

· 原 著 ·

参麦注射液保护氧化损伤心肌细胞线粒体的机制研究

赵 誉¹, 张 凤¹, 赵筱萍², 袁 玮³, 张金华³, 王 毅¹

1. 浙江大学药物信息学研究所, 浙江 杭州 310058

2. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 310053

3. 云南大理药业股份有限公司, 云南 大理 671000

[摘 要] 目的:探究参麦注射液对氧化损伤心肌细胞的保护作用及其对线粒体能量代谢过程的影响。方法:采用叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导构建 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型。分别采用 MTT 法和化学发光法检测参麦注射液对细胞存活率和 ATP 水平的影响;采用 Clark 氧电极检测参麦注射液对细胞有氧呼吸速率的调节作用;采用 ELISA 法检测丙酮酸及丙酮酸脱氢酶(PDH)的含量及活性;采用蛋白质印迹法检测丙酮酸脱氢酶亚基(PDHA1)含量;采用实时定量 RT-PCR 检测丙酮酸脱氢酶激酶 1(PDK1) mRNA 的表达。结果:与氧化损伤模型比较,参麦注射液可有效提高心肌细胞存活率和 ATP 水平(均 $P < 0.01$),提高细胞氧呼吸速率,减少丙酮酸含量,并提高 PDH 活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在分子水平上,参麦注射液可提高 PDHA1 蛋白表达($P < 0.05$),并具有降低 PDK1 mRNA 表达的趋势($P > 0.05$)。结论:参麦注射液可有效保护氧化损伤心肌细胞,其机制可能与提高 PDH 活性、减少丙酮酸堆积,从而维持线粒体功能稳定和细胞能量代谢稳定有关。



[关键词] 肌细胞,心脏/药物作用;肌细胞,心脏/病理学;线粒体,心脏/病理学;氧/代谢;丙酮酸脱氢酶(硫辛酰胺);麦冬/药理学;人参/药理学

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A

Shenmai injection protects mitochondria from oxidative injury in myocardial cells and its mechanism

ZHAO Yu¹, ZHANG Feng¹, ZHAO Xiaoping², YUAN Wei³, ZHANG Jinhua³, WANG Yi¹ (1. Institute of Pharmaceutical Informatics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 3. Dali Pharmaceutical Co., Ltd., Dali 671000, Yunnan Province, China)

收稿日期:2018-03-08 接受日期:2018-05-16

基金项目:国家自然科学基金(81822047);浙江省自然科学基金(LR16H280001);浙江大学基本科研业务费专项资金(2017FZA7015);浙江大学曹光彪高科技发展基金(2017RC016)

第一作者:赵 誉(1994—),女,博士研究生,主要从事中药药效物质研究;E-mail: zy-joy-zy@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8436-5386>

通信作者:王 毅(1980—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事中药药效物质研究;E-mail: zjuwangyi@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-3676-9183>

Corresponding author: WANG Yi, E-mail: zjuwangyi@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-3676-9183>

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenmai injection on myocardial cells with oxidative injury and the underlying mechanisms. **Methods:** Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) was used to induce the oxidative stress in H9c2 myocardial cells. The cell viability and ATP level were evaluated using MTT-colorimetric method and CellTiter-Glo luminescent cell viability assay. The oxygen respiration rate was examined by Clark oxygen electrode. Pyruvate and pyruvate dehydrogenase (PDH) levels were evaluated by ELISA kit. Western blot and quantitative real-time RT-PCR were employed to evaluate the expression of pyruvate dehydrogenase alpha 1 (PDHA1) and pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1). **Results:** Shenmai injection significantly improved viability and respiration of H9c2 myocardial cells after t-BHP injury ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It increased ATP contents by consuming pyruvate and increasing PDH level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Furthermore, Shenmai injection had the tendency to increase protein expression of PDHA1 ($P < 0.05$) and decrease mRNA expression of PDK1 ($P > 0.05$). **Conclusion:** Shenmai injection protects mitochondria from oxidative stress by increasing PDH level, which indicates that it may improve energy metabolism of myocardial cells.

[Key words] Myocytes, cardiac/drug effects; Myocytes, cardiac/pathology; Mitochondria, heart/pathology; Oxygen/metabolism; Pyruvate dehydrogenase (lipoamide); Ophiopogon japonicus/pharmacology; Ginseng/pharmacology

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2018,47(5):507-513.]

