

# PBNA-413对心肌缺血/再灌注损伤大鼠凋亡相关蛋白及基因表达的影响

汪琪, 廖坚, 谢渭林, 许培华, 曾丽梅, 黄志华\*  
(赣南医学院, 江西赣州 341000)

**[摘要]** 目的:探讨拳参正丁醇提取物-413(Bistortae Rhizoma *n*-butyl alcohol extract, PBNA-413)对大鼠心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion, MI/R)细胞凋亡的影响。方法:将30只SD雄性大鼠随机分为5组,假手术组,MI/R模型组,PBNA-413低剂量组(0.1 mg·kg<sup>-1</sup>),PBNA-413中剂量组(0.3 mg·kg<sup>-1</sup>),PBNA-413高剂量组(1.0 mg·kg<sup>-1</sup>)。采用结扎左冠状动脉前降支40 min,恢复血流60 min,复制MI/R模型,记录肢体II导联心电图。采用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠心肌组织凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),Caspase-9 mRNA及蛋白表达。结果:大鼠心肌缺血后,模型组大鼠心电图ST段及T波较假手术组明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),PBNA-413处理后ST段及T波降低( $P < 0.01$ ),以中剂量和高剂量的效果好。与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织Bax,Caspase-3及Caspase-9蛋白表达升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),Bcl-2蛋白表达降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,PBNA-413中剂量组Bax及Caspase-3和Caspase-9蛋白表达降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),Bcl-2蛋白表达升高( $P < 0.01$ )。除Caspase-9外,Bax,Bcl-2和Caspase-3的基因水平出现与蛋白类似变化。结论:PBNA-413可能通过抑制细胞凋亡从而有效保护MI/R心肌。

**[关键词]** 拳参正丁醇提取物-413(PBNA-413); 心肌缺血/再灌注; 细胞凋亡; B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2); Bcl-2相关X蛋白(Bax); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3; Caspase-9

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5;R255 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0134-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180831

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1525.010.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-24 17:06

## Protective Effect of PBNA-413 on Myocardial Ischemia Reperfusion Rats by Inhibiting Apoptosis

WANG Qi, LIAO Jian, XIE Wei-lin, XU Pei-hua, ZENG Li-mei, HUANG Zhi-hua\*  
(Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Bistortae Rhizoma *n*-butyl alcohol extract (PBNA-413) on cardiocyte apoptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion (MI/R) injury. **Method:** Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: sham group, MI/R model groups, low-dose, middle-dose and high-dose (0.1, 0.3, 1.0 mg·kg<sup>-1</sup>) PBNA-413 treatment groups ( $n = 6$ ). The models of MI/R injury were established by ligating the left anterior descending coronary artery for 40 min and then reperusing for 60 min, and the electrocardiogram (ECG) was recorded. Western blot analysis and Real-time PCR were utilized to measure B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) and

**[收稿日期]** 20170925(024)

**[基金项目]** 江西省自然科学基金项目(20122BAB205039)

**[第一作者]** 汪琪,从事心脑血管疾病发病机制及药物干预研究,E-mail:2608372428@qq.com

**[通信作者]** \*黄志华,博士,教授,硕士生导师,从事心脑血管疾病发病机制及药物干预研究,Tel:0797-8169776, E-mail: gnyxyzhz@163.com

Caspase-9 mRNA and protein expressions in the ischemic and reperfusion region. **Result:** After myocardial ischemia, ECG ST-segment and T-wave in MI/R vehicle group were significantly higher than those in sham group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but they were significantly decreased in the PBNA-413 treatment groups ( $P < 0.01$ ), particularly in middle and high-dose groups. Compared with Sham group, protein and mRNA expressions of Bcl-2 ( $P < 0.01$ ) were decreased, while Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were increased in MI/R vehicle group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with MI/R vehicle group, the middle-dose PBNA-413 group showed an increased protein expression of Bcl-2 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but decreased expressions of Bax, Caspase-3 and Caspase-9 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Except for Caspase-9, mRNA expressions of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 showed similar changes with protein expressions. **Conclusion:** PBNA-413 may play a protective role against MI/R injury in rats by inhibiting cell apoptosis.

