

稳心颗粒调控内质网应激途径抑制心梗大鼠心肌凋亡的机制

刘珂珂, 吕梦, 纪晓迪, 娄利霞, 赵一舟, 吴爱明*

(北京中医药大学东直门医院 中医内科学教育部和北京市重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨稳心颗粒对心梗大鼠内质网应激凋亡通路的影响及分子机制。方法:结扎左冠状动脉前降支建立心梗大鼠模型,术后随机分为假手术组,模型组,稳心颗粒低剂量组、高剂量组及倍他乐克组,每组10只,假手术组与模型组给予 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 去离子水灌胃,稳心颗粒低剂量及高剂量组分别给予 $1.35, 2.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 水溶液灌胃,倍他乐克组给予 $2.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 水溶液灌胃,治疗2周后,采用导管法检测心脏血流动力学,之后处死大鼠取材,苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠心肌组织病理形态的变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内质网应激蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78),蛋白激酶R样内质网激酶(PERK),磷酸化激活的PERK(p-PERK),活化转录因子6(ATF6),细胞核转录因子X盒结合蛋白(XBP1)和凋亡蛋白C/EBP同源蛋白(CHOP),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达变化,脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡。结果:与假手术组比较,模型组的左室内压最大上升速率(+dp/dt_{max}),下降速率(-dp/dt_{max}),左室收缩压(LVSP)明显降低($P<0.05$),左室终末舒张压(LVEDP)明显上升($P<0.05$),内质网应激蛋白GRP78, p-PERK, PERK, ATF6及XBP1表达均明显升高($P<0.05, P<0.01$),凋亡蛋白CHOP和Bax表达显著增高($P<0.01$),Bcl-2蛋白及Bcl-2/Bax显著降低($P<0.01$),凋亡指数显著增加($P<0.01$);与模型组比较,稳心颗粒低剂量组-dp/dt_{max}及Bcl-2蛋白表达明显增加($P<0.05$),心肌细胞凋亡指数显著降低($P<0.01$);稳心颗粒高剂量组+dp/dt_{max}与-dp/dt_{max}明显增加($P<0.05, P<0.01$),内质网应激通路蛋白GRP78, p-PERK, PERK, ATF6, XBP1及凋亡相关蛋白CHOP, Bax表达均显著降低($P<0.01$),Bcl-2蛋白及Bcl-2/Bax显著增加($P<0.01$),凋亡指数显著降低($P<0.01$)。结论:稳心颗粒可抑制过度的内质网应激,减少心肌细胞凋亡,进而改善心梗大鼠心脏血流动力学,其分子机制与下调GRP78, PERK, p-PERK, ATF6, XBP1表达,减少CHOP, Bax表达,增加Bcl-2表达有关。

[关键词] 稳心颗粒; 心肌梗死; 内质网应激; 凋亡

[中图分类号] R2-0;R289;R714.252 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0056-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210337

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20201202.1142.002.html>

[网络出版日期] 2020-12-2 15:10

Mechanism of Wenxin Granule Inhibits Myocardial Cell Apoptosis After Myocardial Infarction by Regulating Endoplasmic Reticulum Stress in Rats

LIU Ke-ke, LYU Meng, JI Xiao-di, LOU Li-xia, ZHAO Yi-zhou, WU Ai-ming*

(Dongzhimen Hospital, Ministry of Education and Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Internal Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the intervention effect of Wenxin granule on endoplasmic reticulum stress apoptosis pathway and its related mechanism in rats with myocardial infarction. **Method:** Ligating the left anterior descending coronary artery to establish the rat model, the rats were randomly divided into 5 groups, namely sham group, model group, betaloc group and low, high-dose Wenxin granule groups, 10 in each group. The sham group and the model group were given $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ deionized water, the low, high-dose modified

[收稿日期] 20200926(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673895);北京中医药大学杰出青年人才项目(BCUM-2019-JCRC008)

