

当药苷调节兴奋-收缩耦联改善心肌缺血再灌注损伤的机制

唐家杨, 王青, 于雪, 魏小棋, 于江, 李帅, 李森, 郭淑贞*

(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:探索当药苷通过兴奋-收缩耦联信号通路对缺血再灌注损伤后心脏收缩/舒张功能的影响。方法:24只健康雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药苷给药组与 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 地高辛给药组,并采用Langendorff系统结合左前降支冠状动脉结扎建立缺血再灌注损伤模型(I/R),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测各组心肌梗死面积,Powerlab生理记录仪检测血流动力学参数,如左室舒张压(LVDP)、左室终末舒张压(LVEDP)、左室终末收缩压(LVESP)、左室内压最大上升速率($+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$)和左室内压最大下降速率($-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$);提取分离乳鼠原代心肌细胞(NRCMs),建立缺氧/复氧(H/R)损伤模型,随机分为正常组、模型组、 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药苷给药组和 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药苷给药组,多功能成像细胞分析仪和激光共聚焦显微镜测定各组心肌细胞活力、心率、收缩幅度、收缩时程、达峰时程和舒张时程及钙瞬变峰值。根据前期转录组学测序结果及文献调研,利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测L型钙通道相关基因(Cacnb2),细胞色素C氧化酶相关基因(Cox6a2),肌钙蛋白(Tnnc1、Tnni3、Tnnt2)、肌动蛋白(Actc1)、肌球蛋白(Myh6、My12、My14)等兴奋-收缩耦联通路基因的mRNA表达并对差异基因进行聚类分析。结果:与正常组比较,模型组心肌梗死面积显著增加($P<0.01$)、LVDP显著降低($P<0.01$)、LVEDP显著上升($P<0.01$)、LVESP明显下降($P<0.05$)、 $+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 有下降趋势和 $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 上升趋势及心肌细胞活力降低、心率降低、收缩幅度降低、收缩时程升高、达峰时程升高和舒张时程升高($P<0.01$),而当药苷可以逆转上述指标($P<0.05$)。此外,心肌细胞经H/R损伤后,Cacnb2、Cox6a2、Tnnc1、Tnni3、Tnnt2、Actc1、Myh6、My12、My14等兴奋-收缩耦联通路的基因表达下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。而使用当药苷预处理后,可以增强上述基因的表达($P<0.05$)。结论:当药苷通过调节兴奋-收缩耦联信号通路,从而调节原代乳鼠心肌细胞内钙离子水平,增强心肌收缩功能,对抗I/R损伤。

[关键词] 当药苷; 缺血再灌注损伤; 收缩与舒张功能; Ca^{2+} ; 兴奋收缩耦联通路

[中图分类号] R2-0;R33;R285;R541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0085-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221342

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220523.1348.006.html>

[网络出版日期] 2022-05-24 8:49

Sweroside Effectively Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating Excitation-contraction Coupling

TANG Jiayang, WANG Qing, YU Xue, WEI Xiaoqi, YU Jiang, LI Shuai, LI Sen, GUO Shuzhen*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of sweroside on the protection of cardiac systolic/diastolic function during ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Method:** Twenty-four healthy male SD rats were randomly divided into control group, model group, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sweroside group and $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ digoxin group. The I/R injury was modeled by Langendorff and ligation of the left anterior descending coronary artery. The infarct size in each group was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and hemodynamic parameters such as left ventricular diastolic pressure (LVDP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular end-systolic pressure (LVESP), maximum rate of rising of left ventricular pressure ($+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$) and

[收稿日期] 2022-03-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81922075)

[第一作者] 唐家杨,在读硕士,从事中医药防治心血管疾病的基础研究,E-mail:postboxofjiayang@163.com

[通信作者] *郭淑贞,教授,博士生导师,从事中医药防治心血管疾病的基础研究,E-mail:guoshz@bucm.edu.cn

maximum rate of decreasing of left ventricular pressure ($-dp/dt_{max}$) of rat isolated heart were detected by Powerlab. In addition, neonatal rat cardiomyocytes (NRCMs) were isolated and randomly divided into control group, model group, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sweroside group and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sweroside group. Hypoxia/reoxygenation (H/R) injury model was established. Cardiac systolic function and calcium transients were examined by multi-functional cell imaging analyzer and laser confocal microscope. Furthermore, real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to verify the mRNA expression of excitation-contraction coupling genes such as L-type calcium channel (Cacnb2), cytochrome c oxidase subunit 6A2 (Cox6a2), troponin (Tnnc1, Tnni3, Tnnt2), actin (Actc1), and myosin (Myh6, Myl2, Myl4) according to the results of previous transcriptome sequencing and literature investigation. Differentially expressed genes were subjected to cluster analysis. **Result:** Compared with the conditions in the control group, increased cardiac infarction size ($P<0.01$) and LVEDP ($P<0.01$) and decreased LVDP ($P<0.01$) and LVESP ($P<0.05$) were observed in the model group, with $+dp/dt_{max}$ of increasing trend while $-dp/dt_{max}$ decreasing. Moreover, the cell viability, heart rate and contraction amplitude of NRCMs was reduced ($P<0.01$), while the contraction duration, time to peak and relaxation time was elevated ($P<0.01$) in the model group. Interestingly, sweroside could reverse these indicators ($P<0.05$). In addition, the expression of Cacnb2, Cox6a2, Tnnc1, Tnni3, Tnnt2, Actc1, and Myh6, Myl2, and Myl4 was down-regulated in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), but sweroside could up-regulate the expression of the above genes ($P<0.05$). **Conclusion:** Sweroside effectively regulated Ca^{2+} level in NRCMs, enhanced cardiac systolic function, and protected against H/R injury by regulating excitation-contraction coupling.

