

# 丹酚酸 B 对脓毒症大鼠心肌损伤的保护作用

刘晓龙, 崔子林, 李阳, 张雅敏\*  
(天津市第一中心医院, 天津 300192)

**[摘要]** **目的:**探讨丹酚酸 B(salvianolic acid B, Sal-B)对脓毒症大鼠心肌损伤的作用及机制。**方法:**将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组(行盲肠结扎穿孔术复制脓毒症动物模型),Sal-B 组低、中、高剂量组(在模型基础上,经尾静脉注射 Sal-B 6,12,24 mg·kg<sup>-1</sup>)。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测心肌坏死标志物和炎症因子,包括血清肌钙蛋白 T(TnT),肌酸激酶同工酶(CK-MB),心肌肌钙蛋白 I(cTnI)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ,IL-6 水平;比色法检测心肌中超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)的含量;采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组心肌组织病理变化;采用原位末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡情况;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌组织中凋亡相关蛋白半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和自噬微管相关蛋白轻链 3(LC3),Beclin-1 表达水平。**结果:**与假手术组比较,模型组 TnT,CK-MB 和 cTnI 水平显著升高( $P < 0.01$ );心肌组织 TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-6 水平显著升高( $P < 0.01$ );心肌组织 MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ ),SOD 的活力显著降低( $P < 0.01$ ),TUNEL 阳性心肌细胞比率显著升高( $P < 0.01$ ),Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平升高,而 Bcl-2 表达显著降低( $P < 0.01$ ),自噬相关蛋白 LC3,Beclin-1 表达水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,Sal-B 中、高剂量组 TnT,CK-MB 和 cTnI 水平均显著降低( $P < 0.01$ ),心肌组织 TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ ,IL-6 水平显著降低( $P < 0.01$ ),心肌组织 MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),同时,心肌组织 SOD 的活性明显升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );TUNEL 阳性心肌细胞比率明显降低( $P < 0.05$ ),Bax 和 Caspase-3 蛋白表达下降,Bcl-2 表达明显升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );同时增强自噬反应,LC3 II/LC3 I 增加,Beclin-1 表达水平明显上调( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。**结论:**Sal-B 通过影响自噬蛋白,降低脓毒症大鼠心肌炎症反应和氧化应激,抑制心肌细胞凋亡,从而减轻脓毒症大鼠心肌的损伤。

**[关键词]** 丹酚酸 B; 脓毒症; 心肌损伤; 保护作用; 自噬

**[中图分类号]** R285.5;R541;R392.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0112-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191337

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190318.1357.006.html>

**[网络出版时间]** 2019-03-19 16:06

## Protective Effect of Salvianolic Acid B on Myocardial Injury in Septic Rats

LIU Xiao-long, CUI Zi-lin, LI Yang, ZHANG Ya-min\*  
(Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of salvianolic acid B (Sal-B) on the myocardial apoptosis in rats with sepsis. **Method:** The 50 male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group (cecal ligation and perforation were performed to replicate the animal model of sepsis) and Sal-B low, medium and high-dose group (6, 12, 24 mg·kg<sup>-1</sup>). The myocardial necrosis markers troponin T (TnT), cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase-MB (CK-MB) and the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) activities and malonaldehyde (MDA) levels in myocardial homogenates were determined by spectrophotometrically. Haematoxylin-eosin (HE) staining was used to evaluate the pathological change in rats. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) was

