

丹参多酚酸盐对大鼠心肌缺血再灌注后心肌细胞凋亡的抑制作用及机制研究



李 兵

摘要:目的 研究丹参多酚酸盐对大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡的抑制作用及其机制。方法 通过夹闭左冠状动脉前降支复制心肌缺血再灌注大鼠模型,设假手术组、模型组和丹参多酚酸盐各剂量组(分别予 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg),每组 20 只。观察心电图波动情况,2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法检测心肌梗死面积;苏木素-伊红(HE)染色法进行心肌组织病理学检查;缺口末端标记法(TUNEL)观察心肌细胞凋亡,蛋白质免疫印迹(western blotting)法检测其凋亡相关蛋白表达。结果 与模型组比较,丹参多酚酸盐各剂量组心电图明显改善。与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织梗死面积明显升高($P < 0.01$);丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组、40 mg/kg 组大鼠心肌组织梗死面积较模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。丹参多酚酸盐各剂量组大鼠心肌组织病变较模型组明显改善。模型组大鼠心肌细胞凋亡指数(AI)较假手术组显著升高($P < 0.01$);丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组、40 mg/kg 组 AI 较模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白、激活型 Caspase-3 蛋白较假手术组显著上调表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Bcl-2/Bax 比值较假手术组显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组、40 mg/kg 组抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著上调,促凋亡蛋白 Bax 表达显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Bcl-2/Bax 比值提高($P < 0.01$),促凋亡蛋白激活型 Caspase-3 蛋白表达显著下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 丹参多酚酸盐对缺血再灌注后心肌细胞凋亡具有抑制作用,而调节凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、激活型 Caspase-3)表达可能是其重要的分子机制。

关键词:心肌缺血;再灌注;丹参多酚酸盐;细胞凋亡;抑制作用;Bcl-2;Bax;激活型 Caspase-3

中图分类号:R542.2 R256.2 文献标识码:A doi:10.12102/j.issn.1672-1349.2019.02.008

Inhibitory Effect of Salvianolate on Myocardial Apoptosis after Myocardial Ischemia - reperfusion Injury in Rats and Its Mechanism

LI Bing

Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect and mechanism of Salvianolate on myocardial apoptosis after myocardial ischemia - reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** The myocardial ischemia - reperfusion model was established by clamping the left anterior descending coronary artery. The rats were divided into sham group, model group, and Salvianolate groups (10, 20, 40 mg/kg, $n = 20$ in each group). The changes of electrocardiogram (ECG) in each group were monitored. The infarct size was detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining method. The myocardial histopathological changes were observed by Hematoxylin - Eosin (HE) staining. The apoptosis of cardiomyocytes was observed by TUNEL. The expression of apoptosis - related proteins was detected by western blotting. **Results** Compared with model group, the ECG in Salvianolate (10, 20, 40 mg/kg) groups were significantly improved, especially in the Salvianolate 40 mg/kg group. The myocardial infarct size in Salvianolate 20 mg/kg group and Salvianolate 40 mg/kg group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The myocardial histopathological changes and myocardial cardiomyocyte apoptosis were significantly improved and the apoptotic index (AI) were significantly decreased ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 protein was significantly increased, and the expressions of Bax, and cleaved Caspase-3 were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The ratio of bcl-2/Bax was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly up-regulated in the Salvianolate 20 mg/kg group and 40 mg/kg group, and the pro-apoptotic protein Bax expression was significantly down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Bcl-2/Bax ratio was increased ($P < 0.01$), and the expression of proapoptotic protein - cleaved Caspase-3 protein was significantly down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion**

Salvianolate has an inhibitory effect on cardiomyocyte apoptosis after MIRI, and regulation of apoptosis - related proteins such as Bcl-2, Bax, and activated Caspase-3 may be an important molecular mechanism.

