

# 1-磷酸鞘氨醇对心肌缺血再灌注损伤所致细胞凋亡的影响及其与PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ 通路的相关性研究

李文畅<sup>1</sup>, 马晓倩<sup>1</sup>, 李玉璟<sup>1</sup>, 张丽志<sup>2</sup>, 李蒙蒙<sup>1</sup>, 方瑞<sup>1</sup>, 温克<sup>1\*</sup> (1.天津医科大学基础医学院药理学系, 天津 300070; 2.天津市第一中心医院妇产科, 天津 300192)

**摘要:** 目的 研究 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)对心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)所致细胞凋亡的影响及其与 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ 信号通路的相关性。方法 缺血 30 min 后, 进行再灌注损伤 120 min, 建立大鼠 MIRI 模型。采用 TTC 染色方法测定心肌梗死面积, 采用 TUNEL 染色方法观察心肌凋亡指数, 采用酶联免疫方法测定血浆 CK-MB 活性。采用 Western blot 方法测定 Akt、GSK3 $\beta$  磷酸化情况以及 cleaved caspase-3 水平, 并测定细胞色素 C 释放情况。结果 S1P 可明显减少心肌梗死面积、降低细胞凋亡指数。同时增加 Akt、GSK3 $\beta$  磷酸化程度, 降低 cleaved caspase-3 水平, 减少胞浆细胞色素 C 易位。S1P 的保护作用可被 PI3K 抑制剂 LY294002 所阻断。结论 S1P 可通过抑制线粒体蛋白细胞色素 C 释放、减少 caspase 激活, 减弱 MIRI 所致心肌细胞凋亡以及心肌梗死, 该作用与 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路活化有关。

**关键词:** 1-磷酸鞘氨醇; 缺血再灌注损伤; 凋亡; PI3K/Akt

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)02-0151-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.02.001

## Effects of Sphingosine-1-phosphate on Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia-reperfusion Injury and Its Correction with PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ Pathway

LI Wenchang<sup>1</sup>, MA Xiaoqian<sup>1</sup>, LI Yujing<sup>1</sup>, ZHANG Lizhi<sup>2</sup>, LI Mengmeng<sup>1</sup>, FANG Rui<sup>1</sup>, WEN Ke<sup>1\*</sup> (1.Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect of sphingosine 1-phosphate (S1P) on cell apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion injury(MIRI), and its correlation with PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  pathway. **METHODS** Rats were subjected to MIRI, consisting of 30 min of ischemia followed by 120 min of reperfusion. Myocardial infarct size and apoptotic index were measured by triphenyltetrazolium (TTC) and terminal deoxynucleotide transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assays, respectively. Plasma CK-MB activity was measured by enzyme linked immunosorbent assay. Akt and GSK3 $\beta$  phosphorylation, caspase-3 cleavage, and cytochrome C translocation were assessed by western blot. **RESULTS** S1P significantly decreased myocardial infarct size and apoptosis, as well as enhanced Akt and GSK3 $\beta$  phosphorylation, attenuated caspase-3 cleavage and cytosolic cytochrome C translocation. Moreover, the protective effects of S1P treatment were blocked by cotreatment with a PI3K inhibitor, LY294002. **CONCLUSION** S1P can inhibit the release of mitochondrial cytochrome C, block activation of caspase-3, relieve cellular apoptosis and myocardial infarction. And these effects are mediated by activation of PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  pathway.

**KEY WORDS:** sphingosine 1-phosphate; myocardial ischemia/reperfusion injury; apoptosis; PI3K/Akt

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)是指缺血心肌在恢复血液供应后, 心肌损伤加重的情况, 可导致梗死面积增大、细胞凋亡、心律失常等。缺血性或药理性预适应或后适应可在一定程度上增加心肌细胞抗

MIRI 的能力<sup>[1]</sup>, 实验研究表明, 部分药物(如吸入麻醉药、他汀类和阿片类药物)可诱导药理性后适应发挥心肌保护作用<sup>[2-3]</sup>。