[**Key words**] Bistortae Rhizoma *n*-butyl alcohol extract (PBNA-413); myocardial ischemia/reperfusion; apoptosis; B-cell lymphoma-2 (Bcl-2); Bcl-2 associated X protein (Bax); cysteine aspartate protease (Caspase) -3; Caspase-9

心肌梗死是死亡率最高的心血管疾病之一。早期再灌注仍然是心肌梗死最有效的治疗方法。然而,随着药物溶栓、冠脉介入、冠脉搭桥等再灌注治疗技术的开展可引起缺血心肌的再灌注继发性损伤,即心肌缺血/再灌注(myocardial ischemia/reperfusion, MI/R)损伤<sup>[1]</sup>,MI/R的发生机制复杂,包括氧自由基、线粒体损伤、钙超载、细胞凋亡、细胞自噬、能量代谢障碍以及细胞膜间缝隙连接通道(gapjunction, GJ)的脱偶联等多种机制<sup>[2-3]</sup>。然而,目前疗效显著且多靶点作用的抗MI/R损伤的药物仍十分稀少。因此,寻找和研究有效的抗MI/R损伤的药物有着重大的社会和经济意义。

拳参,别名倒根草,为蓼科植物拳参 *Polygonum bistorta* 的干燥根茎,已报道具有清热镇惊、理湿消肿等功效<sup>[4]</sup>。拳参95%乙醇提取物主要成分有没食子酸、槲皮素、黄酮类化合物等。余生元等<sup>[5]</sup>和王刚等<sup>[6]</sup>采用体外细胞培养的方法,认为槲皮素能逆转胃癌组织P-糖蛋白的多药耐药,且其抗癌作用的分子机制涉及多方面;季风清等<sup>[7]</sup>实验显示槲皮素可通过抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)基因蛋白的表达来对急性缺血心肌其保护作用;张浩楠等<sup>[8]</sup>广枣抑制心肌缺血所致的豚鼠心律失常可能与没食子酸有关;黄酮类化合物对缺血/再灌注损伤心肌具有保护作用已有报道<sup>[9]</sup>。拳参正丁醇提取物(Bistortae Rhizoma *N*-butyl alcohol extract, PBNA-413)的主要成分为芦丁、儿茶素、丁香苷等<sup>[10]</sup>。芦丁、儿茶素具有抗自由基和抗脂质过氧化的作用已有报道<sup>[11-12]</sup>,丁香苷可通过提高环磷酸腺苷诱导的免疫低下小鼠非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫功能<sup>[13]</sup>。课题组多年来对PBNA的药理作

用进行了研究,发现其具有中枢抑制、镇痛和心脑血管保护等作用<sup>[14]</sup>。

课题组从PBNA的水溶性成分中分离出有效化合物,质谱分析其相对分子质量为413,含量在70%以上。前期研究发现PBNA-413可通过抑制脑缺血再灌注损伤后的炎症反应对脑缺血再灌注损伤起保护作用;对离体MI/R损伤也具有良好的心肌保护作用,其机制可能与抗氧化作用、血管活性物质有关<sup>[15-17]</sup>。研究表明,细胞凋亡在MI/R损伤发生发展中发挥非常关键的作用<sup>[18]</sup>,心肌细胞缺血再灌注损伤过程中氧自由基、线粒体损伤、钙超载、细胞自噬不足或过度等均可诱导细胞凋亡发生。鉴于课题组前期研究发现PBNA-413具有抗氧化作用<sup>[17]</sup>,推测PBNA-413可能通过抑制细胞凋亡途径对MI/R起保护作用。因此,本文采用结扎左冠状动脉前降支/再灌注方法,制备MI/R损伤模型,记录肢体II导联心电图,运用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)方法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡相关蛋白B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax), Caspase-3, Caspase-9 mRNA及蛋白表达,观察PBNA-413对MI/R的保护作用是否通过抑制细胞凋亡起效应,进一步为PBNA的临床应用提供坚实的科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性、健康清洁级SD大鼠30只,体重250~300g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2013-0004。所有动物实验已获赣南医学院伦理学委员会批准,动物实验程序均符合赣南医学院动物伦理委员会的指导方针,并努力减少实验动物使用数量。

