

血府逐瘀胶囊对缺血心肌细胞 SIRT1 信号转导通路的干预作用

段锦龙, 姚魁武*, 刘张静, 陈孟倩
(中国中医科学院 广安门医院, 北京 100053)

[摘要] **目的:**观察血府逐瘀胶囊对大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 信号通路的干预作用,探讨该中药复方的作用机制。**方法:**将 70 只健康成年雌性 Wistar 大鼠随机分成正常组,假手术组(以蒸馏水 10 mL·kg⁻¹灌胃),模型组(以蒸馏水 10 mL·kg⁻¹灌胃),血府逐瘀高、中、低剂量组(0.03, 0.02, 0.01 g·kg⁻¹),L-NAME 组(按 2 mg/只腹腔注射),采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)技术检测各组心肌组织沉默信息调节因子 1(Sirt1),p53 及核转录因子-κB(NF-κB) mRNA 表达情况。**结果:**与假手术组比较,模型组缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$),缺血心肌细胞 p53, NF-κB mRNA 表达水平增高($P < 0.05$);与模型组比较,血府逐瘀高、中、低剂量组大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达水平明显增高($P < 0.05$),血府逐瘀高剂量组大鼠缺血心肌细胞 p53, NF-κB mRNA 表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论:**血府逐瘀胶囊可延长缺血心肌细胞寿命,其机制可能是通过激活 Sirt1 信号通路,抑制 p53, NF-κB 基因的表达而发挥作用。

[关键词] 缺血性心脏病; 沉默信息调节因子 1; 血府逐瘀胶囊; 细胞寿命, 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0141-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180141

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1018.040.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 10:18

Effect of Xuefu Zhuyu Capsule on SIRT1 Signal Transduction Pathway of Ischemic Cardiomyocytes

DUAN Jin-long, YAO Kui-wu*, LIU Zhang-jing, CHEN Meng-qian

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Xuefu Zhuyu capsule on Sirt1 signal transduction pathway of ischemic cardiomyocytes in rats, and discuss its mechanism of action. **Method:** A total of 70 healthy adult female wistar rats were randomly divided into normal group, sham operation group (10 mL·kg⁻¹ distilled water), model group (10 mL·kg⁻¹ distilled water), Xuefu Zhuyu high dose group (0.03 g·kg⁻¹), Xuefu Zhuyu middle dose group (0.02 g·kg⁻¹), Xuefu Zhuyu low dose group (0.01 g·kg⁻¹), and L-NAME group (2 mg/rat, intraperitoneal injection). The mRNA expression levels of Sirt1, p53 and NF-κB in myocardium were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Result:** As compared with the sham operation group, the expression level of Sirt1 was significantly reduced in the model group ($P < 0.05$); the expression levels of p53 and NF-κB in myocardium were increased in model group ($P < 0.05$). As compared with the model group, the expression level of Sirt1 in ischemic myocardium was increased in Xuefu Zhuyu high, middle and low dose groups ($P < 0.05$); the expression levels of p53 and NF-κB in myocardium were decreased in Xuefu Zhuyu high dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xuefu Zhuyu capsule can inhibit the expression of p53 and NF-κB genes by activating Sirt1 signaling pathway to exert its anti-aging effect and prolong the life span of ischemic cardiomyocytes.

[收稿日期] 20170318(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473466)

[第一作者] 段锦龙,在站博士后,从事中西医结合心血管病防治研究,E-mail:524133606@qq.com

[通讯作者] *姚魁武,博士,主任医师,硕士生导师,从事中西医结合心血管病防治研究,Tel:010-88001241,E-mail:yaokuiwu@126.com

[Key words] ischemic cardiac disease; silent information regulator 1 (Sirt1); Xuefu Zhuyu capsules; cell lifespan; apoptosis