**[收稿日期]** 20181208(004)

**[第一作者]** 刘晓龙, 硕士, 主治医师, 从事肝胆外科及心血管研究, E-mail:3166425349@qq.com

**[通信作者]** \*张雅敏, 博士, 主任医师, 从事肝再生与保护研究, E-mail:zhangyamin@126.com

used to detect apoptosis of myocardial cells in hearts, respectively. Western blot was used to detect the expression levels of apoptosis-related protein cysteine protease-3 (Caspase-3), b-lymphocytoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (Bax), autophagy microtubule-related light chain 3 (LC3) and Beclin-1 in myocardial tissue. **Result:** Compared with sham group, the levels of TnT, CK-MB and cTnI in model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in myocardial tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ). MDA content in myocardial tissue was significantly increased ( $P < 0.01$ ), SOD activity in myocardial tissue was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the ratio of TUNEL positive myocardial cells was significantly increased ( $P < 0.01$ ), Bax and Caspase-3 protein expression levels were significantly increased, while Bcl-2 expression was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), autophagy related protein LC3 and Beclin-1 expression levels were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the levels of TnT, CK-MB and cTnI in Sal-B medium and high-dose groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 in the myocardial tissue were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), MDA content in myocardial tissue was significantly decreased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and the SOD activity in myocardial tissue was significantly increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The ratio of TUNEL positive cardiomyocytes was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), Bax and Caspase-3 protein expressions were decreased, and Bcl-2 expression was significantly increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The autophagy response was enhanced, the LC3 II/LC3 I ratio was increased, and Beclin-1 expression was significantly up-regulated ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Sal-B showed a protective effect on the myocardial apoptosis in septic rats maybe by depressing inflammatory infiltration, anti-oxidative effects and improving the exceptional expression of the proteins such as Bax, Bcl-2, Caspases-3 by enhancing the level of autophagy.

[**Key words**] salviolic acid B; sepsis; myocardium injury; protect effect; autophagy

脓毒症指各种致病微生物侵入机体致感染后引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。SIRS 可能由严重烧伤,局部缺血再灌注,严重出血和某些外科手术引起<sup>[1]</sup>。患者人数每年超过 3 千万,死亡率约为 30%,无疑是当今最紧迫的医疗需求之一<sup>[2]</sup>。脓毒症幸存者表现出更高的再住院率和更严重的情况<sup>[3]</sup>,无法控制的炎症反应和难治性免疫抑制被认为是脓症患者预后不良的主要原因<sup>[4]</sup>。在脓毒症早期就有心肌的器质性损伤,心肌损伤发生越早,进行性恶化的程度越重,病死率就越高,早发的心肌损伤常常是难治性休克的先兆,死亡率会明显增加<sup>[5]</sup>。加强对脓毒症心功能障碍的防治具有重要的临床意义。据报道,自噬活性的上调可以影响免疫细胞的炎症反应和存活以及功能,并且通过改善器官功能障碍和改善结局显示出巨大的益处。自噬的抑制或缺陷导致免疫细胞功能障碍和耗竭,随后免疫力受到干扰,脓毒症的死亡率增加<sup>[6-7]</sup>,表明自噬可能是脓毒症的有效治疗靶点。

丹参是最重要的传统草药之一,已被广泛用于治疗冠状动脉疾病和其他心血管疾病,包括心绞痛和心肌梗死<sup>[8-9]</sup>。丹酚酸 B(Sal-B)是主要的丹参水溶性成分,是丹参中具有生物活性含量最丰富的

成分<sup>[10]</sup>。文献表明,Sal-B 具有许多全植物丹参药物的生物活性,如镇静作用,抗氧化作用,保肝作用,抗纤维化作用<sup>[11-12]</sup>,及调节自噬的作用<sup>[13-14]</sup>。尽管 Sal-B 对冠状动脉疾病和其他心血管疾病有明显的保护作用,但其在脓毒症的心脏保护作用迄今为止还很少被提及。本研究探讨 Sal-B 在脓毒症动物模型中对炎症因子的影响,以及其调节自噬相关蛋白发挥心肌保护作用的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 48 只雄性清洁级 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,饲养于定湿、定温的动物室内,由河北医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(冀)2017-0006。饲养和实验遵守河北医科大学实验动物管理和使用规定,并遵守中国实验动物管理条例。

**1.2 药物及试剂** Sal-B(上海融禾医药科技发展有限公司,纯度 >98%,批号 170715);原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(美国 Roche 公司,批号 20160805);兔抗鼠自噬微管相关蛋白轻链 3(LC3) I/II, B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 20173070, 20173407, 20174674, 20179165);兔抗鼠 Beclin-1 抗体,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国

Abcam 公司,批号分别为 170906,171123);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(美国 Sigma 公司,批号 D8417);Dy Light 488 绿色荧光二抗(美国 Santa Cruz 公司,批号 1712102241);BSA 封闭液,DAB 显色试剂盒,TBST 缓冲液,枸橼酸盐缓冲液,苏木素-伊红(HE)染色液(北京索莱宝生物技术有限公司,批号分别为 20170425,20170656,20171479,20171421,20160311);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ),白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(大连凡邦生物科技有限公司,批号分别为 20161112,20161014,20161123);超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20171220,20171101);血清肌酸激酶同工酶(CK-MB),血清肌钙蛋白 T(TnT)和心肌肌钙蛋白 I(cTnI)ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程技术有限公司,批号分别为 171204,171026,17920)。