[第一作者] 刘珂珂,在读硕士,从事中医药防治心血管疾病应用基础研究工作, E-mail:zhizhierjing@163.com

[通信作者] *吴爱明,博士,副研究员,从事中医药防治心血管疾病应用基础研究工作, E-mail:wam688@163.com

Wenxin groups were given 1.35, 2.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ aqueous solution respectively, and the betaloc group was given 2.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ aqueous solution. After 14 days, the catheter method was used to detect the cardiac hemodynamics and hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe the pathological morphological changes. The levels of endoplasmic reticulum stress protein glucose regulatory protein 78 (GRP78), protein kinase R like endoplasmic reticulum kinase (PERK), phosphorylated activated PERK (p-PERK), activated transcription factor 6 (ATF6), nuclear transcription factor X cassette binding protein (XBP1) and apoptosis protein C/EBP homologous protein (CHOP), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) were detected by Western blot. Deoxyribonucleotide end-transferase-mediated notch end labeling (TUNEL) was also used to detect the myocardial cell apoptosis. **Result:** Compared with control group, the levels of the maximum ascending rate of left ventricular pressure (+dp/dt_{max}), the maximum descending rate of left ventricular pressure (-dp/dt_{max}) and the left ventricular systolic blood pressure (LVSP) were decreased significantly ($P<0.05$), but the level of the left ventricular end diastolic blood pressure (LVEDP) was significantly increased ($P<0.05$). The expressions of GRP78, p-PERK, PERK, ATF6, XBP1, CHOP, Bax and apoptosis index were increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), while Bcl-2/Bax and Bcl-2 were decreased significantly ($P<0.01$) in model group. Compared with the model group, the levels of -dp/dt_{max} and Bcl-2 were increased significantly ($P<0.05$), while the level of the apoptosis index was decreased significantly ($P<0.01$) in low-dose Wenxin granule group. In high-dose Wenxin granule group, the levels of +dp/dt_{max} and -dp/dt_{max} were increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$), the levels of endoplasmic reticulum stress pathway protein GRP78, p-PERK, PERK, ATF6, XBP1, apoptosis-related protein CHOP, Bax and apoptosis index were decreased significantly ($P<0.01$), but Bcl-2 and Bcl-2/Bax were increased significantly ($P<0.01$). **Conclusion:** Wenxin granule has effect in inhibiting excessive endoplasmic reticulum stress, reducing myocardial cell apoptosis and improving cardiac hemodynamics. Its molecular mechanism may be related to decrease the levels of GRP78, PERK, p-PERK, ATF6, XBP1, CHOP, Bax and increasing the expression of Bcl-2.

[Key words] Wenxin granule; myocardial infarction; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

心肌梗死是由冠状动脉急性、持续性缺血缺氧引起的心肌组织坏死,为致死致残的主要原因。我国心肌梗死的发病率和病死率逐年上升^[1]。最近研究表明,内质网应激参与了心肌梗死的发生发展过程,干预内质网应激有望为心肌梗死的防治提供新的治疗途径^[2]。

内质网应激是细胞受到内外因素刺激,内质网形态和功能遭受损害,导致蛋白质加工运输受阻,使大量未折叠或误折叠蛋白质滞留于内质网内,此时内质网会发生一系列应激反应,减少蛋白质合成,加速蛋白降解及促进内质网中辅助蛋白质折叠的分子伴侣表达,以缓解内质网的压力,促进其功能的恢复。然而,在心肌梗死这一疾病中,内质网应激往往是过度而持续的,当超过细胞自身的调节能力时,就会导致心肌细胞的凋亡,从而加重心脏的病理损伤和血流动力学的障碍。抑制过度的内质网应激有利于减轻心肌梗死后的心肌损伤和改善心功能^[3-5]。稳心颗粒由党参、三七粉、琥珀、甘松、黄精等组成,可用于心梗后心律失常的防治^[6-7]。

目前研究证实,稳心颗粒不仅能够通过调节各种离子通道(主要包括峰值钠电流)缩短QRS和QT间隔,改善心律失常的症状,减少房/室颤的发生率和室性心动过速的发作次数,而且对于心肌梗死后心肌组织的缺血损伤也有较好的治疗作用^[8-10]。稳心颗粒保护心肌和抗心律失常的作用与抑制炎症反应,降低氧化应激,调节血管舒缩功能紊乱,降低细胞凋亡并保护内皮细胞,改善心肌缺血、纤维化和心脏肥大有关^[8-11]。但稳心颗粒在改善心梗后病理损伤的具体机制尚未明确,而内质网应激可引发未折叠蛋白反应(UPR),活性氧(ROS)自由基爆发和钙超载等重要病理生理现象,是导致心梗后心肌病理损伤和凋亡加重,以及心脏血流动力学恶化的新机制。本研究建立心梗大鼠模型,以稳心颗粒进行干预治疗,旨在从内质网应激凋亡途径入手,探讨稳心颗粒对心梗大鼠心脏的保护机制,为进一步发现稳心颗粒的分子药理作用提供新的实验室依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠50只,6周龄,体质

