

基于不同Caspase凋亡通路的玄参环烯醚萜总苷抑制心肌梗死模型大鼠心肌细胞凋亡的作用机制研究[△]

梁 俭^{1*}, 骆杰炉¹, 蔡庆群¹, 许良葵², 李 脉², 黄海潮^{2#} (1. 广州中医药大学第一附属医院药学部, 广州 510405; 2. 广东食品药品职业学院实验实训中心, 广州 510520)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0735-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.04

摘要 目的: 研究玄参环烯醚萜总苷抑制心肌梗死模型大鼠心肌细胞凋亡的作用机制。方法: 将雄性Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组和玄参环烯醚萜总苷低、中、高剂量给药组, 每组10只。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支的方法建立心肌梗死模型, 假手术组只穿线不结扎。各剂量药物组大鼠在造模成功后分别灌胃玄参环烯醚萜总苷混悬液, 每次剂量为50、100、200 mg/kg (以总苷提取物质量计), 灌胃体积为10 mL/次, 每天2次, 连续给药7 d; 假手术组和模型组大鼠同法灌胃等体积生理盐水。记录大鼠术前、术后及给药7 d过程中的II导联心电图S-T段变化情况; 检查大鼠心功能指标; 采用比色法、免疫抑制法或酶联免疫吸附(ELISA)法检测各组大鼠血清中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白I(cTn I)、N末端钠尿肽原(NT-pro BNP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平; 采用TUNEL法观察心肌细胞凋亡情况; 采用比色法检测心肌细胞中超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)的含量; 采用ELISA法、酶解比色法或酶解荧光法检测心肌细胞中Bcl-2、Bax、细胞色素C(Cyt C)、胱天蛋白酶8(Caspase-8)、Caspase-9、Caspase-12、Caspase-3、Calpain的蛋白表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠心电图S-T段显著抬高, 左室舒张末期内径、左室收缩末期内径均显著增加, 左室射血分数、短轴缩短率均显著降低; 血清中LDH、CK-MB、cTn I、NT-pro BNP、TNF- α 水平均显著升高; 心肌组织中有大量黄褐色凋亡细胞; 心肌组织中SOD活性显著降低, MDA含量显著升高; 心肌细胞中Bcl-2蛋白表达水平及Bcl-2/Bax比值均显著降低, Bax、Cyt C、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12、Calpain的蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 各剂量药物组大鼠的上述指标及心肌组织病理学变化均有显著改善; 心肌细胞中Bcl-2蛋白表达水平及Bcl-2/Bax比值均显著升高, Bax、Cyt C、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12、Calpain的蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 玄参环烯醚萜总苷可同时通过抑制Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12相关的3条凋亡通路, 继而抑制Caspase-3的激活, 从而起到抗心肌细胞凋亡作用。

关键词 玄参; 环烯醚萜总苷; 心肌梗死; 半胱天冬蛋白酶; 凋亡途径; 机制; 大鼠

Study on the Effect Mechanism of Iridoid Glycosides of *Scrophularia ningpoensis* Inhibiting Cardiomyocytes Apoptosis in Myocardial Infarction Model Rats Based on Different Caspase Apoptosis Pathways

LIANG Jian¹, LUO Jielu¹, CAI Qingqun¹, XU Liangkui², LI Mai², HUANG Haichao² (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. Experimental Training Center, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect mechanism of iridoid glycosides extracted from *Scrophularia ningpoensis* inhibiting cardiomyocytes apoptosis in myocardial infarction model rats. METHODS: The male Wistar rats were randomly divided into sham operation group, model group and *S. ningpoensis* iridoid glycosides low-dose, medium-dose and high-dose groups, with 10 rats in each group. Myocardial infarction models were established by ligating the left anterior descending coronary artery of the rats, and sham operation group was only threaded without ligation. After the model was established, each administration group was given *S. ningpoensis* iridoid glycosides suspension intragastrically at three different doses of 50, 100, 200 mg/kg (by the amount of total glycosides extract) with 10 mL/time, twice a day, for consecutive 7 days. Sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically with same method. The changes of S-T segment of lead ECG II were recorded before, after and during 7 days of administration. Cardiac function of rats was examined. The serum levels of LDH, CK-MB, cTn I, NT-pro BNP and TNF- α were determined by colorimetry, immunosuppression or ELISA. The apoptosis of myocardial cells was observed by TUNEL method. SOD activity and MDA content in cardiac myocytes were detected by colorimetry. The expressions of Bcl-2, Bax, Cyt C, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-12, Caspase-3 and Calpain in

