肌缺血再灌注; 凋亡

中图分类号 R 541.4; R 961.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0944-07

2016-03-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81202631)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院心血管内科, 合肥 230601

² 安徽中医药大学药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈才, 男, 硕士研究生;

吴继雄, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wjx8261@163.com

Construction of three lentiviral vectors expressing HPV16 E5, E6 or E7 oncogene and respective infection of oral epithelial cells with the vectors

Xiang Xianwang¹, Jiang Tong², Chen Chuanjun^{1,3}

(¹ Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061;

² College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

³ Dept of Stomatology, Wannan Medical College, Wuhu 241002)

Abstract Objective To provide the basis for the study of HPV16 E5 gene in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma by constructing three lentiviral vectors expressing HPV16 E5, E6 or E7 oncogene and transfecting oral epithelial cells with the vectors. **Methods** HPV16 E5, E6 or E7 oncogene was amplified using PCR and ligated into the lentiviral vector pLVX-AcGFP-N1 respectively to construct vectors pLVX-AcGFP-E5, pLVX-AcGFP-E6 and pLVX-AcGFP-E7, then respectively cotransfected 293T cells with packaging plasmids, viral supernatant was collected to respectively transfect oral epithelial cells. After puromycin screening, oral epithelial cells with HPV 16 E5, E6 or E7 oncogene transfection were constructed, then reverse transcription PCR and western blot assays were performed for verifying HPV16 E5, E6 or E7 expression. **Results** pLVX-AcGFP-E5, pLVX-AcGFP-E6 and pLVX-AcGFP-E7 were successfully constructed, oral epithelial cells expressing HPV 16 E5, E6 or E7 oncogene were acquired, HPV16 E5, E6 or E7 expression was confirmed in oral epithelial cells through reverse transcription PCR and western blot assays. **Conclusion** Three lentiviral vectors expressing HPV16 E5, E6 or E7 oncogene can successfully infect oral epithelial cells.

Key words human papillomavirus; HPV16 oncogene; lentiviral vector; oral epithelial cells

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 多是由于冠状动脉内膜损伤、血小板聚集或痉挛引起血栓形成导致冠状动脉急性闭塞。及时有效恢复冠脉血流可挽救损伤心肌,但随后的再灌注可进一步加重缺血心肌细胞损伤;药物后处理在再灌注早期作为辅助性治疗在临床过程中减轻心肌缺血再灌注治疗有良好前景。川陈皮素来源于芸香科植物橘及栽培变种的成熟果皮,有有效的药物活性,被普遍使用^[1]。近期研究^[2-3]显示,川陈皮素可通过降低脑细胞凋亡从而减轻脑缺血及脑缺血再灌注损伤。川陈皮素药理学作用逐步被人们发现,但川陈皮素对于心肌缺血再灌注是否有影响及其机制暂无相关研究。该实验评估川陈皮素后处理对小鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其与 PI3K/Akt 信号通路的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 C57BL/6 小鼠 48 只,10~12 周,22~28 g,购自安徽医科大学动物实验中心 [SCXK(皖)2011-002];本实验所用动物和实验操作经过安徽医科大学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器 川陈皮素(陕西慧科植物开发有限公司,纯度超过 98%,溶于生理盐水包含 0.5% Tween 80 中配成比例为 10 mg/10 ml);TTC (氯化三苯基四氮唑)、Evans Blue(伊文氏蓝)(美国 Sigma 公司);LY294002 [美国 BIOMOL Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA) 公司];TUNEL 凋亡检测试剂盒(瑞士 Roche Diagnostics 公司);超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛 (maleic dialdehyde, MDA) 试剂盒(南京建成生物工程研究所);Akt、Bcl-2、Bax、Caspase-3(美国 Cell Signaling Technologies 公司);羊抗兔二抗(武汉博士德生物科技有限公司);BL-420E 生物信号采集分析系统、动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司)。

1.3 小鼠心肌缺血/再灌注模型 动物适应性喂养 1 周,实验前禁食 12 h,不限饮水;随机分为 4 组($n=12$)。假手术组(Sham 组):仅过线不结扎;缺血再灌注组(I/R 组):小鼠左前降支结扎 30 min,随后松开结扎再灌注 120 min;川陈皮素后处理组(NOB 组):缺血 30 min,再灌注前 5 min 予以颈静脉注射川陈皮素 15 mg/kg;川陈皮素后处理 + LY294002 组(NL 组):再灌注 5 min 予以尾静脉注射 LY294002 0.3 mg/kg,再灌注 5 min 予以颈静脉注射川陈皮素 15 mg/kg。按照既往方法^[4]构建小鼠心肌缺血再灌