量(180±20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号SCXK(京)2012-0001。饲养于北京中医药大学东直门医院屏障环境动物室。本动物实验经北京中医药大学东直门医院实验动物福利与伦理委员会批准(批准号17-12-01)。

1.2 药物及试剂 稳心颗粒由山东步长制药股份有限公司生产(国药准字Z10950026),药物组成为党参、三七粉、琥珀、甘松、黄精,5g/袋。酒石酸美托洛尔片(倍他乐克)由阿斯利康制药有限公司生产(国药准字H32025391),每片25mg。戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号C06818794);苏木素-伊红(HE)染色液(南京建成生物工程研究所,批号D006);蛋白激酶RNA样内质网激酶(PERK),磷酸化PERK(p-PERK)(美国CST公司,批号分别为3192s,3179s);激活转录因子6(ATF6),X盒结合蛋白1(XBP1)(英国Abcam公司,批号分别为ab203119,ab37152);葡萄糖调节蛋白78(GRP78),C/EBP同源蛋白(CHOP),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(美国Proteintech公司,批号分别为11587-1-AP,15204-1-AP,26593-1-AP,60267-1-Ig,60004-1-Ig);兔二抗,鼠二抗(北京兰博利德生物技术有限公司,批号分别为s0101-1,s0100-1)。

1.3 仪器 ALC-V8S型小动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);FX-7202型多道自动分析心电图机(北京福田电子医疗仪器有限公司);BL-420F型生物机能实验信号采集系统(成都泰盟软件有限公司);JA1003N型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);LF-mini3型电泳槽,LF-ZY01型电转槽(北京龙方科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备 参照文献[12]建立心肌梗死大鼠模型,首先用1%戊巴比妥钠(5mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠,然后仰卧位固定并经喉气管插管,于心前区第3,4肋间横向开胸,在肺动脉圆锥与左心耳下约2mm处用5/0手术线结扎左冠脉前降支,见左心室前壁缺血变白且心电图ST段抬高,而后逐层缝合关胸。术后24h心电图出现病理性Q波,提示结扎手术成功^[13-14]。假手术组平行操作,但不结扎。术后连续3d注射青霉素40U以防感染。

2.2 分组及给药 大鼠经适应性喂养1周后,进行心梗模型制备手术,以术中结扎左冠脉前降支心肌组织颜色迅速变白并且术后24h心电图检查有6~8个导联出现病理性Q波作为入组标准,随机分为模

型组,稳心颗粒低、高剂量组和倍他乐克组,另设假手术组,平行手术操作但不结扎左冠脉前降支,以不出现前述心肌颜色和心电图改变作为假手术组的入组标准,每组10只大鼠。术后次日开始灌胃给药。药物剂量换算参考《药理实验方法学》^[15],稳心颗粒按照人临床1日量换算成大鼠的等效剂量(约为人临床用量的6倍)作为低剂量组,低剂量组扩大1倍为高剂量组(约为人临床用量的12倍);倍他乐克采用等效剂量(约为人临床用量的6倍);模型组和假手术组每日给予等体积去离子水。各组大鼠给药2周后,先检测心脏血流动力学,然后取材进行后续分子生物学和病理指标检测。

2.3 导管法检测心脏血流动力学指标 给药2周后,使用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,仰卧位固定,颈部正中备皮,络合碘消毒及医用酒精脱碘,用眼科剪沿正中中线在颈部作4.0cm切口,钝性分离颈前肌群并暴露右颈总动脉,用棉线结扎右颈总动脉远心端并在近心端打一活结。用动脉夹夹住右颈总动脉近心端,使用虹膜剪在右颈总动脉上作1.5mm左右切口,随即左手持缠绕于近心端的棉线轻轻上提,右手持经肝素钠溶液灌注过的导管插入动脉并小心地向心脏方向推进直至导管进入左心室。信号稳定2min后,分别检测心率(HR),左心室收缩压(LVSP),左心室内压最大上升速率(+dp/dt_{max}),左心室内压最大下降速率(-dp/dt_{max}),左心室终末舒张压(LVEDP)。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 RIPA蛋白裂解法提取组织中的总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,根据测定结果调整所有蛋白样本使其为同一浓度,分装放于-20℃冰箱,并于2周内进行Western blot检测。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,随即湿转至硝酸纤维素膜上,5%的脱脂奶粉室温摇床封闭1h后,加入预先配置好的一抗4℃孵育过夜。一抗稀释比例GAPDH, XBP1, GRP78, ATF6, PERK, p-PERK, CHOP, Bcl-2, Bax分别为1:1万,1:300,1:2000,1:1000,1:1000,1:1000,1:500,1:500,1:5000。第2天, TBST洗膜后加入相应二抗,稀释比例均为1:5000,室温孵育1h, TBST清洗后ECL显色曝光得到蛋白条带。使用Image J进行条带分析,以目的蛋白/内参所得值,再与假手术组的均值的比值作为最终蛋白表达量。

