

甘草酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

王军¹, 张虹², 谢凤杰², 李海红^{2*}

(1. 海南医学院第一附属医院, 海口 570102;

2. 牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

[摘要] **目的:**观察甘草酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)的保护作用及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 原癌基因(B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)表达的影响,探讨其可能机制。**方法:**50 只 SD 大鼠随机分为假手术组,心肌缺血再灌注损伤组(模型组),甘草酸预处理低、中、高剂量组。采用结扎左冠状动脉前降支建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。假手术组穿线后不结扎;模型组于缺血前 30 min 腹腔注射 2 mg·kg⁻¹生理盐水;甘草酸低、中、高剂量组于缺血前 30 min 腹腔注射 2, 4, 10 mg·kg⁻¹甘草酸。光镜下观察心肌组织的病理组织学变化;检测肌酸激酶同工酶(CK-MB)活性,乳酸脱氢酶(LDH)活性,心肌肌钙蛋白-T(cTnT)水平,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,白细胞介素-6(IL-6)水平,髓过氧化物酶(MPO)活性,超氧化物歧化酶(SOD)活性,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性,丙二醛(MDA)水平;末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡指数;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌 Bcl-2 和 Bax 的表达。**结果:**与模型组比较,甘草酸预处理低剂量组、中剂量组、高剂量组明显减轻心肌缺血再灌注损伤;与模型组比较,甘草酸预处理低剂量组、中剂量组、高剂量组显著降低 CK-MB, LDH, cTnT, TNF- α , IL-6, MPO, MDA 水平,显著升高 SOD, GSH-Px 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,甘草酸预处理低剂量组,中剂量组,高剂量组显著降低心肌细胞凋亡指数($P < 0.01$);与模型组比较,甘草酸预处理低、中、高剂量组显著上调心肌 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达及上调 Bcl-2/Bax($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**甘草酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,且能上调心肌 Bcl-2 表达和下调心肌 Bax 表达,从而抑制细胞心肌凋亡。

[关键词] 甘草酸; 心肌缺血再灌注损伤; 凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 原癌基因(Bcl-2); Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)

[中图分类号] R285.5; R256.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0126-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180698

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171127.0904.018.html>

[网络出版时间] 2017-11-27 9:04

Protective Effect of Pretreatment with Glycyrrhizic Acid on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats and Expressions of Bcl-2 and Bax

WANG Jun¹, ZHANG Hong², XIE Feng-jie², LI Hai-hong^{2*}

(1. The First Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China;

2. Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect and of pretreatment with glycyrrhizic acid on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) in rats and expressions of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax). **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group), myocardial ischemia-reperfusion injury group (MIRI group), low-dose group, middle-dose group,

[收稿日期] 20170912(022)

[基金项目] 海南医学院创新性实验项目(HYCX2016-124)

[第一作者] 王军, 硕士, 副主任医师, 从事冠心病及心律失常介入治疗, Tel: 0898-66808109, E-mail: wangjunss1973@163.com

[通信作者] *李海红, 硕士, 副主任医师, 从事危急重症的诊治, Tel: 0453-6602345, E-mail: soslihaihong@163.com