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81702990); 广东省医学科学技术研究基金项目(No.B2018184)

* 主管药师。研究方向: 药理学。电话: 020-36591912。E-mail: 302061494@qq.com

通信作者: 高级实验师, 硕士研究生。研究方向: 药理学。电话: 020-28854990。E-mail: joejack329@163.com

cardiac myocytes were detected by ELISA, enzymolysis colorimetry or enzymatic fluorescence assay. RESULTS: Compared with sham operation, electrocardiogram S-T segment was significantly elevated and the left ventricular end-diastolic diameter and left ventricular end-systolic diameter were significantly increased in the model group; left ventricular ejection fraction and short axis shortening rate decreased significantly; serum levels of LDH, CK-MB, cTn I, NT-pro BNP and TNF- α were increased significantly; there were a large number of yellow-brown apoptotic cells in myocardial tissue; the activity of SOD in myocardial tissue was significantly decreased while the content of MDA was significantly increased; the protein expression level of Bcl-2 and Bcl-2/Bax were significantly decreased, while the levels of Bax, Cyt C, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-12 and Calpain were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model group, above indexes and pathological changes of myocardial tissue were improved significantly in administration group; the level of Bcl-2 and Bcl-2/Bax in cardiomyocytes increased significantly, while the levels of Bax, Cyt C, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Caspase-12 and Calpain decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: *S. ningpoensis* iridoid glycosides can inhibit the activation of Caspase-3 by inhibiting three apoptotic pathways related to Caspase-8, Caspase-9 and Caspase-12, and then inhibit the apoptosis of cardiomyocytes.

KEYWORDS *Scrophularia ningpoensis*; Iridoid glycosides; Myocardial infarction; Caspase; Apoptosis pathway; Mechanism; Rat

玄参是玄参科植物玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.)的支根经烘晒干燥而制成的药材,传统中医药理论认为其味甘、苦、咸,性微寒,具有滋阴凉血、解毒散结、行气通脉之功效^[1]。因此,玄参常作为治疗心血管疾病中成药(如复方血栓通胶囊、健心颗粒冲剂、脉络宁注射液等)的主要组方药材,在临床上常用以治疗阴虚血瘀型冠心病^[2]。现代中药学研究表明,玄参主要含环烯醚萜苷类、黄酮类、苯丙素苷类、三萜皂苷类等成分,其中环烯醚萜苷类化合物在玄参中含量较高,是其最主要的药效成分^[3]。研究证实,环烯醚萜苷具有扩张冠状动脉、清除氧自由基、减轻炎症反应、抑制血栓形成等作用^[4]。

心肌梗死是在冠状动脉发生狭窄病变的基础上继发形成血栓,从而引起急性供血短缺,导致心功能衰竭、心肌缺氧坏死的疾病^[5]。而在心肌缺血的过程中,侧支循环再灌注产生的氧自由基和组织坏死引发的炎症反应,也是造成心肌组织损伤的重要因素^[6]。近年研究发现,心肌梗死的病理变化与细胞的程序性死亡(即凋亡)密切相关,心肌细胞凋亡可能是心肌组织发生不可逆损伤的一个重要因素^[7]。胱天蛋白酶(Caspases)家族是启动细胞凋亡的关键蛋白,根据起始激活 Caspase 种类的不同,细胞凋亡途径可分为 Caspase-8 启动的外源性途径、Caspase-9 启动的内源性途径、Caspase-12(鼠类)启动的内质网途径,分别涉及炎症反应、线粒体损伤、内质网功能障碍等导致心肌凋亡的关键因素^[8]。已有学者通过检测 Caspase-3 的活性来研究玄参提取物抑制氧化应激所致心肌凋亡的作用机制^[9]。然而 Caspase-3 是细胞执行上述 3 种凋亡途径的汇合点,仅对其进行研究无法充分说明玄参提取物是通过抑制哪一条途径来发挥抗凋亡作用。目前,仍未见有研究从 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12 相关的 3 条凋亡通路整体深入探讨玄

参环烯醚萜总苷抑制心肌凋亡的作用机制^[10]。为此,本课题组通过建立大鼠心肌梗死模型,进一步阐明玄参环烯醚萜总苷抑制缺血性心肌细胞凋亡的作用及其机制,为更深入研究玄参的药效成分提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