[Keywords] sweroside; ischemia/reperfusion injury; systolic/diastolic function; Ca^{2+} ; excitation-contraction coupling

心血管疾病发生在各个年龄段,被认为是人类死亡的主要原因之一^[1]。急性心肌梗死或动脉粥样硬化,是临床上常见的心血管疾病,溶栓和介入治疗等再灌注治疗是治疗急性心梗临床指南首选的治疗方法。然而,突然恢复血液流动会导致心肌缺血再灌注损伤^[2-3]。心肌细胞的收缩与舒张功能是心脏泵血功能正常运行的基础,依赖于心肌细胞的兴奋-收缩耦联机制,并且与心肌细胞内 Ca^{2+} 密切相关。胞浆 Ca^{2+} 浓度的迅速变化形成钙瞬变,当 Ca^{2+} 大量积聚于胞浆内,可与肌钙蛋白结合,引发肌丝纤维运动,形成了心肌细胞的收缩/舒张机械运动^[4]。心肌收缩/舒张功能是心血管药物研究的重要评价指标,而钙瞬变也是反映心肌收缩/舒张功能离子基础的重要指标。

研究表明,金银花提取物绿原酸可以改善心肌缺血再灌注损伤射血分数与短轴缩短率,并减轻心肌细胞的凋亡^[5],但金银花改善心肌缺血再灌注损伤的效应成分和机制还尚未阐明。当药昔又名獐牙菜昔,是四妙勇安汤及其君药金银花中含量最高的环烯醚萜苷类化合物,可能是四妙勇安汤及金银花改善心血管疾病的重要活性成分之一。同时,当药昔也是当药、龙胆等其他中药材的主要成分。大量研究表明,当药昔具有抗肿瘤、治疗糖尿病和保

肝等功效^[6-8],但目前当药昔在治疗心血管系统的作用研究极少。因此,本研究通过离体心脏缺血再灌注模型(I/R)及使用原代乳鼠心肌细胞(NRCMs)建立缺氧/复氧(H/R)模型,探究当药昔的心肌保护作用及其对兴奋-收缩耦联相关基因的影响,为拓展新的治疗心肌缺血再灌注损伤的中草药奠定实验基础。

1 材料

1.1 动物 24只雄性SD大鼠,体质量220~250g,及SD乳鼠(出生1d)均购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2019-0010。饲养于北京中医药大学SPF级动物实验室,恒温恒湿,12h昼夜交替,自由饮水,普通维持饲料,本研究经北京中医药大学动物伦理委员会许可,编号BUCM-4-2019042701-2108(大鼠)、BUCM-4-2019042702-2109(乳鼠)。

1.2 试剂 当药昔(成都普思生物科技有限公司,货号1415-86-2, purity \geq 99%);地高辛(美国Med Chemexpress公司,货号HY-B1049);氯化钠(NaCl)、葡萄糖(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为s210-500g、g8150-500g);碳酸氢钠(NaHCO_3 ,如东百奥百乐生物科技有限公司,货号TRH44576-500g);氯化钾(KCl)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、硫酸镁

(MgSO₄)、无水氯化钙(CaCl₂)(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司,货号分别为746436-500G、P5655-500G、M2643-500G、S24110-500g);2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号G3005);胰蛋白酶(美国VWR-amresco公司,货号4058-25G);DMEM(无糖)、DMEM/F12和胶原蛋白酶II型(美国Gibco公司,货号分别为11966-025、12400-024、17101-015-1g);胎牛血清(美国康宁公司,货号35-081-cv);特级马血清(天津康源生物技术有新公司,货号DE0475-200 mL);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(上海东仁化学科技有限公司,货号CK04);钙离子荧光探针(Fluo-4, AM, 美国赛默飞世尔科技有限公司,货号F12401);QuantiTect Reverse Transcription Kit(德国凯杰生物技术有限公司,货号205311);iTa^q™ Universal SYBR® Green Supermix(上海伯乐生命产品有限公司,货号1725122)。

1.3 仪器 ImageXpress Micor XLS型多功能成像细胞分析仪(上海美谷分子仪器有限公司),SpectraMax i3x型多功能酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司),Powerlab 16/35型Powerlab生理记录仪(埃德仪器国际贸易有限公司),ALC-HP型Langendorff灌流系统(上海奥尔科特公司),QuantStudio6Flex型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),FV300型激光共聚焦显微镜(北京奥林巴斯销售服务有限公司)。

2 方法

2.1 Powerlab生理记录仪及TTC染色检测当药苷对I/R损伤离体心脏血流动力学及梗死面积的影响

参考陈婵娟等^[9]造模方法,健康雄性SD大鼠麻醉后,迅速摘除心脏并安装在Langendorff设备上进行心脏灌流。正常组:K-H液(NaCl 6.9 g、NaHCO₃ 2.1 g、KCl 0.35 g、KH₂PO₄ 0.163 g、MgSO₄ 0.144 g溶于1 L灭菌去离子水中,临用前加入葡萄糖1.998 g、无水CaCl₂ 0.139 g。提前0.5 h通入5% CO₂与95% O₂配比的标准气氧合)平衡灌流125 min;模型组:K-H液平衡灌流20 min后,结扎冠状动脉左前降支,局部停灌30 min,再松开结扎线,恢复灌流75 min;当药苷组使用含10 μmol·L⁻¹当药苷的K-H液复灌,余操作同模型组;地高辛组使用1 μmol·L⁻¹地高辛的K-H液复灌,其余操作同模型组。在缺血30 min及再灌注15、30、75 min时采用Powerlab生理记录仪检测血流动力学参数,包括左心室舒张压

