

丹皮酚对急性心肌梗死大鼠心室重构及 NF- κ B p65, IL-1 mRNA 表达的影响

赵静怡¹, 董红玉², 周晓慧¹, 姚银辉³, 张树峰^{1*}

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 承德护理职业学院, 河北承德 067000;
3. 承德医学院附属医院药剂科, 河北承德 067000)

[摘要] 目的: 观察丹皮酚(paeonol, Pae)对大鼠急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后心室重构的改善作用及心肌组织核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65)及白细胞介素-1 (IL-1) mRNA 表达的影响。方法: Wistar 大鼠左冠状动脉前降支结扎建立急性心肌梗死模型, 分为模型组和 Pae 低、中、高(4, 6, 8 mg·kg⁻¹·d⁻¹, ip 3 个剂量组, 及卡托普利组 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量, ig; 另设假手术组只穿线不结扎。大鼠连续给药 4 周后测定血流动力学指标及 RT-PCR 技术检测 NF- κ B p65 和 IL-1 mRNA 表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组左心室舒张压(LVEDP)显著升高($P < 0.05$)。Pae 干预结果表明, 对心室重构大鼠, 能明显升高左心室收缩压(LVSP)、左室压最大上升与下降速率($\pm dp/dt_{max}$), 降低 LVEDP, Pae 用药组大鼠心功能显著优于模型组; Pae 可明显降低大鼠心肌组织中的 NF- κ B p65 和 IL-1 mRNA 的表达($P < 0.05$)。结论: Pae 一定程度上能够改善大鼠心肌梗死后的心室重构, 其机制可能与抑制 NF- κ B p65 和 IL-1 mRNA 表达及阻断 NF- κ B 通路有关。

[关键词] 丹皮酚; 心肌梗死; 核转录因子- κ B p65; 白细胞介素-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0177-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150177

Effect of Paeonol on Levels of NF- κ B p65 and IL-1 mRNA in Rats with Myocardial Infarction

ZHAO Jing-yi¹, DONG Hong-yu², ZHOU Xiao-hui¹, YAO Yin-hui³, ZHANG Shu-feng^{1*}

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China;

2. Chengde Nursing Vocational College, Chengde 067000, China;

3. Pharmacy Department, The affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of paeonol (Pae) on ventricular remodeling and levels of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p65 and interleukin (IL)-1 mRNA in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Method:** The myocardial infarction (MI) model of Wistar rat was induced by ligating left anterior descending coronary artery. The rats were randomly distributed into five groups, they are model group, low-dose Pae group, middle-dose Pae group, high-dose Pae group (4, 6, 8 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and captopril group (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹). Moreover, sham-operated group without ligation. After 4 weeks treatment of paeonol, the hemodynamic changes in rats were determined. The mRNA levels of NF- κ B p65 and IL-1 were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Compared with shame-operated group, the left ventricular systolic pressure (LVEDP) of model group increased significantly ($P < 0.05$). With intervention of Pae the heart function improved obviously. And then LVSP, the maximum left ventricular pressure rising and dropping rates ($\pm dp/dt_{max}$) were increased significantly ($P < 0.05$), while the left ventricular end diastolic pressure LVEDP decreased significantly ($P < 0.05$). Besides, the mRNA levels of NF- κ B p65 and IL-1 in the middle dose Pae and high-dose Pae groups were declined sharply ($P < 0.05$). **Conclusion:** Pae could prevent and

[收稿日期] 20140129(002)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(C2011406009)

[第一作者] 赵静怡, 硕士, 从事心血管药理学研究, Tel: 0314-2291779, E-mail: 33236986@qq.com

[通讯作者] * 张树峰, 教授, 博士生导师, 从事中医肾病及中药毒理学研究, Tel: 0314-2291111, E-mail: zsf@cdmc.edu.cn

treat ventricular remodeling in rats with myocardial infarction efficiently, which maybe related to the inhibition of expression of the mRNA levels of NF- κ B p65 and IL-1, and the suppressing of NF- κ B pathway.