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate, S1P)是位于细胞膜上的鞘磷脂的代谢产物<sup>[4]</sup>, 本实验室

基金项目: 国家自然科学基金项目(81173058, 81502419), 天津市大学生创新创业训练计划项目(201610062021)

作者简介: 李文畅, 女, 硕士生, 研究实习员 Tel: 15222152061 E-mail: lanyu\_ziqi@163.com \*通信作者: 温克, 男, 博士, 副教授 Tel: (022)83336835 E-mail: kewencn@163.com

前期研究表明, S1P 具有保护微血管内皮细胞, 抑制炎症诱导的微血管通透性增加<sup>[5]</sup>; 抵抗心肌细胞缺氧/复氧损伤等作用<sup>[6]</sup>。但其对心肌缺血再灌注损伤的影响及其机制尚不完全清楚。目前研究发现, 再灌注损伤挽救激酶(reperfusion injury salvage kinase, RISK)通路介导了部分药物后适应诱导的心肌保护作用, 该通路主要包括磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-OH kinase, PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinases 1/2, Erk1/2)以及糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )<sup>[7]</sup>。而 GSK3 $\beta$  活性的抑制可增加心肌对 MIRI 的耐受力。S1P 是否对 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  通路有影响目前尚不清楚, 因此本研究应用大鼠 MIRI 模型观察了 S1P 对心肌细胞损伤的影响, 同时进一步观察了 S1P 对 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  通路以及凋亡通路主要蛋白细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-C)以及 caspase-3 的影响, 以明确 S1P 心肌保护作用的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠, 7 周龄, 体质量(250 $\pm$ 10)g,  $\delta$ , 56 只, 由北京维通利华实验动物技术有限公司动物公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(京) 2007-0001。

### 1.2 主要试剂与仪器

S1P(美国 Sigma 公司, 批号: 113M4720V); PI3K 抑制剂 LY294002(美国 Sigma 公司, 批号: 092M4616V); 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC, 美国 Sigma 公司, 批号: T17770); CK-MB Elisa 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: E1112060); 磷酸化-Akt(Ser473)、cleaved caspase-3、 $\beta$ -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 科技公司; Akt、Cyt-C、VDAC、磷酸化-GSK3 $\beta$ (Ser 9)以及 GSK3 $\beta$  抗体购自美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: 20140709); ECL 发光试剂盒(江苏碧云天生物技术研究, 批号: 109525)。

Powerpac HC 型电泳仪(美国 BIO-RAD 公司); Tanon-5200 型凝胶成像仪(北京原平皓生物技术有限公司)。

### 1.3 分组

Wistar 大鼠随机分为 4 组, 每组 14 只。假手术组: 大鼠行开胸手术, 但不进行 MIRI 损伤操作; MIRI 组: 大鼠开胸后, 接受心肌 30 min 缺血随后 120 min 再灌注损伤操作; S1P 组: 大鼠接受 MIRI 损伤操作, 再灌注初期股静脉注射 1.0 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> S1P; LY+S1P 组: 大鼠缺血后 15 min 股静脉注射 0.3 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup> LY294002, 其余同 S1P 组。每组动物其中 8 只用于梗死面积及 CK-MB 测定, 剩余 6 只用于凋亡及蛋白检测。

### 1.4 MIRI 模型制备

大鼠通过腹腔注射乌拉坦(1.0 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)进行麻醉。行气管插管, 连接小动物呼吸机。开胸后暴露心脏, 用 3-0 缝合线结扎冠状动脉左前降支进行缺血损伤, 缺血 30 min 后, 去除缝合线, 恢复血液供应, 进行再灌注损伤 120 min。

### 1.5 心肌梗死面积测定

每组选取 8 只动物心脏用于梗死面积测定。再灌注 120 min 后, 结扎左前降支, 股静脉注射 0.5%台盼蓝溶液 2 mL, 随后立即取出心脏。沿矢状轴将心脏切成 1 mm 厚的切片。蓝染组织为正常组织, 而未染色组织为缺血组织, 即危险区(AAR)。分离 AAR 并用 0.03 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> TTC 溶液于 37  $^{\circ}$ C 水域孵育 20 min。正常心肌经 TTC 染色后为砖红色, 而梗死心肌(IS)表现为灰白色。分离梗死组织及正常组织并称量, 计算 IS/AAR 比值以反应心肌梗死面积。