and high-dose group. The myocardium ischemia reperfusion injury model in rats was established through ligation of the left anterior descending of the coronary artery. Rats in Sham group were not ligated after threading. Rats in MIRI group were administered with saline at the dose of $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ through intraperitoneal injection 30 minutes before ischemia. Low-dose group, middle-dose group and high-dose group were administered with glycyrrhizic acid at doses of 2, 4 and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ through intraperitoneal injection 30 minutes before ischemia. The pathological histologic changes in myocardial tissues were observed under optical microscope. Creatine kinase isoenzyme (CK-MB) activity, lactate dehydrogenase (LDH) activity, cardiac troponin-T (cTnT), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), myeloperoxidase (MPO) activity, superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondialdehyde (MDA) were detected. Apoptotic index of myocardial cells was detected by terminal dextrynucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), and expressions of Bcl-2 and Bax in cardiac muscle tissues were detected by Western blot. **Result:** Compared with MIRI group, myocardial ischemia reperfusion injury in rats was reduced significantly in low-dose group, middle-dose group and high-dose group. Compared with MIRI group, CK-MB activity, LDH activity, cTnT, TNF- α , IL-6, MPO activity and MDA were significantly reduced in low-dose group, middle-dose group and high-dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while SOD activity and GSH-Px activity were significantly elevated in low-dose group, middle-dose group and high-dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with MIRI group, apoptotic index of myocardial cells was significantly reduced in low-dose group, middle-dose group and high-dose group ($P < 0.01$). Compared with MIRI group, expression of Bcl-2 in cardiac muscle tissues and ratio of Bcl-2, Bax were significantly elevated in low-dose group, middle-dose group and high-dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while expression of Bax in cardiac muscle tissues was significantly reduced in low-dose group, middle-dose group and high-dose group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Glycyrrhizic acid has a protective effect on myocardial ischemia reperfusion injury in rats by inhibiting apoptosis of myocardial cells, and can elevate expression of Bcl-2 and reduce expression of Bax in cardiac muscle tissues.

[**Key words**] glycyrrhizic acid; myocardial ischemia reperfusion injury; apoptosis; B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2); Bcl-2 associated X protein (Bax)

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemiar reperfusion injury, MIRI) 是由心脏血流中断引起的局部缺血而导致的心肌细胞明显损伤, 随后的重新恢复血流灌注后心肌细胞功能和结构不但没有恢复, 反而激活各种损伤反应并进一步损伤加重的现象, 是影响心功能的重要因素^[1-2]。因此, 解决心肌缺血再灌注损伤已经成为心脏疾病治疗的主要挑战。甘草酸 (glycyrrhizic acid) 又名甘草甜素, 甘草皂苷, 强力宁, 是甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 的重要有效活性成分之一, 具有抗炎, 抗溃疡, 抗过敏, 抗氧化, 免疫调节, 抗病毒, 抗癌和保肝等药理作用^[3]。研究表明, 甘草酸对心肌缺血, 心肌肥厚具有明显的保护作用^[4-5]。也有研究表明, 甘草酸亦具有改善肾脏, 肠道, 下肢, 肝脏等缺血再灌注损伤的作用^[6-9]。另外还有研究表明, 甘草酸可减轻心肌缺血再灌注损伤^[10]。然而有关于甘草酸对心肌缺血再灌注损伤保护作用是否与 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 原癌基因 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X

蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 有关研究鲜见报道, 故此本研究采用结扎左冠状动脉前降支建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型, 探讨甘草酸对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。

1 材料

1.1 药物和试剂 甘草酸 (质量分数 $> 72.0\%$, 西安唐朝化工有限公司, 批号 20160316251); 水合氯醛 (上海市白鹤化工厂有限公司, 批号 161127); 肌酸激酶同工酶 (CK-MB), 乳酸脱氢酶 (LDH), 心肌钙蛋白-T (cTnT), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6 (IL-6), 髓过氧化物酶 (MPO), 超氧化物歧化酶 (SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px), 丙二醛 (MDA) 试剂盒 [上海晶抗生物工程有限公司, 批号分别为 JK-(a)-1611, JK-(a)-5027, JK-(a)-5828, JK-(a)-3602, JK-(a)-1498, JK-(a)-1753, JK-(a)-2056, JK-(a)-5138, JK-(a)-1520]; 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法 (TUNEL)

凋亡检测试剂盒(德国 Merck 公司,批号 QIA39);兔抗人 Bcl-2 多克隆抗和兔抗人 Bax 多克隆抗体(美国 Cell Signal 公司,批号分别为 2772S,2876S);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG II 抗(美国 Abbkine 公司,批号 A-08023);增强化学发光(ECL)试剂盒(美国 National Diagnostics 公司,批号 SGCL-300)。

