

山精胶囊对心肌缺血大鼠 NF- κ B 信号通路调控机制探讨

于栋华¹, 刘树民², 王霄阳¹, 董培良¹, 张宁¹, 于纯森^{3*}

(1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江中医药大学 药学院, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**探讨山精胶囊对心肌缺血大鼠能量代谢、氧自由基及细胞凋亡相关基因的作用及其机制。**方法:**选取 Wista 大鼠采用冠状动脉结扎法, 建立慢性心肌缺血模型。将筛选出来的大鼠随机分为山精胶囊低、中、高剂量组(283.5, 850.5, 1 701.0 mg·kg⁻¹)和阳性药组(心安胶囊 324.0 mg·kg⁻¹), 假手术组和模型组灌胃给予同等剂量的 0.9% 的氯化钠注射液, 给药 10 d。紫外可见分光光度计检测血清及组织中乳酸(LD), 游离脂肪酸(NEFA), 丙二醛(MDA), 超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px), 一氧化氮(NO)及三磷酸腺苷(ATP)水平; 蛋白质免疫印迹(Western blot)法及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测心肌组织中核转录因子- κ B(NF- κ B), 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达。**结果:**与假手术组比较, 模型组大鼠 LD, NEFA, MDA 明显升高($P < 0.05$), NO, Na⁺-K⁺-ATP, Ca²⁺-ATP 酶, SOD, GSH-Px 明显降低($P < 0.05$), 心肌 NF- κ B, Caspase-3, Bax mRNA 及蛋白表达明显上调($P < 0.05$), Bcl-2 mRNA 及蛋白表达明显下调($P < 0.05$); 与模型组比较, 山精胶囊能显著降低 LD, NEFA, MDA($P < 0.05$), NO, Na⁺-K⁺-ATP, Ca²⁺-ATP 酶, SOD, GSH-Px 显著升高($P < 0.05$), 明显下调 NF- κ B, Caspase-3, Bax mRNA 及蛋白表达($P < 0.05$), 明显上调 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达($P < 0.05$)。**结论:**山精胶囊可能通过调控 NF- κ B 信号通路, 提高心肌缺血大鼠清除氧自由基能力, 改善心肌细胞能量代谢, 调节凋亡相关蛋白和基因的表达, 从而抑制了心肌细胞凋亡, 减少缺血缺氧对心肌细胞的病理损害, 起到保护心肌的作用。

[关键词] 山精胶囊; 心肌缺血; 凋亡; 核转录因子- κ B; 半胱氨酸蛋白酶-3; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; Bcl-2 相关 X 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0151-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017110151

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1018.078.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:18

Regulation Mechanism of Shanjing Capsule on NF- κ B Signal Pathway in Myocardial Ischemia Rats

YU Dong-hua¹, LIU Shu-min², Wang Xiao-yang¹, DONG Pei-liang¹, ZHANG Ning¹, YU Chun-miao^{3*}

(1. Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
3. Pharmacy School, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Shanjing capsule on energy metabolism, oxyradical and apoptosis-related genes in myocardial ischemia rats. **Method:** The chronic myocardial ischemia models were established with ligating coronary artery. Then the modeled rats were randomly divided into Shanjing capsule low dose, middle dose and high dose groups (283.5, 850.5, 1 701.0 mg·kg⁻¹), positive drug group (324.0 mg·kg⁻¹). The rats in sham operation group and model group received equivalent amount of 0.9% Sodium

[收稿日期] 20161206(014)

[基金项目] 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目

[第一作者] 于栋华, 博士, 副研究员, 从事中药药性理论及药效物质基础研究工作, Tel:0451-87266836, E-mail:yudonghua1015@163.com

[通讯作者] * 于纯森, 博士, 副教授, 从事中药保健食品研制与开发工作, Tel:0451-87266881, E-mail:yuchunmiao@163.com