MS304S 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ-1000DE-Q 型超声仪(昆山超声仪器有限公司);SAV2500 型动物呼吸机、V3404 型动物心电监护仪(美国 SurgiVet 公司);CX23 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Acuson SC2000 型超声显像仪(德国 Siemens 公司);Synergy 2 型全自动多功能酶标仪(美国 Diotek 公司);AU5800 型生化分析仪(美国 Beckman 公司);Elysys2010 型免疫分析仪[罗氏诊断产品(上海)有限公司];Sorvall ST40 型台式离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Direct-Q3 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I(cTn I)、N 末端钠尿肽原(NT-pro BNP)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究社);Bcl-2、Bax、细胞色素 C(Cyt C)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12、钙蛋白酶(Calpain)活性检测试剂盒(美国 Biovision 公司);硫化钠、水合氯醛、苏木精(上海阿拉丁生化技术有限公司);HPD100 大孔吸附树脂(16~60 目,天津浩聚树脂科技有限公司);其余试剂为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 药材

玄参饮片(广东康美药业中药饮片厂,批号:180306231),经广州中医药大学第一附属医院主任中医师蔡庆群作显微和理化鉴别,鉴定为玄参科植物玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.)干燥支根。

1.4 动物

SPF级Wistar雄性大鼠50只,6周龄,体质量为(196±5.2)g,购于广州中医药大学实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2013-0001。

2 方法

2.1 玄参环烯醚萜总苷的提取

称取充分粉碎的玄参粉末500g,参照文献[11],按液料比20:1(L/g)加入30%乙醇,超声提取(功率:600W,频率:40kHz)30min×3次,合并提取液,抽滤,得滤液。称取预处理过的HPD100大孔树脂适量,装柱,根据文献[12],将上述滤液酸碱度调节pH至4,按10倍柱体积(BV)上样,静态吸附48h后,按6BV以pH8的80%乙醇洗脱。取洗脱液,在70℃条件下旋蒸浓缩,50℃恒温干燥挥发残余溶剂,得棕褐色粉末,即玄参环烯醚萜总苷提取物(约27.82g,得率约为5.56%),置于干燥器中在室温下保存,备用。

2.2 大鼠心肌梗死模型的建立

参照文献[13]建立大鼠心肌梗死模型。对大鼠腹腔注射10%水合氯醛0.3mL/100g麻醉后,将其仰卧固定于操作台上,用8%硫化钠溶液脱去胸前杂毛,气管插管,采用动物呼吸机通气并记录术前肢体II导联心电图。皮肤消毒后剪开胸骨,以10号线荷包穿缝;剥离肋间肌肉,于第3~4肋间钝性开胸,使心脏充分暴露;于左心耳根部下方2mm处进针,穿过表层于肺动脉圆锥旁出针,找到左冠状动脉伴行的冠状静脉后,于左心耳下2~3mm处用6~0号无损缝合线结扎(宽度为0.2~0.3cm);将心脏沿肋间间隙放回胸腔,迅速挤出胸腔内气体并拉紧荷包缝合线缝合切口。假手术组大鼠只穿线不结扎,其余同法处理。术后测定II导联心电图,以心电图S-T段明显抬高为心肌梗死模型成功建立的标志。术后大鼠肌内注射青霉素预防感染。

2.3 分组与给药

取造模成功的大鼠40只,随机分为模型组和低、中、高剂量药物组,每组10只;另取10只假手术组大鼠作为对照。各剂量药物组分别灌胃“2.1”项下总苷提取物的水制混悬液,每次剂量为50、100、200mg/kg(剂量按人体用量换算而得^[14-15]),以玄参环烯醚萜总苷提取物质量计,灌胃体积为10mL/次,每天2次,连续给药7d;假手术组和模型组大鼠同法灌胃等体积生理盐水。

2.4 大鼠心电图S-T段变化情况监测

在术前、术后及给药7d过程中,各组大鼠按“2.2”项下方法麻醉、固定后,记录各时间点的II导联心电图的

S-T段变化。

2.5 大鼠心功能指标检测

末次给药后第2天,各组大鼠按“2.2”项下方法麻醉、固定,采用超声显像仪取胸骨旁左室长轴切面检测各项心功能指标,主要包括左室舒张末期内径(LVEDd)和左室收缩末期内径(LVEDs);同时,计算左室射血分数(LVEF)和短轴缩短率(LVFS), $LVEF \approx (LVEDd^3 - LVEDs^3) / LVEDd^3 \times 100\%$, $LVFS = (LVEDd - LVEDs) / LVEDd \times 100\%$ 。

