



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R605

U D C 616.1

密 级 公开

博士学位论文

褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤作用
及机制研究

 于立明

培 养 类 别 全日制

学 号 3012008001

学 位 类 型 专业学位

一级学科(专业类) 临床医学

二级学科(专业) 外科学(胸心外科)

研 究 方 向 心肌保护

指 导 教 师 俞世强 教授(主任医师)

培 养 单 位 西京医院心血管外科

二〇一六年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表.....	1
中文摘要.....	3
Abstract.....	8
前 言.....	15
文献回顾.....	17
正 文.....	44
第一部分 SIRT1 信号通路介导褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤作用及机制研 究.....	44
1 实验材料.....	44
2 实验方法.....	47
3 实验结果.....	51
4 实验讨论.....	53
第二部分 SIRT1 信号通路介导褪黑素抗糖尿病状态下心肌缺血/再灌注损伤 作用及机制研究.....	55
1 实验材料.....	55
2 实验方法.....	58
3 实验结果.....	65
第三部分 Notch1/Hes1 信号通路介导褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤作用及 机制研究.....	69
1 实验材料.....	69
2 实验方法.....	72
3 实验结果.....	79
4 实验讨论.....	81
附 图.....	83
小结及主要创新点.....	111

参考文献.....	112
个人简历和研究成果.....	134
致 谢.....	137

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
AFMK	N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine	N1-乙酰-N2-甲酰-5-甲氧色胺
Akt	protein kinase B	蛋白激酶 B
AMK	N1-acetyl-5-methoxykynuramine	N-乙酰-甲氧犬尿胺
APN	adiponectin	脂联素
ARE	antioxidant response element	抗氧化应激元件
ATG	autophagy associated gene	自噬相关基因
ATP	adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
caspase	cysteinyl aspartate specific proteinase	含半胱氨酸的天冬氨酸蛋
CRP	C-reactive protein	C 反应蛋白
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DBC1	deleted in breast cancer 1	乳腺癌缺失基因 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	培养液
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	内皮型一氧化氮合酶
HIC1	hypermethylated in cancer 1	癌高甲基化 1
HMGB1	high mobility group box-1 protein	高迁移率族蛋白 1
HO-1	heme oxygenase-1	红素加氧酶-1
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	人脐静脉内皮细胞
iNOS	inducible nitric oxide synthase	诱导型一氧化氮合酶
JAK	Janus Kinase	Janus 激酶
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LDL	low-density lipoprotein	低密度脂蛋白
LVEF	left ventricular ejection fraction	左室射血分数
Mel	melatonin	褪黑素

MHC	myosin heavy chain	肌球蛋白重链
MI/R	myocardial ischemia/reperfusion	心肌缺血/再灌注
MPO	myeloperoxidase	髓过氧化物酶
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase	烟酰胺磷酸核糖基转移酶
NICD	Notch intracellular domain	Notch 受体胞内区段
NMNAT	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase	烟酰胺/烟酸单核苷酸腺苷酰 转移酶
nNOS	neuronal NOS	神经型一氧化氮合酶
NO	nitric oxide	一氧化氮
NQO1	quinone oxidoreductase-1	醌氧化还原酶-1
Nrf2	nuclear factor erythroid-2-related factor 2	核因子 E2 相关因子 2
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10	10 号染色体上缺失的磷酸酶 和张力蛋白类似物
PVDF	Poly vinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
RAAS	renin-angiotensin-aldosterone system	肾素-血管紧张素-醛固酮系统
ROS	reactive oxygen species	活性氧簇
SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
STAT	signal transducers and activators of transcription	信号传导及转录激活因子
STZ	streptozotocin	链脲佐菌素
TBARS	thiobarbituric acid reactive substance	硫代巴比妥酸反应物
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	金属蛋白酶-3 抑制因子
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TTC	2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride	2,3,5-三苯基氯化四氮唑
TUNEL	transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling	转移酶介导的三磷酸脱氧 鸟苷-生物素刻痕末端标记
UPR	unfolded protein response	未折叠蛋白反应
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子

褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤作用及机制研究

博士研究生：于立明

导 师：俞世强 教授

辅 导 教 师：段维勋 副教授

第四军医大学西京心血管外科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（81470415，81470411）

中文摘要

研究背景：

心肌缺血/再灌注（myocardial ischemia/reperfusion, MI/R）损伤可引发心律失常、心肌顿抑、微血管功能障碍甚至不可逆性心肌损伤，是缺血性心脏病预后不良的重要原因。尤其在糖尿病状态下，机体高血糖及心肌胰岛素抵抗更加重了 MI/R 损伤，临床上亟待探寻一种有效的干预方法。近年来，外源性药物治疗已成为减轻 MI/R 损伤的关键策略，然而由于药物作用机制、来源及副作用等诸多问题，至今尚未有理想的药物干预手段。寻找人体内源性心肌保护分子抗 MI/R 损伤已成为当前研究热点。

褪黑素（Melatonin, Mel）是一种由松果体合成的内源性激素，具有镇静、催眠、调节血压、抗肿瘤等多种药理学作用。更重要的是，研究发现褪黑素可调节心血管系统并有效减轻 MI/R 损伤，保护心功能。然而褪黑素抗 MI/R 损伤的机制尚未完全阐明，尤其是在糖尿病状态下褪黑素对 MI/R 损伤的作用及机制也未见基础及临床报道，严重限制其临床应用。

SIRT1（silent information regulator of transcription 1，沉默信息调控因子 1）参与调控细胞增殖、凋亡、分化和衰老等多个过程，是目前国际上研究心脏保护的热点与“明星分子”。本课题组前期研究证实，SIRT1 可介导姜黄素（curcumin）等药物抗 MI/R 损伤，然而 SIRT1 是否介导褪黑素心肌保护效应及在糖尿病 MI/R 损伤过程中

的作用均未见报道。另外，本课题组前期研究发现在缺血心肌组织中，激动 Notch1/Hes1 (hairy and enhancer of split-1) 信号同样发挥抗氧化损伤的关键作用，但是褪黑素的心肌保护作用是否与之相关也未见报道。

研究目的：

为了进一步明确褪黑素的心肌保护作用及机制，本研究旨在通过在体及离体实验探讨：

- (1) SIRT1 信号通路介导褪黑素抗 MI/R 损伤的作用及机制；
- (2) SIRT1 信号通路介导褪黑素抗糖尿病状态下 MI/R 损伤的作用及机制；
- (3) Notch1/Hes1 信号通路介导褪黑素抗 MI/R 损伤的作用及机制。

研究方法：

(1) 2 型糖尿病 SD 大鼠模型的建立：用经典的高脂高糖饲料喂养及链脲佐菌素 (STZ, 35mg/kg) 腹腔注射法构建 2 型糖尿病大鼠模型。以 STZ 注射 1 周后空腹血糖大于或等于 11.1 mmol/L 为模型构建成功标准。(2) SD 大鼠心肌缺血/再灌注手术：戊巴比妥钠常规麻醉大鼠，颈部正中做长切口后显露气管并做气管插管，连接动物呼吸机。开胸显露心脏并结扎冠状动脉左前降支，以系紧线结为缺血开始标志，30min 后松开线结，再灌注开始。(3) SD 大鼠超声心动图检测：心肌缺血/再灌注术后采用异氟烷吸入麻醉大鼠，待大鼠心率呼吸恢复平稳后，用小动物超声仪 (Vevo770) 检测心脏功能。用仪器自带软件计算大鼠左室缩短分数(LVFS)及左室射血分数(LVEF)。

(4) 心脏 Evan's blue/TTC 染色：心肌缺血/再灌注后，立刻剪取心脏向主动脉逆灌 Evan's blue 染液，冷冻切片后使用 TTC 染液复染，再用多聚甲醛固定并拍照，图像用 ImageJ 软件分析，心肌梗死程度以梗死区面积/危险区面积表示。(5) 血浆肌酸激酶及乳酸脱氢酶测定：心肌缺血/再灌注后，抽取大鼠血样，严格按照试剂盒说明书进行肌酸激酶及乳酸脱氢酶的测定。(6) 心肌超氧化物生成量、丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性测定：心肌缺血/再灌注后迅速取大鼠缺血区心肌组织严格按照试剂盒说明书进行肌酸激酶及乳酸脱氢酶的测定。(7) TUNEL 法检测凋亡：用多聚甲醛固定心肌组织后，常规脱水石蜡包埋并切片 (3 μ m)。常规脱蜡操作之后用蛋白酶 K 打孔，避光使用 TUNEL 及 DAPI 荧光染色，采集荧光照片，以绿色数量/蓝色数量为心肌组织凋亡率，进行统计分析。(8) 体外模拟 2 型糖尿病损伤：用高糖 DMEM (25mmol/L) 配制 0.5mmol/L 的棕榈酸钠溶液，体外培养 H9c2 细胞系 18h 模拟 2

型糖尿病高脂高糖损伤。(9) 体外模拟心肌缺血/再灌注损伤: 配制经典的模拟缺血液, 并用之培养 H9c2 细胞系, 同时将培养体系整体置于含 95%N₂ 和 5%CO₂ 的无菌环境, 37°C 缺血 2h。模拟再灌注时, 换为正常培养基, 并将培养体系整体置于常规的孵箱环境, 模拟再灌 4h。(10) 细胞小干扰 RNA 处理: 小干扰 RNA 序列及转染试剂盒均购于美国 Santa Cruz 公司, 细胞培养及转染均严格按照说明书进行。(11) 免疫荧光实验: 组织及细胞标本经过相应处理后用 2%的 BSA 溶液室温封闭。分别用一抗及对应的荧光二抗孵育, 再加入 DAPI 荧光染料。在荧光显微镜下观察样本, 采集照片并用 Image Pro plus 软件进行统计分析。(12) 细胞活力检测: 将 H9c2 细胞传代至 96 孔细胞培养板, 待细胞处理结束, 常规使用 MTT 法, 调整酶标仪至 490nm, 测定每孔吸光度, 检测细胞活力。(13) Western blot 检测蛋白表达: 常规配制 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶, 电泳转膜后用脱脂牛奶封闭并分别孵育对应的一抗及二抗。最后滴加 ECL 发光液, 用凝胶成像分析系统进行成像操作, 并用配套软件 (ImageLab) 进行分析。(14) 统计分析方法: 采用 GraphPad Prism (V5.01) 进行统计处理, 结果均以平均值±标准差表示。用 *t* 检验进行两组之间的比较, 用单因素方差分析辅以 *t* 检验方法进行多组之间的比较, 若 $P < 0.05$ 则认为两组具有统计学差异。

研究结果:

(1) 在非糖尿病状态下, 褪黑素可明显激活 SIRT1 信号, 促进内源性抗氧化酶合成减轻氧化应激损伤, 进而减轻心肌缺血/再灌注损伤, 维护心功能。我们建立非糖尿病 SD 大鼠在体心肌缺血/再灌注模型, 缺血/再灌注 72 小时后检测超声心动图发现, 褪黑素处理可显著提高左室射血分数 (LVEF) 和左室缩短分数 (LVFS), 改善大鼠心功能。褪黑素治疗可显著下调缺血心肌超氧化物生成量, 下调 gp91^{phox} 的表达及丙二醛含量, 上调超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平减轻心肌氧化应激损伤。进一步研究 SIRT1 信号通路发现, 褪黑素治疗可明显上调缺血心肌 SIRT1 信号, 下调 Ac-Foxo1 表达及凋亡通路标志蛋白。

(2) 褪黑素膜受体非选择性拮抗剂 Luzindole (Luz) 及 SIRT1 通路抑制剂 EX527 (EX) 均显著抑制褪黑素的心肌保护作用, 提示褪黑素受体也参与该过程。与褪黑素处理组相比, Luz 和 EX 处理可显著加重心肌氧化应激损伤, 增加心肌细胞凋亡率, 扩大心肌梗死面积, 上调肌酸激酶和乳酸脱氢酶水平。更重要的是, Luz 也抑制了 SIRT1 信号通路, 提高 Foxo1 乙酰化水平, 表明褪黑素可通过膜受体依赖的途径激

动心肌 SIRT1 信号通路，减轻心肌氧化应激损伤，保护心功能。

(3) 在 2 型糖尿病状态下，心肌 SIRT1 信号受损可导致氧化应激及 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激损伤加重。我们建立高脂饮食-STZ (streptozocin, 链脲佐菌素) 诱导的 2 型糖尿病大鼠模型发现，与再灌注 4h 的正常大鼠相比，2 型糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注后心肌梗死面积与凋亡率明显增加，心肌氧化应激损伤明显加重，PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激心肌凋亡通路被明显激活。进一步研究发现，与正常大鼠假手术组相比，糖尿病大鼠假手术组心肌 SIRT1 表达显著下调、Ac-Foxo1 水平显著升高，而经过缺血/再灌注手术损伤后，SIRT1 表达量更低造成 Ac-Foxo1 进一步上调，内源性抗氧化酶活性下降，提示糖尿病心肌 SIRT1 信号受损，可能是缺血/再灌注损伤加重的重要因素。H9c2 细胞实验验证了在体实验的发现，与模拟心肌缺血/再灌注 4h 的正常 H9c2 细胞相比，高糖高脂处理的细胞凋亡与氧化应激水平明显加重，SIRT1 信号受损，而 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激心肌凋亡通路被明显上调。

(4) 褪黑素可通过激动 SIRT1 信号减轻糖尿病心肌缺血/再灌注损伤，保护心功能。我们给予糖尿病大鼠外源性褪黑素口服治疗发现，再灌注 72h 后，褪黑素治疗可显著上调 SIRT1 表达，下调 Ac-Foxo1 水平，改善心功能，抑制心肌凋亡通路，而上述作用被 SIRT1 抑制剂 Sirtinol 所抑制。进一步研究发现，褪黑素可明显抑制糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注后心肌氧化应激以及 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 内质网应激凋亡通路，而 Sirtinol 同样可抑制上述作用。我们进而在体外实验中应用高糖高脂培养基处理 H9c2 细胞系发现，褪黑素处理可明显下调细胞氧化应激水平与 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激心肌凋亡通路，而 SIRT1 siRNA 同样抑制此保护作用。

(5) 褪黑素还可通过褪黑素膜受体介导的途径激活 Notch1/Hes1 信号通路进而调控 PTEN/Akt 抑制心肌凋亡，减轻心肌缺血/再灌注损伤。在体研究发现，DAPT (Notch1 信号阻断剂) 与 Luzindole 可明显抑制褪黑素改善心功能、减轻氧化应激损伤及抗凋亡的心肌保护作用。分析心肌 Notch1/Hes1 信号及 PTEN/Akt 信号发现，褪黑素可明显上调心肌 Notch1、NICD、Hes1 的表达，同时下调 PTEN 表达从而激动 Akt 通路，而这些作用均可被 Luz 及 DAPT 所抑制。

使用 H9c2 细胞系进行了体外实验发现，Notch1 siRNA 可明显抑制褪黑素的抗凋

亡及抗氧化应激的作用，分析 Notch1/Hes1 及其下游分子发现，干扰 Notch1 信号后 NICD、Hes1 的表达均下降，而 PTEN 的表达明显上升，抑制 Akt 磷酸化激活，提示 Notch1 信号通过调控 Hes1 表达，从而影响 PTEN/Akt 通路，与体内实验互相印证。同时，Hes1 siRNA 也显著抑制褪黑素抗凋亡及减轻细胞氧化应激损伤的作用，Hes1 siRNA 还明显上调 PTEN 的表达，下调 Akt 的磷酸化水平，以上结果均提示 Hes1 可在体外模拟缺血/再灌注情况下调控 PTEN/Akt 通路，发挥细胞保护作用。最后我们发现，体外应用 Luz 可明显抑制褪黑素抗氧化应激损伤的作用，上调细胞凋亡通路。同时，Luz 也可以明显下调 NICD 与 Hes1 的表达，上调 PTEN 表达从而抑制 Akt 的磷酸化激活。

研究结论：

(1) 在非糖尿病状态下，激活 SIRT1 信号进而促进内源性抗氧化酶合成减轻氧化应激是褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的新机制，且褪黑素膜受体参与此过程。

(2) 在 2 型糖尿病状态下，心肌 SIRT1 信号受损可导致氧化应激及 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激损伤加重，这是糖尿病缺血心肌损伤加重的新机制。我们首先发现褪黑素可通过激动 SIRT1 信号减轻糖尿病心肌缺血/再灌注损伤，保护心功能（图 3-1）。

(3) 褪黑激素还可通过褪黑素膜受体介导的途径激活 Notch1/Hes1 信号通路进而调控 PTEN/Akt 抑制心肌凋亡，减轻心肌缺血/再灌注损伤。

(4) 本研究揭示了褪黑素心血管保护作用的新机制，提示褪黑素治疗可能是抗糖尿病心肌缺血损伤的新策略。同时，褪黑素膜受体及 Notch1 信号可能是心肌保护药物研发的靶点。

关键词：褪黑素，心肌缺血/再灌注损伤，糖尿病，SIRT1，Notch1/Hes1，氧化应激，内质网应激，心肌保护

Melatonin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury and its underlying mechanisms

Candidate for doctorate: Yu Liming

Supervisor: Yu Shiqiang

Tutor: Duan Weixun

Department of cardiovascular surgery, Xijing hospital,

Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: National Natural Science Foundation of China (81470415, 81470411)

Abstract

Background:

Myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury results in cardiac arrhythmias, myocardial stunning, microvascular dysfunction and even irreversible myocardial injury, which is the major cause of poor prognosis of ischemic heart disease. Especially in the diabetic state, hyperglycemia and insulin resistance even aggravate MI/R injury. There is a great need to explore the effective clinical intervention. Recently, exogenous drug treatment has become a key strategy to reduce the MI/R injury. However, due to the mechanism of drug action and the source or the side effects of the exogenous drug, there has not been an ideal drug intervention strategy. The investigation of a safe and effective endogenous myocardial protective molecule has become a hot topic.

Melatonin (Mel) is an endogenous hormone synthesized by the pineal gland cells, which has multiple pharmacological effects, such as sedative, hypnotic, regulation of

blood pressure and anti-tumor effects. Moreover, Mel has been proved to regulate the cardiovascular system and protect the heart against MI/R injury. However, the mechanism of its cardiovascular protective effect is still not fully understood. In addition, whether it exerts protective effect against MI/R injury under diabetic state and the underlying mechanism are unknown. These aspects all severely limit its clinical application.

SIRT1 (silent information regulator 1) is the "star elements" in the study of myocardial protection which is involved in multiple cellular activities such as cell proliferation, apoptosis, differentiation, aging and so on. Our previous studies confirmed that SIRT1 may mediate curcumin's cardioprotective effects against MI/R injury. However, whether SIRT1 mediate the myocardial protective effects of melatonin and its role in the process of diabetic MI/R injury were unknown. Moreover, although we previously found that the activation of Notch1/Hes1 signaling protected against MI/R injury by reducing oxidative stress, whether Notch1/Hes1 plays a role in melatonin's protective action was poorly understood.

Objective:

This study was designed to (i) determine the role of SIRT1 in melatonin's protective effect against MI/R injury; (ii) investigate the effect of melatonin treatment on MI/R injury in type 2 diabetic state and elucidate the role of SIRT1 signaling in melatonin treatment in type 2 diabetic setting; (iii) determine the role of Notch1/Hes1 signaling in melatonin's protective effect against MI/R injury.

Methods:

(1) Model of type 2 diabetic SD rats: We established the classic type 2 diabetic SD rat model by treating the rats with high-fat diet and streptozotocin (STZ, 35 mg/kg, i.p.). 1 week after STZ injection, the rats with fasting blood glucose ≥ 11.1 mmol/L were considered as successful. (2) Myocardial ischemia/reperfusion injury: The rats were anesthetized with sodium pentobarbital conventionally. Middle neck incision was made to reveal the tracheal. After tracheal intubation and connecting to the animal ventilator, the heart was exposed. Then, the left anterior descending artery was ligated for 30 min of ischemia. After that, the knot was loosened and the reperfusion started. (3)

Echocardiographic measurement: After the myocardial ischemia/reperfusion injury, we anesthetized rats with isoflurane. When the heart rate and breathing smoothly recovered, the cardiac function was detected with a small animal ultrasound device (Vevo770). Left ventricular fractional shortening (LVFS) and left ventricular ejection fraction (LVEF) were calculated with the software. (4) Myocardial Evan's blue/TTC staining: After the myocardial ischemia/reperfusion injury, we collected the heart immediately and irrigated Evan's blue dye inversely to the aorta. The heart was frozed and stained with TTC dye. Then, the heart sections were fixed with paraformaldehyde and the photographs were analyzed using ImageJ software. The extent of myocardial infarction was expressed as infarct area/area at risk. (5) Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase assay: After the myocardial ischemia/reperfusion injury, the blood was collected. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase were detected strictly following the instructions of the kits. (6) Myocardial superoxide production, MDA, SOD activity assay: After the myocardial ischemia/reperfusion injury, myocardial tissue was collected. Myocardial superoxide production, MDA, SOD activity were detected strictly following the instructions of the kits. (7) TUNEL assay: Tissue was fixed with paraformaldehyde and sliced. The slices were then incubated in protein kinase K, TUNEL and DAPI. Fluorescence photographs were them collected. Myocardial apoptotic rate was analyzed and expressed as number of green fluorescence /number of blue fluorescence. (8) Simulated high glucose and high fat injury: Prepare 0.5 mmol/L sodium palmitate solution with high glucose DMEM (25 mmol/L). The cells were incubated for 18h to simulate high glucose and high fat injury. (9) Simulated ischemia reperfusion injury: We initially prepared the classic ischemia analog buffer and incubated the H9c2 cell. The cellular system was placed in the incubator containing 95% N₂ and 5% CO₂ in a sterile environment for 2h of ischemia. Then, the ischemia analog buffer was changed to normal culture medium, and the system was placed in normal incubator to simulate reperfusion for 4h. (10) Small interfering RNA: Small interfering RNA sequence and transfection kits were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Cell culture and transfection were performed in strict accordance with the instructions. (11) Immunofluorescence assay:

Tissue and cell samples received appropriate treatment and were blocked with 2% BSA solution at room temperature. Then, they were incubated with the primary antibody, secondary antibody and DAPI dye. The samples were evaluated under the fluorescence microscope and the photos were analyzed using Image Pro plus software. (12) Cell viability assay: The H9c2 cells were passaged to 96-well cell culture plates. MTT assay was employed and the absorbance of each well was measured. (13) Western blot: The protein samples were separated using SDS-PAGE gel. The transferred membrane was blocked with skim milk and were incubated with primary antibody and corresponding secondary antibodies. Finally, the ECL luminescent agent was used and the bands were scanned and quantified by densitometry analysis. The photographs were analyzed by supporting software (Image Lab). (14) The values are expressed as mean \pm SEM. Differences were compared by ANOVA followed by post hoc t test, where appropriate. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. All of the statistical tests were performed with GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad Software).

Results:

(1) Under non-diabetic condition, melatonin reduces MI/R injury by activating SIRT1 signaling, thus increasing the synthesis of endogenous anti-oxidative enzyme. We established a non-diabetic SD rat in vivo MI/R model. After 72 h of reperfusion, echocardiographic results showed that melatonin treatment can significantly improve left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS), improving cardiac function in rats. We found that melatonin treatment significantly reduced the amount of ischemic myocardium superoxide production, downregulated gp91^{phox} (an important markers of oxidative stress belonging to NADPH oxidase enzyme) expression and MDA content, increased superoxide dismutase (SOD) level, thus protecting against myocardial oxidative stress. We next studied SIRT1 signaling pathways and found that melatonin treatment could significantly upregulate SIRT1 signaling, downregulate Ac-Foxo1 expression and apoptosis pathway.

(2) Further investigation showed that melatonin membrane receptor antagonist Luzindole (Luz) and SIRT1 pathway inhibitor EX527 (EX) significantly blunted

melatonin's cardioprotective actions, suggesting that melatonin receptor also participated in this process. Compared with the melatonin-treated group, Luz and EX treatment markedly increased myocardial oxidative stress, and enhanced apoptotic index and infarct size, increased creatine kinase and lactate dehydrogenase levels. More importantly, Luz also inhibited SIRT1 signaling pathway, increased Foxo1 acetylation level. These data indicated that melatonin activated myocardial SIRT1 signaling pathway through the membrane receptor, thus reducing myocardial oxidative stress and protecting the heart function.

(3) Impaired SIRT1 signaling in type 2 diabetic heart enhanced oxidative stress and ER stress caused by MI/R injury. We established high-fat diet-fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats. Compared with normal rats, after 4 h of reperfusion, type 2 diabetic rats showed significantly enhanced myocardial infarct size and apoptosis index. In addition, myocardial oxidative stress and PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP-mediated endoplasmic reticulum stress are also significantly aggravated. Compared with normal rats subjected to sham operation, the sham group of diabetic rats already showed attenuated myocardial SIRT1 signaling, thus increasing Ac-Foxo1 level. After ischemia/reperfusion injury, further impaired SIRT1 expression and enhanced Ac-Foxo1 expression were found in diabetic rats compared with that of the non-diabetic animals. Additionally, endogenous antioxidant enzyme activity further decreased, suggesting that SIRT1 signal damage may aggravate diabetic cardiomyopathy. Our in vitro data also verified the in vivo results. High glucose/ high fat incubated H9c2 cells also showed impaired SIRT1 signaling and enhanced oxidative stress and PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP-mediated endoplasmic reticulum stress. The apoptotic pathway is also significantly enhanced.

(4) Exogenous melatonin supplementation attenuated myocardial oxidative stress and ER stress by re-activating SIRT1 signaling. We treated the diabetic rats with exogenous melatonin. Compared with the MI/R+V group, melatonin treatment significantly increased the expression of SIRT1, reduced Ac-Foxo1 levels and improved heart function, inhibited myocardial apoptosis pathway. However, these effects were inhibited by Sirtinol. Further study found that melatonin significantly inhibited MI/R induced oxidative stress and

PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP-mediated endoplasmic reticulum stress, while Sirtinol also reduced these effects. We further employed high glucose/ high fat incubated H9c2 cells and found that melatonin treatment also markedly reduced the cellular oxidative stress and PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP-mediated endoplasmic reticulum stress, while SIRT1 siRNA also inhibited these protective effects.

(5) Melatonin protects against MI/R injury by modulating PTEN/Akt signaling via Notch1/Hes1 pathway in a membrane receptor-dependent manner. In vivo studies found that DAPT and Luzindole can markedly inhibit melatonin's cardioprotective effect by aggravating cardiac function and enhancing oxidative stress and apoptotic signaling pathway. Analysis of myocardial Notch1/Hes1 signaling and PTEN/Akt signaling found that melatonin can significantly increase the expressions of myocardial Notch1, NICD, Hes1 while reduce PTEN expression and activated Akt signaling, while these effects can be inhibited by Luz and DAPT administration.

In vitro study showed that Notch1 siRNA significantly inhibited melatonin's anti-apoptotic and anti-oxidative effects. Downregulation of Notch1 signaling inhibited NICD and Hes1 expression, while the expression of PTEN significantly increased and phosphorylation of Akt was markedly reduced, suggesting that Notch1/Hes1 signaling might regulate PTEN/Akt pathway. Meanwhile, Hes1 siRNA significantly inhibited melatonin's anti-apoptotic and anti-oxidative effects. Furthermore, Hes1 siRNA also significantly increased the expression of PTEN, thus reducing the phosphorylation of Akt. Finally, we found that, in vitro application of Luz can inhibit melatonin's anti-apoptotic and anti-oxidative effects. Meanwhile, Luz can also significantly decrease the expression of NICD and Hes1, increase PTEN expression, thus inhibiting Akt activation.

Conclusions:

(1) Under non-diabetic condition, Melatonin reduces MI/R injury by activating SIRT1 signaling, thus increasing the synthesis of endogenous anti-oxidative enzyme in a membrane receptor dependent manner.

(2) Impaired SIRT1 signaling in type 2 diabetic heart enhanced oxidative stress and ER stress caused by MI/R injury. Exogenous melatonin supplementation attenuated

myocardial oxidative stress and ER stress by re-activating SIRT1 signaling.

(3) Melatonin protects against MI/R injury by modulating PTEN/Akt signaling via Notch1/Hes1 pathway in a membrane receptor-dependent manner.

(4) This study reveals the new mechanism for the cardiovascular protective effects of melatonin, suggesting that melatonin therapy may be a new strategy to fight against diabetic myocardial ischemia injury. At the same time, melatonin membrane receptor and Notch1 signaling may be the targets for the cardioprotective drug discovery.

Key words: melatonin, myocardial ischemia/reperfusion, diabetes, SIRT1, Notch1/Hes1, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, cardioprotection

前 言

近年来, 国人心血管病发病率和死亡率呈现显著上升态势。而以冠状动脉粥样硬化性心脏为首的缺血性心脏病死亡率上升是心血管病死亡率的上升的重要原因。心肌缺血后公认的治疗原则是及时恢复缺血心肌组织的血液灌流, 缓解受损组织缺氧和缺乏能量供应的状态, 然而, 再灌注可加重可逆性心肌损伤, 引发心律失常、心肌顿抑、微血管功能障碍甚至不可逆性心肌损伤, 此过程又被称为心肌缺血/再灌注 (myocardial ischemia/reperfusion, MI/R) 损伤。MI/R 损伤是缺血性心脏病预后不良的重要原因, 尤其是在糖尿病状态下, 机体高血糖症、心肌胰岛素抵抗状态及炎症反应又明显加重 MI/R 损伤, 临床上亟待探寻一种有效的干预方法。近年来, 外源性药物治疗已成为减轻 MI/R 损伤的重要策略, 然而由于药物作用机制不完全明确、来源及副作用多等问题, 至今尚未有理想的药物干预手段。寻找人体内源性心肌保护分子抗 MI/R 损伤已成为当前研究热点。

褪黑素 (Melatonin, Mel) 是由美国皮肤病学家 Aaron Lerner 率先分离并纯化的一种内源性激素。它由松果体细胞合成并具有镇静、催眠、抗肿瘤、调节免疫等广泛的生物学作用。近年来, 其心血管保护作用越来越受到重视。已发现褪黑素具有两种细胞膜受体 (MT1 和 MT2), 其属于 G 蛋白偶联受体家族。以往研究证实, 褪黑素及其清除自由基而生成的代谢产物可形成一套非受体依赖的级联式氧自由基清除系统, 对抗氧化应激损伤, 这是其心血管保护作用的重要机制。而最近的研究发现, 褪黑素也可以通过其膜受体依赖的途径激动保护性信号通路发挥心血管保护作用。然而, 褪黑素膜受体依赖的心血管保护作用的机制尚未完全阐明, 更重要的是, 其是否发挥抗糖尿病状态下 MI/R 损伤的作用及其机制尚无基础及临床研究报道, 严重制约其临床应用。

SIRT1 (silent information regulator of transcription 1, 沉默信息调控因子 1) 是目前国际上研究心脏保护的热点与“明星分子”。它是一种 NAD⁺ 依赖的具有组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 活性的转录因子, 参与调控细胞增殖、凋亡、分化和衰老等多个过程。本课题组前期研究证实, SIRT1 可介导姜黄素 (curcumin) 等药物抗心肌缺血

/再灌注损伤,然而 SIRT1 在糖尿病心肌缺血/再灌注损伤过程中发挥的作用及是否介导褪黑素心肌保护效应均未见报道。另外,本课题组前期研究发现激动 Notch1/Hes1 (hairy and enhancer of split-1) 信号可通过调控 PTEN/Akt 通路显著减轻心肌缺血/再灌注损伤,但是褪黑素的心肌保护作用是否与之相关也未见报道。

为了进一步明确褪黑素的心肌保护作用及机制,本研究旨在通过在体及离体实验探讨:①SIRT1 信号通路介导褪黑素抗 MI/R 损伤的作用及机制;②SIRT1 信号通路介导褪黑素抗糖尿病状态下 MI/R 损伤的作用及机制;③Notch1/Hes1 信号通路介导褪黑素抗 MI/R 损伤的作用及机制。

文献回顾

一、心肌缺血/再灌注损伤相关机制的研究现状

1. 心肌缺血/再灌注损伤概况

近年来，国人心血管病发病率和死亡率呈现显著上升态势。国家心血管病中心发布的《中国心血管病报告 2014》显示，2013 年心血管疾病死亡率在中国农村及城市地区为 293.69/100000 和 259.40/100000（图 1-1），心血管疾病死亡构成比在农村及城市地区居民中高居首位，分别达到 44.8%和 41.9%^[1]，防治心血管病已经成为亟待解决的重大公共卫生问题。而以冠状动脉粥样硬化性心脏病为首的缺血性心脏病死亡率上升是心血管病死亡率的上升的重要原因，《中国卫生和计划生育统计年鉴 2014》显示，2013 年农村及城市居民冠状动脉粥样硬化性心脏病死亡率分别为 98.68/100000 及 100.86/100000，与往年相比均有所上升（图 1-2）。

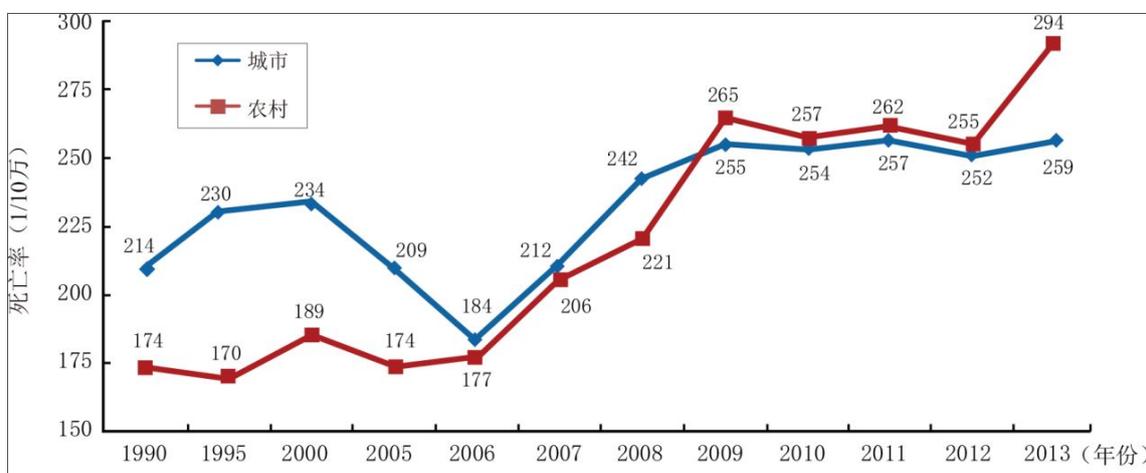


图 1-1 1990-2013 年中国城乡居民心血管病死亡率变化^[1]

冠状动脉粥样硬化性心脏病，是指冠状动脉血管粥样硬化病变而引发管腔狭窄或阻塞，造成心肌缺血、缺氧甚至坏死，进而导致的心脏病，简称“冠心病”^[2]。心肌缺血后公认的治疗原则是及时恢复缺血心肌组织的血液灌流，缓解受损组织缺氧和缺乏能量供应的状态，减少缺血后心肌梗死面积进而维护心脏功能^[3,4]；目前，临床

上应用药物溶栓、冠脉介入术、冠脉旁路移植术等使缺血心肌及时恢复血流灌注，有效缓解了冠心病患者症状，降低了病死率。然而，再灌注也可加重可逆性心肌损伤，引发心律失常、心肌顿抑、微血管功能障碍甚至不可逆性心肌损伤，此过程又被称为心肌缺血/再灌注（myocardial ischemia/reperfusion, MI/R）损伤^[4-6]。

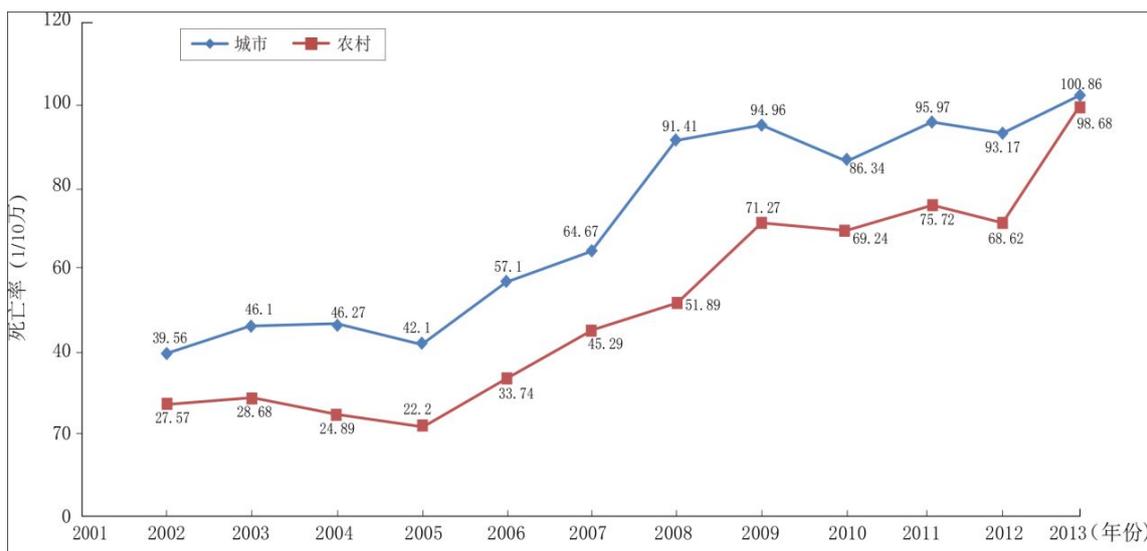


图 1-2 2002-2013 年城乡地区冠心病死亡率变化趋势^[1]

2. 心肌缺血/再灌注损伤的病理生理机制

2.1 心肌缺血损伤的病理生理

急性心肌梗塞病人冠状动脉血管堵塞后，该血管支配的对应区域被称为“缺血危险区”，如果急性心肌缺血时间延长（通常超过 20min），一部分心内膜细胞即开始死亡，随着缺血时间延长，损伤逐渐累及心肌全层直至心外膜细胞^[7]。

由于缺乏供氧和供能，缺血区域心肌细胞发生一系列复杂的生化和代谢改变^[8]（图 1-3），供氧缺乏可引起氧化磷酸化过程减弱甚至停止，进而引起线粒体膜去极化、三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）耗竭，最终导致心脏收缩功能障碍^[8, 9]。而在此过程中，为了维持线粒体膜电位， F_1F_0 三磷酸腺苷合酶参与水解三磷酸腺苷，使线粒体内无机磷酸盐积累上升的同时，又进一步加重了心肌能量缺乏^[10]。此外，心肌缺乏供氧还可引发心肌细胞无氧糖酵解，导致乳酸积累增加，进而使细胞内 pH 下降（ $pH < 7$ ）^[11]。细胞内质子积累又可激活 Na^+-H^+ 离子交换体，使 H^+ 外排交换 Na^+

进入胞浆，加之缺血期间缺乏三磷酸腺苷导致 $3\text{Na}^+-2\text{K}^+$ 离子交换体供能障碍，共同加重了细胞内 Na^+ 超载，进而激活 $2\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 离子交换体使细胞内的 Na^+ 外排，最终导致细胞内 Ca^{2+} 超载，心功能受损^[12, 13]。

2.2 心肌再灌注损伤的病理生理

目前，再灌注损伤主要以其四种损伤形式逐渐被人们认识。

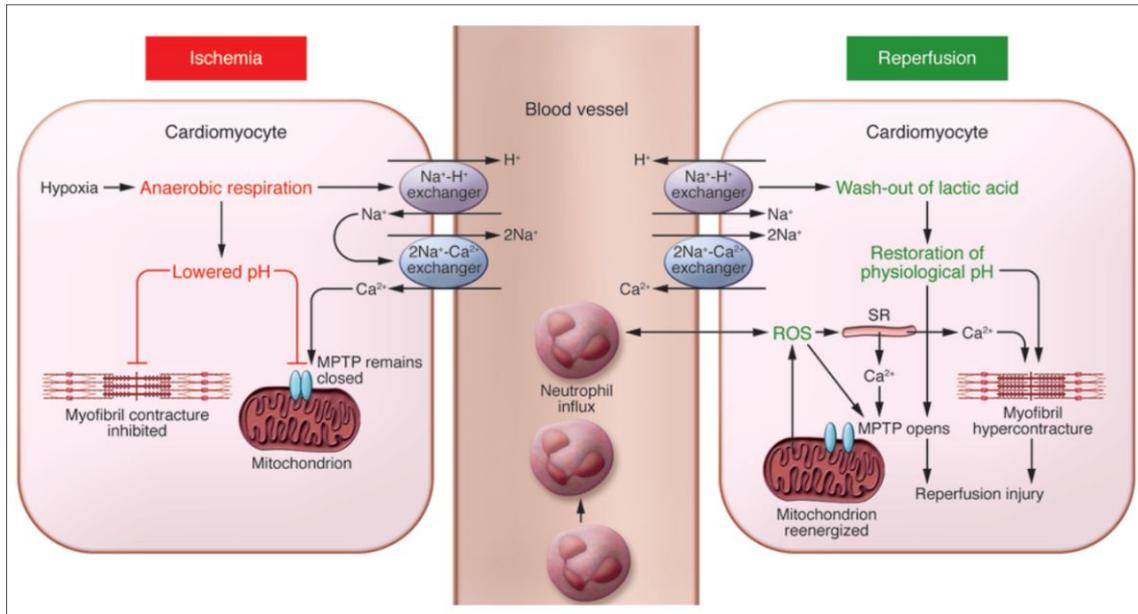


图 1-3 心肌缺血/再灌注损伤病理生理机制^[13]

2.2.1 再灌注诱发的心律失常

缺血心肌组织急性再灌注治疗可引发严重的心律失常，而这种由再灌注治疗引发的心律失常通常可以自发停止或者容易被纠正^[14]。

2.2.2 心肌顿抑

心肌缺血后可导致心脏收缩功能障碍，而再灌注治疗后发生的收缩功能障碍称为心肌顿抑，心肌氧化应激损伤以及细胞内 Ca^{2+} 超载是造成心肌顿抑的关键因素^[8, 15]。

2.2.3 微血管堵塞

1966 年 Krug 课题组首先提出微血管堵塞的概念，即“无复流现象”^[16]。后续研究发现，微血管堵塞是由毛细血管扩张受损、内皮细胞与心肌细胞水肿挤压微血管、冠脉粥样硬化斑块微栓子堵塞等多种因素共同导致的^[17-20]。冠状动脉介入治疗患者中，微血管堵塞表现为再灌注血流流速低并呈现特征性的冠脉血流表现^[21]。更引人

注意的是, 30%至 40%的病患虽然造影检查显示再灌注血流流速正常, 然而在进行心脏超声和心脏核素显像的检查时仍可发现微血管阻塞的证据^[22]。微血管阻塞可导致心肌梗死面积扩大、心脏左室射血分数降低、左室病理性重构以及临床康复不良^[18, 19, 23, 24]。然而, 目前尚没有针对微血管堵塞的有效治疗策略。

2.2.4 致死性再灌注损伤

缺血过程中仍存活的心肌细胞在再灌注过程中死亡的现象被称为致死性再灌注损伤。其主要致伤因素为氧化应激损伤、细胞内钙超载、线粒体通透性转换孔(MPTP)的开放以及缺血细胞的过强收缩^[25]。致死性心肌再灌注损伤被证实是动物心肌梗死模型及冠心病患者行再灌注治疗的重要致伤因素, 已经成为冠心病再灌注治疗的新的靶点^[26]。

2.3 心肌再灌注损伤的机制

近年来, 随着分子生物学技术的进步, 心肌再灌注损伤的几个关键机制已经基本明确(图 1-3)。

2.3.1 氧化应激损伤

缺血心肌行再灌注术后数分钟内即可爆发氧化应激损伤, 其主要机制为超量活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)在再灌注后急剧生成, 打破了心肌细胞内氧化还原系统的平衡, 导致氧化应激损伤(图 1-3)^[13, 27]。因此, 学者一度认为再灌注期间的抗氧化治疗可以有效减轻氧化应激损伤, 从而保护受损心肌组织。然而, 近年来不少临床研究显示这种治疗手段效果并不显著^[28]。有学者提出, 其原因很可能是抗氧化剂很难进入细胞和线粒体^[29], 因此, 临床上亟待探寻一种透膜性好、抗氧化作用强的抗氧化剂。

2.3.2 细胞内 Ca^{2+} 超载

同前所述, 心肌缺血过程即可导致心肌细胞与线粒体 Ca^{2+} 超载, 而缺血组织再灌注后由于氧化应激反应使肌浆网脂质膜结构破坏, Ca^{2+} 摄取水平下降, 使得心肌细胞内 Ca^{2+} 进一步增加^[30, 31]。氧化应激损伤还可破坏线粒体膜结构, 此时, 胞浆 Ca^{2+} 即大量进入线粒体内, 导致线粒体 Ca^{2+} 超载和线粒体通透性转换孔开放^[32]。因此, 有研究显示, 拮抗线粒体 Ca^{2+} 单向转运体或肌纤维 Ca^{2+} 通道均可有效减轻再灌注过程导致的 Ca^{2+} 超载, 减轻心肌损伤从而保护心功能^[30]。

2.3.3 线粒体通透性转换孔开放

线粒体通透性转换孔开放是由多种再灌注损伤因素共同引发的，线粒体通透性转换孔位于线粒体内膜，属于非选择性通道。再灌注过程导致其开放，许多小分子量的分子得以通过其进出线粒体，引起线粒体膜电位去极化及氧化磷酸化解偶联，最终导致线粒体三磷酸腺苷耗竭，细胞死亡^[33]。有研究表明，梗死心肌再灌注前，线粒体通透性转换孔维持关闭状态，再灌注过程中线粒体 Ca^{2+} 超载、无机磷酸盐积累及氧化应激损伤等多种因素导致其开放^[34]。许多动物实验和临床证据也提示线粒体通透性转换孔开放抑制剂应用于再灌注早期可明显降低心肌梗死面积^[35, 36]。因此，线粒体通透性转换孔也可作为治疗心肌缺血/再灌注损伤的重要靶点。

2.3.4 炎症反应

炎症反应在心肌缺血/再灌注过程中的作用还存在争议，目前尚不明确炎症反应参与心肌细胞死亡还是其本身为急性心肌梗死的适应性反应^[37]。尽管有动物实验证实再灌注过程中采用抗体抑制细胞粘附因子等炎症反应介质可显著缩小心肌梗死面积^[38, 39]，但是临床实验大多效果不理想^[40]。因此，炎症反应在心肌缺血/再灌注损伤中的作用有待于进一步研究。

2.3.5 pH 值快速中性化

在心肌缺血过程中，细胞内外乳酸积累导致 pH 下降至 7.0 以下，而在再灌注过程中，堆积的乳酸被快速清除，引起 pH 迅速变化进而导致线粒体通透性转换孔开放和心肌细胞强直收缩^[41, 42]。有动物研究也显示酸性再灌注缓冲液可明显减轻心肌损伤、缩小心肌梗死面积^[43]。因此，在再灌注过程中减缓心肌细胞中性化过程也成为抗心肌缺血/再灌注重要策略^[43]。