Chloride Injection for 10 days. Then ultraviolet visible spectrophotometer was used to detect the content and activity of lactic acid (LD), free fatty acids (NEFA), malondialdehyde (MDA), total superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), NO and ATP in serum and tissues. The expression levels of nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B), Caspase-3, B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in myocardial tissues were detected by Western blot and RT-PCR. **Result:** As compared with the sham operation group, contents of LD, NEFA, MDA were increased ($P < 0.05$); levels of NO, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ enzyme, SOD and GSH-Px were decreased ($P < 0.05$); the mRNA and protein expression of NF- κ B, Caspase-3 and Bax in cardiomyocytes were up-regulated significantly ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression of Bcl-2 was decreased ($P < 0.05$) in model group. As compared with the model group, Shanjing capsules could decrease the contents of LD, NEFA, MDA ($P < 0.05$), increase the levels of NO, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ enzyme, SOD and GSH-Px ($P < 0.05$), significantly down-regulate the mRNA and protein expression levels of NF- κ B, Caspase-3, Bax in cardiomyocytes ($P < 0.05$), and up-regulate the mRNA and protein expression of Bcl-2 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shanjing capsule could increase the ability of antioxidant and oxygen free radical scavenging in myocardial ischemia rats, improve energy metabolism of cardiomyocyte, regulate the expression of apoptosis related protein and genes by regulating the NF- κ B signal pathway, which plays a role in myocardial preservation by inhibiting cardiomyocyte apoptosis and decreasing pathological lesion under cardiomyocyte ischemia and anoxia.

[**Key words**] Shanjing capsule; myocardial ischemia; apoptosis; nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B); Caspase-3; B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2); Bcl-2 associated X protein (Bax)

心肌缺血(myocardial ischemia, MI)是世界上死亡率最高的疾病之一。心肌缺血损伤的机制一般为氧自由基的损伤,能量代谢障碍,心肌细胞凋亡,钙超载等。实验证实,心肌长时间缺血缺氧时,不仅能导致心肌细胞的坏死,还能诱导心肌细胞的凋亡及心功能下降等^[1],而细胞凋亡是 MI 发生时心肌损伤的主要形式^[2]。核转录因子- κ B(NF- κ B)可介导心肌细胞凋亡,是一种具有基因转录多向调控作用的转录因子。近年研究表明,心肌细胞、血管平滑肌细胞及血管内皮细胞中亦存在 NF- κ B,其活化可能参与了心肌细胞凋亡的信号转导^[3]。NF- κ B 可以通过多种途径抑制细胞凋亡,而抑制 NF- κ B 的活化对细胞凋亡意义重大。

山精胶囊是山楂叶、薤白和黄精 3 味中药组成的中药复方,治以活血化瘀,通阳化痰理气,益气养阴。主要用于气滞血瘀所致的胸痹。方中山楂叶活血化瘀,理气通脉为君,从标祛实;薤白通阳化痰,宽胸散结,辅助君药活血通脉;黄精入脾肾二经。善补脾肾之精气,又补而不腻。故薤白、黄精二药共为臣药。本方特点为祛邪扶正,溶瘀血、痰浊、气滞,气阴并治于一体,标本兼顾,寓补于消。充分体现了中医整体辨证(治)观念,故能收到瘀血得化,痰浊得消,气机调畅,心脉得养的良好效果。课题组前期已采用冠状动脉结扎法造模,初步发现山精胶囊可能是

通过调控 NF- κ B 信号通路相关凋亡蛋白的表达,抑制心肌细胞凋亡,减少缺血缺氧对心肌细胞的病理损害,起到对心肌的保护作用^[4],在此基础上,本实验欲通过观察山精胶囊对 MI 大鼠的能量代谢、氧自由基及对细胞凋亡相关基因的影响,进而探讨山精胶囊对其心肌的保护机制,以期为中医药在治疗该病方面提供更有意义的研究线索。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wista 大鼠,体重(200 ± 20) g,雌雄各半。由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(黑)2013-0004。动物实验符合黑龙江医药大学伦理委员会标准(编号 DWLL20150506002)

1.2 药物及试剂 山精胶囊(黑龙江贵龙医药有限公司,批号 20150324);心安胶囊(哈尔滨红太阳健康产业集团有限公司,批号 20150506);戊巴比妥钠、肝素钠(北京金鑫天佑生物科技有限公司);氯化钠注射液(吉林省都邦药业股份有限公司,批号 1503210302);ATP 酶,游离脂肪酸(NEFA),乳酸(LD),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成科技有限公司,批号分别为 20150826, 20150506, 20150712, 20150817, 20150721, 20150819, 20150609);苏木精(上海蓝季科技发展