**1.3 仪器** RM2235 型切片机,EG1160 型一体式石蜡包埋机,DM4B/DM6B 型荧光显微镜(德国 Leica 公司);Image-Pro Plus 6.0 病理图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司);ESP-300 型电泳仪(上海天能科技有限公司);1704150 全能型蛋白快速转膜仪(国美 Bio-Rad 公司);ELX800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);L400 型湘仪离心机(湖南湘仪有限公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备及分组** 48 只雄性 SD 大鼠实验前自由饮水,禁食 12 h。将大鼠随机分为假手术组、模型组和 Sal-B 低、中、高剂量组。模型组参照盲肠结扎加穿孔法制备脓毒症模型,术后大鼠出现竖毛、精神萎靡、出现呼吸急促,尿液浓缩、浑浊等症状表明造模成功<sup>[15]</sup>。假手术组只开腹,不行盲肠结扎和穿孔,给予组在模型组术后 2 h,尾静脉分别注射 Sal-B 6,12,24 mg·kg<sup>-1</sup>。假手术组、模型组术后腹腔注射同等量生理盐水。术后 24 h 腹主动脉无菌取血,分离血清。无菌取出所有实验大鼠心脏,留取左室心肌组织并分成 2 份,用液氮迅速冷冻后置于 -80 °C 冰箱保存。

**2.2 ELISA 检测心肌损伤指标** 将各组大鼠腹主动脉血装入离心管,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 后,取血清置于 1.5 mL 离心管中。采用 ELISA 检测 CK-MB,cTnI 和 TnT 水平。

**2.3 ELISA 检测心肌组织中相关炎症因子** 制备

心肌组织匀浆 5 mL,4 °C,5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,吸取上清,按照试剂盒说明书,采用 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL- $1\beta$  水平。

**2.4 比色法检测心肌组织抗氧化能力** 取各大鼠左室心肌组织 0.2 g,用预冷生理盐水制备组织匀浆,按照试剂盒说明测定心肌组织 MDA 含量和 SOD 活性。

**2.5 HE 染色观察心肌组织病理变化** 大鼠处死后立即开胸留取心脏左室组织标本,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、脱水、连续切片,HE 染色,显微镜下观察心肌组织病理变化。

**2.6 TUNEL 检测心肌细胞凋亡** 组织切片脱蜡后,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 次;TUNEL 和 DAPI 共染色,检测心肌细胞凋亡发生情况<sup>[16]</sup>。每张切片随机观察 3 个高倍镜( $\times 400$ )视野,计算心肌细胞凋亡数和心肌细胞总数,两者比值 $\times 100\%$ 为凋亡细胞百分率。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达** 收集各组心肌组织,PBS 洗 2 次,用蛋白裂解液在冰上研磨提取蛋白,离心(4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min),取上测定蛋白浓度,配平各组蛋白浓度,蛋白变性,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后将分离的蛋白转至 PVDF 膜上,5% BSA 稀释的 Bcl-2, Bax, Caspase-3, LC3 I, LC3 II, Beclin-1 (1:1 000) 4 °C 冰箱过夜,TBST 洗涤后,将膜转入杂交袋,室温孵育相对应的二抗(1:5 000)2 h,TBST 洗膜后,ECL 系统显影,通过图像分析软件计算目标蛋白与  $\beta$ -actin 蛋白灰度比值,实验重复 3 次。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组数据采用单因素方差 One-way ANOVA,方差齐组间多重比较采用 LSD 法, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对大鼠心肌损伤标志物水平的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠血清中 CK-MB,cTnI,TnT 水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,Sal-B 高剂量组的 CK-MB,cTnI,TnT 水平显著下降( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 对大鼠心肌炎症因子 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL- $1\beta$  的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织中 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL- $1\beta$  水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,Sal-B 中、高剂量组中 TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL- $1\beta$  水平显著降低( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 对大鼠心肌组织 SOD 和 MDA 的影响** 与

