

灵仙新苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究

丁海燕¹, 李运曼², 方伟蓉²

1. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 中国药科大学 药理学教研室 天然药物重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 考察灵仙新苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护作用,并阐述可能的作用机制。**方法** SD大鼠随机分为6组:假手术组、模型组、丹参酮IIA(阳性药,16 mg/kg)组和灵仙新苷低、中、高(8、16、32 mg/kg)组,连续ig给药7 d;采用结扎冠状动脉左前降支制备大鼠MIRI模型,缺血40 min再灌120 min;试剂盒法检测MIRI大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)水平;TTC染色法检测心肌梗死率,流式细胞术检测心肌细胞凋亡率;Western blotting法检测心肌组织中Bcl-2、Bax、TNF- α 及Caspase-3的蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较,灵仙新苷(8、16、32 mg/kg)显著降低MIRI模型大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平,心肌梗死率和心肌细胞凋亡率;明显上调Bcl-2蛋白表达水平,下调Bax、TNF- α 、Caspase-3蛋白表达水平,且均具有显著性差异($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 灵仙新苷对MIRI大鼠心肌具有保护作用,其机制可能与抑制TNF- α ,调节Bcl-2/Bax蛋白平衡,减少MIRI诱导的心肌细胞凋亡有关。

关键词: 灵仙新苷; 心肌缺血再灌注; 凋亡; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); Bcl-2; Bax

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)04-0547-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.04.008

Protection effects and mechanism of clematichinenoside on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

DING Haiyan¹, LI Yunman², FANG Weirong²

1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Key Laboratory of Natural Medicines, Department of Physiology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of clematichinenoside (AR) on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats and elucidate the underlying mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into six groups: sham, model, Tanshinone IIA (positive control, 16 mg/kg), and AR (8, 16, 32 mg/kg) groups. Drug was given for seven consecutive days before the operation by ig method. Animal MIRI model was established by ligation of left anterior descending coronary artery (LAD). Rats were sacrificed after 40 min ischemia and 120 min reperfusion. TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in serum were measured. Myocardial infarct rate and cardiomyocyte apoptosis rate in MIRI rats were observed by TTC staining and flow cytometry, respectively. Western blotting was used to detect the expression of Bcl-2, Bax, TNF- α , and Caspase-3 in myocardial tissue. **Results** Compared with model group, AR at 8, 16 and 32 mg/kg reduced the TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in serum, myocardial infarct rate, and cardiomyocyte apoptosis rate. AR could up-regulate Bcl-2 and down-regulate protein expression levels of Bax, TNF- α and Caspase-3, and the differences were significant ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** AR plays an important role in cardioprotection and anti-apoptosis against the ischemia and reperfusion injury in rats. The mechanism could involve in inhibition of TNF- α , regulation of Bcl-2/Bax protein balance and reduction of apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury.

Key words: clematichinenoside (AR); myocardial ischemia-reperfusion; apoptosis; TNF- α ; Bcl-2; Bax

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MIRI)是指缺血心肌在恢复血供

后组织损伤反而加重,甚至导致不可逆性损伤的现象,是严重威胁人类健康的心血管疾病之一^[1]。MIRI

收稿日期: 2017-11-27

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2015211C001)

第一作者: 丁海燕(1979—),女,副教授,研究方向为天然产物的药理活性研究。Tel: (0991) 4362470 E-mail: dinghaiyan79@163.com

的重要原因之一是炎症反应的过度激活,可导致心肌细胞凋亡增加,进一步损伤心脏功能^[2]。灵仙新苷是毛茛科植物威灵仙干燥根茎的活性成分之一,研究表明,灵仙新苷具有显著的镇痛、抗炎和抗动脉粥样硬化作用^[3-5]。本文旨在研究灵仙新苷对MIRI大鼠心肌的保护作用和可能作用机制,为灵仙新苷开发为防治心血管系统疾病的新药提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级SD大鼠,雄性,体质量200~250 g,由新疆医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(新)2011-0004。

