

痰瘀同治方对心肌缺血再灌注损伤过程中自噬与凋亡相关基因调节作用研究

唐丹丽¹, 孙明杰¹, 佟琳², 崔海峰¹, 隋宇¹, 张华敏^{2*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;

2. 中国中医科学院中医药信息研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**观察痰瘀同治方对心肌缺血再灌注损伤(IR)不同阶段自噬与凋亡相关基因的调控作用。**方法:**将80只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、痰瘀同治方组($43\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$)及3-MA干预组($13.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ iv}$)。可逆性冠脉左前降支结扎缺血30 min,再灌注2 h复制心肌缺血(MI)及IR模型,利用全自动生化仪检测血清肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)含量;采用RT-PCR法检测各组大鼠心肌自噬基因Beclin-1,心肌微管相关蛋白轻链3蛋白(LC3)及抗凋亡蛋白Bcl-2表达。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠在缺血及再灌注阶段血清CK,LDH含量及心肌Beclin-1,LC3 mRNA表达均显著增强,且Bcl-2 mRNA表达减弱($P < 0.01$);与模型组比较,痰瘀同治组能降低缺血期血清CK及再灌注期CK,LDH含量($P < 0.05$),抑制缺血期Beclin-1 mRNA及再灌注期Beclin-1,LC3 mRNA表达,上调缺血期及再灌注期Bcl-2 mRNA表达($P < 0.05$, $P < 0.01$);与假手术组,3-MA组比较,痰瘀同治组在缺血期可上调Beclin-1,LC3 mRNA表达($P < 0.01$)。经相关性检验,缺血期及再灌注期Beclin-1与Bcl-2均呈负相关表达($P < 0.01$)。**结论:**痰瘀同治方通过促进缺血期自噬发生及抑制再灌注期自噬过表达,同时促进抗凋亡蛋白Bcl-2表达而发挥其对缺血再灌注损伤心肌的保护作用。

[关键词] 心肌缺血再灌注损伤;自噬;凋亡;痰瘀同治方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0101-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040101

Regulatory Effect of Tanyu Tongzhi Recipe on Autophagy and Antiapoptosis Gene of Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Rats

TANG Dan-li¹, SUN Ming-jie¹, TONG Lin², CUI Hai-feng¹, SUI Yu¹, ZHANG Hua-min^{2*}

(1. *Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*

2. *Institute of Information on Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulatory effect of Tanyu Tongzhi (TYTZ) recipe on autophagy and antiapoptosis gene of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Method:** Totally 80 SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, 3-MA intervention ($13.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ iv}$) and TYTZ recipe ($43\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$) groups. The model of ischemia and reperfusion of the myocardium was reproduced by ligation of left descending artery for 30 min and reperfusion for 2 hours in rats. Serum contents of CK, LDH were measured by automatic biochemical analyzer. The expression level of Beclin-1, LC3 and Bcl-2 were determined with RT-PCR. **Result:** Compared with the sham-operated group, the contents of CK, LDH and the expression of Beclin-1, LC3 mRNA were both significantly increased, while the level of Bcl-2 mRNA were decreased in MI and

[收稿日期] 20150518(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202630,81373792);中国博士后科学基金特别项目(2014T70201);中国中医科学院自主选题项目(ZZ2014002)

[第一作者] 唐丹丽,副研究员,博士,从事中医药防治心血管病基础研究,Tel:010-64010953

[通讯作者] *张华敏,博士,研究员,从事中医药防治心血管病基础研究,Tel:010-64010953, E-mail:zhanghm@mail.cintcm.ac.cn

IR model groups ($P < 0.01$). Compared with the model group, the contents of CK and LDH in ischemic period and reperfusion period, the expression of Beclin-1 mRNA in ischemic period and Beclin-1, LC3 mRNA in reperfusion period were lower in TYTZ recipe groups, and myocardial Bcl-2 mRNA activities of the groups in ischemic period and reperfusion period were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the sham-operated group and 3-MA group, the expression of Beclin-1, LC3 mRNA in ischemic period were increased in TYTZ recipe groups ($P < 0.01$). Beclin-1 expression was found to have negative correlation with Bcl-2 expression of time in ischemia and reperfusion periods by Pearson test ($P < 0.01$). **Conclusion:** The TYTZ recipe can reduce myocardial ischemia/reperfusion injury by promoting the occurrence of autophagy during ischemia period, inhibiting them in reperfusion and promoting the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2.