2.3.6 内质网应激

内质网作为细胞内参与蛋白质折叠、加工的等过程的关键细胞器，其介导的心肌凋亡被认为在心肌缺血/再灌注损伤中发挥关键作用^[44, 45]。心肌缺血/再灌注过程中，细胞内氧化应激损伤、能量代谢障碍及 Ca^{2+} 超载等均可导致大量未折叠蛋白或错折叠蛋白的形成，他们大量积累于内质网中导致未折叠蛋白反应（unfolded protein response, UPR），未折叠蛋白反应可有效降低蛋白质合成，上调分子伴侣的表达从而恢复蛋白加工过程，然而，一旦未折叠蛋白反应持续发生，则会进一步启动内质网相关凋亡通路^[44, 46]。与传统的线粒体凋亡及死亡受体凋亡途径不同，内质网应激不直接引起细胞凋亡，而是通过其下游 CHOP、JNK 及 caspase-12 等凋亡相关蛋白

引发心肌细胞凋亡^[44]。有研究证实，通过药物或者缺血预处理等对内质网心肌凋亡转导通路进行干预是减轻心肌缺血/再灌注损伤的有效策略^[45, 47]。

二、糖尿病与心肌缺血/再灌注损伤

1. 糖尿病流行病学现状

糖尿病是一种常见的慢性非传染性疾病，世界卫生组织数据显示，到 2030 年，糖尿病可能成为全球第七大致死原因。2014 年全球 18 岁以上人群糖尿病患病率可达 9%，2012 年约有 150 万人死因与糖尿病直接相关，而欠发达地区占其中 80%^[48]。近 30 年来，经济的稳步发展和人民生活水平的提高正在促使城乡居民日常生活方式发生巨大改变，国民糖尿病患病率显著上升，我国糖尿病流行病学形势更为严峻。根据 2013 年发布的《中国 2 型糖尿病防治指南》，到 2010 年，糖尿病患病率达到 11.6%，而糖尿病前期患病率可达 50.1%，我国已成为全球糖尿病第一大国^[49]。而糖尿病患者各种并发症随病程延长发生率增高，心血管并发症尤为显著，据统计，在糖尿病患者中，急性心肌梗死等心血管事件导致的死亡可占总死亡的 80%甚至更高^[49]。据世界卫生组织估算，从 2005 年至 2015 年的 10 年间，中国因糖尿病伴发的心血管疾病导致的经济损失可达 5577 亿美元。如何防治糖尿病及其诱发的心血管疾病已成为亟待解决的医学难题。

2. 糖尿病加重心肌缺血/再灌注损伤的机制

目前，糖尿病已被确认为心血管事件的独立危险因素。糖尿病患者高糖血症、胰岛素抵抗状态、长期糖代谢、脂代谢紊乱及血液高凝状态均可诱发血管内皮细胞损伤及平滑肌细胞增殖、凋亡稳态失衡，最终加重冠状动脉粥样硬化症，导致冠心病^[50, 51]。更为严重的是，在多种复杂机制的作用下，糖尿病状态下心肌缺血/再灌注损伤较正常患者显著加重，Greer 等通过对 db/db 小鼠（瘦素受体缺乏型，属于 2 型糖尿病模式动物）与非糖尿病小鼠行 30min，45min 或 60min 心肌缺血，并再灌注 24 小时发现，糖尿病动物死亡率显著高于非糖尿病组，而再灌注 28 天后糖尿病动物左室扩张及心肌肥厚程度显著高于对照组^[52]。糖尿病加重心肌缺血/再灌注损伤的主要机制总结如下。

2.1 胰岛素抵抗

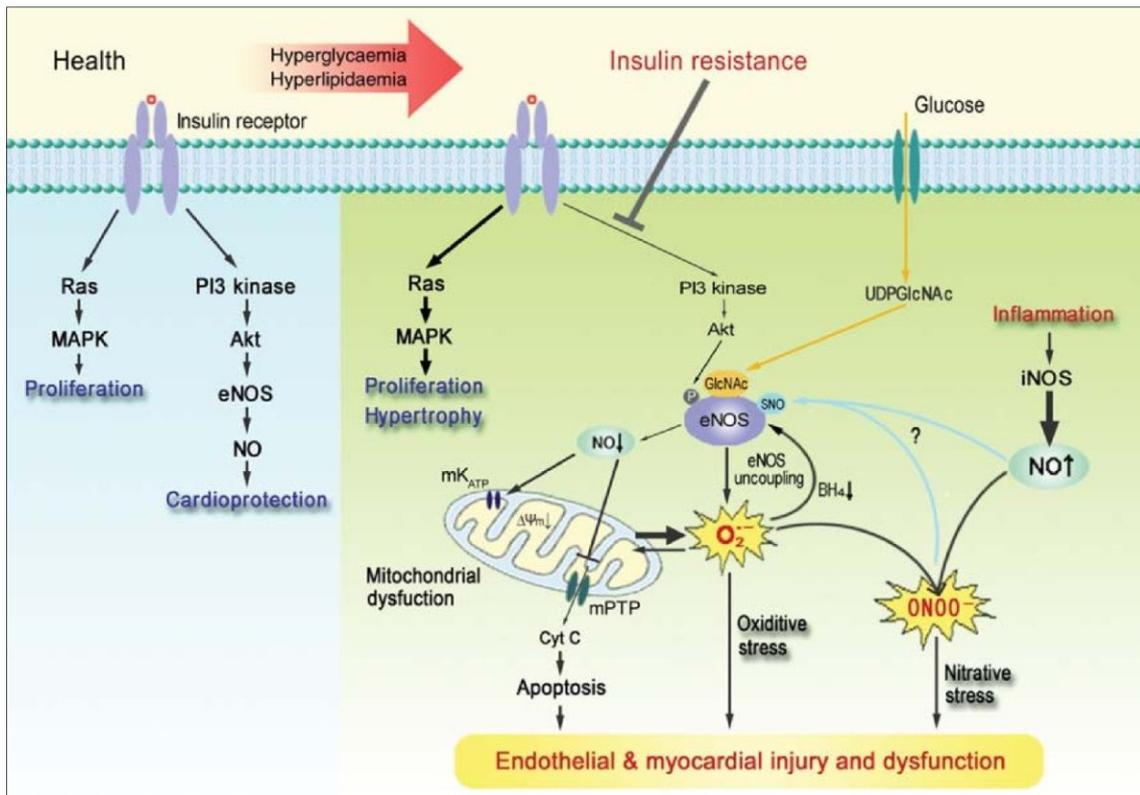


图 1-4 胰岛素抵抗对心血管系统的影响^[53]

糖尿病心肌缺血/再灌注损伤加重的重要原因之一是机体出现胰岛素抵抗现象，机体对胰岛素敏感性下降导致一系列病理生理变化，是心肌缺血/再灌注损伤加重的基础^[54, 55]。生理状态下，胰岛素通过与胰岛素受体结合使其磷酸化，进而引起下游磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）磷酸化从而激动蛋白激酶 B（PKB）。蛋白激酶 B 可进一步激动下游内皮型一氧化氮合酶（eNOS），促进内源性一氧化氮（NO）生成^[53]。在心肌缺血情况下，升高的 NO 有效扩张冠脉血管、增加心肌灌注的同时也发挥显著的抗心肌细胞凋亡、减轻梗死的作用，因此，PI3K-PKB-eNOS 被称为缺血心肌的“生存信号”，是胰岛素的心血管保护作用的关键分子机制^[53, 56]。心脏也是一个胰岛素敏感器官，在糖尿病状态下，心肌处于胰岛素抵抗状态，胰岛素的心肌保护信号受损，显著加重心肌梗死损伤并加速心衰进程。除了胰岛素抵抗的生化指标之外，PKB 磷酸化水平还被用来标志靶器官对胰岛素的敏感性。Botker 等在 1997 年首先报道了 X 综合征患者心肌胰岛素抵抗的现象^[57]。后续研究发现，糖尿病等代谢疾病中发生心肌胰岛素抵抗后，PI3K-PKB 信号可被显著抑制，而 Ras-MEK-ERK1/2 系统被显著

激活，加重心肌损伤^[55]（图 1-4）。

2.2 氧化应激与硝化应激

一氧化氮是由一氧化氮合酶催化生成的小分子物质，其前体是 L-精氨酸 (L-arginine)。一氧化氮合酶 (NOS) 包括三种类型：神经型一氧化氮合酶 (neuronal NOS, nNOS)，内皮型一氧化氮合酶 (endothelial NOS, eNOS) 及诱导型一氧化氮合酶 (inducible NOS, iNOS) ^[58]。一氧化氮及其介导的信号通路可影响血压调节、免疫调节等多种机体的生理活动^[59]。有研究表明，一氧化氮与组织损伤、炎症反应密切相关，在诸如感染性休克、自身免疫性疾病及器官缺血损伤中发挥重要作用^[60]。硝化应激反应是指活性氮和活性氧共同作用使供能蛋白发生硝化修饰从而活性降低的过程，硝化应激损伤可导致细胞凋亡，甚至死亡。心肌缺血/再灌注过程中产生大量氧自由基，加之糖尿病状态下，PI3K-PKB-eNOS 信号受损导致 eNOS 活性降低，引起发挥生理作用的 NO 合成下降，而诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 活性上升，产生大量发挥病理性作用的 NO，过量 NO 与心肌再灌注时产生的超氧阴离子 (O_2^-) 反应生成过氧亚硝酸离子 ($ONOO^-$)，进而使多种蛋白酪氨酸残基发生硝基化而活性减低，从而加重心肌细胞损伤，甚至引起死亡^[53, 58, 61]。

2.3 炎症反应

由糖尿病引起的高血糖和胰岛素抵抗状态可促使机体发生一系列炎症反应。研究发现，糖尿病状态下心肌炎症反应与多种脂肪因子有关，包括脂联素 (adiponectin)、肿瘤坏死因子 ($TNF-\alpha$)、C 反应蛋白 (CRP) 等^[62]。糖尿病心肌缺血/再灌注损伤可上调泛素-蛋白酶体水平，从而激活 NF- κ B 系统。另外，氧化应激损伤还激动 $TNF-\alpha$ 、CRP 等进一步激活 NF- κ B。活化的 NF- κ B 转位至细胞核，进而上调多种炎症介质表达，从而引起糖尿病内皮功能障碍，增加单核巨噬细胞等与内皮细胞粘附，不仅参与动脉粥样硬化的发生和发展，更加重了无复流现象，造成心肌缺血/再灌注损伤^[63]。

2.4 能量代谢障碍

生理状态下，心肌主要依赖脂肪酸供能，通过脂肪酸在线粒体中氧化磷酸化形成三磷酸腺苷从而满足自身能量需要。当遭受缺血打击后，心肌在胰岛素的作用下利用葡萄糖进行无氧代谢提供能量。然而糖尿病状态下，由于心肌产生胰岛素抵抗，不仅降低心肌利用葡萄糖使心肌供能受限，而且增加脂肪酸 β 氧化导致酸性脂肪代谢产物大量积累，造成心肌细胞酸中毒，导致心肌凋亡坏死^[64]。

目前,学者对于糖尿病加重缺血心肌损伤的机制虽然已有一定的认识,但是仍缺乏有效的干预措施,糖尿病患者心肌缺血的预后仍然不尽人意,临床上亟待探寻一种新的治疗策略。

三、褪黑素的心血管保护作用研究现状

美国皮肤病学家 Aaron Lerner 在上世纪 60 年代首次分离纯化了褪黑素 (melatonin, Mel), 其化学全称为 5-甲氧基-N-乙酰色胺 ($C_{13}N_2H_{16}O_2$), 是一种由松果体细胞以色氨酸为原料合成的内源性激素, 参与合成的主要酶类包括色氨酸羟化酶、5-羟色胺-N-乙酰转移酶、羟化-氧-甲基转移酶等^[65]。松果体分泌褪黑素具有昼夜节律性, 褪黑素的合成主要受到光照及交感神经双重调控, 而其分泌机制尚未完全阐明, 目前发现主要通过简单扩散或者囊泡形式释放进入脑脊液或血液^[65, 66]。另外有研究显示, 3 到 6 岁褪黑素分泌量达到高峰, 以后随着年龄增长, 褪黑素合成和分泌量逐渐下降, 老年期分泌量仅占高峰期的 10%左右。褪黑素分泌量随年龄上升而衰减被认为是脑功能衰退的标志 (图 1-5) ^[65, 67, 68]。

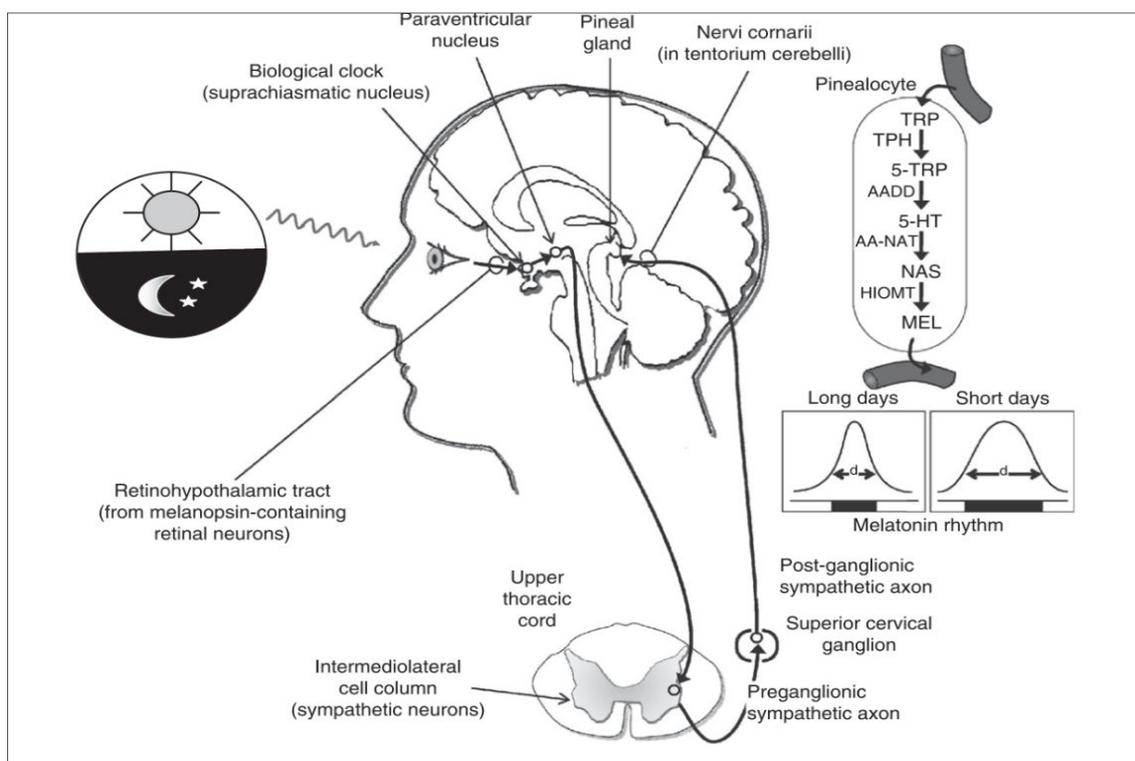


图 1-5 褪黑素合成与分泌调节机制^[69]

褪黑素具有十分广泛地生物学作用,如抗肿瘤、催眠、提高免疫力、镇静等^[65]。近年来,随着研究的深入,褪黑素心血管保护作用越来越受到重视。已发现褪黑素对高血压、心衰、药物引起的心肌损伤及动脉粥样硬化均发挥明显地调节作用^[70]。同时,越来越多的证据显示,褪黑素还可以发挥显著地抗心肌缺血/再灌注损伤的作用^[71]。Dobsak 等应用离体工作心脏灌注模型发现,褪黑素不仅可以显著提高再灌注时心脏血流动力学指标,还可以明显减轻心律失常^[72]。而我们前期研究也发现,褪黑素预处理可明显减轻线粒体氧化应激损伤,保护心功能^[71,73]。

1. 褪黑素心血管系统的药理学作用概况

1.1 氧自由基清除作用

在多种病理情况下,机体氧自由基生成与清除系统失衡易引发活性氧簇和活性氮簇积累,进而导致组织或细胞氧化应激损伤。超氧阴离子、过氧化氢及羟自由基等均属于活性氧簇,而活性氮簇主要包括二氧化氮、氮自由基及过氧化亚硝酸阴离子等。1993年, Poeggeler 等首先证实了褪黑素的自由基清除作用^[74]。更重要的是,褪黑素与氧自由基作用之后的产物也具有相当的抗氧化作用,其中最早被发现的是环-3-羟基褪黑素(cyclic-3-hydroxymelatonin),其可显著中和羟自由基^[75]。而环-3-羟基褪黑素可进一步转化为 N1-乙酰-N2-甲酰-5-甲氧色胺(N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, AFMK), AFMK 可进一步与过氧化氢结合生成 N-乙酰-甲氧犬尿胺(N1-acetyl-5-methoxykynuramine, AMK)^[76],而 AMK 不仅可以作用于活性氧,还可以中和活性氮^[77]。因此,褪黑素及其清除自由基而产生的代谢产物在机体内形成一套级联式氧自由基清除系统,使组织免于氧化应激损伤。

同时,有研究证实,褪黑素还可以在体外环境中与 NO·反应并使其降解,生成 1-羟基-3-氧基-3-(N-甲基-3-胺丙基)-3-甲基-1-三氮稀^[69,76]。Bonfont 等证实,褪黑素还可以与多种活性氮簇成分反应,其中包括对细胞损伤最为严重的过氧亚硝酸离子^[78],而维生素 C、维生素 E 等传统抗氧化剂是难以中和过氧亚硝酸离子的。近年来越来越多的研究表明褪黑素抗氧化的效应远超出传统的抗氧化剂,加之其由机体本身产生、安全性高,已成为医学界研究热点。

1.2 调节抗氧化酶活性的作用

超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GRD)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)、

过氧化氢酶（CAT）是心血管系统主要的抗氧化酶^[79, 80]。近年来，越来越多的证据表明，褪黑素可通过上调多种抗氧化酶基因表达从而增强细胞抗氧化能力，进而保护心血管系统^[81, 82]。Ciftci 等通过 SD 大鼠体内及体外实验发现，褪黑素可显著上调红细胞内葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的表达量与活性，抵抗氧化应激损伤^[83]。我们前期研究也发现，心肌缺血前给予大鼠褪黑素预处理可显著提高大鼠心肌超氧化物歧化酶的活性并降低组织超氧化物生成量及丙二醛的含量，减轻心肌缺血损伤^[73]。

2. 褪黑素对心血管常见疾病的作用

2.1 褪黑素与原发性高血压

高血压是心血管系统常见疾病，尽管已经有不少药物可以用来降血压，然而能够将血压控制在理想范围的患者比例仍然不尽人意。而且，降血压药物已被发现存在或多或少的副作用，严重限制其临床应用。例如， β 肾上腺素受体阻断剂常见的副作用是抑制褪黑素的分泌^[84]，而褪黑素本身即具有降血压的作用^[85, 86]。

1967 年，Zamboni 课题组首先发现将大鼠松果体腺体摘除 7 天后，大鼠开始出现平均动脉压升高的现象，且升高至少持续 7 周^[87]，后续有不少研究佐证了这个发现^[81, 88]。有研究报道，随着年龄的增长，人体血压升高的趋势与褪黑素夜晚分泌减少的水平密切相关，提示衰老导致的高血压发生可能与褪黑素分泌量减少相关^[81, 89]。

另外许多动物实验也证实褪黑素治疗可显著降低高血压动物的血压水平。Kawashima 课题组发现，每天通过腹腔给予自发性高血压大鼠 6 mg 褪黑素治疗可显著降低大鼠血压水平^[90]。另有研究报道每天给予自发性高血压大鼠 10mg 褪黑素水溶液饲喂也发挥显著地降压作用，褪黑素饲喂 6 周可使平均血压从 195mmHg 降至 149mmHg^[91]。

目前，学者对褪黑素的降血压机制已有一定认识：1. 有研究表明褪黑素可直接作用于中枢神经系统发挥血压调节作用。K-Laflamme 等发现褪黑素可作用于 α -肾上腺素能受体从而对自主神经进行调节降低血压水平^[92]。研究还发现褪黑素可作用于下丘脑-垂体-肾上腺轴，抑制糖皮质激素分泌从而发挥降血压作用^[93]。褪黑素还可通过抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统下调血管紧张素及醛固酮水平从而调控血压水平^[94]。2. 另有证据提示，褪黑素可通过外周血管系统调控血压。Pozo 等证实，褪黑素通过膜受体 MT2 下调平滑肌细胞磷酸肌醇水平，使其对去甲肾上腺素的反应性减低，从而舒张血管而降低血压^[95]；还有研究发现，褪黑素可抑制病理性 iNOS 的激活，

促进生理性 eNOS 合成一氧化氮，舒张血管降低血压^[96, 97]。随着分子生物学技术的发展，褪黑素调控血压的机制会进一步被阐明。

2.2 褪黑素与冠状动脉粥样硬化性心脏病

冠心病严重威胁现代人生命健康，众所周知，血清低密度脂蛋白（LDL）与胆固醇水平与冠心病发生发展密切相关^[98]。有证据证明，褪黑素可发挥明确的调血脂作用。Hoyos 等发现，长期高胆固醇饮食饲喂的大鼠，其血清 LDL 与胆固醇水平均显著升高，而每天以 10 mg/L 褪黑素口服治疗可使其显著降低^[99]。另外有临床研究报道，代谢综合征患者给予每日服用褪黑素（5 mg/kg）治疗 8 周，其血清低密度脂蛋白、胆固醇水平明显下降，同时发现，褪黑素还能显著上调血清过氧化氢酶活性，下调硫代巴比妥酸反应物（TBARS）水平^[100]。以上证据均提示褪黑素抗动脉粥样硬化的作用很可能与其减轻血脂异常的作用有关。

心肌缺血后公认的治疗原则是及时恢复缺血心肌组织的血液灌流，目前，针对冠心病已经形成以药物溶栓、经皮介入、动脉搭桥等一系列手段为核心的治疗策略，这些手段虽然可以有效的缓解冠心病患者症状，降低病死率。但是再灌注亦可加重可逆性心肌损伤，引发心律失常、心肌顿抑、微血管功能障碍甚至不可逆性心肌损伤，此过程又被称为心肌缺血/再灌注损伤^[25]。目前已有研究证实褪黑素还可以发挥显著地抗心肌缺血/再灌注损伤的作用^[71]。具体综述见第 6 部分。

2.3 褪黑素与心力衰竭

心力衰竭（heart failure）简称心衰，是指因心脏舒缩功能障碍，导致心室充盈射血不足，引发静脉血瘀滞、动脉灌注不良的心脏循环障碍综合征。有证据表明，褪黑素可延缓心衰的进展^[81, 101]。早在 1993 年，Grad 课题组率先报道了老年患者心衰的发生与发展与其褪黑素分泌量随年龄增长而显著下降密切相关^[102]。另外，Girotti 等也证实，与对照人群相比，急性和轻度慢性心力衰竭患者尿液 6-羟基褪黑素含量差异不明显，而晚期心力衰竭患者含量显著升高，提示褪黑素水平减低可能参与心衰的发展^[103]。随后动物研究也表明，给予甲亢大鼠模型褪黑素口服治疗可有效减轻其心肌肥厚程度^[104]。以上结果均提示，褪黑素影响心力衰竭的作用可能与其降血压作用有关，亦可能与其对心肌细胞活动的直接调控有关，其具体机制有待于进一步明确。

3. 褪黑素与心肌缺血/再灌注损伤

3.1 褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤概述

近年来,越来越多的研究揭示了褪黑素对心血管系统的保护作用,其抗心肌缺血损伤的作用已成为研究热点。有证据显示,褪黑素可引起心肌细胞微结构的改变从而发挥保护作用。2006年 Sahach 等应用成年鼠离体心脏灌流模型研究了褪黑素对心肌缺血耐受性的作用及其与线粒体通透性转换孔的关系^[105]。他们发现,褪黑素处理可显著改善心脏收缩功能,同时抑制线粒体通透性转换孔的开放,提示线粒体通透性转换孔很可能是褪黑素心肌保护作用的重要靶点^[105]。另有研究证实在心肌缺血/再灌注损伤过程中,褪黑素通过下调细胞色素 C 对线粒体的适应性改变发挥保护作用^[106,107]。后续研究表明,褪黑素可显著减轻再灌注过程中活性氧簇对心肌磷脂结构的破坏作用,这是其发挥上述保护作用的重要原因。Petrosillo 等发现褪黑素可显著减轻心肌磷脂结构的过氧化作用,从而抑制线粒体通透性转换孔的开放^[108]。另有研究发现,褪黑素还可以维护线粒体复合体 I、复合体III的功能,进而维护心功能^[71,73,109]。以上均提示褪黑素通过保护缺血心肌线粒体的结构和功能,从而发挥抗心肌缺血/再灌注损伤的作用(图 1-6)。

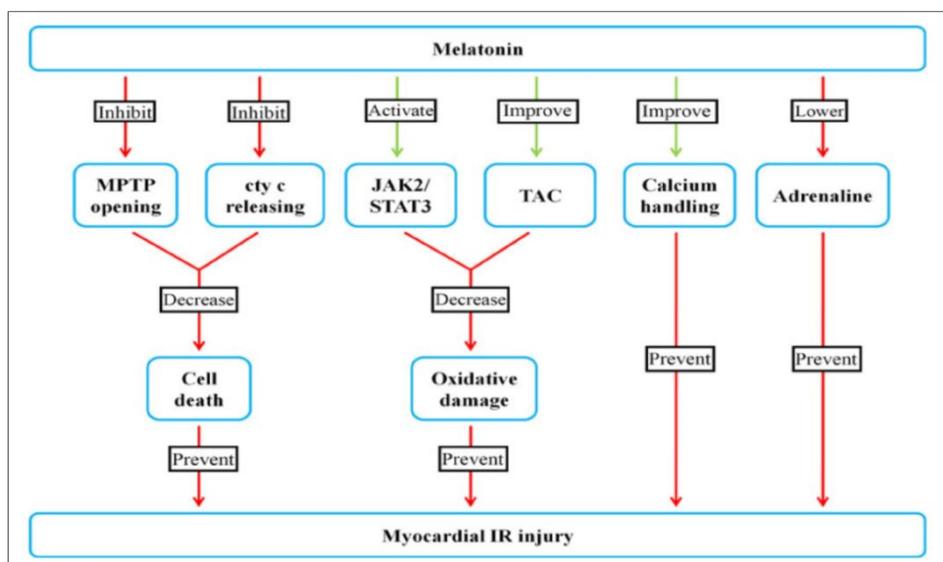


图 1-6 褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤机制^[71]

心肌组织积累大量活性氧簇、氮氧合酶活性改变及中性粒细胞浸润是心肌缺血/再灌注损伤的重要的机制,褪黑素具有高效的级联式氧自由基清除作用^[69]。研究表

明,褪黑素及其代谢产物既可以中和活性氧簇、活性氮簇,又可以上调抗氧化酶的表达^[110-112]。Sahna 等进一步研究了褪黑素对髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的作用及其与心肌保护的关系^[113]。研究发现, L-NAME(一氧化氮合酶抑制剂)可显著升高实验动物血压,并降低心肌组织谷胱甘肽活性,而褪黑素可逆转上述作用^[114, 115]。心肌缺血/再灌注损伤可显著上调组织丙二醛及髓过氧化物酶的活性,同时降低谷胱甘肽的活性,而 L-NAME 处理并不显著改变心肌丙二醛的含量及谷胱甘肽的活性,却可显著提高髓过氧化物酶的活性^[113]。褪黑素还可显著降低丙二醛及髓过氧化物酶的活性,提示褪黑素可通过抑制中性粒细胞浸润从而发挥缺血心肌保护作用(图 1-6)。

3.2 褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤相关信号转导机制研究现状

近年来,随着分子生物学技术的发展,一些保护性的细胞内信号通路也被证实参与了褪黑素的心肌保护作用。

Janus 激酶/信号传导及转录激活因子(Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT)在心肌缺血/再灌注损伤中发挥重要作用。目前,哺乳动物已发现 4 种 JAKs (JAK1,2,3,4 及 Tyk2)和 7 种 STATs (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b 及 6)^[116]。Janus 激酶属于非受体型酪氨酸蛋白激酶,STATs 是 JAKs 的作用底物,其本身包括 SH2 和 SH3 两类结构域,JAKs 可磷酸化 STATs 并使其发生二聚化,后者转位至细胞核内调控多种基因的表达^[116, 117]。JAK2/STAT3 是一条进化高度保守的细胞内信号通路,广泛参与生长和发育的过程,既可调节细胞内生化活动又对细胞间通讯发挥重要作用。更重要的是,在缺血再灌注过程中,心肌 JAK2/STAT3 信号被显著激活,减轻缺血损伤^[117, 118]。Hattori 等发现缺血预处理(ischemic preconditioning)的心肌保护作用与激动 JAK2/STAT3 信号密切相关^[119]。Tian 等证实,缺血后处理(ischemic postconditioning)同样可激动心肌 JAK2/STAT3 通路上调 Bcl-2 信号减轻心肌凋亡^[120]。更重要的是,激活 JAK2/STAT3 信号被证实是多种心肌保护剂(如硫化氢、法舒地尔等)的抗缺血再灌注作用的关键分子机制^[121-124]。

在哺乳动物中发现,褪黑素受体参与了褪黑素多种药理学作用。已发现褪黑素具有两种细胞膜受体(MT1 和 MT2),其属于 G 蛋白偶联受体家族^[125, 126]。褪黑素受体在各种组织中广泛表达,其中包括视网膜、脑、肾脏、心血管系统等等^[125-127]。G 蛋白偶联褪黑素受体与 JAK2/STAT3 信号密切相关。有研究表明,G 蛋白偶联的褪

黑素受体可激动多种细胞因子,进而使下游 STAT3 在酪氨酸 705 位点发生磷酸化^[128]。另有研究表明 Luzindole (非选择性褪黑素膜受体, Luz) 可显著降低褪黑素对星形胶质细胞 STAT3 的磷酸化作用,提示褪黑素受体直接参与了褪黑素对 STAT3 磷酸化激活的作用^[129]。在胰腺组织细胞中, MT1 受体也参与了 STAT3 的磷酸化过程^[130]。这些作用均强烈提示褪黑素的心血管保护作用可能与其对 JAK2/STAT3 信号的激活作用有关。本课题组前期工作显示,褪黑素可显著上调缺血心肌 JAK2 及 STAT3 的磷酸化水平,显著减轻线粒体氧化应激损伤。而应用 AG490 (JAK2 抑制剂) 则显著抑制 JAK2/STAT3 信号,逆转褪黑素的心肌保护效应^[73]。由此, JAK2/STAT3 是褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的关键信号通路 (图 1-7)。

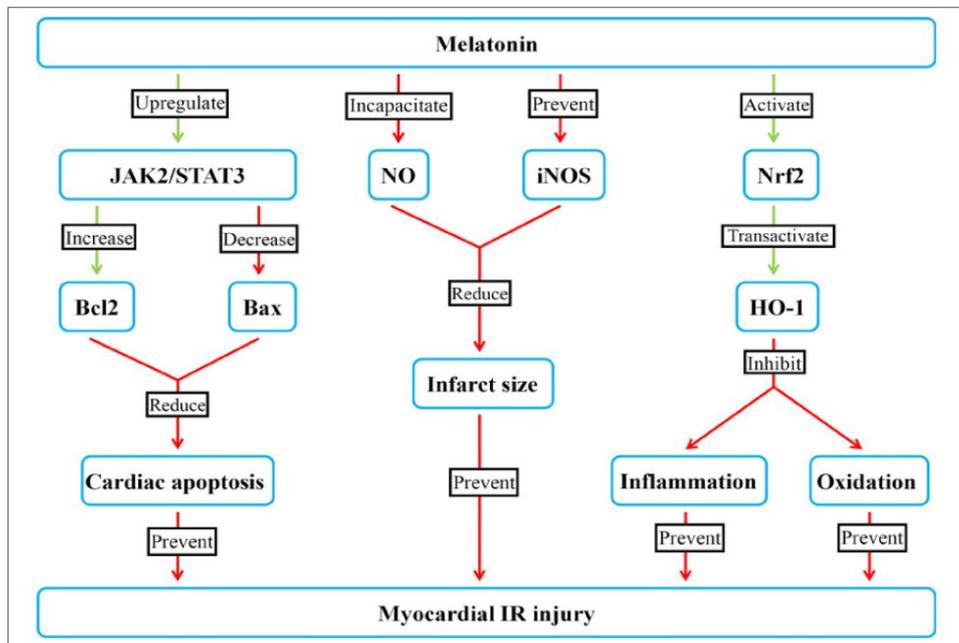


图 1-7 褪黑素心肌保护作用下游信号通路^[71]

1994 年, Moi 等率先克隆了核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2, nuclear factor erythroid-2-related factor 2), 其属于转录因子 CNC 家族^[131]。已有研究证实 Nrf2 可与 DNA 抗氧化应激元件 (antioxidant response element, ARE) 结合调控细胞多种抗氧化酶的转录与翻译^[132, 133]。更重要的是, 褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的作用被证实与 Nrf2 密切相关。在生理情况下, Nrf2 主要位于细胞质中, 其活性主要由 Keap1 所调控, 而在应激情况下, Nrf2 可与 Keap1 分离, 从细胞质转位至细胞核与 ARE 结

合，进而启动一系列细胞保护性酶的合成与表达，其中包括血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、NADPH、醌氧化还原酶-1 (quinone oxidoreductase-1, NQO1) 及谷胱甘肽 S-转移酶-1 等^[134-137]。Aparicio-Soto 等报道，褪黑素可通过 Nrf2 级联通路上调 HO-1 表达从而减轻脂多糖诱导的炎性损伤^[138]。另外，有研究显示 HO-1 还可以显著抑制炎症反应及氧化应激反应对心肌组织的损伤作用，Tao 等发现，褪黑素可调节 Keap1/Nrf2 通路发挥血管保护作用，提示褪黑素可能通过调节 Nrf2-HO-1 通路发挥抗心肌缺血/再灌注损伤作用^[139]。同时，Haghjooy Javanmard 等在一项临床研究发现，褪黑素治疗可显著上调冠脉搭桥术病人心肌 Nrf2-ARE 通路，发挥围术期心肌保护作用^[140]，进一步提示 Nrf2 可能在褪黑素的心肌保护作用中发挥关键作用。作为褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的新靶点，Nrf2 通路与褪黑素的具体联系仍有待于进一步研究 (图 1-7)。

4. 褪黑素与糖尿病状态下心肌缺血/再灌注损伤的研究现状

如前文所述，糖尿病是一种常见的慢性非传染性疾病，我国已成为全球糖尿病第一大国。糖尿病的危害主要在于糖尿病患者晚期各种并发症，其中以心血管并发症尤为显著，据统计，在糖尿病患者中，急性心肌梗死等心血管事件导致的死亡可占总死亡的 80% 甚至更高^[49]。如何防治糖尿病及其诱发的心血管疾病已成为亟待解决的医学难题。

褪黑素是主要由松果体分泌的一类吲哚类激素，其对人体神经系统、内分泌系统、消化系统及免疫系统均发挥重要的调节作用^[69, 112]。哺乳动物褪黑素的分泌有明显的昼夜节律，白天分泌量达到最低，而夜晚分泌量达到最高。研究发现，褪黑素分泌的昼夜变化受到光照与下丘脑视交叉上核的双重调控^[65, 76, 112]。另有研究报道，胰岛素的分泌水平恰好与褪黑素的分泌规律相反。Korkmaz 等提出，胰岛素的昼高夜低现象与褪黑素的调控作用密切相关，褪黑素可抑制胰岛素的分泌量^[141]。Peschke 等也证实，长期褪黑素治疗可显著降低 2 型糖尿病大鼠机体胰岛素水平。该课题组进一步研究 2 型糖尿病患者发现，褪黑素减低可导致胰岛素昼夜分泌紊乱，从而引起高血糖症，促使糖尿病相关并发症的发生^[142]。

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的另一重要的特征，其不仅可以导致糖代谢紊乱及机体炎症反应，还参与器官氧化应激与硝化应激损伤，是糖尿病加重心肌缺血损伤的重要因素^[56]。实验发现，摘除松果体可导致小鼠糖耐量受损，出现胰岛素抵抗及

糖原合成障碍等症[143]。而敲除小鼠褪黑素膜受体 1 基因也可导致实验动物发生胰岛素抵抗，提示褪黑素可能发挥调节组织糖原合成，提高机体胰岛素敏感性的作用。另外，de Oliveira 等还发现，长期胰岛素治疗还可以显著提高链脲佐菌素（streptozotocin, STZ）诱导的糖尿病小鼠机体胰岛素敏感性，并显著降低糖尿病指标[144]。以上结果均提示，糖尿病情况下外源性补充褪黑素治疗可显著改善胰岛素抵抗，为缓解糖尿病相关并发症发生提供了理论依据。

目前，已有不少临床实验显示褪黑素可减轻心肌梗死再通患者心肌损伤，其有望成为一种新的心肌保护试剂在临床上推广应用。然而，褪黑素的心肌保护机制仍然不明确，是目前褪黑素无法临床广泛应用的重要因素之一。同时，外源性给予褪黑素治疗虽然可发挥显著地抗心肌缺血/再灌注损伤作用，但是目前尚无实验证据证实糖尿病病理情况下褪黑素是否发挥抗心肌缺血/再灌注损伤的作用，其作用机制也未见报道，有待于进一步研究。

四、SIRT1 及其心肌保护作用

1. SIRT1 信号通路概述

SIRT1 是组蛋白去乙酰化酶 III 类组的一个成员，统称为 sirtuin。已发现哺乳动物 sirtuin 家族包含 7 个成员，即 SIRT1-SIRT7，其特征是由一个保守的 275 个氨基酸的催化核心和独特的额外的 N-末端和 C-末端变长序列组成[145, 146]。以往的研究表明，SIRT1 可以使多种转录因子脱乙酰化，包括 FOXO (Forkhead box O) 转录因子、p53、核因子 κ B (NF- κ B)、肝 X 受体 (liver X receptor) 及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 等[147]。有报道显示，SIRT1 参与多种生命活动，包括肥胖相关的代谢疾病、癌症、老化、细胞衰老、心脏老化和应力应激，朊病毒介导的神经变性，炎症及胎盘细胞存活[148]。最重要的是，SIRT1 参与心脏保护作用。例如，Pillai 等证实，SIRT1 可调节肌球蛋白重链 (MHC) 基因表达从而参与果糖喂养对心脏的保护作用[149]。

目前，虽然已经证实一些因素可调节 SIRT1 活性，然而其上游调节机制尚未完全阐明。已证实热量限制、饥饿、运动和氧化应激均可上调 SIRT1 的表达。而 NAD⁺ 是 SIRT1 的重要底物。NAD⁺ 的水平也参与调控 SIRT1 的脱乙酰活性。在 NAD⁺ 合成途径中，烟酰胺磷酸核糖基转移酶 (NAMPT) 催化烟酰胺生成烟酰胺单核苷酸，烟酰胺单核苷酸进一步由烟酰胺/烟酸单核苷酸腺苷酰转移酶 (NMNAT) 转化为 NAD。

NAMPT 是哺乳动物 NAD 生物合成途径中的限速酶^[146, 150, 151]。有研究发现, NAMPT 活动增强即可上调细胞总的 NAD⁺水平, 也可上调小鼠成纤维细胞的 SIRT1 的后续转录活性^[152]。NMNAT 还可以通过其靶基因的启动子调节 SIRT1 的脱乙酰活性^[153]。此外, HuR (一种 RNA 结合蛋白) 可结合 SIRT1 mRNA 的 3'端非翻译区, 稳定 SIRT1 mRNA 进而上调 SIRT1 表达。在细胞遭受氧化应激损伤过程中, HuR 发生磷酸化导致 HuR-SIRT1 mRNA 复合体解离, 进而下调 SIRT1 的翻译水平^[154]。

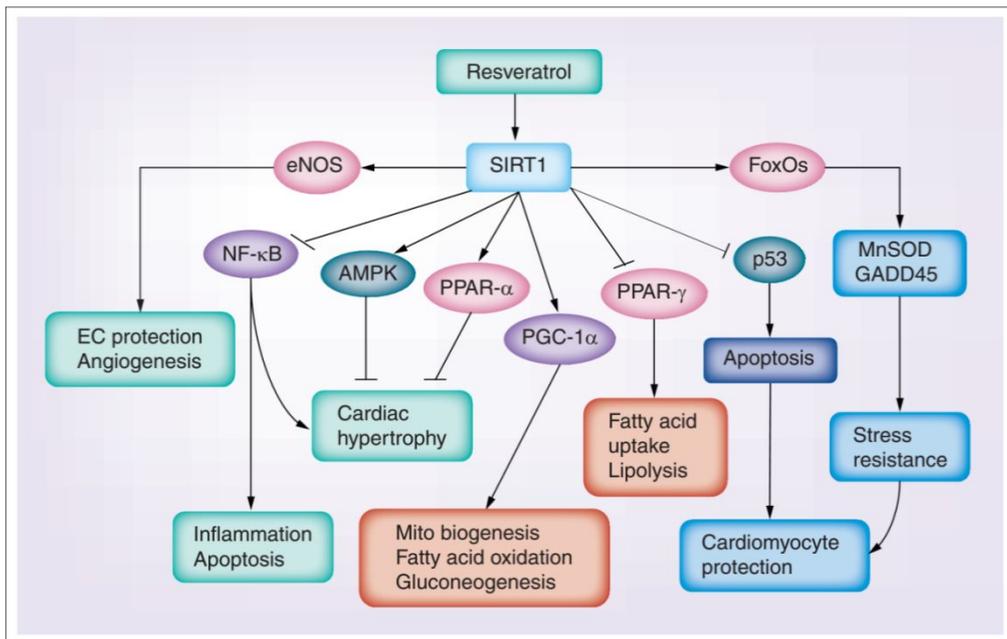


图 1-8 SIRT1 信号心血管保护作用的机制^[150]

癌高甲基化 1 (hypermethylated in cancer 1, HIC1) 和乳腺癌缺失基因 1 (deleted in breast cancer 1, DBC1) 都被证实是 SIRT1 的负性调节因子^[155, 156]。HIC1 属于转录抑制因子, 可特异性结合于 SIRT1 的启动子而抑制其转录。有研究发现, 细胞中 HIC1 缺失上调 SIRT1 表达, 进而引起 p53 脱乙酰失活是癌细胞增殖失控的重要原因^[155]。而 DBC1 可直接与 SIRT1 相互作用, 抑制 SIRT1 活性。有研究表明, 在细胞应激情况下, 下调 DBC1 表达可促进 SIRT1 介导的抗凋亡作用^[156] (图 1-8)。

2. SIRT1 与常见的心血管疾病

2.1 SIRT1 的心肌细胞保护作用

激活 SIRT1 信号可发挥明确的心肌细胞保护作用。适量饮用红葡萄酒可降低冠

心病风险的重要原因就是其富含白藜芦醇，而白藜芦醇是 SIRT1 的天然激动剂^[157]。有研究证实白藜芦醇可直接抑制过氧化氢对 H9c2 细胞系的损伤作用，而阻断 SIRT1 信号则显著逆转白藜芦醇的心肌保护作用，提示 SIRT1 信号是其抗氧化、抗凋亡心肌保护作用的关键通路^[158-160]。另外，白藜芦醇还可通过 SIRT1 信号抑制化疗药物阿霉素对心脏的毒性作用^[160, 161]。

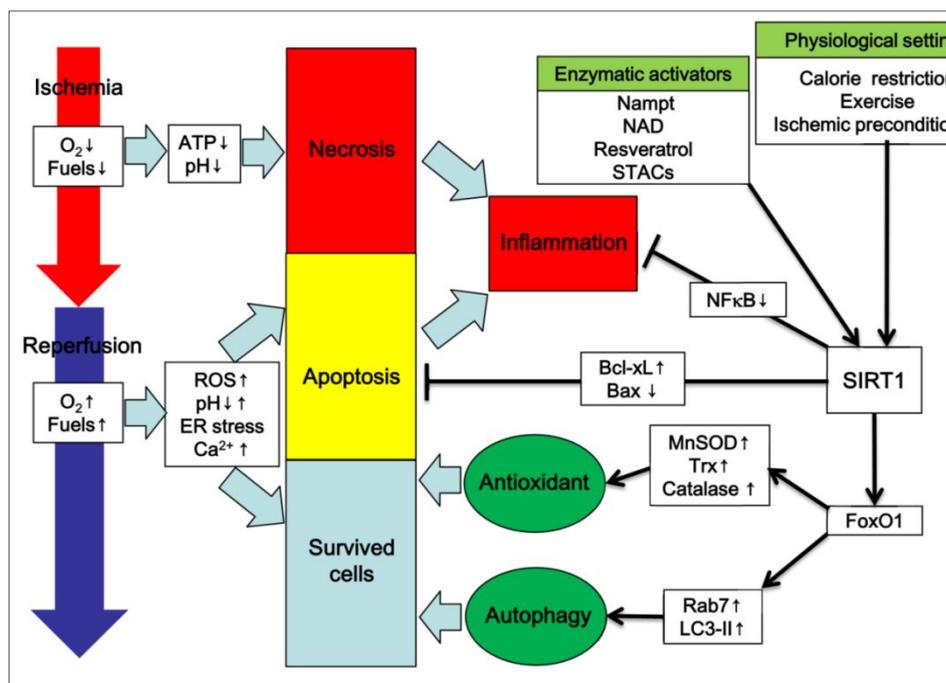


图 1-9 SIRT1 抗心肌缺血/再灌注损伤作用的机制^[162]

SIRT1 在细胞质和细胞核中均有表达，有研究表明细胞核 SIRT1 可发挥明显的抗凋亡、抗氧化作用。在血管内皮细胞凋亡过程中，SIRT1 主要存在于细胞质，白藜芦醇治疗可显著诱导其转位至细胞核从而促进细胞生存^[163]。另有研究发现，在心肌细胞中，核 SIRT1 可通过上调 MnSOD 表达增强细胞抵抗氧化应激的能力，而应用小干扰 RNA 抑制 MnSOD 可显著下调 SIRT1 的细胞保护作用，提示核 SIRT1 转位可上调抗氧化酶从而显著减轻氧化应激损伤，保护心肌细胞^[164]（图 1-9）。