### 1.6 血浆 CK-MB 活性测定

动物心肌缺血再灌注损伤 120 min 后, 经腹主动脉取血 3 mL, 300 $\times$ g 离心 10 min 分离血浆。采用 ELISA 方法测定血浆 CK-MB 活性。

### 1.7 心肌细胞 TUNEL 检测

心肌再灌注损伤 120 min 后, 取左心室近心尖部组织, 常规固定、脱水、包埋、切片。采用 TUNEL 染色的方法观察心肌凋亡情况。胞核棕染的细胞为 TUNEL 阳性、凋亡细胞。计算 5 个视野下凋亡阳性细胞的百分率即为凋亡指数。

### 1.8 Western blot 实验

取心脏左心室组织制备匀浆, 并提取全细胞、线粒体、胞浆蛋白样品, BCA 法蛋白定量。全细胞蛋白样品用于 Akt、GSK3 $\beta$  以及 caspase-3 检测,

线粒体及胞浆蛋白样品用于 Cyt-C 测定。BCA 法蛋白定量, 将蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并转至 PVDF 膜。封闭液室温封闭 1 h 后, 加入 p-Akt、Akt、p-GSK3 $\beta$ 、GSK3 $\beta$ 、cleaved caspase-3、 $\beta$ -actin、Cyt-C、VDAC 等一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h。采用 ECL 法观察特异蛋白条带光密度变化。并计算磷酸化蛋白与总蛋白的比值或目的蛋白与内参蛋白(VDAC: 线粒体内参;  $\beta$ -actin: 全细胞蛋白内参)比值。

### 1.9 统计学方法

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析(one way ANOVA)检验。 $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 S1P 对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心肌梗死面积及血浆 CK-MB 活性的影响

假手术组无梗死心肌存在, 而 MIRI 组可见大范围梗死组织与假手术组比较, 具有显著性差异( $P < 0.01$ )。S1P 可明显减少 IS/AAR, 与 MIRI 组比较, 具有显著性差异( $P < 0.01$ )。此外, LY294002 预处理组可减弱 S1P 减少心肌梗死面积的作用, 与 MIRI 组比较无显著性差异。血浆 CK-MB 检测发现, MIRI 组 CK-MB 水平明显高于假手术组

( $P < 0.01$ )。与心肌梗死面积结果相似, S1P 可显著降低 MIRI 损伤引起的 CK-MB 增高( $P < 0.01$ ), 而 LY294002 可抑制 S1P 对 CK-MB 的影响。结果见表 1。

表 1 S1P 对缺血再灌注损伤大鼠心肌 IS/AAR 和血浆 CK-MB 的影响( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effect of S1P on IS/AAR and serum creatine kinase-MB(CK-MB) after ischemia-reperfusion injury( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IS/AAR	CK-MB/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术组	-	-	90.76 $\pm$ 22.43 <sup>2)</sup>
MIRI	-	0.536 $\pm$ 0.132 <sup>1)</sup>	195.44 $\pm$ 29.94 <sup>1)</sup>
S1P	1.0	0.301 $\pm$ 0.134 <sup>2)</sup>	129.93 $\pm$ 20.83 <sup>1)2)</sup>
LY+S1P	1.0(S1P)+0.3(LY)	0.482 $\pm$ 0.064	174.93 $\pm$ 21.13 <sup>1)</sup>

注: 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与 MIRI 组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with MIRI group, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

### 2.2 S1P 对心肌细胞凋亡的影响

与假手术组比较, MIRI 组凋亡细胞数量明显增加( $P < 0.01$ ); 而 S1P 可降低心肌细胞凋亡指数, 与 MIRI 组比较具有显著性差异( $P < 0.01$ )。LY294002 预处理可抑制 S1P 降低凋亡细胞的作用, 与 MIRI 组比较, 无显著性差异。结果见图 1。