**1.2 药物与试剂** PBNA-413 的获取参考文献[15-16],用双蒸水将 PBNA 溶解成  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的混悬液,  $0.22 \mu\text{m}$  的水性滤膜过滤,得到其水溶性部分,经测定其主要成分的相对分子质量为 413 的化合物,含量在 70% 以上。 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体, Caspase-9 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 4970S, 9508); Caspase-3 抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab44976); Bax 抗体, Bcl-2 抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号分别为 sc-526, sc-492); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔单克隆抗体(索莱宝公司,批号 RG000110-100); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔,山羊抗小鼠 IgG(H + L)(美国 Jason 公司,批号均为 115-035-003); 增强化学发光试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司,批号 34580); trizol<sup>®</sup> RNA 分离试剂,实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒(美国 Ambion Life Technologies 公司,批号分别为 15596018/117206, 4472908); 反转录试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司,批号 1501132)。

**1.3 仪器** BL-420F 型生物信号采集与分析系统(成都泰盟软件有限公司); DHX-300 型动物呼吸机(成都仪器厂); BS224S 型电子天平(北京赛多利斯公司); 153BR 垂直电泳槽, 041BR 电源, 552BR 型转膜装置, Universal Hood II 型超灵敏度化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 3001 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); QuantStudio 7 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** 雄性,健康清洁级 SD 大鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只,分别为假手术组, MI/R 模型组, PBNA-413 低( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 中( $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 高( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )剂量组。

**2.2 MI/R 损伤模型制备及给药** 动物模型制备参考文献[19],大鼠用 10% 水合氯醛( $350 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射全身麻醉后,气管插管进行人工呼吸,呼吸频率为 60 次/min,潮气量为  $40 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  体质量。在大鼠胸骨左缘 3~4 肋间行开胸术并剪开心包,找到冠状动脉左前降支,并在该血管起始部上放置 1 根细小塑料管(直径约 0.8 mm),通过用 4/0 丝线结扎血管使心肌缺血,40 min 后拔去塑料管实现再灌注并持续 60 min 来制备 MI/R 损伤模型,假手术组只穿线但不结扎,整个缺血及再灌过程,用 BL-420F 生物信号采集与分析系统连续记录标准肢体 II 导联心电图,结扎后出现

ST 段抬高或 T 波高耸、结扎线以下心肌变为暗红色则标志 MI/R 模型制备成功。PBNA-413 治疗组于结扎成功后,经舌下静脉分别注射 0.1, 0.3,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  PBNA-413(课题组前期预实验结果显示此浓度梯度效果较好),给药体积为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  体质量;假手术组及 MI/R 模型组注射等体积生理盐水。

**2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织凋亡相关蛋白表达** 实验结束后,取出心脏,经生理盐水洗净后,取冠状动脉左前降支结扎线以下血管支配部位的左心室组织 30 mg,提取组织蛋白,使用 BCA 法进行蛋白定量,取总蛋白 50  $\mu\text{g}$  加入上样缓冲液煮沸变性,经 SDS/PAGE 凝胶电泳,分离的目的蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(1:200)放置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰柜孵育过夜,二抗(1:1000)则于室温摇床上孵育 1 h,采用 ECL 化学发光法显色,使用 Image J 图像分析软件测定目的条带和  $\beta$ -actin 的灰度值,以  $\beta$ -actin 为内参照,计算目的蛋白相对表达量。将假手术组目的条带的相对表达量标化为 1,计算其他各组的变化位数。

**2.4 Real-time PCR 检测心肌组织凋亡相关基因表达** 取结扎线以下左心室组织 30 mg, trizol 法提取总 RNA,多功能酶标仪检测总 RNA 浓度及纯度,  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  在 1.8~2.0 说明样本纯度比较好。取总 RNA 4  $\mu\text{g}$ ,按试剂盒说明书操作加样,设置反应条件为 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 120 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min,待温度降至 4  $^{\circ}\text{C}$ ,完成反转录。特异性引物由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成(表 1)。