注模型。利用 1% 戊巴比妥钠(0.6 ml/100 g)腹腔麻醉,然后小鼠固定解剖台,四肢连接心电图机;予以颈部皮肤消毒剪毛,气管插管,接动物呼吸机。第三或第四肋间距胸骨左缘 0.5 cm 逐层解剖小鼠胸腔,剪开心包,以伴行的左冠状静脉主干为标记,在左心耳下约 2 mm 处用 8-0 无损伤缝合线穿过,以 PE-10 软管垫于缝合线上,结扎冠脉前降支 30 min,可见缺血心肌变白,心电图出血 ST 段抬高,造成心肌缺血 30 min。剪断结扎线,心电图可见 ST 回落及再灌注心律失常,缺血心肌由白色变红。随后关闭胸腔,持续再灌注 2 h。

1.4 TTC/Evans Blue 染色 除 Sham 组外,于心肌再灌注 120 min 时,重新扎紧左冠状动脉前降支,经颈静脉注射 1% 伊文氏蓝 1 ml,可见染成蓝色的为心肌非缺血区,未蓝染的为心肌缺血区;心肌缺血区予以冲洗后滤纸吸干, -80 °C 冰冻 10 min,沿心尖部垂直于心脏长轴切 5 片(厚为 2 mm),置于 1% 的 TTC 溶液中,37 °C 水浴锅温孵 20 min,用福尔马林固定,梗死心肌呈白色,缺血心肌呈红色,进行扫描拍照。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国 Meridia Cybernetics 公司)测量缺血危险区面积和梗死区面积。

1.5 TUNEL 法测定心肌细胞凋亡 取左室缺血危险区心肌组织 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,每隔 1 mm 进行切片;按照 TUNEL 试剂盒说明书以原位末端标记法检测细胞凋亡;光镜下($\times 400$)观察病理结果:凋亡阳性的细胞呈棕褐色。每张切片随机选 4 个互不重叠高倍视野,采用图像分析软件计数凋亡细胞数和总细胞数。细胞凋亡指数 (%) = 凋亡细胞数 ÷ 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.6 SOD 活性和 MDA 浓度的测定 剪取左室心肌,每 50 mg 心肌加入 0.5 ml 生理盐水,再加入抑肽酶并煮沸 10 min,3 000 r/min 离心 3 min 后取上清液, -20 °C 保存。全部实验结束后按照试剂盒说明书推荐的操作步骤测定血清 T-SOD 活性和 MDA 含量,于波长 550 nm 处测定各管吸光度 (absorbance, A) 值并计算 SOD 活性,波长 532 nm 处测定各管 A 值并计算 MDA 含量。

1.7 Western blot 检测 Akt、Bcl-2、Bax、Caspase-3

将心肌组织置于匀浆器中剪碎并匀浆,加 400 μ l 单去污剂裂解液裂(含 PMSF)置于冰上,裂解 30 min 后将裂解液移至 1.5 ml 离心管中,4 °C 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液后采用 BCA 法进行蛋白定量,取等量蛋白进行 SDS-PAGE,将蛋白质电转移

到 PVDF 膜上,脱脂奶粉(TBST 缓冲液配制)室温封闭 1 h,加入一抗(1 : 1 000) 4 ℃ 摇床孵育过夜, TBST 缓冲液洗脱 ×3 次后加入二抗(1 : 100),室温孵育 2 h 后 TBST 缓冲液洗脱 3 次,化学发光法(ECL)法显影、定影并胶片曝光。将胶片进行扫描或拍照,用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行分析,计算资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料的比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 法。方差不齐者采用非参数检验,组间多重比较采用 Tamhane 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血/再灌注后心肌梗死面积显著增加 与 Sham 组(2.88 ± 0.45)% 相比,I/R 组(39.38 ± 2.04)% 小鼠心肌梗死区面积显著增加($\chi^2 = 44.804, P < 0.001$),两组间缺血危险区面积差异无统计学意义(46.88% vs 47.04%, $F = 0.547, P = 0.965$)。I/R 组小鼠心肌凋亡指数(49.88 ± 6.99)% 明显高于 Sham 组(3.90 ± 2.48)% ($\chi^2 = 36.098, P < 0.001$)。表明本实验成功建立了小鼠心肌缺血/再灌注模型。见图 1、2。