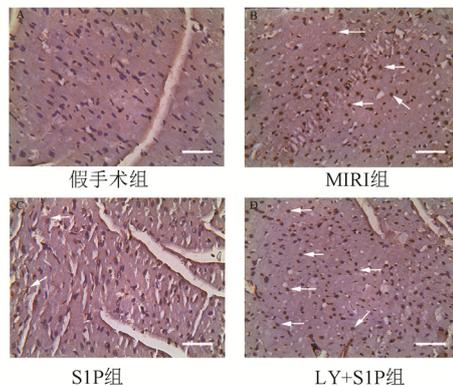
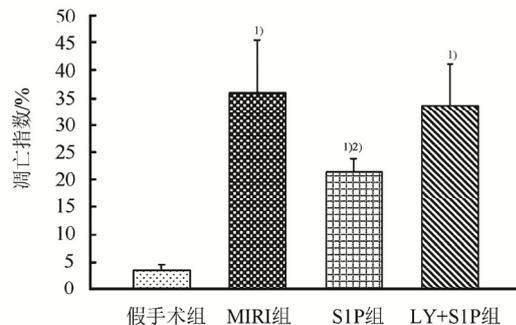


图 1 S1P 对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌凋亡的影响(400 $\times$ )  
与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与 MIRI 组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect of S1P on apoptosis of myocardium after ischemia-reperfusion injury (400 $\times$ )  
Compared with control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with MIRI group, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .



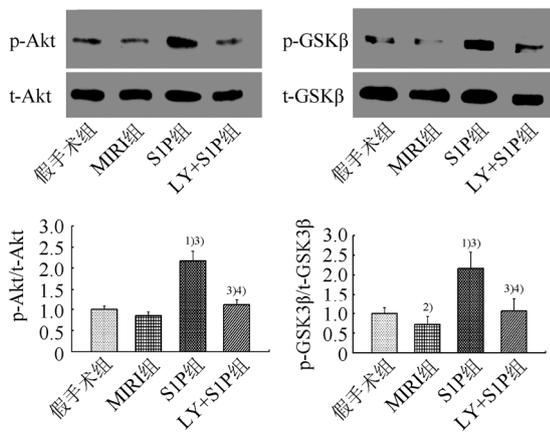
### 2.3 S1P 对心肌细胞 Akt、GSK3 $\beta$ 磷酸化以及 cleaved caspase-3 水平的影响

各组间总 Akt 以及总 GSK3 $\beta$  水平无显著性差异。与假手术组比较, MIRI 组磷酸化 Akt 水平无显著性差异。而 S1P 可明显增加 p-Akt, 与假手术

组比较, 具有显著性差异( $P < 0.01$ )。此外 LY294002 可减弱 S1P 引起的 Akt 磷酸化的增加, 与 S1P 组及 MIRI 组比较, 具有显著性差异( $P < 0.01$ )。

GSK3 $\beta$  磷酸化水平检测显示, 与假手术组比较, MIRI 组 p-GSK3 $\beta$  水平明显增高( $P < 0.05$ )。S1P

可明显增加 p-GSK3 $\beta$  水平, 与假手术组比较, 具有显著性差异( $P<0.01$ ), 而 LY294002 可部分抑制 S1P 对 p-GSK3 $\beta$  的作用, 与 S1P 组及 MIRI 组比较, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。结果见图 2。



**图 2** S1P 对心肌 Akt 和 GSK3 $\beta$  磷酸化的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ ) 与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ , <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与 MIRI 组比较, <sup>3)</sup> $P<0.01$ ; 与 S1P 组比较, <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

**Fig. 2** Effects of S1P on Akt and GSK3 $\beta$  phosphorylation in rat hearts( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ , <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with MIRI group, <sup>3)</sup> $P<0.01$ ; compared with S1P group, <sup>4)</sup> $P<0.01$ 。