2.6 大鼠血清标志物水平检测

取“2.5”项下麻醉大鼠,清洁其尾部污垢后,剪去尾尖2~3mm,向下轻轻挤压尾根收集血液1mL至离心管中,静置30min,3000r/min离心5min。吸取上层血清500μL,按相应试剂盒说明书操作,采用比色法检测血清中LDH水平,采用免疫抑制法检测CK-MB水平,采用ELISA法检测cTnI、NT-proBNP、TNF-α水平。上述指标均以自动生化分析仪进行检测。

2.7 大鼠心肌细胞凋亡情况观察

采用原位末端凋亡检测(TUNEL)法进行染色观察。取“2.5”项下麻醉大鼠,沿剑突剪开其胸骨并暴露胸腔,迅速取出心脏并排出腔内血液,剪取部分心脏组织置于4%多聚甲醛溶液中固定约4h,常规梯度脱水、石蜡包埋、切片(5μm)。按相应试剂盒说明书操作,以辣根过氧化物酶(HRP)催化底物二氨基联苯胺(DAB)生成深棕色沉淀物,再经苏木精复染细胞核后,于显微镜下观察心肌组织形态及染色情况。深棕色沉淀物越多、颜色越深,则表示心肌细胞凋亡数越多。

2.8 大鼠心肌氧化应激指标水平检测

取“2.7”项下剪取的另一部分心脏组织,于4℃预冷的培养皿内将其剪碎,称取约100mg,在冰浴条件下制成匀浆,于4℃条件下以3000r/min离心10min。吸取上清液,按相应检测试剂盒说明书操作,采用比色法以酶标仪检测SOD的活性和MDA的含量。

2.9 大鼠心肌组织中Caspase凋亡通路相关蛋白表达水平检测

取“2.8”项下心肌匀浆上清液,微孔滤膜过滤,采用BCA法进行总蛋白定量并确定后续操作的上样量。按相应试剂盒说明书操作,分别采用ELISA法以免疫分析仪检测Bcl-2、Bax、Cyt C表达水平;采用酶解比色法以多功能酶标仪检测Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12、Caspase-3表达水平;采用酶解荧光法以多功能酶标仪检测Calpain表达水平[以相对荧光强度(RFI)表示]。

2.10 统计学方法

采用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。模型组与假手术组比较采用t检验分析,各剂量给药组与模型组两两多重比较采用单因素方

差分析。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠心电图S-T段变化

与假手术组比较,造模成功的大鼠心电图S-T段在不同时间点均显著抬高,差异有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较,各剂量药物组大鼠心电图S-T段随实验时间的延长而呈下降趋势;在给药第5、6、7天时,各剂量药物组大鼠心电图S-T段均显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01),且这一下降趋势随给药剂量的增加而更明显。各组大鼠心电图S-T段变化见图1。

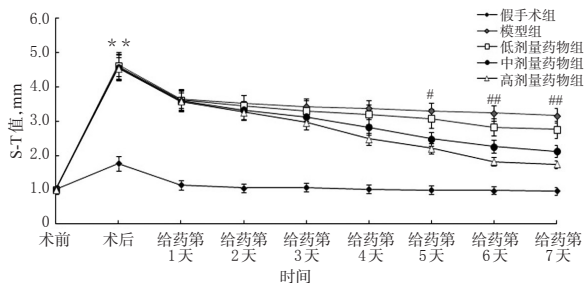


图1 各组大鼠心电图S-T段变化

Fig 1 Changes of S-T segment in electrocardiogram of rats in each group

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

Note: vs. sham operation group, **P<0.01; vs. model group, #P<0.05, ##P<0.01

3.2 各组大鼠心功能指标水平

与假手术组比较,模型组大鼠的LVEDd和LVESd均显著增加,LVEF和LVFS均显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。与模型组比较,各剂量药物组大鼠的LVEDd和LVESd均显著降低,LVEF和LVFS均显著升高,差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。各组大鼠的心功能指标水平检测结果见表1。