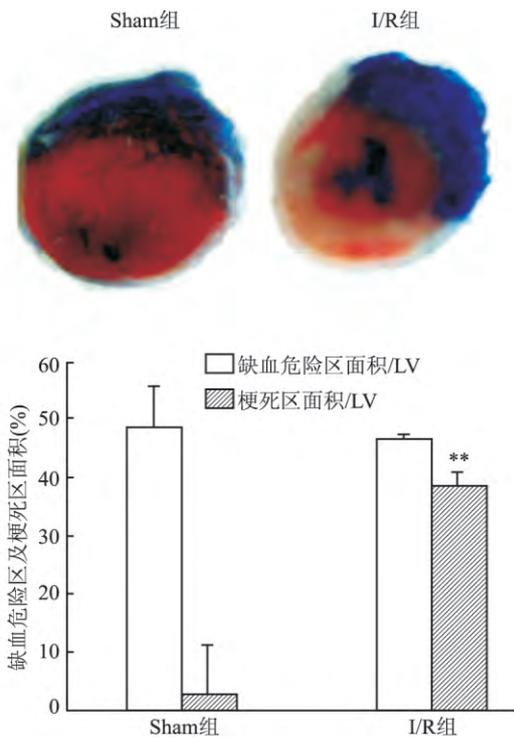


图 1 缺血/再灌注后心肌缺血危险区及梗死面积的变化(n = 12) 与 Sham 组比较: ** $P < 0.001$

2.2 缺血/再灌注后凋亡相关蛋白及氧化应激水平的变化 与 Sham 组相比,I/R 组小鼠心肌磷酸化-Akt(p-Akt)的含量显著下降,为 Sham 组的 0.42 倍($\chi^2 = 41.696, P < 0.001$);I/R 组小鼠心肌 Cleaved-caspase-3 含量显著增加,为 Sham 组的 4.73 倍($\chi^2 = 44.091, P < 0.001$)。见图 3、4。与 Sham 组相比,

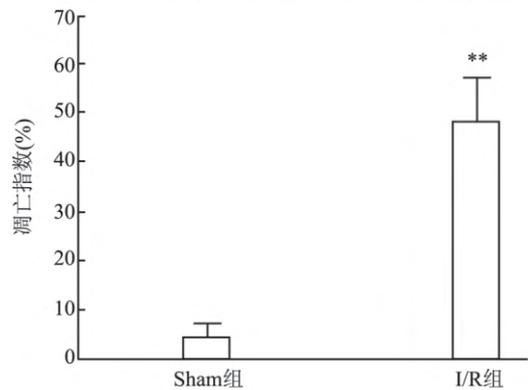
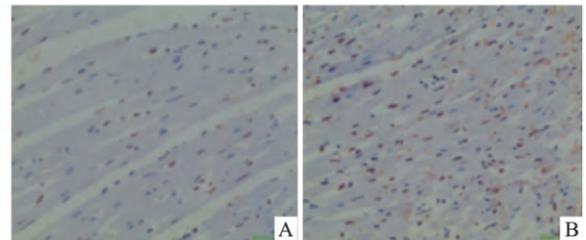


图 2 缺血/再灌注后心肌凋亡指数的变化(n = 12) 与 Sham 组比较: ** $P < 0.001$

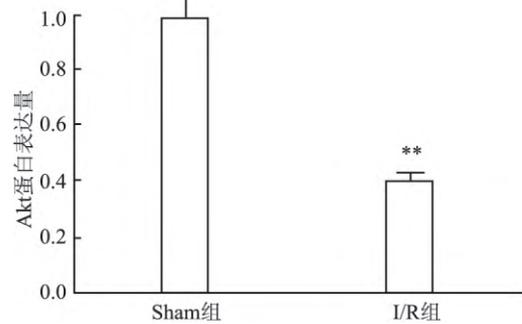
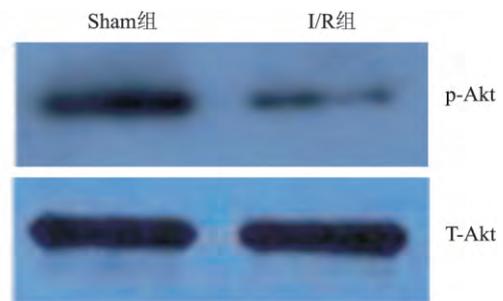