1.2 仪器 BL-420S 型生物机能实验系统(合肥远明科技有限公司);HX-100E 小动物呼吸机(芜湖市一帆医疗器械商行);UV-3200PCS 紫外-可见分光光度计(合肥市科隆商贸有限责任公司);IX51 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Microfuge 20R 型高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);DYCP 31PN 型琼脂糖水平电泳仪(北京六一仪器厂);Trans-Blot Turbo 蛋白快速转膜仪,ChemiDoc XRS 蛋白成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物 健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,10~12 周龄,体质量(300 ± 50 g),由广东省医学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0002。动物实验的开展取得了海南医学院动物伦理委员会标准(编号 HNMC2014-112)。1 笼 5 只,自由饮水摄食,空调恒温室内 22 ℃,相对湿度 50%。适应性饲养 1 周。

1.4 甘草酸配制 精确量取甘草酸溶于生理盐水,50 ℃ 水浴加热直至其完全溶解,配制成 2, 4, 10 mg·kg⁻¹ 溶液,实验前现用现配。

2 方法

2.1 心肌缺血再灌注损伤模型建立^[11-12] SD 大鼠术前禁食 12 h,不禁水。称重后,以 10% 水合氯醛按 330 mg·kg⁻¹ 剂量腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定于实验台,四肢皮下连接电极,连接 BL-420S 生物机能实验系统,记录 II 导联心电图。颈部备皮,络合碘消毒皮肤。切开颈部,分离右侧颈动脉,行颈动脉置管,记录平均动脉血压。切开气管,行气管套管接 HX-100E 小动物呼吸机行机械通气(呼吸频率 60~70 次/min,潮气量 6~7 mL·min⁻¹)。经左前胸第 4,5 肋间逐层开胸,打开心包,使心脏充分暴露,在左心耳下 1~2 mm 处以 5-0 无损伤真丝线(在丝线与心肌间放 1 根约 1 cm 长细棉绳)穿过心脏表层(约 1.5 mm 深),结扎左冠状动脉前降支,引起心肌缺血,30 min 后松开结扎,使缺血冠脉再灌注 24 h。关闭胸腔关闭胸腔,逐层缝合肌肉,皮肤,术后腹腔注射青霉素 10 万单位预防感染。以缺血时局部心肌组织苍白或发绀,标准导联 II 导联 ST 段弓背上抬,T 波高耸表示造模成功;以心尖复红,ST 段回落

1/2 以上表示再灌注成功。剔除结扎前心电图不正常,造模不成功或未观察到观察终点而死亡大鼠。死亡大鼠随时补充,达到各组分组时的数量。

2.2 分组和给药 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组,手术方法与心肌缺血再灌注损伤模型建立相同,但是仅穿线不结扎左冠状动脉前降支,穿线前 30 min 腹腔注射 2 mg·kg⁻¹ 生理盐水;缺血再灌注损伤模型组,缺血前 30 min 腹腔注射 2 mg·kg⁻¹ 生理盐水;参照文献[10]和预实验结果,甘草酸预处理低、中、高剂量组,缺血前 30 min 分别腹腔注射 2, 4, 10 mg·kg⁻¹ 甘草酸,每组 10 只。

2.3 血清和标本采集 再灌注结束后,颈动脉采血 6 mL,室温下静置 30 min,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清,-70 ℃ 冰箱无菌环境下保存,用于血清指标检测。采血结束后,低温条件下迅速剪下心脏,0 ℃ 生理盐水洗净残血,分离左心室前壁左冠状动脉前降支中段左侧旁开 2 mm,距左冠状动脉前降支起始约 15~18 mm 处心肌,并分为 3 份。2 份分别用于病理组织学观察,TUNEL 法检测心肌细胞凋亡;另 1 份 -80 ℃ 迅速冻存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。

2.4 病理组织学观察 心肌以 4% 多聚甲醛溶液浸泡固定 12 h,常规石蜡包埋,徠卡冰冻切片间断均匀切片(2 μm)切片行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察心肌组织的病理学变化。

2.5 血清指标检测

2.5.1 血清心肌损伤标志酶 CK-MB 和 LDH 活性及 cTnT 水平检测 采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清 CK-MB 和 LDH 活性及 cTnT 水平,严格按照 ELISA 试剂盒的说明书进行操作。