Keywords: myocardial ischemia; reperfusion; Salvianolate; myocardial apoptosis; inhibitory effect; Bcl-2; Bax; cleaved Caspase-3

作者单位 邯郸市中心医院(河北邯郸 056001), E-mail: hdxzyyzhj@163.com

引用信息 李兵. 丹参多酚酸盐对大鼠心肌缺血再灌注后心肌细胞凋亡的抑制作用及机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(2): 192-195.

中药丹参味苦、微寒,具有活血通络、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦之功效,常用于心血管系统疾病的预防与治疗^[1]。丹参多酚酸是丹参的有效成分之一。王强等^[2]研究发现丹参多酚酸能够通过降低氧化应激损伤、抑制神经细胞凋亡而对实验性脑缺血再灌注损伤大鼠模型具有一定的神经保护作用,但关于丹参多酚酸对心肌组织缺血再灌注后细胞凋亡的影响文献报道尚不多见。本实验拟通过复制心肌缺血再灌注大鼠模型,研究丹参多酚酸盐对心肌缺血再灌注后细胞凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、药物与试剂 实验用大鼠(品系 SD 大鼠,清洁级,雄性,鼠龄 8 周龄,220~260 g)购自河北省实验动物中心[SCXK(冀)2013-1-003]。丹参多酚酸盐购自上海绿谷制药有限公司(规格:每瓶 50 mg)。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)购自美国 Sigma 公司;苏木素-伊红(HE)试剂盒、缺口末端标记(TUNEL)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;Bcl-2、Bax、激活型 Caspase-3 多克隆抗体购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组、模型制备与给药 设假手术组、模型组、丹参多酚酸盐各剂量组(分别予 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg),每组 20 只。通过夹闭左冠状动脉前降支复制心肌缺血再灌注大鼠模型,心电图示 ST 段抬高或 T 波高耸为心肌缺血,夹闭 30 min 后松开动脉夹,ST 段或 T 波恢复表示再灌注成功^[3];假手术组大鼠除不夹闭左冠状动脉前降支外,其余操作同模型组。丹参多酚酸盐各剂量组腹腔注射给药治疗,每日 1 次,疗程 7 d。

1.2.2 心肌梗死面积测定 取心脏组织后放置于-20℃冰箱 20 min,切片,置 2% TTC 溶液(恒温 37℃)避光孵育 15 min,灰白色为梗死区,通过医学成像软件计算梗死面积。

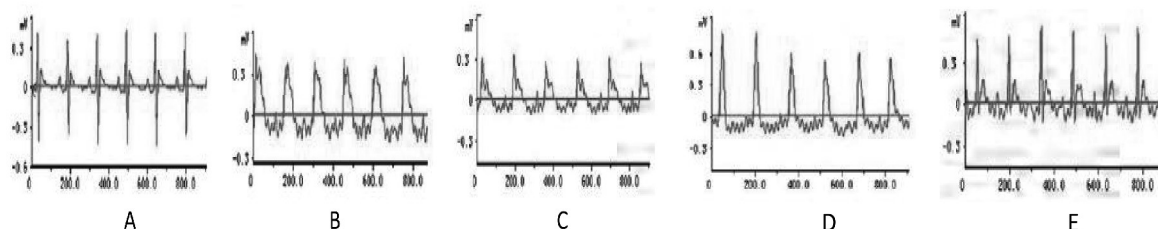
1.2.3 心肌组织病变及细胞凋亡的观察 制备心肌组织蜡块并切片,经脱蜡水化后,通过 HE 染色及倒置光学显微镜观察进行组织病理学检查,通过 TUNEL 染色观察细胞凋亡状况。凋亡指数(AI)计算:每张切片选取不重叠的 6 个视野计数细胞总数和凋亡细胞数,计算 AI, AI(%)=(阳性细胞数/细胞总数)×100%,各组分别计算平均值。