近年来,我国心血管疾病的病死率高居各类疾病之首^[1]。在疾病状态下,受损心肌细胞产生的过量氧自由基可导致细胞抗氧化功能受损,从而对心肌功能造成氧化损伤^[2-3]。临床上主要用于治疗冠心病等心血管疾病的参麦注射液由红参和麦冬两种药材制成,具有益气固脱、养阴生津等功效^[4-5]。研究表明,参麦注射液及其主要成分人参皂苷 Rb1 具有抗凋亡、抗氧化、抗炎性反应等作用^[6-8],可以通过提高血液中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量,减少丙二醛含量,达到缓解细胞氧化应激的效果^[9];还可提高 ATP 酶活性,调节钙离子平衡,改善线粒体功能^[10]。线粒体功能稳定是维持细胞生命活动的前提。然而,参麦注射液对于线粒体功能的保护机制尚不明确。本研究采用叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)诱导建立心肌细胞氧化损伤模型,从线粒体能量代谢的角度阐述参麦注射液对心肌细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

大鼠 H9c2 心肌细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。参麦注射液为云南大理药业股份有限公司产品;槲皮素为上海源叶生物科技有限公司产品;高糖 DMEM 培养基为美国 Corning 公司产品;MTT 试剂盒、t-BHP、丙酮酸脱氢酶(PDH)活性检测试剂盒为美国 Sigma 公司产品;CellTiter-Glo 发光法细胞活性检测试剂盒为美国 Promega 公司产品;丙酮酸测定试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;大鼠丙酮酸脱氢酶 α (PDHA1) 抗体为英国 Abcam 公司产品; β -Tubulin 抗体为美国 BD Pharmingen 公司产品;重组人丙酮酸脱氢酶激酶 1 (PDK1) 引物及商品化 GAPDH 引物为生工生物工程(上海)股份有限公司产品。

Leica DMI 6000B 型荧光倒置显微镜为德国 Leica 公司产品;细胞自动计数仪为美国

Invitrogen 公司产品; Authorized Thermal Cycler 逆转录仪为德国 Eppendorf 公司产品; Infinite F200 多功能酶标仪为瑞士 Tecan 公司产品; Clark 氧电极极英国 Hansatech 公司产品; CFX-Touch 实时荧光定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 建立心肌细胞氧化损伤模型

心肌细胞置于含 10% FBS 和 1% 青链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基, 放入 37 °C、5% 二氧化碳的细胞培养箱中培养。心肌细胞按一定密度接种于细胞培养板或细胞培养皿中贴壁培养 24 h 后, 根据使用的细胞代数及状态不同, 为达到相近的氧化损伤程度, 分别设置不同浓度的 t-BHP 进行造模。由于复苏初期的细胞对 t-BHP 较为敏感, 故降低其造模浓度, 防止细胞损伤过重; 随着细胞代数增加, 适当提高 t-BHP 浓度, 以保证合适的氧化损伤程度。因此, 在检测 PDHA1 蛋白和 PDK1 mRNA 表达时采用 150 μmol/L t-BHP 损伤 2 h, 检测细胞存活率、ATP 含量和细胞氧呼吸时采用 200 μmol/L t-BHP 损伤 2 h, 检测丙酮酸含量及 PDH 活性时采用 300 μmol/L t-BHP 损伤 2 h, 分别建立心肌细胞氧化损伤模型。

1.3 实验分组

在检测细胞毒性、氧呼吸、丙酮酸含量、PDH 活性、PDHA1 蛋白和 PDK1 mRNA 时, 设置对照组、模型组和参麦组。其中对照组为正常培养的心肌细胞; 模型组为细胞接种后 48 h 进行 t-BHP 损伤的心肌细胞; 参麦组为造模前加入含参麦注射液的高糖 DMEM 培养液预保护 24 h 后, 再进行 t-BHP 损伤的心肌细胞。在检测细胞存活率和 ATP 含量时, 设置对照组、模型组、参麦组和槲皮素组, 其中对照组、模型组和参麦组处理方式同上, 作为阳性对照的槲皮素组 t-BHP 损伤前加入含 50 mmol/mL 槲皮素的高糖 DMEM 培养液预保护 24 h。