缺血性心脏病 (IHD) 的发病率和死亡率在我国呈逐年上升趋势,是引起死亡的最主要原因之一。目前,临床上采用药物、介入手术等方法进行治疗,虽然能减缓疾病进展,改善心脏功能,但因心肌细胞缺血坏死,预后大多不良^[1],因此防治 IHD 是临床亟需解决的问题。沉默信息调控子 1 (Sirt1) 是一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 的去乙酰化酶,可通过对各种组蛋白和非组蛋白的去乙酰基作用来调控细胞凋亡、炎症反应、氧化应激、自噬、细胞有丝分裂、细胞增殖、细胞衰老及新陈代谢等多种生命活动^[2-4]。L-NAME 为 Sirt1 信号转导通路的抑制剂。Sirt1 介导的信号转导通路与 IHD 病理机制密切相关,能调控心肌细胞在应激情况下的寿命。

血腑逐瘀汤是清代王清任所创,方由地黄、桃仁、红花、当归、甘草、赤芍、桔梗、枳壳、柴胡、川芎、牛膝 11 味中药组成,具有活血化瘀、行气止痛的功效^[5]。研究均表明血腑逐瘀汤在缺血性心肌病的治疗中,不但能改善临床症状,更能从病因根本改善心肌代谢及氧供,减少心肌细胞凋亡,提高心肌收缩力,并能促进缺血区血管新生,对心肌缺血损伤有保护作用^[6-8]。本研究通过建立大鼠心肌缺血模型,采用血腑逐瘀胶囊进行干预,基于 Sirt1 信号通路,观察血腑逐瘀胶囊对大鼠缺血心肌细胞寿命的影响,探讨祛瘀生新中药在 IHD 治疗中的作用机制。

1 材料

1.1 动物 选用成年清洁级雌性 Wistar 大鼠,体重 200~220 g,总共 70 只,由广安门医院动物中心提供,购自北京市维通利华实验动物技术有限公司,灯光明/暗各 12 h,自由摄食。动物合格证号 SCXK (京)2006-0009。本研究所有动物实验均符合中国伦理委员会指导原则。

1.2 药物及试剂 血腑逐瘀胶囊 (天津宏仁堂药业有限公司,批号 ZZ-2914-津卫药准字 (1992) 0748 号); L-NAME (美国 Sigma 公司,批号 14H0135); RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (加拿大 Fermentas 公司,批号 41651); SYBR Green PCR Master Mix (美国 Applied Biosystems 公司,批号 1309117)。

1.3 仪器 GeneAmp 5700 型荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), DU640 型紫外线分光光度计 (德国 Backman 公司), CYY-

III-5 型电泳仪 (北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 实验分组及处理 大鼠 70 只,随机分成 7 组,每组 10 只。正常组不做处理;假手术组麻醉后开胸,冠状动脉只穿线不结扎,术后灌胃蒸馏水,持续 10 d;模型组按心肌缺血造模方法进行造模,术后灌胃蒸馏水,持续 10 d;血腑逐瘀高剂量组造膜方法同前,术后按 3 g·L⁻¹ 给予血腑逐瘀胶囊灌胃,持续 10 d;血腑逐瘀中剂量组造膜方法同前,术后按剂量 2 g·L⁻¹ 给予血腑逐瘀胶囊灌胃,持续 10 d;血腑逐瘀低剂量组造膜方法同前,术后按 1 g·L⁻¹ 给予血腑逐瘀胶囊灌胃,持续 10 d; L-NAME 组:造膜方法同前,造膜前 1 d 即开始 L-NAME 连续腹腔注射给药,每天 1 次。

2.2 造膜方法 照 YIN 等^[9] 造膜方法,在大鼠左侧第 4,5 肋间剪开皮肤,分离肌肉、肋骨和心包,采用 0 号手术线在左心耳下 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支,闭合胸腔,逐层进行缝合。