(LVDP)、左心室终末舒张压(LVEDP)、左心室终末收缩压(LVESP)、左室内压最大上升速率(+dp/dt_{max})和左室内压最大下降速率(-dp/dt_{max})。在实验终点,心脏于切心槽中切片,每片约2 mm厚,并采用TTC染色,Image J软件将图片转为8-bit灰度再调整阈值、色度、饱和度、亮度等参数后分析心肌梗死面积与全心面积的比值。

2.2 CCK-8法检测当药苷对NRCMs细胞活力的影响 参考文献^[10]提取NRCMs,收集乳鼠心室,剪成1 mm³左右的小块,转移至含有0.06%胰蛋白酶和0.04%胶原蛋白酶II型的缓冲液中解离4~5次,然后将分离的细胞再转移到含有5%胎牛血清和10%马血清的DMEM/F12中,37℃培养1.5 h,以去除成纤维细胞。获得的心肌细胞以1×10⁴个/孔密度接种于96孔板,培养3~5 d后,随机分为正常组、不同浓度当药苷组(0.01、0.1、1、10、100 μmol·L⁻¹),孵育24 h,常规培养。实验终点,采用CCK-8法检测各组细胞活力,确定当药苷对正常心肌细胞活力的影响。

2.3 CCK-8法检测当药苷对H/R损伤后的NRCMs细胞活力的影响 参考文献^[11-12]的方法,取培养3~5 d且生长状态良好的NRCMs,更换培养基为缺氧液(无糖DMEM),置于细胞低氧培养小室,调节气体比例为O₂(0.5%)、CO₂(5%)、N₂(94.5%),缺氧条件下培养6 h后取出,更换培养基为复氧液(正常心肌细胞培养基),再将细胞置于正常培养箱培养1 h后(H6R1),获得心肌细胞H/R损伤模型模拟心脏缺血再灌注损伤。细胞随机分为正常组、模型组、当药苷组。模型组经H/R损伤且无药物处理,各给药组用不同浓度当药苷(0.1、1、10、100 μmol·L⁻¹)预孵24 h后,再进行缺氧复氧,并且在H/R过程中也用不同浓度的当药苷共同孵育,实验终点CCK-8法检测心肌细胞活力。

2.4 激光共聚焦显微镜检测当药苷对H/R损伤后的NRCMs收缩功能的影响 取3~5 d且生长状态良好的细胞,随机分为4组,正常组、模型组、当药苷组(1、10 μmol·L⁻¹),其余操作同2.3。细胞经处理后,使用激光共聚焦显微镜于明场20倍镜下记录20 s,曝光时间为40 ms,使用Image J Muscle Motion软件分析心肌细胞收缩幅度、心率、收缩时程、达峰时间以及收缩时程^[13]。

2.5 钙离子荧光探针法检测当药苷对H/R损伤后的NRCMs钙瞬变的影响 取3~5 d且生长状态良好的细胞,分组及操作同2.4。细胞处理完毕后,加

入Fluo-4, AM荧光染料, 孵育, 洗涤。给予各组细胞1 Hz电场刺激后, 使用多功能成像细胞分析仪记录。随机记录4个视野, 曝光时间40 ms, 记录20 s。每个视野随机选择10个细胞进行分析。使用Image J分析荧光强度变化值 ΔF , 通过PeakCaller软件分析检测时间内钙瞬变平均峰高^[14]。

2.6 Real-time PCR检测H/R损伤后NRCMs兴奋收缩耦联相关mRNA表达水平 取3~5 d且生长状态良好的细胞, 分组及操作同2.4, 正常组、模型组、当药昔组(1、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 提取NRCMs总RNA, 逆转录成cDNA。结合文献和课题组前期转录组学测序结果, 采用Real-time PCR检测兴奋收缩耦联相关基因: 细胞色素氧化酶6A2亚基(Cox6a2)、肌钙蛋白C1(Tnnc1)、肌钙蛋白I3(Tnni3)、肌钙蛋白T2(Tnnt2)、心肌肌动蛋白 $\alpha 1$ (Actc1)、肌球蛋白重链6(Myh6)、肌球蛋白轻链2(Myl2)和肌球蛋白轻链4(Myl4)等mRNA的表达量。各组NRCMs的RNA提取合格后, 计算定量2 μg RNA所需体积及不含RNA酶的DEPC水体积, 二者之和为11 μL , 加入QuantiTect Reverse Transcription Kit中的5 \times Buffer缓冲液4 μL , RNAase抑制剂1 μL , 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP混合物2 μL , 反应总体积为20 μL /样本, 转录条件为25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ forever, 使RNA逆转录成cDNA。再按上游引物-下游引物-SYBR 1: 1: 20进行配制混合液, 将稀释10倍的cDNA按cDNA-DEPC水5: 4进行混合, 反应总体积为20 μL /样本, 扩增条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸1 min, 40个循环, 扩增结束后, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来计算相对含量变化, 引物(北京六合华大基因科技有限公司)如表1所示。同时运用R包pheatmap_1.0.12对差异基因进行聚类分析。

2.7 统计学分析 采用SAS 8.4统计软件进行数据分析, 所有数据皆以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 当数据符合正态分布并且满足方差齐性检验时, 多组比较采用单因素方差分析, 并且组间多重比较采用最小显著性差异法(LSD), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠离体心脏I/R损伤的影响 在离体心脏平衡灌流20 min时, 各组血流动力学参数差异无统计学意义, 具有可比性。与同期正常组比较, 自结扎30 min起, 模型组LVDP显著降低、LVEDP显著升高($P < 0.01$)、LVESP明显降低($P < 0.05$); 自再灌