2.5.2 血清心肌损伤炎症因子 TNF-α 和 IL-6 水平及 MPO 活性检测 采用 ELISA 法检测血清 TNF-α 和 IL-6 水平;采用比色法检测血清 MPO 活性。以上操作严格按照试剂盒的说明书进行。

2.5.3 血清氧自由基清除酶 SOD 和 GSH-Px 活性及脂质过氧化终末代谢产物 MDA 水平检测 采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性;采用比色法测定 GSH-Px 活性;采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 水平。以上操作严格按照试剂盒的说明书进行。

2.6 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 采用 TUNEL 凋亡检测试剂盒检测心肌细胞凋亡指数,严格按照试剂盒的说明书进行操作。荧光显微镜下观察每张切片荧光变化,未凋亡细胞(正常细胞)核发出蓝色荧光,凋亡细胞核和(或)细胞碎发出绿色荧光。随

机选取 10 个高倍视野 ($\times 200$), 记录每个视野内的绿色荧光及蓝色荧光心肌细胞核数, 并计算出凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数, 计算凋亡率。凋亡率 = (视野内凋亡细胞数/视野内心肌细胞总数) $\times 100\%$ 。

2.7 Western blot 分析检测心肌组织 Bcl-2 和 Bax 的表达 心肌组织加入 RIPA 裂解液匀浆后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 弃沉渣, 收集上清液, BCA 法测定总蛋白浓度。取蛋白 $50\ \mu\text{g}$ 上样后进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 电转膜仪转膜至 $0.45\ \mu\text{m}$ PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 $2\ \text{h}$ 。与兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体 ($1:500$), 兔抗人 Bax 多克隆抗体 ($1:500$) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, $1\times\ \text{TBS-T}$ 洗膜后加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗孵育 $2\ \text{h}$ 。以 GAPDH ($1:1\ 000$) 单克隆抗体重复上述实验过程, 作为内参对照。ECL 化学发光试剂显色。Chemidoc XRS 蛋白成像系统对各组条带进行计值及统计分析。

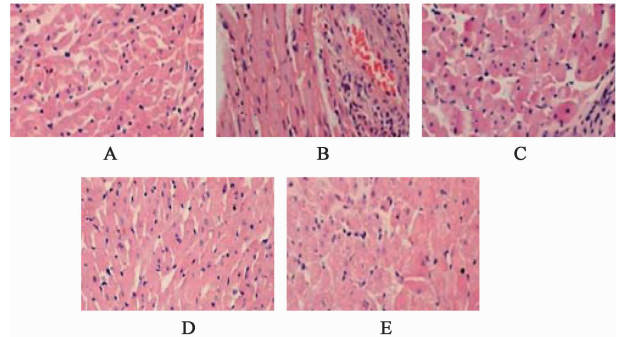
2.8 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件处理分析实验数据。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组数据符合正态分布, 方差齐时, 采用单因素方差分析, 组间两两比较, 采用 LSD 检验; 方差不齐时采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草酸对大鼠心肌组织病理组织学的影响

光学显微镜下观察心肌结构可见, 假手术组心肌润

盘清晰, 横纹清楚, 肌丝排列整齐, 未见明显的间质炎细胞浸润, 水肿; 模型组部分心肌细胞呈凝固性或带状坏, 间质炎细胞浸润, 水肿明显; 甘草酸低剂量组、中剂量组、高剂量组心肌横纹较为清楚, 间质炎细胞浸润, 水肿明显减轻。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 甘草酸低剂量组; D. 甘草酸中剂量组; E. 甘草酸高剂量组 (图 2~3 同)

图 1 甘草酸对大鼠心肌组织病理组织学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of glycyrrhizic acid on histopathologies of myocardial tissues in rats (HE, $\times 200$)