有限公司,批号 151110);伊红(天津市天新精细化工开发中心,批号 20141107);中性树胶(中国上海懿洋仪器有限公司,批号 20151009);TTC(上海惠世生化试剂有限公司,批号 150908);蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂(瑞士 Roche 公司,批号分别为 154240,154981);脱脂奶粉(伊利集团);山羊抗兔 IgG(H+L),山羊抗小鼠 IgG(H+L),GAPDH 鼠单抗(天德悦公司,批号分别为 TDY516,TDY568,TDY041);兔抗 NF- κ B, Caspase-3, Bcl-2, Bax(美国 CST 公司,批号分别为 4764,9662,9542,7965);Goldview 染料(北京诺特莱斯生物科技有限公司,批号 10201ES03);2 \times PCR TaqMix(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW0938A);DNA Marker(2 000 bp),引物,RNA 提取试剂盒,反转录试剂盒(大连宝生物公司,批号分别为 BK5201, BK1602, BK5103, BK1504);其他为国产分析纯。

1.3 仪器 756PC 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);KD-TS3D1 型组织脱水机(浙江金华公司);2135 型组织切片机(德国莱卡公司);Moticam3000 型显微摄影成像系统(美国 Motic 公司);Image-pro plus6.0 病理图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司);Fresco 型低温冷冻离心机,MultiSkán3 型酶标仪,超低温冰箱(美国 Thermo 公司);Mini P-4 型电泳槽,湿转电泳槽(Cavoy 公司);电泳仪,半干槽,PCR 反应扩增仪,核酸电泳系统,垂直电泳仪,全自动梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型复制^[5-6] 大鼠称重后以 1% 戊巴比妥钠(0.04 g \cdot kg⁻¹)腹腔注射麻醉,仰卧位固定于手术台上,气管切开后插管与呼吸机相连通(呼吸频率 60 次/min,潮气量 10 mL \cdot kg⁻¹,吸呼比为 2:1),针形电极插入四肢皮下,监测心电并记录标准 II 导联心电图。在左前胸处用手触摸心跳最明显处(大约在第 3,4 肋间)剥离肌肉组织,找到搏动的的心脏,轻挤胸廓,挤出心脏,小心撕开心包膜,于主动脉圆锥与左心耳之间用手术线穿过冠脉左前降支血管并结扎(假手术组只穿线不结扎),一同结扎心肌纤维一小束,可以观察到结扎处,下面心肌颜色变浅变白。心脏复位,鼓肺后迅速缝合胸腔(心包膜不缝合),伤口处涂擦青霉素,预防创口感染。关胸后稳定 10 min 并观察大鼠是否出现吞咽动作,注意呼吸的恢复情况及动态心电图,如有自主呼吸即可拔出气管插管,脱机后放回鼠笼,单笼饲养,以心电图 S-T 段出现弓背

抬高为急性 MI 造模成功。四周后经心电图及血液学检测,提示慢性 MI 造模成功,进行筛选分组。

2.2 分组 将筛选后的 MI 大鼠模型除假手术组外,按体重随机分为 6 组,每组 8 只,分别为假手术组、模型组、阳性药组(心安胶囊)、山精胶囊低、中、高剂量组。山精胶囊低、中、高剂量组给药剂量分别为 283.5,850.5,1 701.0 mg \cdot kg⁻¹;心安胶囊给药剂量为 324.0 mg \cdot kg⁻¹。假手术组和模型组给予同等剂量的 0.9% 的氯化钠注射液。每日 1 次,给药 10 d。

2.3 指标检测

2.3.1 能量代谢及氧自由基指标的检测 将造模后的心肌缺血大鼠分组给药 10 d,于末次后给药 1 h,下腔静脉取血 2 mL 于离心管中,不抗凝,室温静置,3 500 r \cdot min⁻¹离心 15 min,分离血清。按试剂盒说明书操作,并用 756PC 型紫外可见分光光度计检测 LD,NEFA,MDA,SOD,GSH-Px,NO 指标,记录数据。下腔静脉取血后迅速取出大鼠心脏,剪取适量心肌组织,匀浆,3 500 r \cdot min⁻¹离心 15 min,取上清液。按试剂盒说明书操作,并用 756PC 型紫外可见分光光度计检测 ATP 酶指标,记录数据。