表1 各组大鼠的心功能指标水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Results of cardiac function index levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LVEDd,mm	LVESd,mm	LVEF,%	LVFS,%
假手术组	3.86±0.28	1.53±0.11	93.74±9.21	60.30±5.69
模型组	4.73±0.35*	2.79±0.23*	79.56±7.81†	41.09±3.97**
低剂量药物组	4.56±0.35*	2.51±0.19*	84.50±7.17*	46.28±4.98*
中剂量药物组	4.43±0.33*	2.16±0.16*	88.46±8.05**	51.32±5.45**
高剂量药物组	4.10±0.32**	1.73±0.14**	92.53±8.85**	57.88±6.13**

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

Note: vs. sham operation group, *P<0.05, **P<0.01; vs. model group, #P<0.05, ##P<0.01

3.3 各组大鼠血清标志物水平

与假手术组比较,模型组大鼠血清中LDH、CK-MB、cTn I、NT-pro BNP、TNF-α水平均显著升高,差异均有统计学意义(P<0.01)。与模型组比较,各剂量

药物组上述血清标志物水平均显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05或P<0.01)。各组大鼠血清标志物水平检测结果见表2。

表2 各组大鼠血清标志物水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Results of serum marker levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LDH,U/L	CK-MB,kU/L	cTn I,ng/mL	NT-pro BNP,ng/L	TNF-α,μg/mL
假手术组	148.25±13.09	10.54±7.16	346.35±29.54	119.45±12.02	1.51±0.17
模型组	227.50±20.39**	18.30±17.11**	759.48±69.04**	236.21±28.31**	2.31±0.60**
低剂量药物组	200.48±18.55*	16.74±13.35*	642.35±50.40	205.78±19.74*	2.02±0.47*
中剂量药物组	175.08±13.87*	15.78±11.20*	508.47±27.45*	172.33±15.64*	1.78±0.49*
高剂量药物组	157.92±15.38**	12.07±10.45**	392.70±38.96**	138.34±15.03**	1.62±0.58**

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

Note: vs. sham operation group, **P<0.01; vs. model group, #P<0.05, ##P<0.01

3.4 各组大鼠心肌组织凋亡情况

镜下可见,假手术组大鼠心肌组织细胞排列紧密、横纹清晰,细胞核未见棕色沉淀物;模型组大鼠心肌组织细胞排列不规整、肌束变性分离,心肌间质有较多炎症细胞浸润,大量细胞核附着有深棕色沉淀物;各剂量药物组大鼠心肌组织细胞的形态病变程度、细胞核深棕色沉淀物、炎症细胞浸润均较模型组减少。各组大鼠心肌组织凋亡情况显微图见图2。

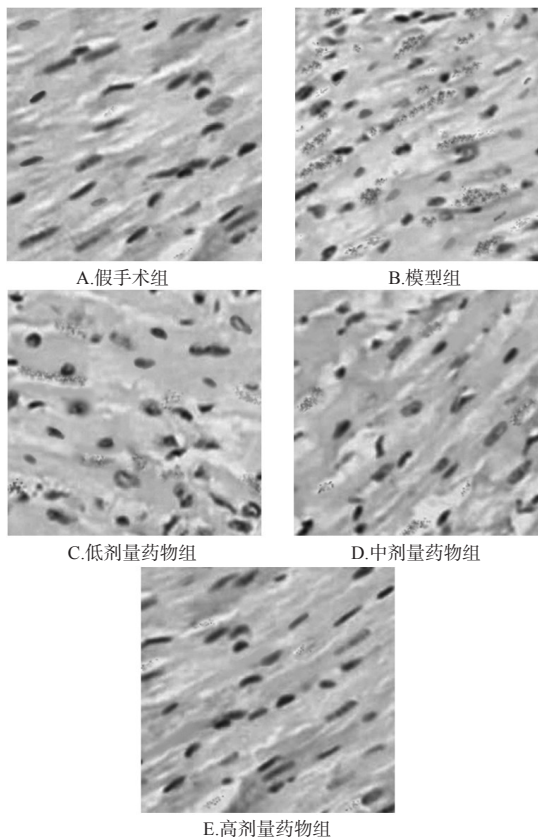


图2 各组大鼠心肌组织凋亡情况显微图(TUNEL法,×200)

Fig 2 Micrograms of myocardium apoptosis of rats in each group (TUNEL method, ×200)