[Key words] paeonol; myocardial infarction; nuclear factor kappa B p65; interleukin-1

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 后心室重构可改变心脏结构、损害泵功能和血液供应,是导致心室收缩与舒张功能减退的重要原因。AMI 后心室重构做为心肌梗死后预后的敏感指标,也是导致慢性心力衰竭的重要因素^[1-2]。因此,心室重构的改善与治疗已成为临床与实验研究的焦点与热点问题。近年来研究证明,丹皮酚 (paeonol, Pae) 作为具有多种药理活性的传统中药^[3-5],在实验性动脉粥样硬化、血栓、再灌注损伤、心律失常、高血压等方面有显著的疗效^[4,6],但对心室重构方面的核转录因子 Kappa-B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 作用机制未见报道。前期实验证实,丹皮酚能够下调人内皮细胞中相应的炎症因子的表达及活化^[5],本实验旨在探讨丹皮酚改善心梗后心室重构是否与干预 NF- κ B 炎症通路有关。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠,体重 (300 \pm 20) g,购自北京华阜康生物科技有限公司,批号 SCXK (京)2009-00040245860。大鼠常规饲养,观察 1 周无异常后再进行试验。

1.2 药物与试剂 丹皮酚注射液 (宁波天真制药有限公司,批号 20110603),卡托普利 (江苏平光制药有限公司,批号 120102),NF- κ B p65、白介素 (IL)-1 和 β -actin 引物 (自上海生工公司)。TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (100 次量) (宝生物工程 (大连)有限公司)。DNA Maker-J (LM109-A) (美国 Bio Basic Inc 公司)。

1.3 仪器 BL-420 生物机能实验系统 (成都泰盟生物科技有限公司),ECG-11D 心电图机 (惠州科美思医用仪器有限公司),小动物人工呼吸机 (淮北正华生物科技有限公司),SORVALL Biofuge fresco 冷冻离心机 (德国 Kendro Labrotary 公司),BH-2 型显微镜及摄像装置 (日本 Olympus 公司),MiVnt 图像分析系统 (中国山东易创),PCR 扩增仪 (ABI 公司),Nanodrop1000 (美国热电公司)。

2 方法

2.1 模型建立与分组 心肌梗死模型的建立具体参照文献 [7],采取左冠状动脉前降支结扎法。大鼠 8% 水合氯醛腹腔注射麻醉,经气管插管连接呼吸机,左侧腋下三、四肋间逐层开胸,于左心耳下缘

2 mm 处使用无菌线完全结扎左冠状动脉前降支,然后立即逐层关胸并缝合。观察大鼠心电图 ST 段的变化,以 ST 段持续抬高并出现室性心律失常做为判断 AMI 模型成功的标准。术后 3 d 将成模大鼠随机分为 5 组:模型组 ($n = 9$),丹皮酚低、中、高剂量组 (4, 6, 8 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, $n = 8$),卡托普利组 (10 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, $n = 8$);同时设假手术组 ($n = 8$),在相同部位只穿线不结扎。丹皮酚用药组每天经腹腔注射 (ip) 1 次,卡托普利经灌胃给药,假手术组和模型组大鼠每天以等量生理盐水灌胃,按等效体表面积计算同阳性药给药体积,每周根据体重变化调整剂量,各组大鼠给药时间均为 4 周。

2.2 血液动力学测定 给药后 4 周,8% 水合氯醛麻醉大鼠,分离颈总动脉并连接 BL-420 生物机能实验系统,将压力传感微导管经颈总动脉插入至左心室,期间不断注入肝素,稳压 10 min 后测定左心室收缩压 (LVSP),左心室舒张压 (LVEDP)、左心室内压最大上升速率和下降速率 ($\pm dp/dt_{max}$),各指标取连续 10 个心搏的平均值。随后注入 10% KCl 2 ~ 3 mL,使心脏停留于舒张期,切取左心室非梗死部位,用无菌锡箔纸包裹后迅速放于液氮罐中冷冻,24 h 后放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,用以 RT-PCR 检测相关指标。

2.3 RT-PCR 法测定 mRNA 的表达 mRNA 抽提步骤如下:取组织 100 mg,加 Trizol 液 1 mL,冰上匀浆,紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度后以此模版进行 PCR 扩增,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 完整性。引物序列及扩增产物长度见表 1。PCR 产物 5 μ L 于 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外投射仪观察并摄取图像。应用 Quantity One 软件进行定量分析,以目的条带的吸光度与 β -actin 条带吸光度的比值,作为目的基因 mRNA 表达的相对水平。

2.4 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料的组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 Pae 对 AMI 大鼠血流动力学指标的影响 与假手术组相比,模型 AMI 组大鼠的 LVSP 及 $\pm dp/dt_{max}$ 显著降低,而 LVEDP 显著升高 ($P < 0.05$),

表1 各个指标引物序列及退火温度

目的因子	引物序列	退火温度 产物长度	
		/ $^{\circ}$ C	/bp
NF- κ B	上游 5'-ATCTGTTTCCCTCATCTTCC-3'	59	170
p65	下游 5'-TGGGTCGCTCTTACTGCTATCT-3'		
IL-1	上游 5'GGCATAACAGGCTCATCTGC-3'	59	414
	下游 5'-CATCATCCCACGAGCTCACAG-3'		
β -actin	上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	53	150
	下游 5'-GACTGATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'		