2.3.2 RT-PCR 法对心肌组织中 NF- κ B, Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的检测 取一定量的大鼠动脉结扎线下的心肌组织,Trizol 法提取心肌总 RNA,紫外可见分光光度计进行 RNA 样品定量,进行逆转录反应,引物序列见表 1。扩增反应条件为 94 $^{\circ}$ C 4 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 30 s(NF- κ B, Bcl-2, GAPDH 退火温度 54 $^{\circ}$ C, Bax 退火温度 56 $^{\circ}$ C, Caspase-3 退火温度 59 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将等量的 PCR 扩增产物上样,1.0% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 15 min,UVP 凝胶成像系统拍照。使用凝胶图像分析软件,测定目的条带和 GAPDH 的灰度值,即两者的比值表示的为 RT-PCR 目的产物的相对表达量。

2.3.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)法对心肌组织中 NF- κ B, Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的检测 取一定量的大鼠动脉结扎线下的心肌组织,进行组织蛋白的抽提,按蛋白提取试剂盒的方法,提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量,根据各目的蛋白的分子量,配置 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法转膜,转膜后将膜完全浸没 3% BSA-TBST 中室温轻摇 30 min,一抗、二抗孵育,TBST 洗膜,ECL 加到膜上后反应,显影,定影,胶片扫描。凝胶成像系统分析软件,对 Western blot 结果进行分析,结果以目的蛋白与内参的相对灰度值表示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	引物序列
Caspase-3	上游5'-ATGGACAACAACGAAACCTCCGTG-3'
	下游5'-CCACTCCCAGTCATTGCTTTAGTG-3'
NF-κB	上游5'-GGGGCAGCAGCTGAATG-3'
	下游5'-GGGCACGATTGTCAAAGAT-3'
Bax	上游5'-CCACCAGCTCTGAACAGATCATGA-3'
	下游5'-TCAGCCCATCTTCTCCAGATGGT-3'
Bcl-2	上游5'-TGCAGCTCTGTTTGATTCTCC-3'
	下游5'-GCTGATTTGACCATTTCCTGAA-3'
GAPDH	上游5'-TATCGGACGCCTGGTTAC-3'
	下游5'-CTGTGCCCTTGAACCTGTC-3'

2.4 统计学分析 统计学处理采用 SPSS 18.0

表 2 山精胶囊对 MI 大鼠 LD, NEFA, Ca²⁺-ATP, Na⁺-K⁺ ATP 酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Shanjing capsule on LD, NEFA, Ca²⁺-ATP and Na⁺-K⁺ ATP in myocardial inchemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	LD/mmol·L ⁻¹	NEFA/μmol·L ⁻¹	Ca ²⁺ -ATP/μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ ATP 酶/μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹
假手术	-	6.05 ± 0.25	410.54 ± 50.38	5.13 ± 0.23	5.29 ± 0.26
模型	-	10.05 ± 0.44 ¹⁾	899.51 ± 64.34 ¹⁾	4.48 ± 0.15 ¹⁾	4.56 ± 0.14 ¹⁾
山精胶囊	1 701.0	7.60 ± 0.42 ²⁾	643.38 ± 61.77 ²⁾	4.76 ± 0.12 ²⁾	4.81 ± 0.132 ²⁾
	850.5	7.07 ± 0.74 ²⁾	518.38 ± 24.82 ²⁾	4.87 ± 0.16 ²⁾	4.99 ± 0.12 ²⁾
	283.5	8.66 ± 0.47 ²⁾	765.93 ± 54.07 ²⁾	4.69 ± 0.22 ²⁾	4.76 ± 0.06 ²⁾
心安胶囊	324.0	7.67 ± 0.61 ²⁾	647.06 ± 28.22 ²⁾	4.79 ± 0.17 ²⁾	4.92 ± 0.23 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05(表 3~5 同)。

3.2 对 MI 大鼠氧自由基的影响 与假手术组比较,模型组 MDA 含量明显升高(P < 0.05);模型组 SOD, GSH-Px 活性明显降低, NO 含量明显降低, 差异有明显统计学意义(P < 0.05);与模型组比较,山