[**Key words**] myocardial ischemia-reperfusion injury; autophagy; antiapoptosis; tanyu tongzhi recipe

自噬是一个自我消化并涉及细胞内溶酶体降解其内容物,藉此实现细胞本身代谢及能量平衡的过程,其在心脏疾病调节中具有双刃剑作用,既可以延缓疾病进程,促进损伤恢复,也可以导致细胞死亡^[1-3]。自噬在心肌缺血-再灌注中普遍存在并发挥双重作用,有研究认为自噬于缺血初期发挥保护作用,而再灌注过程中则发挥损伤作用^[4]。因此,调控 IR 过程中自噬反应为缺血性心脏病提供了一个新的治疗靶点。

中医学者从传统理论观点理解,认为自噬是对机体正虚邪实作出的一种自我调节方式,与机体脏腑功能失调下,内生痰浊瘀血之实邪的自我清除以维持内环境的阴阳平衡有关,并在肿瘤及心血管疾病方面取得了一定进展^[5-8]。痰瘀相关学说是中医理论的重要组成部分,基于此而提出的痰瘀同治法广泛应用于心血管疾病的临床治疗。课题组前期研究表明:痰瘀同治方能够通过调控核因子- κ B (NF- κ B) 及 Rho/Rho 激酶信号转导通路、减轻炎症反应、调节脂代谢紊乱等途径抗缺血再灌注损伤^[9-12]。这些结果涉及氧化应激、细胞炎症、凋亡等多个细胞与分子生物学事件,它们与自噬之间可以相互交叉形成一个复杂的网络。所以,进一步探讨痰瘀同治方对心肌缺血再灌注损伤(IR)过程不同阶段自噬的调控作用,对阐明其抗 IR 机制十分必要。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 80 只,体重(250 ± 20) g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(军)2012-0004。

1.2 药物及试剂 痰瘀同治方由瓜蒌 15 g,薤白 15 g,清半夏 10 g,赤芍 15 g,黄连 5 g 等组成,所有药材由北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司提供。上药水煎加热浓缩至 4.3 g·mL⁻¹ 的质量浓度,4 ℃ 保存备用。药物剂量换算依 70 kg 成人每日 1 剂原

方用量,换算出大鼠 1 日用量。肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号分别为 140561,140571,中生北控生物科技股份有限公司),3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA,批号 M9281,美国 Sigma 公司),超纯 RNA 提取试剂盒及 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(北京康为世纪生物科技股份有限公司,批号分别为 CW0581,CW0744)。

1.3 仪器 ALC-V8 型动物呼吸机(上海奥尔科特公司),RM6240BD 型多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂),HITACHI7080 型全自动生化分析仪(日本日立公司),GeneAmp 9600 型普通 PCR 仪(美国应用生物公司)。

2 方法

2.1 动物模型复制 大鼠术前 12 h 禁食,不禁水。腹腔注射 20% 乌拉坦 <0.5 mL/100 g) 麻醉后仰卧位固定四肢及头部。记录 II 导心电图。颈部、胸前手术野备皮,切开气管,连接动物呼吸机(呼吸频率 70 次/min,吸呼比 1:2,潮气量 9 mL·kg⁻¹)。自左侧第 3~4 肋间剪开皮肤,钝性分离肌肉组织,打开胸腔,剪开心包膜,于左心耳与肺动脉圆锥之间找出冠状动脉左前降支,并以 5~0 号丝线结扎分支起点外约 1~2 mm,(在丝线与心肌间放一根聚乙烯小管),此时缺血心肌壁呈现发绀、膨出,同时记录心电图,以标准肢导联 II 导联 ST 段弓背上抬,T 波高耸,显示心肌缺血形成。再灌注模型结扎 30 min 后松开,使缺血冠脉再灌注,关闭胸腔,再灌注 120 min,心电图示 ST 段回落 1/2 以上,提示造模成功。结扎前心电图不正常,或未观察到观察终点而死亡以及造模不成功者剔除。3-MA 干预组分别于结扎及再灌注前 10 min 尾静脉注射给药(13.5 mg·kg⁻¹)。

2.2 动物分组及给药 用随机数字表法将 80 只大鼠分为假手术组、模型组、痰瘀同治方组及 3-MA 干

预组。各组动物常规饲养,条件相同。假手术组、模型组大鼠每日灌服生理盐水 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,痰瘀同治方组灌服中药煎液 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,造模前连续给药 3 周。

2.3 指标检测

2.3.1 标本采集 大鼠结扎 30 min 或再灌注 2 h 后腹主动脉取血,之后迅速剪取心脏,预冷生理盐水冲洗,冰盘上切取部分左冠状动脉供血区的心肌组织,称重后即于液氮中迅速冰冻,置于 -80 °C 保存备用。