图 3 缺血/再灌注后心肌 p-Akt 表达水平的变化(n = 12) 与 Sham 组比较: ** $P < 0.001$

I/R 组小鼠心肌 Bcl-2 的含量显著下降, Bax 显著增加, Bcl-2/Bax 为 Sham 组的 0.39 倍 ($\chi^2 = 44.151, P < 0.001$)。见图 5。与 Sham 组 (26.29 ± 5.40 U/mg protein) 相比, I/R 组 (5.06 ± 2.06 U/mg protein) 小

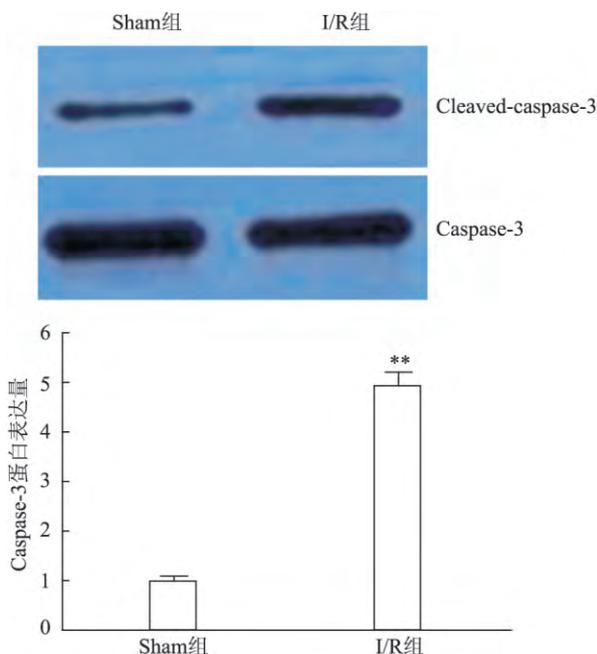


图 4 缺血/再灌注后心肌 Cleaved-caspase-3 表达水平的变化 ($n = 12$) 与 Sham 组比较: ** $P < 0.001$

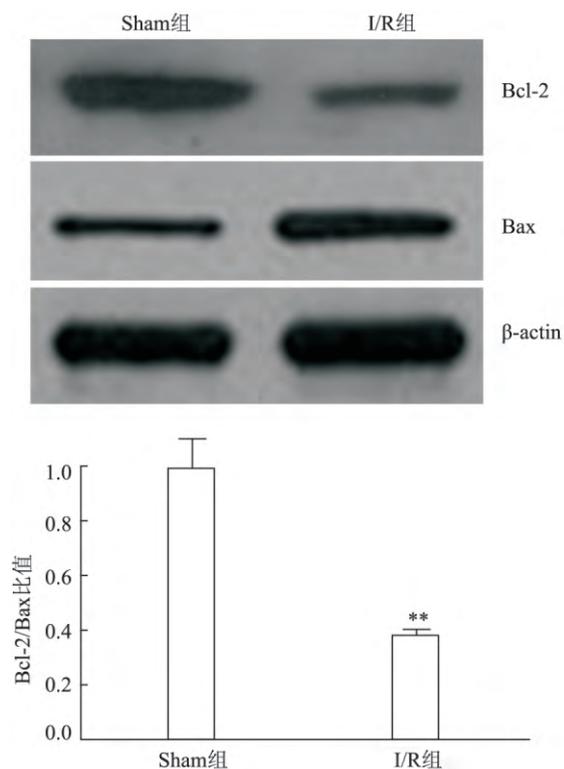


图 5 缺血/再灌注后心肌 Bcl-2/Bax 比值的变化 ($n = 12$) 与 Sham 组比较: ** $P < 0.001$

鼠心肌 T-SOD 含量显著降低 ($F = 63.433, P < 0.001$); 与 Sham 组相比, MDA 的含量则显著升高 [(180.47 ± 7.07) nmol/mg protein, $F = 1011.629, P < 0.001$]。