3.2 甘草酸对大鼠血清心肌损伤标志酶 CK-MB 和 LDH 活性及 cTnT 水平的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 CK-MB 和 LDH 活性及 cTnT 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 甘草酸低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠血清 CK-MB 和 LDH 活性及 cTnT 水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 甘草酸对大鼠血清 CK-MB, LDH 活性及 cTnT 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of glycyrrhizic acid on serum CK-MB and LDH activities and cTnT levels in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	CK-MB/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	cTnT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
假手术	-	$2\ 214.83\pm 129.92$	$1\ 430.86\pm 82.03$	0.121 ± 0.006
模型	-	$6\ 671.34\pm 385.26^{1)}$	$4\ 211.58\pm 241.42^{1)}$	$0.429\pm 0.025^{1)}$
甘草酸	2	$4\ 931.85\pm 283.41^{2)}$	$3\ 329.67\pm 190.96^{2)}$	$0.298\pm 0.016^{2)}$
	4	$4\ 536.62\pm 261.75^{2)}$	$2\ 797.14\pm 159.32^{3)}$	$0.247\pm 0.012^{3)}$
	10	$3\ 788.48\pm 218.34^{3)}$	$2\ 145.34\pm 122.70^{3)}$	$0.196\pm 0.010^{3)}$

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.3 甘草酸对各组大鼠血清心肌损伤炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平及 MPO 活性的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平及 MPO 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 甘草酸低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平及 MPO 活性显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.4 甘草酸对大鼠血清氧自由基清除酶 SOD 和 GSH-Px 活性及脂质过氧化终末代谢产物 MDA 水平

的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低, MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 甘草酸低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性显著升高, MDA 水平显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.5 甘草酸对大鼠心肌细胞凋亡的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 甘草酸低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠心肌细胞凋亡率显著降低

表 2 甘草酸对大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平及 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of glycyrrhizic acid on serum TNF- α and IL-6 levels and MPO activities in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	MPO/U·L ⁻¹
假手术	-	50.22 ± 2.90	68.07 ± 3.79	35.37 ± 1.94
模型	-	179.97 ± 10.07 ¹⁾	234.83 ± 13.57 ¹⁾	126.42 ± 7.15 ¹⁾
甘草酸	2	143.23 ± 8.35 ²⁾	170.18 ± 9.55 ²⁾	94.91 ± 5.42 ²⁾
	4	82.23 ± 4.82 ³⁾	128.15 ± 7.31 ³⁾	87.11 ± 5.05 ²⁾
	10	66.02 ± 3.75 ³⁾	98.62 ± 5.67 ³⁾	56.35 ± 3.17 ³⁾

表 3 甘草酸对大鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of glycyrrhizic acid on serum SOD and GSH-Px activities and MDA levels in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·L ⁻¹	GSH-Px/U·L ⁻¹	MDA/mol·L ⁻¹
假手术	-	262.81 ± 15.07	1.88 ± 0.11	2.87 ± 0.15
模型	-	143.22 ± 8.13 ¹⁾	1.21 ± 0.08 ¹⁾	8.24 ± 0.46 ¹⁾
甘草酸	2	198.07 ± 11.13 ²⁾	1.56 ± 0.09 ²⁾	6.57 ± 0.37 ²⁾
	4	216.86 ± 12.34 ³⁾	1.78 ± 0.10 ³⁾	6.13 ± 0.32 ²⁾
	10	237.98 ± 13.72 ³⁾	1.83 ± 0.11 ³⁾	4.72 ± 0.25 ³⁾

($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2 和表 4。

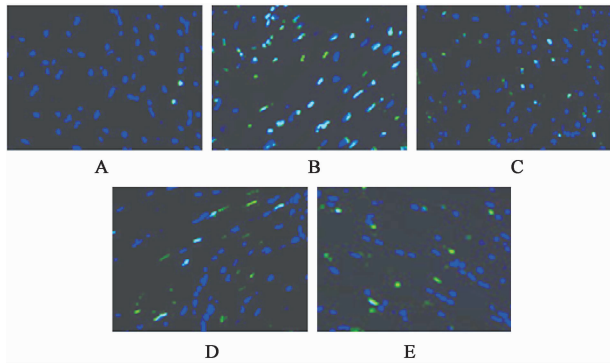


图 2 甘草酸对大鼠心肌细胞凋亡的影响 (TUNEL, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of glycyrrhizic acid on cardiomyocyte apoptosis in rats (TUNEL, $\times 200$)