表 1  $\beta$ -actin, Caspase-3, Caspase-9, Bax 和 Bcl-2 的特异性引物序列

Table 1 Specific primer of  $\beta$ -actin, Caspase-3, Caspase-9, Bax and Bcl-2

基因名称	序列(5'-3')	产物长度/bp
$\beta$ -actin	上游 TGTGACGTTGACATCCGTAAGAC	243
	下游 GGACTCATCGTACTCTGCTTG	
Caspase-3	上游 GAACGAACGGACCTGTGGAC	259
	下游 AACCATGACCCGTCCTTG	
Caspase-9	上游 CTGTGGTGGTGAGCAGAAAGAC	228
	下游 CAGGAACCCGCTCTTCTGTCTC	
Bax	上游 TGTTGCCCTTTTCTACTTTG	207
	下游 CAGCCACAAAGATGGTCACTGTC	
Bcl-2	上游 CTGTGGATGACTGACTACCTGAACC	126
	下游 AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG	

按 (Real-time PCR) 试剂盒说明书操作进行处理。反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 共 1 个循环; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 25 s, 共 40 个循环。熔解曲线分析条件为 72 °C ~ 95 °C 每间隔 0.5 °C, 每个 10 s 进行检测。实验结束后, 按如下公式分析并整理数据,  $Folds = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ,  $-\Delta\Delta C_t = (C_{i1} - C_{i2}) - (C_{i3} - C_{i4})$  [ $C_{i1}$ , 待测基因的临界循环数,  $C_{i2}$ , 持家基因 ( $\beta$ -actin) 的临界循环数,  $C_{i3}$ , 假手术组待测基因的临界循环数,  $C_{i4}$ , 假手术组持家基因 ( $\beta$ -actin) 的临界循环数]。

**2.5 统计学分析** 应用 Prism5.0 统计学软件进行分析。心电图 T 波及 ST 段的数据采用双因素方差分析。Real-time PCR 数据采用单因素方差分析, 组

间比较采用 SNK 检验, 实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 PBNA-413 对 MI/R 大鼠心电图 ST 段及 T 波的影响** 大鼠冠状动脉左前降支结扎 40 min 后心电图 ST 段及 T 波明显抬高, 说明造模成功。大鼠冠状动脉左前降支结扎前、结扎后 20 min, 再灌注 10, 30, 60 min 后心电图 ST 段及 T 波明显抬高。0.1, 0.3, 1.0  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  PBNA-413 处理后心电图 ST 段及 T 波较模型组降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖性, 以 0.3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组的效果最好。因此, 以下选取 0.3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的 PBNA-413 进行以下实验。见表 2, 3。

表 2 PBNA-413 对 MI/R 大鼠标准 II 导联心电图 ST 段的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of PBNA-413 on ST-segment of standard II lead ECG in MI/R rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	结扎前	结扎 20 min	再灌注 10 min	再灌注 30 min	再灌注 60 min
假手术	-	0.16 ± 0.09	0.18 ± 0.05	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.04
模型	-	0.22 ± 0.02	0.37 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.29 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.27 ± 0.07 <sup>1)</sup>
PBNA-413	0.1	0.23 ± 0.10	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.08	0.23 ± 0.06	0.24 ± 0.04
	0.3	0.18 ± 0.03	0.21 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.18 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.18 ± 0.07 <sup>3)</sup>	0.14 ± 0.05 <sup>3)</sup>
	1.0	0.20 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.22 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.14 ± 0.02 <sup>3)</sup>

注: 与假手术组同期比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组同期比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 3 ~ 5 同)。

表 3 PBNA-413 对 MI/R 大鼠标准 II 导联心电图 T 波的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of PBNA-413 on T-wave of standard II lead ECG in MI/R rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	结扎前	结扎 20 min	再灌注 10 min	再灌注 30 min	再灌注 60 min
假手术	-	0.05 ± 0.08	0.14 ± 0.10	0.14 ± 0.04	0.11 ± 0.07	0.11 ± 0.06
模型	-	0.03 ± 0.03	0.34 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.26 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>1)</sup>
PBNA-413	0.1	0.07 ± 0.04	0.27 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.22 ± 0.06	0.23 ± 0.02	0.16 ± 0.03
	0.3	0.06 ± 0.02	0.13 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.13 ± 0.06 <sup>3)</sup>	0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.05 <sup>3)</sup>
	1.0	0.05 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.22 ± 0.06	0.16 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>3)</sup>