表2 Pae对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	LVSP /mmHg	LVEDP /mmHg	+ dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹	- dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹
假手术	-	137.9 ± 10.91 ¹⁾	10.64 ± 1.11 ¹⁾	2 080.66 ± 193.83 ¹⁾	2 019.12 ± 158.73 ¹⁾
模型	-	88.88 ± 14.86 ²⁾	17.24 ± 1.25 ²⁾	755.03 ± 257.45 ²⁾	698.32 ± 201.01 ²⁾
Pae	4	91.55 ± 17.04	15.61 ± 1.24 ²⁾	1 422.29 ± 241.11	1 267.51 ± 221.34
	6	100.15 ± 13.22 ¹⁾	14.86 ± 1.44 ¹⁾	1 524.51 ± 210.09 ¹⁾	1 308.78 ± 144.18 ¹⁾
	8	121.95 ± 12.73 ¹⁾	11.73 ± 1.47 ¹⁾	1 896.23 ± 133.29 ¹⁾	1 768.22 ± 110.19 ¹⁾
卡托普利	10	121.45 ± 15.32 ¹⁾	11.96 ± 1.50 ¹⁾	1 755.47 ± 329.56 ¹⁾	1 703.65 ± 298.26 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$;与假手术组相比²⁾ $P < 0.05$ (表3同),LVSP左心室收缩压,LVEDP左心室舒张末压,± dp/dt_{max}左室内压最大上升速率和下降速率。

3.2 Pae对AMI大鼠心肌组织NF- κ B p65及IL-1 mRNA表达影响 图像分析结果表明,各组 β -actin mRNA表达较为均一。与模型组比较,假手术组、Pae低、中、高剂量组和卡托普利组中NF- κ B p65表达量显著下降($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组和丹皮酚低剂量组中NF- κ B p65的表达量均显著增强($P < 0.05$);与模型组比较,假手术组、Pae中、高剂量组和卡托普利组的IL-1 mRNA表达量显著降低($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组和Pae低剂量组中IL-1 mRNA表达量显著升高($P < 0.05$)。NF- κ B p65及IL-1 mRNA及 β -actin RT-PCR产物电泳结果见图1,各组间相对吸光度(A)比较结果见表3。

表3 Pae对急性心肌梗死大鼠心肌组织NF- κ B及IL-1相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	NF- κ B/ β -actin	IL-1/ β -actin
假手术	-	0.187 ± 0.036 ¹⁾	0.385 ± 0.103 ¹⁾
模型	-	0.414 ± 0.051 ¹⁾	1.358 ± 0.097 ¹⁾
Pae	4	0.313 ± 0.058 ¹⁾	1.244 ± 0.095
	6	0.286 ± 0.051 ¹⁾	0.658 ± 0.119 ¹⁾
	8	0.198 ± 0.041 ¹⁾	0.513 ± 0.120 ¹⁾
卡托普利	10	0.235 ± 0.044 ¹⁾	0.599 ± 0.132 ¹⁾