2.5 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡 TUNEL染色按照

试剂盒说明书进行,充分脱蜡、水化后,于4%多聚甲醛中固定15 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,加入20 mg·L⁻¹蛋白酶K室温孵育10 min。平衡液室温平衡10 min,冰上配制反应液,37℃孵育60 min,终止液终止15 min并用PBS溶液冲洗以去除未加入的荧光素-12-dUTP,在心肌组织上滴一滴含DAPI的抗荧光衰减封片剂,用盖玻片封片。立即在荧光显微镜下进行图像采集,设置标准荧光素滤光片,观察荧光素在520 nm处表示凋亡核的绿色荧光以及在460 nm处的蓝色的全核。用Image J软件计数凋亡细胞核和正常细胞核的数目,计算凋亡百分率。

2.6 统计学方法 使用SPSS 23.0软件统计分析,

计量资料符合正态分布的采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD),符合正态分布,方差不齐的组间比较采用Dunnett T3法, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血流动力学的影响 与假手术组比较,模型组大鼠的 $+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$,LVSP均明显降低($P<0.05$),LVEDP明显上升($P<0.05$);与模型组比较,稳心颗粒低剂量组 $-dp/dt_{max}$ 明显增加($P<0.05$),稳心颗粒高剂量组大鼠 $+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$ 均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),其余指标差异无统计学意义,倍他乐克组 $+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$ 均明显增加($P<0.05$)。见表1。

表1 稳心颗粒对大鼠血流动力学的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

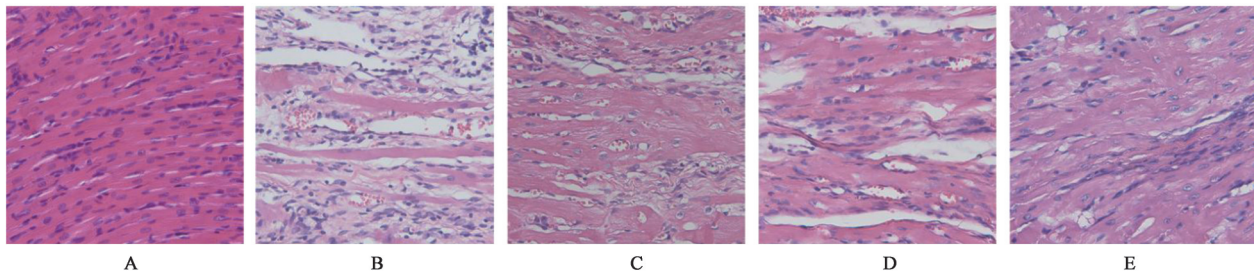
Table 1 Effect of Wenxin granule on hemodynamics in rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HR/次/分	+dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹	-dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹	LVSP/mmHg	LVEDP/mmHg
假手术		428.13±47.56	5 554.20±845.27	-4 358.83±815.30	143.74±4.07	2.68±2.01
模型		397.25±46.85	3 105.62±531.88 ¹⁾	-2 713.93±433.76 ¹⁾	116.10±18.23 ¹⁾	16.08±8.68 ¹⁾
稳心颗粒	1.35	415.38±28.13	3 612.82±335.65 ¹⁾	-3 340.30±483.35 ³⁾	138.46±18.63	11.24±5.56
	2.7	420.63±42.91	4 057.92±779.15 ³⁾	-3 463.13±524.60 ⁴⁾	135.90±11.59	8.72±8.74
倍他乐克	2.25×10 ⁻³	388.88±46.54	4 091.19±816.40 ³⁾	-3 292.54±390.93 ³⁾	134.57±14.38	9.99±7.77

注:1 mmHg≈0.133 kPa;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⁾ $P<0.01$ (表2~4同)。

3.2 对大鼠心肌组织病理变化的影响 假手术组心肌细胞形态规整,心肌纤维排列整齐,染色均匀,细胞核形态正常;与假手术组比较,模型组心肌组织

大面积坏死,出现空泡样变性及细胞溶解,细胞核固缩,残存心肌排列紊乱。与模型组比较,各给药组病理改变有所减轻。见图1。



A.假手术组;B.模型组;C.稳心颗粒低剂量组;D.稳心颗粒高剂量组;E.倍他乐克组(图2~4同)