1.2 药品与主要试剂

灵仙新苷,淡黄色粉末,由中国药科大学中药学院药剂教研室提供,质量分数95.3%,实验前配制成所需浓度溶液使用;丹参酮II_A,江苏柯菲平医药股份有限公司,批号120115;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)ELISA试剂盒,武汉博士德生物技术有限公司;氯化三苯基四氮唑(TTC)染料,美国Sigma公司;Annexin V-FITC/PI,德国Roche公司;Bcl-2、Bax、TNF- α 、Caspase-3抗体,美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 主要仪器

HX-300呼吸机,成都泰盟科技有限公司;ECG-6511心电图机,上海光电医用电子仪器有限公司;Meditec AG双目显微镜,德国Zeiss公司;MULTISKAN MK3型酶标仪,美国Thermo公司;ALTRA流式细胞分析仪,美国贝克曼公司;ChemiDocTM XRS+凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 大鼠MIRI模型制备^[6-7]

大鼠ip 10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,仰卧位固定,气管插管并连接动物人工呼吸机,连接心电图仪。胸骨左侧第3~4肋间水平横行切开皮肤并逐层分离,撑开胸腔,剪开心包膜,向右上方推动挤出心脏。冠状动脉左前降支起始部位位于左心耳下缘与肺动脉圆锥间,于左心耳下缘2 mm处穿线,形成直径约5 mm活结,用软管置于活结中,拉紧活结造成冠脉左前降支供应区域心肌缺血,观察心电图并以ST段抬高为结扎成功标志。缺血40 min后轻轻拉松结扎线,恢复血液灌注120 min,为大

鼠MIRI模型。假手术组只穿线不结扎。

2.2 动物分组及给药

将SD大鼠随机分为6组,假手术组和模型组(生理盐水2 mL/kg),丹参酮II_A(16 mg/kg)组,灵仙新苷低、中、高剂量(8、16、32 mg/kg)组,每组10只,分别于造模前连续ig给药7 d,末次给药后30 min,实施手术。

2.3 血清中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6水平的测定^[8]

再灌120 min后进行腹主动脉取血,3 000 r/min离心10 min,取血清按照试剂盒说明书操作,测定血清中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。

2.4 心肌梗死率的评价^[7]

复灌120 min后取心脏,用生理盐水洗去血液,剪去心房及心底部血管,称心室质量,将心室沿房室沟平均切成5片放入1% TTC溶液内,37 °C染色5 min。非梗死心肌为深红色,梗死心肌呈白色,分离白色部分称质量,计算其占整个心室质量的百分率:

$$\text{心肌梗死率} = \frac{\text{苍白区质量}}{\text{心室质量}}$$

2.5 心肌细胞凋亡率评价^[9-10]

大鼠缺血再灌后快速取出心脏切割得到心室,采用酶消化法将心肌细胞制成细胞悬液,37 °C酶解20~30 min,过200 μ m金属网除去残留组织,2 000 r/min离心1 min,除去上清,磷酸缓冲液(PBS)调整细胞浓度至 1×10^6 /mL。通过膜联蛋白V-荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染色流式细胞术测定心肌细胞凋亡率,细胞凋亡率是Annexin V-FITC阳性细胞的占比。

2.6 心肌组织中Bcl-2、Bax、Caspase-3和TNF- α 蛋白表达水平测定^[11-13]

按每100 mg心肌组织加1 mL的裂解液后,用匀浆器搅匀组织样品,37 °C孵育5 min,12 000 r/min离心10 min。用蛋白提取试剂盒按操作说明提取细胞总蛋白,以BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,煮沸变性,SDS-PAGE凝胶电泳。电转移至硝酸纤维素(PVDF)膜上,5% BSA封闭2 h,用TBST清洗3次,分别加入Bcl-2、Bax、Caspase-3和TNF- α 抗体(1:1 000),4 °C孵育过夜;TBST清洗3次,加入相应二抗室温孵育1 h,TBST清洗3次,ECL显色。将PVDF膜放入凝胶扫描系统曝光及图片扫描成像,采用Image J软件计算分析各蛋白条带和对应的内参蛋白条带的灰度。