表 4 甘草酸对大鼠心肌细胞凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of glycyrrhizic acid on cardiomyocyte apoptotic index in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	凋亡指数/%
假手术	-	4.24 ± 0.23
模型	-	39.71 ± 2.24 ¹⁾
甘草酸	2	18.03 ± 1.02 ³⁾
	4	15.31 ± 0.86 ³⁾
	10	14.99 ± 0.82 ³⁾

3.6 甘草酸对各组大鼠心肌凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠心肌抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调,促凋亡蛋白 Bax 表达显著上调,Bcl-2/Bax 显著下调 ($P <$

0.01);与模型组比较,甘草酸低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠心肌 Bcl-2 表达显著上调,Bax 表达显著下调,Bcl-2/Bax 显著上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3 和表 5。

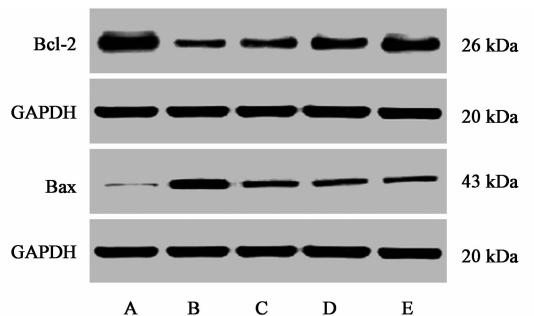


图 3 甘草酸对各组大鼠心肌 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达电泳

Fig. 3 Bcl-2 and Bax protein electrophoresis in myocardial tissues of rats

4 讨论

本研究发现,模型组大鼠,光镜下可见部分心肌细胞呈凝固性或带状坏,间质炎细胞浸润,水肿明显,以上改变提示心肌缺血再灌注损伤模型建立成功。同时,甘草酸低、中、高剂量组心肌横纹较为清楚,间质炎细胞浸润,水肿明显减轻。以上结果提示,甘草酸可能具有对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

心肌缺血早期的病理生理变化是心肌酶学指标的变化。心肌细胞坏死时,线粒体、细胞膜受到损伤,导致膜通透性增加,可以引起细胞膜完整性破坏和心肌标志酶的外漏。心肌损伤标志酶包括

表 5 甘草酸对大鼠心肌 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of glycyrrhizic acid on Bcl-2 and Bax expressions in myocardial tissues of rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/Bax
假手术	-	1.209 ± 0.068	0.154 ± 0.007	7.850 ± 0.459
模型	-	0.447 ± 0.024 ¹⁾	1.017 ± 0.056 ¹⁾	0.439 ± 0.022
甘草酸	2	0.626 ± 0.034 ²⁾	0.601 ± 0.032 ³⁾	1.041 ± 0.061 ³⁾
	4	0.796 ± 0.043 ³⁾	0.494 ± 0.026 ³⁾	1.146 ± 0.067 ³⁾
	10	0.877 ± 0.049 ³⁾	0.458 ± 0.024 ³⁾	1.914 ± 0.081 ³⁾

CK-MB, LDH 及 cTnT 等。CK-MB 具有心肌组织特异性,再灌注后 CK-MB 释放增多与心肌组织再灌注不良有关,被认为是诊断心肌坏死的“金标准”之一^[13]。LDH 是目前常用的心肌酶检测指标,其活性的升高也可间接反映心肌损伤程度。cTnT 作为心肌细胞所特有的一种调钙蛋白,具有高度的心肌特异性,在心肌细胞内分布且含量丰富,当心肌细胞时不断释放,在血液中异常时间可持续数周,其被美国和欧洲心脏协会一致评价为确诊急性心肌梗死的高特异性和高敏感性的血清学标志物,其血清水平升高提示心肌细胞坏死^[14-16]。本研究发现,甘草酸低、中、高剂量组大鼠血清 CK-MB 和 LDH 活性及 cTnT 水平显著降低。以上结果提示,甘草酸可能通过降低 CK-MB 和 LDH 活性及 cTnT 水平而发挥心肌缺血再灌注损伤的心肌保护作用。