1.4 MTT 法测定细胞存活率

心肌细胞以 4×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 按 1.2 和 1.3 中的方法建立模型和设置实验分组。吸弃培养液, 每孔加入 100 μL MTT 溶液 (0.5 mg/mL), 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中继续孵育 4 h 后, 弃上清液, 每孔加入 100 μL DMSO 溶液, 37 °C 振摇 10 min, 使结晶充分溶解混匀。用 Infinite F200 多功能酶标仪于 580 nm 波长处测定吸光度值, 并计算细胞存活率。细胞存活率

(%) = 样品吸光度值/对照组吸光度值 × 100%。

1.5 CellTiter-Glo 化学发光法检测 ATP 水平

心肌细胞以 4×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 按 1.2 和 1.3 中的方法建立模型和设置实验分组。在原培养液中每孔加入 12.5 μL CellTiter-Glo 化学发光法检测试剂液, 37 °C 振摇 10 min, 用 Infinite F200 多功能酶标仪检测化学发光强度, 并计算细胞 ATP 相对水平。ATP 相对水平 (%) = 各实验组化学发光强度/对照组化学发光强度 × 100%。

1.6 Clark 氧电极测定氧呼吸能力

心肌细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于细胞培养皿, 按 1.2 和 1.3 中的方法建立模型和设置实验分组。吸弃培养液, PBS 洗涤两次, 消化细胞, 低速离心, 用新鲜培养基重悬细胞。按说明书进行电极组装并调零, 恒定测试温度为 37 °C, 加入 1 mL 细胞浓度为 10^6 个/mL 的细胞悬液。待体系平衡后采用 Clark 氧电极测定相同时间点 5 min 内的氧呼吸曲线斜率。结果采用相对氧呼吸速率表示。相对氧呼吸速率 (%) = 样品氧呼吸速率/对照组氧呼吸速率 × 100%。

1.7 ELISA 法测定丙酮酸含量及 PDH 活性

心肌细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板, 按 1.2 和 1.3 中的方法建立模型和设置实验分组。吸弃培养液, PBS 洗涤两次, 每孔加入 150 μL Western 及 IP 细胞裂解液, 冰上裂解 5 min, $15\ 294 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液, 用 BCA 蛋白定量试剂盒说明书中的方法测定蛋白浓度, 然后按照丙酮酸测定试剂盒及 PDH 活性检测试剂盒说明书中的方法分别测定丙酮酸含量及 PDH 活性。

1.8 蛋白质印迹法测定 PDHA1 蛋白表达

将心肌细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 10 mm 直径的培养皿, 按 1.2 和 1.3 中的方法建立模型和设置实验分组。吸弃培养基, 加入预冷的 Western 及 IP 细胞裂解液, 裂解 5 min, $15\ 294 \times g$ 离心 10 min, 取上清液进行 BCA 定量。取等量蛋白样品上样, 采用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶恒压 150 V 电泳分离约 1.5 h, 用转印系统将蛋白转至 PVDF 膜, 室温封闭 2 h。剪膜后分别用 β-Tubulin 抗体 (1: 1000)、PDHA1 抗体 (1: 1000) 4 °C 孵育过夜。HRP 标记的抗鼠二抗 (1: 10 000) 室温孵育 1 h。将 PVDF 膜浸入化学

发光底物工作液(A液:B液=1:1),采用BIO-RAD凝胶成像系统显影并拍摄,Quantity One软件进行半定量分析。结果以相对蛋白表达量表示。相对蛋白表达量=(各实验组蛋白表达量/内参蛋白表达量)/(对照组蛋白表达量/内参蛋白表达量)。

1.9 实时定量 RT-PCR 法测定 PDK1 mRNA 表达

将心肌细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板,按 1.2 和 1.3 中的方法建立模型和设置实验分组。吸弃培养基,按 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,置于 -20°C 保存。Nanodrop 2000 微量分光光度计用无酶水调零后,检测样品 RNA 浓度;按逆转录试剂盒构建 20 μL 反应体系并设置反应过程,进行 RNA 逆转录。按实时定量 RT-PCR 试剂盒 UltraSYBR Mixture 说明书构建 25 μL 反应体系,并设置反应过程。目的基因为 PDK1,上游引物为 5'-GCTCTGTCAACGGAGTCCATC-3',下游引物为 5'-TCGGAACGTCGTCATGTCTT-3',内参基因为商品化的 GAPDH 引物。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对每个样本的 C_t 值进行处理。 C_t 值 = $2^{-[\text{实验组}(\text{目的基因}C_t - \text{内参基因}C_t) - \text{对照组}(\text{目的基因}C_t - \text{内参基因}C_t)]}$