3.5 各组大鼠心肌氧化应激指标水平

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织中SOD活性显著降低,MDA含量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,各剂量药物组大鼠心肌细胞中SOD活性均显著升高,MDA含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠心肌氧化应激指标水平检测结果见表3。

表3 各组大鼠心肌氧化应激指标水平检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 3 Results of myocardial oxidative stress index levels of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	SOD, U/mg prot	MDA, μ mol/g prot
假手术组	49.77 \pm 5.28	23.01 \pm 2.72
模型组	33.74 \pm 3.59**	55.70 \pm 7.05**
低剂量药物组	37.52 \pm 4.02 [#]	50.21 \pm 5.37 [#]
中剂量药物组	42.08 \pm 4.58 [#]	37.61 \pm 3.62 [#]
高剂量药物组	46.09 \pm 4.96 ^{##}	31.79 \pm 3.05 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

表4 各组大鼠心肌组织中Caspase凋亡通路相关蛋白表达水平检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 4 Results of protein expression levels of Caspase apoptosis pathway related protein in myocardium of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	Bcl-2, ng/mL	Bax, ng/mL	Bcl-2/Bax	Cyt C, ng/mL	Caspase-3, U/g prot	Caspase-8, U/g prot	Caspase-9, U/g prot	Caspase-12, U/g prot	Calpain
假手术组	49.85 \pm 6.02	23.61 \pm 2.42	2.11 \pm 0.32	20.45 \pm 3.55	1.36 \pm 0.13	0.81 \pm 0.11	0.35 \pm 0.08	0.48 \pm 0.07	1.01 \pm 0.01
模型组	25.22 \pm 5.37**	43.94 \pm 6.20**	0.57 \pm 0.05**	38.65 \pm 6.82**	6.37 \pm 0.92**	1.97 \pm 0.82**	0.52 \pm 0.06**	0.98 \pm 0.13**	2.46 \pm 0.42**
低剂量药物组	31.47 \pm 6.21 [#]	34.51 \pm 5.30 [#]	0.91 \pm 0.09 ^{##}	33.59 \pm 4.96 [#]	5.02 \pm 0.98 [#]	1.82 \pm 0.71 [#]	0.47 \pm 0.05 [#]	0.85 \pm 0.09 [#]	2.30 \pm 0.56 [#]
中剂量药物组	39.64 \pm 7.01 [#]	30.08 \pm 5.18 [#]	1.32 \pm 0.32 ^{##}	28.38 \pm 6.48 [#]	4.20 \pm 0.28 [#]	1.49 \pm 0.65 [#]	0.42 \pm 0.05 [#]	0.73 \pm 0.06 [#]	2.09 \pm 0.39 [#]
高剂量药物组	45.87 \pm 6.02 ^{##}	25.16 \pm 4.50 ^{##}	1.86 \pm 0.84 ^{##}	23.06 \pm 5.13 ^{##}	2.27 \pm 0.30 ^{##}	1.24 \pm 0.29 [#]	0.38 \pm 0.03 [#]	0.58 \pm 0.05 [#]	1.72 \pm 0.36 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

素诱导的大鼠心肌损伤^[19],桃叶珊瑚苷可缓解TNF- α 诱导的心脏祖细胞凋亡^[20]。本研究结果显示,与假手术组比较,大鼠造模后的心电图S-T段显著抬高,LVEDd和LVEDs均显著增加,LVEF和LVFS均显著降低;血清中LDH、CK-MB、cTn I、NT-pro BNP、TNF- α 水平均显著升高;心肌组织有大量黄褐色凋亡细胞;心肌组织中SOD活性显著降低,MDA含量显著升高。这表明大鼠心肌梗死模型建立成功,其心功能明显受损,心肌细胞出现炎症损伤,并发生明显凋亡。与模型组比较,给予不同剂量玄参环烯醚萜总苷干预后,大鼠的上述指标及心肌组织病理学变化均有显著改善,表明玄参环烯醚萜总苷能显著减轻心肌梗死模型大鼠的症状,恢复大鼠心功能,抑制心肌细胞凋亡,对缺血性心肌细胞炎症损伤具有明显的保护作用。

细胞凋亡是指机体细胞在自身发育过程中或外在因素作用下,通过细胞内基因及其产物的调控而自发的一种程序性死亡^[18]。Caspase是一类与凋亡密切相关的蛋白水解酶家族,其成员在氨基酸序列、结构及酶的特