表1 引物序列

Table 1 Sequences primers

引物	序列	长度/bp
GAPDH	上游 ACTCCCATTCTTCCACCTTTG	20
	下游 CCCTGTTGCTGTAGCCATATT	
Cacnb2	上游 AGCCTCGCCACCCGACTAG	19
	下游 ACTCGCCAGCCTCACTCCTTG	
Cox6a2	上游 TGCTCGCTTAAGTGTGGATGC	22
	下游 GAGAAGGGCTTGGTTCCGGATGC	
Tnnc1	上游 GGCAGTGGCACAGTGGACTTC	21
	下游 ATCCGACAGCTCCTCCTCAGAC	
Tnni3	上游 CCACCGAGCCACATGCCAAG	20
	下游 TCCTCTGCCTCAGCTCCATC	
Tnnt2	上游 GAGGCAGTGGAGGAGGAGGATG	22
	下游 GCTGGGCTTGGGTTTGAGTC	
Actc1	上游 GGCGACGGTGTGTGACTCATAACG	22
	下游 CCCGACCAGCTAGATCCAGACG	
Myh6	上游 GGACGGAGGAGCTGGGAAG	21
	下游 GAGAGGAGCACTTGGCGTTGAC	
Myl2	上游 GGCGGAAGCTCCAACGTTTC	21
	下游 GGCAGCAAACGTGTCCCTTAGG	
Myl4	上游 AAAGCAACGGCAGTCATGGG	22
	下游 TCCACCTCAGCCTCGCTCATC	

15 min起, 模型组+dp/dt_{max}明显降低($P < 0.05$), -dp/dt_{max}明显升高($P < 0.05$), 再灌注进一步加重了心肌损伤。与模型组比较, 当药昔组、地高辛组在结扎30 min时, 各指标差异无统计学意义, 表示模型的结扎程度相似; 与模型组比较, 当药昔再灌注15、30、75 min均可以显著升高LVDP和LVESP($P < 0.01$), 与地高辛药效相近; 与模型组比较, 当药昔再灌注30、75 min可以明显升高+dp/dt_{max}和降低-dp/dt_{max}($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与地高辛药效相近; 当药昔和地高辛对LVEDP差异均无统计学意义。此外, 地高辛再灌注15 min即可明显降低-dp/dt_{max}($P < 0.05$), 起效时间早于当药昔, 其中, 地高辛组中一只大鼠的心脏在K-H液平衡灌流时血流动力学参数出现异常, 故舍弃。见表2-表6。

TTC染色结果显示, 模型组心肌梗死面积约占全心面积的44%, 在复灌时加入10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔, 可减少心肌梗死面积至21%左右($P < 0.01$), 与地高辛药效相近。见图1、表7。

3.2 对H/R损伤后NRCMs细胞活力的影响 当药昔浓度在0.01~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 预处理24 h对

表2 当药昔对I/R损伤大鼠心脏血流动力学参数LVDP的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of sweroside on hemodynamic parameter LVDP in rat heart subjected to I/R injury ($\bar{x}\pm s$) mmHg

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>n</i>	平衡灌流 20 min 末	结扎 30 min 末	再灌注 15 min 末	再灌注 30 min 末	再灌注 75 min 末
正常组		6	74.57±8.14	75.58±7.76	76.30±8.30	74.34±8.90	72.72±9.17
模型组		6	79.17±7.29	56.27±5.34 ²⁾	41.66±4.59 ²⁾	40.24±4.45 ²⁾	37.92±5.21 ²⁾
当药昔组	10	6	80.19±6.51	57.39±6.72	57.85±3.09 ⁴⁾	57.42±3.54 ⁴⁾	59.11±2.10 ⁴⁾
地高辛组	1	5	73.20±10.98	56.99±10.53	57.15±9.35 ⁴⁾	57.03±9.87 ⁴⁾	54.53±10.23 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3-表6、表10-表12同);1 mmHg≈0.133 kPa

表3 当药昔对I/R损伤大鼠心脏血流动力学参数LVEDP的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of sweroside on hemodynamic parameter LVEDP in rat heart subjected to I/R injury ($\bar{x}\pm s$) mmHg

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>n</i>	平衡灌流 20 min 末	结扎 30 min 末	再灌注 15 min 末	再灌注 30 min 末	再灌注 75 min 末
正常组		6	6.97±1.04	7.94±1.08	8.00±1.31	8.16±1.40	8.88±1.24
模型组		6	8.70±1.82	16.75±3.18 ²⁾	19.89±6.10 ²⁾	20.38±5.09 ²⁾	20.81±3.77 ²⁾
当药昔组	10	6	8.74±1.18	18.02±2.72	17.68±2.38	18.73±2.73	18.74±2.02
地高辛组	1	5	8.29±1.30	15.01±1.95	18.47±3.96	18.77±3.25	19.51±2.76

表4 当药昔对I/R损伤大鼠心脏血流动力学参数LVSEP的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of sweroside on hemodynamic parameter LVSEP in rat heart subjected to I/R injury ($\bar{x}\pm s$) mmHg

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>n</i>	平衡灌流 20 min 末	结扎 30 min 末	再灌注 15 min 末	再灌注 30 min 末	再灌注 75 min 末
正常组		6	81.54±8.33	83.53±7.91	84.30±8.11	82.51±8.70	81.59±9.44
模型组		6	87.87±7.07	73.03±2.46 ¹⁾	61.55±3.46 ²⁾	60.62±3.08 ²⁾	58.73±2.71 ²⁾
当药昔组	10	6	88.94±6.09	75.40±4.82	75.53±2.44 ⁴⁾	76.15±2.45 ⁴⁾	77.85±2.14 ⁴⁾
地高辛组	1	5	81.49±11.63	72.00±10.73	75.62±6.63 ⁴⁾	75.80±9.31 ⁴⁾	74.03±9.51 ⁴⁾