2.2 SIRT1 与冠状动脉粥样硬化性心脏病

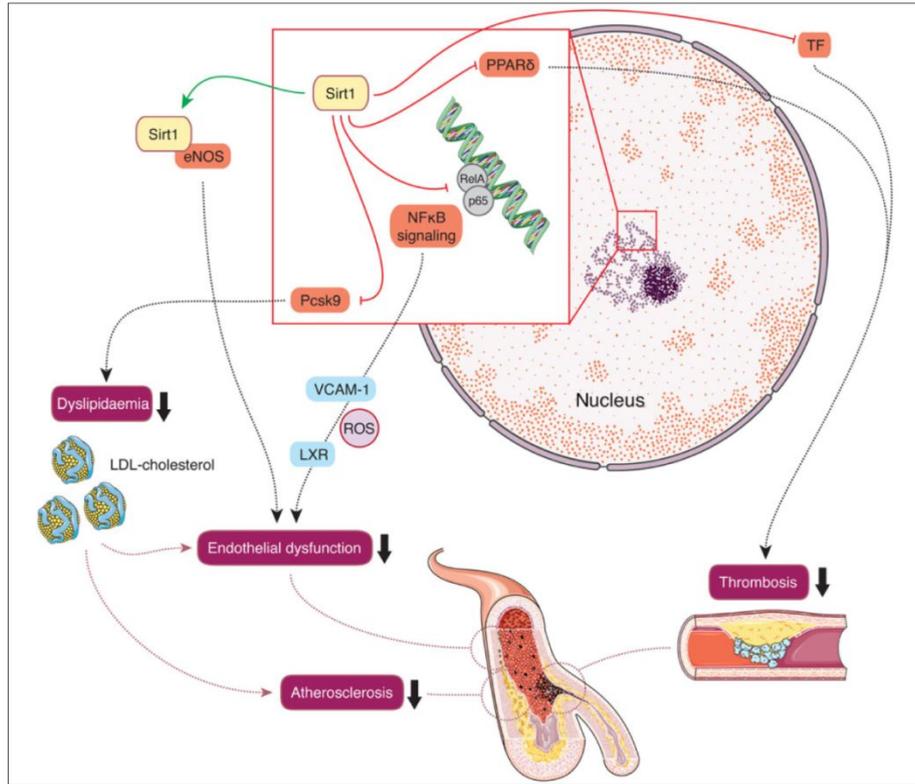


图 1-10 SIRT1 抗动脉粥样硬化的机制^[165]

激活内皮细胞 SIRT1 信号发挥明显的抗动脉粥样硬化作用。高脂饮食可提高血清脂肪酸阴离子与脂蛋白水平，他们均可激活血管内皮细胞并损伤血管内皮完整性，发挥促动脉粥样硬化斑块形成的作用^[166]。内皮细胞受损后，动脉管壁则容易聚集血小板从而形成血栓^[81, 167]。SIRT1 可保护内皮细胞免受氧化应激损伤，抑制氧化低密度脂蛋白诱导的内皮细胞凋亡^[163, 167]。另有研究报道，人脐静脉内皮细胞（HUVEC）过表达也可发挥抗氧化低密度脂蛋白（LDL）诱导细胞凋亡的作用^[168]。而 Zhang 等发现，给予小鼠高脂饮食诱导其内皮细胞损伤造成的血管壁瘢痕模型中，与对照组相比，内皮细胞特异性 SIRT1 转基因动物的损伤程度明显降低，提示 SIRT1 可改善血管内皮功能，防止动脉粥样硬化^[168]。激活 SIRT1 也可激活内皮型一氧化氮合酶，上调一氧化氮含量进而发挥舒张血管的作用^[169-171]（图 1-10）。

平滑肌细胞肥大是动脉粥样硬化发生的关键因素，有研究显示激活 SIRT1 可显著抑制血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞肥大^[172]。SIRT1 可通过上调金属蛋白酶-3 抑制因子（Tissue inhibitor of metalloproteinase 3, TIMP3）的活性调节动脉粥样硬化。金属蛋白酶 3 抑制剂可抑制金属蛋白酶 3 消化细胞内基质，而血管平滑肌细胞的基

质发挥稳定粥样硬化斑块的作用。因此，糖尿病患者发生动脉粥样硬化与金属蛋白酶-3 抑制因子活性下降密切相关，而 SIRT1 可发挥有效的调节作用^[172]。

此外，激动 SIRT1 信号还可抗心肌缺血/再灌注损伤，直接保护受损心肌。大鼠心肌缺血/再灌注过程中给予白藜芦醇治疗可减轻心律失常，降低心肌梗死面积，明显下调血浆乳酸脱氢酶和肌酸激酶的水平^[173]。白藜芦醇针对缺血/再灌注损伤的心脏保护还取决于其抗氧化及抗炎作用^[163, 167]。已证实 SIRT1 可提高 FoxO1 的转录活性上调的 MnSOD 的基因表达，抑制心肌细胞的氧化应激，从而减少心肌梗死面积，维护小鼠缺血/再灌注之后的心功能^[174-176]。在大鼠心肌梗死模型中，白藜芦醇还可显著增加血管内皮生长因子（VEGF）的表达，促进新生血管形成，减轻心肌损伤^[177]。

2.3 SIRT1 与心肌肥厚

激动 SIRT1 信号可有效抑制心肌肥厚，延缓心脏衰竭。应用转基因技术过表达小鼠心肌 SIRT1 信号至对照组的 2.5 至 7.5 倍可显著减轻衰老引起的心肌肥厚、心肌细胞凋亡及心脏功能衰竭^[178]。然而，有实验证实 SIRT1 的表达增加也可能有危害作用。将 SIRT1 过表达至对照组 12.5 倍时可造成线粒体功能障碍及 NAD⁺消耗枯竭，从而导致心肌氧化应激损伤，促进细胞凋亡，加重心肌肥厚^[178]。另外，过表达 SIRT1 还可促进磷脂酰-3,4,5-三磷酸（PIP）募集并激活 Akt 及 PDK1 信号，从而导致心肌肥厚加重^[179]。最近的研究表明，原代心肌细胞过表达 SIRT1 或者经过白藜芦醇处理均可显著抑制去氧肾上腺素引起的心肌细胞肥厚作用，同时下调脂肪酸氧化基因^[180]。另外，在 H9c2 细胞系，去氧肾上腺素处理可显著上调心肌 SIRT1 表达，并提高其活性，而 AMPK 可显著抑制此作用^[181]；和其它细胞系受到氧化应激损伤时干扰 SIRT1 可加重损伤类似的是，此时使用 sirtinol 或 SIRT1 小干扰 RNA 抑制 SIRT1 信号也可显著降低细胞活力^[182]。

3. SIRT1 与心肌缺血/再灌注损伤

近年来，SIRT1 在心肌缺血/再灌注损伤中的作用得到广泛关注^[183]。SIRT1 被证实可调控心肌保护性信号分子及凋亡相关分子的转录。有研究发现，心肌中等程度特异性过表达 SIRT1 可明显抑制心肌缺血/再灌注损伤，而抑制 SIRT1 表达则显著加重再灌注损伤^[174]。SIRT1 也参与了缺血预处理心肌保护作用，缺血预处理通过 SUMO 化（sumoylation）修饰作用激动心肌 SIRT1 信号，进而引起心肌保护分子乙酰化而被激活，包括异柠檬酸脱氢酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶及内皮型一氧化氮合酶等^[184]。

^{185]}。因此, SIRT1 可通过转录及转录后水平发挥缺血心肌保护作用。

3.1 SIRT1 对氧化应激及内质网应激的作用

心肌缺血/再灌注过程中, 线粒体可产生大量的超氧阴离子 (O_2^-), O_2^- 不仅可与超氧化物歧化酶作用生成过氧化氢, 还可进一步转化生成 OH 和 ONOO⁻ 等^[186]。这些氧化应激与硝化应激损伤介质可反作用于线粒体功能蛋白, 导致线粒体功能障碍^[178, 187]。有证据表明, SIRT1 可发挥显著地抗氧化应激的心肌保护作用。Hsu 等发现, 在心肌细胞中过表达 SIRT1 可明显上调抗氧化酶超氧化物歧化酶、硫氧还原蛋白等的表达量, 减轻缺血再灌注损伤^[174]。Alcendor 等也发现, 在百草枯心脏损伤模型中, SIRT1 过表达也可显著上调过氧化氢酶, 从而减轻心脏损伤^[178]。目前, 已发现 SIRT1 抗氧化应激的重要分子机制是通过使转录因子 FOXO 家族脱乙酰化并诱导其核转位, 进而激活细胞抗氧化酶和其它心脏保护性分子的转录^[188, 189]。正如前述, SIRT1 的抗氧化应激作用与其过表达量密切相关, 心肌细胞过高的 SIRT1 表达可加重氧化应激损伤, 破坏线粒体功能^[178]。

另外, 内质网应激损伤也在心肌缺血/再灌注过程中发挥关键作用。研究发现, 再灌注过程中, 心肌细胞氧化应激损伤、能量代谢障碍及 Ca^{2+} 超载等均可导致内质网未折叠蛋白反应, 而持久的内质网应激则可启动内质网相关凋亡通路, 通过下游 CHOP、JNK 及 caspase-12 等凋亡相关蛋白诱导细胞凋亡^[45]。Li 等发现, SIRT1 过表达可显著降低糖尿病小鼠肝脏 XBP1 (X-box binding protein 1) 等内质网应激标志物, 提示 SIRT1 可能是糖尿病诱发的内质网应激负性调控分子^[190]。然而, 在心肌缺血/再灌注过程中, SIRT1 是否参与调控内质网应激及其调控机制尚不清楚。

3.2 SIRT1 对凋亡与坏死的作用

SIRT1 对凋亡过程发挥重要的调控作用, SIRT1 可脱乙酰化多种促凋亡 (如 p53 等) 及抑凋亡分子 (如 DNA 修复因子 Ku70 等) 进而抑制凋亡。Hsu 等发现, 心肌缺血/再灌注小鼠模型中, SIRT1 在抑制 p53 的同时还可以脱乙酰化 Foxo1 进而上调 Bcl-2 和 Bcl-xL, 下调 Bax 的表达^[174], 提示转录因子 FoxOs 作为 SIRT1 的重要下游分子也参与了 SIRT1 的抑制凋亡作用。

细胞坏死同样在心肌缺血/再灌注损伤中扮演重要角色, 再灌注过程中线粒体通透性转换孔开放以及一系列坏死相关通路的激活均可导致心肌细胞坏死。坏死的心肌细胞在周围进一步释放三磷酸腺苷、尿酸及高迁移率族蛋白 1 (high mobility group

box-1 protein, HMGB1) 等毒性物质可进一步募集巨噬细胞和中性粒细胞, 从而引发局部炎症反应^[191]。Nadtochiy 等发现, SIRT1 可通过脱乙酰化 NF- κ B 亚单位 RelA/p65 蛋白, 下调 NF- κ B 的转录活性, 抑制心肌炎症反应, 减轻病理性重构^[185]。SIRT1 对缺血再灌注过程中心肌细胞的坏死作用及机制有待于进一步研究。

3.3 SIRT1 对自噬的作用

大量研究证实, 心肌细胞信号 SIRT1 对自噬 (autophagy) 过程发挥重要的调控作用。自噬是囊泡包裹细胞蛋白或细胞器后与溶酶体融合成自噬溶酶体, 进而降解的过程。生理情况下, 细胞即存在自噬现象, 它是细胞满足自身代谢需要和更新某些细胞器的重要过程, 有利于保持能量供给稳定, 维持细胞稳态^[192]。有研究发现, SIRT1 诱导 Foxo1 的脱乙酰化, 从而上调 Rab7 (RAS-related GTP-binding protein 7) 等自噬相关蛋白表达, 促进自噬体和溶酶体的融合^[189, 193]。另外, Lee 和 Fulco 等也证实 SIRT1 还可以通过脱乙酰化自噬相关基因 (autophagy associated gene, ATG) 并同时激活 AMPK 信号促进自噬反应^[190, 194]。在心肌缺血过程中, NAMPT 表达降低使 SIRT1 活性下降, 此时外源性 NAMPT 处理可明显激动自噬过程减轻心肌缺血/再灌注损伤, 提示 NAMPT-SIRT1 通路可通过调节自噬水平保护缺血心肌^[174]。

4. 褪黑素对 SIRT1 的调控作用

有证据显示, 褪黑素发挥调节 SIRT1 信号的作用。对快速老化小鼠模型 (SAMP8) 的研究发现, 衰老显著下调 SIRT1 信号, 而褪黑素可明显逆转此作用, 减轻细胞凋亡^[195]。Tajes 等发现, 褪黑素还可以激动大鼠原代小脑神经细胞 SIRT1 信号, 发挥神经保护作用^[196]。与此相反的是, 在一些肿瘤细胞系的研究中, 褪黑素发挥抑制 SIRT1 信号的作用从而抑制肿瘤细胞增殖。例如, Jung 及 Cheng 等发现, 褪黑素可显著抑制 SIRT1 表达从而抑制前列腺癌细胞和骨肉瘤细胞增殖^[197-199], 提示褪黑素对 SIRT1 的调控作用具有组织差异性, 同时与不同的病理条件密切相关。在心肌缺血/再灌注损伤中, 褪黑素对 SIRT1 的调控作用尚不清楚。

五、Notch 信号通路及其心肌保护作用

1. Notch 信号通路概述

Notch 信号是一类进化上高度保守的细胞信号通路, 存在于大多数多细胞生物体, 上世纪 80 年代, Artavanis 课题组第一次成功的克隆了 Notch 基因, 后期研究发现, Notch 编码 4 种高度同源的跨膜受体 (Notch1、Notch2、Notch3 及 Notch4), 同时,

Notch 受体的配体也逐渐被确认，迄今为止已发现 5 种经典的配体（Delta-like1、3、4 及 Jagged1、2）^[200]。Notch 信号通过细胞与细胞间的受体-配体结合而传导，其广泛参与细胞分化、增殖、凋亡与再生等过程^[201]。

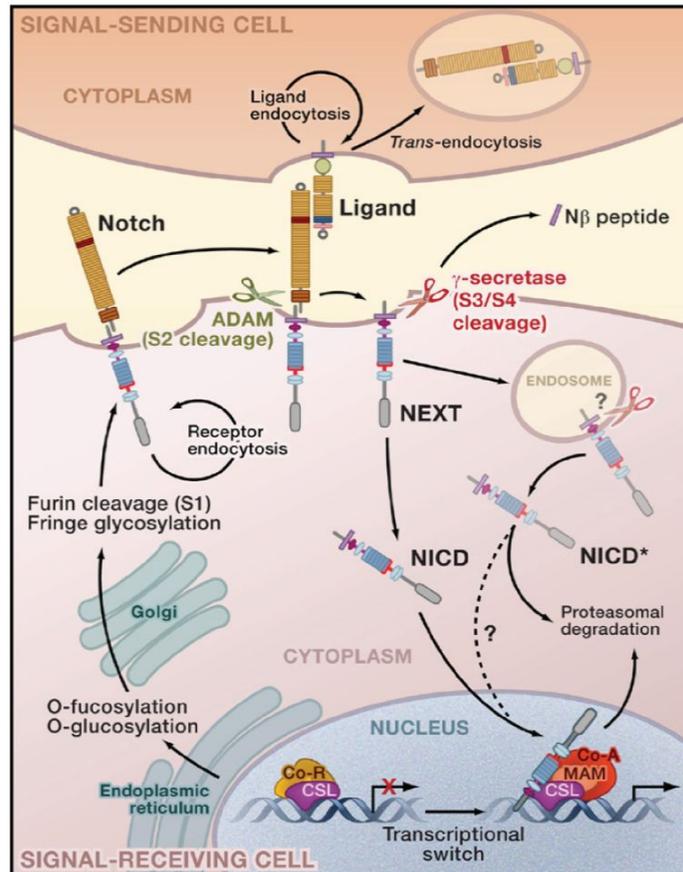


图 1-11 Notch 信号系统^[200]

Notch 是单次跨膜受体，其包括 3 个区段，胞外段、跨膜段和胞内段，当相互邻近的细胞配体与受体结合后，Notch 信号通路被激活，Notch 受体跨膜区段 1743 位甘氨酸和 1744 位缬氨酸被 γ 分泌酶（ γ -Secretase，天冬氨酸蛋白酶复合体）剪切，使 Notch 受体胞内区段（Notch intracellular domain, NICD）解离并激活转位至细胞核，进而调控 Hes (Hairy/enhancer of split)，Hey (Hes-related proteins) 及 Nrarp (Notch-regulated ankyrin repeat protein) 等家族的基因表达^[202, 203]（图 1-11）。以上蛋白可进一步调控下游 cMyc、cyclin D1 等其他基因的转录与翻译，最终决定细胞的增殖、分化与凋亡过程。

2. Notch1 信号通路与心脏的研究概况

Notch 通路在心脏的发育过程中发挥关键的调控作用，先天性心脏缺陷与 Notch 基因的变异也密切相关。成年心肌细胞最主要表达 Notch 受体类型是 Notch1，配体类型是 Jagged1^[201, 204]。Gude 等研究大鼠心肌梗死模型发现，在生理情况下心脏 Notch1 信号处于静息状态，而在应激条件下（如心肌缺血梗死），缺血周边区 Notch1 信号被激动^[205, 206]。此外，对临床样本的研究也发现心力衰竭患者心肌 Notch 信号被激活，提示 Notch1 可能同样参与心脏应激条件下的心肌细胞命运决定^[207]。同时，Croquelois 等研究血管紧张素 II 过表达的转基因小鼠发现，抑制心肌 Notch1 信号可显著加重心肌肥厚，导致病理性心肌重构^[205]。而 Gude 和 Kratsios 等证实，应用单克隆抗体或者过表达病毒载体特异性激动心肌 Notch1 可明显减轻心肌梗死后心肌损伤从而抑制病理性重构^[206, 207]。另有研究表明，心肌特异性过表达 Jagged1 可减轻主动脉缩窄小鼠的心肌重构，延缓心力衰竭的发生^[208]。以上结果均强烈提示 Notch1 可能参与心肌梗死等应激条件下的心脏修复过程。

3. Notch1 信号与心肌细胞存活

成年心肌细胞前体细胞因需要大量增殖而高表达 Notch1 信号。在新生大鼠心肌细胞原代培养模型中发现，分离之初心肌细胞 Notch1 信号表达高，而在体外培养并传几代之后，Notch1 的表达显著下调，甚至无法检测到，此时，这些原代培养的细胞也失去了增殖能力^[209]。这些结果表明，激动 Notch1 信号是心脏前体细胞的增殖的必要条件，而在心肌细胞进一步分化时必须下调 Notch1 信号。而成年心肌细胞 Notch1 信号又可以在心肌细胞受损时被激动。有研究发现，心肌梗死病理条件下，肝细胞生长因子可激动梗死区 c-Met 受体，从而重新激活梗死周边区 Notch1 信号通路，进而上调促生存信号分子 Akt 的磷酸化，从而减轻心肌凋亡^[206]。同样，心肌细胞特异性过表达 Notch1 的小鼠心梗后，心肌细胞凋亡水平明显较对照组低^[207]。另外，在心肌细胞慢性缺氧模型中发现，如果激动 Notch1 信号则抗凋亡基因被显著激动，而抑制 Notch1 信号则促凋亡基因被显著激活^[205]。Oie E 的研究也发现，心肌 Notch1 过表达的小鼠在发生心肌梗死后，Ki67（细胞增殖相关标识蛋白）阳性的细胞数量与野生型小鼠相比明显增加^[210]。以上结果均表明心肌受损后，Notch1 信号重新激活可发挥明显的心肌细胞保护作用，可能是心脏自我修复的关键信号（图 1-12）。

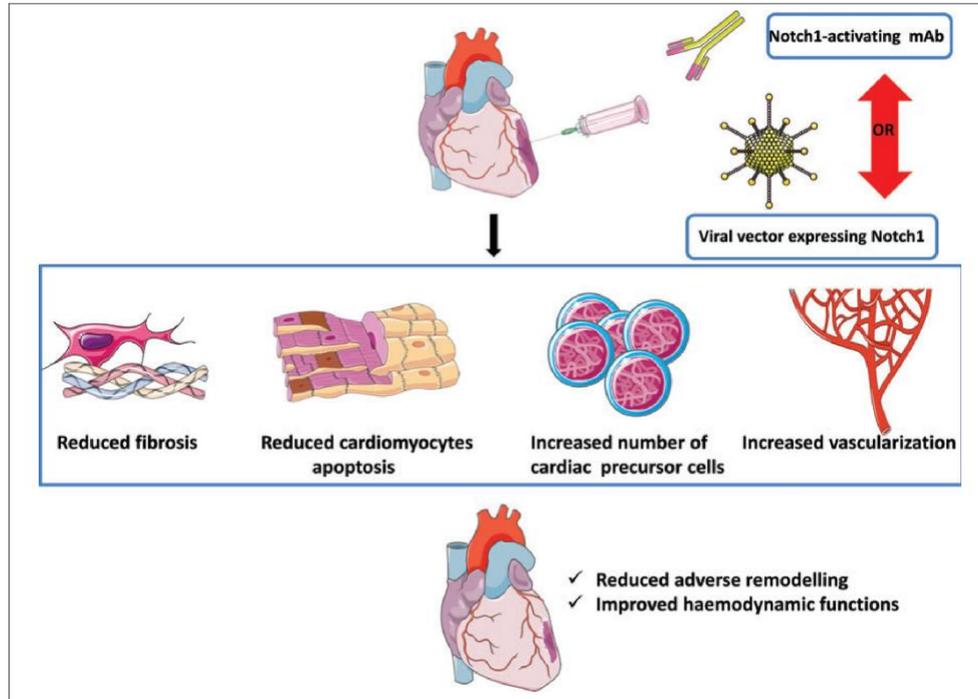


图 1-12 Notch1 抗心肌病理性重构的作用及机制^[201]

4. Notch1 信号与心肌血管再生

心肌梗死区毛细血管和小动脉再生不良导致心脏组织供血不足是心力衰竭发生发展的重要因素。已发现内皮表达的 Notch 受体类型是 Notch1、Notch2 和 Notch4，配体类型是 Delta-like ligands1/4 和 Jagged1/2^[211]。在发育过程中，Notch 信号可决定心脏动静脉的形成，而在出生后，内皮 Notch 信号则在维持血管稳态、调节血管再生的过程中发挥关键作用^[212, 213]。Notch 信号还参与血管平滑肌细胞生长、凋亡和迁移过程^[214]。Kratsios 的研究表明，通过心肌点注射 Notch1 单克隆蛋白配体的手段激动小鼠心肌 Notch1 信号可明显上调心肌梗死 4 周后心肌缺血再生，维护心功能^[207]。与之相反的是，Gu 等研究急性下肢缺血模型发现，使用低剂量的可溶性 Delta-like ligand 4 胞外区段抑制 Notch1 可有效增加血管再生水平^[206, 215]。以上结果提示 Notch 对血管再生的影响可能与组织器官有关，其具体调控机制有待于进一步研究。

5. Notch1 信号通路与心肌缺血/再灌注损伤

有研究表明，Notch1 在器官缺血/再灌注损伤中也发挥重要的调控作用。Yu 等发现，Notch1 可激活肝脏 JAK2/STAT3 信号通路从而减轻氧化应激，抗肝缺血/再灌注损伤^[216]。另有研究证实，Notch2-Hes1 信号通路参与了肾脏缺血/再灌注损伤^[217]。更

重要的是,裴等发现,激动 Notch1/Hes1 信号通路可通过调控 PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) /Akt 信号,抑制 iNOS 表达进而减轻氧化应激与硝化应激水平,发挥抗心肌缺血/再灌注损伤的作用,提示 Notch1 信号可调控器官缺血再灌注损伤,尤其是在心肌缺血/再灌注过程中发挥重要的保护作用,其具体机制可能与减轻氧化应激、抗凋亡有关^[218]。PTEN 是 1997 年发现的具有双特异磷酸酶活性的抑癌基因,其参与细胞的生长、凋亡、粘附、迁移等多个过程。有文献证实,在胸腺瘤和 T 细胞淋巴瘤中 Hes1 可抑制 PTEN 从而促进 PI3K/Akt 信号通路^[219, 220]。同时,Pei 等证实 Notch1/Hes1 信号也通过抑制 PTEN 信号保护缺血心肌^[218]。另有研究表明,褪黑素可能对 Notch1/Hes1 信号通路发挥调控作用。Margheri 等发现褪黑素与全反式维甲酸及生长抑素联用可通过影响 Notch1 信号进而抑制乳腺癌细胞系生长^[221]。同时,Akimoto 等发现,褪黑素可能通过维持 Hes1 表达从而调控垂体及下丘脑的发育^[222]。然而,迄今为止,在心肌缺血/再灌注过程中,褪黑素是否对 Notch1/Hes1 及 PTEN/Akt 信号有影响及其机制尚不清楚。

正文

第一部分 SIRT1 信号通路介导褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤作用及机制研究

1 实验材料

1.1 仪器设备

大鼠心肌缺血/再灌注手术器械	上海医疗手术器械厂
小动物手术台	美国 Harvard Appraatus 公司
小动物呼吸机	成都泰盟科技有限公司
外科手术缝合线	美国 ETHICON 公司
医用玻璃皿	南通海伦生物公司
动物剃毛器	上海玉研仪器有限公司
RM6240B 型生理信号处理系统	成都泰盟科技有限公司
医用超声耦合剂	山东九尔医药有限公司
小动物超声仪器及分析系统	加拿大 Visual Sonics 公司
单道可调量程移液器	德国 Eppendorf 公司
血糖仪	长沙三诺科技公司
涡旋震荡器	德国 Wiggens 公司
组织匀浆机	美国 Pro Scientific 公司
台式通用摇床	江苏其林贝尔公司
恒温磁力搅拌器	上海科升仪器有限公司
电子精密天平	瑞士 Mettler Toledo 公司
低温离心机	湖南湘仪公司
恒温水浴箱	陕西欧凯科技有限公司

雪花制冰机	无锡沃信
纯水/超纯水一体化系统	美国 Merck Millipore 公司
凝胶电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
蛋白凝胶电泳玻璃板	美国 Bio-Rad 公司
凝胶成像分析系统	美国 Bio-Rad 公司
多功能酶标仪 SpectraMax M5	美国 Molecular Devices 公司
双目荧光显微镜	日本奥林巴斯公司
共聚焦显微镜	日本奥林巴斯公司
细胞培养板	美国 Corning 公司
细胞培养超净台	无锡易纯净化设备公司
细胞培养箱	美国 Thermo 公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯公司

1.2 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠，体质量 220-250g，采购于第四军医大学动物实验中心。

1.3 实验试剂

褪黑素	美国 Sigma-Aldrich 公司
戊巴比妥钠	北京索莱宝有限公司
异氟烷	上海玉研科学仪器公司
伊文氏蓝	北京索莱宝有限公司
肌酸激酶试剂盒	南京建成生物公司
2,3,5-氯化三苯基四氮唑	北京索莱宝有限公司
乳酸脱氢酶试剂盒	南京建成生物公司
Luzindole (褪黑素膜受体拮抗剂)	美国 Santa Cruz 公司
EX527 (SIRT1 通路抑制剂)	美国 Selleck Chemicals 公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Sigma-Aldrich 公司

TUNEL 试剂盒	德国罗氏公司
DAPI	美国 Sigma-Aldrich 公司
MTT	上海阿拉丁公司
GP91 ^{phox} 抗体	美国 Santa Cruz 公司
SIRT1 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Ac-foxo1 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Bcl-2 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Bax 抗体	美国 Santa Cruz 公司
cleaved caspase-3 抗体	美国 Santa Cruz 公司
caspase-3 抗体	美国 Santa Cruz 公司
β -actin 抗体	美国 Santa Cruz 公司
HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
HRP 标记的兔抗羊 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
RIPA 裂解液	上海碧云天公司
蛋白酶抑制剂	德国罗氏公司
BCA 蛋白定量试剂盒	美国 Merck Millipore 公司
Tris 碱	西安国安生物公司
Tween-20	北京索莱宝有限公司
甘氨酸	西安国安生物公司
SDS-PAGE 凝胶试剂盒	北京索莱宝有限公司
聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜	美国 Merck Millipore 公司
蛋白上样缓冲液	上海碧云天公司
蛋白预染 Marker	美国 Merck Millipore 公司
ECL 发光液	美国 Merck Millipore 公司

2 实验方法

2.1 实验分组

2.1.1 外源性药物心脏毒性检测

将实验大鼠随机分为 3 组：

- 1) Sham 假手术组：大鼠行心肌缺血/再灌注手术。心肌穿线但是不做结扎，作为假手术组。
- 2) Sham+Luz 组：假手术前 Luz 以 1 mg/kg 腹腔注射 7 天，术中对应 2.2.2 MI/R+Mel+Luz 组时间点补充注射（2 mg/kg）1 次。
- 3) Sham+EX 组：假手术前 EX 以 5 mg/kg 腹腔注射 3 天，术中对应 2.2.2 MI/R+Mel+EX 组时间点补充注射（5 mg/kg）1 次。

2.2.2 褪黑素心肌保护作用及机制研究

将实验大鼠随机分为 5 组

- 1) Sham 组：大鼠行心肌缺血/再灌注手术，心肌穿线但是不做结扎，作为假手术组。
- 2) MI/R+V (vehicle) 组：大鼠给予如下对应剂量的 Luz 或 EX 的溶剂处理，然后行常规心肌缺血/再灌注手术。
- 3) MI/R+Mel：手术前接受褪黑素腹腔注射（10 mg/kg）7 天，再灌注前 15min 补充注射褪黑素（15 mg/kg）1 次，然后常规心肌缺血/再灌注手术。
- 4) MI/R+Mel+Luz：褪黑素给药同前，手术前 Luz 以 1mg/kg 腹腔注射 7 天，再灌注前 20min 补充注射（2 mg/kg）1 次，然后行常规心肌缺血/再灌注手术。
- 5) MI/R+Mel+EX：褪黑素给药同前，手术前 EX 以 5mg/kg 腹腔注射 3 天，再灌注前 20min 补充注射（5 mg/kg）1 次，然后行常规心肌缺血/再灌注手术。

2.2 大鼠心肌缺血/再灌注手术操作

- 1) 用清洁生理盐水配制浓度为 1%的戊巴比妥钠溶液，避光 4°C 保存备用。
- 2) 按照 50 mg/kg 剂量给予大鼠腹腔注射戊巴比妥钠溶液。

- 3) 静止观察 10 分钟，用轻捏鼠尾巴方法判断麻醉成功后。
- 4) 给大鼠颈部及胸部胸骨至左腋下剃毛。
- 5) 将大鼠腹部向上固定于动物实验台，处于舒适体位。给予脱毛区域 75%酒精消毒 3 次。
- 6) 颈部正中开 1cm 长切口，钝性分离筋膜及肌肉，显露气管。用眼科剪在气管处做横切口后将橡胶插管插入，连接成都泰盟动物呼吸机。参数调至大鼠预设值，频率 60 次/分左右，潮气量 10ml/kg 左右，呼吸比设置为 1:2。
- 7) 在左侧胸部纵向切口，钝性分离胸部肌肉及筋膜，在三四肋间沿肋间隙方向做 0.5cm 长度的切口。
- 8) 用特制的小动物胸腔撑开器打开胸腔，显露心脏。
- 9) 避免伤及肺部，刺穿心包膜，确定左心耳位置，在左心耳下缘 2mm 处以 6-0 无创外科线穿入心肌组织，在结扎冠脉前降支前线结内穿过一小段消毒的橡胶管，以避免线结伤及心肌肌肉组织。
- 10) 以系紧线结后心前区组织变白为标志，开始计时，缺血开始。30min 后松开线结，再灌开始。

2.3 大鼠超声心动图检测

- 1) 心肌缺血/再灌注 72 小时后，用小动物超声仪 (Vevo770) 检测心脏功能。
- 2) 大鼠胸部剃毛后采用异氟烷吸入麻醉，然后固定于超声仪操作台上。
- 3) 等待数分钟后大鼠心率呼吸恢复平稳后，将超声耦合剂在心前区涂抹均匀，测定二维超声心动图。
- 4) 用仪器自带软件计算大鼠左室缩短分数 (LVFS) 及左室射血分数 (LVEF)。

2.4 血浆肌酸激酶及乳酸脱氢酶测定

- 1) 心肌缺血/再灌注 6 小时后，抽取大鼠 1ml 血样。
- 2) 静置离心得到血浆样本，严格按照南京建成生物公司的说明书进行肌酸激酶及乳酸脱氢酶的测定。

2.5 Evan's blue/TTC 染色

- 1) 心肌缺血/再灌注 6 小时后，立刻剪取心脏。
- 2) 用清洁生理盐水清洗心脏后重新结扎冠脉左前降支，向主动脉逆灌 1ml 浓度为 1% 的 Evan's blue 染液，漂洗心脏后立刻冻入-80°C 冰箱。
- 3) 20min 将冻硬的心脏取出，用手术刀片垂直于心脏长轴将心脏切片成为 1mm 厚度的切片。
- 4) 用生理盐水稍作漂洗后，立刻浸入已配好的 2% 的 TTC 溶液中，37°C 水浴 30min。
- 5) 多聚甲醛固定 6h 后，取出拍照。
- 6) 将数码照片用 ImageJ 软件分析，其中白色区域为梗死区 (infarct area)，红色区域为心肌缺血但是未梗死区，蓝色区域为未缺血区。白色区域和红色区域合并为相对危险区 (area at risk)。心肌梗死程度以梗死区面积/危险区面积表示。

2.6 心肌超氧化物生成量测定

- 1) 每组随机分配 6 只动物，心肌缺血/再灌注 6 小时后，迅速取大鼠缺血区心肌组织 0.1g。
- 2) 严格按照南京建成生物公司的说明书进行心肌组织心肌超氧化物生成量测定。

2.7 心肌组织丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性检测

- 1) 每组随机分配 6 只动物，心肌缺血/再灌注 6 小时后，迅速取大鼠缺血区心肌组织 0.1g。
- 2) 严格按照南京建成生物公司的说明书进行心肌组织丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性测定。

2.8 心肌组织 TUNEL 法检测凋亡率

- 1) 每组随机分配 6 只动物，心肌缺血/再灌注 6 小时后，迅速取大鼠缺血区心肌组织。
- 2) 将心肌组织置于多聚甲醛固定 72h 后，脱水石蜡包埋备用。
- 3) 在石蜡切片机上将组织蜡块切成 3 μ m 厚的切片，小心置于 50°C 清水水面摊片，

然后以载玻片捞取组织切片进行烤片操作 3h, 备用。

4) 常规脱蜡操作之后将载玻片置于水平湿盒中, 加入蛋白酶 K 打孔, 37°C 打孔 1h 后用 PBS 小心摇洗 3 次。

5) 按照罗氏 TUNEL 试剂盒说明书混合 A 液与 B 液, 避光条件下滴在组织切片上, 37°C 恒温水浴 2h。

6) 取出切片用 PBS 小心避光摇洗 3 次后, 再加入 1:1000 配制的 DAPI 试剂, 常温反应 15min 后用 PBS 小心摇洗 3 次。

7) 配制 50%的甘油 PBS 溶液滴于载玻片, 用盖玻片进行封片处理。

8) 在共聚焦显微镜下观察心肌组织切片, 其中绿色荧光标记凋亡细胞的细胞核, 蓝色荧光标记组织切片全部细胞的细胞核。采集荧光照片, 以绿色数量/蓝色数量为心肌组织凋亡率, 进行统计分析。

2.9 Western blot 检测蛋白表达

1) 每组随机分配 6 只动物, 心肌缺血/再灌注 6 小时后, 迅速取大鼠缺血区心肌组织。

2) 用 RIPA buffer 裂解心肌组织标本, 经过离心、定量、加上样缓冲液、煮沸等操作后, 得到上样样本。将上样样本置于 -80°C 环境保存, 备用。

3) 按照北京索莱宝公司 Western blot 配胶试剂盒说明书配制 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶。

4) 每个泳道上样体积及蛋白总量一致 (20-50 μ g), 上层浓缩胶以 80V 电压、下层分离胶以 120V 电压进行蛋白电泳操作。

5) 小心将玻璃板上的凝胶取下, 置于转膜液中。按照从上至下: 三层滤纸-凝胶-PVDF 膜-三层滤纸安放好后, 用转膜专用夹夹紧, 然后置于转膜槽中, 以 90V 的电压转膜 50min。PVDF 膜使用前用甲醇浸泡激活 10min。

6) 用 TBST 溶液配制脱脂奶粉, 最终浓度为 5%。转膜结束后室温封闭 PVDF 膜 3h。

7) 按照分子量将 PVDF 膜裁切整齐, 分别加对应一抗, 4°C 孵育 12h, 一抗配制严格按照抗体说明书方法进行。

8) 应用 TBST 摇洗 3 次 (每次 5min) 后, 孵育对应的二抗, 室温 2h, 二抗配制严格按照抗体说明书方法进行。

9) 再次应用 TBST 摇洗 3 次 (每次 5min) 后, 滴加 ECL 发光液, 用凝胶成像分析系统进行成像操作, 并用配套软件 (ImageLab) 进行分析。

2.10 统计分析

以上实验数据经过相应软件转换、分析之后, 应用 GraphPad Prism (V5.01) 进行统计处理, 结果均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SEM) 表示。用 t 检验进行两组之间的比较, 用单因素方差分析辅以 t 检验方法进行多组之间的比较, 若 $P < 0.05$ 则认为两组具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 褪黑素处理显著减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤

缺血再灌注 72 小时后检测超声心动图发现, 与 MI/R+V 组相比, 褪黑素处理可显著提高左心室射血分数 (LVEF) 和左心室缩短分数 (LVFS), 提示褪黑素治疗可改善心肌缺血/再灌注后心脏功能 (图 2-1)。缺血再灌注 6 小时后, 与 MI/R+V 组相比, 褪黑素处理也显著降低了心肌细胞凋亡率和心肌梗死面积, 下调血浆肌酸激酶及乳酸脱氢酶水平, 提示褪黑素治疗可能通过减轻缺血再灌注心肌凋亡和梗死程度, 从而改善心脏功能 (图 2-2)。

3.2 褪黑素处理显著减轻大鼠心肌缺血/再灌注引发的氧化应激损伤

心肌缺血/再灌注引发大量自由基积累, 导致氧化应激损伤。如图 2-3A 所示, 与假手术相比, 再灌注心肌组织超氧化物含量显著增加, 而褪黑素处理可显著下调心肌超氧化物生成量。进一步研究 gp91^{phox} (一种重要的氧化应激标志蛋白, 属于 NADPH 氧化酶) 的表达发现, 褪黑素处理组可显著下调 gp91^{phox} 表达量 (图 2-3B)。此外, 褪黑素处理同样显著下调心肌组织 MDA 含量, 上调超氧化物歧化酶水平 (图 2-3C, D)。这些结果均表明褪黑素可显著减轻大鼠心肌缺血/再灌注引发的氧化应激损伤。

3.3 褪黑素治疗激活缺血心肌 SIRT1 表达，抑制凋亡信号。

为了探究缺血再灌注过程中褪黑素对 SIRT1 信号的影响，我们检测了 SIRT1 和 Ac-Foxo1 的表达。如图 2-4A 和 B 所示，与 Sham 组相比，心肌缺血/再灌注损伤可明显下调心肌 SIRT1 信号，进而增加 Ac-Foxo1 水平；与 MI/R+V 组相比，给予褪黑素处理后，心肌 SIRT1 信号被显著激活，Ac-Foxo1 水平显著下降。我们进一步研究了褪黑素对心肌抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 的表达的影响，如图 2-4C 和 D 所示，褪黑素处理可显著上调 Bcl-2 的表达降低 Bax 的表达。另外，与 MI/R+V 组相比，褪黑素处理也可显著下调 caspase-3 与激活型 caspase-3 的表达（图 2-4E, F）。这些结果表明，褪黑素治疗可能通过激动 SIRT1 信号，降低 Foxo1 乙酰化水平从而抑制细胞凋亡信号，保护缺血心肌。

3.4 褪黑素通过膜受体介导的途径，激动 SIRT1 信号从而发挥心肌保护作用

为了进一步探讨褪黑素是否通过激动 SIRT1 信号发挥心肌保护作用以及此过程与褪黑素膜受体的关系，我们应用褪黑素膜受体非选择性抑制剂 Luzindole (Luz) 及 SIRT1 通路抑制剂 EX527 (EX) 进行在体实验研究。

Luz 与 EX 剂量及给药方式参照以往文献报道，我们进行预实验来确定本实验所用的剂量与给药方法是否有心脏毒性。如图 2-5, 6 及 7 显示，与 Sham 组相比，Luz 或 EX 对心脏功能、心肌梗死与凋亡率、心肌酶谱（肌酸激酶，乳酸脱氢酶）以及心肌细胞凋亡通路均无显著影响，表明本实验采用的剂量对相关心肌损伤指标无显著影响。

如图 2-8 所示，与 MI/R+Mel 相比，Luzindole 和 EX527 处理逆转了褪黑素的心肌保护作用，显著降低 LVFS 和 LVEF，提示褪黑素的心脏保护作用可能是受体介导的，且 SIRT1 信号通路在其中发挥关键作用。进一步研究发现，与 MI/R+Mel 相比，Luzindole 和 EX527 处理还显著加重心肌细胞凋亡率、扩大心肌梗死面积、上调肌酸激酶和乳酸脱氢酶水平，提示褪黑素的抗心肌缺血/再灌注引起的凋亡和坏死作用也与 SIRT1 的信号密切相关，并且是受体介导的（图 2-9）。

3.5 褪黑素通过膜受体介导的途径，激动 SIRT1 信号从而发挥抗氧化应激、抗凋亡的心肌保护作用。

如图 2-10 所示，褪黑素降低超氧化物生成量、下调 GP91^{phox} 表达量、下调心肌组织丙二醛含量及上调超氧化物歧化酶的作用也可被 Luzindole 和 EX527 处理所抑制，提示 SIRT1 与褪黑素膜受体同样参与褪黑素的抗氧化应激作用。那么褪黑素对 SIRT1 的调控是否是通过其受体起的作用呢？如图 2-11B 和 C 所示，Luz 处理可显著下调褪黑素对 SIRT1 信号的激动作用，进而上调缺血心肌 Ac-foxo1 含量，提示褪黑素对心肌 SIRT1 的激动作用确实是褪黑素膜受体介导的，进一步研究发现，Luzindole 和 EX527 处理均可上调心肌细胞凋亡通路标志蛋白，显著抑制褪黑素的抗凋亡心肌保护作用。以上结果均表明，褪黑素抗心肌细胞氧化应激损伤及凋亡作用是通过褪黑素膜受体依赖的 SIRT1 激动作用实现的。

4 实验讨论

通过本部分实验，我们首次证实 SIRT1 是褪黑素心肌保护作用的关键信号分子，褪黑素可通过褪黑素膜受体介导的途径激动心肌 SIRT1 信号通路，下调 Ac-Foxo1 水平，从而发挥抗心肌缺血/再灌注损伤的作用。

以往研究已证实褪黑素具有级联式的氧自由基中和作用，发挥显著地心血管系统保护作用^[111, 223]。然而，其间接的抗氧化作用机制并不明确，限制其临床应用。SIRT1 是组蛋白去乙酰化酶 III 类组的一个成员，参与多种生命活动，包括肥胖相关的代谢疾病、癌症、老化、细胞衰老、心脏老化和应力应激，朊病毒介导的神经变性，炎症及胎盘细胞存活^[148]。最重要的是，激动 SIRT1 具有潜在的心血管保护效应^[145, 183, 224]。我们前期研究也发现，姜黄素等外源性药物可通过激动 SIRT1 信号减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤，其具体机制可能与 SIRT1 调节 Foxo1 的乙酰化水平进而抑制细胞凋亡通路有关^[224]。Hsu 等首次发现，中等程度过表达 SIRT1 可通过脱乙酰化作用下调 Ac-Foxo1 从而启动内源性抗氧化酶的合成并抑制凋亡相关分子，显著减轻心肌缺血/再灌注损伤^[174]。然而，心血管系统中，SIRT1 信号与褪黑素的关系尚无研究报道。

事实上，在一些其他系统的病理模型中，有文献报道了褪黑素对 SIRT1 的调控

作用。Tajes 等发现,褪黑素可激动大鼠原代小脑神经细胞 SIRT1 信号,发挥神经保护作用^[196]。对快速老化小鼠模型(SAMP8)的研究发现,衰老显著下调 SIRT1 信号,而褪黑素可明显逆转此作用,减轻细胞凋亡^[195]。与此相反的是,在一些肿瘤细胞系的研究中,褪黑素发挥抑制 SIRT1 信号的作用从而抑制肿瘤细胞增殖。例如, Jung 及 Cheng 等发现,褪黑素可显著抑制 SIRT1 表达从而抑制前列腺癌细胞和骨肉瘤细胞增殖,提示褪黑素对 SIRT1 的调控作用具有组织差异性,同时与不同的病理条件密切相关^[197, 199]。在心肌缺血/再灌注损伤中,褪黑素对 SIRT1 的调控作用尚不清楚。在本研究中,我们发现心肌缺血 30min,再灌注 6h 后,SIRT1 表达显著下调,Ac-Foxo1 的水平显著升高,而褪黑素处理可显著逆转此作用。同时,褪黑素上调 SIRT1 表达、促进 Ac-Foxo1 脱乙酰化从而保护心肌的作用被 SIRT1 的抑制剂 EX527 显著抑制,表明 SIRT1 是褪黑素心血管保护作用的关键分子。此外,褪黑素抗氧化应激、抗凋亡的作用也被 EX527 抑制,提示褪黑素抗氧化应激的心血管保护作用也与激动 SIRT1 信号密切相关。

迄今为止,在哺乳动物中已发现两种褪黑素膜受体(MT1 和 MT2),其属于两种 G 蛋白偶联受体并在各种组织中广泛表达,其中包括视网膜、脑、肾脏、心血管系统等等^[125, 225, 226]。有研究表明,褪黑素的直接清除自由基的作用是非受体依赖的,但是其间接的抗氧化功能,可能通过受体介导的^[125, 226]。Rezzani 等发现褪黑素抗环孢菌素 A 引起的心脏毒性的作用是褪黑素膜受体介导的^[227]。而 Lochner 等发现,褪黑素膜受体的非选择性拮抗剂 Luzindole 可显著抑制褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的心肌保护作用^[228]。以上研究均提示,褪黑素的心肌保护作用与其受体密切相关,然而,褪黑素膜受体是否介导其对 SIRT1 的激动作用尚不清楚。我们发现,Luzindole 可显著下调 SIRT1 信号加重氧化应激损伤,上调凋亡信号从而加重心肌损伤,表明褪黑素激动 SIRT1 抗氧化应激损伤的作用可能是通过褪黑素膜受体介导的途径实现的,其具体机制有待于进一步研究。

总之,我们的研究结果表明,褪黑素治疗可明显减轻心肌缺血/再灌注损伤,而 SIRT1 是其心肌保护作用的关键分子;同时,褪黑素激动 SIRT1 信号抗氧化应激损伤的心血管保护作用与其膜受体密切相关,可能是通过膜受体依赖的途径实现的。