**3.2 PBNA-413 对 MI/R 大鼠心肌组织凋亡相关蛋白表达的影响** 与假手术组比较, MI/R 模型组大鼠心肌细胞内抑制凋亡的 Bcl-2 蛋白表达降低, 促凋亡相关蛋白 Bax, Caspase-3 和 Caspase-9 表达升高; 与 MI/R 模型组相比, 0.3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  PBNA-413 组 Bcl-2 表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Bax, Caspase-3 及 Caspase-9 表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1, 表 4。

**3.3 PBNA-413 对 MI/R 大鼠心肌组织凋亡相关基因表达的影响** 与假手术组比较, MI/R 模型组大鼠心肌细胞内抑制凋亡的基因 Bcl-2 表达降低, 促凋亡相关基因 Bax 和 Caspase-3 表达升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Caspase-9 表达无明显变化; 与 MI/R

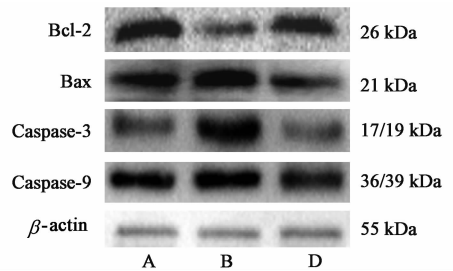


图 1 PBNA-413 对 MI/R 大鼠心肌组织凋亡相关蛋白表达电泳  
Fig. 1 Effect of PBNA-413 on expression of apoptosis-related proteins in MI/R rats

R 模型组相比, 0.3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  PBNA-413 组 Bcl-2 mRNA 表达升高, Bax 及 Caspase-3 mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 5。

表 4 PBNA-413 对 MI/R 大鼠心肌 Bax, Bcl-2, Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of PBNA-413 on protein expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in MI/R rats( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Caspase-3/ $\beta$ -actin	Caspase-9/ $\beta$ -actin
假手术	-	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0
模型	-	1.33 ± 0.33 <sup>1)</sup>	0.44 ± 0.21 <sup>2)</sup>	1.82 ± 0.70 <sup>2)</sup>	1.25 ± 0.27 <sup>1)</sup>
PBNA-413	0.3	0.79 ± 0.29 <sup>4)</sup>	0.81 ± 0.27 <sup>4)</sup>	0.67 ± 0.31 <sup>4)</sup>	0.86 ± 0.10 <sup>4)</sup>

表 5 PBNA-413 对 MI/R 大鼠心肌组织 Bax, Bcl-2, Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 5 Effect of PBNA-413 on mRNA expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in MI/R rats( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Bax	Bcl-2	Caspase-3	Caspase-9
假手术	-	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0
模型	-	1.53 ± 0.28 <sup>2)</sup>	0.92 ± 0.09	2.10 ± 0.90 <sup>1)</sup>	0.89 ± 0.05
PBNA-413	0.3	1.09 ± 0.12 <sup>4)</sup>	1.29 ± 0.24 <sup>3)</sup>	1.33 ± 0.32 <sup>3)</sup>	0.94 ± 0.13

#### 4 讨论

MI/R 损伤是一个复杂的过程,最终可导致细胞损伤和器官功能障碍,大量研究发现,MI/R 损伤机制复杂,细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤发病机制中的重要环节之一<sup>[20]</sup>,ZHU 等<sup>[21]</sup>研究表明全反式视黄酸可以通过减少心肌细胞凋亡来改善 MI/R 损伤;陈才等<sup>[22]</sup>研究表明,川陈皮素可通过上调蛋白激酶 B(Akt),Bcl-2 的表达,抑制 Bax 和 Caspase-3 的表达以及减轻氧化应激反应发挥心肌保护作用。因此,如果可以抑制心肌细胞凋亡,则可以在很大程度上降低 MI/R 引起的心脏损伤和功能障碍。