2.3.2 血清心肌酶学检测 取血后离心(3 000 r·min⁻¹,15 min),分离血清,按试剂盒说明,利用全自动生化分析仪进行心肌酶指标 CK,LDH 检测。

2.3.3 RT-PCR 实验步骤 用超纯 RNA 提取试剂盒提取组织样本中总 RNA;以 1% 琼脂糖凝胶进行电泳;之后用 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA,再进行 PCR 反应检测 mRNA 表达,引物序列见表 1 反应条件为 95 °C,10 min;95 °C,15 s,59 °C,60 s,共 30 个循环。采用 GelPro 3.2 凝胶图像分析软件对各靶基因条带进行定量分析。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用 One-way ANOVA 分析,满足方差齐性时组间比较采用最小显著差法,不满足方差齐性时采用 Tamhane's T2

法进行两两比较。相关性分析采用 Pearson 检验方法。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of RT-PCR

基因	序列	引物长度 /bp
Beclin	5'-TCCTTGCGTCAGCTCTCGTC-3'	163
	5'-CACCTAGGCTCGCTCTACCG-3'	
LC3	5'-CCGTGTTTGATGCCAAGCAA-3'	142
	5'-TTCCGGATAGCTTCGGC-3'	
Bcl-2	5'-CTTCCAGCCTGAGAGCAACC-3'	170
	5'-GACGGTAGCGACGAGAGAAG-3'	
β -actin	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	

3 结果

3.1 痰瘀同治方对大鼠血清心肌酶 CK,LDH 水平的影响 与假手术组比较,模型大鼠血清 CK,LDH 水平明显升高($P < 0.01$),且再灌注期含量高于缺血期;与模型组比较,痰瘀同治组能够降低再灌注期血清 CK,LDH 及缺血期 CK 水平且差异显著($P < 0.05$);自噬抑制剂 3-MA 可降低再灌注期 CK,LDH 水平($P < 0.05$),但对于缺血期各项心肌酶指标无明显影响。见表 2。

表 2 痰瘀同治方对大鼠血清心肌酶 CK,LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Tanyu Tongzhi recipe on CK,LDH levels of myocardial enzyme in rat serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CK/U·L ⁻¹		LDH/U·L ⁻¹	
		30 min	2 h	30 min	2 h
假手术	-	1 092.25 ± 670.86	1 661.75 ± 534.23	1 149.30 ± 509.26	1 235.35 ± 602.73
模型	-	2 650.38 ± 451.64 ²⁾	3 136.75 ± 875.09 ²⁾	2 037.25 ± 515.51 ¹⁾	2 723.31 ± 823.58 ²⁾
痰瘀同治方	43	1 882.13 ± 365.65 ³⁾	2 315.25 ± 766.01 ³⁾	1 928.40 ± 602.10	1 775.68 ± 569.02 ³⁾
3-MA 干预	0.013 5	2 103.75 ± 934.98	2 340.88 ± 766.21 ³⁾	1 764.65 ± 702.51	1 747.00 ± 725.11 ⁴⁾

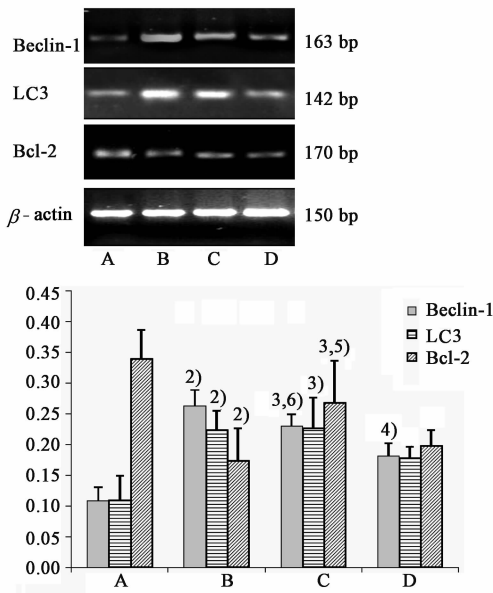
注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与 3-MA 组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (图 1~2 同)。

3.2 对大鼠心肌 Beclin-1,轻链 3 蛋白(LC3)及 Bcl-2 mRNA 表达的影响 缺血期阶段,与假手术组比较,模型组大鼠心肌 Beclin-1,LC3 mRNA 表达均显著增强且 Bcl-2 mRNA 明显减弱($P < 0.01$);与模型组比较,痰瘀同治组可降低 Beclin-1 mRNA 水平并同时上调 Bcl-2 mRNA 表达;与 3-MA 组比较,痰瘀同治组上调 Beclin-1,LC3 mRNA 表达作用明显($P < 0.01$)。再灌注阶段,假手术组比较,模型组大鼠心肌 Beclin-1,LC3 mRNA 表达均显著增强且 Bcl-2 mRNA 明显减弱($P < 0.01$);与模型组比较,痰瘀