2.3 给药 参照《药理实验方法学》^[10] 所示体表面积剂量换算法并结合预实验计算给药剂量,血腑逐瘀高、中、低剂量组分别为 0.03, 0.02, 0.01 g·kg⁻¹,按 10 mL·kg⁻¹ 体重剂量灌胃;正常组、假手术组、模型组灌胃等体积蒸馏水; L-NAME 组按每只 2 mg 剂量腹腔注射给药。

2.4 观察指标及检测方法 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术检测心肌细胞 Sirt1, p53 和核转录因子- κ B (NF- κ B) mRNA 表达:取缺血区心肌组织,加入 Trizol 抽提总 RNA,分光光度法测定核酸的浓度,按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录反应,得到 cDNA,用 Real-time PCR 仪进行扩增。SIRT1 基因引物上游 5'-TTTCAGAACCACCAAAGCG-3', 下游 5'-TCCCACAGGAAACAGAAACC-3', 长度 206 bp; p53 基因引物上游 5'-GCAGTTCCTCTTCCTGCAGTACTC-3', 下游 5'-AACCAGACCTCAGCGGCTCATAG-3', 长度 241 bp; NF- κ B 基因引物的上游 5'-CGATCTGTTTCCCCTCATCT-3', 下游 5'-ATTGGGTGCGTCTTACTGGT-3', 长度 175 bp; 内参 β -肌动蛋白 (β -actin) 基因引物上游 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3', 下游 5'-AATG TCACGCACGATTTCCC-3', 长度 263 bp。循环条件 95 °C 10 min, 95 °C 25 s, 55 °C 25 s,

72 °C 50 s, 72 °C 5 min, 共 40 循环。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行 mRNA 表达的相对定量分析。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布、方差齐性检测后,采用 *t* 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达的影响

与正常组比较,假手术组缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$);与假手术组比较,模型组缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,血府逐瘀高、中、低剂量组明显增高大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$);而相对于 L-NAME 组,血府逐瘀高、中、低剂量组大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 表达水平明显增高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 血府逐瘀胶囊对大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on expression of Sirt1 mRNA of ischemic myocardial cells in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Sirt1
正常	-	1.77 ± 0.13
假手术	-	1.61 ± 0.06 ¹⁾
模型	-	1.35 ± 0.07 ²⁾
血府逐瘀	0.03	1.66 ± 0.06 ^{3,4)}
	0.02	1.63 ± 0.05 ^{3,4)}
	0.01	1.51 ± 0.03 ^{3,4)}
L-NAME ¹⁾	2.00	1.36 ± 0.05

注:L-NAME 组的剂量单位为 mg/只,与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与假手术组比较²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$;与 L-NAME 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

3.2 对大鼠缺血心肌细胞 p53 mRNA 表达的影响

与正常组比较,假手术缺血心肌细胞 p53 mRNA 表达水平无明显变化;与假手术组比较,模型组缺血心肌细胞 p53 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,血府逐瘀高、中、低剂量组明显降低大鼠缺血心肌细胞 p53 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$);而相对于 L-NAME 组,血府逐瘀高、中、低剂量组大鼠缺血心肌细胞 p53 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对大鼠缺血心肌细胞 NF-κB mRNA 表达的影响

与正常组比较,假手术组缺血心肌细胞 NF-κB mRNA 表达水平无明显变化;与假手术组比较,模型组缺血心肌细胞 NF-κB mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,血府逐瘀高剂量组明显降低大鼠缺血心肌细胞 NF-κB mRNA 表达水平

表 2 血府逐瘀胶囊对大鼠缺血心肌细胞 p53 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on expression of p53 mRNA of ischemic myocardial cells in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p53
正常	-	1.15 ± 0.03
假手术	-	1.16 ± 0.03
模型	-	1.29 ± 0.04 ²⁾
血府逐瘀	0.03	1.23 ± 0.02 ^{3,4)}
	0.02	1.26 ± 0.02 ^{3,4)}
	0.01	1.29 ± 0.03 ^{3,4)}
L-NAME	2.00	1.33 ± 0.05