1.10 统计学方法

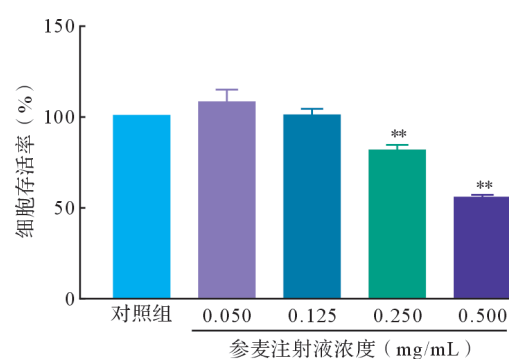
采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参麦注射液可在一定浓度范围内提高细胞存活率和 ATP 水平

对不同浓度参麦注射液进行细胞毒性检测,结果表明参麦注射液给药浓度在 0.250 mg/mL 及以上时会显著降低细胞存活率 ($P < 0.01$),见图 1。故后续实验以 0.025、0.050 和 0.125 mg/mL 三个浓度进行给药,保证参麦注射液对正常细胞无损伤作用。

与对照组(100%)比较,模型组细胞存活率下降为 $(48.05 \pm 4.37)\%$,两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$);参麦组药物浓度为 0.025、0.050、0.125 mg/mL 时,细胞存活率分别为 $(54.03 \pm 7.47)\%$ 、 $(76.81 \pm 6.86)\%$ 、 $(89.46 \pm 7.26)\%$,其中参麦注射液浓度为 0.050 和 0.125 mg/mL 时细胞存活率高于模型组(均 $P <$



与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度参麦注射液细胞毒性比较 ($n = 3$)

Figure 1 Toxicity of Shenmai injection on H9c2 myocardial cells ($n = 3$)

0.01),且与槲皮素组 $(82.13 \pm 2.52)\%$ 差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

与对照组(100%)比较,模型组细胞内相对 ATP 水平下降为 $(27.19 \pm 3.16)\%$,两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$);参麦组药物浓度为 0.025、0.050 和 0.125 mg/mL 时,细胞内相对 ATP 水平分别为 $(28.27 \pm 2.96)\%$ 、 $(38.62 \pm 3.26)\%$ 和 $(42.92 \pm 1.50)\%$,均高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但低于槲皮素组 $(72.33 \pm 3.74)\%$,均 $P < 0.01$ 。

上述结果提示,参麦注射液在一定浓度范围内可提高 t-BHP 损伤后心肌细胞的存活率和细胞内的 ATP 水平,且具有良好的量效关系。其中 0.125 mg/mL 参麦注射液给药后的细胞存活率与槲皮素组差异无统计学意义,且该浓度为本实验中无细胞毒性的最大药物浓度,故选择浓度为 0.125 mg/mL 的参麦注射液进行后续实验。

2.2 参麦注射液可改善线粒体氧呼吸功能

模型组细胞氧消耗直线斜率减小,呼吸速率降低为对照组的 $(60.68 \pm 5.24)\%$,与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.01$);0.125 mg/mL 参麦注射液给药后,氧呼吸速率提高至 $(79.87 \pm 11.38)\%$,与模型组差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 2。结果提示参麦注射液可提高心肌细胞的呼吸速率,改善细胞氧呼吸功能。

2.3 参麦注射液可增加细胞内丙酮酸含量和降低 PDH 活性

对照组丙酮酸含量为 $(0.02 \pm 0.01) \mu\text{mol}/\text{mg}$,模型组增加至 $(0.13 \pm 0.01) \mu\text{mol}/\text{mg}$,与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.01$);0.125 mg/mL 参麦