图1 稳心颗粒对心肌梗大鼠心肌细胞形态的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Wenxin granule on morphology of rat cardiomyocytes(HE,×400)

3.3 对大鼠内质网应激通路蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组内质网应激蛋白GRP78, p-PERK, PERK, ATF6及XBP1蛋白表达均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,稳心颗粒低剂量组GRP78, p-PERK, PERK, ATF6及XBP1蛋白表达有降低趋势,但差异无统计学意义;稳心颗粒高剂量组的内质网应激通路GRP78, p-PERK, PERK, ATF6及XBP1蛋白表达均明显降低($P<0.05$);倍他

乐克组的内质网应激通路蛋白表达除GRP78无统计学差异外,其余蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。见图2,表2。

3.4 对大鼠凋亡相关蛋白CHOP, Bcl-2, Bax表达的影响 与假手术组比较,模型组凋亡蛋白CHOP和Bax蛋白表达显著增高($P<0.01$),Bcl-2蛋白表达及Bcl-2/Bax显著降低($P<0.01$);与模型组比较,稳心颗粒低剂量组Bcl-2蛋白表达明显增加($P<0.05$),

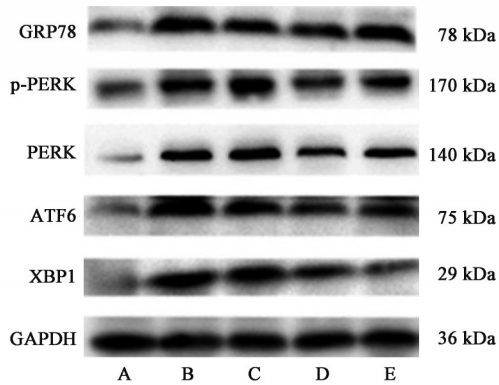


图2 大鼠内质网应激通路 GRP78, p-PERK, PERK, ATF6 及 XBPI 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of GRP78, p-PERK, PERK, ATF6 and XBPI protein in endoplasmic reticulum stress pathway in rats

稳心颗粒高剂量组 CHOP 和 Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 显著增加 ($P<0.01$), 倍他乐克组 CHOP 和 Bax 蛋白表达显著降低

表2 稳心颗粒对大鼠内质网应激通路 GRP78, p-PERK, PERK, ATF6 及 XBPI 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of Wenxin granule on GRP78, p-PERK, PERK, ATF6 and XBPI protein in endoplasmic reticulum stress pathway proteins in rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GRP78/GAPDH	p-PERK/GAPDH	PERK/GAPDH	ATF6/GAPDH	XBPI/GAPDH
假手术		1.00±0.24	1.00±0.25	1.00±0.34	1.00±0.39	1.00±0.34
模型		2.38±0.30 ²⁾	1.69±0.35 ¹⁾	2.82±0.61 ²⁾	3.10±1.09 ²⁾	3.52±0.90 ²⁾
稳心颗粒	1.35	1.96±0.64 ¹⁾	1.36±0.32	2.43±0.19 ²⁾	1.92±0.55	3.25±0.30 ²⁾
	2.7	1.31±0.50 ³⁾	1.11±0.24 ³⁾	1.89±0.35 ³⁾	1.62±0.62 ³⁾	2.40±0.20 ³⁾
倍他乐克	2.25×10 ⁻³	1.72±0.63	1.16±0.27 ³⁾	2.06±0.32 ³⁾	1.63±0.39 ³⁾	2.20±0.52 ³⁾

表3 稳心颗粒对大鼠凋亡通路 CHOP, Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Wenxin granule on CHOP, Bcl-2, Bax protein in apoptotic pathway proteins in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CHOP /GAPDH	Bax /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH	Bcl-2 /Bax
假手术		1.00±0.23	1.00±0.09	1.00±0.23	0.99±0.14
模型		1.88±0.08 ²⁾	3.24±0.48 ²⁾	0.33±0.05 ²⁾	0.10±0.02 ²⁾
稳心颗粒	1.35	1.64±0.17	2.95±0.52 ²⁾	0.55±0.07 ³⁾	0.19±0.03 ²⁾
	2.7	1.16±0.08 ⁴⁾	2.03±0.17 ⁴⁾	0.69±0.04 ⁴⁾	0.34±0.04 ⁴⁾
倍他乐克	2.25×10 ⁻³	1.20±0.16 ⁴⁾	1.15±0.14 ⁴⁾	0.31±0.06 ²⁾	0.27±0.02 ³⁾