($P < 0.05$);而相对于 L-NAME 组,血府逐瘀高剂量组大鼠缺血心肌细胞 NF-κB mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 血府逐瘀胶囊对大鼠缺血心肌细胞 NF-κB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on expression of NF-κB mRNA of ischemic myocardial cells in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB
正常	-	1.19 ± 0.07
假手术	-	1.20 ± 0.05
模型	-	1.33 ± 0.08 ²⁾
血府逐瘀	0.03	1.24 ± 0.06 ^{3,4)}
	0.02	1.32 ± 0.03
	0.01	1.33 ± 0.07
L-NAME	2.00	1.37 ± 0.06

4 讨论

目前对缺血性心脏病的治疗虽能够有效地改善冠状动脉供血、挽救缺血心肌,但对已坏死的心肌或无功能心肌尚无良好治疗措施^[11]。由于心肌细胞受到损伤后会发生凋亡、坏死,造成具有完整舒缩功能的心肌细胞数量明显减少,而成熟个体的心肌细胞很少有再生功能,故难以满足心功能恢复的需要,因此受累心肌出现纤维化及心室重构,心脏舒缩功能下降,导致心力衰竭、心律失常等严重合并症的发生。因此,如何修复受损的心肌细胞,延长缺血心肌细胞的寿命,改善心肌细胞的功能对于治疗 IHD 非常有意义。

Sirt1 是一种 NAD 依赖去乙酰化酶,可作用于多种蛋白质,减少细胞在应激状态下的凋亡,增加细胞的修复能力。研究显示,Sirt1 介导的信号通路与 IHD 的发生有密切关系,通过调控其下游基因的表达,能够减轻细胞凋亡和炎症反应,从而延长缺血细胞寿命。它拥有大量的可反应基质,包括 p53, FOXO3 以及 NF-κB 等^[12]。相关研究表明上调 Sirt1 的表达能够抑制细胞凋亡,并在氧化应激损伤中保

护心肌细胞以及延缓老鼠心脏的衰老进程^[13]。在结扎冠状动脉左前降支建立的小鼠 MI 模型中发现,过表达 Sirt1 后小鼠心功能明显改善并显著降低了死亡率^[14]。Sirt1 能通过抑制 p53 基因的表达而减少心肌细胞凋亡^[15-16]。ZHANG 等^[17]研究表明 Sirt1 信号通路的激活能够降低 p53 乙酰化程度,并减少对细胞凋亡起促进作用 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白的表达,从而减少阿霉素引起的心肌细胞凋亡。NF- κ B 与炎症反应相关, Sirt1 可与 NF- κ B 的亚单位互相作用,减少活性氧的产生,减轻炎症反应,进而延长细胞寿命。所以, Sirt1 信号通路在延长细胞寿命方面发挥重要作用。

缺血性心脏病属中医“胸痹”、“心痛”等范畴,祛瘀生新法是其一个重要的治疗原则。血腑逐瘀汤出自王清任的《医林改错》,是中医“祛瘀生新”理论的代表方剂,本方由桃红四物汤(桃仁、红花、当归、川芎、生地、赤芍)合四逆散(柴胡、枳实、甘草、芍药)加桔梗、牛膝而,方中以桃红四物汤活血化瘀而养新血;四逆散疏理肝气,使气行则血行;加桔梗引药上行达于胸中(血腑);牛膝引瘀血下行而通利血脉。本方具有活血化瘀、行气止痛的功效,在缺血性心脏病治疗中应用广泛且疗效显著。