2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

组间采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及心肌梗死率的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平明显增加,均具有显著性差异 ($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药丹参酮 II_A (16 mg/kg) 和灵仙新苷 (8、16、32 mg/kg) 组均能显著降低血清中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,均具有显著性差

异 ($P < 0.05$ 、 0.01);丹参酮 II_A (16 mg/kg)、灵仙新苷 (8、16、32 mg/kg) 显著降低 MIRI 大鼠的心肌梗死率 ($P < 0.05$ 、 0.01),结果见表 1。

3.2 流式细胞术检测 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡率

与假手术组比较,模型组心肌细胞的凋亡率明显增加,差异显著 ($P < 0.01$);与模型组比较,丹参酮 II_A (16 mg/kg) 和灵仙新苷 (8、16、32 mg/kg) 组均显著降低 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡率 ($P < 0.01$),结果见图 1。

表 1 灵仙新苷对 MIRI 大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平及心肌梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of AR on TNF- α , IL-1 β and IL-6 and myocardial infarction rate in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	心肌梗死率/%
假手术	—	34.67±6.11	91.70±7.35	30.20±2.62	0
模型	—	253.61±7.49**	257.64±16.96**	96.30±5.66**	38.21±6.63**
丹参酮 II _A	16	83.02±5.92##	107.80±10.15##	42.62±3.78##	23.20±2.56##
灵仙新苷	8	161.25±11.53##	205.61±15.31##	81.43±2.70#	30.94±4.79#
	16	123.33±7.51##	158.03±14.14##	66.98±4.88##	27.93±2.76##
	32	97.67±9.29##	134.78±9.58##	55.95±4.61##	25.82±3.93##

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

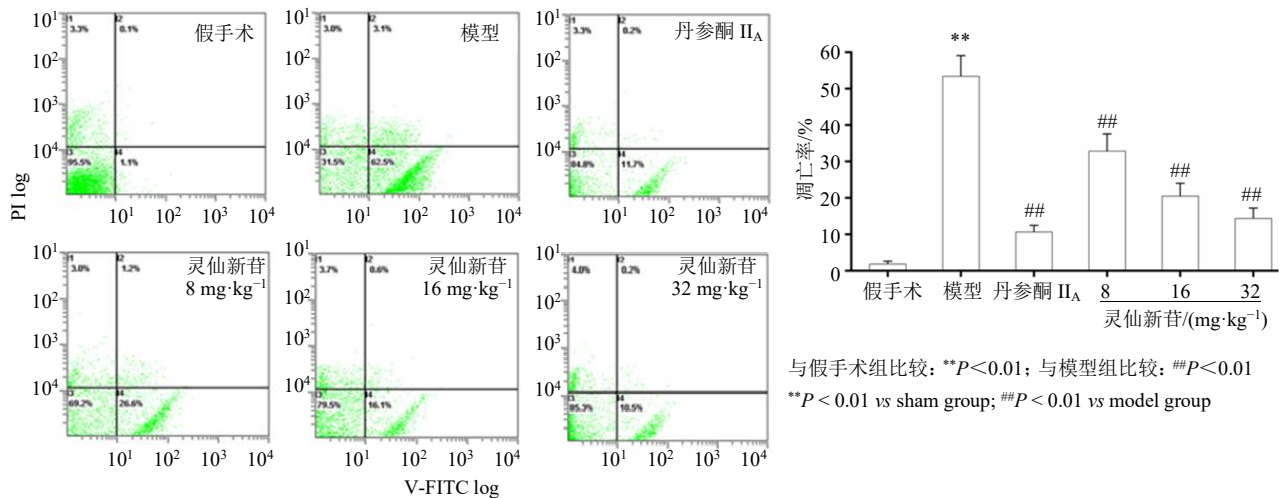


图 1 灵仙新苷对 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of AR on cardiomyocyte apoptosis rate in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 对 MIRI 大鼠心肌组织中 Bcl-2、Bax、TNF- α 、Caspase-3 蛋白表达水平的影响