3.6 各组大鼠心肌组织中Caspase凋亡通路相关蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织中Bcl-2蛋白表达水平及Bcl-2/Bax比值均显著降低,Bax、Cyt C、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12、Calpain的蛋白表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,各剂量给药组大鼠心肌组织中Bcl-2蛋白表达水平及Bcl-2/Bax比值均显著升高,Bax、Cyt C、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12、Calpain的蛋白表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠心肌组织中Caspase凋亡通路相关蛋白表达水平检测结果见表4。

4 讨论

已有研究对玄参环烯醚萜总苷进行分离、纯化后发现,其主要由哈巴俄苷、哈巴昔、梓醇苷、桃叶珊瑚苷、京尼平苷等活性环烯醚萜苷类成分组成^[16]。其中,哈巴俄苷、哈巴昔可减轻氧自由基对血管内皮的损伤^[17],京尼平苷可抑制核转录因子 κ B活化产生的抗炎反应和钙超载引起的内质网应激反应^[18],梓醇苷可抑制异丙肾上腺

性上均相似,通常以无活性的酶原形式存在于大多数生物细胞中^[21]。Caspase酶原必须通过自身活化或相互激活,重新组装形成活性复合物才能启动凋亡程序。目前,经典的细胞凋亡途径包括由不同Caspase成员启动的3条途径:(1)Caspase-8启动的外源性途径,又称死亡受体途径;(2)Caspase-9启动的内源性途径,又称线粒体途径;(3)Caspase-12(鼠类)启动的内质网途径^[8]。

外源性途径始于细胞表面死亡受体Fas、TNF受体1(TNFR1)的激活,当Fas配体(FasL)和TNF- α 等凋亡信号分子作用于相应的受体后,会发生一系列反应生成凋亡复合物,从而激活Caspase-8酶原^[22-23]。活化的Caspase-8可激活下游的Caspase-3,最终导致细胞凋亡。本实验结果显示,玄参环烯醚萜总苷干预后可显著降低心肌梗死模型大鼠的血清TNF- α 水平和心肌组织中Caspase-8的蛋白表达水平,表明其可阻止TNF- α 参与形成凋亡复合物,抑制Caspase-8的活化,最终避免激活Caspase-3促进细胞凋亡。

内源性凋亡途径由细胞线粒体的功能异常或损伤

所致,因此也被称为线粒体途径。在梗死的心肌组织中,侧支循环缺血-再灌注可导致胞内氧自由基的累积,使线粒体外膜受到氧化损伤^[24],此时促进细胞存活的Bcl-2和促进细胞凋亡的Bax表达量发生逆转,导致线粒体膜通透性增大^[25],大量Cyt C释放至细胞浆中并激活Caspase-9酶原,活化后的Caspase-9可激活下游的Caspase-3,最终导致细胞凋亡^[26]。本实验结果显示,玄参环烯醚萜总苷干预后可显著升高心肌梗死模型大鼠心肌细胞中的SOD活性、降低MDA含量,表明其可减少心肌缺血-再灌注产生的氧自由基;同时,其可上调Bcl-2和下调Bax的表达量,进而抑制Cyt C释放入胞浆激活Caspase-9,从而发挥抗细胞凋亡作用。

内质网凋亡途径主要与内质网应激反应有关。内质网是细胞内最重要的蛋白质合成折叠的场所,当心肌组织发生缺血-再灌注时,可导致Na⁺-Ca²⁺交换增加,使胞外Ca²⁺大量内流造成胞内Ca²⁺超载,从而引发内质网应激反应使其内部的蛋白质折叠错误并过度聚集,最终触发细胞凋亡信号^[27]。很多细胞在凋亡早期均出现胞质内Ca²⁺浓度迅速持续升高的现象,以致激活胞质中的钙依赖性蛋白酶Calpain,而Calpain能直接激活Caspase-12,活化后的Caspase-12又可激活Caspase-3,使凋亡继续进行^[28]。本实验结果显示,玄参环烯醚萜总苷干预后可显著降低心肌梗死模型大鼠心肌细胞中Caspase-12、Calpain的蛋白表达水平,表明其可抑制心肌缺血-再灌注引发的Ca²⁺超载,从而阻止Caspase-12活化并传递凋亡信号。