2.3 川陈皮素对缺血/再灌注后心肌梗死面积的影响及 LY294002 的拮抗作用 为明确川陈皮素后处理是否有心肌保护作用及其可能机制, 检测了 I/R、NOB 及 NL 组小鼠梗死区面积和缺血危险区面积。与 IR 组 (38.69 ± 2.25) % 相比, NOB 组 (19.85 ± 2.84) % 小鼠心肌梗死区面积显著减小 ($\chi^2 = 44.804, P < 0.001$), 而给予 PI3K 阻断剂 LY294002 一定程度上可拮抗川陈皮素的保护作用, NL 组 (29.37 ± 2.69) % 心肌梗死区面积高于 NOB 组 ($P < 0.001$)。3 组间缺血危险区面积的差异无统计学意义 ($P = 0.965$)。NOB 小鼠心肌凋亡指数 (32.11 ± 9.42) % 也明显低于 I/R (49.88 ± 6.99) % ($\chi^2 = 36.098, P < 0.001$), 而 LY294002 处理组心肌凋亡指数 (43.75 ± 8.14) % 也高于 NOB 组 ($P = 0.023$)。此结果说明川陈皮素后处理可以减少梗死区面积, 减轻心肌细胞凋亡, 此作用一定程度上可以被 PI3K 阻断剂 LY294002 拮抗, 提示川陈皮素后处理可能通过调节 PI3K-Akt 的表达而发挥心肌保护作用。见图 6、7。

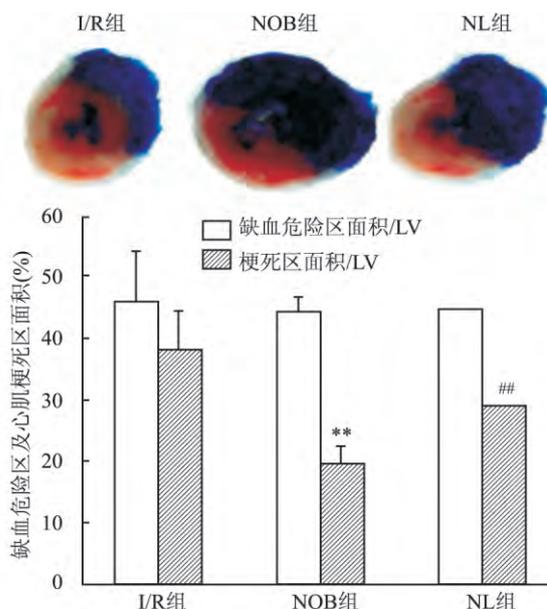


图 6 川陈皮素对缺血/再灌注后心肌缺血危险区及梗死面积的影响及 LY294002 的拮抗作用 ($n = 12$) 与 I/R 组比较: ** $P < 0.001$; 与 NOB 组比较: # $P < 0.001$

2.4 川陈皮素对缺血/再灌注后 Akt、凋亡相关蛋白及氧化应激水平的影响及 LY294002 的拮抗作用 为进一步明确川陈皮素后处理心肌保护作用的机

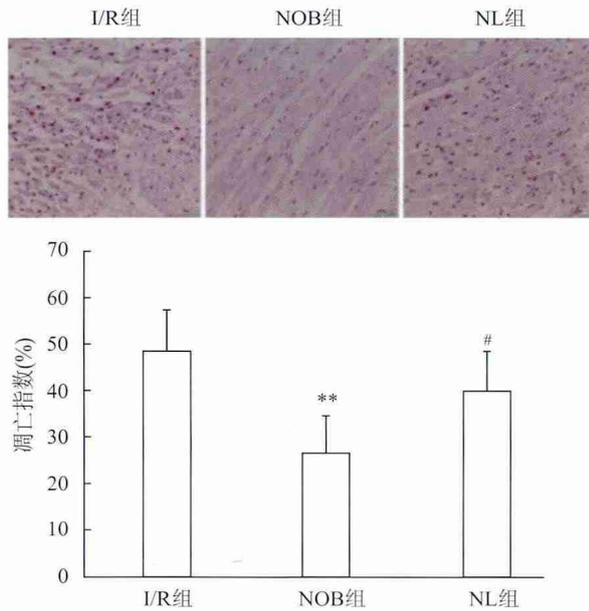


图7 川陈皮素对缺血/再灌注后心肌凋亡指数的影响及LY294002的拮抗作用(n=12)