第二部分 SIRT1 信号通路介导褪黑素抗糖尿病状态下心肌缺血/再灌注损伤作用及机制研究

1 实验材料

1.1 仪器设备

大鼠心肌缺血/再灌注手术器械	上海医疗手术器械厂
小动物手术台	美国 Harvard Appraatus 公司
小动物呼吸机	成都泰盟科技有限公司
外科手术缝合线	美国 ETHICON 公司
医用玻璃皿	南通海伦生物公司
动物剃毛器	上海玉研科学仪器有限公司
RM6240B 型多道生理信号处理系统	成都泰盟科技有限公司
医用超声耦合剂	山东九尔生物有限公司
小动物超声仪器及分析系统	加拿大 Visual Sonics 公司
单道可调量程移液器	德国 Eppendorf 公司
血糖仪	长沙三诺科技公司
涡旋震荡器	德国 Wiggins 公司
组织匀浆机	美国 Pro Scientific 公司
台式通用摇床	江苏其林贝尔公司
恒温磁力搅拌器	上海科升仪器有限公司
电子精密天平	瑞士 Mettler Toledo 公司
低温离心机	湖南湘仪公司
恒温水浴箱	陕西欧凯科技有限公司
雪花制冰机	无锡沃信

纯水/超纯水一体化系统	美国 Merck Millipore 公司
凝胶电泳仪	美国 Bio-Rad 公司
蛋白凝胶电泳玻璃板	美国 Bio-Rad 公司
凝胶成像分析系统	美国 Bio-Rad 公司
多功能酶标仪 SpectraMax M5	美国 Molecular Devices 公司
双目荧光显微镜	日本奥林巴斯公司
共聚焦显微镜	日本奥林巴斯公司
细胞培养板	美国 Corning 公司
细胞培养超净台	无锡易纯净化设备公司
细胞培养箱	美国 Thermo 公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯公司

1.2 实验动物及细胞系

- 1) 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠，体质量 220-250g，采购于第四军医大学动物实验中心。
- 2) H9c2 细胞系购于上海天成生物科技有限公司。

1.3 实验试剂

褪黑素	美国 Sigma-Aldrich 公司
链脲佐菌素	美国 Sigma-Aldrich 公司
戊巴比妥钠	北京索莱宝有限公司
异氟烷	上海玉研科学仪器公司
伊文氏蓝	北京索莱宝有限公司
肌酸激酶试剂盒	南京建成生物公司
2,3,5—氯化三苯基四氮唑	北京索莱宝有限公司
乳酸脱氢酶试剂盒	南京建成生物公司
Luzindole (褪黑素膜受体拮抗剂)	美国 Santa Cruz 公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Sigma-Aldrich 公司

棕榈酸钠	北京索莱宝公司
DMEM 细胞培养液	美国 Hyclone 公司
胎牛血清	杭州四季青公司
胰蛋白酶	上海碧云天公司
SIRT1 siRNA 及转染试剂盒	美国 Santa Cruz 公司
Sirtinol	美国 Santa Cruz 公司
TUNEL 试剂盒	德国罗氏公司
DAPI	美国 Sigma-Aldrich 公司
MTT	上海阿拉丁公司
GP91 ^{phox} 抗体	美国 Santa Cruz 公司
SIRT1 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Ac-foxo1 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Bcl-2 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Bax 抗体	美国 Santa Cruz 公司
caspase-3 抗体	美国 Santa Cruz 公司
p-PERK 抗体	美国 Santa Cruz 公司
PERK 抗体	美国 Santa Cruz 公司
p-eIF2a 抗体	美国 Santa Cruz 公司
eIF2a 抗体	美国 Santa Cruz 公司
ATF4 抗体	美国 Santa Cruz 公司
CHOP 抗体	美国 Santa Cruz 公司
β -actin 抗体	美国 Santa Cruz 公司
HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
HRP 标记的兔抗羊 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
RIPA 裂解液	上海碧云天公司
蛋白酶抑制剂	德国罗氏公司
BCA 蛋白定量试剂盒	美国 Merck Millipore 公司
Tris 碱	西安国安生物公司

Tween-20	北京索莱宝有限公司
甘氨酸	西安国安生物公司
SDS-PAGE 凝胶试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜	美国 Merck Millipore 公司
蛋白上样缓冲液	上海碧云天公司
蛋白预染 Marker	美国 Merck Millipore 公司
ECL 发光液	美国 Merck Millipore 公司

2 实验方法

2.1 实验分组

2.1.1 糖尿病对心肌 SIRT1 信号通路的影响的研究

正常对照大鼠随机分为 2 组，2 型糖尿病大鼠随机分为 2 组：

- 1) Con+Sham: 正常饮食大鼠行心肌缺血/再灌注手术，心肌穿线但是不做结扎，作为假手术组。
- 2) Con+MI/R: 正常饮食大鼠行心肌缺血/再灌注手术。
- 3) DM+Sham: 2 型糖尿病大鼠行心肌缺血/再灌注手术，心肌穿线但是不做结扎，作为糖尿病假手术组。
- 4) DM+MI/R: 2 型糖尿病大鼠行心肌缺血/再灌注手术。

对数期生长的 H9c2 细胞系随机分为 4 组：

- 1) Con: 含 10% 的胎牛血清的低糖 DMEM (5.5 mmol/L) 培养基常规培养 H9c2 细胞系。
- 2) Con+SIR: 含 10% 的胎牛血清的低糖 DMEM (5.5 mmol/L) 培养基常规培养 H9c2 细胞系，行模拟心肌缺血/再灌注处理。
- 3) HG/HF: 含 0.5 mmol/L 棕榈酸钠的高糖培养基 (25 mmol/L) 培养 H9c2 细胞系 18h 体外模拟 2 型糖尿病高糖高脂损伤。
- 4) HG/HF+SIR: 含 0.5 mmol/L 棕榈酸钠的高糖培养基 (25 mmol/L) 培养 H9c2 细胞系 18h 体外模拟 2 型糖尿病高糖高脂损伤后，行模拟心肌缺血/再灌注处理。

2.1.2 褪黑素通过 SIRT1 通路抗糖尿病心肌缺血/再灌注损伤的作用和机制研究

2 型糖尿病大鼠随机分为 5 组：

- 1) DM+Sham: 2 型糖尿病大鼠行心肌缺血/再灌注手术, 心肌穿线但是不做结扎, 作为假手术组。
- 2) DM+MI/R: 2 型糖尿病大鼠行心肌缺血/再灌注手术。
- 3) DM+MI/R+Mel: 2 型糖尿病大鼠每天褪黑素 (20 mg/kg) 灌胃 1 周后行心肌缺血/再灌注手术。
- 4) DM+MI/R+Mel+Sirtinol: 2 型糖尿病大鼠每天褪黑素 (20 mg/kg) 灌胃 1 周后, 行心肌缺血/再灌注手术, 再灌注前 15min 腹腔注射 Sirtinol (15 mg/kg)。
- 5) DM+MI/R+Sirtinol: 2 型糖尿病大鼠行心肌缺血/再灌注手术, 再灌注前 15min 腹腔注射 Sirtinol (15 mg/kg)。

对数期生长的 H9c2 细胞系随机分为 5 组：

- 1) HG/HF: 含 0.5 mmol/L 棕榈酸钠的高糖培养基 (25 mmol/L) 培养 H9c2 细胞系 18h 体外模拟 2 型糖尿病高糖高脂损伤。
- 2) HG/HF+SIR: 含 0.5 mmol/L 棕榈酸钠的高糖培养基 (25 mmol/L) 培养 H9c2 细胞系 18h 体外模拟 2 型糖尿病高糖高脂损伤后, 行模拟心肌缺血/再灌注处理。
- 3) HG/HF+SIR+Mel: 含 0.5 mmol/L 棕榈酸钠、含褪黑素 (100 μ mol/L) 的高糖培养基 (25 mmol/L) 培养 18h, 最后行模拟心肌缺血/再灌注处理。
- 4) HG/HF+SIR+Mel+SIRT1 siRNA: SIRT1 siRNA 干扰处理后, 含 0.5 mmol/L 棕榈酸钠、含褪黑素 (100 μ mol/L) 的高糖培养基 (25 mmol/L) 培养 18h, 最后行模拟心肌缺血/再灌注处理。
- 5) HG/HF+SIR+SIRT1 siRNA: SIRT1 siRNA 干扰处理后, 含 0.5 mmol/L 棕榈酸钠的高糖培养基 (25 mmol/L) 培养 18h, 最后行模拟心肌缺血/再灌注处理。

2.2 2 型糖尿病大鼠模型的建立

- 1) 糖尿病高脂高糖饲料由第四军医大学动物实验中心制备, 其中总热量含 40%脂肪, 41%碳水化合物, 18%蛋白质。
- 2) 高脂高糖饲料喂养大鼠 4 周后, 配制 STZ 溶液。

A 液：柠檬酸 2.1g 溶于 100ml 水中；

B 液：柠檬酸钠 2.94g 溶于 100ml 水中；

1:1 混合 A 与 B 成柠檬酸缓冲液，使 pH 在 4.2-4.5 之间，STZ 溶解于柠檬酸缓冲液避光保存，现用现配。

4) 大鼠禁食不禁水 12 小时后腹腔注射 1 次链脲佐菌素 (STZ, 35 mg/kg)，注射后继续高脂高糖饮食 1 周，1 周后禁食 12h，鼠尾取血检测血糖水平。空腹血糖大于或等于 11.1 mmol/L 为 2 型糖尿病构建成功。

2.3 大鼠心肌缺血/再灌注手术操作

- 1) 用清洁生理盐水配制浓度为 1% 的戊巴比妥钠溶液，避光 4°C 保存备用。
- 2) 按照 50 mg/kg 剂量给予大鼠腹腔注射戊巴比妥钠溶液。
- 3) 静止观察 10 分钟，用轻捏鼠尾巴方法判断麻醉成功后。
- 4) 给大鼠颈部及胸部胸骨至左腋下剃毛。
- 5) 将大鼠腹部向上固定于动物实验台，处于舒适体位。给予脱毛区域 75% 酒精消毒 3 次。
- 6) 颈部正中开 1cm 长切口，钝性分离筋膜及肌肉，显露气管。用眼科剪在气管处做横切口后将橡胶插管插入，连接成都泰盟动物呼吸机。参数调至大鼠预设值，频率 60 次/分左右，潮气量 10 ml/kg 左右，呼吸比设置为 1:2。
- 7) 在左侧胸部纵向切口，钝性分离胸部肌肉及筋膜，在三四肋间沿肋间隙方向做 0.5cm 长度的切口。
- 8) 用特制的小动物胸腔撑开器打开胸腔，显露心脏。
- 9) 避免伤及肺部，刺穿心包膜，确定左心耳位置，在左心耳下缘 2mm 处以 6-0 无创外科线穿入心肌组织，在结扎冠脉前降支前线结内穿过一小段消毒的橡胶管，以避免线结伤及心肌肌肉组织。
- 10) 以系紧线结后心前区组织变白为标志，开始计时，缺血开始。30min 后松开线结，再灌开始。

2.4 大鼠超声心动图检测

- 1) 每组随机分配 8 只动物，心肌缺血/再灌注 72 小时后，用小动物超声仪 (Vevo770) 检测心脏功能。
- 2) 大鼠胸部剃毛后采用异氟烷吸入麻醉，然后固定于超声仪操作台上。
- 3) 等待数分钟后大鼠心率呼吸恢复平稳后，将超声耦合剂在心前区涂抹均匀，测定二维超声心动图。
- 4) 用仪器自带软件计算大鼠左室缩短分数 (LVFS) 及左室射血分数 (LVEF)。

2.5 Evan's blue/TTC 染色

- 1) 每组随机分配 8 只动物，心肌缺血/再灌注 6 小时后，立刻剪取心脏。
- 2) 用清洁生理盐水清洗心脏后重新结扎冠脉左前降支，向主动脉逆灌 1ml 浓度为 1% 的 Evan's blue 染液，漂洗心脏后立刻冻入 -80°C 冰箱。
- 3) 20min 将冻硬的心脏取出，用手术刀片垂直于心脏长轴将心脏切片成为 1mm 厚度的切片。
- 4) 用生理盐水稍作漂洗后，立刻浸入已配好的 2% 的 TTC 溶液中，37°C 水浴 30min。
- 5) 多聚甲醛固定 6h 后，取出拍照。
- 6) 将数码照片用 ImageJ 软件分析，其中白色区域为梗死区 (infarct area)，红色区域为心肌缺血但是未梗死区，蓝色区域为未缺血区。白色区域和红色区域合并为相对危险区 (area at risk)。心肌梗死程度以梗死区面积/危险区面积表示。

2.6 心肌超氧化物生成量测定

- 1) 每组随机分配 8 只动物，心肌缺血/再灌注 6 小时后，迅速取大鼠缺血区心肌组织 0.1g。
- 2) 严格按照南京建成生物公司的说明书进行心肌组织心肌超氧化物生成量测定。

2.7 心肌组织丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性检测

- 1) 每组随机分配 8 只动物，心肌缺血/再灌注 6 小时后，迅速取大鼠缺血区心肌组织

0.1g。

2) 严格按照南京建成生物公司的说明书进行心肌组织丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性测定。

2.8 TUNEL 法检测凋亡率

2.8.1 心肌组织

- 1) 每组随机分配 8 个样本, 心肌缺血/再灌注 6 小时后, 迅速取大鼠缺血区心肌组织。
- 2) 将心肌组织置于多聚甲醛固定 72h 后, 脱水石蜡包埋备用。
- 3) 在石蜡切片机上将组织蜡块切成 3 μ m 厚的切片, 小心置于 50 $^{\circ}$ C 清水水面摊片, 然后以载玻片捞取组织切片进行烤片操作 3h, 备用。
- 4) 常规脱蜡操作之后将载玻片置于水平湿盒中, 加入蛋白酶 K 打孔, 37 $^{\circ}$ C 打孔 1h 后用 PBS 小心摇洗 3 次。
- 5) 按照罗氏 TUNEL 试剂盒说明书混合 A 液与 B 液, 避光条件下滴在组织切片上, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 2h。
- 6) 取出切片用 PBS 小心避光摇洗 3 次后, 再加入 1:1000 配制的 DAPI 试剂, 常温反应 15min 后用 PBS 小心摇洗 3 次。
- 7) 配制 50%的甘油 PBS 溶液滴于载玻片, 用盖玻片进行封片处理。
- 8) 在共聚焦显微镜下观察心肌组织切片, 其中绿色荧光标记凋亡细胞的细胞核, 蓝色荧光标记组织切片全部细胞的细胞核。采集荧光照片, 以绿色数量/蓝色数量为心肌组织凋亡率, 进行统计分析。

2.8.2 心肌细胞

- 1) 细胞爬片处理结束后, 移走原有培养液, 用 PBS 液漂洗 1 遍, 加入 4%多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 30min, 移走多聚甲醛, 用 PBS 液漂洗 1 遍, 4 $^{\circ}$ C 存放备用。
- 2) 准备载玻片滴一滴中性树胶, 将盖玻片背面贴于载玻片上置于湿盒内固定 24h, 并做标记。
- 3) 配制 0.1%浓度的 Triton X-100 破膜液, 滴加于爬片上, 放回湿盒, 37 $^{\circ}$ C 破膜 5-10min,

然后用 PBS 漂洗 3 次（每次 5min）。

4) 按照罗氏 TUNEL 试剂盒说明书混合 A 液与 B 液，避光条件下滴在细胞爬片上，37°C 恒温水浴 1h。

5) 其余步骤同上述。

2.9 H9c2 高糖高脂处理

1) 将 0.028g 棕榈酸钠溶解于 5ml 90°C PBS 中，然后将该溶液溶解于等体积的 20%BSA 溶液中，震荡使二者混合均匀，得到 10 mM 棕榈酸钠溶液。

2) 0.22 μ m 滤膜过滤该溶液后分装于-20°C 保存，2 周之内使用。

3) 高糖 DMEM（25 mmol/L）与棕榈酸钠溶液 20:1 配制成 0.5mmol/L 高糖高脂培养基，体外高糖高脂培养液培养 H9c2 18h 模拟 2 型糖尿病高脂高糖损伤。

2.10 H9c2 细胞系模拟心肌缺血/再灌注损伤处理

1) 经典体外模拟缺血液配方：4 mM HEPES，0.9 mM CaCl₂·2H₂O，0.49 mM MgCl₂，137 mM NaCl，12 mM KCl，10 mM 脱氧葡萄糖，0.75 mM Na₂SO₃，20 mM C₃H₅O₃Na，调节 pH 至 6.5。

2) 模拟缺血时将细胞用 PBS 漂洗三遍，加入模拟缺血液，最后将培养体系整体置于含 95%N₂ 和 5%CO₂ 的无菌环境，37°C 缺血 2h。

3) 体外模拟再灌注时，吸走细胞模拟缺血液，用 PBS 漂洗三遍，换为正常培养基，最后将培养体系整体置于含 21% O₂，5% CO₂ 的 37°C 常规的孵箱环境，时间为 4h。

2.11 小干扰 RNA 处理

SIRT1 siRNA 与转染试剂盒均购于美国 Santa Cruz 公司，H9c2 接种于 6 孔细胞培养板，其中转染 A 液与 B 液严格按照说明书配制。A 液：20 μ l SIRT1 siRNA 溶于 400 μ l 转染培养液中，混匀；B 液：20 μ l 转染试剂溶于 400 μ l 转染培养液中，混匀。A 液 B 液混匀后室温静置 30min 后可加入 6 孔板的一个细胞孔，6 小时后再加入含 20%FBS 的普通培养基，继续培养 18h 更换为正常培养基，进一步实验。

2.12 细胞活力检测

- 1) 将 H9c2 细胞传代至 96 孔细胞培养板，待细胞处理结束，用 PBS 漂洗一遍，每孔加入 10 μ l 的 0.5% 的 MTT 溶液及 100 μ l 的 DMEM 培养液。
- 2) 将体系置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 4h，移走培养液，每孔加入 100 μ l 的二甲基亚砷，震荡混匀 20min 后，调整酶标仪至 490nm，测定每孔吸光度。

2.13 Western blot 检测蛋白表达

- 1) 每组随机分配 8 个样本，心肌缺血/再灌注 6 小时后（细胞处理结束后），迅速冻存样本。
- 2) 用 RIPA buffer 裂解样本，经过离心、定量、加上样缓冲液、煮沸等操作后，得到上样样本。将上样样本置于 -80 $^{\circ}$ C 环境保存，备用。
- 3) 按照北京索莱宝公司 Western blot 配胶试剂盒说明书配制 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶。
- 4) 每个泳道上样体积及蛋白总量一致（20-50 μ g），上层浓缩胶以 80V 电压、下层分离胶以 120V 电压进行蛋白电泳操作。
- 5) 小心将玻璃板上的凝胶取下，置于转膜液中。按照从上至下：三层滤纸-凝胶-PVDF 膜-三层滤纸安放好后，用转膜专用夹夹紧，然后置于转膜槽中，以 90V 的电压转膜 50min。PVDF 膜使用前用甲醇浸泡激活 10min。
- 6) 用 TBST 溶液配制脱脂奶粉，最终浓度为 5%。转膜结束后室温封闭 PVDF 膜 3h。
- 7) 按照分子量将 PVDF 膜裁切整齐，分别加对应一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育 12h，一抗配制严格按照抗体说明书方法进行。
- 8) 应用 TBST 摇洗 3 次（每次 5min）后，孵育对应的二抗，室温 2h，二抗配制严格按照抗体说明书方法进行。
- 9) 再次应用 TBST 摇洗 3 次（每次 5min）后，滴加 ECL 发光液，用凝胶成像分析系统进行成像操作，并用配套软件（ImageLab）进行分析。

2.14 统计分析

以上实验数据经过相应软件转换、分析之后，应用 GraphPad Prism (V5.01) 进行统计处理，结果均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SEM) 表示。用 t 检验进行两组之间的比较，用单因素方差分析辅以 t 检验方法进行多组之间的比较，若 $P < 0.05$ 则认为两组具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 2 型糖尿病加重心肌缺血/再灌注损伤

高脂-STZ 诱导处理的大鼠空腹血糖高于 11.1mmol/L 认为糖尿病造模成功。如图 2-12A, B 所示，糖尿病大鼠口服糖耐量和腹腔糖耐量显著受损，进一步提示糖尿病建模成功。如图 2-12C-E 所示，糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注 72h 后，心功能较正常大鼠再灌注 72h 明显下降，提示糖尿病情况下，心肌缺血/再灌注后心功能恢复不良。如图 2-12F-I 所示，糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注 6h 后，心肌梗死面积和调亡率能较正常大鼠再灌注 6h 明显上升，提示糖尿病情况下，心肌缺血/再灌注后心肌梗死与调亡情况也明显加重。

3.2 2 型糖尿病心肌 SIRT1 信号受损，氧化应激与内质网应激加重

研究糖尿病大鼠氧化应激指标显示，与再灌注 4h 的正常大鼠相比，糖尿病大鼠心肌超氧化物生成量、gp91^{phox} 表达量及丙二醛释放量明显上升，而超氧化物歧化酶明显下降，提示糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注后心肌氧化应激水平显著上升 (2-13A-D)。研究糖尿病大鼠 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激心肌调亡通路显示，与再灌注 4h 的正常大鼠相比，糖尿病大鼠心肌 PERK、eIF2 α 磷酸化水平明显上升，ATF4 与 CHOP 表达量明显上调，提示糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注后心肌内质网应激调亡通路显著激活 (2-13E-I)。

进一步研究发现，与正常大鼠假手术组相比，糖尿病假手术组心肌 SIRT1 信号显著下调，Ac-Foxo1 表达显著升高，而经过缺血再灌注手术损伤后，SIRT1 表达量更低造成 Ac-Foxo1 进一步上调，提示糖尿病心肌 SIRT1 信号受损，可能是缺血再灌

注损伤加重的重要因素(图 2-14B-C)。如图 2-14D-F 所示,与再灌注 4h 的正常大鼠相比,糖尿病大鼠心肌凋亡明显加重,进一步提示糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注后心肌凋亡水平明显上升。

我们又进行了体外细胞实验进一步验证在体动物实验结果。研究发现,与模拟心肌缺血/再灌注 4h 的正常 H9c2 细胞相比,高糖高脂处理的细胞凋亡与氧化应激水平明显加重(图 2-15),SIRT1 信号受损,而 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激心肌凋亡通路被明显上调,提示高糖高脂模拟的 2 型糖尿病损伤可在体外条件下使 SIRT1 信号通路受损,并且加重细胞氧化应激与内质网应激水平,造成凋亡加重(2-16)。

3.3 褪黑素减轻糖尿病心肌缺血/再灌注损伤

如图 2-17A-C 所示,糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注 72h 后,褪黑素治疗组显著改善心功能指标,而这种作用被 SIRT1 抑制剂 Sirtinol 所抑制,进一步研究发现,糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注 6h 后,褪黑素治疗组可显著减轻心肌凋亡率与梗死面积,而这种作用也被 Sirtinol 所抑制(2-17D-G),提示糖尿病情况下,褪黑素可有效减轻心肌缺血/再灌注损伤,减轻梗死从而保护心功能,SIRT1 信号可能参与此过程。

3.4 褪黑素减轻糖尿病心肌缺血/再灌注损伤氧化应激与内质网应激水平

我们进一步研究了褪黑素对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤氧化应激与内质网应激的影响,如图 2-18A-D 所示,与缺血再灌注组相比,褪黑素治疗组糖尿病大鼠心肌超氧化物生成量、gp91^{phox} 表达量及丙二醛释放量明显下降,而超氧化物歧化酶明显升高,而这种作用也被 Sirtinol 所抑制,提示褪黑素可有效减轻糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注后心肌氧化应激水平,而 SIRT1 通路同样发挥重要作用。进一步研究糖尿病大鼠 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激心肌凋亡通路显示,与缺血再灌注组相比,褪黑素治疗组糖尿病大鼠心肌 PERK、eIF2 α 磷酸化水平明显下降,ATF4 与 CHOP 表达量明显降低,而以上保护效果也被 Sirtinol 所抑制,提示褪黑素可抑制糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注后心肌内质网应激凋亡通路,而 SIRT1 通路可能介导褪黑素的保护作用(2-18E-I)。

进一步研究发现,与缺血再灌注组相比,褪黑素治疗可显著上调 SIRT1 表达,

下调 Ac-Foxo1 水平，抑制心肌凋亡通路，而这种作用也被 Sirtinol 所抑制。提示糖尿病心肌 SIRT1 信号受损，而褪黑素治疗可明显激动 SIRT1 信号，发挥心肌保护作用（图 19）。

我们又在体外实验中进一步验证，如图 2-20A 所示，给予 H9c2 不同浓度梯度褪黑素处理后，均对高糖高脂刺激的 H9c2 发挥了一定的保护作用，我们筛选 100 μ mol/L 的褪黑素浓度作为细胞实验的褪黑素浓度，如图 2-20B-I 所示，与模拟心肌缺血/再灌注 4h 的 H9c2 细胞相比，褪黑素处理的细胞凋亡与氧化应激水平明显下调，而 SIRT1 的抑制剂同样抑制此保护作用。研究细胞 SIRT1 信号及内质网应激水平显示，H9c2 细胞 SIRT1 通路被褪黑素显著激活（图 2-21A-C），而 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激心肌凋亡通路被明显下调，褪黑素以上作用均被 SIRT1 siRNA 抑制（图 2-21D-G）。以上结果表明，糖尿病情况下心肌 SIRT1 信号受损，导致氧化应激与内质网应激加重，心肌凋亡通路被激活，而褪黑素可通过激动 SIRT1 信号减轻糖尿病心肌缺血/再灌注损伤，保护心功能。

4 实验讨论

本研究首次证实在糖尿病情况下，心肌 SIRT1 信号通路受损可能是糖尿病心肌缺血易损性的重要机制，而褪黑素可有效地激动 SIRT1 信号，脱乙酰化 Ac-Foxo1 进而减轻氧化应激和内质网应激，减轻心肌缺血/再灌注损伤，褪黑素可能是 2 型糖尿病的状态下抗心肌缺血/再灌注损伤的新策略。

冠心病是 2 型糖尿病最主要的致死疾病，2 型糖尿病罹患冠心病的危险度比正常个体高 2-5 倍，而其预后明显更差^[53-55]。氧化应激损伤是糖尿病缺血心肌易损性增加的重要机制，事实上，高血糖、胰岛素抵抗都是糖尿病情况下氧化应激加重原因^[53, 55]，我们前期证实，氧化应激又可以加重内质网应激，进一步加重缺血损伤^[229]。本实验中，我们采用高脂饮食-STZ 诱导的 2 型糖尿病大鼠模型发现，与非糖尿病心肌缺血损伤组相比，糖尿病损伤组氧化应激及内质网应激水平均显著加重，提示氧化应激与内质网应激参与加重糖尿病缺血心肌损伤。

褪黑素已被证实是一种高效的自由基清除剂，其抗氧化的心血管保护作用越来越受到关注。通过第一部分的实验，我们证实褪黑素可激动非糖尿病动物心肌 SIRT1

信号，发挥显著地抗缺血再灌注损伤作用。然而，其在 2 型糖尿病情况下对心肌缺血/再灌注的影响及其机制尚不明确。我们在本研究中首次发现，褪黑素治疗同样可减轻糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注引起的氧化应激与内质网应激水平，发挥明显的心肌保护作用。而研究其机制发现，2 型糖尿病大鼠心肌 SIRT1 信号显著下调，而褪黑素治疗可激动 SIRT1 信号，同时，使用 Sirtinol 在抑制 SIRT1 的同时，也显著抑制了褪黑素抗氧化应激与内质网应激的心肌保护作用，提示 SIRT1 信号也是糖尿病情况下褪黑素的心肌保护作用的关键信号通路。

本实验表明，褪黑素补充治疗可能是 2 型糖尿病状态下抗心肌缺血/再灌注损伤的新的治疗策略。值得注意的是，Peschke 等发现，在 Goto Kakizaki 大鼠（2 型糖尿病大鼠）及 2 型糖尿病患者中，夜晚褪黑素分泌均较正常对照组明显降低，他们进一步发现大鼠松果体腺体中褪黑素合成的关键限速酶芳烷基-N-乙酰转移酶（arylalkylamine-N-acetyltransferase, AANAT）活性显著下降，并提出这可能是褪黑素分泌量下降的主要原因^[230]。同时，McMullan 等在 JAMA 报道，在长期睡眠不规律的人群中，褪黑素水平下降与糖尿病发病率上升密切相关^[231, 232]。由于褪黑素对许多器官均发挥抗氧化的保护作用，血浆褪黑素水平降低很可能是诱发糖尿病晚期多器官并发症的重要因素。而糖尿病情况下褪黑素水平减低很有可能是心肌 SIRT1 信号受损进而加重缺血损伤的关键因素，而糖尿病情况下外源补充褪黑素可能是预防并减轻心肌缺血损伤的新策略，本课题组将继续进行基础及临床实验，进一步明确褪黑素抗糖尿病心肌缺血/再灌注损伤的机制，探讨其是否可以应用于临床糖尿病相关并发症的防治。

总之，我们通过^{在体和离体的研究}发现，2 型糖尿病情况下 SIRT1 信号受损是心肌易损性增加的重要原因，而在此情况下，外源性补充褪黑素可通过激动 SIRT1 信号从而下调氧化应激与内质网应激水平，显著减轻心肌缺血/再灌注损伤。本研究为糖尿病情况下应用褪黑素治疗心肌缺血/再灌注损伤提供了理论和实验依据，褪黑素补充治疗可能是抗糖尿病心肌缺血/再灌注损伤的新策略。

第三部分 Notch1/Hes1 信号通路介导褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤作用及机制研究

1 实验材料

1.1 仪器设备

大鼠心肌缺血/再灌注手术器械	上海医疗手术器械厂
小动物手术台	美国 Harvard Appraatus 公司
小动物呼吸机	成都泰盟科技有限公司
外科手术缝合线	美国 ETHICON 公司
医用玻璃皿	南通海伦生物公司
动物剃毛器	上海玉研科学仪器有限公司
RM6240B 型多道生理信号处理系统	成都泰盟科技有限公司
医用超声耦合剂	山东九尔生物有限公司
小动物超声仪器及分析系统	加拿大 Visual Sonics 公司
单道可调量程移液器	德国 Eppendorf 公司
血糖仪	长沙三诺科技公司
涡旋震荡器	德国 Wiggins 公司
组织匀浆机	美国 Pro Scientific 公司
台式通用摇床	江苏其林贝尔公司
恒温磁力搅拌器	上海科升仪器有限公司
电子精密天平	瑞士 Mettler Toledo 公司
低温离心机	湖南湘仪公司
恒温水浴箱	陕西欧凯科技有限公司
雪花制冰机	无锡沃信
纯水/超纯水一体化系统	美国 Merck Millipore 公司
凝胶电泳仪	美国 Bio-Rad 公司

蛋白凝胶电泳玻璃板	美国 Bio-Rad 公司
凝胶成像分析系统	美国 Bio-Rad 公司
多功能酶标仪 SpectraMax M5	美国 Molecular Devices 公司
双目荧光显微镜	日本奥林巴斯公司
共聚焦显微镜	日本奥林巴斯公司
细胞培养板	美国 Corning 公司
细胞培养超净台	无锡易纯净化设备公司
细胞培养箱	美国 Thermo 公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯公司

1.2 实验动物及细胞系

1) 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体质量 220-250g, 采购于实验动物由第四军医大学动物实验中心。

2) H9c2 细胞系购于上海天成生物科技有限公司。

1.3 实验试剂

褪黑素	美国 Sigma-Aldrich 公司
戊巴比妥钠	北京索莱宝有限公司
异氟烷	上海玉研科学仪器公司
伊文氏蓝	北京索莱宝有限公司
2,3,5—氯化三苯基四氮唑	北京索莱宝有限公司
Luzindole (褪黑素膜受体拮抗剂)	美国 Santa Cruz 公司
DAPT (Notch1 抑制剂)	美国 Santa Cruz 公司
二甲基亚砷 (DMSO)	美国 Sigma-Aldrich 公司
DMEM 细胞培养液	美国 Hyclone 公司
胎牛血清	杭州四季青公司
胰蛋白酶	上海碧云天公司
Notch1 siRNA 及转染试剂盒	美国 Santa Cruz 公司

Hes1 siRNA 及转染试剂盒	美国 Santa Cruz 公司
Sirtinol	美国 Santa Cruz 公司
TUNEL 试剂盒	德国罗氏公司
DAPI	美国 Sigma-Aldrich 公司
MTT	上海阿拉丁公司
GP91 ^{phox} 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Notch1 抗体	美国 Santa Cruz 公司
NICD 抗体	英国 Abcam 公司
Hes1 抗体	美国 Santa Cruz 公司
PTEN 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Akt 抗体	美国 Santa Cruz 公司
p-Akt 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Bcl-2 抗体	美国 Santa Cruz 公司
Bax 抗体	美国 Santa Cruz 公司
caspase-3 抗体	美国 Santa Cruz 公司
β -actin 抗体	美国 Santa Cruz 公司
α -actin 抗体	英国 Abcam 公司
HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
HRP 标记的兔抗羊 IgG 二抗	北京中杉金桥公司
RIPA 裂解液	上海碧云天公司
蛋白酶抑制剂	德国罗氏公司
BCA 蛋白定量试剂盒	美国 Merck Millipore 公司
Tris 碱	西安国安生物公司
Tween-20	北京索莱宝有限公司
甘氨酸	西安国安生物公司
SDS-PAGE 凝胶试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜	美国 Merck Millipore 公司
蛋白上样缓冲液	上海碧云天公司

蛋白预染 Marker	美国 Merck Millipore 公司
ECL 发光液	美国 Merck Millipore 公司
Cy3 标记的羊抗兔 IgG 二抗	武汉博士德生物公司
FITC 标记的驴抗羊 IgG 二抗	北京康为生物科技公司
Texas Red 标记的驴抗兔 IgG 二抗	美国 Abbkine 公司

2 实验方法

2.1 实验分组

2.1.1 动物分组

2.1.1.1 探讨实验剂量的 DAPT 与 Luz 对假手术组心脏功能、凋亡率和心肌梗死面积的影响

将实验大鼠随机分为 3 组：

- 1) Sham 假手术组：大鼠行心肌缺血/再灌注手术，心肌穿线但是不做结扎，作为假手术组。
- 2) Sham+DAPT 组：大鼠行心肌缺血/再灌注手术，心肌穿线但是不做结扎，10min 后腹腔给予 DAPT (50 mg/kg) 注射 1 次。
- 3) Sham+Luz 组：大鼠行心肌缺血/再灌注手术，心肌穿线但是不做结扎，10min 后腹腔给予 Luz (5 mg/kg) 注射 1 次，手术前三天每天给予 Luz (2 mg/kg) 腹腔注射。

2.1.1.2 探讨 DAPT 与 Luz 对褪黑素抗缺血再灌注损伤作用的影响及可能的机制

将实验大鼠随机分为 5 组：

- 1) Sham 假手术组：大鼠行心肌缺血/再灌注手术，心肌穿线但是不做结扎，作为假手术组。
- 2) MI/R+V 组：大鼠给予对应剂量的 DAPT 或 Luz 的溶剂处理，然后行常规心肌缺血/再灌注手术。
- 3) MI/R+Mel 组：每天褪黑素 (10 mg/kg) 灌胃 4 周后行心肌缺血/再灌注手术。
- 4) MI/R+Mel+DAPT 组：大鼠给予褪黑素及 DAPT 剂量和方式同上。
- 5) MI/R+Mel+Luz 组：大鼠给予褪黑素及 Luz 剂量和方式同上。

2.1.2 细胞分组

H9c2 细胞系分为 8 组

- 1) Con 组: 含 10%的胎牛血清的低糖 DMEM (5.5 mmol/L) 培养基常规培养 H9c2 细胞系。
- 2) SIR 组: DMEM 培养基常规培养 H9c2 细胞系 28h 后行模拟心肌缺血/再灌注处理 (缺血 2h, 再灌注 4h)。
- 3) SIR+Mel 组: DMEM 培养基常规培养 H9c2 细胞系 24h 后, 褪黑素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 4h 后行模拟心肌缺血/再灌注处理 (缺血 2h, 再灌注 4h)。
- 4) SIR+Mel+Luz 组: DMEM 培养基常规培养 H9c2 细胞系 24h 后, 褪黑素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 与 Luz (10 $\mu\text{mol/L}$) 共同处理 4h 后行模拟心肌缺血/再灌注处理 (缺血 2h, 再灌注 4h)。
- 5) SIR+Mel+Notch1 siRNA 组: H9c2 细胞首先进行 Notch1 siRNA 干扰处理, 然后褪黑素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 4h, 最后行模拟心肌缺血/再灌注处理 (缺血 2h, 再灌注 4h)。
- 6) SIR+Mel+Hes1 siRNA 组: H9c2 细胞首先进行 Hes1 siRNA 干扰处理, 然后褪黑素 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 4h, 最后行模拟心肌缺血/再灌注处理 (缺血 2h, 再灌注 4h)。
- 7) SIR+Notch1 siRNA 组: H9c2 细胞首先进行 Notch1 siRNA 干扰处理, 然后普通 DMEM 处理 4h, 最后行模拟心肌缺血/再灌注处理 (缺血 2h, 再灌注 4h)。
- 8) SIR+Hes1 siRNA 组: H9c2 细胞首先进行 Hes1 siRNA 干扰处理, 然后普通 DMEM 处理 4h, 最后行模拟心肌缺血/再灌注处理 (缺血 2h, 再灌注 4h)。

2.2 大鼠心肌缺血/再灌注手术操作

- 1) 用清洁生理盐水配制浓度为 1%的戊巴比妥钠溶液, 避光 4°C 保存备用。
- 2) 按照 50 mg/kg 剂量给予大鼠腹腔注射戊巴比妥钠溶液。
- 3) 静止观察 10 分钟, 用轻捏鼠尾巴方法判断麻醉成功后。
- 4) 给大鼠颈部及胸部胸骨至左腋下剃毛。
- 5) 将大鼠腹部向上固定于动物实验台, 处于舒适体位。给予脱毛区域 75%酒精消毒 3 次。

- 6) 颈部正中开 1cm 长切口，钝性分离筋膜及肌肉，显露气管。用眼科剪在气管处做横切口后将橡胶插管插入，连接成都泰盟动物呼吸机。参数调至大鼠预设值，频率 60 次/分左右，潮气量 10 ml/kg 左右，呼吸比设置为 1:2。
- 7) 在左侧胸部纵向切口，钝性分离胸部肌肉及筋膜，在三四肋间沿肋间隙方向做 0.5cm 长度的切口。
- 8) 用特制的小动物胸腔撑开器打开胸腔，显露心脏。
- 9) 避免伤及肺部，刺穿心包膜，确定左心耳位置，在左心耳下缘 2mm 处以 6-0 无创外科线穿入心肌组织，在结扎冠脉前降支前线结内穿过一小段消毒的橡胶管，以避免线结伤及心肌肌肉组织。
- 10) 以系紧线结后心前区组织变白为标志，开始计时，缺血开始。30min 后松开线结，再灌开始。

2.3 大鼠超声心动图检测

- 1) 每组随机分配 8 只动物，心肌缺血/再灌注 24 小时后，用小动物超声仪 (Vevo770) 检测心脏功能。
- 2) 大鼠胸部剃毛后采用异氟烷吸入麻醉，然后固定于超声仪操作台上。
- 3) 等待数分钟后大鼠心率呼吸恢复平稳后，将超声耦合剂在心前区涂抹均匀，测定二维超声心动图。
- 4) 用仪器自带软件计算大鼠左室缩短分数 (LVFS) 及左室射血分数 (LVEF)。

2.4 Evan's blue/TTC 染色

- 1) 每组随机分配 8 只动物，心肌缺血/再灌注 6 小时后，立刻剪取心脏。
- 2) 用清洁生理盐水清洗心脏后重新结扎冠脉左前降支，向主动脉逆灌 1ml 浓度为 1% 的 Evan's blue 染液，漂洗心脏后立刻冻入 -80°C 冰箱。
- 3) 20min 将冻硬的心脏取出，用手术刀片垂直于心脏长轴将心脏切片成为 1mm 厚度的切片。
- 4) 用生理盐水稍作漂洗后，立刻浸入已配好的 2% 的 TTC 溶液中，37°C 水浴 30min。
- 5) 多聚甲醛固定 6h 后，取出拍照。

6) 将数码照片用 ImageJ 软件分析, 其中白色区域为梗死区 (infarct area), 红色区域为心肌缺血但是未梗死区, 蓝色区域为未缺血区。白色区域和红色区域合并为相对危险区 (area at risk)。心肌梗死程度以梗死区面积/危险区面积表示。

2.5 心肌超氧化物生成量测定

- 1) 每组随机分配 8 只动物, 心肌缺血/再灌注 6 小时后, 迅速取大鼠缺血区心肌组织 0.1g。
- 2) 严格按照南京建成生物公司的说明书进行心肌组织心肌超氧化物生成量测定。

2.6 心肌组织丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性检测

- 1) 每组随机分配 8 只动物, 心肌缺血/再灌注 6 小时后, 迅速取大鼠缺血区心肌组织 0.1g。
- 2) 严格按照南京建成生物公司的说明书进行心肌组织心肌组织丙二醛含量及超氧化物歧化酶活性测定。

2.7 TUNEL 法检测凋亡率

2.7.1 心肌组织

- 1) 每组随机分配 8 个样本, 心肌缺血/再灌注 6 小时后, 迅速取大鼠缺血区心肌组织。
- 2) 将心肌组织置于多聚甲醛固定 72h 后, 脱水石蜡包埋备用。
- 3) 在石蜡切片机上将组织蜡块切成 3 μ m 厚的切片, 小心置于 50 $^{\circ}$ C 清水水面摊片, 然后以载玻片捞取组织切片进行烤片操作 3h, 备用。
- 4) 常规脱蜡操作之后将载玻片置于水平湿盒中, 加入蛋白酶 K 打孔, 37 $^{\circ}$ C 打孔 1h 后用 PBS 小心摇洗 3 次。
- 5) 按照罗氏 TUNEL 试剂盒说明书混合 A 液与 B 液, 避光条件下滴在组织切片上, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 2h。
- 6) 取出切片用 PBS 小心避光摇洗 3 次后, 再加入 1:1000 配制的 DAPI 试剂, 常温反应 15min 后用 PBS 小心摇洗 3 次。

- 7) 配制 50%的甘油 PBS 溶液滴于载玻片, 用盖玻片进行封片处理。
- 8) 在共聚焦显微镜下观察心肌组织切片, 其中绿色荧光标记凋亡细胞的细胞核, 蓝色荧光标记组织切片全部细胞的细胞核。采集荧光照片, 以绿色数量/蓝色数量为心肌组织凋亡率, 进行统计分析。

2.7.2 心肌细胞

- 1) 细胞爬片处理结束后, 移走原有培养液, 用 PBS 液漂洗 1 遍, 加入 4%多聚甲醛 4°C 固定 30min, 移走多聚甲醛, 用 PBS 液漂洗 1 遍, 4°C 存放备用。
- 2) 准备载玻片滴 1 滴中性树胶, 将盖玻片背面贴于载玻片上置于湿盒内固定 24h, 并做标记。
- 3) 配制 0.1%浓度的 Triton X-100 破膜液, 滴加于爬片上, 放回湿盒, 37°C 破膜 5-10min, 然后用 PBS 漂洗 3 次 (每次 5min)。
- 4) 按照罗氏 TUNEL 试剂盒说明书混合 A 液与 B 液, 避光条件下滴在细胞爬片上, 37°C 恒温水浴 1h。
- 5) 其余步骤同上述。

2.8 H9c2 细胞系模拟心肌缺血/再灌注损伤处理

- 1) 经典体外模拟缺血液配方: 4 mM HEPES, 0.9 mM CaCl₂·2H₂O, 0.49 mM MgCl₂, 137 mM NaCl, 12 mM KCl, 10 mM 脱氧葡萄糖, 0.75 mM Na₂SO₃, 20 mM C₃H₅O₃Na, 调节 pH 至 6.5。
- 2) 模拟缺血时将细胞用 PBS 漂洗三遍, 加入模拟缺血液, 最后将培养体系整体置于含 95%N₂ 和 5%CO₂ 的无菌环境, 37°C 缺血 2h。
- 3) 体外模拟再灌注时, 吸走细胞模拟缺血液, 用 PBS 漂洗三遍, 换为正常培养基, 最后将培养体系整体置于含 21% O₂, 5% CO₂ 的 37°C 常规的孵箱环境, 时间为 4h。

2.9 小干扰 RNA 处理

Notch1/Hes1 SiRNA 与转染试剂盒均购于美国 Santa Cruz 公司, H9c2 接种于 6 孔细胞培养板, 其中转染 A 液与 B 液严格按照说明书配制。A 液: 20μl SIRT1 siRNA

溶于 400 μ l 转染培养液中，混匀；B 液：20 μ l 转染试剂溶于 400 μ l 转染培养液中，混匀。A 液 B 液混匀后室温静置 30min 后可加入 6 孔板的一个细胞孔，6 小时后再加入含 20%FBS 的普通培养基，继续培养 18h 更换为正常培养基，进一步实验。

2.10 细胞活力检测

- 1) 将 H9c2 细胞传代至 96 孔细胞培养板，待细胞处理结束，用 PBS 漂洗 1 遍，每孔加入 10 μ l 的 0.5% 的 MTT 溶液及 100 μ l 的 DMEM 培养液。
- 2) 将体系置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 4 h，移走培养液，每孔加入 100 μ l 的二甲基亚砷，震荡混匀 20min 后，调整酶标仪至 490nm，测定每孔吸光度。

2.11 Western blot 检测蛋白表达

- 1) 每组随机分配 8 个样本，心肌缺血/再灌注 6 小时后（细胞处理结束后），迅速冻存样本。
- 2) 用 RIPA buffer 裂解样本，经过离心、定量、加上样缓冲液、煮沸等操作后，得到上样样本。将上样样本置于 -80 $^{\circ}$ C 环境保存，备用。
- 3) 按照北京索莱宝公司 Western blot 配胶试剂盒说明书配制 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶。
- 4) 每个泳道上样体积及蛋白总量一致（20-50 μ g），上层浓缩胶以 80V 电压、下层分离胶以 120V 电压进行蛋白电泳操作。
- 5) 小心将玻璃板上的凝胶取下，置于转膜液中。按照从上至下：三层滤纸-凝胶-PVDF 膜-三层滤纸安放好后，用转膜专用夹夹紧，然后置于转膜槽中，以 90V 的电压转膜 50min。PVDF 膜使用前用甲醇浸泡激活 10min。
- 6) 用 TBST 溶液配制脱脂奶粉，最终浓度为 5%。转膜结束后室温封闭 PVDF 膜 3h。
- 7) 按照分子量将 PVDF 膜裁切整齐，分别加对应一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育 12h，一抗配制严格按照抗体说明书方法进行。
- 8) 应用 TBST 摇洗 3 次（每次 5min）后，孵育对应的二抗，室温 2h，二抗配制严格按照抗体说明书方法进行。
- 9) 再次应用 TBST 摇洗 3 次（每次 5min）后，滴加 ECL 发光液，在凝胶成像分析