4 讨论

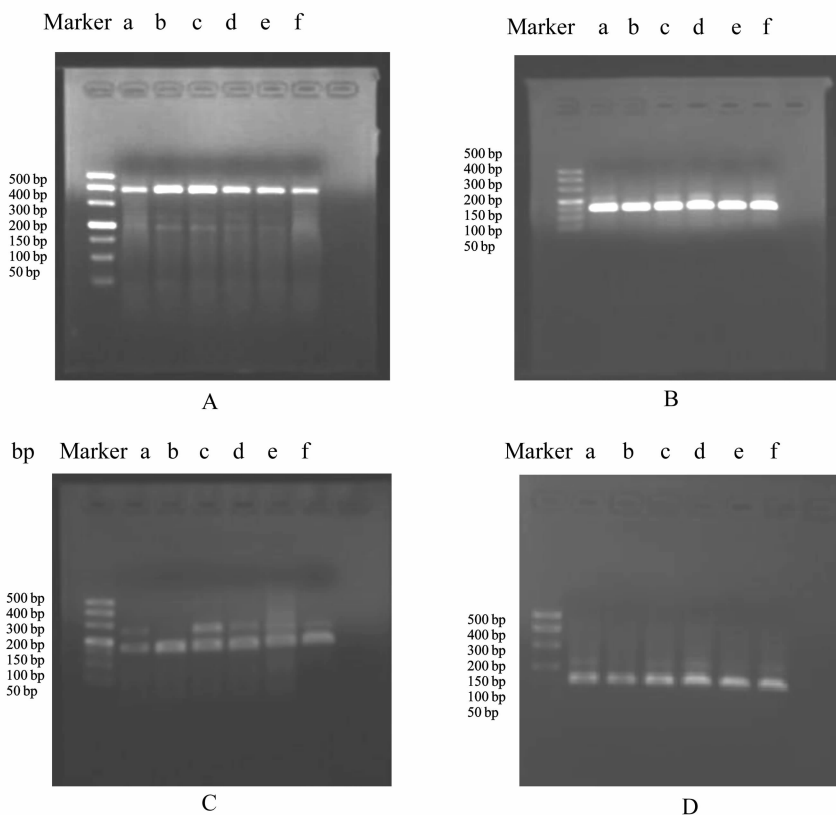
心室重构是心肌梗死发生后心脏对血流动力学

表明大鼠AMI后出现心室重构且心功能受损严重。Pae中、高剂量组与AMI组相比较LVSP及± dp/dt_{max}均有不同程度的升高,LVEDP均有不同程度的降低($P < 0.05$),表明Pae能明显升高LVSP,± dp/dt_{max}及降低LVEDP,改善心室重构及心功能,此外,数据显示Pae高剂量组降低趋势同卡托普利相近,见表2。

改变的一种代偿性反应过程。长期严重的心肌缺血,将导致心肌的射血分数下降,心脏的每搏输出量增加,心脏后负荷加重^[1],严重影响患者的心功能及存活率。此外,众多研究证实,心室重构相关的因素中,生长因子、炎性细胞因子、氧化应激反应等已成为引起心室重构的重要原因。NF- κ B是调节基因表达的关键因子之一,也是炎症反应的调节因子,它通过诱导与炎症反应有关的基因表达来控制炎症反应的发生发展。研究证实,急性心肌梗死后,炎性因子IL-1、肿瘤坏死因子(TNF)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等均可通过NF- κ B途径激活^[7-8]。

有研究报道,左室肥厚时,心肌组织IL-1 mRNA表达量为正常组织的3.9倍,且左室心肌IL-1 mRNA表达量与左室质量指数呈正相关性。IL-1参与了心室重构的发生发展过程。大量IL-1表达,使得成纤维细胞大量增生,从而导致心功能严重下降,而抑制IL-1的表达能够减轻心室重构的发展。这是由于机体炎性反应发生后,IL-1的表达在NF- κ B活化后随之增强,同时IL-1又可以作为激动剂反作用于NF- κ B,提示IL-1不仅作为炎性因子直接参与机体炎症反应,还受到NF- κ B的调控参与心室重构的发生发展。

本实验以过结扎冠状动脉左前降支复制AMI模型,研究Pae对大鼠急性心肌梗死后心肌组织NF- κ B p65表达的影响。血液动力学检测中,LVSP,



A. IL-1 mRNA 电泳; B. 和 A 对应的 β -actin mRNA 电泳; C. NF- κ B p65 mRNA 电泳; D. 和 C 对应的 β -actin mRNA 电泳;
a. 假手术组; b. 模型组; c-e. 分别为 Pae 4, 6, 8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; f. 卡托普利 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 1 大鼠心肌组织检测因子电泳

LVEDP, $\pm dp/dt_{\max}$ 是重要的检测指标, 其数值的变化是心功能强弱的最主要反映。首先, 实验结果表明, Pae 中、高两组剂量对大鼠血流动力学指标 LVSP, LVEDP、均明显 $\pm dp/dt_{\max}$ 好于模型组 ($P < 0.05$)。这与 Pae 具有扩张血管, 抗心肌缺血和改善血液循环有关。表明丹皮酚对 AMI 后的心室重构有一定的治疗和改善作用, 能够改善心肌梗死后心肌的收缩和舒张功能, 这对于预防或逆转心室重构具有重要意义。研究还通过 Pae 对 AMI 大鼠心肌组织 NF- κ B p65 和 IL-1 mRNA 表达量的检测结果亦说明二者呈正相关性。与模型组比较, 经 Pae 给药干预 4 周后, 提示, Pae 抑制大鼠心肌梗后心室重构, 改善心功能, 可能与阻断 NF- κ B 通路, 减少炎症反应有关。总之, 本研究表明 Pae 能一定程度地改善心梗后心室重构, 其机制可能与抑制 NF- κ B 活性, 下调炎症细胞因子 IL-1 表达有关。

[参考文献]