统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间比较用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MI 大鼠能量代谢的影响 与假手术组比较,模型组 LD, NEFA 含量明显升高(P < 0.05),模型组 Na⁺-K⁺-ATP, Ca²⁺-ATP 酶活性明显降低(P < 0.05);与模型组比较,山精胶囊高、中、低剂量组、心安胶囊组 LD, NEFA 含量明显降低(P < 0.05),山精胶囊高、中、低剂量组、心安胶囊组 Na⁺-K⁺-ATP, Ca²⁺-ATP 酶活性显著升高(P < 0.05)。提示,山精胶囊能明显降低心肌代谢产物 LD 和 NEFA 的含量,能明显升高 Na⁺-K⁺-ATP 和 Ca²⁺-ATP 酶的活性,从而改善心肌组织的能量代谢障碍,对受损心肌起到了保护作用。见表 2。

表 3 山精胶囊对 MI 大鼠 MDA, SOD, GSH-Px 及 NO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Shanjing capsule on on MDA, SOD, GSH-Px and NO in myocardial inchemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹
假手术	-	1.45 ± 0.33	176.86 ± 10.40	868.80 ± 45.32	56.84 ± 6.24
模型	-	7.80 ± 0.66 ¹⁾	103.12 ± 4.31 ¹⁾	556.80 ± 83.34 ¹⁾	12.24 ± 5.31 ¹⁾
山精胶囊	1 701.0	3.87 ± 0.83 ²⁾	139.35 ± 7.33 ²⁾	759.60 ± 71.18 ²⁾	25.39 ± 3.49 ²⁾
	850.5	3.64 ± 0.64 ²⁾	161.61 ± 8.79 ²⁾	808.80 ± 54.73 ²⁾	37.50 ± 3.77 ²⁾
	283.5	6.25 ± 0.39 ²⁾	120.72 ± 13.45 ²⁾	769.80 ± 45.46 ²⁾	19.21 ± 3.68 ²⁾
心安胶囊	324.0	4.75 ± 0.42 ²⁾	140.04 ± 12.03 ²⁾	760.80 ± 47.52 ²⁾	23.29 ± 4.52 ²⁾

3.3 对 MI 大鼠的心肌组织中 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组心肌组织的 NF-κB, Caspase-3, Bax mRNA 表达水平显著上调(P < 0.05), Bcl-2 mRNA 表达水平显

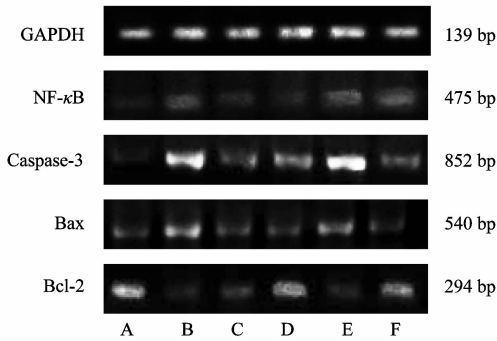
精胶囊高、中、低剂量组、心安胶囊组的 MDA 含量明显降低,差异有明显统计学意义(P < 0.05); SOD, GSH-Px 活性明显升高, NO 含量明显升高(P < 0.05)。见表 3。

著下调(P < 0.05);与模型组比较,山精胶囊高、中、低剂量组、心安胶囊组的 NF-κB, Caspase-3, Bax mRNA 表达水平显著下调(P < 0.05), Bcl-2 的 mRNA 表达水平显著上调(P < 0.05)。见表 4,图 1。