表5 当药昔对I/R损伤大鼠心脏血流动力学参数+dp/dt_{max}的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of sweroside on hemodynamic parameter +dp/dt_{max} in rat heart subjected to I/R injury ($\bar{x}\pm s$) mmHg·s⁻¹

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>n</i>	平衡灌流 20 min 末	结扎 30 min 末	再灌注 15 min 末	再灌注 30 min 末	再灌注 75 min 末
正常组		6	2 446.04±251.68	2 411.56±182.41	2 432.31±259.17	2 398.71±237.04	2 337.33±276.02
模型组		6	2 881.26±687.05	2 307.09±389.98	1 920.70±390.17 ¹⁾	1 824.07±302.91 ²⁾	1 819.21±377.02 ²⁾
当药昔组	10	6	2 486.61±302.46	2 290.95±222.35	2 252.63±387.23	2 299.09±332.72 ³⁾	2 231.62±271.99 ³⁾
地高辛组	1	5	2 643.61±298.32	2 377.28±217.89	2 242.09±179.19	2 197.23±281.37 ³⁾	2 079.32±308.51

表6 当药昔对I/R损伤大鼠心脏血流动力学参数-dp/dt_{max}的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Effect of sweroside on hemodynamic parameter -dp/dt_{max} in rat heart subjected to I/R injury ($\bar{x}\pm s$) mmHg·s⁻¹

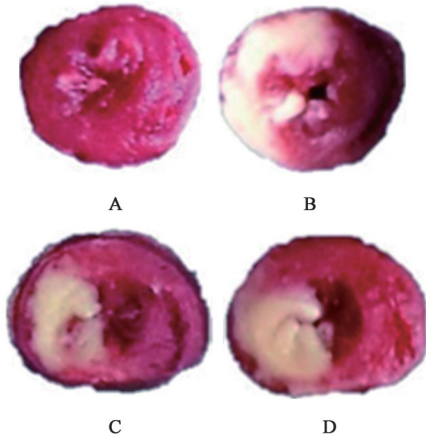
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>n</i>	平衡灌流 20 min 末	结扎 30 min 末	再灌注 15 min 末	再灌注 30 min 末	再灌注 75 min 末
正常组		6	-1 867.03±180.59	-1 769.02±285.06	-1 767.99±317.81	-1 736.43±325.33	-1 603.76±294.69
模型组		6	-2 050.67±178.17	-1 659.65±144.13	-1 287.18±129.22 ¹⁾	-1 245.12±75.70 ²⁾	-1 205.37±24.98 ²⁾
当药昔组	10	6	-1 923.80±190.37	-1 629.72±188.37	-1 558.30±206.77	-1 602.36±217.99 ³⁾	-1 540.95±149.97 ⁴⁾
地高辛组	1	5	-1 978.70±130.82	-1 650.92±284.49	-1 693.45±253.97 ³⁾	-1 683.25±214.68 ⁴⁾	-1 534.43±134.68 ⁴⁾

心肌细胞活力无显著影响,表明当药昔对正常心肌细胞无明显毒性作用,安全范围较宽。见表8。

与正常组比较,经H/R处理后,NRCMs细胞活力显著下降($P<0.01$);与模型组比较,1、10、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔均可显著改善NRCMs细胞活

力($P<0.01$);0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔组对NRCMs细胞活力无显著影响。见表9。

3.3 对H/R损伤后NRCMs收缩/舒张功能的影响
NRCMs经H/R损伤后,细胞收缩幅度显著降低,心率显著降低,收缩时程显著升高,达峰时程显著



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 当药昔组;D. 地高辛组

图1 当药昔对I/R损伤大鼠心肌梗死面积的影响(TTC染色)

Fig. 1 Effect of sweroside on size of myocardial infarction in I/R injured rats (TTC staining)

表7 TTC染色测定左心室梗死大小($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Infarct size of left ventricle from TTC staining ($\bar{x}\pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>n</i>	心肌梗死面积/%
正常组		6	1.67±1.15
模型组		6	44.33±7.77 ¹⁾
当药昔组	10	6	21.33±2.31 ²⁾
地高辛组	1	5	25.67±0.58 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表9同)

升高,舒张时程显著升高,钙瞬变峰值显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,1、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔可以显著改善NRCMs收缩相关指标,表现NRCMs收缩幅度显著上升,心率显著升高,收缩时程显著降低,舒

表10 当药昔对H/R损伤心肌细胞收缩功能的保护作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of sweroside on NRCMs systolic function after H/R ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	收缩幅度/a.u	心率/Hz	收缩时程/ms	舒张时程/ms	达峰时程/ms	钙瞬变峰值
空白组		7 768.77±212.53	1.60±0.10	264.37±6.80	162.96±2.96	102.80±5.46	5.31±0.39
模型组		5 316.35±291.64 ²⁾	0.89±0.11 ²⁾	496.97±29.62 ²⁾	338.51±34.16 ²⁾	135.76±24.20 ²⁾	3.71±0.06 ²⁾
当药昔组	1	8 221.18±300.82 ⁴⁾	1.90±0.01 ⁴⁾	273.33±1.91 ⁴⁾	162.97±5.91 ³⁾	103.39±3.40 ⁴⁾	4.72±0.22 ³⁾
	10	7 162.98±429.90 ⁴⁾	1.68±0.09 ⁴⁾	260.61±9.77 ⁴⁾	159.78±8.43 ³⁾	99.15±1.34 ⁴⁾	4.74±0.66 ³⁾