同治组可显著降低心肌 Beclin-1,LC3 mRNA 表达并促进 Bcl-2 mRNA 表达($P < 0.01, P < 0.05$);与 3-MA 组比较,痰瘀同治组大鼠心肌 Bcl-2 mRNA 表达水平更高($P < 0.05$)。见图 1,2。

4 讨论

心肌缺血再灌注期间不可避免地导致心肌损伤,发生心肌缺血和梗死,血清心肌酶是判断心肌坏死程度的重要指标之一。CK,LDH 是急性心肌梗死后常用的检测指针,其升高水平与心肌细胞死亡数量及梗梗面积成正相关^[13]。实验显示,与假手术组比较,模



A. 假手术组; B. 模型组; C. 痰瘀同治方; D. 3-MA 干预组(图 2 同)
图 1 痰瘀同治方对缺血期大鼠心肌 Beclin-1, LC3 及 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effects of Tanyu Tongzhi recipe on Beclin-1, LC3 and Bcl-2 mRNA in ischemia period of rat myocardial ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

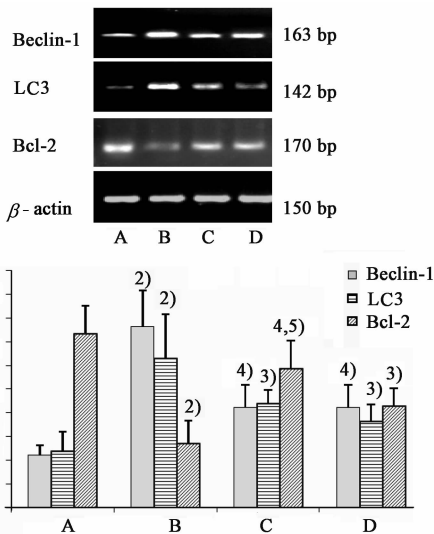


图 2 痰瘀同治方对再灌注期大鼠心肌 Beclin-1, LC3 及 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 2 Effects of Tanyu Tongzhi recipe on Beclin-1, LC3 and Bcl-2 mRNA in reperfusion period of rat myocardial ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

型组 CK 与 LDH 含量显著增加,且再灌注期表达较缺血期升高,说明心肌损伤程度加重。与模型组相比,自噬抑制剂 3-MA 对缺血期 CK, LDH 含量明显无影响,提示在此阶段自噬的反应可能对心肌具有保护作用;再灌注期,3-MA 组 CK, LDH 含量明显降低,说明抑制自噬表达可以减轻心肌损伤程度。与模型组比较,痰瘀同治组对于降低缺血期 CK 含量及再灌注期

CK, LDH 含量效果显著,说明该方在缺血及再灌注阶段可抑制心肌损伤。

心肌自噬可能具双重作用,在缺血和早期再灌注时,低水平的自噬能消化受损细胞器,供给氨基酸和游离脂肪酸,进而保护细胞免受死亡;然而在再灌注期持久和长时间的自噬能过度降解必需蛋白质和细胞器,从而导致细胞死亡^[14]。为了进一步明确痰瘀同治方对 IR 过程中自噬反应的调控作用,笔者观察了 Beclin-1 和 LC3 的表达变化。Beclin-1 和 LC3 是重要并具有标志性的自噬相关分子,可以反映自噬发生程度,被广泛地用于自噬研究中。实验结果显示,自噬在缺血期即发生,发展至再灌注期表达更为强烈,提示自噬反应的增强趋势与心肌损伤程度一致;值得注意的是,痰瘀同治组在缺血期能够可上调 Beclin-1 mRNA, LC3 mRNA 表达,说明该方一定程度上能够促进缺血期心肌自噬反应的适度增强。再灌注期间,痰瘀同治组明显抑制了 Beclin-1 mRNA, LC3 mRNA 表达,与模型组比较差异显著,且作用与 3-MA 相当,说明此阶段该方能够抑制再灌注期自噬的过度激活。以上结果显示,痰瘀同治方在缺血期及再灌注期分别具有诱导自噬发生和抑制自噬过表达的保护性调节作用。