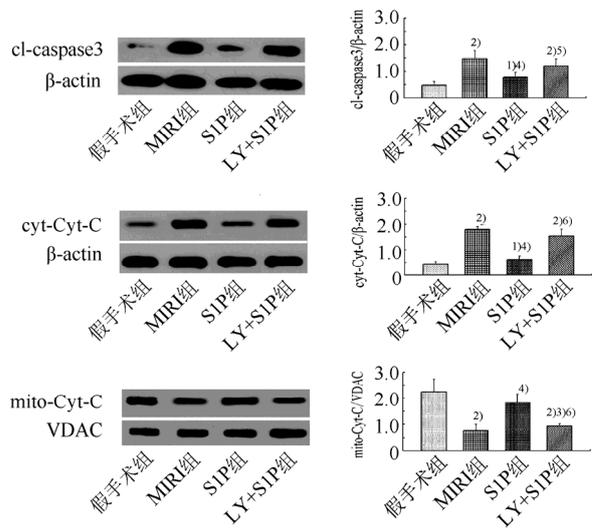
与假手术组比较, MIRI 组 cleaved caspase-3 水平明显增加( $P<0.01$ ), S1P 可阻断 MIRI 所致的 cleaved caspase-3 增加, 与 MIRI 组比较, 具有显著性差异( $P<0.01$ )。此外, LY294002 预处理可抑制 S1P 对 caspase-3 的作用, 与 S1P 组比较, 具有显著性差异( $P<0.05$ )。结果见图 3。

#### 2.4 S1P 对心肌细胞线粒体 Cyt-C 释放的影响

与假手术组比较, MIRI 组心肌细胞胞浆 Cyt-C 水平明显增加( $P<0.01$ ), 而线粒体 Cyt-C 水平显著下降( $P<0.01$ )。S1P 可抑制 Cyt-C 由线粒体至胞浆的释放, 可降低胞浆 Cyt-C, 增加线粒体 Cyt-C 水平, 与 MIRI 组比较, 具有显著性差异( $P<0.01$ ), 而该作用可为 LY294002 所逆转, 结果见图 3。

### 3 讨论

心肌缺血再灌注损伤过程中, 细胞死亡形式主要包括 2 种: 细胞凋亡和坏死<sup>[8]</sup>。有其他实验研究证实, S1P 对内皮细胞放射损伤具有抗凋亡作用<sup>[9]</sup>。本研究在证实 S1P 具有缩小心肌梗死面积、降低 CK-MB 活性的前提下, 主要观察了 S1P 对细胞凋亡的影响, 并进一步探索了其抗细胞凋亡机制。TUNEL 检测证实, S1P 可明显降低 MIRI 诱导的细胞凋亡, 具有一定的抗凋亡作用。



**图 3** S1P 对心肌 Cleaved caspase 3 及 Cyt-C 易位的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; 与 MIRI 组比较, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ ; 与 S1P 组比较, <sup>5)</sup> $P<0.05$ , <sup>6)</sup> $P<0.01$ 。

**Fig. 3** Effects of S1P on caspase-3 cleavage and Cyt-C translocation in rat hearts( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ ; compared with MIRI group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ , <sup>4)</sup> $P<0.01$ ; compared with S1P group, <sup>5)</sup> $P<0.05$ , <sup>6)</sup> $P<0.01$ 。

多数研究认为 RISK 信号通路和生存活化因子增强通路(survivor activating factor enhancement pathway, SAFE)可能在药物抗 MIRI 损伤作用中发挥一定的作用<sup>[10]</sup>。本实验室前期研究已证实 SAFE 通路 S1P 抗心肌缺氧复氧损伤作用有关<sup>[6]</sup>。本次研究主要观察 RISK 通路在 S1P 心肌保护作用中的影响。实验结果显示 S1P 可明显增加 p-Akt, 提示 S1P 可活化 RISK 通路。为进一步证实 RISK 通路活化与 S1P 心肌保护作用有关, 采用了 PI3K 抑制剂 LY294002, 研究显示 LY294002 可抑制 S1P 引起的 Akt 磷酸化增加, 并减弱 S1P 诱导的心肌保护作用。提示 RISK 信号通路活化在 S1P 抗 MIRI 损伤中发挥重要作用。