[1] Sutton M G, Sharpe N. Left Ventricular remodeling after myocardial Infarction: pathophysiology and therapy [J]. Circulation, 2000, 101(25): 2981.
[2] 郝玉明, 朱文玲. 心肌梗死后的心室重构 [J]. 中华心

血管病杂志, 2005, 33(2): 196.
[3] C M Riley, T C Ren. Simple method for the determination of paeonol in human and rabbit plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection [J]. J Chromatogr, 1989, 489(2): 432.
[4] 王祝举, 唐力英, 赫炎. 牡丹皮的化学成分和药理作用 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2006, 21(4): 155.
[5] 周晓慧, 牛成伟, 曹凯, 等. 丹皮酚通过抑制 NF- κ B 信号通路下调高脂血清诱导的人脐静脉内皮细胞黏附分子的表达 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(2): 249.
[6] 张荣发. 丹皮酚的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2008, 6(18): 110.
[7] 郭张强, 廖玉华, 程翔, 等. 大鼠急性心肌梗死心室重塑中细胞因子与胶原的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(12): 2322.
[8] Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA [J]. 2004, 101(15): 5634.

[责任编辑 聂淑琴]

褐藻素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬的机制

廖政邦¹, 李明², 谢松强^{2*}

(1. 广东省东莞市太平人民医院, 广东 东莞 523900;
2. 河南大学药学院化学生物学研究所, 河南 开封 475004)

[摘要] **目的:**探讨褐藻素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬的分子机制。**方法:**MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 高内涵活细胞成像系统检测细胞自噬, Western blotting 检测蛋白的表达。**结果:**褐藻素剂量依赖性地抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖, 诱导 Beclin 1 表达显著增强、促进 LC3 I 转化为 LC3 II 以及自噬溶酶体的形成; 褐藻素剂量依赖性地增加 Annexin V 染色阳性细胞数量、诱导 Caspase-3 活化、线粒体膜电位下降并伴随 Cytochrome c 从线粒体释放到细胞浆中、上调 Bax 和 PTEN 的表达及下调 Bcl-2 的表达, 抑制 Akt、p70S6K 及 mTOR 的磷酸化; 自噬抑制剂 3-MA 可增加褐藻素诱导的细胞凋亡率, 并促进 Caspase-3 的活化。**结论:**褐藻素通过抑制 Akt 信号通路诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬, 且该自噬抑制细胞凋亡。

[关键词] 凋亡; 自噬; 褐藻素; 肝癌

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0181-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150181

Fucoxanthin Induced Hepatoma HepG2 Cells Apoptosis, Autophagy and It's Mechanism

LIAO Zheng-bang¹, LI Ming², XIE Song-qiang^{2*}

(1. Taiping People' Hospital, Dongguan 523900, China;
2. Institute of Chemical Biology, Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the antiproliferative effects of fucoxanthin, a major carotenoid found in edible seaweed, and also to elucidate the molecular mechanism on hepatoma HepG2 cells. **Method:** The antiproliferative effects of fucoxanthin was evaluated using MTT assay. Fucoxanthin-mediated cell apoptosis was evaluated using Flow Cytometer. Autophagy detection with acridine orange staining and Lyso-Tracker Red staining by High Content Screening (HCS). The protein expression was detected using Western blotting. **Result:** Fucoxanthin exerts potent antiproliferative activity on HepG2 cells in a dose-dependent manner. Furthermore, fucoxanthin induces HepG2 cells autophagy and apoptosis. After treatment with fucoxanthin, the protein expression of LC3 II and Beclin 1 were enhanced. Furthermore, fucoxanthin induced cell apoptosis, Caspase-3 activation, mitochondrial membrane potential decrease, cytochrome C release from mitochondria to cytoplasm, upregulation the protein expression of Bax and PTEN, downregulation the protein expression of Bcl-2, and also inhibited the phosphorylation of Akt, p70S6K and mTOR. Whereas 3-methyladenine (3-MA), a phosphatidylinositol 3-phosphate kinase inhibitor, enhanced the fucoxanthin-mediated apoptosis and caspase-3 activation. **Conclusion:** Fucoxanthin-mediated autophagy and apoptosis were due to inhibition of Akt signal pathway in HepG2 cells.

[Key words] apoptosis; autophagy; fucoxanthin; hepatoma

[收稿日期] 20140317 (009)

[基金项目] 河南省科技厅基础与前沿技术研究 (102300410095)

[第一作者] 廖政邦, 主管药师, 从事医院药学研究, Tel:13713088382, E-mail: tplzb2008@163.com

[通讯作者] * 谢松强, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事肿瘤药理学研究, Tel:0378-22864665, E-mail: xiesq@henu.edu.cn