如图 2 所示,与假手术组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达量显著下降, Bax、TNF- α 、Caspase-3 蛋白表达量明显增加,均具有显著性差异 ($P < 0.01$);阳性药丹参酮 II_A (16 mg/kg) 和灵仙新苷 (8、16、32 mg/kg) 均能显著上调 MIRI 大鼠心肌组织中 Bcl-2 蛋白的表达,下调 Bax、TNF- α 、Caspase-3 蛋白的表达,具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

结果表明,灵仙新苷能上调 MIRI 大鼠心肌组织中 Bcl-2/Bax 比率,降低 TNF- α 、Caspase-3 蛋白表达,可能通过调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白平衡减少 MIRI 诱导的心肌细胞凋亡。

4 讨论

MIRI 是一个多机制参与、多因素相互影响而导致的复杂的病理生理过程,炎症介质在心肌细胞缺氧损伤的过程中发挥着重要的作用^[14-15],其中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 是关键炎症因子。IL-1 β 、IL-6

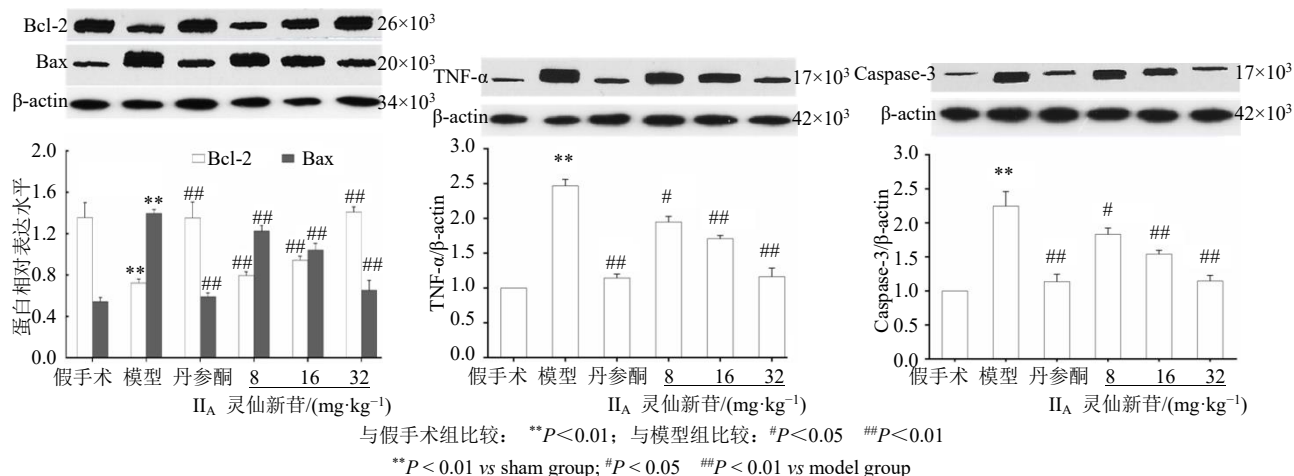


图2 灵仙新苷对MIRI大鼠心肌Bcl-2、Bax、TNF-α及Caspase-3蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of AR on expression of myocardial Bcl-2, Bax, TNF-α and Caspase-3 protein in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参与了炎症反应的调节,增加表达的TNF-α可通过多种途径影响心肌功能并造成心肌损伤和心肌细胞凋亡,进一步加重MIRI损伤^[16]。因此减少MIRI大鼠血清中炎症因子的堆积,抑制心肌细胞凋亡,可减轻MIRI损伤,达到保护心肌的作用。本实验结果表明,灵仙新苷能降低MIRI大鼠血清中炎症因子TNF-α、IL-1β和IL-6水平,通过降低心肌组织的炎症反应,减少心肌梗死率,减轻心肌损伤。