系统进行成像操作，并用配套软件（ImageLab）进行分析。

2.12 免疫荧光操作

2.12.1 心肌组织

- 1) 每组随机分配 8 个样本，心肌缺血/再灌注 6 小时后，迅速取大鼠缺血区心肌组织。
- 2) 将心肌组织置于多聚甲醛固定 72h 后，脱水石蜡包埋备用。
- 3) 在石蜡切片机上将组织蜡块切成 3 μ m 厚的切片，小心置于 50 $^{\circ}$ C 清水水面摊片，然后以载玻片捞取组织切片进行烤片操作 3h，备用。
- 4) 常规脱蜡操作之后将载玻片置于水平湿盒中，加入蛋白酶 K 打孔，37 $^{\circ}$ C 打孔 1h 后用 PBS 小心摇洗 3 次。
- 5) 配制 2%的 BSA 溶液并滴加至每个样本室温封闭 1h。
- 6) 配 α -actin 抗体稀释液（1:200）并滴加至每个样本，4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 7) 将标本用 PBS 漂洗 3 次，每次 5min。然后重新用 2%的 BSA 溶液室温封闭 1h。
- 8) 配 Notch1 或 Hes1 抗体稀释液（1:50）并滴加至每个样本，4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 9) 将标本用 PBS 漂洗 3 次，每次 5min，然后分别用对应的荧光二抗依次进行孵育，每次室温 2h 并注意避光。两次孵育之间及结束后均用 PBS 漂洗标本 3 次，每次 5min。
- 10) 取出切片用 PBS 漂洗 3 次后，每次 5min，再加入 1:1000 配制的 DAPI 试剂，常温反应 15min 后用 PBS 小心摇洗 3 次。
- 11) 配制 50%的甘油 PBS 溶液滴于载玻片，用盖玻片进行封片处理。
- 12) 在荧光显微镜下观察心肌组织切片，采集照片并用 ImagePro plus 软件进行统计分析。

2.12.2 心肌细胞

- 1) 细胞爬片处理结束后，移走原有培养液，用 PBS 液漂洗 1 遍，加入 4%多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 30min，移走多聚甲醛，用 PBS 液漂洗 1 遍，4 $^{\circ}$ C 存放备用。
- 2) 准备载玻片滴 1 滴中性树胶，将盖玻片背面贴于载玻片上置于湿盒内固定 24h，并做标记。

- 3) 配制 0.1% 浓度的 Triton X-100 破膜液, 滴加于爬片上, 放回湿盒, 37°C 破膜 5-10min, 然后用 PBS 漂洗 3 次 (每次 5min)。
- 4) 配制 2% 的 BSA 溶液并滴加至每个样本室温封闭 1h。
- 5) 配 α -actin 抗体稀释液 (1:200) 并滴加至每个样本, 4°C 过夜。
- 6) 将标本用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5min。然后重新用 2% 的 BSA 溶液室温封闭 1h。
- 7) 配 Notch1 或 Hes1 抗体稀释液 (1:50) 并滴加至每个样本, 4°C 过夜。
- 8) 将标本用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5min, 然后分别用对应的荧光二抗依次进行孵育, 每次室温 2h 并注意避光。两次孵育之间及结束后均用 PBS 漂洗标本 3 次, 每次 5min。
- 9) 取出切片用 PBS 漂洗 3 次后, 每次 5min, 再加入 1:1000 配制的 DAPI 试剂, 常温反应 15min 后用 PBS 小心摇洗 3 次。
- 10) 配制 50% 的甘油 PBS 溶液滴于载玻片, 用盖玻片进行封片处理。
- 11) 在荧光显微镜下观察心肌组织切片, 采集照片并用 ImagePro plus 软件进行统计分析。

2.13 统计分析

以上实验数据经过相应软件转换、分析之后, 应用 GraphPad Prism (V5.01) 进行统计处理, 结果均以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SEM) 表示。用 t 检验进行两组之间的比较, 用单因素方差分析辅以 t 检验方法进行多组之间的比较, 若 $P < 0.05$ 则认为两组具有统计学差异。

3 实验结果

如图 2-22 所示, 本实验采用的 DAPT 与 Luz 剂量均对假手术组再灌注 24h 后心脏功能以及再灌注 6h 后心肌梗死与凋亡程度无显著影响, 提示实验剂量安全, 无明显心脏毒性。接下来, 我们研究了 DAPT 与 Luz 对褪黑素心肌保护作用的影响, 如图 2-23A-C 及表 2-1 所示, 褪黑素对再灌注 24h 心功能的改善作用被 DAPT 及 Luz 显著抑制, 进一步研究发现, 褪黑素减轻梗死与凋亡的作用也被二者所抑制 (图 2-23D-G), 提示褪黑素的心肌保护作用与其膜受体及 Notch 信号密切相关。

我们下一步研究了 DAPT 和 Luz 对细胞凋亡信号通路及氧化应激损伤的影响,

如图 2-24A-C 所示, 与 MI/R+Mel 相比, DAPT 和 Luz 均显著上调 caspase-3 和 Bax 表达, 下调 Bcl-2 表达, 提示褪黑素抗凋亡的作用也被二者所抑制。如图 2-24D-G 所示, DAPT 和 Luz 也显著增加心肌超氧化物生成量、gp91^{phox} 表达量及丙二醛的含量, 降低超氧化物歧化酶水平, 提示褪黑素抑制凋亡信号, 减轻氧化应激损伤的作用也被二者所抑制。

分析心肌 Notch1/Hes1 信号及 PTEN/Akt 信号发现, 褪黑素治疗在体内实验中明显上调心肌 Notch1、NICD、Hes1 的表达, 同时下调 PTEN 表达从而激动 Akt 通路, 而这些作用均可被 Luz 及 DAPT 所抑制, 提示褪黑素的心肌保护作用可能与其激动心肌 Notch1/Hes1 信号有关, 而 PTEN/Akt 有可能是其下游的信号通路, 二者共同通过褪黑素膜受体介导的途径被调控。为了进一步研究其上下游关系, 我们使用 H9c2 细胞系进行了体外实验。

首先, 我们探讨了 control siRNA 及 Notch1/Hes1 siRNA 对 H9c2 细胞的干扰效率, 蛋白印迹及免疫荧光实验表明, Notch1/Hes1 siRNA 的干扰效率良好, 可显著下调对应蛋白的表达 (图 2-26)。随后, 我们评价了实验剂量的 Luz 对正常细胞以及模拟缺血再灌注处理细胞生存情况的影响, 研究发现, Luz (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 4h 对细胞凋亡以及生存率均无显著影响, 提示实验剂量的 Luz 无明显细胞毒性。

如图 2-28A 所示, 褪黑素对 H9c2 细胞生存率无明显影响。而图 2-28B-F 表明, 体外干扰 Notch1 信号后可明显抑制褪黑素的抗凋亡抗氧化应激作用, 结合体内实验结果, 提示 Notch1 信号是褪黑素心肌保护作用的关键分子。进一步研究发现, 干扰 Notch1 信号后, 褪黑素抑制细胞凋亡的作用减弱 (图 2-29A-C), 同时 NICD、Hes1 的表达均下降, 而 PTEN 的表达明显上升, Akt 被显著磷酸化激活, 提示 Notch1 信号通过调控 Hes1 表达, 从而影响 PTEN/Akt 通路, 与体内实验互相印证 (图 2-29D-J)。

进一步采用 Hes1 小干扰 RNA 抑制 Hes1 表达显示, 抑制 Hes1 也显著抑制褪黑素抗凋亡及减轻细胞氧化应激损伤的作用 (图 2-30)。褪黑素抑制 caspase-3、Bax 表达, 促进 Bcl-2 表达的作用也被 Hes1 siRNA 所减弱 (图 2-31A-C), 更重要的是, Hes1 siRNA 还明显上调 PTEN 的表达, 下调 Akt 的磷酸化水平 (图 2-31D-F), 以上结果均提示 Hes1 可在体外模拟缺血再灌注情况下调控 PTEN/Akt 通路, 发挥细胞保护作用。

最后我们研究了褪黑素膜受体在此过程中的作用, 我们发现, 体外应用 Luz 可

明显下调褪黑素的细胞保护作用，上调细胞凋亡通路（图 2-32）。如图 2-33 所示，Luz 处理可明显抑制褪黑素的抗氧化应激损伤作用（图 2-33A, B），同时，Luz 也可以明显下调 NICD 与 Hes1 的表达，上调 PTEN 表达从而抑制 Akt 的磷酸化激活（图 2-33C-D），提示褪黑素激动 Notch1/Hes1 信号调控 PTEN/Akt 通路的作用是褪黑素膜受体介导的。

4 实验讨论

本实验在体和离体的实验首次证实 Notch1 也是褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的关键信号通路，Notch1 可通过下游的 Hes1 调控 PTEN 进而激活 Akt 信号通路，这可能是褪黑素心肌保护作用的新机制，同时，我们证实以上作用是褪黑素受体介导的。

Notch 信号是一类进化上高度保守的细胞信号通路，已发现成年心肌细胞最主要表达 Notch 受体类型是 Notch1，Notch 是单次跨膜受体，其包括 3 个区段，胞外段、跨膜段和胞内段，当相互邻近的细胞配体与受体结合后，Notch 信号通路被激活，Notch 受体跨膜区段 1743 位甘氨酸和 1744 位缬氨酸被 γ 分泌酶（ γ -Secretase，天冬氨酸蛋白酶复合体）剪切，使 Notch 受体胞内区段（Notch intracellular domain, NICD）解离并激活转位至细胞核，进而调控 Hes (Hairy/enhancer of split)、Hey (Hes-related proteins)及 Nrarp (Notch-regulated ankyrin repeat protein)等家族的基因表达^[200, 233]（图 1-17）。以上蛋白可进一步调控下游 cMyc、cyclin D1 等其他基因的转录与翻译，最终决定细胞的增殖、分化与凋亡过程。更重要的是，Pei 等发现，激动 Notch1/Hes1 信号通路可抑制 iNOS 表达进而减轻氧化应激与硝化应激水平，发挥抗心肌缺血/再灌注损伤的作用，提示 Notch1 信号可调控器官缺血再灌注损伤，尤其是在心肌缺血/再灌注过程中发挥重要的保护作用，其具体机制可能与减轻氧化应激、抗凋亡有关^[218]。然而，在心血管系统，褪黑素对 Notch1/Hes1 的调控作用及其机制尚未见报道。在本研究中，我们通过体外及体内实验发现，褪黑素治疗可显著激活心肌缺血/再灌注后 Notch1/Hes1 信号通路，而 Notch1 信号抑制剂可显著抑制其心肌保护作用，提示 Notch1 是褪黑素心肌保护作用的关键分子。

PTEN 是 1997 年发现的具有双特异磷酸酶活性的抑癌基因，其参与细胞的生长、

凋亡、粘附、迁移等多个过程。而 PI3K/Akt 信号是公认的心肌生存信号，是许多心肌保护药物的共同靶点^[53, 56]。有文献证实，在胸腺瘤和 T 细胞淋巴瘤中 Hes1 可抑制 PTEN 从而促进 PI3K/Akt 信号通路^[219, 220]。而 Pei 等证实激动心肌 Notch1/Hes1 信号是通过 PTEN 信号进而激动 Akt 保护发挥抗心肌缺血/再灌注损伤作用的^[218]。在本实验中，应用 DAPT 阻断 Notch1 信号后，褪黑素对 PTEN 及 Akt 的调控作用消失，提示 Notch1 与 PTEN/Akt 信号在褪黑素的心肌保护作用中密切相关，可能存在上下游关系。而细胞实验结果表明，Hes1 siRNA 也可显著抑制褪黑素对 PTEN/Akt 的调控作用，进一步提示 PTEN/Akt 是 Notch1/Hes1 信号的下游，共同参与褪黑素抗氧化应激的心血管保护作用。

我们进一步研究了褪黑素膜受体在此过程中的作用，第一部分实验证实，褪黑素受体参与其心肌保护作用，在本研究中，褪黑素膜受体拮抗剂 Luzindole 不仅抑制了褪黑素抗氧化应激、促生存的作用，也抑制了其对 Notch1/Hes1 及 PTEN/Akt 信号的调控作用，说明此过程也是通过褪黑素膜受体介导的。尽管这一过程的具体机制有待于进一步研究，我们的结果仍然提示，褪黑素膜受体激动剂可能是心肌保护的又一个重要的靶点。

更有意义的是，本课题组近期发现，在糖尿病动物心肌组织中 Notch1 胞内段及 Hes1 的表达水平显著降低，而比较糖尿病动物与非糖尿病动物，在心肌缺血/再灌注后，糖尿病心肌 Notch1/Hes1 信号也显著下调，内质网应激水平明显上升。而糖尿病动物给予褪黑素治疗后，其心肌 Notch1 信号明显上调，提示 Notch1/Hes1 信号受损可能也是糖尿病心肌易损性增加的重要原因。褪黑素还可以激动 Notch1 信号通路抗糖尿病心肌缺血损伤（未发表数据）。以上研究进一步提示，褪黑素可能发挥抗糖尿病心肌损伤的作用，本课题组将继续阐明其机制。

总之，我们通过*in vivo*和*in vitro*研究发现，褪黑素治疗可通过褪黑素膜受体介导的途径激活 Notch1/Hes1 信号通路进而调控 PTEN/Akt 抑制心肌凋亡。本研究揭示了褪黑素心血管保护作用的新机制，并提示褪黑素膜受体和 Notch1 信号是药物研发的新靶点。

附图

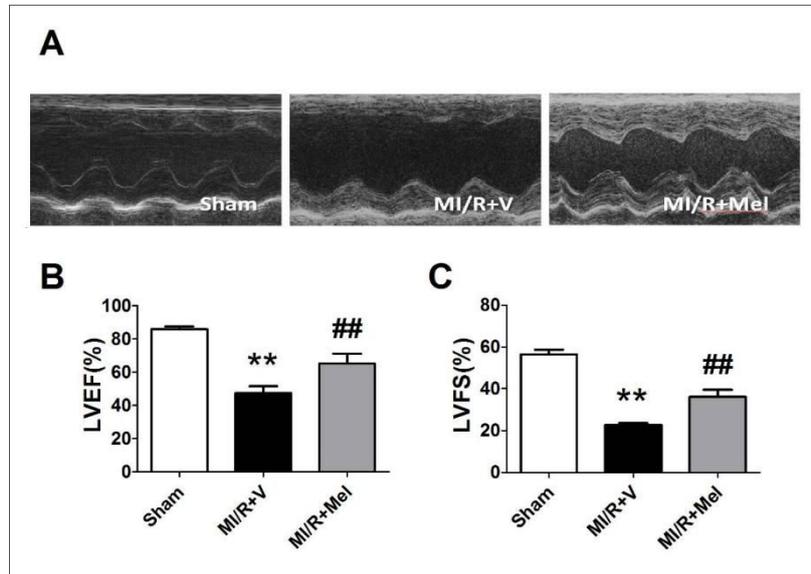


图 2-1 褪黑素对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心功能的影响。(A) 再灌注 72h 后代表性超声心动图；(B) 左室射血分数 (LVEF)；(C) 左室缩短分数 (LVFS)。结果用 mean \pm S.E.M. 表示, n=6。 ** $P < 0.01$ versus Sham 组, ## $P < 0.01$ versus MI/R+V 组。

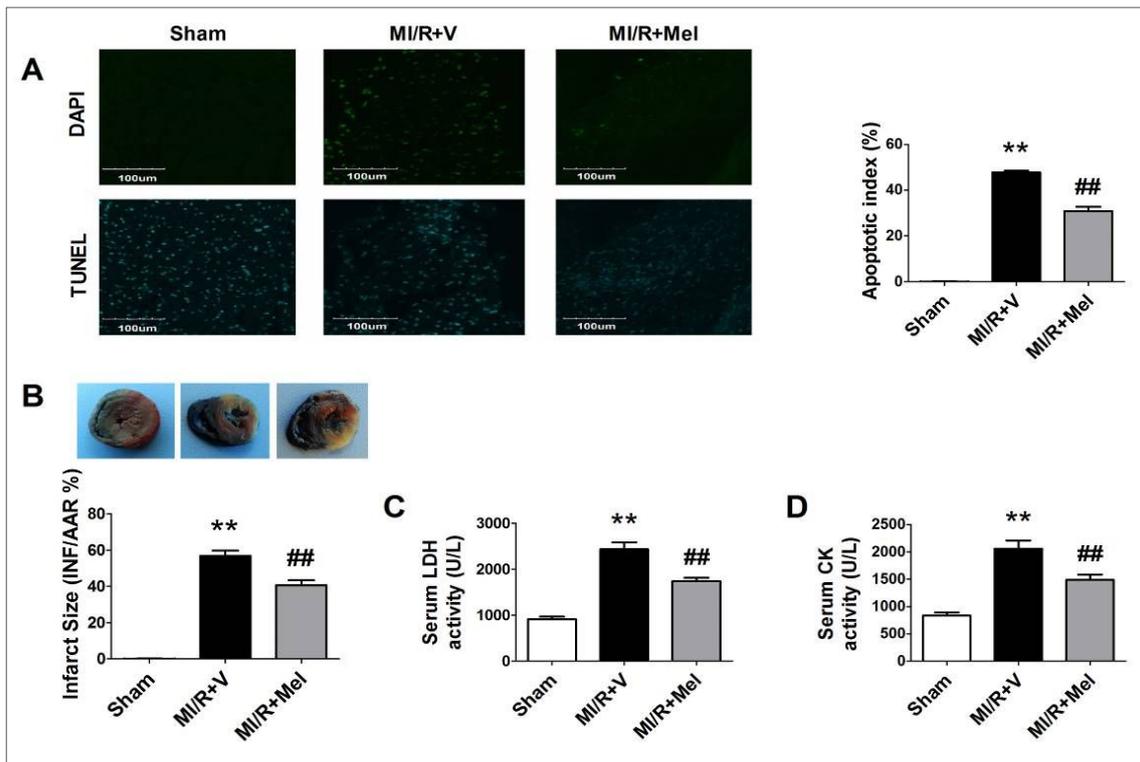


图 2-2 褪黑素对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌凋亡率、梗死面积、血浆乳酸脱氢酶及肌酸激酶的影响。(A) 左：代表性 TUNEL 图 (400 \times)，绿色标示凋亡细胞核，蓝色标示总细胞核；右：凋亡率统计图；(B) 上：心肌 Evans blue-TTC 双染图；下：梗死面积统计图；(C) 血浆乳酸脱氢酶 (LDH) 水平；(D) 血浆肌酸激酶 (CK) 水平。结果用 mean \pm S.E.M.表示，n=6。** $P < 0.01$ versus Sham 组，## $P < 0.01$ versus MI/R+V 组。

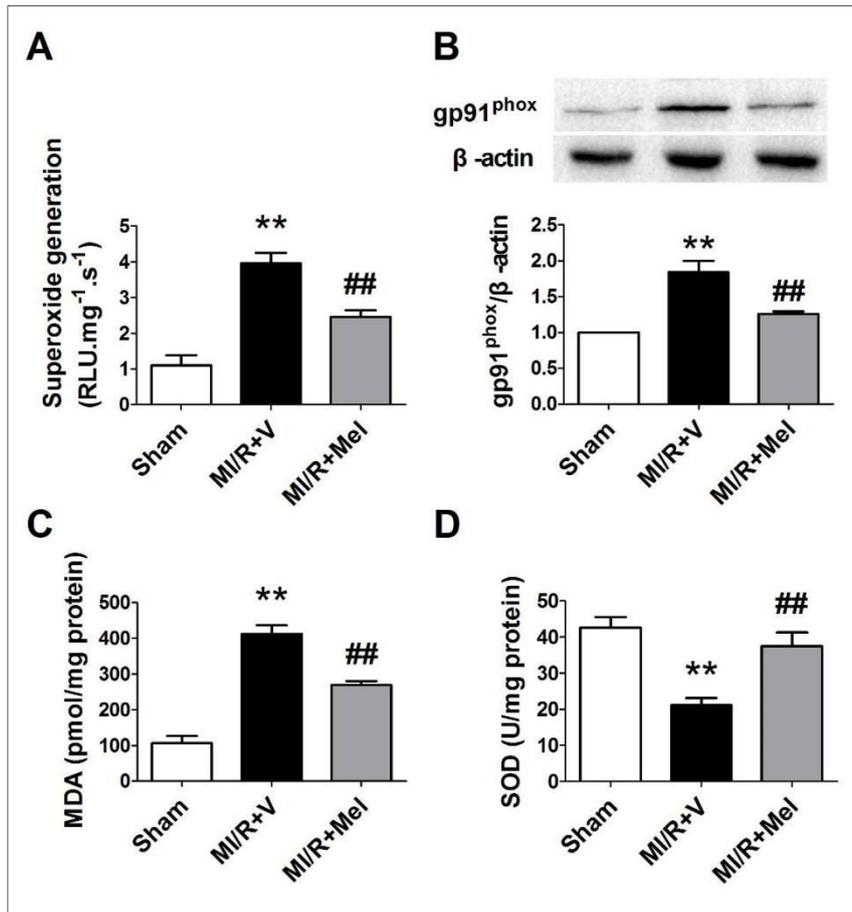


图 2-3 褪黑素对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌氧化应激指标的影响。(A) 心肌超氧化物生成量；(B) 心肌 gp91^{phox} 表达量；(C) 心肌丙二醛 (MDA) 水平；(D) 心肌超氧化物歧化酶(SOD)水平。结果用 mean \pm S.E.M.表示，n=6。** $P < 0.01$ versus Sham 组，## $P < 0.01$ versus MI/R+V 组。

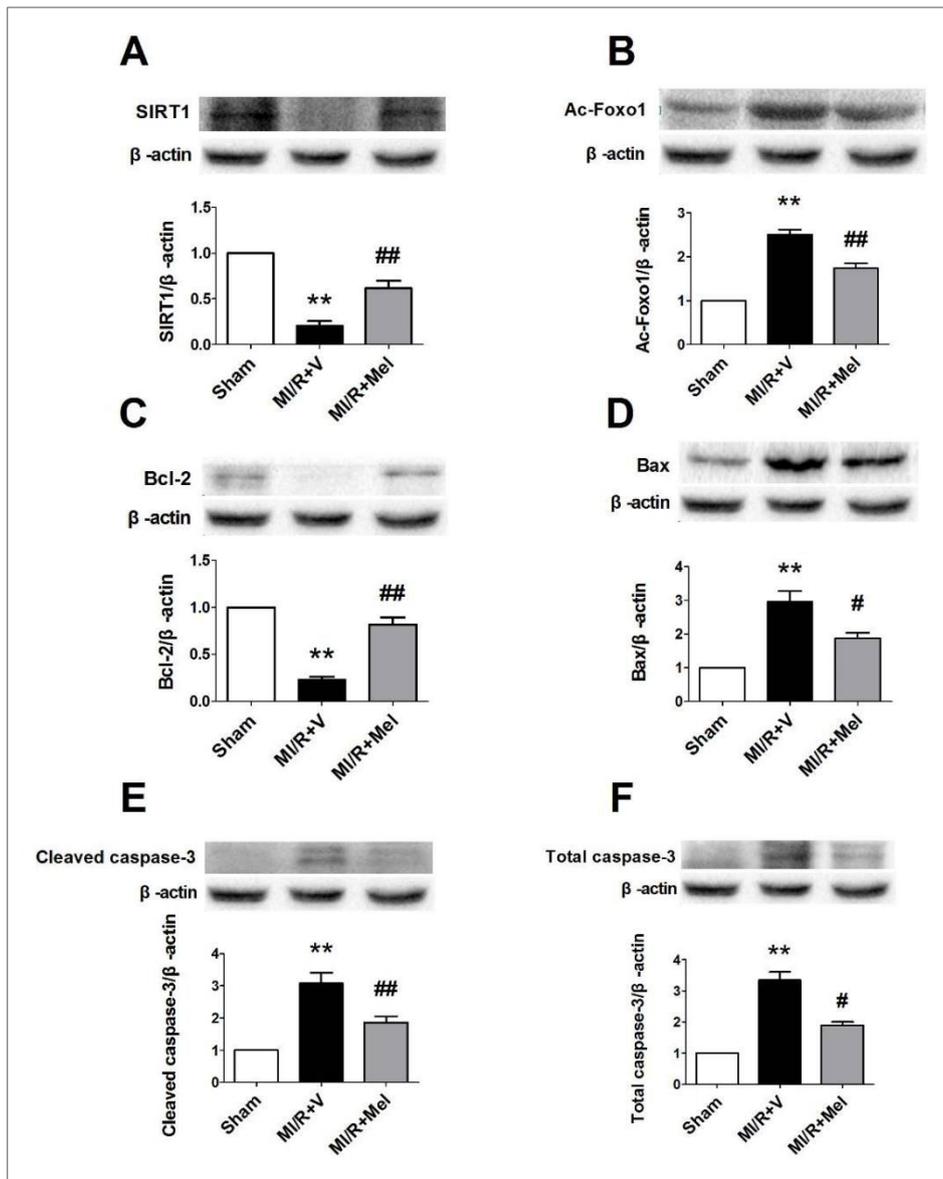


图 2-4 褪黑素对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌 SIRT1 信号通路与心肌凋亡通路的影响。(A) SIRT1 表达; (B) Ac-Foxo1 表达; (C) Bcl-2 表达; (D) Bax 表达; (E) cleaved caspase-3 表达; (F) 总 caspase-3 表达。结果用 mean ± S.E.M.表示, n=6。** $P < 0.01$ versus Sham 组, # $P < 0.01$ versus MI/R+V 组。

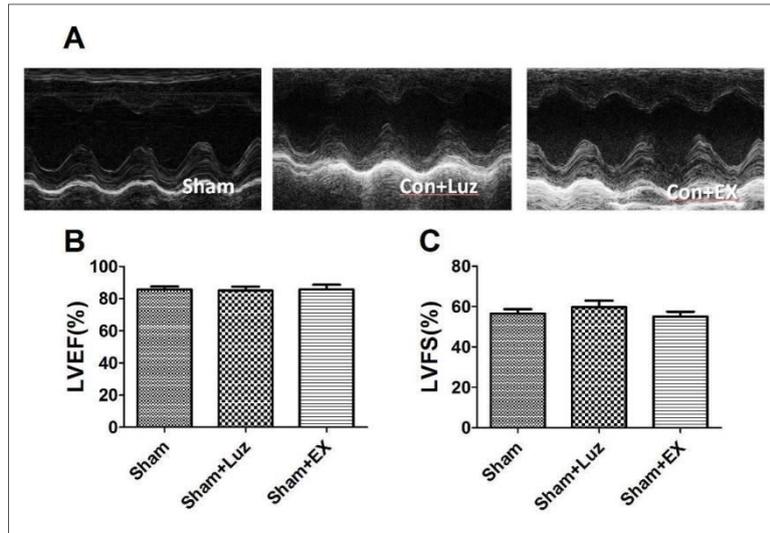


图 2-5 Luzindole 与 EX527 对假手术组大鼠心功能的影响。(A) 代表性超声心动图；(B) 左室射血分数 (LVEF)；(C) 左室缩短分数 (LVFS)。结果用 mean \pm S.E.M.表示，n= 6。

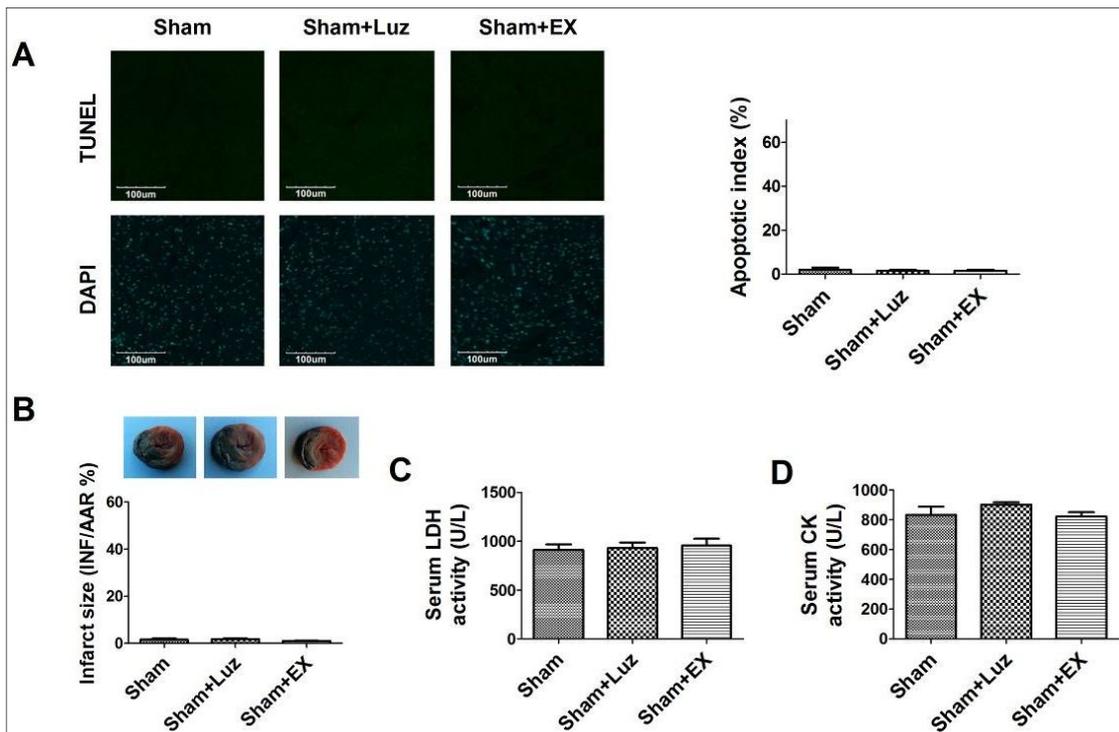


图 2-6 Luzindole 与 EX527 对假手术组大鼠心肌凋亡率、梗死面积、血浆乳酸脱氢酶及肌酸激酶的影响。(A) 左：代表性 TUNEL 图 (400 \times)，绿色标示凋亡细胞核，蓝色标示总细胞核；右：凋亡率统计图；(B) 上：心肌 Evans blue-TTC 双染图；下：梗死面积统计图；(C) 血浆乳酸脱氢酶 (LDH) 水平；(D) 血浆肌酸激酶 (CK) 水平。结果用 mean \pm S.E.M.表示，n= 6。

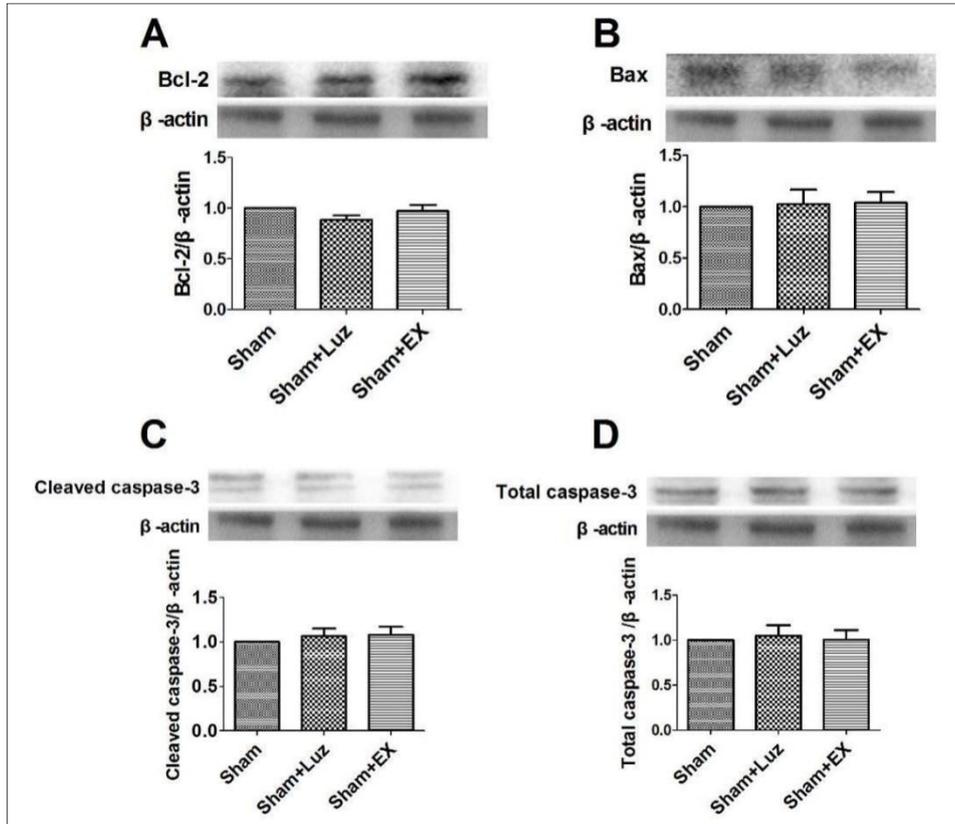


图 2-7 Luzindole 与 EX527 对假手术组大鼠心肌凋亡通路的影响。(A) Bcl-2 表达; (B) Bax 表达; (C) cleaved caspase-3 表达; (D) 总 caspase-3 表达。结果用 mean ± S.E.M. 表示, n=6。

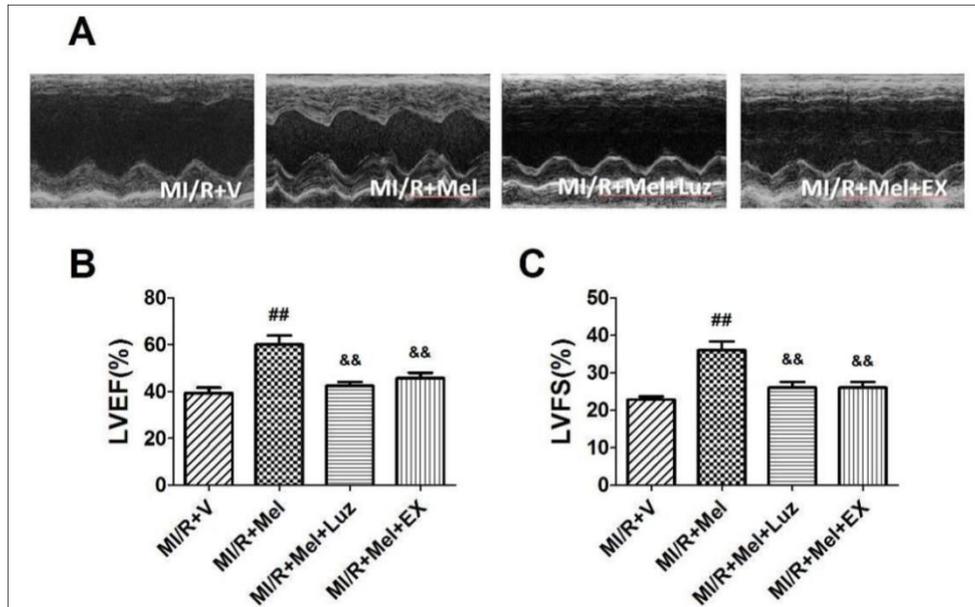


图 2-8 褪黑素、Luzindole 与 EX527 对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心功能的影响。(A) 再灌注 72h 后代表性超声心动图; (B) 左室射血分数 (LVEF); (C) 左室缩短分

数 (LVFS); 结果用 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 表示, $n=6$ 。&& $P < 0.01$ versus MI/R+Mel 组, ## $P < 0.01$ versus MI/R+V 组。

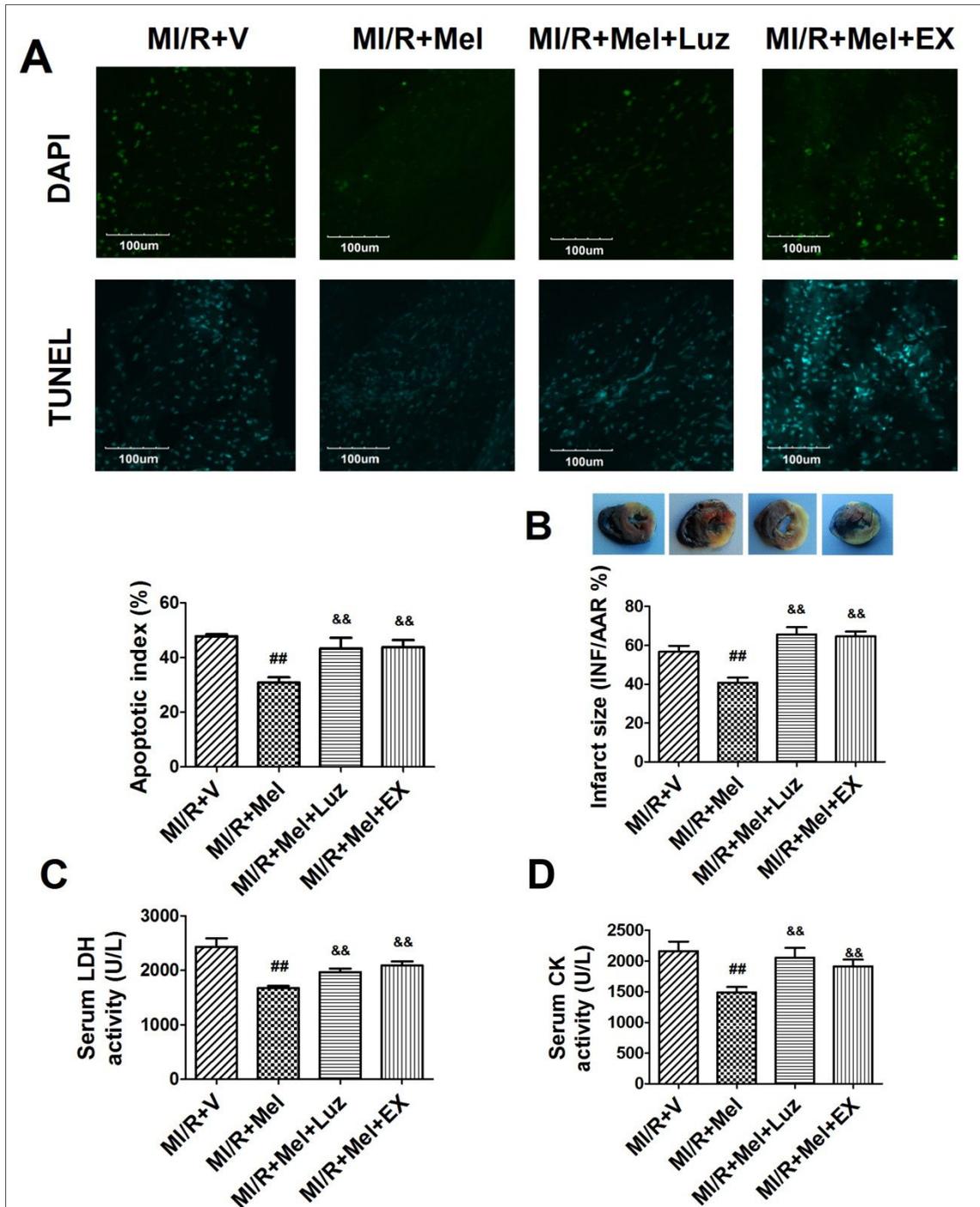


图 2-9 褪黑素、Luzindole 与 EX527 对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌凋亡率、梗死面积、血浆乳酸脱氢酶及肌酸激酶的影响。(A) 上: 代表性 TUNEL 图 (400 \times), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核; 下: 凋亡率统计图; (B) 上: 心肌 Evans blue-TTC 双染图; 下: 梗死面积统计图; (C) 血浆乳酸脱氢酶 (LDH) 水平; (D) 血

浆肌酸激酶(CK)水平。结果用 mean ± S.E.M.表示, n= 6。&&P < 0.01 versus MI/R+Mel组, ##P < 0.01 versus MI/R+V组。

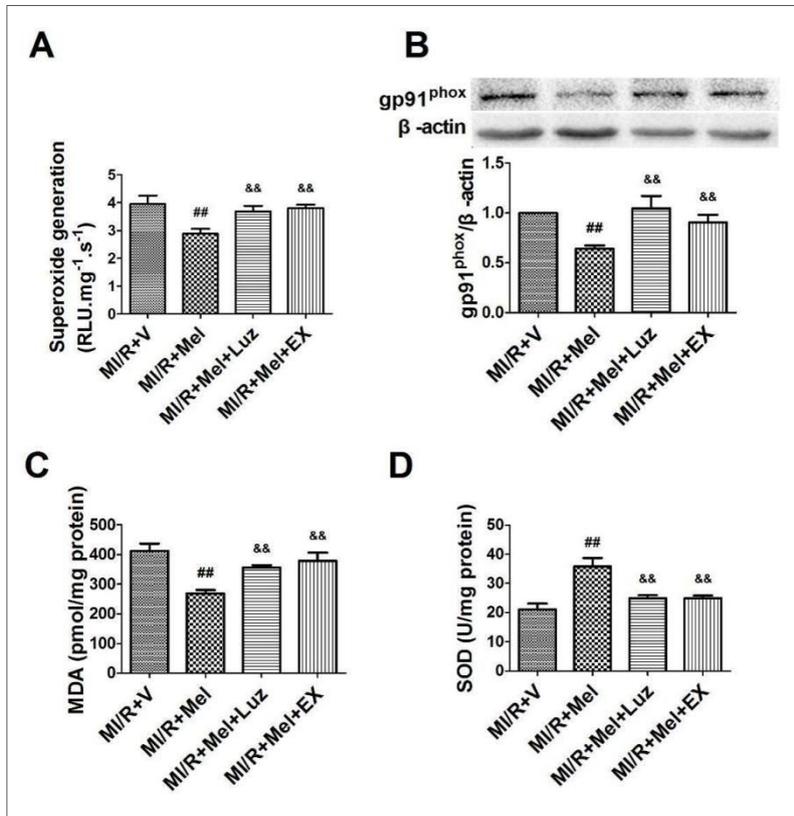


图 2-10 褪黑素、Luzindole 与 EX527 对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌氧化应激指标的影响。(A) 心肌超氧化物生成量; (B) 心肌 gp91^{phox} 表达量; (C) 心肌丙二醛 (MDA) 水平; (D) 心肌超氧化物歧化酶 (SOD) 水平。结果用 mean ± S.E.M.表示, n= 6。&&P < 0.01 versus MI/R+Mel组, ##P < 0.01 versus MI/R+V组。

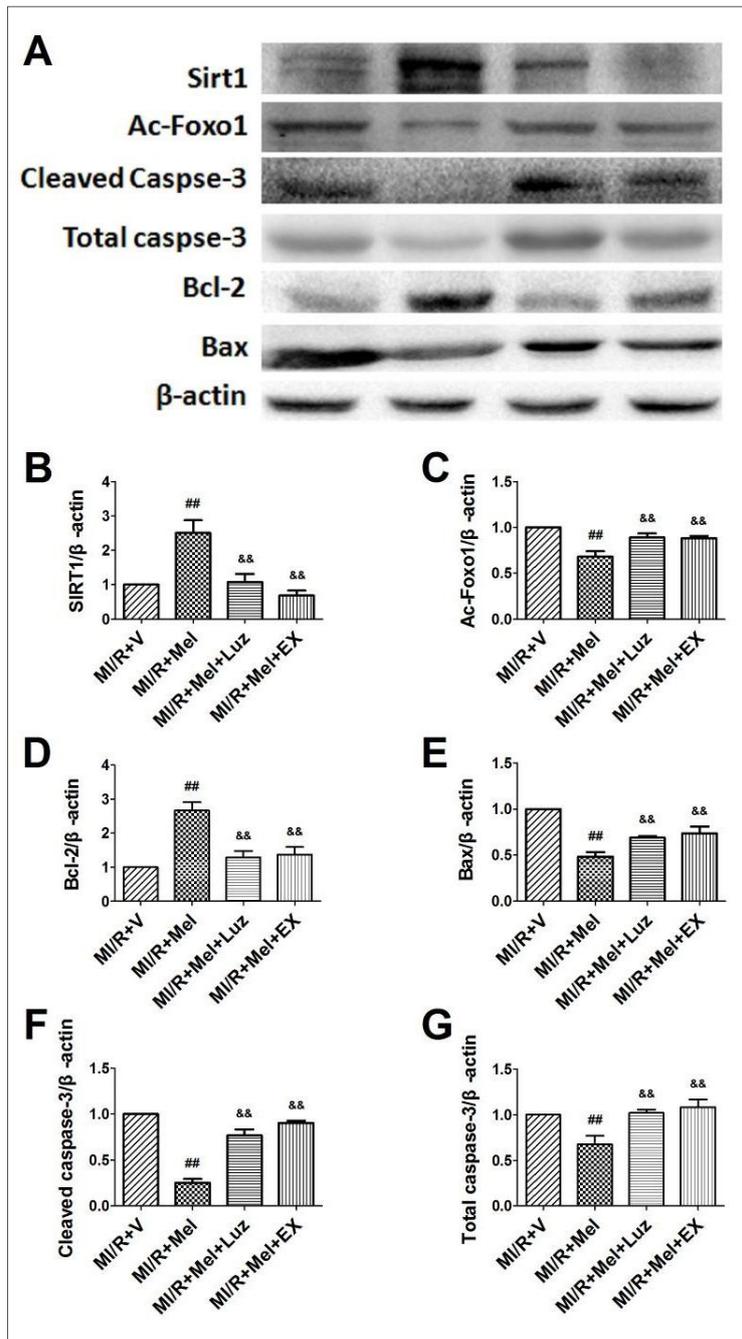


图 2-11 褪黑素、Luzindole 与 EX527 对大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌 SIRT1 信号通路与心肌凋亡通路的影响。(A) SIRT1 表达; (B) Ac-Foxo1 表达; (C) Bcl-2 表达; (D) Bax 表达; (E) cleaved caspase-3 表达; (F) 总 caspase-3 表达。结果用 mean ± S.E.M. 表示, n=6。&&P < 0.01 versus MI/R+Mel 组, ##P < 0.01 versus MI/R+V 组。