GSK3 $\beta$  是 RISK 信号通路下游的关键靶点, 有研究报道, 白藜芦醇、舒芬太尼等药物可增加 GSK3 $\beta$  磷酸化进而减少心肌梗死范围<sup>[11]</sup>, 提示 GSK3 $\beta$  磷酸化与心肌保护作用有关。与其他实验室研究结果相似, 本研究证实 S1P 亦可增加 GSK3 $\beta$  磷酸化, 且此作用可为 LY294002 所阻断, 提示 S1P 可通过 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  通路发挥心肌保护作用。

线粒体为细胞氧化磷酸化的主要位点, 在 MIRI 损伤引起的细胞坏死和凋亡过程中发挥着关键作用。在生理状态, 线粒体通透性转换孔

(mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 处于关闭状态, 再灌注损伤早期, 钙超负荷、氧化应激等因素可刺激 mPTP 开放<sup>[12-13]</sup>。mPTP 开放可进一步导致线粒体肿胀, 线粒体破坏, Cyt-C 由线粒体释放入胞浆, 进而激活 caspase 家族, 诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。本实验研究结果显示 S1P 可抑制 MIRI 诱导的 Cyt-C 释放以及 caspase-3 活化, 该作用亦可为 LY294002 所阻断。

综上所述, 本研究结果提示 S1P 可通过抑制线粒体 Cyt-C 释放、减少 caspase 激活, 减弱 MIRI 所致心肌细胞凋亡以及心肌梗死, 该作用与 PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  信号通路活化有关。

## REFERENCES

- [1] HEUSCH G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic [J]. *Lancet*, 2013, 381(9861): 166-175.
- [2] XIA J G, XU F F, QU Y, et al. Atorvastatin post-conditioning attenuates myocardial ischemia reperfusion injury via inhibiting endoplasmic reticulum stress-related apoptosis [J]. *Shock*, 2014, 42(4): 365-371.
- [3] CHEN D, CHENG B, ZHOU H Y, et al. The effect of sevoflurane postconditioning on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 6049-6057.
- [4] YATOMI Y, OHMORI T, RILE G, et al. Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells [J]. *Blood*, 2000, 96(10): 3431-3438.
- [5] ZHANG G, XU S, QIAN Y, et al. Sphingosine-1-phosphate prevents permeability increases via activation of endothelial

- sphingosine-1-phosphate receptor 1 in rat venules [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(5): H1494-H1504.
- [6] WANG Y, WANG D, ZHANG L, et al. Role of JAK-STAT pathway in reducing cardiomyocytes hypoxia/reoxygenation injury induced by S1P postconditioning [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016(784): 129-136.
- [7] HAUSENLOY D J, YELLON D M. New directions for protecting the heart against ischemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 448-460.
- [8] GOTTLIEB R A, BURLESON K O, KLONER R A, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes [J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(4): 1621-1628.
- [9] BONNAUD S, NIAUDET C, LEGOUX F, et al. Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23): 9905-9915.
- [10] KALAKECH H, HIBERT P, PRUNIER-MIREBEAU D, et al. RISK and SAFE signaling pathway involvement in apolipoprotein A-I-induced cardioprotection [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107950. Doi: 10.1371/journal.pone.0107950.
- [11] WU Q L, SHEN T, MA H, et al. Sufentanil postconditioning protects the myocardium from ischemia-reperfusion via PI3K/Akt-GSK-3 $\beta$  pathway [J]. *J Surg Res*, 2012, 178(2): 563-570.
- [12] ONG S B, SAMANGOUEI P, KALKHORAN S B, et al. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015(78): 23-34.
- [13] ERTRACHT O, MALK A, ATAR S, et al. The mitochondria as a target for cardioprotection in acute myocardial ischemia [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(1): 33-40.
- [14] PARK S S, ZHAO H, MUELLER R A, et al. Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3beta [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(5): 708-716.

收稿日期: 2016-09-11