与I/R组比较: **P<0.001; 与NOB组比较: #P<0.05

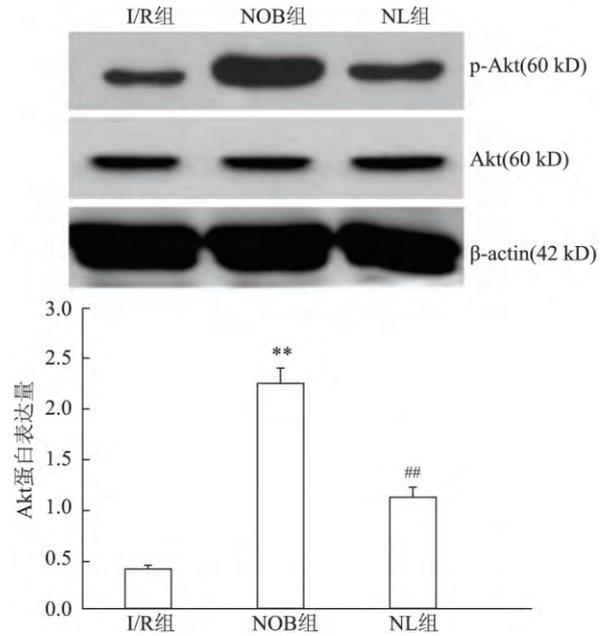


图8 川陈皮素对缺血/再灌注后Akt表达的影响及LY294002的拮抗作用(n=12)

与I/R组比较: **P<0.001; 与NOB组比较: ##P<0.001

制 检测了I/R、NOB及NL组小鼠心肌Akt、凋亡相关蛋白的表达及氧化应激水平。NOB组小鼠心肌p-Akt含量是I/R组的5.51倍(P<0.001),而NL组p-Akt的含量是NOB组的0.5倍(P<0.001)。此外,NOB组小鼠心肌caspase-3含量是I/R组的0.33倍(P<0.001),Bcl-2/Bax是I/R组的8.14倍(P<0.001),而NL组caspase-3的含量是NOB组的1.92倍(P<0.001),Bcl-2/Bax是NOB组的0.47倍(P<0.001)。

NOB组小鼠心肌T-SOD含量(21.13±4.71 U/mg protein)明显高于I/R组(5.06±2.05 U/mg protein)(F=63.433 P<0.001),而NL组T-SOD含量(11.66±3.57 U/mg protein)则低于NOB组(P<0.001)。此外,NOB组小鼠心肌MDA含量(89.14±7.34 nmol/mg protein)明显低于I/R组(180.47±7.07 nmol/mg protein,F=1011.629 P<0.001)而NL组MDA的含量(136.78±6.13 nmol/mg protein)则明显高于NOB组(P<0.001)。说明川陈皮素预处理通过上调Akt的表达、减轻氧化应激反应发挥心肌保护作用,此作用一定程度上可以被PI3K阻断剂LY294002拮抗,提示Akt是川陈皮素心肌保护作用的重要效应通路。见图8~10。

3 讨论

AMI是现今人类高致病和致死的主要病因之

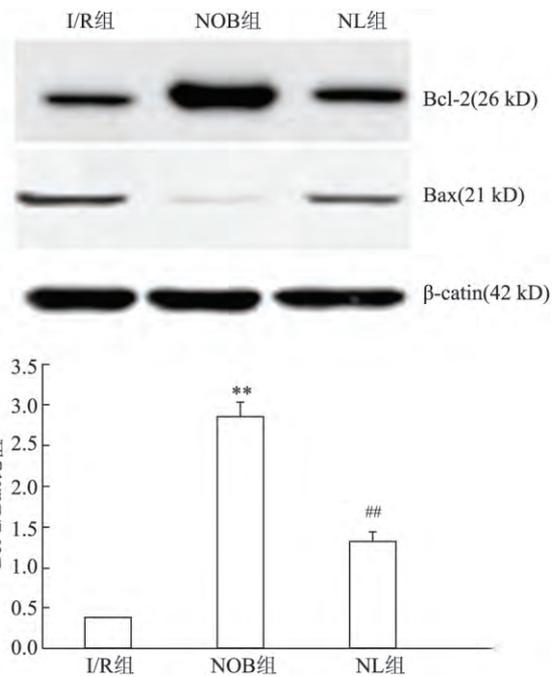


图9 川陈皮素对缺血/再灌注后Bcl-2/Bax表达的影响及LY294002的拮抗作用(n=12)

与I/R组比较: **P<0.001; 与NOB组比较: ##P<0.001

一 尽早恢复血流并维持缺血心肌氧和能量平衡对临床有重大意义;PCI、溶栓及CABG是主要的恢复血流方法,但研究显示再灌注期间心肌细胞面临着二次损伤,即为缺血再灌注损伤;凋亡在心肌缺血/