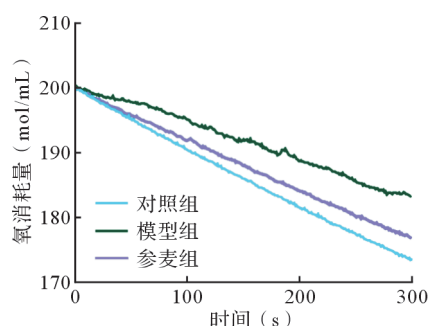


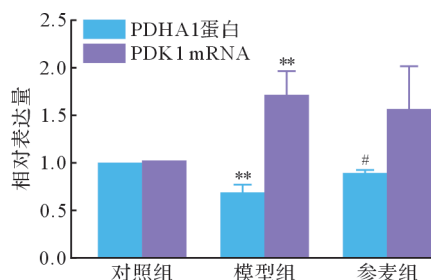
图2 各组氧呼吸曲线比较

Figure 2 Oxygen consumption curve in each group

注射液给药后,丙酮酸含量降至 $(0.09 \pm 0.01) \mu\text{mol}/\text{mg}$,与模型组差异有统计学意义($P < 0.01$)。对照组 PDH 活性为 $(0.91 \pm 0.02) \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,模型组 PDH 活性降低为 $(0.36 \pm 0.02) \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,与对照组差异有统计学意义($P < 0.01$); $0.125 \text{mg}/\text{mL}$ 参麦注射液给药后,PDH 活性升高至 $(0.51 \pm 0.03) \text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$,与模型组差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果提示,参麦给药可提高细胞内的 PDH 活性,从而降低丙酮酸含量。

2.4 参麦注射液可增加 PDHA1 蛋白表达

模型组 PDHA1 蛋白表达较对照组减少($P < 0.01$),而 $0.125 \text{mg}/\text{mL}$ 参麦注射液给药后,PDHA1 蛋白表达增加,与模型组差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组 PDK1 mRNA 表达较对照组增加($P < 0.01$),而 $0.125 \text{mg}/\text{mL}$ 参麦注射液给药后,其表达有减少趋势,但与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。结果提示,参麦注射液可提高氧化损伤过程中心肌细胞内 PDHA1 含量,可能与其下调 PDK1 mRNA 有关。

PDHA1:丙酮酸脱氢酶 α ;PDK1:丙酮酸脱氢酶激酶1.图3 各组 PDHA1 蛋白和 PDK1 mRNA 相对表达量比较($n=3$)Figure 3 Expression of PDHA1 protein and PDK1 mRNA ($n=3$)

3 讨论

参麦注射液源自古方生脉方,是由红参和麦冬两味药材组成的中药复方注射液,主要药理成分包括原人参二醇、原人参三醇、麦冬皂苷以及多糖等多种物质。人参皂苷是参麦注射液的主要成分,具有改善心血管功能、清除自由基、抗衰老等功效,而麦冬类物质在参麦注射液中含量较低^[11]。本研究提示,参麦注射液主要与调控氧化损伤心肌细胞中的能量代谢过程有关。

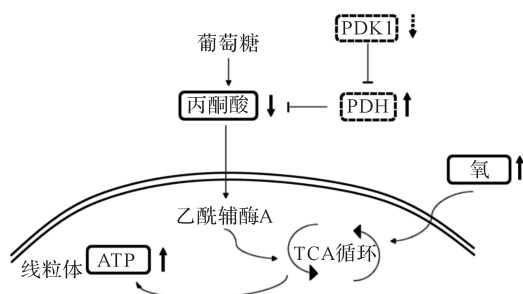
线粒体是细胞能量转换的主要场所,为人体提供 95% 以上的能量^[12],其功能稳定是维持细胞生命活动的前提。正常生理状态下线粒体产生的氧自由基具有动态平衡的特点,在病理环境如心脏缺血再灌注等情况下,氧自由基代谢失衡,对线粒体造成氧化损伤,影响细胞正常的能量转换过程,进一步对生命造成威胁^[13-14]。本实验采用 t-BHP 诱导心肌细胞氧化损伤模型,体外模拟心肌氧化损伤病理状态,研究参麦注射液对心肌细胞的保护作用。结果表明,参麦注射液能够剂量依赖性地提高氧化损伤后心肌细胞的存活率。氧化损伤后心肌细胞内 ATP 含量下降,提示线粒体功能受损,而参麦注射液给药后能够剂量依赖性地促进 ATP 生成,对维持线粒体能量代谢稳定具有一定作用。

有氧呼吸是线粒体产生 ATP 的主要途径之一,该过程中细胞通过摄入氧气参与能量代谢,释放 ATP,维持细胞正常生理功能。本研究采用的 Clark 氧电极测定溶液中氧含量的方法是目前测定细胞氧呼吸速率的常用方法。其测定原理是将体系中的氧气通过氧化还原反应形成电化学电池,以输出电流-电压信号的变化表示氧气消耗过程,即为细胞氧呼吸过程,耗氧曲线的斜率代表细胞氧呼吸的速率^[15-16]。结果表明,氧化损伤后细胞有氧呼吸作用受到抑制,耗氧速率降低;参麦注射液给药后能够提高细胞呼吸速率,有效改善细胞有氧呼吸过程。

