

丹酚酸 B 对大鼠缺血心肌血管再生的促进作用

周 丹, 田 天, 舒 庆, 赵小燕, 马 薇, 张建怀, 范丽霞, 郑其萍*

西安市第九医院 药剂科, 陕西 西安 710054

摘 要: **目的** 研究丹酚酸 B 促进缺血心肌血管生成的分子作用机制。**方法** 制备心肌梗死大鼠模型, 50 只大鼠随机分为假手术组、模型组及丹酚酸 B 低、中、高 (20、40、60 mg/kg) 剂量组, 尾 iv 给药 1 周后, 测定大鼠心肌梗死面积; 免疫组化法检测大鼠心肌梗死边缘区微血管密度; 试剂盒检测大鼠血清中肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 (cTnI) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的量; Western blotting 法检测大鼠心肌梗死边缘区核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 (HO-1)、血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白的表达水平。**结果** 与模型组比较, 丹酚酸 B 中、高剂量组大鼠心肌梗死面积显著减少 ($P < 0.05$); 丹酚酸 B 低、中、高剂量组大鼠微血管密度显著增加 ($P < 0.05$); 丹酚酸 B 中、高剂量组大鼠血清 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平显著下降 ($P < 0.05$); 丹酚酸 B 低、中、高剂量均可增加大鼠心肌梗死边缘区 VEGF、Nrf2 和 HO-1 蛋白水平的表达 ($P < 0.05$), 其中以丹酚酸 B 高剂量组效果最佳。**结论** 丹酚酸 B 可促进大鼠缺血心肌血管再生, 该作用与其增加心肌组织 VEGF、Nrf2 和 HO-1 的表达有关。

关键词: 丹酚酸 B; 血管再生; 心肌缺血; Nrf2/HO-1 信号通路; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)21-5166-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.031

Effect of salvianolic acid B on angiogenesis of myocardial ischemia in rats

ZHOU Dan, TIAN Tian, SHU Qing, ZHAO Xiao-yan, MA Wei, ZHANG Jian-huai, FAN Li-xia, ZHENG Qi-ping

Department of Pharmacy, Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an 710054, China

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of salvianolic acid B (Sal B) in the angiogenesis in rats with myocardial ischemia (MI). **Methods** The acute ischemia model was established. The rats were divided randomly into the sham operation group, model group, and Sal B treatment (20, 40, and 60 mg/kg) groups. The drugs were tail administration for 1 week. The microvascular density (MVD) in the marginal zone of myocardial infarction of rats were determined, the levels of CK-MB, cTnI, and LDH were detected by kits, and the expression of myocardial VEGF, Nrf2, and HO-1 were examined by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the infarct area was reduced obviously in Sal B 40 mg/kg group and 60 mg/kg group in MI rats ($P < 0.05$). And Sal B (20, 40, and 60 mg/kg) resulted in an obvious increase in MVD of MI rat ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of CK-MB, LDH, and cTnI of medium and high dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$). In addition, Sal B of 20, 40, and 60 mg/kg could increase the expression of VEGF, Nrf2, and HO-1 protein levels ($P < 0.05$). And that Sal B 60 mg/kg led to strong expression of above proteins. **Conclusion** Sal B induces angiogenesis in rats after MI. The role of Sal B on angiogenesis is correlated with the increased expression of VEGF, Nrf2, and HO-1 in the myocardium.

Key words: salvianolic acid B; angiogenesis; myocardial ischemia; Nrf2/HO-1 signal pathway; vascular endothelial growth factor

冠心病严重危害着人们的身体健康, 目前药物治疗、介入治疗和外科治疗是其主要治疗方法。近年来, 治疗性血管新生 (therapeutic angiogenesis) 在冠心病治疗方面的潜力和研究意义越来越受到关注, 被认为是治疗冠心病所致心肌梗死的新思路^[1]。

丹参是传统的中药, 其有效成分复杂, 其中丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 是丹参的主要成分之一^[2]。大量临床研究表明^[3-5], 丹参对心肌缺血再灌注损伤具有确切的疗效。本课题组前期研究证实 Sal B 能保护缺血诱导的心肌损伤, 减少心肌梗死面积^[2]。

收稿日期: 2018-05-07

基金项目: 西安市科技计划项目 (2017121SF/YX015)

作者简介: 周 丹 (1986—), 女, 硕士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 18329706088 E-mail: rong840301@163.com