研究表明,中药对缺血再灌注心肌的保护作用显著,应用前景广阔<sup>[23]</sup>。本实验主要是研究 PBNA-413 后处理对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及机制,中药注射剂起效快,作用迅速,现较多学者通过静脉注射的方式给药<sup>[24-26]</sup>。PBNA 实验样品由沈阳药科大学植化教研室提供,其水溶性成分 PBNA-413 已有报道有较好的抗炎、抗氧化作用,而其能否通过抑制细胞凋亡途径对 MI/R 起保护作用未见报道。细胞凋亡是程序性细胞死亡的形式之一,是由多阶段、多因素和多基因严格控制的过程,有着非常复杂的调控机制,主要通过死亡受体介导和线粒体途径介导<sup>[21]</sup>,这两条通路介导的细胞凋亡最终都会激活 Caspase-3,活化的 Caspase-3 可导致细胞 DNA 修复功能丧失介导细胞死亡。Bcl-2 家族是与细胞凋亡调控密切相关的基因,包括抗凋亡成员(如 Bcl-2)和促凋亡成员(如 Bax),生理情况下,这两种蛋白处于相对平衡的状态,当受到死亡信号的刺激时,Bcl-2 蛋白表达降低,Bax 蛋白表达上调,导致线粒体膜通透性增高,通过级联反应激活下游凋亡效应

分子 Caspase-3,促使细胞凋亡<sup>[27-28]</sup>。WANG 等<sup>[29]</sup>研究发现,依他普仑降可通过降低大鼠 MI/R 期间 Bax mRNA 和蛋白表达,升高 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达,并使 Bax/Bcl-2 明显降低,从而对缺血心肌起保护作用。Bax 表达升高,并与 Bcl-2 结合形成同型二聚体抑制抗凋亡基因 Bcl-2 的作用刺激细胞凋亡;相反,当 Bcl-2 表达高时,Bcl-2 与 Bax 形成异二聚体,抑制 Bax 的促凋亡作用以抑制凋亡的发生<sup>[30]</sup>。大量研究已表明 MI/R 损伤机制复杂,氧自由基可引起细胞膜结构破坏,改变细胞膜的通透性使 Ca<sup>2+</sup> 内流增加,线粒体 Ca<sup>2+</sup> 超载导致细胞膜损伤,加重细胞能量代谢障碍,诱导细胞凋亡<sup>[31]</sup>,PBNA-413 可能通过抗炎、抗氧化作用发挥保护再灌注损伤心肌的作用。本研究结果显示,与假手术组相比,MI/R 模型组 Bax, Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达升高, Bcl-2 蛋白表达降低;与模型组相比, PBNA-413 中剂量(0.3 mg·kg<sup>-1</sup>)组 Bax 及 Caspase-3 和 Caspase-9 表达降低, Bcl-2 表达升高。除 Caspase-9 外, Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 的基因水平出现与蛋白类似变化,说明 PBNA-413 可能通过抑制细胞凋亡发挥心肌保护作用,其相关机制还有待于进一步研究。

#### [参考文献]

[1] WANG X L, YANG L, KANG L C, et al. Metformin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via up-regulation of antioxidant enzymes [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182777.  
 [2] 刘立亚,王慧晔,黄秀兰. 基于细胞自噬的苈草苷抗心肌缺血/再灌注损伤的机制研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 542-547.  
 [3] 丁士骞,梅举. 线粒体与心肌缺血/再灌注损伤的研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(1): 37-41.