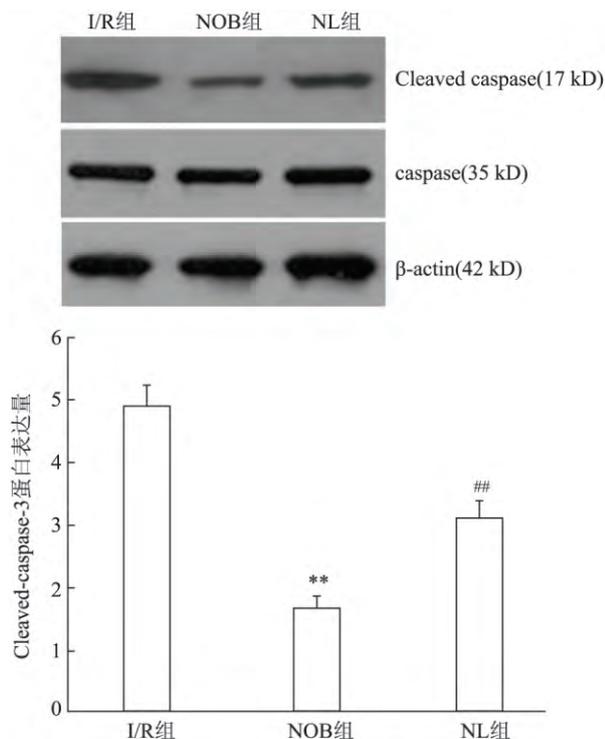


图10 川陈皮素对缺血/再灌注 Cleaved-caspase-3 的影响及 LY294002 的拮抗作用 ($n=12$)

与 I/R 组比较: ** $P < 0.001$; 与 NOB 组比较: ## $P < 0.001$

再灌注损伤过程中起着重要作用,缺血/再灌注过程中通过产生氧自由基、细胞内钙超载、线粒体损伤、炎性细胞浸润等多种机制导致心肌细胞凋亡,故降低细胞凋亡对防治缺血再灌注损伤有重要意义。陈皮素是从芸香科柑橘属橘子果皮中提取的一种多甲氧基黄酮类化合物,川陈皮素含有6个甲氧基,其代谢产物去甲氧化衍生物是主要活性物质,有多种药理学作用^[5-7],如抗肿瘤、改善记忆、抗氧化、抗动脉粥样硬化等药物性作用。本研究表明确实川陈皮素可以显著减少心肌梗死面积和心肌细胞凋亡,从而减轻缺血/再灌注损伤;此作用可能与川陈皮素抑制缺血/再灌注损伤过程中MDA的生成,促进T-SOD的生成,由此减轻氧化应激水平有关。

既往研究证实 Bcl-2 蛋白家族可调控细胞凋亡,其主要包括多种抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,在凋亡途径中起着重要作用。促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 被激活后可激活凋亡途径;而抗凋亡蛋白 Bcl-2 作用刚好与之相反,可抑制 mPTP(线粒体通透性转换孔)开放,阻断细胞色素 C 释放,抑制半胱天冬酶激活从而抑制细胞凋亡^[8-10]。所以,Bcl-2 与 Bax 的比例决定着细胞受凋亡刺激时存活或死亡与否^[11]。本研究显示川陈皮素可以促进 Bcl-2 的表达,抑制

Bax 的表达,故 Bcl-2 与 Bax 的比例升高,从而抑制细胞凋亡,这是川陈皮素心肌保护作用的另外一个可能的机制。

Akt 是重要的细胞存活信号通路,是再灌注损伤存活激酶通路(RISK 通路)的重要组成部分。活化的 Akt 可磷酸化多种凋亡和存活调控分子,包括 Bad、Caspase-9、eNOS、CREB、FKHR、GSK-3 β 等,最终抑制细胞凋亡^[12],在调控细胞存活通路中有着重要的作用。既往研究^[11-13]显示,缺血后处理及药物后处理可通过激活 PI3K-Akt 通路减轻心肌缺血再灌注损伤。Zhang et al^[2] 川陈皮素可通过磷酸化 Akt 激活 Bcl-2 减轻脑细胞凋亡,降低脑缺血损伤;Yasuda et al^[3] 川陈皮素可引起 CREB 磷酸化,磷酸化的 CREB 可引起 Bcl-2 和 BDNF 的表达,抑制细胞凋亡。结合本研究结果表明,在鼠心肌缺血再灌注过程中,磷酸化 Akt 蛋白表达受抑制,而川陈皮素可上调磷酸化 Akt 的表达,并抑制心肌细胞凋亡,减少心肌梗死面积。Akt 特异性阻断剂 LY294002 一定程度上可拮抗川陈皮素后处理所产生的心肌保护作用,表现为 Bcl-2 与 Bax 比例降低,caspase-3 表达增加,心肌梗死面积和心肌细胞凋亡指数增加。所以 Akt 信号通路参与了川陈皮素后处理的心肌保护作用。