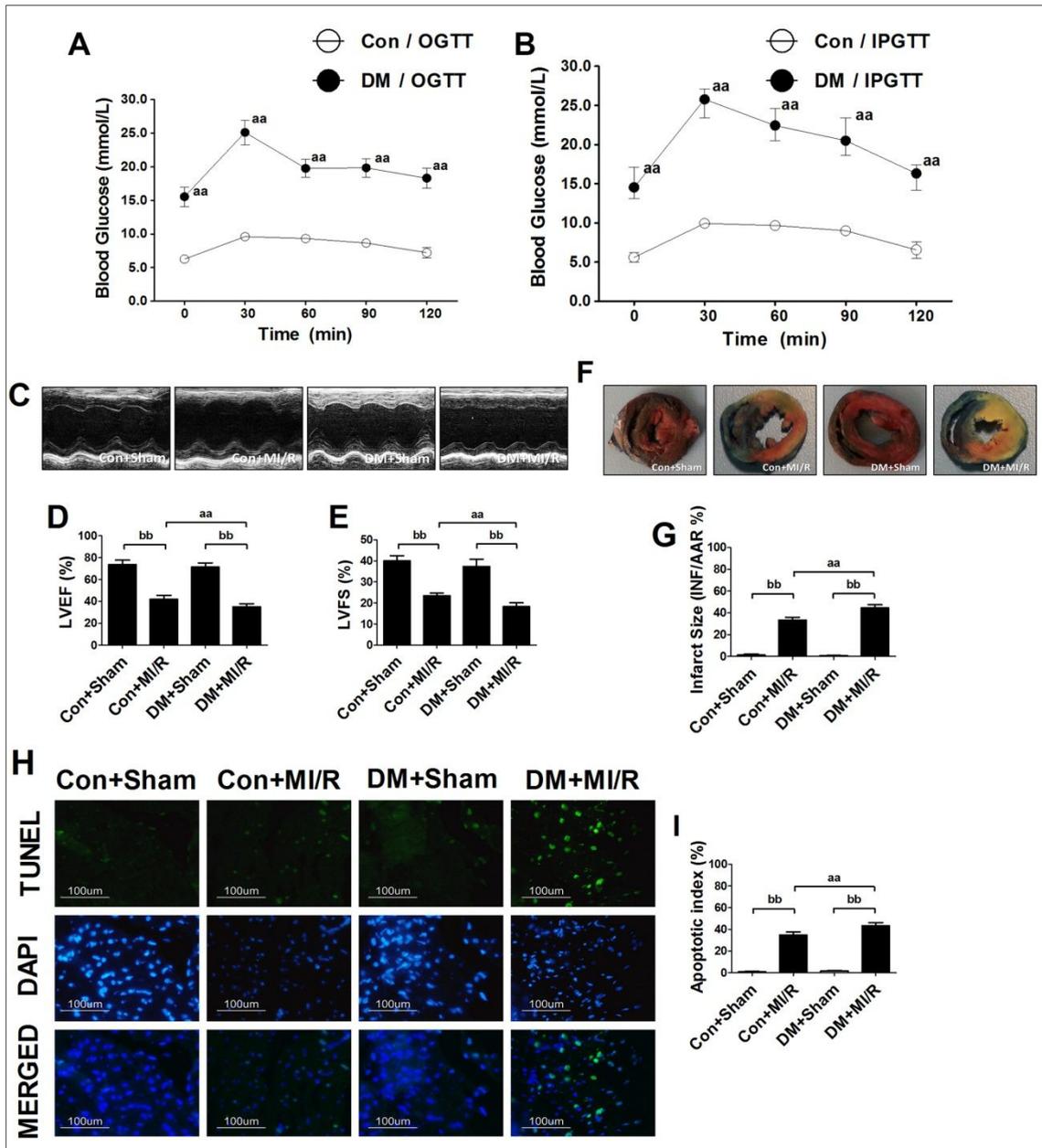


图 2-12 2 型糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注手术对心功能、心肌梗死面积及凋亡率的影响。(A) 口服糖耐量测试 (OGTT); (B) 腹腔糖耐量测试 (IPGTT); (C) 代表性超声心动图; (D) 左室射血分数 (LVEF); (E) 左室缩短分数 (LVFS); (F) 代表性心肌 Evans blue-TTC 双染图; (G) 心肌梗死面积统计图; (H) 代表性 TUNEL 图(400 \times), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核; (I) 凋亡率统计图。结果用 mean \pm S.E.M. 表示, n=8。^{aa} $P < 0.01$ versus Con 组, ^{bb} $P < 0.01$ versus Sham 组。

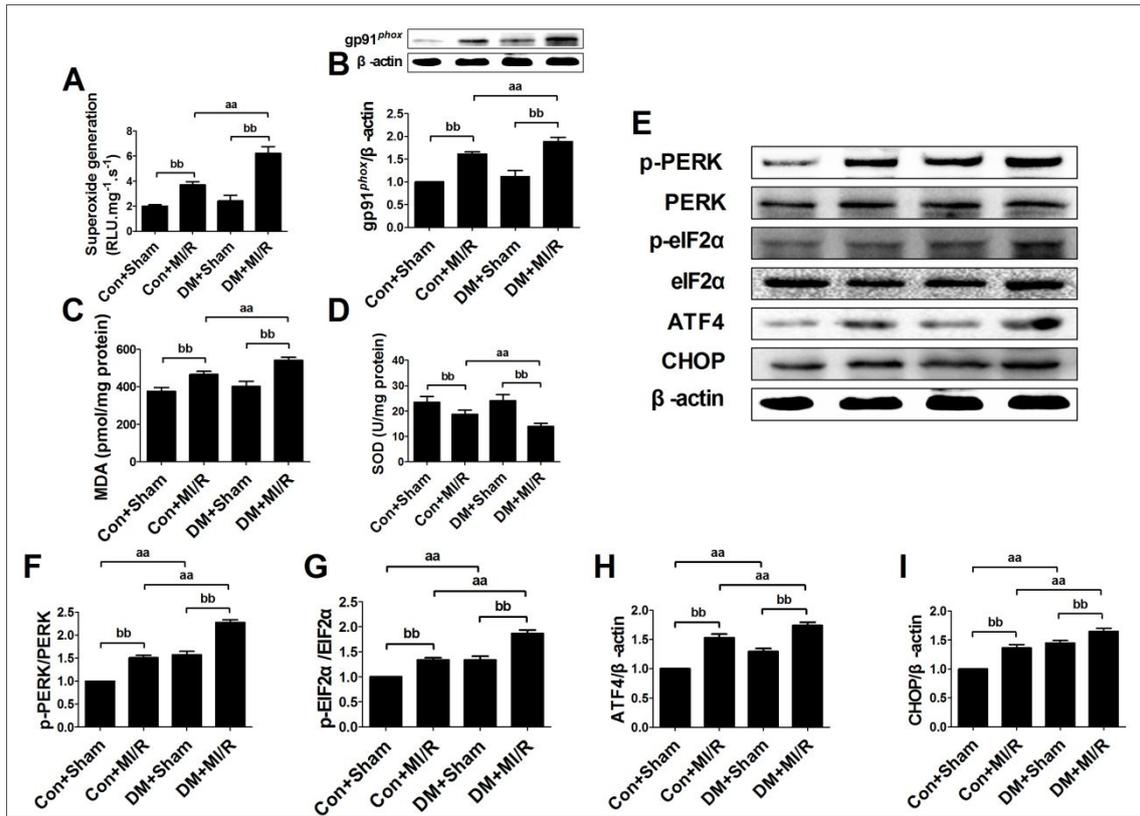


图 2-13 2 型糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注手术对心肌氧化应激指标及 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激水平的影响。(A) 心肌超氧化物生成量；(B) 心肌 gp91^{phox} 表达量；(C) 心肌丙二醛 (MDA) 水平；(D) 心肌超氧化物歧化酶 (SOD) 水平；(E) 代表性 western blot 条带；(F) p-PERK/PERK 比值；(G) p-eIF2 α /eIF2 α 比值；(H) ATF4 表达；(I) CHOP 表达。结果用 mean \pm S.E.M. 表示，n=8。aa $P < 0.01$ versus Con 组，bb $P < 0.01$ versus Sham 组。

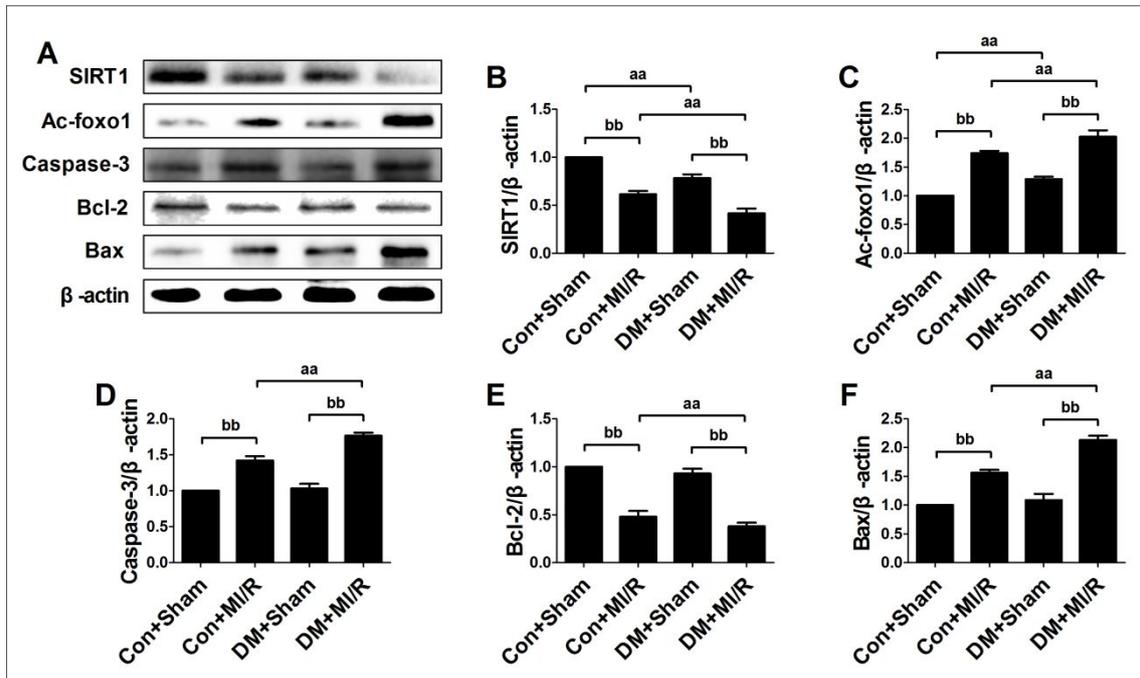


图 2-14 2 型糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注手术对心肌 SIRT1 信号通路及凋亡相关分子表达的影响。(A) 代表性 western blot 条带；(B) SIRT1 表达；(C) Ac-Foxo1 表达；(D) caspase-3 表达；(E) Bcl-2 表达；(F) Bax 表达。结果用 mean ± S.E.M.表示，n= 8。^{aa}*P* < 0.01 versus Con 组，^{bb}*P* < 0.01 versus Sham 组。

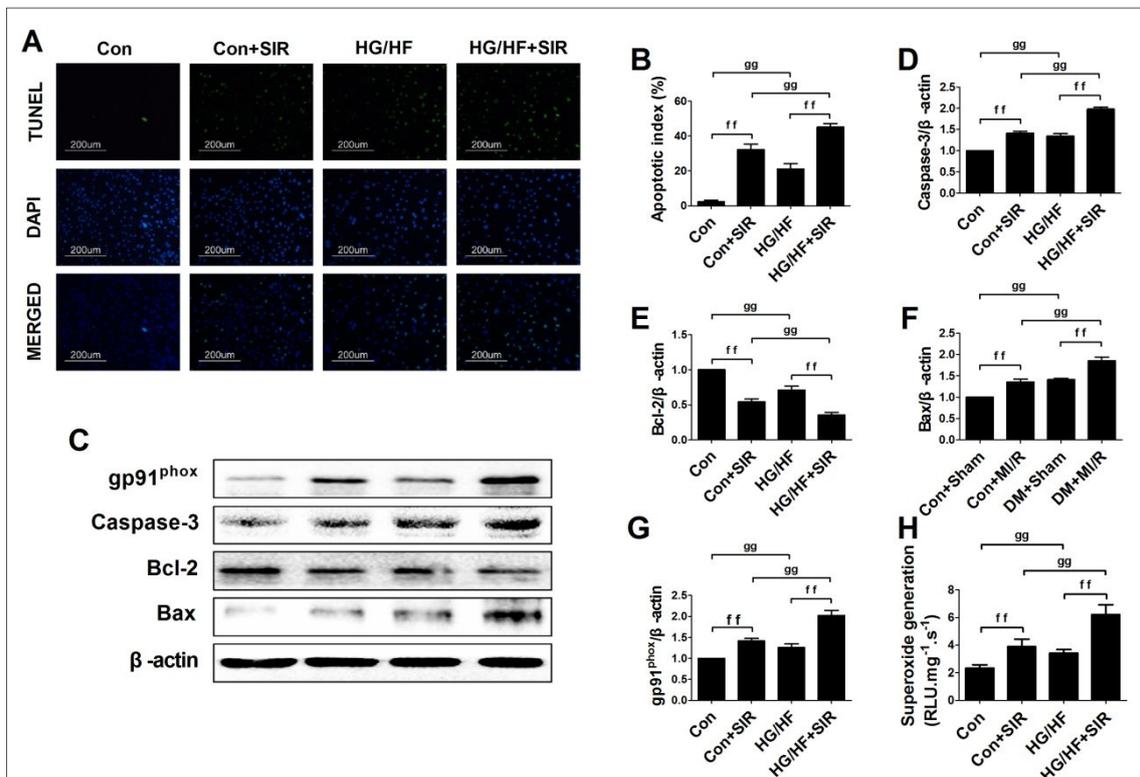


图 2-15 高糖高脂培养的 H9c2 细胞模拟缺血再灌注对氧化应激及凋亡相关分子的影响。

响。(A) 代表性 TUNEL 图 (200×), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核; (B) 凋亡率统计图; (C) 代表性 western blot 条带; (D) caspase-3 表达; (E) Bcl-2 表达; (F) Bax 表达; (G) gp91^{phox} 表达; (H) 细胞超氧化物生成量。结果用 mean ± S.E.M.表示, n= 8。^{ff}P < 0.01 versus no-SIR 处理组, ^{gg}P < 0.01 versus no-HG/HF 培养组。

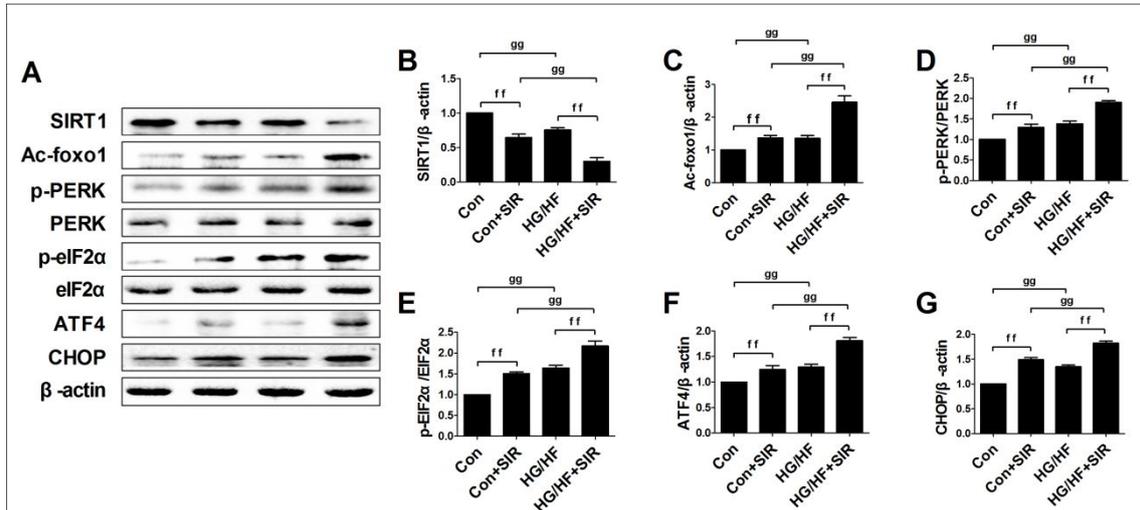


图 2-16 高糖高脂培养的 H9c2 细胞模拟缺血再灌注对 SIRT1 信号及内质网应激水平的影响。(A) 代表性 western blot 条带; (B) SIRT1 表达; (C) Ac-Foxo1 表达; (D) p-PERK/PERK 比值; (E) p-eIF2α/eIF2α 比值; (F) ATF4 表达; (G) CHOP 表达。结果用 mean ± S.E.M.表示, n= 8。^{ff}P < 0.01 versus no-SIR 处理组, ^{gg}P < 0.01 versus no-HG/HF 培养组。

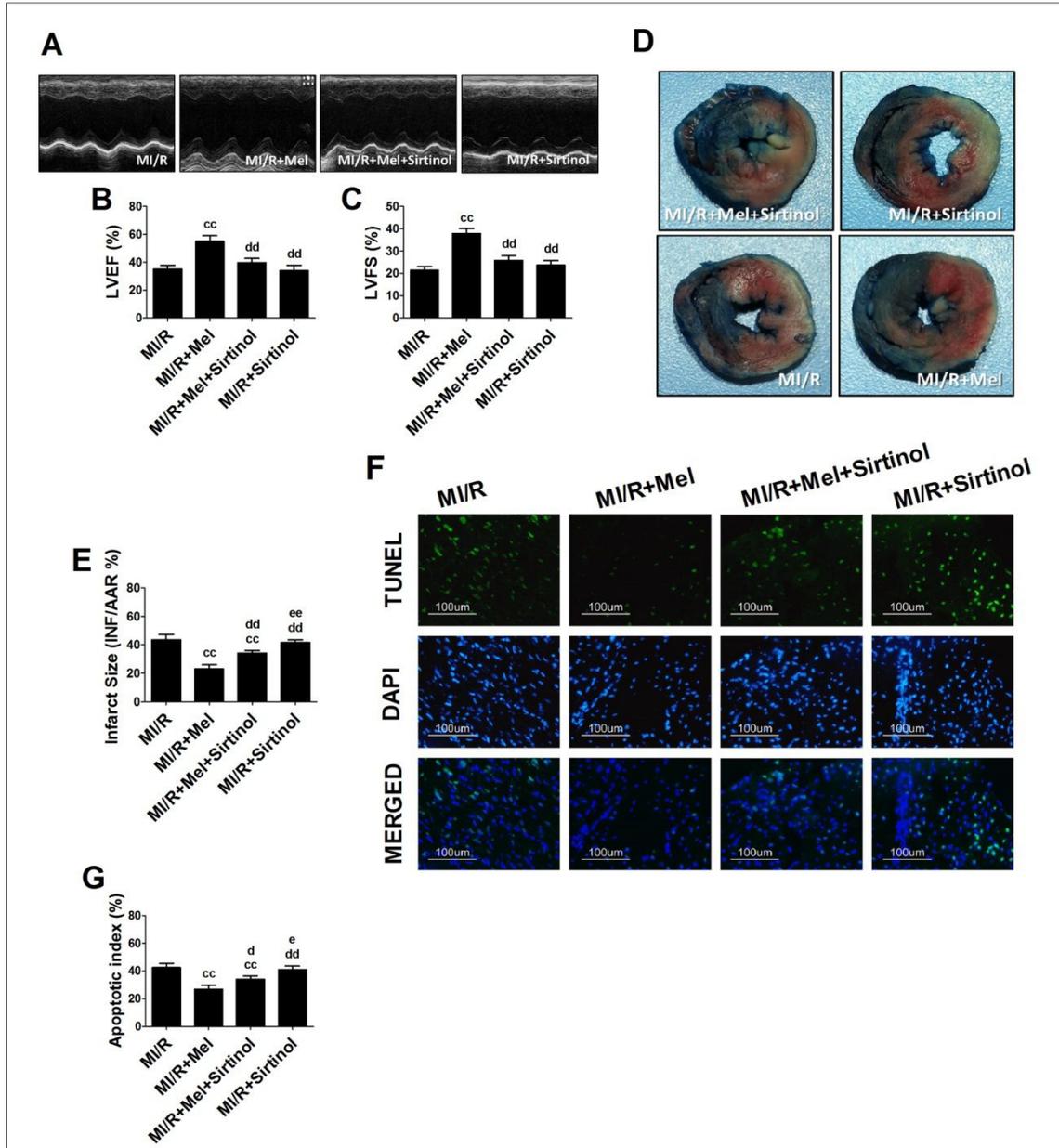


图 2-17 褪黑素及 Sirtinol 对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤后心功能、心肌梗死面积及凋亡率的影响。(A) 代表性超声心动图；(B) 左室射血分数 (LVEF)；(C) 左室缩短分数 (LVFS)；(D) 代表性心肌 Evans blue-TTC 双染图；(E) 心肌梗死面积统计图；(F) 代表性 TUNEL 图 (400×)，绿色标示凋亡细胞核，蓝色标示总细胞核；(G) 凋亡率统计图。结果用 mean ± S.E.M.表示，n=8。^{cc}P < 0.01 versus MI/R 组，^dP < 0.05/^{dd}P < 0.01 versus MI/R+Mel 组，^eP < 0.05/^{ee}P < 0.01 versus MI/R+Mel+Sirtinol 组。

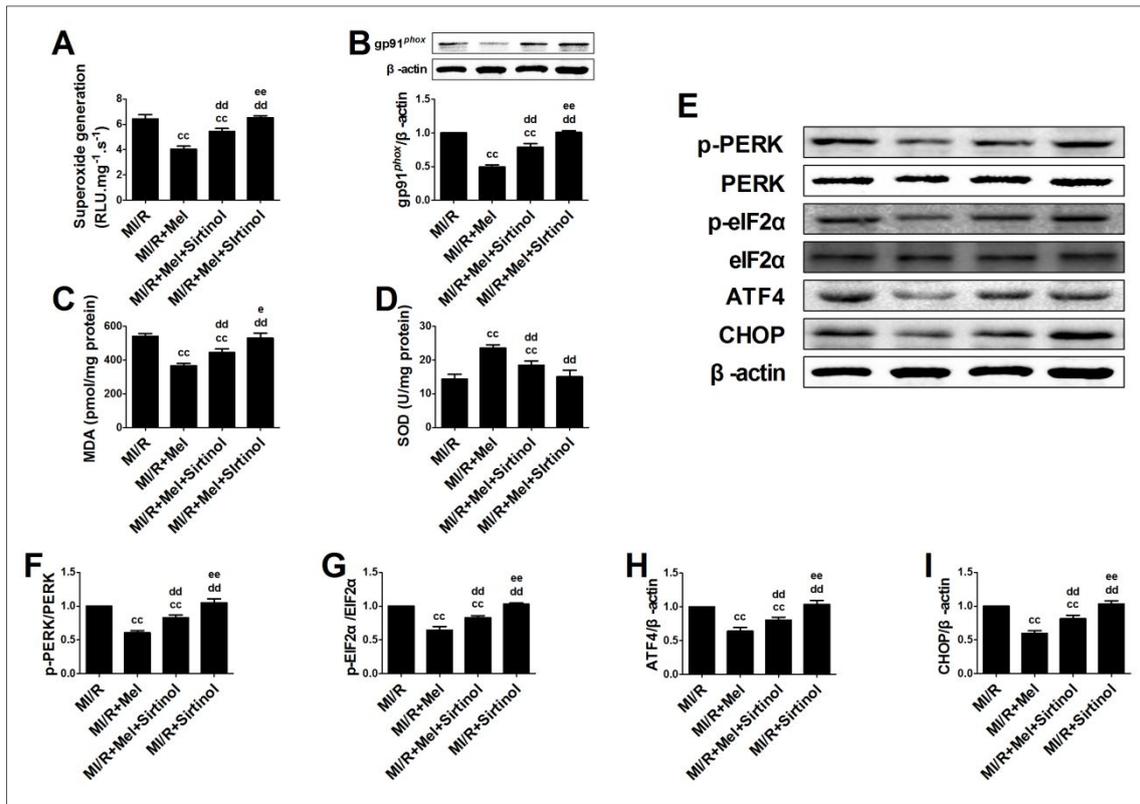


图 2-18 褪黑素及 Sirtinol 对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤后心肌氧化应激及内质网应激水平的影响。(A) 心肌超氧化物生成量; (B) 心肌 gp91^{phox} 表达量; (C) 心肌丙二醛 (MDA) 水平; (D) 心肌超氧化物歧化酶 (SOD) 水平; (E) 代表性 western blot 条带; (F) p-PERK/PERK 比值; (G) p-eIF2α / eIF2α 比值; (H) ATF4 表达; (I) CHOP 表达。结果用 mean ± S.E.M. 表示, n = 8。^{cc}P < 0.01 versus MI/R 组, ^{dd}P < 0.01 versus MI/R+Mel 组, ^{ee}P < 0.05/^{cc}P < 0.01 versus MI/R+Mel+Sirtinol 组。

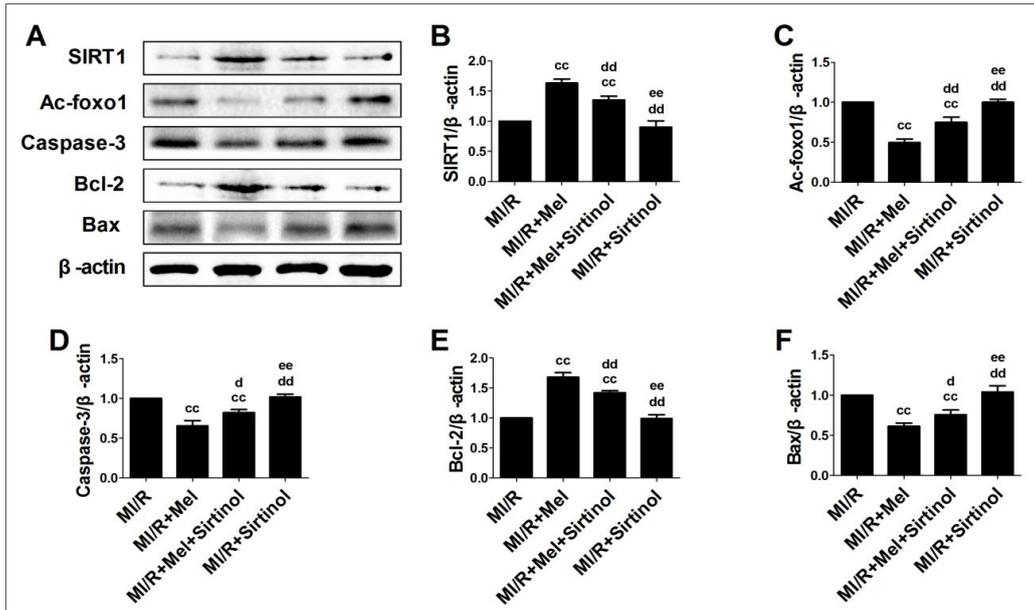


图 2-19 褪黑素及 Sirtinol 对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤后心肌 SIRT1 信号及凋亡相关分子表达的影响。(A) 代表性 western blot 条带；(B) SIRT1 表达；(C) Ac-Foxo1 表达；(D) caspase-3 表达；(E) Bcl-2 表达；(F) Bax 表达。结果用 mean \pm S.E.M. 表示, n = 8。^{cc} $P < 0.01$ versus MI/R 组, ^d $P < 0.05$ /^{dd} $P < 0.01$ versus MI/R+Mel 组, ^{ee} $P < 0.01$ versus MI/R+Mel+Sirtinol 组。

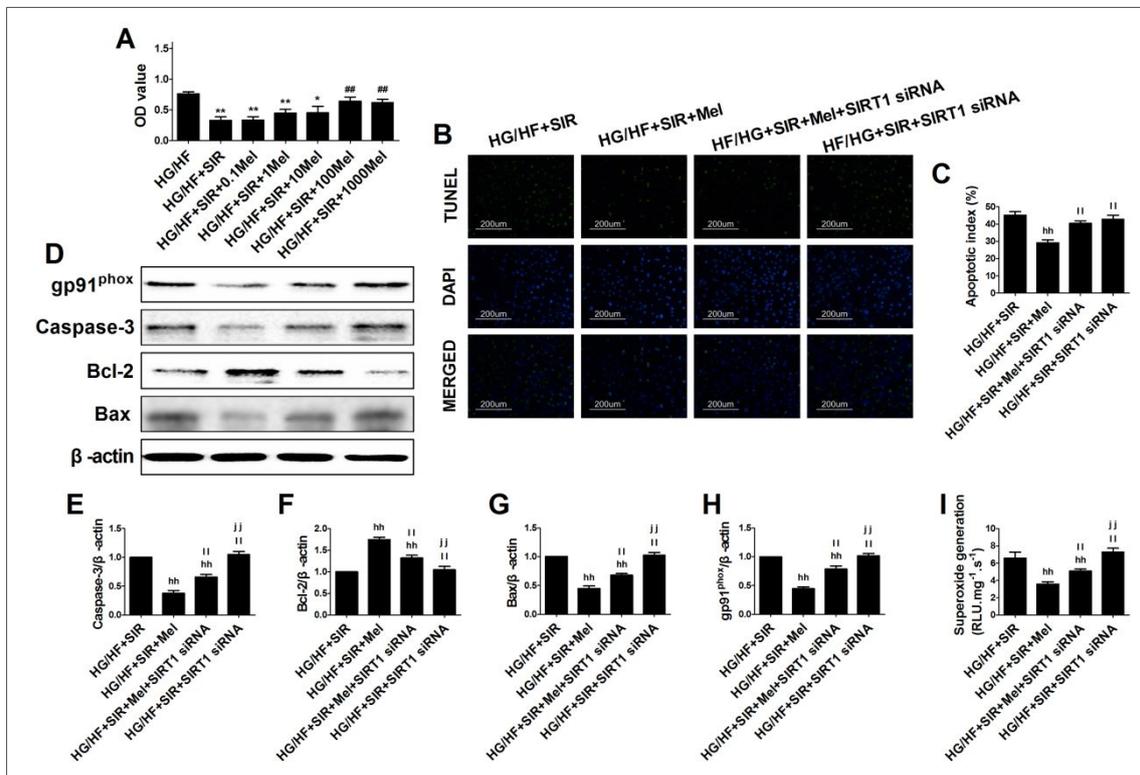


图 2-20 褪黑素及 SIRT1 siRNA 对高糖高脂培养的 H9c2 细胞模拟缺血再灌注损伤后

心肌氧化应激及凋亡水平的影响。(A) 细胞活力; (B) 代表性 TUNEL 图 (200×), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核; (C) 凋亡率统计图; (D) 代表性 western blot 条带; (E) caspase-3 表达; (F) Bcl-2 表达; (G) Bax 表达; (H) gp91^{phox} 表达; (I) 细胞超氧化物生成量。结果用 mean ± S.E.M.表示, n=8。^{hh}*P* < 0.01 versus HG/HF+SIR 组, ⁱⁱ*P* < 0.01 versus HG/HF+SIR+Mel 组, ^{jj}*P* < 0.01 versus HG/HF+SIR+Mel+SIRT1 siRNA 组。

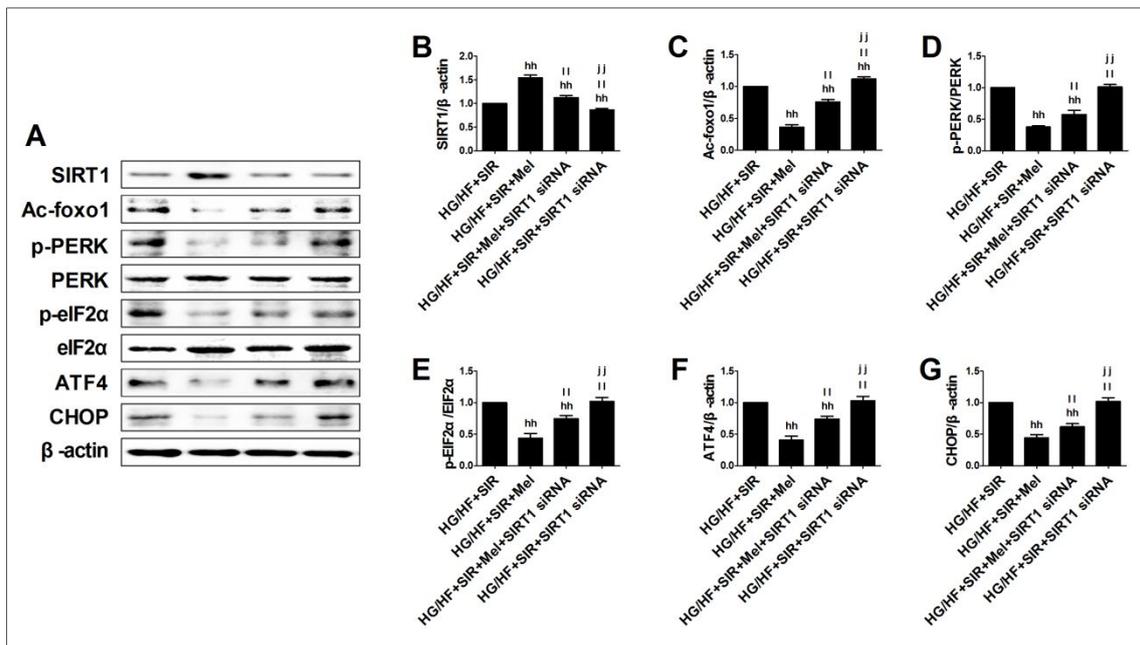


图 2-21 褪黑素及 SIRT1 siRNA 对高糖高脂培养的 H9c2 细胞模拟缺血再灌注损伤后心肌 SIRT1 信号及内质网应激水平的影响。(A) 代表性 western blot 条带; (B) SIRT1 表达; (C) Ac-Foxo1 表达; (D) p-PERK/PERK 比值; (E) p-eIF2α/eIF2α 比值; (F) ATF4 表达; (G) CHOP 表达。结果用 mean ± S.E.M.表示, n=8。^{hh}*P* < 0.01 versus HG/HF+SIR 组, ⁱⁱ*P* < 0.01 versus HG/HF+SIR+Mel 组, ^{jj}*P* < 0.01 versus HG/HF+SIR+Mel+SIRT1 siRNA 组。

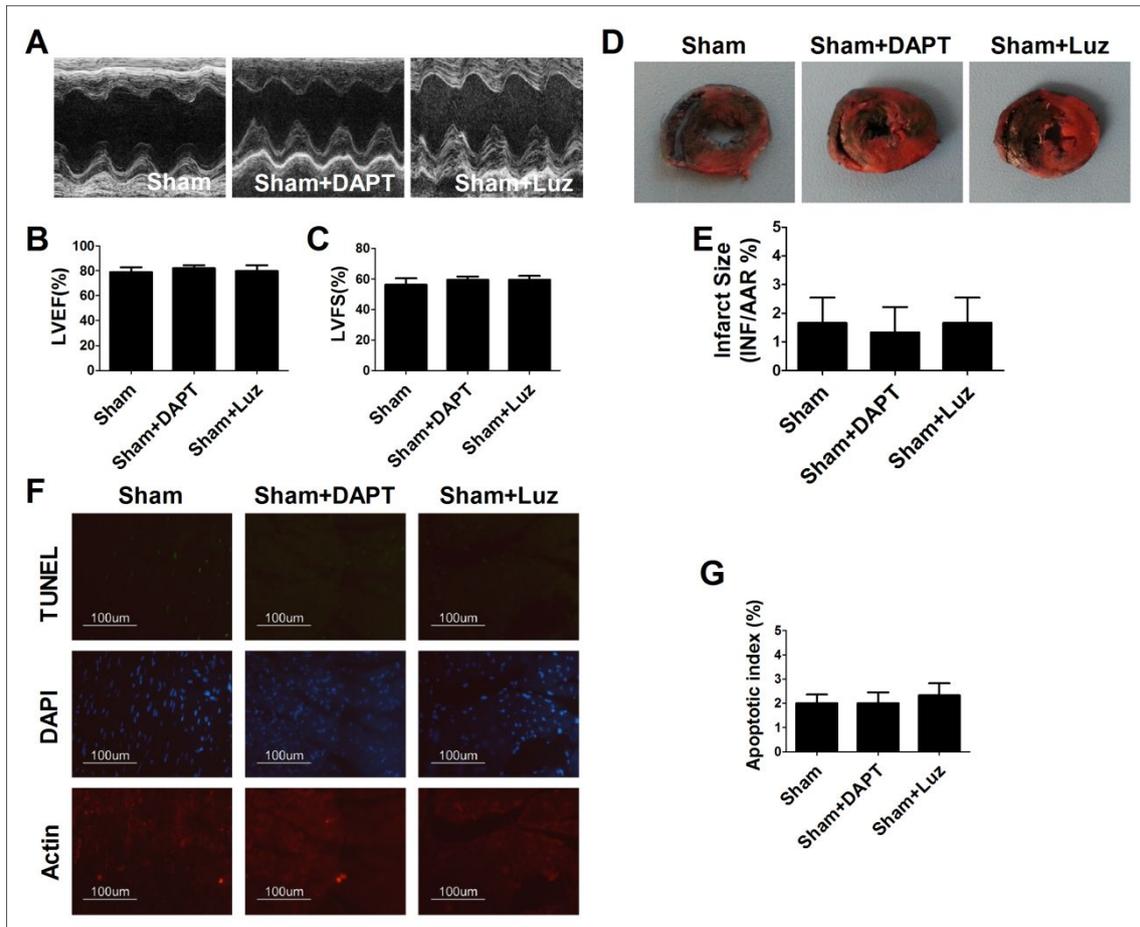


图 2-22 DAPT 及 Luzindole 处理对假手术组大鼠心功能、梗死面积及心肌凋亡率的影响。(A) 代表性超声心动图;(B) 左室射血分数(LVEF);(C) 左室缩短分数(LVFS);(D) 代表性心肌 Evans blue-TTC 双染图;(E) 心肌梗死面积统计图;(F) 代表性 TUNEL 图 (400 \times), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核;(G) 凋亡率统计图。结果用 mean \pm S.E.M.表示, n= 8。

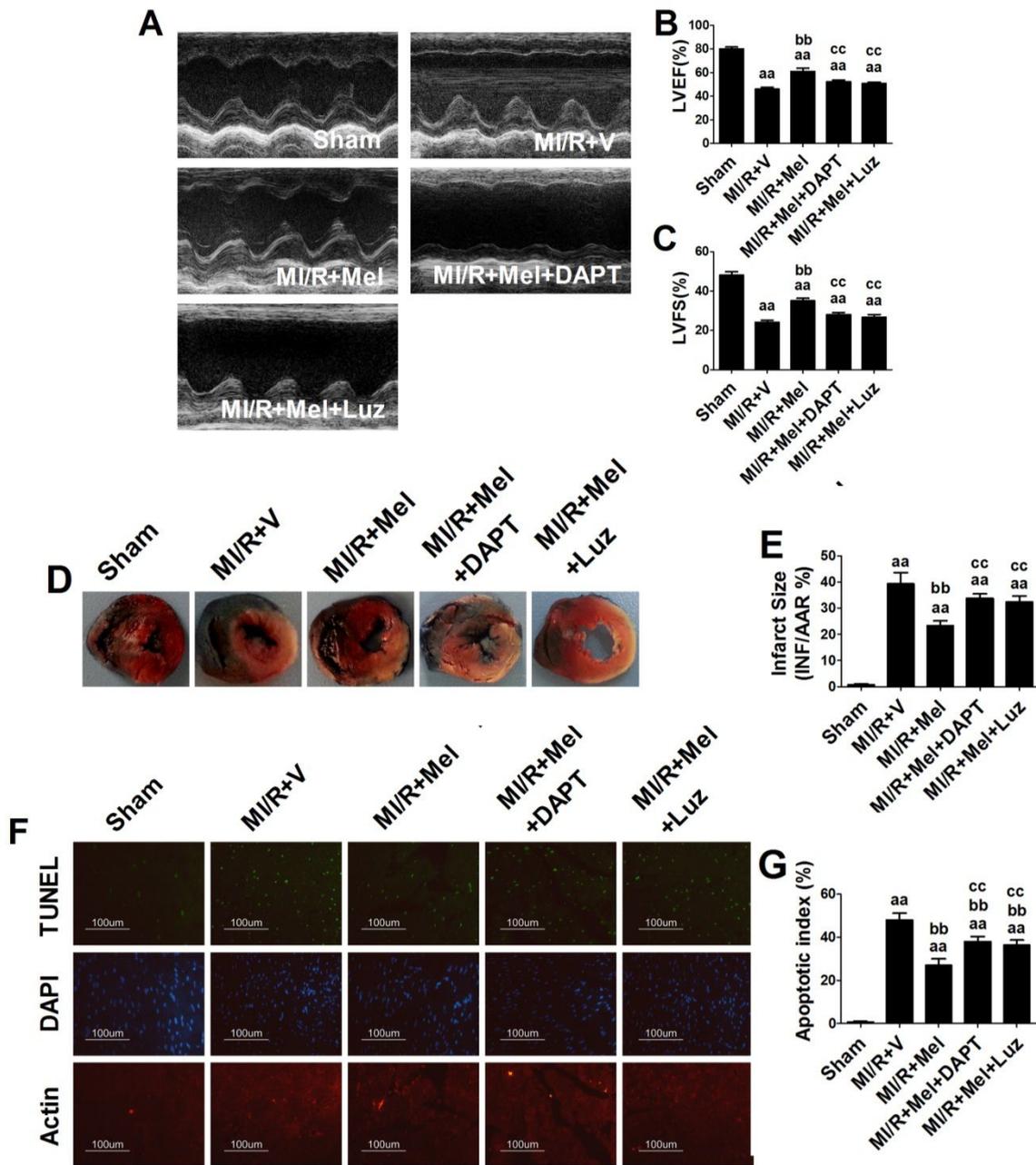


图 2-23 DAPT 及 Luzindole 处理对褪黑素心肌保护作用的影响。(A) 代表性超声心动图; (B) 左室射血分数 (LVEF); (C) 左室缩短分数 (LVFS); (D) 代表性心肌 Evans blue-TTC 双染图; (E) 心肌梗死面积统计图; (F) 代表性 TUNEL 图 (400 \times), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核; (G) 凋亡率统计图。结果用 mean \pm S.E.M. 表示, n=8。^{aa} $P < 0.01$ versus Sham 组, ^{bb} $P < 0.01$ versus MI/R+V 组, ^{cc} $P < 0.01$ versus MI/R+Mel 组。

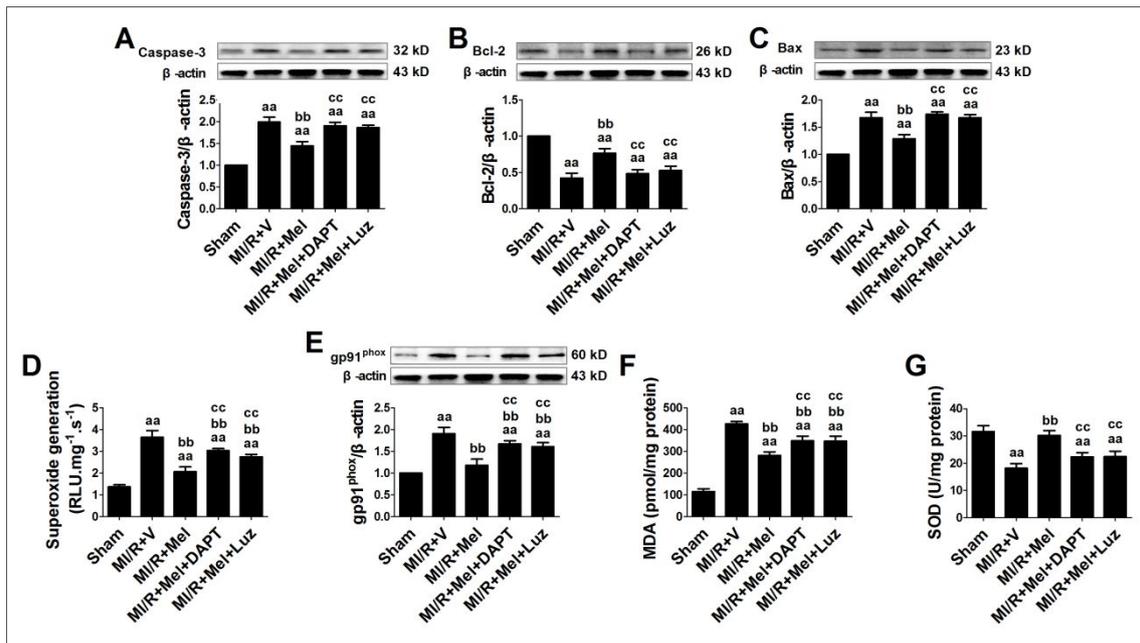


图 2-24 DAPT 及 Luzindole 处理对褪黑素抗大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌凋亡及氧化应激作用的影响。(A) caspase-3 表达; (B) Bcl-2 表达; (C) Bax 表达; (D)心肌超氧化物生成量; (E) 心肌 gp91^{phox} 表达量; (F) 心肌丙二醛 (MDA) 水平; (G) 心肌超氧化物歧化酶(SOD)水平。结果用 mean \pm S.E.M.表示, n=8。^{aa} $P < 0.01$ versus Sham 组, ^{bb} $P < 0.01$ versus MI/R+V 组, ^{cc} $P < 0.01$ versus MI/R+Mel 组。

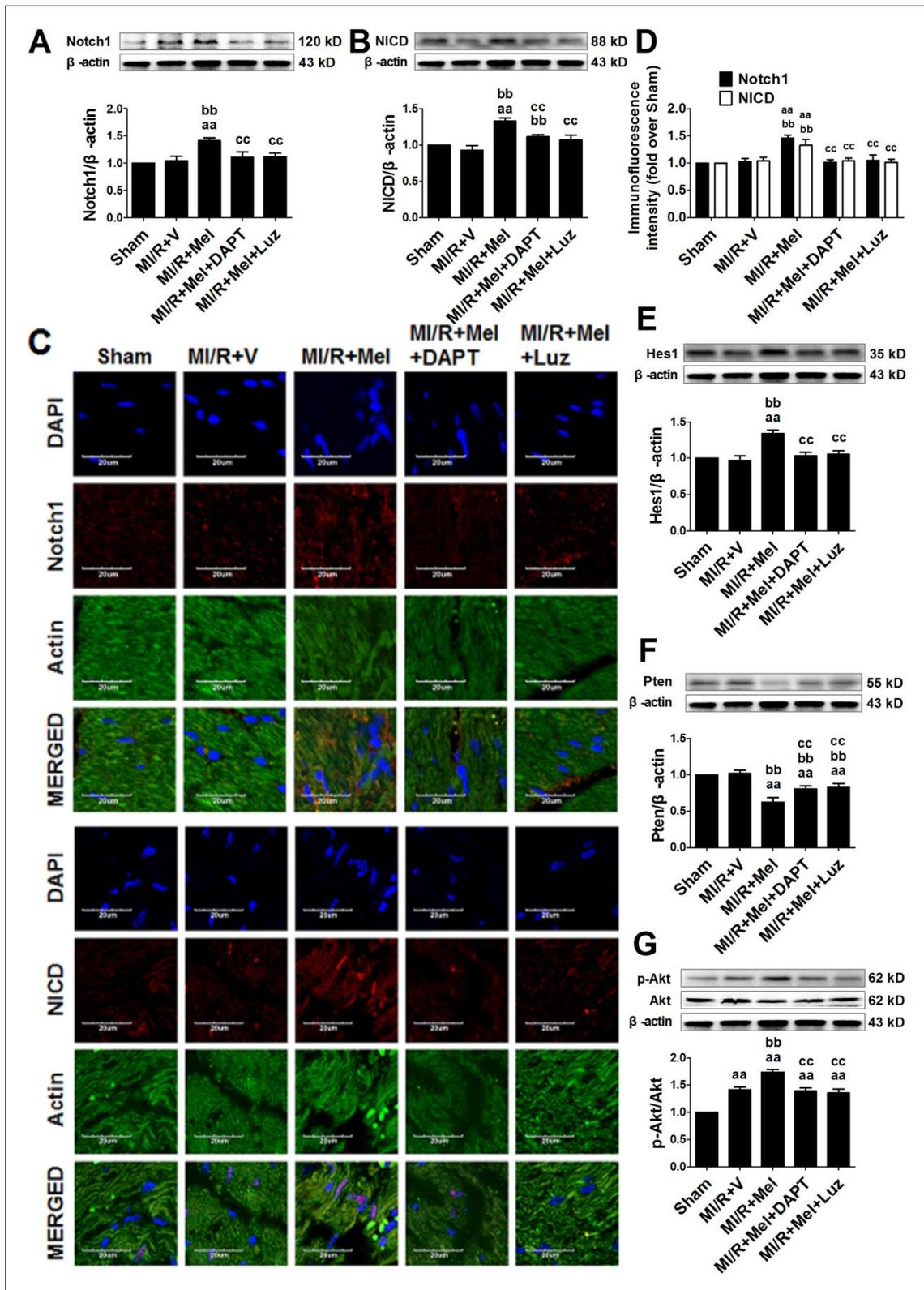


图 2-25 DAPT 及 Luzindole 处理对褪黑素调控大鼠心肌缺血/再灌注手术后心肌 Notch1/Hes1 及 PTEN/Akt 信号的影响。(A) Notch1 表达; (B) NICD 表达; (C) Notch1