自噬与凋亡之间存在复杂的调控关系,细胞自噬的过程可以控制凋亡,细胞凋亡的过程也可以控制细胞自噬^[15]。这其中 Beclin-1 介导的自噬/凋亡互反馈信号通路是经典的自噬信号途径之一,而 Beclin-1/Bcl-2 的平衡状态则是调控自噬/凋亡互反馈作用的关键因素;Bcl-2 可负性调节 Beclin-1 的致自噬作用, Bcl-2 表达下调不仅可诱发凋亡还能通过激动 Beclin-1 来激活自噬,导致细胞死亡^[3, 16-17]。本实验同时检测了 IR 各阶段心肌抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达情况,在缺血及再灌注期,模型组 Bcl-2 mRNA 表达均较假手术组明显下调,说明此时,伴随自噬现象的出现已有心肌凋亡现象发生;与模型组及 3-MA 组比较,痰瘀同治组可促进缺血及再灌注期 Bcl-2 mRNA 表达,说明该方在 IR 各阶段可起到阻止细胞凋亡的保护作用。相关性分析显示,缺血期及再灌注期 Beclin-1 与 Bcl-2 均呈负相关关系,提示痰瘀同治方可能通过 Beclin-1/Bcl-2 负反馈调节作用抑制自噬发生而发挥心肌保护作用。但在缺血期,3-MA 组 Bcl-2 mRNA 表达并未出现明显增强,这可能是由于此阶段自噬表达水平较低并具有一定抑制凋亡的保护性作用,只有一旦超过自噬的调节极限,才会诱导细胞发生死亡。

本研究提示痰瘀同治方在缺血期能够诱导自噬表达、再灌注期可抑制其过度反应,并在各阶段协同抗凋亡途径发挥心肌保护作用。但自噬与凋亡在IR过程中发挥直接或间接的作用机制还需进一步实验研究证实。

[参考文献]

[1] Han Z H, Cao J T, Song D Q, et al. Autophagy is involved in the cardio protection effect of remote limb ischemic postconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, but not diabetic mice [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86838.

[2] Ito B R, Gottlieb R A, Mentzer R M J. Autophagy and the human heart [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 148(1): 369.

[3] 孙瑶,张婵,简洁. 九龙藤总黄酮调控自噬对抗心肌缺血/再灌注损伤的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 232-236.

[4] 黄贵华,纪云西,吴大力,等. 细胞自噬与中医气虚痰瘀关系探讨[J]. 中医杂志, 2011, 52(20): 1717-1719.

[5] 李欣志,韩笑,秦思,等. 心脏“阴阳自和”与心肌细胞自噬[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(5): 339-340.

[6] 邓淑文,殷清华,苏琦,等. 姜黄素诱导人胃癌SGC7901细胞自噬性凋亡的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(31): 30-35.

[7] 张蕾,刘卫红,解欣然,等. 参元丹含药血清对心肌缺血保护作用及其微管相关蛋白及自噬相关基因表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(8): 109-113.

[8] 徐菲菲,刘秀华. 心肌自噬的生理与病理生理作用

[J]. 生理科学进展, 2014, 44(3): 193-199.

[9] 唐丹丽,张华敏,孙明杰,等. 不同治法方药对心肌缺血再灌注损伤大鼠防治作用的对比研究[J]. 国际中医中药杂志, 2009, 31(6): 485-487.

[10] 唐丹丽,刘寨华,隋宇,等. 3种不同治法方药对大鼠心肌缺血再灌注损伤核因子- κ B信号转导通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 161-164.

[11] 唐丹丽,佟琳,张华敏,等. 痰瘀同治方对高脂血症心肌缺血再灌注损伤大鼠血脂、血液流变及炎症因子的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 63-66.

[12] 唐丹丽,佟琳,崔海峰,等. 痰瘀同治方对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌 Rho/Rho 激酶通路的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2013, 35(12): 1082-1085.

[13] Dawie J, Chawla R, Worku Y, et al. Diagnosis of ischemic heart disease using CK-MB, troponin- I and ischemia modified albumin [J]. Ethiop Med J, 2013, 49(1): 25-33.

[14] Matsui Y, Kyo S, Takagi H, et al. Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion [J]. Autophagy, 2008, 4(4): 409-415.

[15] Gum P J M, Thorburn A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? [J]. Trends Cell Biol, 2011, 21(7): 387-392.

[16] Wei K, Wang P, Miao C Y. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury [J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(2): 879-886.

[17] Szegezdi E, Macdonald D C, Ni Chonghaile T, et al. Bcl-2 family on guard at the ER [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(5): C941-C953.

[责任编辑 周冰冰]