表 4 山精胶囊对 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Shanjing capsule on mRNA expression of NF-κB, Caspase-3, Bax and Bcl-2 in myocardial inchemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NF-κB/GAPDH	Caspase-3/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
假手术	-	0.59 ± 0.07	0.13 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.78 ± 0.02
模型	-	1.25 ± 0.06 ¹⁾	1.68 ± 0.13 ¹⁾	0.82 ± 0.03 ¹⁾	0.38 ± 0.03 ¹⁾
山精胶囊	1 701.0	0.80 ± 0.07 ²⁾	0.52 ± 0.09 ²⁾	0.65 ± 0.01 ²⁾	0.58 ± 0.01 ²⁾
	850.5	0.68 ± 0.05 ²⁾	0.39 ± 0.06 ²⁾	0.63 ± 0.01 ²⁾	0.56 ± 0.01 ²⁾
	283.5	0.94 ± 0.06 ²⁾	0.77 ± 0.08 ²⁾	0.70 ± 0.02 ²⁾	0.45 ± 0.02 ²⁾
心安胶囊	324.0	0.79 ± 0.02 ²⁾	0.58 ± 0.07 ²⁾	0.64 ± 0.01 ²⁾	0.58 ± 0.01 ²⁾



A. 假手术组; B. 模型组; C. 心安胶囊组; D. 山精胶囊 1 701.0 mg·kg⁻¹组; E. 山精胶囊 850.5 mg·kg⁻¹组; F. 山精胶囊 283.5 mg·kg⁻¹组

图 1 各组大鼠 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 的 mRNA 表达
Fig. 1 mRNA expression of NF-κB, Caspase-3, Bax and Bcl-2 in each group rats

表 5 山精胶囊对 MI 大鼠 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 的蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of Shanjing capsule on protein expression of NF-κB, Caspase-3, Bax and Bcl-2 in myocardial inchemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NF-κB/GAPDH	Caspase-3/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
假手术	-	0.66 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.61 ± 0.01
模型	-	1.02 ± 0.05 ¹⁾	0.57 ± 0.01 ¹⁾	0.76 ± 0.02 ¹⁾	0.23 ± 0.02 ¹⁾
山精胶囊	1 701.0	0.91 ± 0.02 ²⁾	0.22 ± 0.01 ²⁾	0.19 ± 0.02 ²⁾	0.32 ± 0.01 ²⁾
	850.5	0.80 ± 0.01 ²⁾	0.21 ± 0.03 ²⁾	0.16 ± 0.01 ²⁾	0.41 ± 0.01 ²⁾
	283.5	0.96 ± 0.01 ²⁾	0.37 ± 0.03 ²⁾	0.41 ± 0.02 ²⁾	0.24 ± 0.01 ²⁾
心安胶囊	324.0	0.77 ± 0.02 ²⁾	0.32 ± 0.02 ²⁾	0.35 ± 0.02 ²⁾	0.27 ± 0.01 ²⁾

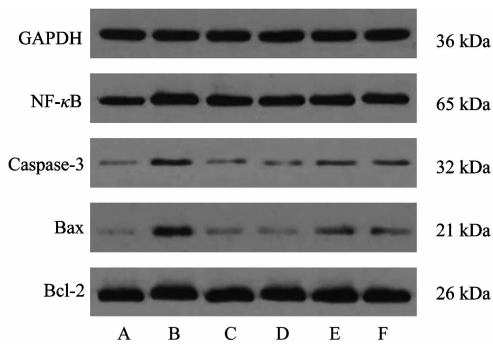
凋亡特征^[9-10]。心肌缺氧时产生大量的氧自由基,心肌细胞膜上的 Na⁺-K⁺-ATP 酶及 Ca²⁺-ATP 酶受自由基氧化作用影响而活性下降,而山精胶囊可显著提高心肌能量代谢过程中的 Na⁺-K⁺-ATP 酶及 Ca²⁺-ATP 酶活性,增加 ATP 的生成,从而改善慢性心肌缺血大鼠能量代谢障碍^[11]。本实验结果显示,山精胶囊组 Na⁺-K⁺-ATP 酶及 Ca²⁺-ATP 酶活性均比模型组显著升高,提示山精胶囊对 ATP 酶活性有显著的改善效果,可以防止水钠潴留,同时也减轻和避免了细胞内钙的进一步超载,可能是其拮抗 MI 的机制之一。

3.4 对 MI 大鼠的心肌组织中 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组心肌组织的 NF-κB, Caspase-3, Bax 的蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$); Bcl-2 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$),与模型组比较,山精胶囊高、中、低剂量组、心安胶囊组的 NF-κB, Caspase-3, Bax 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$), Bcl-2 的蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05$)。见表 5, 图 2。