1.2.4 蛋白质免疫印迹(western blotting)法检测凋亡相关蛋白表达 取心肌组织并研磨匀浆,经 4℃、12 000 r/min 离心 20 min 处理后取沉淀,行 80℃高温蛋白变性后进行电泳、转膜、春红溶液染色,脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 Bcl-2、Bax、激活型 Caspase-3、β-actin(1:500)4℃过夜;洗膜,二抗(1:100)室温摇床孵育 1 h 后经增强化学发光法(ECL)显色。根据条带灰度值,以 β-actin 为内参半定量分析凋亡相关蛋白表达。

1.3 统计学处理 运用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,计量资料以均数±标准($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心电图监测结果比较 与假手术组比较,模型组及丹参多酚酸盐各剂量组大鼠术后左心室前壁呈灰白色并渐变为发绀症状,心电图示 ST 段抬高或 T 波高耸,提示造模成功。丹参多酚酸盐各剂量组心电图波形均明显改善,其中丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组波形接近正常。详见图 1。



A: 假手术组; B: 模型组; C: 丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组;
D: 丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组; E: 丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组

图 1 各组大鼠心电图变化

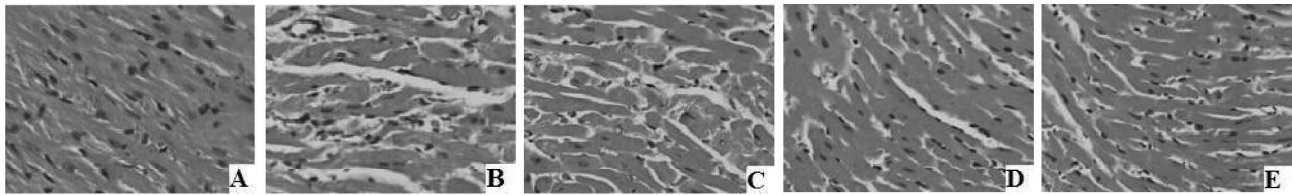
2.2 各组心肌组织梗死面积比较 与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织梗死面积明显升高($P < 0.05$);丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组、40 mg/kg 组大鼠心肌组织

梗死面积较模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组梗死面积与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠心肌组织梗死面积比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	只数	心肌组织梗死面积
假手术组	20	0.0±0.0
模型组	20	45.2±5.7 ¹⁾
丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组	20	39.5±7.4
丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组	20	32.0±5.8 ²⁾
丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组	20	22.3±4.6 ³⁾

模型组与假手术组比较,1) $P < 0.05$;各剂量组与模型组比较,2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$



A:假手术组;B:模型组;C:丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组;D:丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组;E:丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组

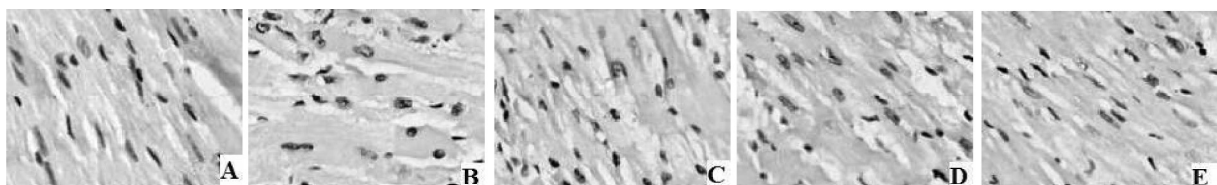
图 2 各组大鼠心肌组织形态 HE 染色

2.4 各组心肌细胞凋亡情况比较 模型组心肌细胞凋亡数量较假手术组明显增多;丹参多酚酸盐各剂量组心肌细胞凋亡数量明显减少,以丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组最为显著。模型组大鼠心肌细胞 AI 较假手术组显著升高 ($P < 0.01$);丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组、40 mg/kg 组 AI 较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组 AI 与模型组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 2、图 3。

表 2 各组大鼠心肌细胞 AI 比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	只数	AI
假手术组	20	0.0±0.0
模型组	20	56.9±10.2 ¹⁾
丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组	20	46.0±9.1
丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组	20	39.3±7.8 ²⁾
丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组	20	26.4±5.8 ³⁾