- [4] 曾靖, 单热爱, 钟声, 等. 拳参水提取物镇痛作用的实验观察[J]. 中国临床康复, 2011, 9(6): 80-81.
- [5] 余生元, 董晓强, 黄世良, 等. 槲皮素对胃癌细胞多药耐药的逆转作用[J]. 江苏医药, 2004, 30(7): 510-512.
- [6] 王刚, 杜士明, 杨光义, 等. 槲皮素抗肿瘤的分子机制研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(4): 322-324.
- [7] 季凤清, 李宝红, 孙海梅, 等. 槲皮素对急性心肌缺血大鼠心肌 Caspase-3 基因蛋白表达的影响[J]. 首都医科大学学报, 2004, 25(4): 435-437.
- [8] 张浩楠, 杨玉梅, 邬国栋, 等. 蒙药广枣抗心律失常作用有效成分的分离[J]. 包头医学院学报, 2013, 29(3): 1-4.
- [9] 李红月, 陈超. 黄酮类化合物对心肌缺血再灌注损伤的作用研究进展[J]. 山东医药, 2010, 50(23): 115-116.
- [10] 刘晓秋, 李维维, 生可心, 等. 拳参正丁醇提取物的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(1): 15-17.
- [11] 王志东, 高峰. 芦丁对大鼠胃缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医药, 2015, 19(8): 1458-1461.
- [12] 刘珊珊, 刘宗文, 卢沛琦, 等. 儿茶素对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(2): 255-257.
- [13] 宋媛媛, 周越, 孙守兵, 等. 丁香苷对免疫功能低下小鼠的免疫调节作用[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 44-47.
- [14] 黄志华, 李良东, 韩立民. 拳参的心脑血管保护作用研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2013, 33(4): 625-627.
- [15] 李良东, 黄志华, 黎晓, 等. 拳参提取物 PBNA-413 对脑缺血再灌注损伤时脑水肿及炎性细胞因子的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(1): 30-31.
- [16] 黄志华, 李良东, 于江云, 等. 拳参提取物 PBNA-413 对离体心肌缺血再灌注时血管活性物质的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(6): 48-50.
- [17] 黄志华, 李良东, 黎晓, 等. PBNA-413 对离体心脏缺血再灌注损伤时抗氧化作用的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 378-380.
- [18] Gottlieb R A. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011, 16(3/4): 233-238.
- [19] 叶和杨, 黄志华, 汪秀荣, 等. 拳参正丁醇提取物保护大鼠心肌缺血再灌注损伤的剂量依赖性效应[J]. 中国临床康复, 2005, 9(39): 118-120.
- [20] 吴晓燕, 苗琳, 郑蕊, 等. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(11): 1043-1045, 1056.
- [21] ZHU Z, ZHU J, ZHAO X, et al. All-trans retinoic acid ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing cardiomyocyte apoptosis [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133414.
- [22] 陈才, 吴继雄, 王靓, 等. 川陈皮素后处理减轻心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(7): 944-950.
- [23] 李冀, 王秀珍, 李在斯, 等. 中药治疗心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中医药学报, 2015, 43(2): 107-109.
- [24] 张静, 马翠丽, 王志国. 黄芪甲苷对大鼠心肌局部缺血再灌注损伤的改善作用及其对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. 吉林大学学报:医学版, 2014, 40(5): 991-996, 1130.
- [25] 翟昌林. 甘草甜素对大鼠心肌缺血再灌注后的保护作用及其机制研究[D]. 济南:山东大学, 2013.
- [26] 孙帅军, 王新宇, 黄小玲, 等. 丹酚酸 B 对大鼠缺血心肌组织溶酶体功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(8): 1789-1791.
- [27] 李军, 石博, 黄可欣, 等. 葛根素对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达水平的影响[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(4): 631-633.
- [28] 夏勇, 丁汝跃, 李东野, 等. 螺内酯对缺血再灌注损伤时心肌细胞凋亡的影响[J]. 心肺血管病杂志, 2007, 26(4): 224-226, 238.
- [29] WANG Y, ZHANG H, CHAI F, et al. The effects of escitalopram on myocardial apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 during myocardial ischemia/reperfusion in a model of rats with depression [J]. BMC Psychiatry, 2014, 14(1): 349-355.
- [30] 魏建昌, 张通, 杨平, 等. 藤黄酸对人结肠癌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(11): 1745-1748.
- [31] 吴锦波, 吴平生. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 医学综述, 2011, 17(19): 2961-2963.

[责任编辑 全燕]