丙酮酸是有氧氧化过程的中间产物,在 PDH 的作用下转变为乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环,同时产生大量 ATP。PDH 是丙酮酸脱氢酶复合体之一,广泛存在于微生物、植物和动物中,其活性对其他的糖类和脂肪氧化代谢均具有重要作用^[17]。因此,PDH 是连接有氧氧化、三羧酸循环

及 ATP 生成的重要物质。结果表明,氧化损伤后细胞内 PDH 活性降低,造成丙酮酸堆积;参麦注射液给药后,PDH 活性提高,丙酮酸含量降低,从而维持三羧酸循环的稳定。通过对 PDHA1 表达的检测,进一步说明参麦注射液能够增加氧化损伤状态下心肌细胞中的 PDH 表达。PDH 的活性与其磷酸化相关,其磷酸化过程主要在 PDK 和丙酮酸脱氢酶磷酸酶的催化下进行^[18]。实时定量 RT-PCR 结果显示,氧化损伤后细胞内 PDK1 mRNA 表达增加,参麦注射液给药后 PDK1 mRNA 具有下降趋势,提示参麦注射液可能通过调控 PDK 从而进一步影响 PDH 的表达及活性。

综上所述,参麦注射液可通过提高氧化损伤心肌细胞线粒体中的 PDH 活性,促进丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环,同时促进细胞氧呼吸作用,提高 ATP 水平和细胞存活率(图 4)。在未来的实验中,我们将进一步对 PDK1 在参麦注射液给药后的蛋白活性及表达量进行测定,以充分揭示参麦注射液通过调控 PDK1 影响 PDH 的活性及表达的机制,为阐明参麦注射液改善心肌细胞线粒体中丙酮酸代谢提供更多依据。



参麦注射液通过调控丙酮酸脱氢酶激酶 I (PDK1) 提高丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性,降低丙酮酸含量,同时促进细胞氧呼吸,从而提高腺苷三磷酸 (ATP) 水平,保护氧化损伤环境下的心肌细胞线粒体功能。

图 4 参麦注射液调控氧化损伤心肌细胞中的能量代谢过程示意图

Figure 4 Shenmai injection may improve energy metabolism of H9c2 myocardial cells

参考文献

- [1] 隋 辉,陈伟伟,王 文.《中国心血管病报告 2015》要点解读[J]. 中国心血管杂志,2016,21(4):259-261.
SUI Hui, CHEN Weiwei, WANG Wen. Interpretation of Report on cardiovascular diseases in China (2015) [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Medicine, 2016,21(4):259-261. (in Chinese)
- [2] 陈 昕,赵 雷,韩蕴琪,等.维生素 E 对心肌氧化损伤的保护作用研究[J]. 中国实验诊断学,2012,16(6):975-977.
CHEN Xin, ZHAO Lei, HAN Yunqi, et al. Effect of vitamin E on myocardium injury caused by free radicals [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2012,16(6):975-977. (in Chinese)
- [3] 李爱群,王绮雯.熊果酸对过氧化氢诱导大鼠心肌细胞氧化损伤的保护作用[J]. 血栓与止血学,2017,23(6):908-911.
LI Aiqun, WANG Qiwen. Protective effect of ursolic acid on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in cultured rat cardiomyocytes [J]. Chinese Journal of Thrombosis and Hemostasis, 2017,23(6):908-911. (in Chinese)
- [4] 李傅冬,沈 毅.参麦注射液治疗冠心病疗效与安全性的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志,2012,37(23):3651-3658.
LI Fudong, SHEN Yi. Meta-analysis on efficacy and safety of Shenmai injection in treatment of coronary heart disease [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012,37(23):3651-3658. (in Chinese)
- [5] 宋建丽.参麦注射液治疗冠心病的临床分析[J]. 药学进展,1999,23(1):44-46.
SONG Jianli. Clinical analysis of Shenmai injection in the treatment of coronary heart disease [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 1999,23(1):44-46. (in Chinese)
- [6] 苏 萍,吕书峰,范雪梅,等.参麦注射液及其有效组分对 H_2O_2 诱导心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中成药,2011,33(12):2150-2153.
SU Ping, LYU Shufeng, FAN Xuemei, et al. Protective effect of Shenmai injection and its components on H_2O_2 induced oxidative injury of cardiomyocytes [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2011,33(12):2150-2153. (in Chinese)
- [7] 许 浩,葛亚坤,邓同乐,等.人参皂苷 Rb1 对 H_2O_2 诱导新生大鼠心肌细胞凋亡的保护作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(7):803-806.
XU Hao, GE Yakun, DENG Tongle, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 against H_2O_2 -induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2005,21(7):803-806. (in Chinese)
- [8] 刘俊伟,任治龙,刘旭玲,等.人参皂苷 Rb1 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后脑梗死体积及脑组织和血清 IL-1 β 的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(12):1696-1700.