*通信作者 郑其萍, 女, 主任药师, 研究方向为中药药理。E-mail: zqp83858@163.com

核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) /血红素加氧酶-1 (HO-1) 信号通路近年来被认为是心脑血管保护的重要靶点^[6-7]。有研究发现可通过激活 Nrf2/HO-1 途径诱导血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 增强内皮细胞黏附、迁移、存活、增殖以及血管形成效应, 促进血管新生^[8-10]。本研究通过大鼠心肌梗死模型, 探讨 Sal B 改善心肌缺血与促进缺血心肌血管生成的分子作用机制, 为中医药防治缺血性疾病提供新的实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 50 只, 清洁级, 体质量 (260±10) g, 购自第四军医大学动物中心, 动物许可证号 SCXK (军) 2007-007。

1.2 药品与试剂

Sal B 由贵州迪达科技有限公司提供, 批号 111562-200908, 质量分数≥98%; 氯化三苯基四氮唑蓝 (TTC) 染色剂购于中国医药集团上海化学试剂公司; 伊文思蓝 (EB) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 兔抗 Nrf2 多克隆抗体、兔抗 HO-1、VEGF、 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; SABC 试剂盒购自博士德生物工程有限公司。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG (北京中山生物技术公司); ECL Plus 荧光检测试剂 (北京百奥莱博科技有限公司); 肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 (cTnI) 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒购自南京建成生物工程公司。

1.3 仪器

HX-100E 小动物呼吸机 (成都泰盟科技有限公司); TDZ4A-WS 低速台式离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); COOLPIX S1 型照相机 (Nikon 公司); 680 型酶标仪、电泳仪、转膜仪、凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司); 5417 型低温高速离心机 (Eppendorf 公司); CMS800 型微循环生物图像分析系统 (Gold Spring 公司)。

2 方法

2.1 心肌梗死大鼠模型的制备

心肌梗死大鼠模型制备参照文献方法^[11]。大鼠麻醉后, 连接心电图监测, 气管插管并接呼吸机。打开大鼠胸腔, 暴露心脏, 于左心耳下方 1~2 mm 处结扎冠状动脉左前降支, 立即将心脏放回胸腔, 关闭切口, 缝合皮肤。

2.2 分组及给药

将大鼠随机分为 5 组, 即假手术组、模型组及 Sal B 低、中、高剂量 (20、40、60 mg/kg) 组, 每组 10 只。假手术组、模型组尾部 iv 等体积生理盐水, Sal B 各剂量组大鼠术后尾 iv 给药 7 d, 每天给药 1 次。

2.3 大鼠心肌梗死面积测定

心肌梗死面积测定参照文献方法^[12], 模型制备结束后, 再次结扎冠状动脉左前降支, 经颈动脉注射 3% 的 EB 溶液 2 mL 后, 摘除心脏, -20 °C 冷冻, 20 min 后切片, 置于 2% TTC 37 °C 孵育 10 min, 随后用多聚甲醛固定。数码相机拍照后用图像分析系统 Image ProPlus 测量心肌梗死面积。

梗死面积=梗死区面积/(梗死区面积+缺血区面积)

2.4 大鼠血清生化指标测定

实验结束后, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 室温静置 30 min, 分离血清, 严格按照试剂盒说明书检测大鼠血清生化指标 CK-MB、cTnI 和 LDH 的含量。

2.5 大鼠心肌梗死边缘区微血管密度 (MVD) 的测定

取各组大鼠左心室梗死区边缘缺血区的心肌组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 用免疫组化法染色心脏切片, 具体步骤按试剂盒说明书进行。用抗 CD34 多克隆抗体免疫组化染色, DAB 显色, 于光学显微镜下观察 MVD。MVD 计数方法参照文献方法^[1]。

2.6 Western blotting 法检测大鼠心肌梗死边缘区 VEGF、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

取大鼠心肌梗死边缘区组织, 在冰上剪碎、加入适量的裂解液。4 °C 离心取上清。取等量蛋白样品上样, 电泳、转印、封闭。分别加适当稀释的 Nrf2、HO-1、VEGF 抗体 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 加相应的二抗 (anti-rabbit IgG-HRP 抗体) 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 将 PVDF 膜置于化学成像仪暗盒中, 使用 ECL-plus 免疫检测试剂盒进行化学发光检测。

2.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差统计分析实验结果。

3 结果

3.1 Sal B 对大鼠心肌梗死面积的影响

结果如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大

鼠心肌梗死面积显著增加 ($P < 0.05$), 提示模型制备成功。与模型组比较, 给予不同剂量的 Sal B 治疗后, 大鼠心肌梗死面积减少, 且呈剂量依赖性。Sal B 中、高剂量组大鼠心肌梗死面积显著减少 ($P < 0.05$)。

3.2 Sal B 对大鼠心肌梗死边缘区 MVD 的影响

结果如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌梗死边缘区 MVD 显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, Sal B 低、中、高剂量组大鼠心肌梗死边缘区 MVD 均显著增加 ($P < 0.05$), 并呈一定剂量依赖关系。