4 讨论

心肌梗死是严重的心血管事件,往往可导致左心室舒张、收缩功能障碍,表现为心脏收缩力减弱,顺应性降低,收缩不协调,+dp/dt_{max}降低,LVEDP增高等^[16]。在中医看来,心梗的形成与气虚血瘀有着密切的关系,益气活血法可作为防治心梗的大法^[17]。稳心颗粒具有益气活血,养阴化痰,定悸复脉的功效,可以用于防治心梗减少心律失常的发

($P<0.01$), Bcl-2 表达与模型组比较,差异无统计学意义, Bcl-2/Bax 明显增加 ($P<0.05$)。见图3,表3。

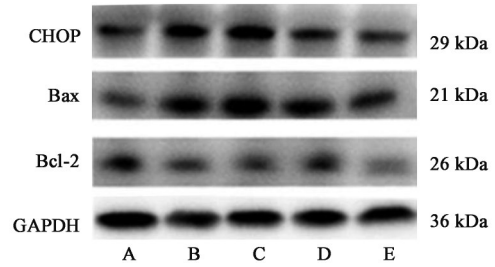


图3 大鼠凋亡通路 CHOP, Bcl-2, Bax 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of CHOP, Bcl-2, Bax protein in apoptotic pathway in rats

3.5 对大鼠心肌凋亡指数的影响 与假手术组比较,模型组大鼠心肌凋亡指数显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠心肌细胞凋亡指数均显著降低 ($P<0.01$)。见图4,表4。

生。以党参为君补中益气,生津养血,定惊悸;黄精补脾益气,滋阴,辅助党参益气生血为臣;琥珀活血散瘀,定惊安神,三七粉化瘀止血,活血定痛,两药共为佐药;使药甘松行气开郁醒脾,使君臣药补而不滞;诸药合用,可使心气充盈,心阴得补,且能疏通络脉,畅通气血,安定心神。现代研究也已表明,稳心颗粒包括人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Re, 三七皂苷 R₁ 等在内的数十种化合物对心脏有保护作用^[18]。本研究结果表明,与假手术组比较,模型组血流动力学指标明显异常,心肌组织病理损伤较重,与文献报道一致^[19]。与模型组比较,稳心颗粒低剂量组、高剂量组对心梗大鼠心脏血流动力学和心肌组织病理损伤有一定改善作用。为明确稳心颗粒上述心脏保护作用的分子机制,本研究进一步观察了内质网应激凋亡通路相关分子表达的变化。

内质网稳态的失衡是心肌梗死的主要病理基础之一。心梗导致缺氧、缺糖、三磷酸腺苷耗竭、钙超载等内外环境变化,引起内稳态失常,未折叠

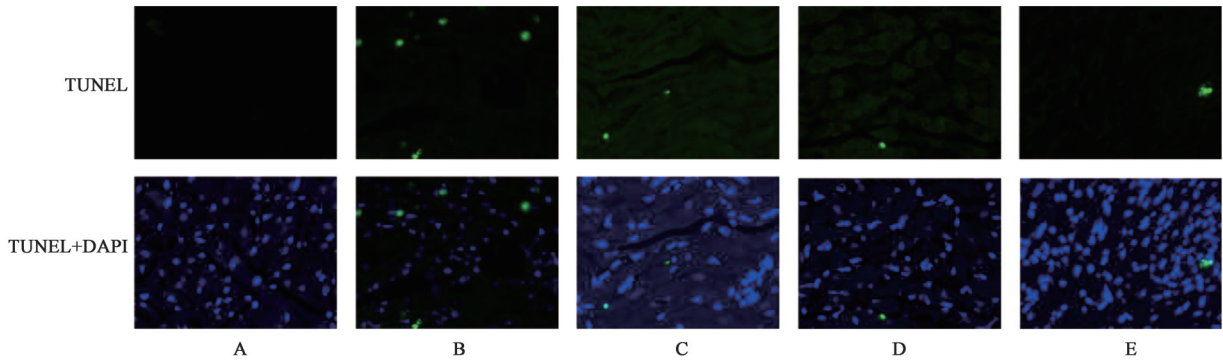


图4 稳心颗粒对大鼠心肌细胞凋亡指数的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 4 Effect of Wenxin granule on apoptosis index of myocardial cells in rats(fluorescence, ×400)