当心肌缺血缺氧时,各种炎症细胞活跃和损伤炎症因子释放,引起心肌炎症损伤,从而进一步加重心肌缺血再灌注损伤。TNF- α 是心肌缺血再灌注损伤炎症连锁反应中的一个关键性介质,心肌细胞在缺血再灌注的刺激下可合成和分泌大量的 TNF- α ,可通过不同途径导致心肌细胞受损,甚至溶解,死亡^[17]。本研究发现,甘草酸低、中、高剂量组大鼠血清 TNF- α 水平显著降低。IL-6 处于炎症调控的枢纽位置,可诱导中性粒细胞内流入缺血心肌组织,损伤心肌^[18]。由于 MPO 是中性粒细胞中含量比较高的一种酶,所以检测 MPO 的活性可间接反映中性粒细胞浸润的数量及程度,其活性增高可以间接反映组织中存在炎症,所以,只要有中性粒细胞浸润的组织都能够通过 MPO 活性的测定来判定细胞浸润程^[19]。本研究发现,甘草酸低、中、高剂量组大鼠血清 IL-6 水平及 MPO 活性均显著降低,说明甘草酸可减轻心肌炎症细胞的浸润,结果与病理组织学观察相一致。以上结果提示,甘草酸可能通过降低 TNF- α 和 IL-6 水平及 MPO 活性,从而减轻炎症反应来发挥心肌缺血再灌注损伤的心肌保护作用。

当心肌血供中断,能量供应减少,包括 SOD, GSH-Px 等氧自由基清除酶系统功能会降低或丧失,导致氧自由基清除减少,生成增多。当恢复血供后,大量的氧自由基便会产生并过量堆积,从而又致脂质过氧化物的产生^[11]。MDA 是氧自由基引发的脂质过氧化终末代谢产物,其水平反映氧自由基的脂质过氧化程度与含量。因此,检测血清 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 水平可直接反映机体内清除氧自由基的能力。本研究发现,甘草酸低、中、高剂量组大鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性显著升高,MDA 水平显著降低。以上结果提示,甘草酸可能通过升高 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 水平,从而增强清除氧自由基的能力来发挥心肌缺血再灌注损伤的心肌保护作用。

再灌注后细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤发生的主要机制^[20]。本研究中,模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著高于假手术组,说明心肌细胞已经大量损伤,进一步说明模型建立成功。甘草酸低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠心肌细胞凋亡率显著较模型组降低。以上结果提示,甘草酸可抑制心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡。为探讨甘草酸抑制心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的可能机制,本研究对心肌 Bcl-2 和 Bax 表达进行了检测。Bcl-2 和 Bax 蛋白为常见的凋亡蛋白,Bcl-2 具有抑制细胞凋亡功能,而 Bax 具有促进细胞凋亡功能,细胞凋亡是否发生由 Bcl-2 与 Bax 决定,Bcl-2/Bax 是反映心肌生存能力的重要指标,即 Bcl-2 表达水平增加,Bcl-2/Bax 异二聚体比例增加,抑制细胞凋亡;Bax 蛋白水平增加时,Bcl-2/Bax 下降,产生 Bax/Bax 同二聚体,细胞凋亡发生^[21-23]。本研究发现,甘草酸低、中、高剂量组大鼠心肌 Bcl-2 表达显著上调,Bax 表达显著下调,上调 Bcl-2/Bax。以上结果提示,甘草酸上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达,从而抑制心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡,起到保护心肌细胞作用。

综上所述,甘草酸对大鼠心肌缺血再灌注损伤

具有保护作用,且能上调心肌 Bcl-2 表达和下调心肌 Bax 表达,从而抑制心肌细胞凋亡。

[参考文献]

[1] Díaz I, Calderón-Sánchez E, Toro R D, et al. miR-125a, miR-139 and miR-324 contribute to urocortin protection against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8898.