模型组与假手术组比较,1) $P < 0.01$;各剂量组与模型组比较,2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$



A:假手术组;B:模型组;C:丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组;D:丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组;E:丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组

图 3 各组大鼠心肌细胞凋亡情况(TUNEL 法)

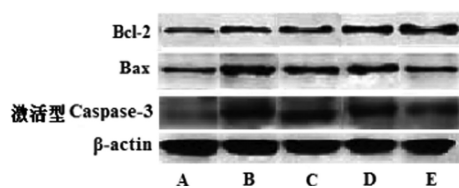
2.5 各组大鼠心肌组织 Bcl - 2、Bax、激活型 Caspase - 3 蛋白表达检测结果比较 模型组大鼠心肌组织 Bcl - 2、Bax 蛋白、激活型 Caspase - 3 蛋白较假手术组显著上调表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Bcl - 2/Bax 比值较假手术组显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,丹参多

酚酸盐 20 mg/kg 组、40 mg/kg 组能显著上调抑凋亡蛋白 Bcl - 2 表达,且显著下调促凋亡蛋白 Bax 表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提高 Bcl - 2/Bax 值 ($P < 0.01$),显著下调促凋亡蛋白激活型 Caspase - 3 蛋白表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 3、图 4。

表 3 各组大鼠心肌组织 Bcl - 2、Bax、激活型 Caspase - 3 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bcl - 2	Bax	Bcl - 2/Bax	激活型 Caspase - 3
假手术组	20	0.26±0.09	0.19±0.07	1.37±0.58	0.10±0.04
模型组	20	0.39±0.12 ¹⁾	0.75±0.18 ²⁾	0.53±0.17 ²⁾	0.49±0.18 ²⁾
丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组	20	0.41±0.10	0.60±0.19	0.67±0.24	0.42±0.15
丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组	20	0.52±0.14 ³⁾	0.42±0.14 ⁴⁾	1.21±0.43 ⁴⁾	0.30±0.10 ³⁾
丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组	20	0.63±0.16 ⁴⁾	0.36±0.11 ⁴⁾	1.69±0.61 ⁴⁾	0.16±0.06 ⁴⁾

模型组与假手术组比较,1) $P < 0.05$,2) $P < 0.01$;各剂量组与模型组比较,3) $P < 0.05$,4) $P < 0.01$



A: 假手术组; B: 模型组; C: 丹参多酚酸盐 10 mg/kg 组;
D: 丹参多酚酸盐 20 mg/kg 组; E: 丹参多酚酸盐 40 mg/kg 组

图 4 各组大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax、
激活型 Caspase-3 蛋白表达

3 讨论

冠状动脉粥样硬化性心脏病及其继发性急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)发病率随着高血压、高血脂等基础疾病发病率的上升而逐年升高,已经发展成为不容忽视的健康问题。目前,药物或手术溶栓仍是临床上应对 AMI 的首选方案,但溶栓后血管再通所引发的血流再灌注损伤却成为影响预后的主要因素。血流再灌注损伤的形成机制极为复杂,其中明确的有氧化应激、炎症、心肌细胞凋亡等^[4-8]。

结扎左冠状动脉前降支是实验室常用的制备心肌缺血再灌注动物模型的方法,造模过程中进行心电图实时监测,ST 段抬高或 T 波高耸为心肌缺血典型表现,该造模方法操作简单、成功率与重复率双高^[9]。本研究发现模型组大鼠术后左心室前壁呈灰白、发绀症状,心电图示 ST 段抬高或 T 波高耸,提示造模成功。既往研究发现丹参多酚酸具有抗凋亡、抗氧化、抗炎等多种药理学作用^[2,10-11]。心肌缺血再灌注大鼠经丹参多酚酸盐治疗能够有效改善心电图,抑制心肌组织病变,减小梗死面积,提示丹参多酚酸盐具有抑制心肌缺血再灌注损伤的作用。