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

Table 4 Effect of Wenxin granule on apoptosis index of myocardial cells in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡率/%
假手术		0.16±0.16
模型		3.69±1.62 ²⁾
稳心颗粒	1.35	1.20±0.43 ⁴⁾
	2.7	1.06±0.64 ⁴⁾
倍他乐克	2.25×10 ⁻³	1.19±0.61 ⁴⁾

蛋白或错误折叠蛋白在内质网腔积聚,激活蛋白质质量控制对蛋白质的合成和降解做出适应性调整即UPR。UPR主要通过肌醇需要蛋白1(IRE1),PERK,ATF6 3条途径发挥生物学效应。内质网在生理状态下,GRP78与PERK,IRE1,ATF6结合在一起,形成稳定的复合物,处于无活性状态,限制相应下游信号的传递;当UPR发生时,GRP78与以上3个蛋白解离,与未折叠蛋白或误折叠蛋白结合,从而激活下游的级联反应,引起相关蛋白GRP78,PERK,ATF6,XBP1等的表达发生改变^[20-21]。需要指出的是,虽然短期内质网应激适度激活对细胞是有利的,此时GRP78可阻止新生蛋白向内质网的转运,减轻内质网的过负荷,促进内质网功能的恢复,从而发挥细胞保护作用^[22]。但是,随着心肌梗死病程的延长,内质网应激往往过强并且持续存在,这种长期严重的内质网应激就会启动下游凋亡信号,导致心肌损伤的加重^[23-24]。因此,在心肌梗死的中长期治疗中,抑制过度的内质网应激被认为是减轻心肌损伤的有效途径之一^[25]。本研究结果表明,心梗造模术后2周,与假手术组比较,模型组内质网应激蛋白GRP78,PERK,ATF6,XBP1及p-PERK表达均显著升高,说明心梗导致了内质网应激通路的过度激活,与文献报道一致^[26]。与模型组比较,稳心颗粒特别是高剂量组可降低上述蛋

白的表达,显著减轻内质网应激的水平。持续而严重的内质网应激势必会激活凋亡通路而加重心脏组织病理损伤。那么,稳心颗粒减轻内质网应激的过度激活是否能够发挥抗心肌凋亡的作用呢?为此,本研究进一步观察了凋亡通路的病理变化。

内质网在非应激状态下,凋亡蛋白CHOP表达水平较低,发生应激后,前述IRE1,PERK,ATF6 3条信号通路均可诱导CHOP的高表达,从而诱发凋亡。并且CHOP可诱导细胞Bcl-2家族相关蛋白的表达,最终激活细胞线粒体凋亡途径^[27-28]。有证据表明,内质网应激与线粒体凋亡通路的激活关系密切,内质网应激可刺激线粒体释放细胞色素C,从而启动线粒体凋亡通路,导致细胞凋亡的发生^[29]。并且Bcl-2家族在其中发挥了重要的调控作用^[30]。Bcl-2家族分为两大类,包括抗凋亡的Bcl-2,Bcl-XL,Bcl-W等以及促细胞凋亡的Bax,Bak,Bcl-XS等。在本研究中,心肌梗死后大鼠心肌组织促凋亡蛋白CHOP和Bax表达升高,抑凋亡蛋白Bcl-2表达水平降低,并且Bcl-2/Bax的下降,最终导致了心肌细胞凋亡指数的显著增加。而中药稳心颗粒可降低CHOP和Bax蛋白的表达,增加Bcl-2的表达水平,促使Bcl-2/Bax增大,从而在TUNEL染色中表现出显著的抗心肌细胞凋亡的效果。

综上所述,本研究从内质网应激凋亡通路探讨了稳心颗粒对心肌梗死大鼠的心脏保护作用。结果表明,稳心颗粒可抑制过度的内质网应激,减少心肌细胞凋亡进而改善心脏血流动力学,其分子机制与下调GRP78,PERK,p-PERK,ATF6,XBP1表达,减少CHOP,Bax表达,增加Bcl-2表达有关。

[参考文献]