[2] Mauro A G, Mezzaroma E, Torrado J, et al. Reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting interleukin-1 alpha [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 69(3): 156-160.

[3] 韩瑶聃, 王彬, 王政雨, 等. 甘草酸药理作用的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(21): 2499-2505.

[4] Haleagrahara N, Varkkey J, Chakravarthi S. Cardioprotective effects of glycyrrhizic acid against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(10): 7100-7113.

[5] 朱丽华, 江洪, 王朗, 等. 甘草酸抗小鼠心肌肥厚及其可能机制的研究 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2012, 26(6): 535-538.

[6] Lau A, WANG S, LIU W, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates HMGB1-mediated cell death and inflammation after renal ischemia reperfusion injury [J]. *Am J Nephrol*, 2014, 40(1): 84-95.

[7] Di Paola R, Menegazzi M, Mazzon E. Protective effects of glycyrrhizic acid in a gut hypoxia (ischemia)-re-oxygenation (reperfusion) model [J]. *Intensive Care Med*, 2009, 35(4): 687-697.

[8] Nakata N, Takaoka K. Use of glycyrrhizin in prevention of tissue damage caused by ischemia-reperfusion in rabbit hind limbs [J]. *J Orthop Sci*, 2006, 11(4): 375-379.

[9] Mabuchi A, Wake K, Marlini M, et al. Protection by glycyrrhizin against warm ischemia-reperfusion-induced cellular injury and derangement of the microcirculatory blood flow in the rat liver [J]. *Microcirculation*, 2009, 16(4): 364-376.

[10] CAI X, WANG X, LI J, et al. Protective effect of glycyrrhizin on myocardial ischemia/reperfusion injury-induced oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammatory reactions through high-mobility group box 1 and mitogen-activated protein kinase expression

[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(2): 1219-1226.

[11] 李俊平, 郭丽丽, 陈中, 等. 丹莪片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(1): 95-100.

[12] 韩军, 宣佳利, 胡浩然, 等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(1): 118-123.

[13] Doganci S, Yildirim V, Bolcal C, et al. Sodium nitrite and cardioprotective effect in pig regional myocardial ischemia-reperfusion injury model [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2012, 21(6): 713-726.

[14] 惠勇, 徐雷. 白首乌 C21 甙苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国食物与营养*, 2015, 21(6): 68-71.

[15] 陈小君, 孟淑娟, 杨凯. cTnT, CK-MB, FIB 和 DD 联合检测在急性心肌梗死中的诊断价值 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(12): 1440-1441.

[16] 郭慧佳, 张建业, 胡亚军, 等. 高敏肌钙蛋白 T 与慢性心力衰竭的相关性及对急性心肌梗死的鉴别意义 [J]. *中国全科医学*, 2014, 17(8): 871-874.

[17] 徐丽, 张元媛, 曹军平. 芒果苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(2): 198-201.

[18] 邹吉丽, 尹照萍, 张利群, 等. 大鼠心肌缺血再灌注早期心肌及血清中 IL-6, TNF- α 的表达 [J]. *中国医科大学学报*, 2013, 42(9): 830-833.

[19] 郭庆军, 王桂敏, 张秀秀. 淫羊藿苷预处理对心肌缺血再灌注损伤炎症反应的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(11): 2034-2038.

[20] 赵雅君, 王艳丽, 杜丽娟, 等. 精胺预处理对离体灌流大鼠心肌缺血/再灌注损伤及细胞凋亡的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(8): 1135-1140.

[21] 蔡智慧, 任丽平. 栀子苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用 [J]. *中国公共卫生*, 2015, 12(31): 1619-1622.

[22] 赵润英, 郝伟, 孟祥军, 等. 阿魏酸川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(19): 230-234.

[23] 高玉峰, 王小杰, 闫文翠, 等. 生黄合剂对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13): 244-247.

[责任编辑 邹晓翠]