促凋亡蛋白激活型 Caspase-3、Bax 和抑凋亡蛋白 Bcl-2 在细胞凋亡过程中发挥着重要的调控作用^[12],其中 Bcl-2 和 Bax 同属 Bcl-2 基因家族。Bcl-2 通过抑制细胞色素 C 释放、调节细胞内钙浓度而表现出抑凋亡作用^[13];Bax 通过破坏线粒体膜渗透性、激活促凋亡蛋白激活型 Caspase-3 而表现出促凋亡作用^[14];同源的 Bax 和 Bcl-2 能够聚合形成同源二聚体而彼此抑制对方的活性,因此 Bax、Bcl-2 的相对含量更能反映二者在细胞凋亡过程中所起到的调控作用^[15]。本研究发现,心肌缺血再灌注大鼠经丹参多酚酸盐治疗能明显上调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达,下调促凋亡蛋白 Bax 和激活型 Caspase-3 表达,提高 Bax/Bcl-2 值,这可能是丹参多酚酸盐抑制心肌缺血再灌注大鼠

心肌细胞凋亡的重要分子机制之一。

丹参多酚酸盐对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡具有抑制作用,可能与其调节凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、激活型 Caspase-3 表达有关。

参考文献:

- [1] 苟占平,吕应年,龚先玲,等.丹参类中药的品种与鉴定研究概述[J].时珍国医国药,2008,19(12):2869-2871.
- [2] 王强,张一,李璐,等.丹参多酚酸盐对大鼠脑缺血再灌注过氧化损伤的保护作用[J].右江医学,2010,38(6):665-667.
- [3] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:45.
- [4] 李娟莉,苏式兵,三七总皂苷对大鼠急性心肌梗死的保护作用[J].中药药理与临床,2013,29(1):68-72.
- [5] 任宏强,赵利,王忠,等.复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响[J].中国动脉硬化杂志,2013,21(12):1084-1088.
- [6] 张卫萍,邓杨阳,任建勋,等.淫羊藿总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤氧化应激干预机制的研究[J].中国中药杂志,2016,41(18):3400-3405.
- [7] 吴锦波,吴平生.心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J].医学综述,2011,17(19):2961-2963.
- [8] 郭庆军,王桂敏,张秀秀.淫羊藿苷预处理对心肌缺血再灌注损伤炎症反应的影响[J].中国病理生理杂志,2013,29(11):2034-2038.
- [9] 许官学,石蓓,盛瑾,等.改良大鼠急性心肌梗死模型的制备方法[J].中国老年学杂志,2013,33(14):3367-3370.
- [10] 卢伟波,杨不坚,李舒敏,等.丹参多酚酸盐对早期糖尿病肾病患者炎症细胞因子及肾血管内皮功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(2):184-187.
- [11] 王明伟,张殿福,唐建金,等.丹参多酚酸盐对猪急性心肌梗死后心肌细胞凋亡和心功能的影响[J].中西医结合学报,2009,7(2):140-144.
- [12] 史婷婷,白建平,梁月琴,等.芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响[J].中国药理学通报,2011,27(5):666-671.
- [13] OGURA T, TANAKA Y, TAMAKI H, et al. Docetaxel induces Bcl-2 and pro-apoptosis caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(6):2330-2338.
- [14] 张春玲,吴立军,左海军,等.冬凌草甲素通过改变 Bax/Bcl-xL 表达激活 caspase-3 诱导 A375-S2 细胞凋亡[J].中国药理学通报,2004,20(6):669-672.
- [15] SAEEDI BORUJENI M J, HAMI J, HAGHIR H, et al. Evaluation of Bax and Bcl-2 proteins expression in the rat hippocampus due to childhood febrile seizure[J]. Iran J Child Neurol, 2016, 10(1):53-60.

(收稿日期:2017-05-06)

(本文编辑 王丽)