- LIU Junwei, REN Yelong, LIU Xuling, et al. Effect of ginsenoside Rb1 on cerebral infarction volume and IL-1 β in the brain tissue and sera of focal cerebral ischemia/reperfusion injury model rats [J]. **Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine**, 2013, 33(12):1696-1700. (in Chinese)
- [9] SU X, MA Y, HUANG R, et al. Effects of shenmai injection on blood SOD activity and MDA level in senile patients with coronary heart disease [J]. **J Tradit Chin Med**, 2005, 25(1):50-53.
- [10] 李 丽, 黄启福. 参麦注射液对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. **中国病理生理杂志**, 2003, 19(11):1472-1475.
- LI Li, HUANG Qifu. Effects of Shenmai injection on acute myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. **Chinese Journal of Pathophysiology**, 2003, 19(11):1472-1475. (in Chinese)
- [11] 余 健, 辛艳飞, 宣尧仙. 参麦注射液药理作用的物质基础研究进展[J]. **医药导报**, 2013, 32(4):497-500.
- YU Jian, XIN Yanfei, XUAN Yaoxian. Progress in pharmacological basis of Shenmai injection [J]. **Herald of Medicine**, 2013, 32(4):497-500. (in Chinese)
- [12] LAHERA V, DE LAS H N, LOPEZ-FARRE A, et al. Role of mitochondrial dysfunction in hypertension and obesity [J]. **Curr Hypertens Rep**, 2017, 19(2):11.
- [13] GRAHAM B H, WAYMIRE K G, COTTRELL B, et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator [J]. **Nat Genet**, 1997, 16(3):226-234.
- [14] KANAI A J, PEARCE L L, CLEMENS P R, et al. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection [J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2001, 98(24):14126-14131.
- [15] CERNIGLIA G J, DEY S, GALLAGHER-COLOMBO S M, et al. The PI3K/Akt pathway regulates oxygen metabolism via pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 α phosphorylation [J]. **Mol Cancer Ther**, 2015, 14(8):1928-1938.
- [16] BRUN S, AUBRY C, LIMA O, et al. Relationships between respiration and susceptibility to azole antifungals in *Candida glabrata* [J]. **Antimicrob Agents Chemother**, 2003, 47(3):847-853.
- [17] STANLEY W C, RECCHIA F A, LOPASCHUK G D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart [J]. **Physiol Rev**, 2005, 85(3):1093-1129.
- [18] CREWE C, SCHAFER C, LEE I, et al. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in the heart through degradation by the Lon protease in response to mitochondrial substrate availability [J]. **J Biol Chem**, 2017, 292(1):305-312.
- [本文编辑 余 方 刘丽娜]

· 学术动态 ·

郭方研究员团队揭示节律神经回路参与睡眠和觉醒的调控机制

2018年9月27日,浙江大学医学院神经科学中心郭方研究员团队在《神经元》(*Neuron*)在线发表了题为“A circadian output circuit controls sleep-wake arousal in *Drosophila*”的研究论文([https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(18\)30775-X?_returnURL](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(18)30775-X?_returnURL))。该研究鉴定出果蝇的背侧节律神经元 APDN1 往睡眠稳态中心椭球体 EB-R2 投射的神经回路,揭示了该神经回路决定睡眠和觉醒水平的作用机制,为阐述昼夜节律回路和睡眠回路的连接机制提供了重要的实验依据。

研究发现,果蝇节律神经回路包含不同的神经元亚群,其中促进睡眠的是 APDN,其往后侧投射的轴突能抑制促进活动的节律神经元 LNd,而往前的轴突则投射到一个叫 AOTU 的脑区。在这里,它们支配着一群特殊的 TuBu 神经元,并通过其与 EB-R2 偶联。激活 APDN 会在 EB-R2 中产生类似睡眠时的特定振荡模式。

研究工作得到国家青年千人计划资助。