大量研究表明,MIRI后的炎症级联放大效应过度激活产生TNF-α,可通过相关的信号通路调控下游相关凋亡蛋白诱导心肌细胞发生凋亡^[17-18]。Bcl-2、Bax是Bcl-2凋亡家族基因的重要成员,在细胞凋亡中起着重要的作用。Bcl-2是促进细胞生存、抑制细胞凋亡的长寿基因,而Bax促进细胞凋亡^[19],它们相互作用调控细胞状态^[20-21]。细胞在正常情况下,促进和抑制凋亡的两种蛋白表达量处于相对稳定的状态,当凋亡信号作用于细胞时,促凋亡蛋白表达量会增多^[22-23],因此促凋亡与抑制凋亡蛋白之间的平衡被打破,通过相关信号通路激活下游的Caspase-3,细胞就会走向凋亡。Caspase是半胱氨酸蛋白酶家族并多以休眠的酶原状态存在,特定条件下激活后发生复杂的蛋白酶级联反应^[24]。对于不同的细胞或不同信号传导途径诱发的凋亡过程,参与的Caspase有所不同,但Caspase-3是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,也是凋亡的关键酶和执行者,Caspase-3的激活是细胞凋亡不可逆转的标志^[25-27]。有报道发现,通过抑制Caspase的活化可减少TNF-α诱导的细胞凋亡;同时调节Bcl-2与Bax之间的平衡可间接下调Caspase-3的表达^[28-29],这

与本文的研究思路相一致。本文通过检测MIRI大鼠心肌细胞凋亡率,心肌组织中TNF-α、Bcl-2、Bax和Caspase-3的蛋白表达水平的变化,表明灵仙新苷回调Bcl-2与Bax的蛋白平衡,降低TNF-α和Caspase-3的蛋白表达水平,减少缺血再灌注损伤诱导的心肌细胞凋亡。

灵仙新苷能抑制MIRI大鼠血清中炎症因子聚集,减少MIRI引起的心肌细胞凋亡,减轻心肌细胞损伤,对MIRI心肌具有保护作用,其机制可能与抑制TNF-α、调节Bcl-2/Bax信号转导通路有关。

参考文献

- [1] Kloner R A. Natural and unnatural triggers of myocardial infarction [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2006, 48(4): 285-300.
- [2] Eefting F, Rensing B, Wigman J, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(3): 414-426.
- [3] Han W, Xiong Y, Li Y, et al. Anti-arthritis effects of clematichinenoside (AR-6) on PI3K/Akt signaling pathway and TNF-alpha associated with collagen-induced arthritis [J]. Pharm Biol, 2013, 51(1): 13-22.
- [4] Peng C, Perera P K, Li Y M, et al., Anti-inflammatory effects of Clematis chinensis Osbeck extract(AR-6) may be associated with NF-kappaB, TNF-alpha, and COX-2 in collagen-induced arthritis in rat [J]. Rheumatol Int, 2012, 32(10): 3119-3125.
- [5] Xiong Y, Ma Y, Han W, et al. Clematichinenoside AR induces immunosuppression involving Treg cells in Peyer's patches of rats with adjuvant induced arthritis [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(2): 1306-1314.
- [6] Tao J, Zhu W, Li Y, et al. Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent

- fashion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(4): 1471-1486.
- [7] Houshmand F, Faghihi M, Zahediasl S. Biphasic protective effect of oxytocin on cardiac ischemia/reperfusion injury in anaesthetized rats [J]. *Peptides*, 2009, 30(12): 2301-2308.
- [8] Liang Z, Liu L F, Yao T M, et al. Cardioprotective effects of Guanxinshutong (GXST) against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2012, 9(2): 130-136.
- [9] Wu Y, Tu X, Lin G, et al. Emodin-mediated protection from acute myocardial infarction via inhibition of inflammation and apoptosis in local ischemic myocardium [J]. *Life Sci*, 2007, 81(17-18): 1332-1338.
- [10] Zhu Z, Zhu J, Zhao X, et al. All-trans retinoic acid ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing cardiomyocyte apoptosis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133414.
- [11] Zhao Y, Xu L, Qiao Z, et al. YiXin-Shu, a ShengMai-San-based traditional Chinese medicine formula, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing mitochondrial mediated apoptosis and upregulating liver-X-receptor alpha [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23025.
- [12] Li J, Lang M J, Mao X B, et al. Antiapoptosis and mitochondrial effect of pioglitazone preconditioning in the ischemic/reperfused heart of rat [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2008, 22(4): 283-291.
- [13] Jian Z, Han H, Zhang T, et al. Mechanochemo transduction during cardiomyocyte contraction is mediated by localized nitric oxide signaling [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(317): ra27.
- [14] Rodrigo R, Libuy M, Feliu F, et al. Molecular basis of cardioprotective effect of antioxidant vitamins in myocardial infarction [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 437613.
- [15] Ahn J, Kim J. Mechanisms and consequences of inflammatory signaling in the myocardium [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2012, 14(6): 510-516.
- [16] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF- α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 127(3): 295-314.
- [17] Jiang C, Fang X, Jiang Y et al. TNF-alpha induces vascular endothelial cells apoptosis through overexpressing pregnancy induced noncoding RNA in Kawasaki disease model [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 72: 118-124.
- [18] Shahid A, Ali R, Ali N, et al. Attenuation of genotoxicity, oxidative stress, apoptosis and inflammation by rutin in benzo(a)pyrene exposed lungs of mice: plausible role of NF-kappaB, TNF-alpha and Bcl-2 [J]. *J Complement Integr Med*, 2016, 13(1): 17-29.
- [19] Hsu S Y, Hsueh A J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(2): 593-614.
- [20] Kong S P, Zhang X, and Tan Q W. Effects of electroacupuncture at "Jiaji" (EX-B 2) on myocardial apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in rats with ischemia-reperfusion injury [J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2013, 33(6): 529-532.
- [21] Wang Y, Zhang H, Chai F, et al., The effects of escitalopram on myocardial apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 during myocardial ischemia/reperfusion in a model of rats with depression [J]. *BMC Psychiatry*, 2014, 14: 349.
- [22] Deng Y J, Tan N, Zeng H K, et al. Effects of BNP preconditioning on myocardial cell apoptosis and expressions of bcl-2 and Bax during myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2010, 90(48): 3431-3434.
- [23] Guo, J., et al., Effects of ethyl pyruvate on myocardial apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins after ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2008, 28(3): 281-283.
- [24] Ruetten H, Badorff C, Ihling C, et al. Inhibition of caspase-3 improves contractile recovery of stunned myocardium, independent of apoptosis-inhibitory effects [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38(7): 2063-2070.
- [25] Wang S, Li Y, Song X, et al. Febuxostat pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via mitochondrial apoptosis [J]. *J Transl Med*, 2015. 13: 209.
- [26] Yang B, Jain S, Ashra S Y, et al. Apoptosis and caspase-3 in long-term renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants [J]. *Transplantation*, 2006. 81(10): 1442-1450.
- [27] Liu G, Wang T, Wang T, et al. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats [J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(6): 861-867.
- [28] Wang C Y, Mayo W, Korneluk R G et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation [J]. *Science*, 1998, 281(5383): 1680-1683.
- [29] Wu B, Lin R, Dai R, et al. Valsartan attenuates oxidative stress and NF-kappaB activation and reduces myocardial apoptosis after ischemia and reperfusion [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 705(1/3): 140-147.