4 讨论

细胞凋亡是一种形态上,有别于细胞坏死的细胞死亡的过程^[7]。心肌缺血缺氧后,细胞一方面坏死,一方面也正在发生凋亡^[8]。实验表明,人类和动物心肌细胞在历经长时间的缺血后,会出现明显

心肌缺血缺氧时,脂肪酸的氧化减少,葡萄糖的氧化增加,使心肌耗氧减少,心肌对缺血和缺氧的耐受性增加,阻止了凋亡,这种能量代谢的转换可能具有一定的心肌保护作用^[12]。心肌缺氧时过氧化产物 MDA 对细胞膜有很强的破坏作用,使其流动性和通透性发生变化,细胞内外离子分布异常,进而抑制心功能,最终导致心肌细胞从可逆性损伤发展为细胞死亡。大量 SOD 等内源性氧自由基清除剂活性降低, SOD 又可通过 GSH-Px 的作用还原为水和分子氧。本研究结果表明山精胶囊能降低心肌组织氧化产物 MDA 的含量,对 MI 有明显的保护作用。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 山精胶囊 1 701.0 mg·kg⁻¹组; D. 山精胶囊 850.5 mg·kg⁻¹组; E. 山精胶囊 283.5 mg·kg⁻¹组; F. 心安胶囊组

图 2 各组大鼠 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 的蛋白表达
Fig. 2 Protein expression of NF-κB, Caspase-3, Bax and Bcl-2 in each group rats

此作用可能与其保护内源性氧自由基清除剂 SOD 等的活性,减轻氧自由基对心肌细胞膜脂质过氧化损伤有关^[13]。

NO 是内皮细胞释放的一种舒血管因子^[14]。研究表明,MI 等许多心血管疾病的发生与内皮细胞受损导致内源性 NO 合成减少有关^[15]。NO 也是反映内皮功能的比较敏感的指标,生理状态先按由血管内皮细胞产生,NO 可抑制活性氧的活性并减少 OH 的生成而直接保护组织细胞免受损伤,故 NO 对 MI 有保护作用^[16]。本研究发现 MI 时,大鼠血清 NO 含量明显降低,而山精胶囊能显著提高大鼠 MI 后血清 NO 含量,而且能清除氧自由基,抑制脂质过氧化,使 MDA 含量降低,表明山精胶囊有保护血管内皮的作用。山精胶囊保护心肌细胞和血管内皮细胞免受 MI 损伤可能是其抗实验室 MI 损伤的另一机制。

近年的研究表明,在分子转录水平,NF-κB 与细胞凋亡的关系密切,其参与多种凋亡相关基因的转录调控,具有抑制细胞凋亡作用及促细胞凋亡的双向作用^[17],NF-κB 的活化被认为是缺血早期发病机理的重要调节环节^[18]。Bcl-2 和 Bax 蛋白水平高低与凋亡调控直接相关,Bax 增高,促进细胞凋亡;Bcl-2 增高,抑制细胞凋亡^[19],而 Caspases 是哺乳动物细胞凋亡的启动者和执行者,其中 Caspase-3 是 Caspases 级联瀑布下游最关键的凋亡蛋白酶 Bcl-2 是通过干扰细胞色素 C 的释放而阻断上游 Caspase 蛋白酶的激活,抑制细胞的凋亡^[20]。Bax 蛋白作为线粒体膜上离子通道的组成成分,使细胞色素 C 得以穿过线粒体膜,并进一步激活 Caspase-3,导致细胞凋亡^[21]。本研究利用 Western blot 法和 PCR 法检测发现山精胶囊使心肌 Bax 及蛋白表达水平显著

下调,Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平显著上调,显著增加 Bcl-2/Bax。因此认为,山精胶囊可能具有抗凋亡作用。

综上所述,山精胶囊可能通过对 NF-κB 信号通路的调控途径,提高 MI 大鼠抗氧化和清除氧自由基的能力,改善心肌细胞的能量代谢,调节凋亡相关蛋白和基因的表达,从而抑制了心肌细胞凋亡,减少缺血缺氧对心肌细胞的病理损害,起到对心肌的保护作用。

[参考文献]

[1] QIAN L, SHI J, ZHANG C, et al. Downregulation of RACK1 is associated with cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion injury in adult rats[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(3): 305-313.