3.3 Sal B 对心肌梗死大鼠血清生化指标的影响

结果如表 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 CK-MB、LDH 和 cTnI 的水平显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, Sal B 中、高剂量组大鼠血清中 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平显著降低 ($P < 0.05$)。Sal B 低剂量组大鼠血清中 LDH 水平显著降低 ($P < 0.05$), CK-MB 和 cTnI 水平虽有下降趋势,

但与模型组比较无统计学差异。

3.4 Sal B 对大鼠心肌梗死边缘区 VEGF、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响

结果如图 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌梗死边缘区 VEGF、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

表 1 Sal B 对大鼠心肌梗死面积的影响及梗死边缘区 MVD 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Sal B on myocardial infarct area and MVD of infarct margin ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	梗死面积/%	MVD/个
假手术	—	0	6.45 ± 0.61
模型	—	54.64 ± 6.35 [#]	8.65 ± 0.74 [#]
Sal B	20	49.39 ± 5.36	10.61 ± 0.69 [*]
	40	32.67 ± 7.28 [*]	12.34 ± 1.21 [*]
	60	29.34 ± 4.61 [*]	19.61 ± 1.67 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, 下同

[#] $P < 0.05$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group, same as below

表 2 Sal B 对心肌梗死大鼠血清 CK-MB、LDH、cTnI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Sal B on levels of CK-MB, LDH, and cTnI in serum in MI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	CK-MB/(ng·mL ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	cTnI/(ng·kg ⁻¹)
假手术	—	23.12 ± 5.21	29 154.31 ± 614.39	3.10 ± 0.59
模型	—	86.26 ± 15.31 [#]	63 145.54 ± 2 641.35 [#]	12.64 ± 3.14 [#]
Sal B	20	78.74 ± 13.28	41 267.37 ± 3 564.97 [*]	11.12 ± 1.29
	40	42.31 ± 11.34 [*]	34 651.97 ± 1 642.34 [*]	9.31 ± 1.26 [*]
	60	24.91 ± 7.31 [*]	29 643.24 ± 956.31 [*]	6.34 ± 1.48 [*]

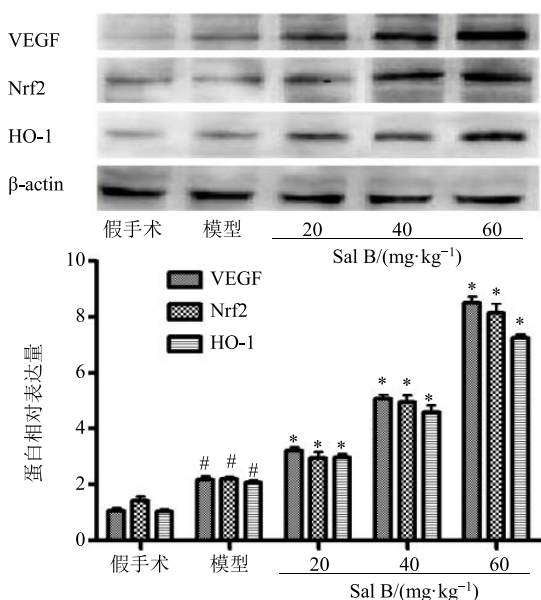


图 1 Sal B 对心肌梗死大鼠心肌梗死边缘区 VEGF、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of Sal B on protein expression of myocardial VEGF, Nrf2, and HO-1 in MI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

水平显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 给予不同剂量的 Sal B 治疗后, 大鼠心肌梗死边缘区 VEGF、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平有不同程度的增加 ($P < 0.05$)。

4 讨论

冠心病对人类健康的危害越来越严重。近年来研究发现, 冠心病心梗之后缺血区可出现血管新生^[9,13-15], 多因组织缺血缺氧诱导产生。本课题组前期实验已经证实 Sal B 能保护缺血诱导的心肌损伤, 减少心肌梗死面积^[2]。Sal B 防治冠心病的疗效确切, 但有关其改善心肌缺血与促进缺血心肌血管生成的相关性及分子作用机制尚不明确。

心肌缺血后, 缺血区内的血管迅速再生对心肌缺血的预后有非常重要的意义^[16]。MVD 和梗死范围可直接或间接反映血管再生情况^[17]。本实验研究结果证明, Sal B 可减少大鼠心肌梗死面积, 增加心肌梗死边缘区 MVD, 显著降低大鼠血清 CK-MB、LDH 和 cTnI 水平, 且呈剂量依赖关系。因此初步