3.4 对NRCMs兴奋-收缩耦联相关基因的影响

结合文献和课题组前期转录组学测序结果,对Cacnb2、Cox6a2、Tnnc1、Tnni3、Tnnt2、Actc1、Myh6、Myl2、Myl4等兴奋-收缩耦联相关基因表达水平进行分析。

与正常组比较,模型组Cacnb2、Cox6a2、Tnnc1、Tnni3、Tnnt2、Actc1、Myh6、Myl2、Myl4的mRNA表达量均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,经1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔处理后,除Cox6a2差异无统计

表8 不同浓度当药昔对正常NRCMs毒性影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 8 Toxicity study of different concentrations of sweroside on NRCMs ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	正常NRCMs细胞活力
空白		1.00±0.08
当药昔组	0.01	0.97±0.03
	0.1	0.98±0.04
	1	0.96±0.05
	10	1.02±0.04
	100	1.02±0.08

表9 不同浓度的当药昔对H/R损伤后心肌细胞活力的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 9 Different concentrations of sweroside improved viability of cardiomyocytes after H/R injury ($\bar{x}\pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>n</i>	H/R损伤后细胞活力
空白正常组		3	1.00±0.05
模型组		4	0.46±0.10 ¹⁾
当药昔组	0.1	5	0.50±0.08
	1	5	0.64±0.10 ²⁾
	10	5	0.66±0.05 ²⁾
	100	5	0.62±0.08 ²⁾

张时程显著降低,达峰时程明显下降,NRCMs钙瞬变峰值明显升高($P<0.05, P<0.01$),促进NRCMs收缩/舒张功能的恢复。在各项指标中,1、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔除去在收缩幅度和心率上有差异外($P<0.05$),在其他指标上均差异无统计学意义。见表10。

学意义外,其他基因mRNA的表达量均明显上调($P<0.05$)。经10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔处理后,Cacnb2、Tnnc1、Tnni3、Tnnt2、Actc1、Myh6的mRNA表达量均明显上调($P<0.05, P<0.01$),其余基因mRNA的表达量有上升趋势,差异无统计学意义。见表11和表12。

上述基因的聚类热图结果显示,模型组各基因的表达均与其他3组的差异较大,而1、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 当药昔给药组基因表达较为接近,并且比较于模型

组,两组当药苷给药组的绝大多数基因表达更接近正常组。见图2。

表 11 当药苷对兴奋-收缩耦联相关基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

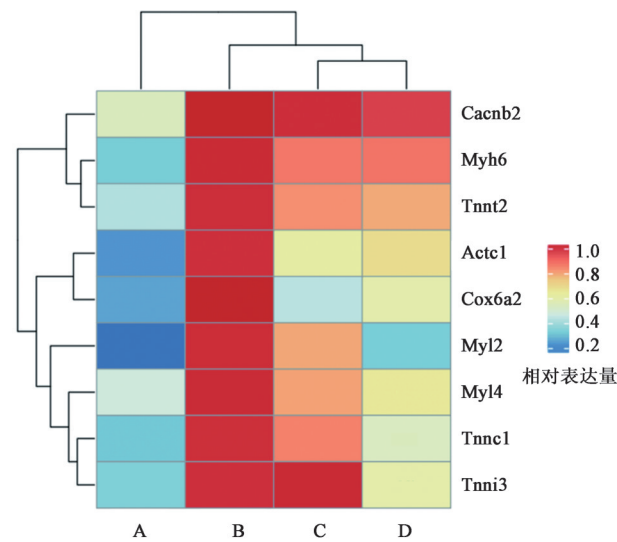
Table 11 Effect of sweroside on expression of genes related to myocardial excitation-contraction coupling pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cacnb2	Cox6a2	Tnnc1	Tnni3	Tnnt2
正常组		1.03±0.31	1.04±0.34	1.00±0.09	1.00±0.07	1.00±0.11
模型组		0.54±0.10 ¹⁾	0.24±0.05 ²⁾	0.31±0.59 ²⁾	0.33±0.12 ²⁾	0.41±0.14 ²⁾
当药苷组	1	1.01±0.29 ³⁾	0.43±0.03	0.85±0.9 ⁴⁾	1.01±0.1 ⁴⁾	0.83±0.07 ³⁾
	10	0.97±0.04 ³⁾	0.58±0.17	0.53±0.13 ³⁾	0.59±0.1 ³⁾	0.79±0.27 ³⁾

表 12 当药苷对兴奋-收缩耦联相关基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 12 Effect of sweroside on expression of genes related to myocardial excitation-contraction coupling pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Actc1	Myh6	Myl2	Myl4
正常组		1.00±0.37	1.01±0.19	1.01±0.13	1.01±0.15
模型组		0.22±0.00 ²⁾	0.31±0.20 ²⁾	0.16±0.07 ²⁾	0.47±0.10 ²⁾
当药苷组	1	0.61±0.00 ⁴⁾	0.87±0.10 ⁴⁾	0.79±0.08 ⁴⁾	0.80±0.03 ⁴⁾
	10	0.68±0.20 ⁴⁾	0.87±0.10 ⁴⁾	0.32±0.08	0.65±0.10



注:A.模型组;B.正常组;C.当药苷1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组;D.当药苷10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 2 兴奋-收缩耦联通路基因表达的热图分析

Fig. 2 Heat map analysis of expression of genes related to myocardial excitation-contraction coupling pathway