[2] ZHAO B, LENG Y, WU X, et al. Role of JAK2/STAT3 signaling pathway in brain injury induced by myocardial ischemia-reperfusion in diabetic rats [J]. *Chin J Anesthesiol*, 2016, 25: 211-213.

[3] ZHANG M, PAN X, ZOU Q, et al. GW27-e0028 Notch3 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction by inhibiting the TGF-β₁/Smad3 pathway[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2016, 16(4): 316-324.

[4] 于栋华,刘树民,董培良,等. 山精胶囊对心肌缺血大鼠 NF-κB 信号通路相关凋亡蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(11): 141-145.

[5] 李玉光,丁洽烽,谭学瑞,等. 长时间慢性心肌缺血实验动物模型的构建技术[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2005, 9(23): 42-43.

[6] 于震,刘建勋. 慢性心肌缺血动物模型制备方法[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(3): 273-276.

[7] 张兰,邹晓宁,姜维娜,等. 含碘中药复方对 AIT 大鼠甲状腺组织凋亡调控蛋白 Fas、FasL、Bcl-2、Bax 的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(2): 159-162.

[8] Boyle A J, Hwang J, YE J, et al. The effects of aging on apoptosis following myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Ther*, 2013, 31(6): 102-110.

[9] 上官海娟,徐江,汤剑青,等. 当归对心肌梗塞后心肌细胞凋亡及凋亡相关基因的影响[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2005, 26(2): 172-175.

[10] 何东伟,刘新伟,庞勇,等. 白藜芦醇对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用与 PI3K-Akt 信号通路的关系[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(15): 2323-2326.

[11] Belliard A, Gulati G K, DUAN Q, et al. Ischemia/reperfusion-induced alterations of enzymatic and signaling functions of the rat cardiac Na⁺/K⁺-ATPase: protection by ouabain preconditioning[J]. *Physiological*

- Reports, 2016, 4(19): e12991.
- [12] HUANG Z, CHEN N, WANG H, et al. Crocetin ester improves myocardial ischemia via Rho/ROCK/NF- κ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 38: 186-193.
- [13] WANG Z, ZHANG J, REN T, et al. Targeted metabolomic profiling of cardioprotective effect of *Ginkgo biloba* L. extract on myocardial ischemia in rats [J]. Phytomedicine, 2016, 23(6): 621-631.
- [14] Dwaich K H, Alamran F G, Alsheibani B I, et al. Melatonin effects on myocardial ischemia-reperfusion injury: Impact on the outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery [J]. Int J Cardiol, 2016, 221: 977-986.
- [15] LUO C C, HUANG C S, MING Y C, et al. Calcitonin gene-related peptide downregulates expression of inducible nitric oxide synthase and Caspase-3 after intestinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Pediatr Neonatol, 2016, 57(6): 474-479.
- [16] ZHOU H, HOU S Z, LUO P, et al. Ginseng protects rodent hearts from acute myocardial ischemia-reperfusion injury through GR/ER-activated RISK pathway in an endothelial NOS-dependent mechanism [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(2): 287-298.
- [17] Dutta J, FAN Y N, FAN G, et al. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB [J]. Oncogene, 2006, 25(51): 6800-6816.
- [18] LI X, YANG J, YANG J, et al. RP105 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via suppressing TLR4 signaling pathways in rat model [J]. Exp Mol Pathol, 2016, 100(2): 281-286.
- [19] CHAO Z, LIU X, CHI Z, et al. Phosphorylated eEF2 is SUMOylated and induces cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia reperfusion [J]. J Cardiol, 2016, doi: 10.1016/j.jjcc.2016.05.020.
- [20] MI Y K, SUN H L, Lee J. Intake of hot water - extracted apple protects against myocardial injury by inhibiting apoptosis in an ischemia/reperfusion rat model [J]. Nutr Res, 2014, 34(11): 951-960.
- [21] LIU X L, LU J, XING J. Stabilization of HIF-1 α modulates VEGF and Caspase-3 in the hippocampus of rats following transient global ischemia induced by asphyxial cardiac arrest [J]. Life Sci, 2016, 151: 243-249.

[责任编辑 周冰冰]