认为 Sal B 具有促进心肌血管再生的作用。

Nrf2/HO-1 信号途径在血管新生中发挥重要的调控作用^[18-19]。Nrf2 及其激活的下游基因对心肌细胞具有关键作用。研究发现心肌缺血导致细胞氧化应激损伤时,存在于细胞质中的 Nrf2 会与其耦合蛋白 keap1 解离并转移入核,识别结合抗氧化反应元件(ARE),启动下游系列基因 HO-1 的表达^[20]。VEGF 是特异性的血管内皮细胞生长刺激因子,具有促进血管形成的作用^[21]。研究发现外界物质可通过激活 Nrf2/HO-1 通路进而诱导 VEGF 的合成,参与缺血损伤后血管新生的调控过程^[11]。本研究结果显示,Sal B 能够显著提高心肌梗死大鼠心脏梗死区 VEGF、Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达水平,提示 Sal B 可能通过该途径促进血管再生,达到对大鼠心肌缺血损伤的保护作用,为 Sal B 临床合理应用提供了一定的基础。

参考文献

- [1] 殷英,卫国,王艳华,等.丹红注射液促进心肌梗模型大鼠缺血心肌血管新生[J].中成药,2016,38(9): 1893-1897.
- [2] 周丹,权伟,关月,等.丹酚酸B通过Akt-eNOS通路对大鼠心肌缺血/再灌注损伤保护作用的研究[J].陕西中医,2013(34): 104-107.
- [3] 袁振飞,范国祥,王蓓蓓,等.丹参注射液对缺血再灌注损伤心肌保护作用[J].实用临床医学杂志,2008,12(8): 12-14.
- [4] 张丽萍,张晶.丹参酮IIA对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J].中国社区医生,2010,12(27): 28.
- [5] 杨萍,贾钰华,李杰.丹参酮IIA对过氧化氢损伤心肌细胞的保护作用及机制研究[J].时珍国医国药,2010,21(1): 3-5.
- [6] Li L, Pan H, Wang H, *et al.* Interplay between VEGF and Nrf2 regulates angiogenesis due to intracranial venous hypertension [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37338.
- [7] Wei Y, Gong J, Xu Z, *et al.* Nrf2 promotes reparative angiogenesis through regulation of NADPH oxidase-2 in oxygen-induced retinopathy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 99(10): 234-243.
- [8] Shanab A Y, Elshaer S L, El-Azab M F, *et al.* Candesartan stimulates reparative angiogenesis in ischemic retinopathy model: Role of hemoxygenase-1 (HO-1) [J]. *Angiogenesis*, 2015, 8(2): 137-150.
- [9] Wei G, Yin Y, Duan J, *et al.* Hydroxysafflor yellow A promotes neovascularization and cardiac function recovery through HO-1/VEGF-A/SDF-1 α cascade [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.074.
- [10] Wang Y, Huo Y, Zhao L, *et al.* Cyanidin-3-glucoside and its phenolic acid metabolites attenuate visible light-induced retinal degeneration *in vivo* via activation of Nrf2/HO-1 pathway and NF- κ B suppression [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(7): 1564-1577.
- [11] 李贻奎,赵乐,何萍,等.提高结扎冠状动脉在体大鼠心肌梗死模型制作速度和质量的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(7): 948-1705.
- [12] 权伟,周丹,郭超,等.丹参素钠通过抑制炎症反应对心肌缺血-再灌注损伤的保护作用[J].中南药学,2012,10(12): 885-888.
- [13] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. *Nature*, 2005, 438(70): 932-936.
- [14] Smart N. Prospects for improving neovascularization of the ischemic heart: Lessons from development [J]. *Microcirculation*, 2017, 24(1): e12335.
- [15] Spyridopoulos I, Arthur H M. Microvessels of the heart: Formation, regeneration, and dysfunction [J]. *Microcirculation*, 2017, 24(1): e12338.
- [16] 周志益,黄晶.心脑血管再生治疗技术的研究进展[J].国际心血管病杂志,2010,37(3): 129-131.
- [17] 张庆勇,陈燕萍,刘芬,等.人参皂苷Rg₁对大鼠急性缺血心肌血管再生的促进作用[J].第三军医大学学报,2013,35(1): 42-45.
- [18] Afonyushkin T, Oskolkova O V, Philippova M, *et al.* Oxidized phospholipids regulate expression of ATF4 and VEGF in endothelial cells via NRF2-dependent mechanism novel point of convergence between electrophilic and unfolded protein stress pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(5): 1007-1013.
- [19] Uno K, Prow T W, Bhutto I A, *et al.* Role of Nrf2 in retinal vascular development and the vaso-obliterative phase of oxygen-induced retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(7): 493-500.
- [20] Czibik G, Derumeaux G, Sawaki D, *et al.* Heme oxygenase-1: An emerging therapeutic target to curb cardiac pathology [J]. *Basic Res Cardiol*, 2014, 109(6): 450-464.
- [21] Crafts T D, Jensen A R, Blocher-Smith E C, *et al.* Vascular endothelial growth factor: Therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia [J]. *Cytokine*, 2015, 71(2): 385-393.