及 NICD 免疫荧光染色图，蓝色荧光标示细胞核，红色荧光标示 Notch1 与 NICD，绿色荧光标示心肌细胞 (α -actin); (D) Notch1 及 NICD 的荧光强度; (E) Hes1 表达; (F) PTEN 表达; (G) p-Akt/Akt 比值。结果用 mean \pm S.E.M.表示, n= 8。^{aa} $P < 0.01$ versus Sham 组, ^{bb} $P < 0.01$ versus MI/R+V 组, ^{cc} $P < 0.01$ versus MI/R+Mel 组。

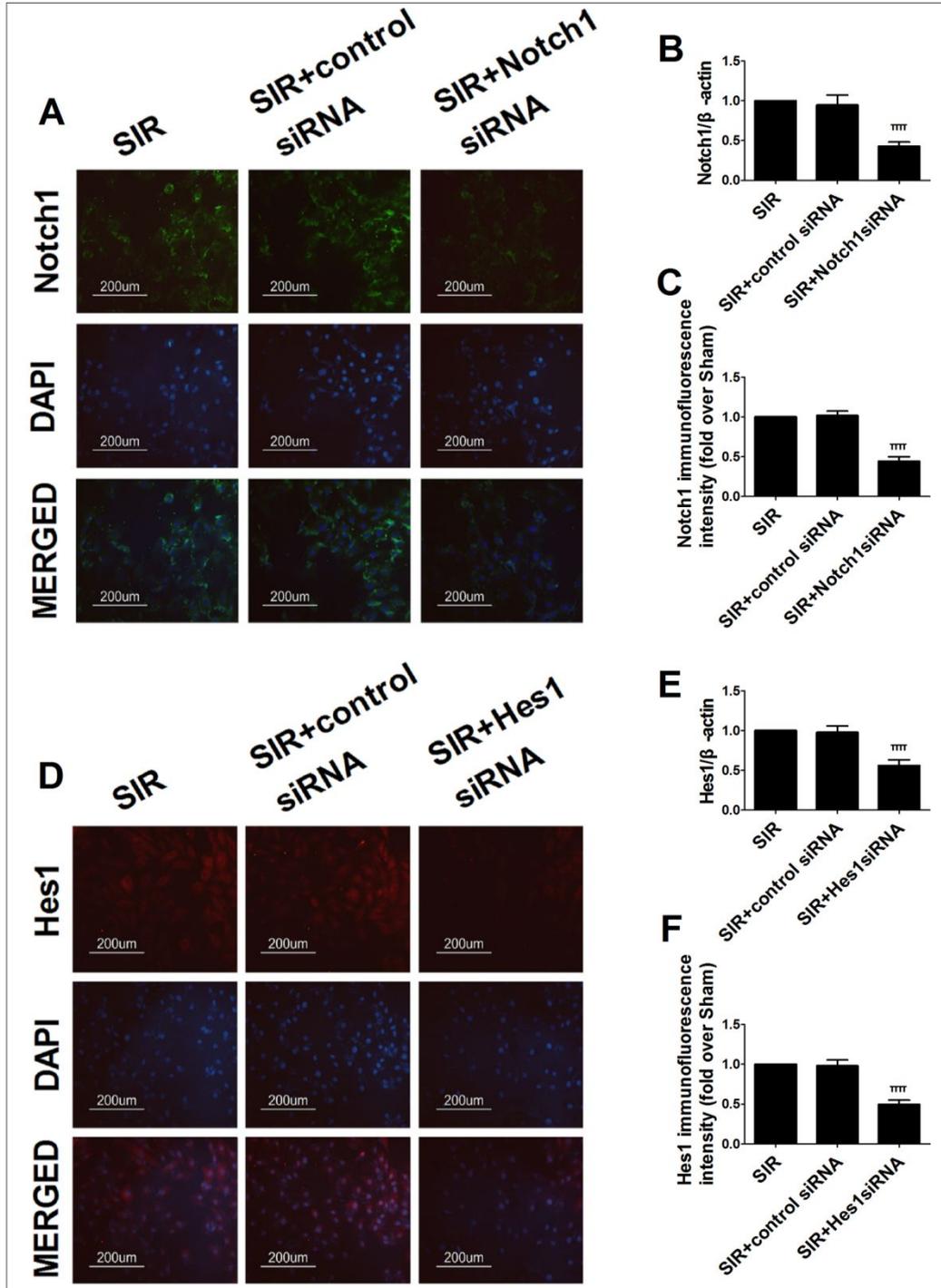


图 2-26 Notch1 siRNA 及 Hes1 siRNA 对 H9c2 细胞的干扰效率检测。(A) Notch1 免

疫荧光图 (200×), 蓝色荧光标示细胞核, 绿色荧光标示 Notch1; (B) Notch1 表达; (C) Notch1 荧光强度; (D) Hes1 免疫荧光图 (200×), 蓝色荧光标示细胞核, 红色荧光标示 Hes1; (E) Hes1 表达; (F) Hes1 荧光强度。结果用 mean ± S.E.M.表示, n= 8。
 $^{**}P < 0.01$ versus SIR+control siRNA 组。

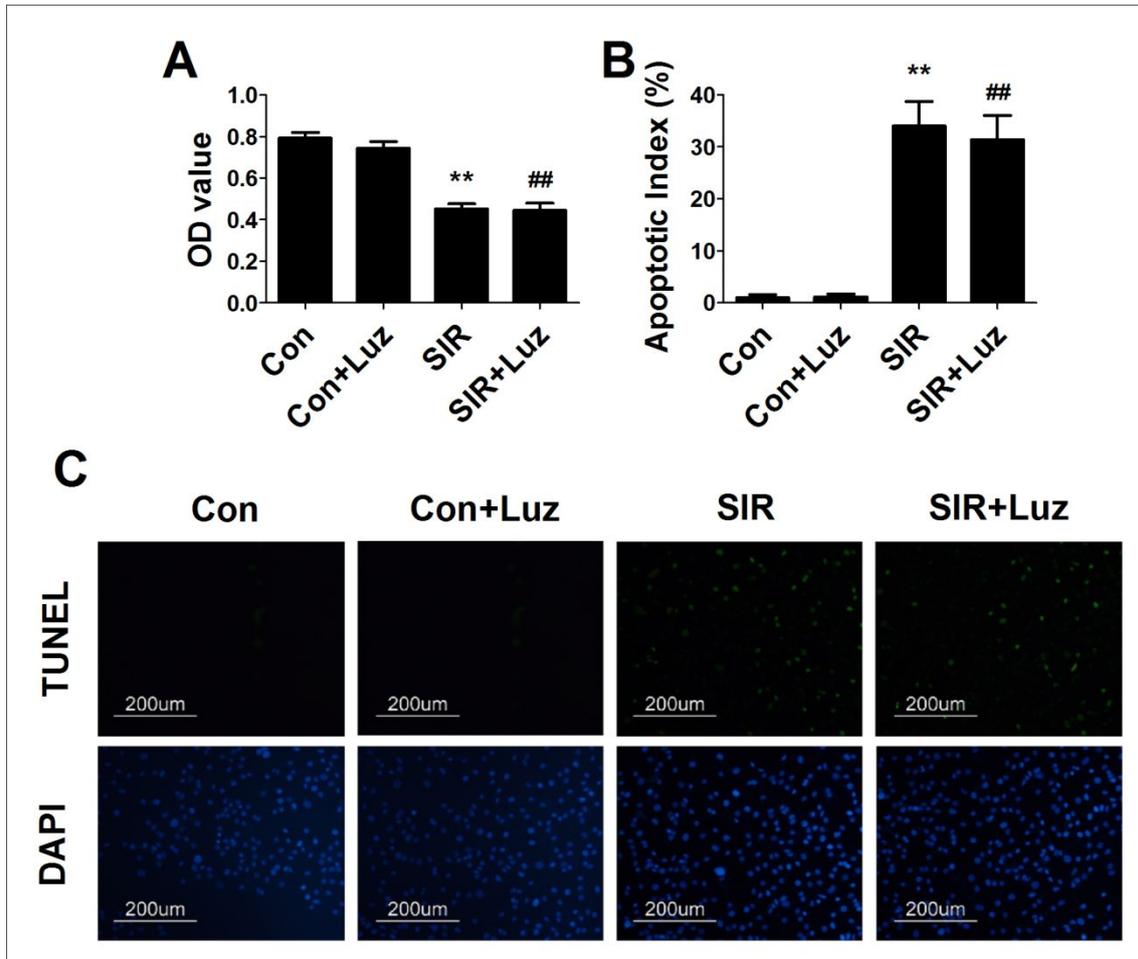


图 2-27 Luzindole 对 H9c2 细胞活力及凋亡率的影响。(A) 细胞活力; (B) 凋亡率统计图; (C) 代表性 TUNEL 图 (200×), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核。结果用 mean ± S.E.M.表示, n= 8。 $^{**}P < 0.01$ versus Con 组, $^{##}P < 0.01$ versus Con+Luz 组。

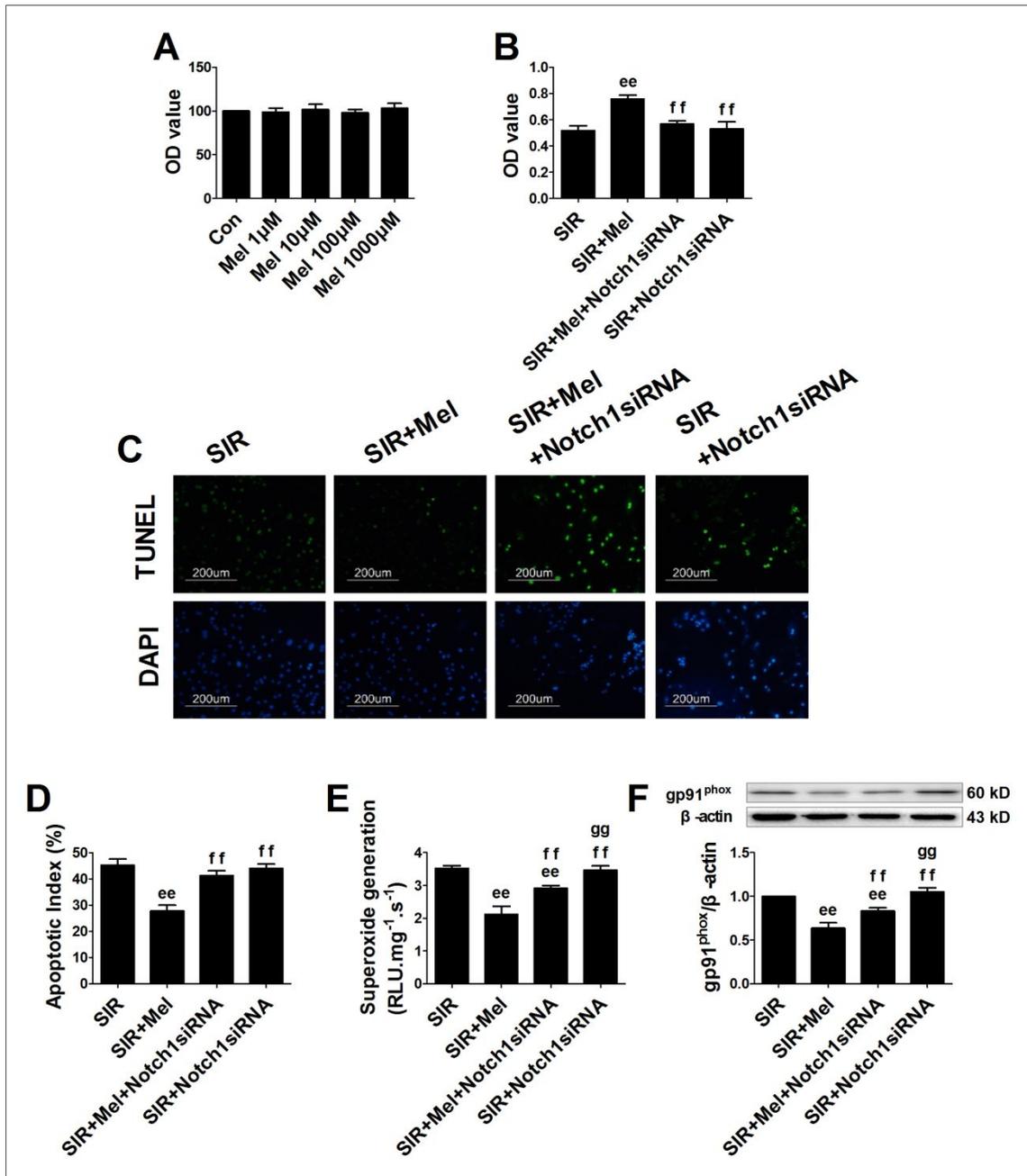


图 2-28 Notch1 siRNA 处理对褪黑素抗模拟缺血再灌注引起的细胞凋亡及氧化应激损伤的影响。(A) 细胞活力；(B) 细胞活力；(C) 代表性 TUNEL 图 (200×)，绿色标示凋亡细胞核，蓝色标示总细胞核；(D) 凋亡率统计图；(E) 细胞超氧化物生成量；(F) gp91^{phox} 表达。结果用 mean ± S.E.M.表示，n = 8。^{ee}P < 0.01 versus SIR 组，^{ff}P < 0.01 versus SIR+Mel 组，^{gg}P < 0.01 versus SIR+Mel+Notch1 siRNA 组。

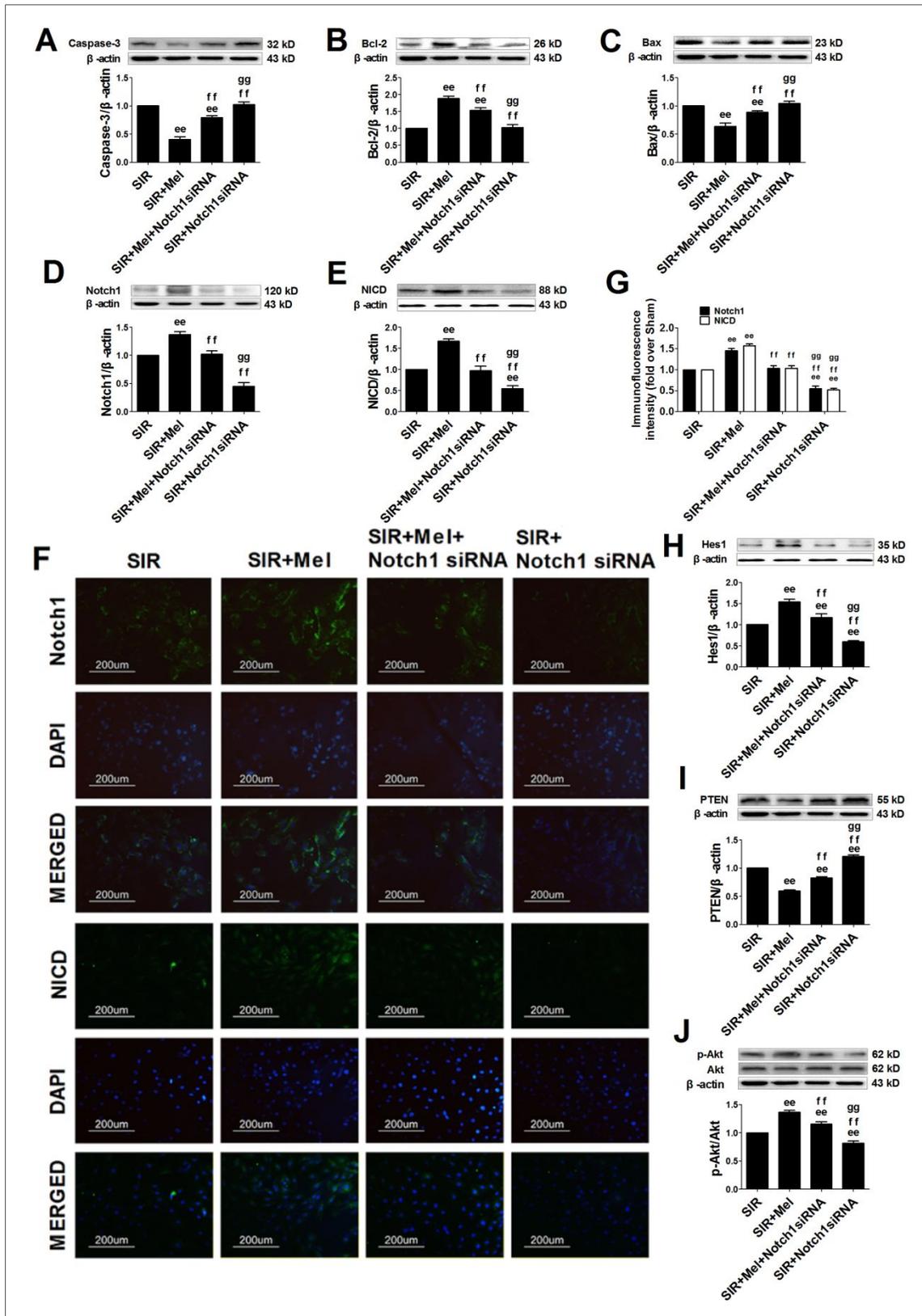


图 2-29 Notch1 siRNA 处理对褪黑素调控 H9c2 细胞 Notch1/Hes1 信号及 PTEN/Akt 信号的影响。(A) caspase-3 表达; (B) Bcl-2 表达; (C) Bax 表达; (D) Notch1 表达; (E)

NICD 表达; (F) Notch1 及 NICD 免疫荧光染色图 (200×), 蓝色荧光标示细胞核, 绿色荧光标示 Notch1 与 NICD; (G) Notch1 及 NICD 的荧光强度; (H) Hes1 表达; (I) PTEN 表达; (J) p-Akt/Akt 比值。结果用 mean ± S.E.M.表示, n= 8。^{cc}P < 0.01 versus SIR 组, ^{ff}P < 0.01 versus SIR+Mel 组, ^{ss}P < 0.01 versus SIR+Mel+Notch1 siRNA 组。

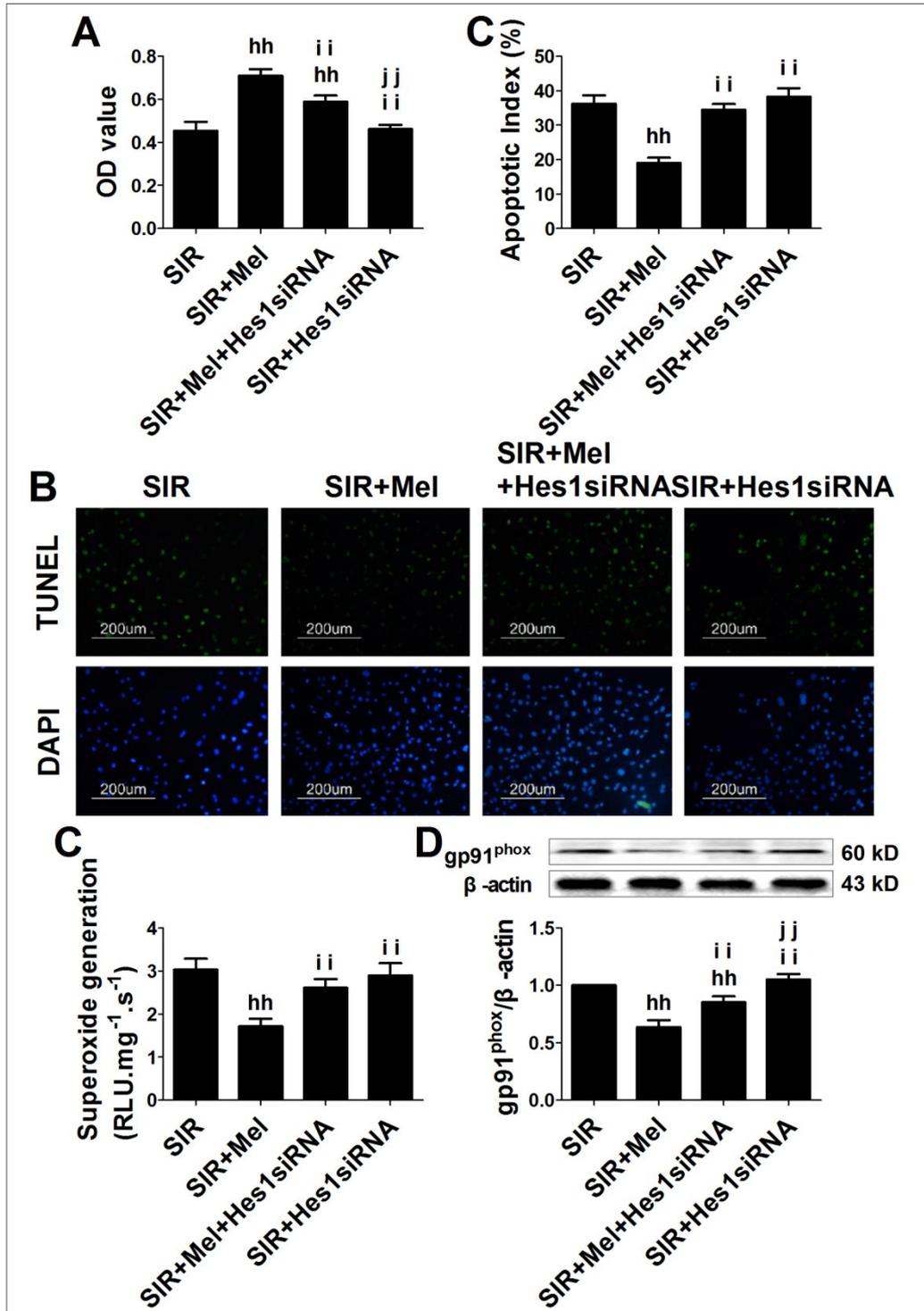


图 2-30 Hes1 siRNA 处理对褪黑素抗模拟缺血再灌注引起的细胞凋亡及氧化应激损

伤的影响。(A) 细胞活力; (B) 代表性 TUNEL 图 (200×), 绿色标示凋亡细胞核, 蓝色标示总细胞核; (C) 凋亡率统计图; (D) 细胞超氧化物生成量; (E) gp91^{phox} 表达。结果用 mean ± S.E.M.表示, n=8。^{hh}*P* < 0.01 versus SIR 组, ⁱⁱ*P* < 0.01 versus SIR+Mel 组, ^{jj}*P* < 0.01 versus SIR+Mel+Hes1 siRNA 组。

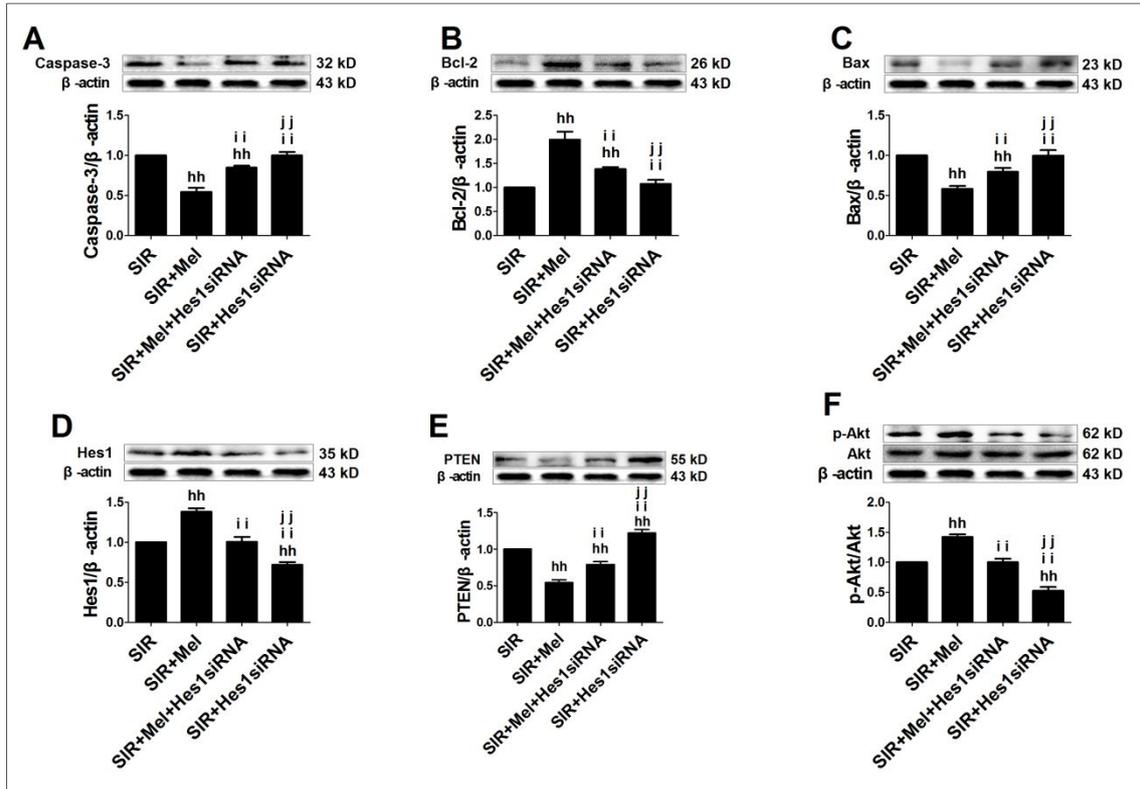


图 2-31 Notch1 siRNA 处理对褪黑素调控 H9c2 细胞凋亡信号及 PTEN/Akt 信号的影响。(A) caspase-3 表达; (B) Bcl-2 表达; (C) Bax 表达; (D) Hes1 表达; (E) PTEN 表达; (F) p-Akt/Akt 比值。结果用 mean ± S.E.M.表示, n=8。^{hh}*P* < 0.01 versus SIR 组, ⁱⁱ*P* < 0.01 versus SIR+Mel 组, ^{jj}*P* < 0.01 versus SIR+Mel+Hes1 siRNA 组。

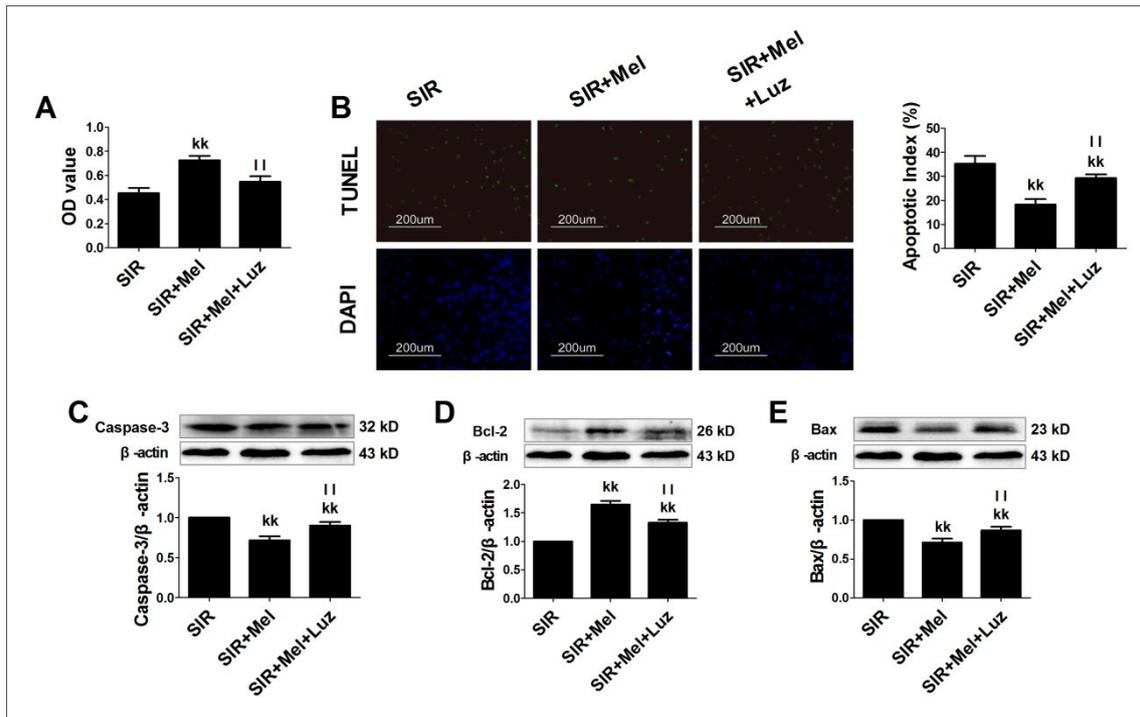


图 2-32 Luz 处理对褪黑素抗模拟缺血再灌注引起的 H9c2 细胞凋亡影响。(A) 细胞活力；(B) 左：代表性 TUNEL 图 (200 \times)，绿色标示凋亡细胞核，蓝色标示总细胞核；右：凋亡率统计图；(C) caspase-3 表达；(D) Bcl-2 表达；(E) Bax 表达。结果用 mean \pm S.E.M.表示，n=8。^{kk} $P < 0.01$ versus SIR 组，^{ll} $P < 0.01$ versus SIR+Mel 组。

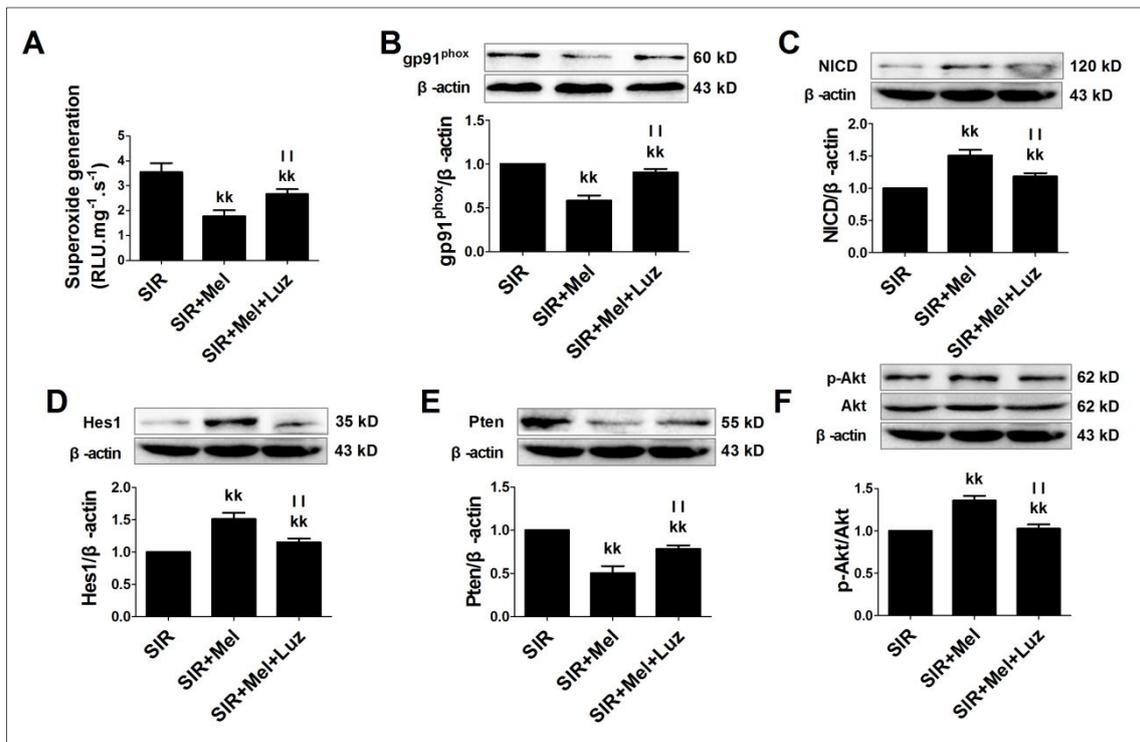


图 2-33 Luz 处理对褪黑素抗模拟缺血再灌注引起的 H9c2 细胞氧化应激及

Notch1/Hes1 信号、PTEN/Akt 信号的影响。(A) 细胞超氧化物生成量; (B) gp91^{phox} 表达; (C) NICD 表达; (D) Hes1 表达; (E) PTEN 表达; (F) p-Akt/Akt 比值。结果用 mean ± S.E.M.表示, n=8。^{kk}P < 0.01 versus SIR 组, ^{ll}P < 0.01 versus SIR+Mel 组。

表 1. DAPT及Luz对褪黑素改善心肌缺血/再灌注术后心功能的影响

	Sham	MI/R+V	MI/R+Mel	MI/R+Mel+ DAPT	MI/R+Mel+ Luz
心率 (bpm)	327 ± 34	347 ± 15	337 ± 31	331 ± 26	329 ± 39
左心室测量值					
舒张末期内径(mm)	6.8 ± 0.7	6.8 ± 0.8	6.9 ± 0.6	7.0 ± 0.4	7.1 ± 0.5
收缩末期内径 (mm)	3.5 ± 0.4	5.2 ± 0.3 ^{aa}	4.5 ± 0.3 ^{aabb}	5.1 ± 0.2 ^{aacc}	5.2 ± 0.2 ^{aacc}
室间隔厚度 (mm)	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.5	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.5
后壁厚度 (mm)	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.4
左心室功能指标					
射血分数(%)	80.0 ± 4.6	45.9 ± 4.1 ^{aa}	61.0 ± 5.2 ^{aabb}	52.2 ± 3.7 ^{aacc}	50.8 ± 3.0 ^{aacc}
缩短分数(%)	48.1 ± 4.9	24.1 ± 2.6 ^{aa}	35.1 ± 3.6 ^{aabb}	28.1 ± 2.9 ^{aacc}	26.8 ± 3.4 ^{aacc}

结果用 mean ± S.E.M.表示, n=8。^{aa}P < 0.01 versus Sham 组, ^{bb}P < 0.01 versus MI/R+V 组, ^{cc}P < 0.01 versus MI/R+Mel 组。

小结及主要创新点

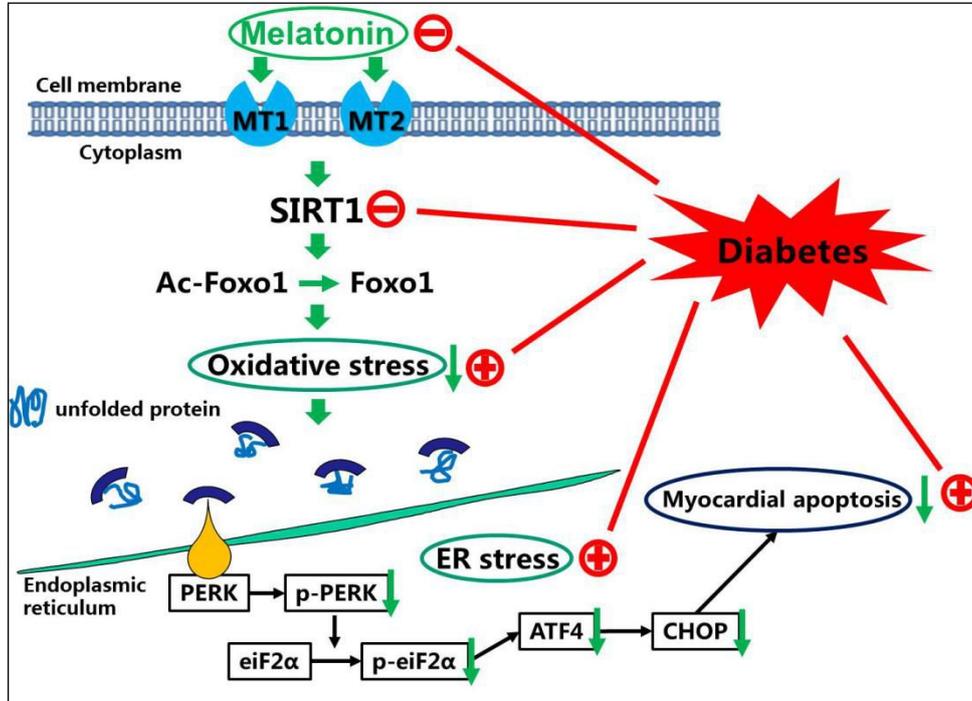


图 3-1 褪黑素通过褪黑素膜受体激动 SIRT1 信号通路抗心肌缺血/再灌注损伤的机制

(1) 在非糖尿病状态下，激活 SIRT1 信号进而促进内源性抗氧化酶合成减轻氧化应激是褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的新机制，且褪黑素膜受体参与此过程。

(2) 在 2 型糖尿病状态下，心肌 SIRT1 信号受损可导致氧化应激及 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 介导的内质网应激损伤加重，这是糖尿病缺血心肌损伤加重的新机制。我们首先发现褪黑素可通过激动 SIRT1 信号减轻糖尿病心肌缺血/再灌注损伤，保护心功能（图 3-1）。

(3) 褪黑素还可通过褪黑素膜受体介导的途径激活 Notch1/Hes1 信号通路进而调控 PTEN/Akt 抑制心肌凋亡，减轻心肌缺血/再灌注损伤。

(4) 本研究揭示了褪黑素心血管保护作用的新机制，提示褪黑素治疗可能是抗糖尿病心肌缺血损伤的新策略。同时，褪黑素膜受体及 Notch1 信号可能是心肌保护药物研发的靶点。

参考文献

- [1] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 朱曼璐, 王文, 王拥军, 吴兆苏, 李惠君, 郑哲, 蒋立新, 胡盛寿. 《中国心血管病报告 2014》概要.[J]. 中国循环杂志 2015(07): 617-622.
- [2] Domanski MJ, Fuster V, Diaz-Mitoma F, Grundy S, Lloyd-Jones D, Mamdani M, Roberts R, Thorpe K, Hall J, Udell JA, Farkouh ME. Next Steps in Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Rationale for and Design of the ECAD Trial. *J Am Coll Cardiol* 2015; 66(16): 1828-1836.
- [3] Liakopoulos OJ, Kuhn EW, Hellmich M, Kuhr K, Krause P, Reuter H, Thurat M, Choi YH, Wahlers T. Statin Recapture Therapy before Coronary Artery Bypass Grafting Trial: Rationale and study design of a multicenter, randomized, double-blinded controlled clinical trial. *Am Heart J* 2015; 170(1): 46-54, 54 e41-42.
- [4] Pell VR, Chouchani ET, Murphy MP, Brookes PS, Krieg T. Moving Forwards by Blocking Back-Flow: The Yin and Yang of MI Therapy. *Circ Res* 2016; 118(5): 898-906.
- [5] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Cardioprotection and pharmacological therapies in acute myocardial infarction: Challenges in the current era. *World J Cardiol* 2014; 6(3): 100-106.
- [6] Thind GS, Agrawal PR, Hirsh B, Saravolatz L, Chen-Scarabelli C, Narula J, Scarabelli TM. Mechanisms of myocardial ischemia-reperfusion injury and the cytoprotective role of minocycline: scope and limitations. *Future Cardiol* 2015; 11(1): 61-76.
- [7] Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56(5): 786-794.
- [8] Walters JW, Amos D, Ray K, Santanam N. Mitochondrial redox status as a target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2016; 27: 50-55.
- [9] Bartz RR, Suliman HB, Piantadosi CA. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection. *Front Physiol* 2015; 6: 291.
- [10] Das S, Steenbergen C. Mitochondrial adenine nucleotide transport and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52(2): 448-453.