[1] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global

- Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 394 (10204): 1145-1158.
- [2] GLEMBOTSKI C C, ROSARDA J D, WISEMAN R L. Proteostasis and beyond: aTF6 in ischemic disease [J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(6): 538-550.
- [3] WANG X, XU L, GILLETTE T G, et al. The unfolded protein response in ischemic heart disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 117: 19-25.
- [4] 王楷扬, 李小丽, 蔡永青. 内质网应激在心脏疾病中的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2019, 24 (11): 1310-1314.
- [5] 吉登仁, 齐永芬. 内质网应激与心血管疾病关系的研究进展 [J]. *生理学报*, 2020, 72(2): 190-204.
- [6] LI M, QIU R, TIAN G, et al. Wenxin Keli for Ventricular premature complexes with heart failure: a systematic review and Meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Complement Ther Med*, 2017, 33: 85-93.
- [7] HE M, LV Z, YANG Z W, et al. Efficacy and safety of Chinese herbal medicine Wenxin Keli for ventricular premature beats: a systematic review [J]. *Complement Ther Med*, 2016, 29: 181-189.
- [8] TIAN G, SUN Y, LIU S, et al. Therapeutic effects of Wenxin Keli in cardiovascular diseases: an experimental and mechanism overview [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1005.
- [9] WU A, ZHAI J, ZHANG D, et al. Effect of Wenxin granule on ventricular remodeling and myocardial apoptosis in rats with myocardial infarction [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 967986.
- [10] WANG X, WANG X, GU Y, et al. Wenxin Keli attenuates ischemia-induced ventricular arrhythmias in rats: involvement of L-type calcium and transient outward potassium currents [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7 (2): 519-524.
- [11] HUANG Y, WU A, LOU L, et al. Wenxin granules influence the TGF β -p38/JNK MAPK signaling pathway and attenuate the collagen deposition in the left ventricle of myocardial infarction rats [J]. *Cardiol Res Pract*, 2019, doi: 10. 1155/2019/3786024.
- [12] WU A, LOU L, ZHAI J, et al. miRNA expression profile and effect of Wenxin granule in rats with ligation-induced myocardial infarction [J]. *Int J Genomics*, 2017, doi: 10. 1155/2017/2175871.
- [13] 刘敏, 贾凯侠. 病理性Q波在心肌梗死患者冠状动脉改变诊断方面的效果 [J]. *检验医学与临床*, 2018, 15 (22): 3418-3421.
- [14] 王萍. 病理性Q波对冠状动脉多支血管病变的诊断价值 [J]. *中国继续医学教育*, 2018, 10(4): 94-95.
- [15] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-203.
- [16] 李忠思, 张小娜, 王锦群, 等. 活心丸对心肌组织力学特性和血流动力学的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 1999(3): 3-5.
- [17] 李冀, 李想, 曹明明. 中医益气活血法治疗心系疾病 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(2): 1-4.
- [18] LIU H, CHEN X, ZHAO X, et al. Screening and identification of cardioprotective compounds from Wenxin Keli by activity index approach and *in vivo* zebrafish model [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1288.
- [19] CHEN H, LOU L, ZHANG D, et al. Qiliqiangxin capsule improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling by upregulating miR-133a after myocardial infarction in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, doi: 10. 1155/2019/7528214.
- [20] BERGMANN T J, MOLINARI M. Three branches to rule them all? UPR signalling in response to chemically versus misfolded proteins-induced ER stress [J]. *Biol Cell*, 2018, 110(9): 197-204.
- [21] ALMANZA A, CARLESSO A, CHINTHA C, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications [J]. *FEBS J*, 2019, 286(2): 241-278.
- [22] HARDY B, RAITER A. Peptide-binding heat shock protein GRP78 protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2010, 88 (11): 1157-1167.
- [23] 陈鹏, 杨成明, 曾春雨, 等. 心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织内质网应激相关凋亡途径的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(6): 1069-1074.
- [24] ZHANG G, WANG X, GILLETTE T G, et al. Unfolded protein response as a therapeutic target in cardiovascular disease [J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(21): 1902-1917.
- [25] WANG X, XU L, GILLETTE T G, et al. The unfolded protein response in ischemic heart disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 117: 19-25.
- [26] 王晶晶, 张杰, 卢静. 内质网应激对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌组织的作用 [J]. *实验动物科学*, 2018, 35(2): 6-10.
- [27] IURLARO R, MUNOZ-PINEDO C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *FEBS J*, 2016, 283(14): 2640-2652.
- [28] JEON M Y, MIN K J, WOO S M, et al. Maritoclax enhances TRAIL-induced apoptosis via CHOP-mediated upregulation of DR5 and miR-708-mediated downregulation of cFLIP [J]. *Molecules*, 2018, 23(11).
- [29] DENIAUD A, SHARAF E D O, MAILLIER E, et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, 27(3): 285-299.
- [30] SZEGEZDI E, MACDONALD D C, NI C 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 孙丛丛]