综上所述,玄参环烯醚萜总苷可同时通过抑制Caspase-8、Caspase-9、Caspase-12相关的3条凋亡通路,继而抑制对Caspase-3的激活而起到抗心肌细胞凋亡作用,由此发挥对大鼠心肌缺血性损伤的保护作用。

参考文献

- [1] 卢芳,于卉,张宁,等.玄参保护心血管系统的药理作用研究进展[J].中国药房,2016,27(22):3148-3150.
- [2] 赵秀君,贾文亮.玄参为主组方治疗心血管病[J].中医杂志,2010,51(3):249.
- [3] 薛刚强,杜婧,潘新艳,等.玄参化学成分研究[J].中药材,2014,37(9):1597-1599.
- [4] 杜晓煌,方勇飞,李莉,等.玄参主要成分生物活性研究进展[J].中国药房,2015,26(15):2158-2160.
- [5] 张佩,王承龙,刘剑刚,等.缺血性心脏病心肌能量代谢障碍的研究进展[J].心脏杂志,2018,30(2):207-211,217.
- [6] 夏强,钱令波.心脑血管缺血再灌注损伤的机制及防治策略研究进展[J].浙江大学学报(医学版),2010,39(6):551-558.
- [7] 李晓云,桂庆军.Caspase家族与冠心病研究现状及其进展[J].现代医药卫生,2015,31(1):70-72.
- [8] 岳原亦,张扬,张一奇.Caspase家族与细胞凋亡[J].中国医疗前沿,2011,6(6):25-26.
- [9] 潘晓冬.金银花和玄参抗心肌细胞凋亡作用及机制研究[D].哈尔滨:哈尔滨医科大学,2014.
- [10] 冯骁,田聆,黄倩.Caspase-3基因表达调控研究进展[J].生命科学,2014,26(9):936-942.
- [11] 周洪伟,郝丽静,杨勇,等.星点设计-效应面法优化玄参提取工艺[J].世界中医药,2012,7(5):455-457.
- [12] 李祚丹.玄参中环烯醚萜类物质的分离纯化研究[D].重庆:重庆大学,2014.
- [13] 王鑫,宋佳格,穆成吉,等.冠状动脉结扎法制作大鼠心肌梗死模型研究进展[J].广州医药,2016,47(6):93-96.
- [14] 熊远珍.实验动物与人用药量的新换算[J].江西医学院学报,1997(4):41.
- [15] 卢芳,于卉,李自辉,等.玄参及其拆分组分对异丙肾上腺素致大鼠心室重构的影响[J].中药材,2016,39(4):863-866.
- [16] 谢小艳,夏春森.中药玄参的化学成分及药理研究进展[J].亚太传统医药,2010,6(5):121-125.
- [17] 崔忠生,邸科前,马焕云.哈巴昔及哈巴俄昔对过氧化氢损伤血管内皮细胞的保护作用[J].医学研究与教育,2009,26(2):11-12.
- [18] 杨轶舜,张彤,于筛成.京尼平的研究进展及其药理价值[J].中成药,2011,33(1):130-133.
- [19] 毕方杰,张虎,胡健.梓醇对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤的保护作用及机制研究[J].中国医科大学学报,2013,42(3):244-248.
- [20] 李春晓,李慧影,王虹,等.桃叶珊瑚苷通过ERβ途径抑制TNF-α诱导的心脏祖细胞凋亡[J].中国药理学通报,2016,32(8):1068-1074.
- [21] 王筱冰,张小翠,夏妙红,等.Caspase的活化机制[J].现代生物医学进展,2006,6(3):53-55.
- [22] TUMMERS B, GREEN DR. Caspase-8: regulating life and death[J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1):76-89.
- [23] LIU X, SHI F, LI Y, et al. Post-translational modifications as key regulators of TNF-induced necroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 6(7):1-9.
- [24] CADENAS S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection[J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2018, 1859(9):940-950.
- [25] 王卫东,陈正堂.Bcl-2/Bax比率与细胞“命运”[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393-396.
- [26] WU CC, BRATTON SB. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(6):546-558.
- [27] 朱静峰,黄冬.氧自由基、钙超载与心肌缺血再灌注损伤[J].云南医药,2007,28(1):67-70.
- [28] MINAMINO T, KITAKAZE M. ER stress in cardiovascular disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(6):1105-1110.

(收稿日期:2018-10-08 修回日期:2019-02-01)

(编辑:段思怡)