- [11] Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart* 2016; 102(5): 341-348.
- [12] Lee BL, Sykes BD, Fliegel L. Structural and functional insights into the cardiac Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 61: 60-67.
- [13] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013; 123(1): 92-100.
- [14] Gibson CM, Krucoff M, Kirtane AJ, Rao SV, Mackall JA, Matthews R, Saba S, Waksman R, Holmes D. Design and rationale of the ANALYZE ST study: a prospective, nonrandomized, multicenter ST monitoring study to detect acute coronary syndrome events in implantable cardioverter-defibrillator patients. *Am Heart J* 2014; 168(4): 424-429 e421.
- [15] Pomblum VJ, Korbmayer B, Cleveland S, Sunderdiek U, Klocke RC, Schipke JD. Cardiac stunning in the clinic: the full picture. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010; 10(1): 86-91.
- [16] Krug A, Du Mesnil de R, Korb G. Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res* 1966; 19(1): 57-62.
- [17] Kleinbongard P, Bose D, Baars T, Mohlenkamp S, Konorza T, Schoner S, Elter-Schulz M, Eggebrecht H, Degen H, Haude M, Levkau B, Schulz R, Erbel R, Heusch G. Vasoconstrictor potential of coronary aspirate from patients undergoing stenting of saphenous vein aortocoronary bypass grafts and its pharmacological attenuation. *Circ Res* 2011; 108(3): 344-352.
- [18] Kaul S. The "no reflow" phenomenon following acute myocardial infarction: mechanisms and treatment options. *J Cardiol* 2014; 64(2): 77-85.
- [19] Betgem RP, de Waard GA, Nijveldt R, Beek AM, Escaned J, van Royen N. Intramyocardial haemorrhage after acute myocardial infarction. *Nat Rev Cardiol* 2015; 12(3): 156-167.
- [20] Durante A, Camici PG. Novel insights into an "old" phenomenon: the no reflow. *Int J Cardiol* 2015; 187: 273-280.
- [21] Iwakura K, Ito H, Takiuchi S, Taniyama Y, Nakatsuchi Y, Negoro S, Higashino Y, Okamura A, Masuyama T, Hori M, Fujii K, Minamino T. Alternation in the coronary blood flow velocity pattern in patients with no reflow and reperfused acute myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94(6): 1269-1275.
- [22] Ito H, Tomooka T, Sakai N, Yu H, Higashino Y, Fujii K, Masuyama T, Kitabatake A, Minamino

- T. Lack of myocardial perfusion immediately after successful thrombolysis. A predictor of poor recovery of left ventricular function in anterior myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85(5): 1699-1705.
- [23] Bouleti C, Mewton N, Germain S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Arch Cardiovasc Dis* 2015; 108(12): 661-674.
- [24] Lim SY. No-Reflow Phenomenon by Intracoronary Thrombus in Acute Myocardial Infarction. *Chonnam Med J* 2016; 52(1): 38-44.
- [25] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 2007; 357(11): 1121-1135.
- [26] Ibanez B, Fuster V, Jimenez-Borreguero J, Badimon JJ. Lethal myocardial reperfusion injury: a necessary evil? *Int J Cardiol* 2011; 151(1): 3-11.
- [27] Braunersreuther V, Jaquet V. Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(1): 97-114.
- [28] Effect of 48-h intravenous trimetazidine on short- and long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction, with and without thrombolytic therapy; A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. The EMIP-FR Group. *European Myocardial Infarction Project--Free Radicals. Eur Heart J* 2000; 21(18): 1537-1546.
- [29] Smith RA, Hartley RC, Murphy MP. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(12): 3021-3038.
- [30] Kleinbongard P, Baars T, Heusch G. Calcium antagonists in myocardial ischemia/reperfusion--update 2012. *Wien Med Wochenschr* 2012; 162(13-14): 302-310.
- [31] Neuhof C, Neuhof H. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol* 2014; 6(7): 638-652.
- [32] Chen S, Li S. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit* 2012; 18(11): RA161-165.
- [33] Ong SB, Dongworth RK, Cabrera-Fuentes HA, Hausenloy DJ. Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism. *Br J Pharmacol* 2015; 172(8): 2074-2084.
- [34] Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2015;

- 78: 23-34.
- [35] Shanmuganathan S, Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM. Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(1): H237-242.
- [36] Wang M, Sun GB, Zhang JY, Luo Y, Yu YL, Xu XD, Meng XB, Zhang MD, Lin WB, Sun XB. Elatoside C protects the heart from ischaemia/reperfusion injury through the modulation of oxidative stress and intracellular Ca(2)(+) homeostasis. *Int J Cardiol* 2015; 185: 167-176.
- [37] Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61(3): 481-497.
- [38] Chen O, Ye Z, Cao Z, Manaenko A, Ning K, Zhai X, Zhang R, Zhang T, Chen X, Liu W, Sun X. Methane attenuates myocardial ischemia injury in rats through anti-oxidative, anti-apoptotic and anti-inflammatory actions. *Free Radic Biol Med* 2016; 90: 1-11.
- [39] Liu H, Guo X, Chu Y, Lu S. Heart protective effects and mechanism of quercetin preconditioning on anti-myocardial ischemia reperfusion (IR) injuries in rats. *Gene* 2014; 545(1): 149-155.
- [40] Martel C, Granger CB, Ghitescu M, Stebbins A, Fortier A, Armstrong PW, Bonnefoy A, Theroux P. Pexelizumab fails to inhibit assembly of the terminal complement complex in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. Insight from a substudy of the Assessment of Pexelizumab in Acute Myocardial Infarction (APEX-AMI) trial. *Am Heart J* 2012; 164(1): 43-51.
- [41] Vogt S, Troitzsch D, Moosdorf R. Epicardial measurement of alterations in extracellular pH and electrolytes during ischemia and reperfusion in cardiac surgery. *Biomed Tech (Berl)* 2009; 54(6): 315-321.
- [42] Inserte J, Ruiz-Meana M, Rodriguez-Sinovas A, Barba I, Garcia-Dorado D. Contribution of delayed intracellular pH recovery to ischemic postconditioning protection. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(5): 923-939.
- [43] Cohen MV, Yang XM, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 2007; 115(14): 1895-1903.
- [44] Cominacini L, Mozzini C, Garbin U, Pasini A, Stranieri C, Solani E, Vallerio P, Tinelli IA, Fratta

- Pasini A. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2015; 88(Pt B): 233-242.
- [45] Wu H, Ye M, Yang J, Ding J. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: A possible role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2016; 208: 65-66.
- [46] Toth A, Nickson P, Mandl A, Bannister ML, Toth K, Erhardt P. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007; 7(3): 205-218.
- [47] Belaidi E, Thomas A, Bourdier G, Moulin S, Lemarie E, Levy P, Pepin JL, Korichneva I, Godin-Ribuot D, Arnaud C. Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia. *Int J Cardiol* 2016; 210: 45-53.
- [48] Anjana RM, Deepa M, Mohan V. Response to Comment on Anjana et al. Incidence of Diabetes and Prediabetes and Predictors of Progression Among Asian Indians: 10-Year Follow-up of the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Diabetes Care* 2015;38:1441-1448. *Diabetes Care* 2015; 38(12): e212.
- [49] 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版).[J]. *中国糖尿病杂志* 2014(08): 2-42.
- [50] Zlobine I, Gopal K, Ussher JR. Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 2016.
- [51] Budoff MJ, Raggi P, Beller GA, Berman DS, Druz RS, Malik S, Rigolin VH, Weigold WG, Soman P. Noninvasive Cardiovascular Risk Assessment of the Asymptomatic Diabetic Patient: The Imaging Council of the American College of Cardiology. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016; 9(2): 176-192.
- [52] Greer JJ, Ware DP, Lefer DJ. Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(1): H146-153.
- [53] Yu Q, Gao F, Ma XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2011; 89(3): 516-524.
- [54] Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12(3): 144-153.
- [55] Laakso M, Kuusisto J. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease

- development. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10(5): 293-302.
- [56] Guo S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol* 2014; 220(2): T1-T23.
- [57] Botker HE, Moller N, Schmitz O, Bagger JP, Nielsen TT. Myocardial insulin resistance in patients with syndrome X. *J Clin Invest* 1997; 100(8): 1919-1927.
- [58] Mercanoglu G, Safran N, Ahishali BB, Uzun H, Yalcin A, Mercanoglu F. Nitric oxide mediated effects of nebivolol in myocardial infarction: the source of nitric oxide. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(24): 4872-4889.
- [59] Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14(9): 623-641.
- [60] Bonavida B, Garban H. Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics. *Redox Biol* 2015; 6: 486-494.
- [61] Patruno A, Franceschelli S, Pesce M, Maccallini C, Fantacuzzi M, Speranza L, Ferrone A, De Lutiis MA, Ricciotti E, Amoroso R, Felaco M. Novel aminobenzyl-acetamidine derivative modulate the differential regulation of NOSs in LPS induced inflammatory response: role of PI3K/Akt pathway. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(12): 2095-2104.
- [62] Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2012; 38(3): 183-191.
- [63] Hopps E, Canino B, Caimi G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta Diabetol* 2011; 48(3): 183-189.
- [64] Gonsolin D, Couturier K, Garait B, Rondel S, Novel-Chate V, Peltier S, Faure P, Gachon P, Boirie Y, Keriell C, Favier R, Pepe S, Demaison L, Leverve X. High dietary sucrose triggers hyperinsulinemia, increases myocardial beta-oxidation, reduces glycolytic flux and delays post-ischemic contractile recovery. *Mol Cell Biochem* 2007; 295(1-2): 217-228.
- [65] Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)* 2014; 29(5): 325-333.
- [66] Nawaz MA, Huang Y, Bie Z, Ahmed W, Reiter RJ, Niu M, Hameed S. Melatonin: Current Status and Future Perspectives in Plant Science. *Front Plant Sci* 2015; 6: 1230.
- [67] Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martinez-Madrid MJ, Reiter R, Hardeland R, Rol MA,

- Madrid JA. Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *Int J Mol Sci* 2014; 15(12): 23448-23500.
- [68] Garcia JJ, Lopez-Pingarron L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, Garcia-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramirez JM, Bernal-Perez M. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J Pineal Res* 2014; 56(3): 225-237.
- [69] Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010; 181: 127-151.
- [70] Yiallourou SR, Wallace EM, Miller SL, Horne RS. Effects of intrauterine growth restriction on sleep and the cardiovascular system: The use of melatonin as a potential therapy? *Sleep Med Rev* 2016; 26: 64-73.
- [71] Yang Y, Sun Y, Yi W, Li Y, Fan C, Xin Z, Jiang S, Di S, Qu Y, Reiter RJ, Yi D. A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases. *J Pineal Res* 2014; 57(4): 357-366.
- [72] Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC, Jancik J, Svacinova H, Vasku J, Kuchtickova S, Horky M, Wolf JE. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology* 2003; 9(3): 179-187.
- [73] Yang Y, Duan W, Jin Z, Yi W, Yan J, Zhang S, Wang N, Liang Z, Li Y, Chen W, Yi D, Yu S. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pineal Res* 2013; 55(3): 275-286.
- [74] Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14(4): 151-168.
- [75] Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AM. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(3): 614-620.
- [76] Galano A, Medina ME, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis. *J Pineal Res* 2015; 58(1): 107-116.
- [77] Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's

- metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013; 54(3): 245-257.
- [78] Bonnefont-Rousselot D, Collin F, Jore D, Gardes-Albert M. Reaction mechanism of melatonin oxidation by reactive oxygen species in vitro. *J Pineal Res* 2011; 50(3): 328-335.
- [79] Thomas SR, Stocker R. Antioxidant activities and redox regulation of interferon-gamma-induced tryptophan metabolism in human monocytes and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 541-552.
- [80] Mancini A, Raimondo S, Persano M, Di Segni C, Cammarano M, Gadotti G, Silvestrini A, Pontecorvi A, Meucci E. Estrogens as antioxidant modulators in human fertility. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 607939.
- [81] Paredes SD, Forman KA, Garcia C, Vara E, Escames G, Tresguerres JA. Protective actions of melatonin and growth hormone on the aged cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014; 18(2): 79-88.
- [82] Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Arch Toxicol* 2015; 89(6): 923-939.
- [83] Ciftci M, Bilici D, Kufrevioglu OI. Effects of melatonin on enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Pharmacol Res* 2001; 44(1): 7-11.
- [84] Carpizo R, Martinez A, Mediavilla D, Gonzalez M, Abad A, Sanchez-Barcelo EJ. Smith-Magenis syndrome: a case report of improved sleep after treatment with beta1-adrenergic antagonists and melatonin. *J Pediatr* 2006; 149(3): 409-411.
- [85] Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res* 2007; 42(4): 319-322.
- [86] Burgess HJ. Melatonin: an adjunctive treatment for cardiometabolic disease? *Sleep* 2012; 35(10): 1319-1320.
- [87] Zanoloni A, Zanoloni-Muciaccia W. Experimental hypertension in pinealectomized rats. *Life Sci* 1967; 6(21): 2327-2331.
- [88] Li HL, Kang YM, Yu L, Xu HY, Zhao H. Melatonin reduces blood pressure in rats with stress-induced hypertension via GABAA receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(4): 436-440.

- [89] Obayashi K, Saeki K, Kurumatani N. Higher melatonin secretion is associated with lower leukocyte and platelet counts in the general elderly population: the HEIJO-KYO cohort. *J Pineal Res* 2015; 58(2): 227-233.
- [90] Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K, Oohata H, Nishino H, Koike H. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens A* 1987; 9(7): 1121-1131.
- [91] Nava M, Quiroz Y, Vaziri N, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(3): F447-454.
- [92] A KL, Wu L, Foucart S, de Champlain J. Impaired basal sympathetic tone and alpha1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998; 11(2): 219-229.
- [93] Portaluppi F. The circadian organization of the cardiovascular system in health and disease. *Indian J Exp Biol* 2014; 52(5): 395-398.
- [94] Enzminger H, Witte K, Lemmer B. Altered melatonin production in TGR(mREN2)27 rats: on the regulation by adrenergic agonists, antagonists and angiotensin II in cultured pinealocytes. *J Pineal Res* 2001; 31(3): 256-263.
- [95] Pozo MJ, Gomez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Martin-Cano FE, Pascua P, Rol MA, Acuna-Castroviejo D, Camello PJ. Melatonin, a potential therapeutic agent for smooth muscle-related pathological conditions and aging. *Curr Med Chem* 2010; 17(34): 4150-4165.
- [96] Escames G, Khaldy H, Leon J, Gonzalez L, Acuna-Castroviejo D. Changes in iNOS activity, oxidative stress and melatonin levels in hypertensive patients treated with lacidipine. *J Hypertens* 2004; 22(3): 629-635.
- [97] Qiao YF, Guo WJ, Li L, Shao S, Qiao X, Shao JJ, Zhang Q, Li RS, Wang LH. Melatonin attenuates hypertension-induced renal injury partially through inhibiting oxidative stress in rats. *Mol Med Rep* 2016; 13(1): 21-26.
- [98] Gottlieb S, Kolker S, Shlomo N, Matetzky S, Leitersdorf E, Segev A, Goldenberg I, Tzivoni D, Weisz G, Moriel M. Association between statin treatment and LDL-cholesterol levels on the rate of ST-elevation myocardial infarction among patients with acute coronary syndromes: ACS Israeli Survey (ACSIS) 2002-2010. *Int J Cardiol* 2016; 210: 133-138.

- [99] Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Oliván J, Fabiani F, Garcia-Perganeda A, Osuna C. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res* 2000; 28(3): 150-155.
- [100] Kozirog M, Poliwczak AR, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Broncel M. Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res* 2011; 50(3): 261-266.
- [101] Simko F, Bednarova KR, Krajcirovicova K, Hrenak J, Celec P, Kamodyova N, Gajdosechova L, Zorad S, Adamcova M. Melatonin reduces cardiac remodeling and improves survival in rats with isoproterenol-induced heart failure. *J Pineal Res* 2014; 57(2): 177-184.
- [102] Grad BR, Rozenzweig R. The role of melatonin and serotonin in aging: update. *Psychoneuroendocrinology* 1993; 18(4): 283-295.
- [103] Girotti L, Lago M, Ianovsky O, Elizari MV, Dini A, Perez Lloret S, Albornoz LE, Cardinali DP. Low urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in patients with severe congestive heart failure. *Endocrine* 2003; 22(3): 245-248.
- [104] Ghosh G, De K, Maity S, Bandyopadhyay D, Bhattacharya S, Reiter RJ, Bandyopadhyay A. Melatonin protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. *J Pineal Res* 2007; 42(1): 71-82.
- [105] Sahach VF, Rudyk OV, Vavilova HL, Kotsiuruba AV, Tkachenko Iu P. [Melatonin recovers ischemic tolerance and decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of aging rats]. *Fiziol Zh* 2006; 52(3): 3-14.
- [106] Giacomo CG, Antonio M. Melatonin in cardiac ischemia/reperfusion-induced mitochondrial adaptive changes. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007; 7(3): 163-169.
- [107] Liu LF, Qin Q, Qian ZH, Shi M, Deng QC, Zhu WP, Zhang H, Tao XM, Liu Y. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion induced myocardial damage and hemodynamic recovery in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(23): 3681-3686.
- [108] Petrosillo G, Di Venosa N, Pistolese M, Casanova G, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Paradies G, Ruggiero FM. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia-reperfusion: role of cardiolipin. *FASEB J* 2006; 20(2): 269-276.

- [109] Petrosillo G, Colantuono G, Moro N, Ruggiero FM, Tiravanti E, Di Venosa N, Fiore T, Paradies G. Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297(4): H1487-1493.
- [110] Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44(4): 175-200.
- [111] Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res* 2011; 51(1): 1-16.
- [112] Zhang HM, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 2014; 57(2): 131-146.
- [113] Sahna E, Deniz E, Bay-Karabulut A, Burma O. Melatonin protects myocardium from ischemia-reperfusion injury in hypertensive rats: role of myeloperoxidase activity. *Clin Exp Hypertens* 2008; 30(7): 673-681.
- [114] Benova M, Herichova I, Stebelova K, Paulis L, Krajcirovicova K, Simko F, Zeman M. Effect of L-NAME-induced hypertension on melatonin receptors and melatonin levels in the pineal gland and the peripheral organs of rats. *Hypertens Res* 2009; 32(4): 242-247.
- [115] Cheng MC, Wu TH, Huang LT, Tain YL. Renoprotective effects of melatonin in young spontaneously hypertensive rats with L-NAME. *Pediatr Neonatol* 2014; 55(3): 189-195.
- [116] Mohri T, Iwakura T, Nakayama H, Fujio Y. JAK-STAT signaling in cardiomyogenesis of cardiac stem cells. *JAKSTAT* 2012; 1(2): 125-130.
- [117] Knight RA, Scarabelli TM, Stephanou A. STAT transcription in the ischemic heart. *JAKSTAT* 2012; 1(2): 111-117.
- [118] Barry SP, Townsend PA, Latchman DS, Stephanou A. Role of the JAK-STAT pathway in myocardial injury. *Trends Mol Med* 2007; 13(2): 82-89.
- [119] Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA, Das DK. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(11): 1929-1936.
- [120] Tian Y, Zhang W, Xia D, Modi P, Liang D, Wei M. Postconditioning inhibits myocardial apoptosis during prolonged reperfusion via a JAK2-STAT3-Bcl-2 pathway. *J Biomed Sci* 2011; 18: 53.

- [121] Li Y, Zhu W, Tao J, Xin P, Liu M, Li J, Wei M. Fasudil protects the heart against ischemia-reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress and modulating SERCA activity: the differential role for PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signaling pathways. *PLoS One* 2012; 7(10): e48115.
- [122] Luan HF, Zhao ZB, Zhao QH, Zhu P, Xiu MY, Ji Y. Hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia and reperfusion injury mediated by the JAK2/STAT3 survival pathway. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45(10): 898-905.
- [123] Jiang X, Guo CX, Zeng XJ, Li HH, Chen BX, Du FH. A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion via the JAK2/STAT3 pathway. *Apoptosis* 2015; 20(8): 1033-1047.
- [124] Zhao GL, Yu LM, Gao WL, Duan WX, Jiang B, Liu XD, Zhang B, Liu ZH, Zhai ME, Jin ZX, Yu SQ, Wang Y. Berberine protects rat heart from ischemia/reperfusion injury via activating JAK2/STAT3 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37(3): 354-367.
- [125] Paulis L, Simko F, Laudon M. Cardiovascular effects of melatonin receptor agonists. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21(11): 1661-1678.
- [126] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P. The role of melatonin in acute myocardial infarction. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17: 2433-2441.
- [127] Lochner A, Huisamen B, Nduhirabandi F. Cardioprotective effect of melatonin against ischaemia/reperfusion damage. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013; 5: 305-315.
- [128] Lau WW, Ng JK, Lee MM, Chan AS, Wong YH. Interleukin-6 autocrine signaling mediates melatonin MT(1/2) receptor-induced STAT3 Tyr(705) phosphorylation. *J Pineal Res* 2012; 52(4): 477-489.
- [129] Wang Z, Liu D, Wang J, Liu S, Gao M, Ling EA, Hao A. Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment in vitro. *J Pineal Res* 2012; 52(2): 253-264.
- [130] Picinato MC, Hirata AE, Cipolla-Neto J, Curi R, Carvalho CR, Anhe GF, Carpinelli AR. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 2008; 44(1): 88-94.
- [131] Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a

- NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(21): 9926-9930.
- [132] Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Carcinog* 2009; 48(2): 91-104.
- [133] Buendia I, Michalska P, Navarro E, Gameiro I, Egea J, Leon R. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* 2016; 157: 84-104.
- [134] Giudice A, Arra C, Turco MC. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol Biol* 2010; 647: 37-74.
- [135] Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Ozercan IH, Yilmaz O, Sahin F, Sahin K. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab (Lond)* 2013; 10(1): 7.
- [136] Abed DA, Goldstein M, Albanyan H, Jin H, Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5(4): 285-299.
- [137] Vriend J, Reiter RJ. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 401: 213-220.
- [138] Aparicio-Soto M, Alarcon-de-la-Lastra C, Cardeno A, Sanchez-Fidalgo S, Sanchez-Hidalgo M. Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages. *Br J Pharmacol* 2014; 171(1): 134-144.
- [139] Tao RR, Huang JY, Shao XJ, Ye WF, Tian Y, Liao MH, Fukunaga K, Lou YJ, Han F, Lu YM. Ischemic injury promotes Keap1 nitration and disturbance of antioxidative responses in endothelial cells: a potential vasoprotective effect of melatonin. *J Pineal Res* 2013; 54(3): 271-281.
- [140] Haghjooy Javanmard S, Ziaei A, Ziaei S, Ziaei E, Mirmohammad-Sadeghi M. The effect of preoperative melatonin on nuclear erythroid 2-related factor 2 activation in patients undergoing

- coronary artery bypass grafting surgery. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 676829.
- [141] Korkmaz A, Ma S, Topal T, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. Glucose: a vital toxin and potential utility of melatonin in protecting against the diabetic state. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349(2): 128-137.
- [142] Peschke E, Schucht H, Muhlbauer E. Long-term enteral administration of melatonin reduces plasma insulin and increases expression of pineal insulin receptors in both Wistar and type 2-diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Pineal Res* 2010; 49(4): 373-381.
- [143] Gorray KC, Quay WB. Effects of pinealectomy and of sham-pinealectomy on blood glucose levels in the alloxan-diabetic rat. *Horm Metab Res* 1978; 10(5): 389-392.
- [144] de Oliveira AC, Andreotti S, Farias Tda S, Torres-Leal FL, de Proenca AR, Campana AB, de Souza AH, Sertie RA, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J, Lima FB. Metabolic disorders and adipose tissue insulin responsiveness in neonatally STZ-induced diabetic rats are improved by long-term melatonin treatment. *Endocrinology* 2012; 153(5): 2178-2188.
- [145] Luo XY, Qu SL, Tang ZH, Zhang Y, Liu MH, Peng J, Tang H, Yu KL, Zhang C, Ren Z, Jiang ZS. SIRT1 in cardiovascular aging. *Clin Chim Acta* 2014; 437: 106-114.
- [146] Ma L, Li Y. SIRT1: role in cardiovascular biology. *Clin Chim Acta* 2015; 440: 8-15.
- [147] Paraiso AF, Mendes KL, Santos SH. Brain activation of SIRT1: role in neuropathology. *Mol Neurobiol* 2013; 48(3): 681-689.
- [148] Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Commun Signal* 2011; 9: 11.
- [149] Pillai JB, Chen M, Rajamohan SB, Samant S, Pillai VB, Gupta M, Gupta MP. Activation of SIRT1, a class III histone deacetylase, contributes to fructose feeding-mediated induction of the alpha-myosin heavy chain expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(3): H1388-1397.
- [150] Chong ZZ, Wang S, Shang YC, Maiese K. Targeting cardiovascular disease with novel SIRT1 pathways. *Future Cardiol* 2012; 8(1): 89-100.
- [151] Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2012; 107(4): 273.
- [152] Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide

- phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 2004; 279(49): 50754-50763.
- [153] Zhang T, Berrocal JG, Frizzell KM, Gamble MJ, DuMond ME, Krishnakumar R, Yang T, Sauve AA, Kraus WL. Enzymes in the NAD⁺ salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters. *J Biol Chem* 2009; 284(30): 20408-20417.
- [154] Gorospe M, de Cabo R. AsSIRTING the DNA damage response. *Trends Cell Biol* 2008; 18(2): 77-83.
- [155] Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005; 123(3): 437-448.
- [156] Kim JE, Chen J, Lou Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* 2008; 451(7178): 583-586.
- [157] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339(8808): 1523-1526.
- [158] Chen CJ, Yu W, Fu YC, Wang X, Li JL, Wang W. Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378(3): 389-393.
- [159] Guo Y, Zhang L, Li F, Hu CP, Zhang Z. Restoration of sirt1 function by pterostilbene attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2016; 776: 26-33.
- [160] Lou Y, Wang Z, Xu Y, Zhou P, Cao J, Li Y, Chen Y, Sun J, Fu L. Resveratrol prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in H9c2 cells through the inhibition of endoplasmic reticulum stress and the activation of the Sirt1 pathway. *Int J Mol Med* 2015; 36(3): 873-880.
- [161] Cappetta D, Esposito G, Piegari E, Russo R, Ciuffreda LP, Rivellino A, Berrino L, Rossi F, De Angelis A, Urbanek K. SIRT1 activation attenuates diastolic dysfunction by reducing cardiac fibrosis in a model of anthracycline cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2016; 205: 99-110.
- [162] Yamamoto T, Sadoshima J. Protection of the heart against ischemia/reperfusion by silent information regulator 1. *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21(1): 27-32.
- [163] Hou J, Wang S, Shang YC, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin employs cell longevity pathways of SIRT1 to foster endothelial vascular integrity during oxidant stress. *Curr Neurovasc*

- Res 2011; 8(3): 220-235.
- [164] Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K, Horio Y. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J Biol Chem* 2010; 285(11): 8375-8382.
- [165] Winnik S, Auwerx J, Sinclair DA, Matter CM. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Eur Heart J* 2015; 36(48): 3404-3412.
- [166] Melnik BC, John SM, Schmitz G. Over-stimulation of insulin/IGF-1 signaling by western diet may promote diseases of civilization: lessons learnt from laron syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8: 41.
- [167] Hou J, Chong ZZ, Shang YC, Maiese K. Early apoptotic vascular signaling is determined by Sirt1 through nuclear shuttling, forkhead trafficking, bad, and mitochondrial caspase activation. *Curr Neurovasc Res* 2010; 7(2): 95-112.
- [168] Zhang QJ, Wang Z, Chen HZ, Zhou S, Zheng W, Liu G, Wei YS, Cai H, Liu DP, Liang CC. Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2008; 80(2): 191-199.
- [169] Kim YH, Hwang JH, Kim KS, Noh JR, Gang GT, Seo Y, Nam KH, Kwak TH, Lee HG, Lee CH. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activation reduces blood pressure through regulation of endothelial nitric oxide synthase acetylation in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2015; 28(1): 50-57.
- [170] Sun Y, Li J, Xiao N, Wang M, Kou J, Qi L, Huang F, Liu B, Liu K. Pharmacological activation of AMPK ameliorates perivascular adipose/endothelial dysfunction in a manner interdependent on AMPK and SIRT1. *Pharmacol Res* 2014; 89: 19-28.
- [171] Li W, Du D, Wang H, Liu Y, Lai X, Jiang F, Chen D, Zhang Y, Zong J, Li Y. Silent information regulator 1 (SIRT1) promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells through the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(3): 2274-2287.
- [172] Stein S, Matter CM. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis. *Cell Cycle* 2011; 10(4): 640-647.
- [173] Hung LM, Su MJ, Chen JK. Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2004;

- 36(6): 774-781.
- [174] Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, Shao D, Takagi H, Oka S, Sadoshima J. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* 2010; 122(21): 2170-2182.
- [175] Yu L, Li Q, Yu B, Yang Y, Jin Z, Duan W, Zhao G, Zhai M, Liu L, Yi D, Chen M, Yu S. Berberine Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Reducing Oxidative Stress and Inflammation Response: Role of Silent Information Regulator 1. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1689602.
- [176] Ding M, Lei J, Han H, Li W, Qu Y, Fu E, Fu F, Wang X. SIRT1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via activating eNOS in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 14: 143.
- [177] Dernek S, Ikizler M, Erkasap N, Ergun B, Koken T, Yilmaz K, Sevin B, Kaygisiz Z, Kural T. Cardioprotection with resveratrol pretreatment: improved beneficial effects over standard treatment in rat hearts after global ischemia. *Scand Cardiovasc J* 2004; 38(4): 245-254.
- [178] Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* 2007; 100(10): 1512-1521.
- [179] Sundaresan NR, Pillai VB, Wolfgeher D, Samant S, Vasudevan P, Parekh V, Raghuraman H, Cunningham JM, Gupta M, Gupta MP. The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy. *Sci Signal* 2011; 4(182): ra46.
- [180] Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Sirt1 acts in association with PPARalpha to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res* 2011; 90(2): 276-284.
- [181] Passariello CL, Zini M, Nassi PA, Pignatti C, Stefanelli C. Upregulation of SIRT1 deacetylase in phenylephrine-treated cardiomyoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 407(3): 512-516.
- [182] Balan V, Miller GS, Kaplun L, Balan K, Chong ZZ, Li F, Kaplun A, VanBerkum MF, Arking R, Freeman DC, Maiese K, Tzivion G. Life span extension and neuronal cell protection by *Drosophila* nicotinamidase. *J Biol Chem* 2008; 283(41): 27810-27819.

- [183] Yang Y, Duan W, Li Y, Jin Z, Yan J, Yu S, Yi D. Novel role of silent information regulator 1 in myocardial ischemia. *Circulation* 2013; 128(20): 2232-2240.
- [184] Nadtochiy SM, Redman E, Rahman I, Brookes PS. Lysine deacetylation in ischaemic preconditioning: the role of SIRT1. *Cardiovasc Res* 2011; 89(3): 643-649.
- [185] Nadtochiy SM, Yao H, McBurney MW, Gu W, Guarente L, Rahman I, Brookes PS. SIRT1-mediated acute cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(4): H1506-1512.
- [186] Shao D, Oka S, Brady CD, Haendeler J, Eaton P, Sadoshima J. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52(3): 550-558.
- [187] Vinciguerra M, Santini MP, Martinez C, Paziienza V, Claycomb WC, Giuliani A, Rosenthal N. mIGF-1/JNK1/SirT1 signaling confers protection against oxidative stress in the heart. *Aging Cell* 2012; 11(1): 139-149.
- [188] Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(27): 10042-10047.
- [189] Wang B, Yang Q, Sun YY, Xing YF, Wang YB, Lu XT, Bai WW, Liu XQ, Zhao YX. Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice. *J Cell Mol Med* 2014; 18(8): 1599-1611.
- [190] Li Y, Xu S, Giles A, Nakamura K, Lee JW, Hou X, Donmez G, Li J, Luo Z, Walsh K, Guarente L, Zang M. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J* 2011; 25(5): 1664-1679.
- [191] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 428-435.
- [192] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140(3): 313-326.
- [193] Wu B, Yu L, Wang Y, Wang H, Li C, Yin Y, Yang J, Wang Z, Zheng Q, Ma H. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in aged heart improves the autophagy by reducing the carbonyl modification on SIRT1. *Oncotarget* 2016; 7(3): 2175-2188.
- [194] Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V. Glucose

- restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell* 2008; 14(5): 661-673.
- [195] Cuesta S, Kireev R, Garcia C, Rancan L, Vara E, Tresguerres JA. Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Age (Dordr)* 2013; 35(3): 659-671.
- [196] Gutierrez-Cuesta J, Tajés M, Jimenez A, Coto-Montes A, Camins A, Pallas M. Evaluation of potential pro-survival pathways regulated by melatonin in a murine senescence model. *J Pineal Res* 2008; 45(4): 497-505.
- [197] Cheng Y, Cai L, Jiang P, Wang J, Gao C, Feng H, Wang C, Pan H, Yang Y. SIRT1 inhibition by melatonin exerts antitumor activity in human osteosarcoma cells. *Eur J Pharmacol* 2013; 715(1-3): 219-229.
- [198] Jung-Hynes B, Reiter RJ, Ahmad N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *J Pineal Res* 2010; 48(1): 9-19.
- [199] Jung-Hynes B, Schmit TL, Reagan-Shaw SR, Siddiqui IA, Mukhtar H, Ahmad N. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *J Pineal Res* 2011; 50(2): 140-149.
- [200] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; 137(2): 216-233.
- [201] Ferrari R, Rizzo P. The Notch pathway: a novel target for myocardial remodelling therapy? *Eur Heart J* 2014; 35(32): 2140-2145.
- [202] Sewell W, Sparrow DB, Smith AJ, Gonzalez DM, Rappaport EF, Dunwoodie SL, Kusumi K. Cyclical expression of the Notch/Wnt regulator Nrarp requires modulation by Dll3 in somitogenesis. *Dev Biol* 2009; 329(2): 400-409.
- [203] Weerkamp F, Luis TC, Naber BA, Koster EE, Jeannotte L, van Dongen JJ, Staal FJ. Identification of Notch target genes in uncommitted T-cell progenitors: No direct induction of a T-cell specific gene program. *Leukemia* 2006; 20(11): 1967-1977.
- [204] Rizzo P, Mele D, Caliceti C, Pannella M, Fortini C, Clementz AG, Morelli MB, Aquila G, Ameri P, Ferrari R. The role of notch in the cardiovascular system: potential adverse effects of investigational notch inhibitors. *Front Oncol* 2014; 4: 384.

- [205] Croquelois A, Domenighetti AA, Nemir M, Lepore M, Rosenblatt-Velin N, Radtke F, Pedrazzini T. Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway. *J Exp Med* 2008; 205(13): 3173-3185.
- [206] Gude NA, Emmanuel G, Wu W, Cottage CT, Fischer K, Quijada P, Muraski JA, Alvarez R, Rubio M, Schaefer E, Sussman MA. Activation of Notch-mediated protective signaling in the myocardium. *Circ Res* 2008; 102(9): 1025-1035.
- [207] Kratsios P, Catela C, Salimova E, Huth M, Berno V, Rosenthal N, Mourkioti F. Distinct roles for cell-autonomous Notch signaling in cardiomyocytes of the embryonic and adult heart. *Circ Res* 2010; 106(3): 559-572.
- [208] Nemir M, Metrich M, Plaisance I, Lepore M, Cruchet S, Berthonneche C, Sarre A, Radtke F, Pedrazzini T. The Notch pathway controls fibrotic and regenerative repair in the adult heart. *Eur Heart J* 2014; 35(32): 2174-2185.
- [209] Urbanek K, Cabral-da-Silva MC, Ide-Iwata N, Maestroni S, Delucchi F, Zheng H, Ferreira-Martins J, Ogorek B, D'Amario D, Bauer M, Zerbini G, Rota M, Hosoda T, Liao R, Anversa P, Kajstura J, Leri A. Inhibition of notch1-dependent cardiomyogenesis leads to a dilated myopathy in the neonatal heart. *Circ Res* 2010; 107(3): 429-441.
- [210] Oie E, Sandberg WJ, Ahmed MS, Yndestad A, Laerum OD, Attramadal H, Aukrust P, Eiken HG. Activation of Notch signaling in cardiomyocytes during post-infarction remodeling. *Scand Cardiovasc J* 2010; 44(6): 359-366.
- [211] Rizzo P, Miele L, Ferrari R. The Notch pathway: a crossroad between the life and death of the endothelium. *Eur Heart J* 2013; 34(32): 2504-2509.
- [212] Wu ZQ, Rowe RG, Lim KC, Lin Y, Willis A, Tang Y, Li XY, Nor JE, Maillard I, Weiss SJ. A Snail1/Notch1 signalling axis controls embryonic vascular development. *Nat Commun* 2014; 5: 3998.
- [213] Yao Y, Song J, Wang W, Liu N. Decidual vascular endothelial cells promote maternal-fetal immune tolerance by inducing regulatory T cells through canonical Notch1 signaling. *Immunol Cell Biol* 2015.
- [214] Sweeney C, Morrow D, Birney YA, Coyle S, Hennessy C, Scheller A, Cummins PM, Walls D, Redmond EM, Cahill PA. Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle

- cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J* 2004; 18(12): 1421-1423.
- [215] Liu R, Trindade A, Sun Z, Kumar R, Weaver FA, Krasnoperov V, Naga K, Duarte A, Gill PS. Inhibition of Notch signaling by Dll4-Fc promotes reperfusion of acutely ischemic tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 418(1): 173-179.
- [216] Yu HC, Qin HY, He F, Wang L, Fu W, Liu D, Guo FC, Liang L, Dou KF, Han H. Canonical notch pathway protects hepatocytes from ischemia/reperfusion injury in mice by repressing reactive oxygen species production through JAK2/STAT3 signaling. *Hepatology* 2011; 54(3): 979-988.
- [217] Huang R, Zhou Q, Veeraragoo P, Yu H, Xiao Z. Notch2/Hes-1 pathway plays an important role in renal ischemia and reperfusion injury-associated inflammation and apoptosis and the gamma-secretase inhibitor DAPT has a nephroprotective effect. *Ren Fail* 2011; 33(2): 207-216.
- [218] Pei H, Yu Q, Xue Q, Guo Y, Sun L, Hong Z, Han H, Gao E, Qu Y, Tao L. Notch1 cardioprotection in myocardial ischemia/reperfusion involves reduction of oxidative/nitrative stress. *Basic Res Cardiol* 2013; 108(5): 373.
- [219] Wong GW, Knowles GC, Mak TW, Ferrando AA, Zuniga-Pflucker JC. HES1 opposes a PTEN-dependent check on survival, differentiation, and proliferation of TCRbeta-selected mouse thymocytes. *Blood* 2012; 120(7): 1439-1448.
- [220] Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, Dahlberg S, Neuberg D, Moreau LA, Winter SS, Larson R, Zhang J, Protopopov A, Chin L, Pandolfi PP, Silverman LB, Hunger SP, Sallan SE, Look AT. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; 114(3): 647-650.
- [221] Margheri M, Pacini N, Tani A, Nosi D, Squecco R, Dama A, Masala E, Francini F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: molecular basis for the anticancer effect of these molecules. *Eur J Pharmacol* 2012; 681(1-3): 34-43.
- [222] Akimoto M, Nishimaki T, Arai Y, Uchinuma E, Yamauchi H, Kameda Y. Hes1 regulates formations of the hypophyseal pars tuberalis and the hypothalamus. *Cell Tissue Res* 2010; 340(3): 509-521.

- [223] Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(11): 1177-1185.
- [224] Yang Y, Duan W, Lin Y, Yi W, Liang Z, Yan J, Wang N, Deng C, Zhang S, Li Y, Chen W, Yu S, Yi D, Jin Z. SIRT1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 667-679.
- [225] Laudon M, Frydman-Marom A. Therapeutic effects of melatonin receptor agonists on sleep and comorbid disorders. *Int J Mol Sci* 2014; 15(9): 15924-15950.
- [226] Li DY, Smith DG, Hardeland R, Yang MY, Xu HL, Zhang L, Yin HD, Zhu Q. Melatonin receptor genes in vertebrates. *Int J Mol Sci* 2013; 14(6): 11208-11223.
- [227] Rezzani R, Rodella LF, Bonomini F, Tengattini S, Bianchi R, Reiter RJ. Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated. *J Pineal Res* 2006; 41(3): 288-295.
- [228] Lochner A, Genade S, Davids A, Ytrehus K, Moolman JA. Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery. *J Pineal Res* 2006; 40(1): 56-63.
- [229] Shi Z, Fu F, Yu L, Xing W, Su F, Liang X, Tie R, Ji L, Zhu M, Yu J, Zhang H. Vasonatin peptide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats and underlying mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308(4): H281-290.
- [230] Peschke E, Frese T, Chankiewitz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, Spessert R, Muhlbauer E. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 2006; 40(2): 135-143.
- [231] Abbott SM, Zee PC. Melatonin level and risk for type 2 diabetes. *JAMA* 2013; 310(5): 536-537.
- [232] McMullan CJ, Schernhammer ES, Rimm EB, Hu FB, Forman JP. Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. *JAMA* 2013; 309(13): 1388-1396.
- [233] Zhou XL, Liu JC. Role of Notch signaling in the mammalian heart. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47(1): 1-10.

个人简历和研究成果

个人简历

于立明，男，汉族，1989年出生，山东省烟台人，中国共产党党员。2008年考入第四军医大学八年制临床医学专业。2013年进入第四军医大学第一附属医院心血管外科攻读博士学位，导师为俞世强教授，辅导老师为段维勋副教授。博士期间主要从事内源性小分子物质心血管保护作用及机制研究。

研究成果

博士期间参与多项国家自然科学基金面上项目的申请及研究工作，迄今以第一作者发表SCI论文6篇，其中第一作者在国际松果体研究最权威杂志《Journal of Pineal Research》发表论文3篇，影响因子9.600，单篇最高被引用28次；以共同第一作者发表SCI论文3篇，合计影响因子49.1；另以第一作者发表中文核心期刊论文6篇。

发表文章目录

1. Yu L, Sun Y, Cheng L, Jin Z, Yang Y, Zhai M, Pei H, Wang X, Zhang H, Meng Q, Zhang Y, Yu S, Duan W. Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of SIRT1. Journal of pineal research. 2014 Sep;57(2):228-38. (第一作者, IF: 9.600)
2. Yu L, Liang H, Lu Z, Zhao G, Zhai M, Yang Y, Yang J, Yi D, Chen W, Wang X, Duan W, Jin Z, Yu S. Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia reperfusion injury: in vivo and in vitro studies. J Pineal Res. 2015 Oct;59(4):420-33. (第一作者, IF: 9.600)
3. Yu L, Liang H, Dong X, Zhao G, Jin Z, Zhai M, Yang Y, Chen W, Liu J, Yi W, Yang J, Yi D, Duan W, Yu S. Reduced silent information regulator 1 signaling exacerbates myocardial ischemia reperfusion injury in type 2 diabetic rats and the protective effect of melatonin. J Pineal Res. 2015 Oct;59(3):376-90. (第一作者, IF: 9.600)
4. Yu L, Li F, Zhao G, Yang Y, Jin Z, Zhai M, Yu W, Zhao L, Chen W, Duan W, Yu S. Protective effect of berberine against myocardial ischemia reperfusion injury: role of Notch1/Hes1-PTEN/Akt signaling. Apoptosis. 2015 Jun;20(6):796-810. (第一作者, IF: 3.685)
5. Yu L, Li B, Zhang M, Jin Z, Duan W, Zhao G, Yang Y, Liu Z, Chen W, Wang S, Yang J, Yi D, Liu

- J, Yu S. Melatonin reduces PERK-eIF2 α -ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress during simulated ischemia-reperfusion injury: role of RISK and SAFE pathways interaction. *Apoptosis*, 2016. Accepted. (第一作者, IF: 3.685)
6. Yu L, Li Q, Yu B, Yang Y, Jin Z, Duan W, Zhao G, Zhai M, Liu L, Yi D, Chen M, Yu S. Berberine attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing oxidative stress and inflammation response, role of silent information regulator 1. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 Article ID 893402. (第一作者, IF: 3.516)
7. Shi Z[#], Fu F[#], Yu L[#], Xing W, Su F, Liang X, Tie R, Ji L, Zhu M, Yu J, Zhang H. Vasonatin peptide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats and underlying mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Feb 15;308(4):H281-90. (#共同第一作者, IF: 3.838)
8. Zhao G[#], Yu L[#], Gao W[#], Duan W, Jiang B, Liu X, Zhang B, Liu Z, Zhai M, Jin Z, Yu S, Wang Y. Berberine protects the heart from ischemia reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2016; 37:1-14. (#共同第一作者, IF: 2.912)
9. Liu J, Fan C, Yu L, Yang Y, Jiang S, Ma Z, Hu W, Li T, Yang Z, Tian T, Duan W*, Yu S*. Pterostilbene exerts an anti-inflammatory effect via regulating endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Cytokine*. 2015 Nov 6;77:88-97. (#共同第一作者, IF: 2.664)
10. 于立明, 闫文俊, 邢文娟, 乔红玉, 张薇, 朱妙章, 高峰, 于军, 张海锋. 长期胰岛素治疗通过促进 BNP 表达延缓缺血性心力衰竭的发展及其机制. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(9):1554-1560. (第一作者)
11. 于立明, 杨阳, 刘丽君, 裴海峰, 金振晓, 段维勋, 俞世强. 褪黑素减轻心肌缺血/再灌注损伤的作用及机制[J]. *心脏杂志*, 2015, 03:255-259+270. (第一作者)
12. 于立明, 张秋芳, 赵国龙, 翟蒙恩, 王晓武, 王云, 金振晓, 段维勋, 俞世强. 褪黑素通过减轻内质网应激抗心肌缺血/再灌注损伤的作用及机制[J]. *心脏杂志*, 2016, 28 已接收. (第一作者)
13. 于立明, 赵国龙, 金振晓, 张秋芳, 王晓武, 高文丽, 王云, 段维勋, 俞世强. 小檗碱减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤及其对 Notch1/Hes1 信号通路的调控研究[J]. *中国体外循环杂志*, 2015, 13(4):55-59. (第一作者)
14. 于立明, 段维勋, 翟蒙恩, 王晓武, 张秋芳, 赵国龙, 陈文生, 金振晓, 俞世强. 褪黑素抗心肌缺血/再灌注损伤的作用及其对 Notch1/Hes1 信号通路影响[J]. *心脏杂志*, 2016, 28 已接收.

(第一作者)

15. 于立明, 段维勋, 赵国龙, 张秋芳, 王晓武, 金振晓, 俞世强. 小檗碱减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 基础医学与临床, 2016,36(4): 433-438. (第一作者)

获得奖励

1. 2012年 第一届全军研究生创新论坛 一等奖、大会报告 (西安)
题目: 长期胰岛素治疗通过促进 B 型钠尿肽表达延缓心力衰竭及其机制
2. 2012年 第二届大学生基础医学创新论坛暨实验设计大赛 二等奖 (天津)
题目: 血管钠肽保护糖尿病大鼠缺血/再灌注心脏及机制
3. 2015年 第七届中国生物医学工程学会体外循环分会优秀论文 一等奖、大会报告 (西安)
题目: 糖尿病缺血心肌易损性增加的新机制—褪黑素合成障碍与心肌 SIRT1 信号受损
4. 2015年 第四军医大学科技贡献 三等奖 (西安)

参与基金目录

1. 国家自然科学基金面上项目: 抗心肌缺血/再灌注损伤新机制: SMP30 介导姜黄素心脏保护作用的关键信号通路研究。编号: 81570230。项目成员: 段维勋, 路志红, 梁宏亮, 于立明, 雷翀, 翟蒙恩, 蒙强, 张建英, 冯建宇, 张盈。
2. 国家自然科学基金面上项目: Claudin-1 及其甲基化在沉默信息调控因子 1 保护缺血再灌注心肌机制中的作用。编号: 81570231。项目成员: 金振晓, 刘洋, 张昊鹏, 冯建宇, 张盈, 范崇熙, 于立明, 蒙强, 赵达君, 翟蒙恩。
3. 国家自然科学基金面上项目: Notch1 信号通路介导褪黑素抗缺血再灌注损伤心肌保护作用机制研究。编号: 81470411。项目成员: 陈文生, 杨阳, 路志红, 梁振兴, 张建英, 于立明, 王宁, 白三省, 张盈。
4. 国家自然科学基金面上项目: 心肌肥厚的新致病机制—组胺 H2 受体及其介导的关键信号通路研究。编号: 81470415。项目成员: 俞世强, 梁宏亮, 刘宝辉, 杨阳, 孟静茹, 翟蒙恩, 雷翀, 张建英, 于立明, 王宁。
5. 国家自然科学基金面上项目: 糖尿病心肌梗死后易发心力衰竭的新机制: 心肌钠尿肽抵抗。编号: 81470438。项目成员: 于军, 闫文俊, 季乐乐, 邢文娟, 余琦, 铁茹, 付锋, 王建榜, 高海燕, 于立明。

致 谢

八年时光匆匆而过，回首过往，有太多的苦、辣、酸、甜在心底涌动，忘不了一次次内务整理和队列训练，忘不了校园嘹亮的号角和振奋的军歌，忘不了竞技场上挥洒不尽的汗水，忘不了自习室实验室彻夜不熄的明灯，更忘不了每一位给予我莫大关心和帮助的老师与同学，这些都是我八年学习生活的美好的回忆，是我青春时光的见证，更是我继续前进的动力。

衷心感谢我敬爱的导师俞世强教授三年来对我学习和生活上的支持、关心和鼓励。恩师医术精湛、医德廉洁、为人正直、平易近人，您渊博的理论知识、严谨的治学态度和高尚的人格品质永远值得我学习。您对西京医院心血管外科方方面面的发展给予不遗余力的支持，为实验室平台建设付出了巨大的心血。您对我的严格要求、殷切期望、悉心指导和鞭策鼓励是我在科学道路上前行的不竭动力。

衷心感谢我的辅导老师段维勋副教授，三年时间里，无论节假日还是休息时间，无论我有科研上的难题还是生活中的困惑，您都会不辞劳苦、第一时间为我排忧解难。您不仅教会我怎样把握方向、设计课题、撰写论文，更培养了我发掘新现象、新机制的独立科研能力。您兢兢业业做事、踏踏实实做人的精神品格将让我受益终生。

衷心感谢我敬爱的金振晓副教授，您对我的支持、信任和帮助是我顺利完成学业的基础，感谢您为课题组成长壮大、为每一个成员个人发展所做的默默付出。

衷心感谢原第四军医大学教学实验中心主任于军副教授和张海锋副教授，您是我科研道路上的领路人，是您带我踏入科学研究的殿堂，时至今日，您本科和研究生时对我的帮助和支持仍历历在目，这是我前进的动力。

衷心感谢西京医院心血管外科易定华主任、杨剑副主任、陈文生教授、易蔚副教授、梁宏亮副教授、王红兵教授、魏旭峰副教授、徐学增教授、任恺医师、俞波医师等对我临床思维以及科研理念方面的培养。

衷心感谢第四军医大学生物医学工程系杨阳博士后对我的指导和帮助，您既拓宽了我的研究视野与思路，又是我生活中的良师益友，谢谢您！

衷心感谢西京心血管外科实验室王晓武老师、马燕燕老师、谭红梅老师、郭亚娟老师、刘君萍老师、马冀鹏老师、谭延振老师、江丽青老师、卢林鹤老师、王艳丽老师等等对我的倾力支持。

衷心感谢第四军医大学生理教研室周京军教授、张建英博士、孔令恒博士、邢文娟博士对我

的真诚帮助和鼓励。

衷心感谢第四军医大学第一附属医院心血管内科闫文俊博士、裴海峰博士、张荣庆老师对我的帮助和指导。

衷心感谢第四军医大学教学实验中心季乐乐老师、陈健康老师、梁向燕老师、铁茹老师、田菲老师对我的帮助和指导。

衷心感谢赵国龙硕士、张羽博士、蒙强博士、刘丽君硕士、翟蒙恩硕士、赵达君博士、范崇熙博士、刘振华博士、李步滢硕士、张蒙硕士、冯建宇硕士、狄守印硕士、秦志刚博士、赵琳硕士、冯笑硕士、张彬硕士、常瑞娇硕士、陈浩博士、陈文豪博士、王宁硕士、梁振兴硕士、王伟光博士、赵堃博士、王正博士、白三省博士、刘军博士、刘宝辉硕士、张盈硕士等三年来对于我实验和生活上的支持与帮助。

感谢我的父母多年的养育之恩，感谢我的亲人们对我求学之路的支持和帮助。你们的关怀、理解和无私的爱是我前进的不竭动力。

最后还要感谢八年来与我同舟共济的同学们，祝大家前程似锦！谢谢！