4 讨论

心血管疾病是危及人类健康的主要疾病,各种类型的心脏手术造成的越来越多的心肌缺血再灌注损伤病例^[15],心肌兴奋-收缩耦联异常是缺血再灌注导致心肌细胞损伤的重要病理生理变化,研发可改善受损心肌兴奋-收缩耦联的药物具有重要的临床意义。当药苷是四妙勇安汤及其君药金银花中含量最高的环烯醚萜苷类化合物,同时也是当药、龙胆等其他中药材的主要成分,可能是这些复方及单味药改善心血管疾病的重要活性成分之一。研

究表明,当药苷可改善乌头碱诱导的大鼠心律失常,抑制H9c2心肌细胞氧化应激、自噬和凋亡并改善细胞内钙异常,上调L型钙通道二氢吡啶类受体(DHPR)等基因表达^[16]。另外,有研究者发现当药苷还可通过抑制Keap1/NRF2轴,从而抑制氧化应激和由炎症小体NLRP3介导的细胞焦亡来改善心肌的H/R损伤^[17],但对于心肌细胞心肌兴奋-收缩耦联的影响尚无报道。

因此,本研究采用离体心脏缺血再灌注和NRCMs缺氧复氧模型,系统评价当药苷对心肌缺血再灌注损伤及其导致的兴奋-收缩耦联异常的影响。结果表明,当药苷可以显著减少I/R损伤离体心脏的心肌梗死面积,改善心肌的收缩与舒张功能,且与地高辛药效相近。同时,当药苷可以显著提高H/R损伤心肌细胞的活力,改善心肌细胞收缩、舒张功能。

当心肌细胞缺血或者缺氧时,细胞外 H^+ 增加会导致细胞内 Na^+ 增加,从而促进 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 的交换并引发细胞内部“钙过载”,细胞运动状态表现为挛缩^[18]。但心衰发生时,肌浆网异常释放 Ca^{2+} ,钙容量减少,即“钙泄漏”,引起钙瞬变降低,心肌收缩力降低^[19]。所以细胞内 Ca^{2+} 过高或者过低,都可能引起心肌细胞收缩功能异常,而胞内 Ca^{2+} 的变化被称为“钙瞬变”,是除了收缩幅度降低、收缩时程等反应收缩功能指标外,另一种可以反应心肌收缩功能的重要检测指标,可以通过荧光染料的特异性结合来观察(例如Fluo-4等)^[20]。当 Ca^{2+} 可通过DHPR进入细胞内,与肌钙蛋白结合,引发肌丝纤维运动,形成

了心肌细胞的收缩/舒张^[4]。当胞浆内Ca²⁺浓度降低时,心肌肌钙蛋白I抑制肌动蛋白及原肌球蛋白结合,阻止肌球蛋白与肌动蛋白结合,肌肉舒张;当细胞膜去极化时,Ca²⁺大量进入细胞内与cTnI结合,引起肌钙蛋白复合物的构型变化,解除了cTnI与肌动蛋白-肌钙蛋白之间的结合,cTnI的抑制作用解除,导致肌球蛋白与肌动蛋白相互作用,粗细肌丝互相滑动,肌肉收缩,即兴奋-收缩耦联^[21]。洋地黄类强心药地高辛可以通过抑制Na⁺-K⁺-ATP酶活性,而使细胞内Na⁺增多促进钠钙交换而增加Ca²⁺,临床上常用来治疗心血管疾病。本实验结果显示,经过H/R损伤后的心肌细胞胞内Ca²⁺水平显著降低,而当药昔可以把其胞内Ca²⁺水平调节到正常组的水平,通过调节钙瞬变发挥改善心肌细胞收缩/舒张功能的作用。

有研究表明,Cacnb2是L型钙通道的β2亚单位,如果β亚基缺失,肾上腺素激动剂将难以发挥增强心肌收缩力的作用^[22]。Cox6a2是线粒体呼吸链复合物IV即细胞色素c氧化酶的亚单位,Cox6a2的缺失可能会导致线粒体功能障碍,从而影响心脏等多个组织的功能^[23],在一项关于速效救心丸防治缺血性心脏病研究表明,缺血缺氧后的HL-1心肌细胞Cox6a2表达降低^[24]。Tnnc1、Tnni3、Tnnt2均与肌钙蛋白的亚单位相关,Tnnc1、Tnni3、Tnnt2任何一个表达异常都会引起心脏功能异常^[25-27]。Actc1与心肌肌动蛋白相关,Actc1基因的表达在先天性心脏病的心肌组织中减少,并且在心肌组织的这部分中存在明显的凋亡^[28]。心肌肌球蛋白由2个肌球蛋白重链(α-MHC与-MHC)和2对肌球蛋白轻链(MLC)组成,Myh6与α-MHC相关,在成人心脏病病理肥大期间α-MHC表达下调^[29],My12、My14与肌球蛋白两条轻链相关My12的磷酸化是调节心肌收缩速度的枢转因子^[30]。当细胞收到H/R损伤时,Cacnb2、Cox6a2、Tnnc1、Tnni3、Tnnt2、Actc1、Myh6、My12、My14基因表达下降,而当药昔可以上调这些基因的表达,提示当药昔改善H/R损伤心肌收缩、舒张功能的效应可能与调节上述兴奋-收缩耦联相关基因有关。

综上所述,当药昔可能通过调节兴奋-收缩耦联相关基因,改善心肌细胞内钙瞬变,从而改善心肌细胞收缩舒张功能、发挥改善心肌细胞缺血再灌注损伤的作用,但当药昔的直接作用靶点还有待进一步研究。以上的工作,为拓展新的改善心肌缺血再灌注损伤的中草药提供了线索,并为揭示当药昔的