本实验结果显示,与模型组比较,血腑逐瘀高、中、低剂量组大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 表达水平明显增高,血腑逐瘀高剂量组大鼠缺血心肌细胞 p53, NF- κ B mRNA 表达水平明显降低;而相对于 L-NAME 组,血腑逐瘀高、中、低剂量组大鼠缺血心肌细胞 Sirt1 mRNA 表达水平明显增高,血腑逐瘀高剂量组大鼠缺血心肌细胞 p53, NF- κ B mRNA 表达水平明显降低。提示血腑逐瘀胶囊能够激活 Sirt1 信号通路,通过抑制其通路下游基因 p53, NF- κ B mRNA 的表达,减少细胞凋亡和炎症反应,从而延长缺血心肌细胞寿命,促进心肌细胞再生。

[参考文献]

[1] 余红,朱锦云,王建安. 干细胞治疗缺血性心肌病研究进展[J]. 中国介入心脏病学杂志,2015,23(5): 286-290.

[2] YI Y W, KANG H J, Kim H J, et al. Targeting mutant p53 by a SIRT1 activator YK-3-237 inhibits the proliferation of triple-negative breast cancer cells[J]. Oncotarget,2013,4(7):984-994.

[3] GU C, LI Y, XU W L, et al. Sirtuin 1 Activator SRT1720 protects against lung injury via reduction of type II alveolar epithelial cells apoptosis in emphysema [J]. COPD,2015,12(4):444-452.

[4] HAO C, ZHU P X, YANG X, et al. Overexpression of

SIRT1 promotes metastasis through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer,2014,doi: 10.1186/1471-2407-14-978.

[5] 李庆盟,李小黎,邵珺,等. 血府逐瘀汤及其类生方方证的思考[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(6): 859-862.

[6] 王立栋. 血府逐瘀汤加味治疗冠心病心肌缺血的临床效果分析[J]. 临床医学研究与实践,2016,1(19):129-130.

[7] 王婷,罗尧岳,谢海,等. 血府逐瘀汤对心肌缺血大鼠模型血清 NO 及缺血区心肌组织 VEGF、DLL4 蛋白表达的影[J]. 中医药导报,2014,20(7):62-65.

[8] 谭元生,雍苏南,唐莹,等. 中医不同治法对大鼠心肌缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报,2011,31(1):18-21.

[9] YIN W, ZHANG P, HUANG J H, et al. Stimulation of kappa-opioid receptor reduces isoprenaline-induced cardiac hypertrophy and fibrosis [J]. Eur J Pharmacol, 2009,607(1/3):135-142.

[10] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006: 882-887.

[11] 高连如. 干细胞移植治疗缺血性心脏病的进展及其作用机制[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007, 11(46):9346-9352.

[12] Sirotkin A V, Dekanová P, Harrath A H, et al. Interrelationships between sirtuin 1 and transcription factors p53 and NF- κ B (p50/p65) in the control of ovarian cell apoptosis and proliferation[J]. Cell Tissue Res,2014,358(2):627-632.

[13] Hsu Y J, Hsu S C, Hsu C P, et al. Sirtuin 1 protects the aging heart from contractile dysfunction mediated through the inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in cardiac-specific Sirtuin 1 knockout mouse model[J]. Int J Cardiol,2017,228:543-552.

[14] GU X S, WANG Z B, YE Z, et al. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates MAPK and improves cardiac function in heart failure[J]. Genet Mol Res, 2014,13(1):323-335.

[15] HAN D, HUANG W, LI X, et al. Melatonin facilitates adipose-derived mesenchymal stem cells to repair the murine infarcted heart via the SIRT1 signaling pathway [J]. J Pineal Res,2016,60(2):178-192.

[16] ZHANG C, QU S, WEI X, et al. HSP25 down-regulation enhanced p53 acetylation by dissociation of SIRT1 from p53 in doxorubicin-induced H9c2 cell apoptosis [J]. Cell Stress Chaperones,2016,21(2):251-260.

[17] ZHANG C, FENG Y, QU S, et al. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53 [J]. Cardiovasc Res,2011,90(3): 538-545.

[责任编辑 周冰冰]