本研究显示川陈皮素预处理通过上调 Akt 和 Bcl-2 的表达,抑制 Bax 和 caspase-3 的表达以及减轻氧化应激反应发挥心肌保护作用,此作用一定程度上可以被 PI3K 阻断剂 LY294002 拮抗,提示 Akt 是川陈皮素心肌保护作用的重要效应分子。受实验经费所限,本研究未完善川陈皮素的心肌保护作用是否有浓度梯度效应以及最佳作用剂量,有待后续实验进一步完善。

参考文献

- [1] Hwang S L, Shih P H, Yen G C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(4): 877-85.
- [2] Zhang L, Zhao H, Zhang X, et al. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat[J]. Brain Res Bull, 2013, 96: 45-53.
- [3] Yasuda N, Ishii T, Oyama D, et al. Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats[J]. Brain Res, 2014, 1559: 46-54.
- [4] Hsu C P, Zhai P, Yamamoto T, et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion[J]. Circulation, 2010, 122(21): 2170-82.
- [5] Jang S E, Ryu K R, Park S H, et al. Nobiletin and tangeretin a-

- meliorate scratching behavior in mice by inhibiting the action of histamine and the activation of NF- κ B, AP-1 and p38 [J]. *Int Immunopharmacol* 2013, 17(3): 502–7.
- [6] Nakajima A, Yamakuni T, Haraguchi M, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice [J]. *J Pharmacol Sci* 2007, 105(1): 122–6.
- [7] Whitman S C, Kurowska E M, Manthey J A, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 178(1): 25–32.
- [8] Kumar D, Jugdutt B I. Apoptosis and oxidants in the heart [J]. *J Lab Clin Med*, 2003, 142(5): 288–97.
- [9] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5684): 626–9.
- [10] Nishihara M, Miura T, Miki T, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3 β -mediated myocardial protection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43(5): 564–70.
- [11] Jacob R, Suzan A, Julia R, et al. Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(1): 186–94.
- [12] Hanada M, Feng J, Hemmings B A. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target [J]. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1697(1–2): 3–16.
- [13] Zhao Z Q. Postconditioning in reperfusion injury: a status report [J]. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010, 24(3): 265–79.

Nobiletin post-conditioning attenuates myocardial cell apoptosis following myocardial ischemia-reperfusion injury

Chen Cai, Wu Jixiong, Wang Liang, et al

(Dept of Cardiovascular, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effects of nobiletin post-conditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury and the possible mechanisms. **Methods** Forty-eight healthy male C57BL/6 rats were randomly allocated into sham operation group (Sham group), ischemia/reperfusion injury group (I/R group), nobiletin post-conditioning group (NOB group) and nobiletin post-conditioning group + LY294002 group (NL group). Myocardial I/R injury was established by occlusion of anterior descending branch of left coronary artery for 30 min followed by 120 min reperfusion. The infarct size and the area at risk were measured by double-staining of Evans Blue and TTC. Myocardial apoptosis was detected by TUNEL. The concentration of MDA was measured by thiobarbituric acid (TBA) and xanthine oxidase was used to measure SOD. Western blot was adopted to detect the expression of the Akt, Bcl-2, Bax, Caspase-3 and ratio of Bcl-2/Bax. **Results** Compared with the sham group, the infarct size and apoptosis of I/R group was significantly increased, the expression of Bax and caspase-3 was up-regulated, Akt and Bcl-2 were decreased and the ratio of Bcl-2/Bax was decreased, the concentration of MDA was significantly increased, but SOD was significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with the I/R group, the infarct size and apoptosis of NOB group were significantly decreased, the expression of Akt and Bcl-2 was up-regulated, while the expression of Bax and caspase-3 was down-regulated and the ratio of Bcl-2/Bax was increased, the concentration of MDA was significantly decreased, but SOD was significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the NOB group, the infarct size and apoptosis of NL group were significantly increased, the expression of Akt and Bcl-2 was down-regulated, while the expression of Bax and caspase-3 was up-regulated and the ratio of Bcl-2/Bax was decreased, the concentration of MDA was significantly increased, but SOD was significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Nobiletin post-conditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury and apoptosis, the mechanism associated with PI3K/Akt pathway activation reduces oxidative stress.

Key words nobiletin; PI3K/Akt; myocardial ischemia-reperfusion; apoptosis