效应及其作用机制提供了实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: A report from the american heart association [J]. Circulation, 2022, 145(8): e153-e639.
- [2] LI C Y, YANG P, JIANG Y L, et al. Ginsenoside Rb₁ attenuates cardiomyocyte apoptosis induced by myocardial ischemia reperfusion injury through mTOR signal pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125: 109913.
- [3] CANNAVO A, LICCARDO D, EGUCHI A, et al. Myocardial pathology induced by aldosterone is dependent on non-canonical activities of G protein-coupled receptor kinases [J]. Nat Commun, 2016, 7: 10877.
- [4] EISNER D. Calcium in the heart: From physiology to disease [J]. Exp Physiol, 2014, 99(10): 1273-1282.
- [5] 许万紫, 陈成, 汤鑫龙, 等. 绿原酸通过抗炎抗程序性细胞坏死作用减轻心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国循环杂志, 2018, 33(S1): 21.
- [6] GONG J, YANG F, YANG Q, et al. Sweroside ameliorated carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis through FXR-miR-29a signaling pathway [J]. J Nat Med, 2020, 74(1): 17-25.
- [7] HAN X L, LI J D, WANG W L, et al. Sweroside eradicated leukemia cells and attenuated pathogenic processes in mice by inducing apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 477-486.
- [8] ANYANWU G O, IQBAL J, KHAN S U, et al. Antidiabetic activities of chloroform fraction of *Anthocleista vogelii* Planch root bark in rats with diet- and alloxan-induced obesity-diabetes [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 229: 293-302.
- [9] 陈婵娟, 潘眩, 赵明镜, 等. 大鼠 Langendorff 离体心脏局部缺血再灌注模型建立及功能评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(12): 21-26, 79.
- [10] 段鹏, 王金鑫, 刘晓静, 等. 三种不同乳鼠原代心肌细胞消化分离方法的对比研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2017, 48(2): 286-289.
- [11] BORDONI A, HRELIA S, ANGLONI C, et al. Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells [J]. J Nutr Biochem, 2002, 13(2): 103-111.
- [12] MATOBA S, TATSUMI T, KEIRA N, et al. Cardioprotective effect of angiotensin-converting

- enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes[J]. *Circulation*, 1999, 99(6):817-822.
- [13] SALA L, VAN MEER B J, TERTOOLEN L, et al. Musclemotion: A versatile open software tool to quantify cardiomyocyte and cardiac muscle contraction *in vitro* and *in vivo* [J]. *Circ Res*, 2018, 122(3): e5-e16.
- [14] ARTMOVICH E, JACKSON R K, KILANDER M B C, et al. Peak caller: An automated graphical interface for the quantification of intracellular calcium obtained by high-content screening [J]. *BMC Neurosci*, 2017, 18(1):72.
- [15] MAZO T, DANNUNZIO V, DONATO M, et al. Dyslipidemia in ischemia/reperfusion injury [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1127:117-130.
- [16] MA L Q, YU Y, CHEN H, et al. Sweroside alleviated aconitine-induced cardiac toxicity in H9c2 cardiomyoblast cell line [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1138.
- [17] LI J, ZHAO C, ZHU Q, et al. Sweroside protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and pyroptosis partially via modulation of the Keap1/Nrf2 axis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8:650368.
- [18] PIPER H M, MEUTER K, SCHAFER C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury [J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(2):S644-S648.
- [19] BELEVYCH A E, RADWANSKI P B, CARNES C A, et al. Ryanopathy: Causes and manifestations of RyR2 dysfunction in heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98(2):240-247.
- [20] ROSSI A M, TAYLOR C W. Reliable measurement of free Ca²⁺ concentrations in the ER lumen using Mag-Fluo-4 [J]. *Cell Calcium*, 2020, 87:102188.
- [21] 王耀菊, 黄从新, 王凤. 心肌肌钙蛋白在心血管病诊治中的应用 [J]. *医学文选*, 2006, 3:514-516.
- [22] YANG L, KATCHMAN A, KUSHNER J, et al. Cardiac CaV1.2 channels require β subunits for β -adrenergic-mediated modulation but not trafficking [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2):647-658.
- [23] INOUE M, UCHINO S, IIDA A, et al. COX6A2 variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase deficiency [J]. *Ann Neurol*, 2019, 86(2):193-202.
- [24] RUAN X, CHEN T, WANG X, et al. Suxiao Jiuxin Pill protects cardiomyocytes against mitochondrial injury and alters gene expression during ischemic injury [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(4):3523-3532.
- [25] LI M X, HWANG P M. Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs [J]. *Gene*, 2015, 571(2):153-166.
- [26] KUHNISCH J, HERBST C, AI-WAKEEL-MARQUARD N, et al. Targeted panel sequencing in pediatric primary cardiomyopathy supports a critical role of TNNI3 [J]. *Clin Genet*, 2019, 96(6):549-559.
- [27] PETTINATO A M, LADHA F A, MELLERT D J, et al. Development of a cardiac sarcomere functional genomics platform to enable scalable interrogation of human TNNT2 variants [J]. *Circulation*, 2020, 142(23):2262-2275.
- [28] JIANG H K, QIU G R, LI-LING J, et al. Reduced ACTC1 expression might play a role in the onset of congenital heart disease by inducing cardiomyocyte apoptosis [J]. *Circ J*, 2010, 74(11):2410-2418.
- [29] LOWES B D, MINOBE W, ABRAHAM W T, et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(9):2315-2324.
- [30] SHEIKH F, LYON R C, CHEN J. Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease [J]. *Gene*, 2015, 569(1):14-20.

[责任编辑 孙丛丛]