表 1 Sal-B 对脓毒症大鼠血清中心肌损伤标志物水平影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Effect of Sal-B on level of myocardial injury markers in serum of septic rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	n	CK-MB	cTnI	TnT
假手术	-	7	384.6 ± 23.4	0.42 ± 0.04	6.17 ± 1.31
模型	-	6	1 452.7 ± 136.2 <sup>1)</sup>	3.46 ± 0.11 <sup>1)</sup>	11.38 ± 1.12 <sup>1)</sup>
Sal-B	6	6	1 346.0 ± 213.4	3.17 ± 0.42	10.25 ± 2.16
	12	8	624.2 ± 45.9 <sup>3)</sup>	2.16 ± 0.08 <sup>3)</sup>	7.03 ± 2.51 <sup>3)</sup>
	24	6	738.9 ± 241.5 <sup>3)</sup>	2.07 ± 0.12 <sup>3)</sup>	6.59 ± 1.43 <sup>3)</sup>

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

表 2 Sal-B 对脓毒症大鼠心肌炎症因子水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Effect of Sal-B on inflammatory factors in septic rats( $\bar{x} \pm s$ )

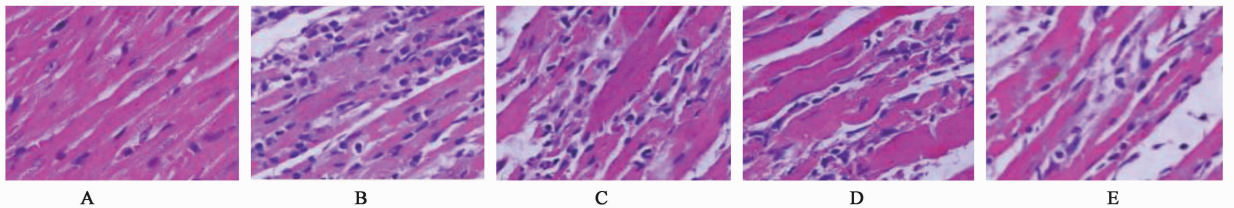
组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	n	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
假手术	-	7	294.6 ± 10.4	452.8 ± 19.2	134.1 ± 24.3
模型	-	6	1 053.8 ± 64.7 <sup>1)</sup>	1 600.0 ± 82.4 <sup>1)</sup>	364.3 ± 32.6 <sup>1)</sup>
Sal-B	6	6	986.4 ± 131.6	3 934.0 ± 241.8	343.8 ± 59.7
	12	8	656.2 ± 25.9 <sup>3)</sup>	2 461.0 ± 57.3 <sup>3)</sup>	205.3 ± 15.5 <sup>3)</sup>
	24	6	632.7 ± 86.1 <sup>3)</sup>	2 318.3 ± 146.2 <sup>3)</sup>	189.5 ± 46.1 <sup>3)</sup>

假手术组大鼠比较,模型组大鼠心肌组织 MDA 含量升高,而 SOD 的水平显著降低( $P < 0.01$ ),说明模型动物氧化应激水平高于正常;经 Sal-B 预处理后,与模型组大鼠比较,Sal-B 中、高剂量组大鼠心肌组织 SOD 水平明显升高,MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 Sal-B 对脓毒症大鼠心肌抗氧化能力的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Effect of Sal-B on myocardial antioxidant capacity in septic rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	n	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/mmol·g <sup>-1</sup>
假手术	-	7	30.16 ± 2.96	3.05 ± 0.44
模型	-	6	18.48 ± 3.58 <sup>1)</sup>	5.84 ± 1.24 <sup>1)</sup>
Sal-B	6	6	20.37 ± 4.62	5.16 ± 0.89
	12	8	22.49 ± 5.87 <sup>2)</sup>	4.68 ± 1.03 <sup>2)</sup>
	24	6	25.32 ± 4.61 <sup>3)</sup>	3.91 ± 0.76 <sup>3)</sup>

3.4 对大鼠心肌组织病理改变的影响 假手术组大鼠心肌横纹清晰,细胞排列整齐,无明显核肿胀和炎症细胞浸润;模型组心肌纤维排列紊乱,出现水肿和核膜破裂、炎症细胞浸润明显;Sal-B 不同剂量组心肌细胞胞核大小均匀,心肌纤维未见明显肿胀,偶见心肌炎症浸润,心肌肌纤维破坏减轻。见图 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C~E. Sal-B 低、中、高剂量组(图 2~4 同)

图 1 Sal-B 对脓毒症大鼠心肌组织形态影响(HE, ×400)

Fig.1 Effect of Sal-B on myocardial morphology in septic rats(HE, ×400)

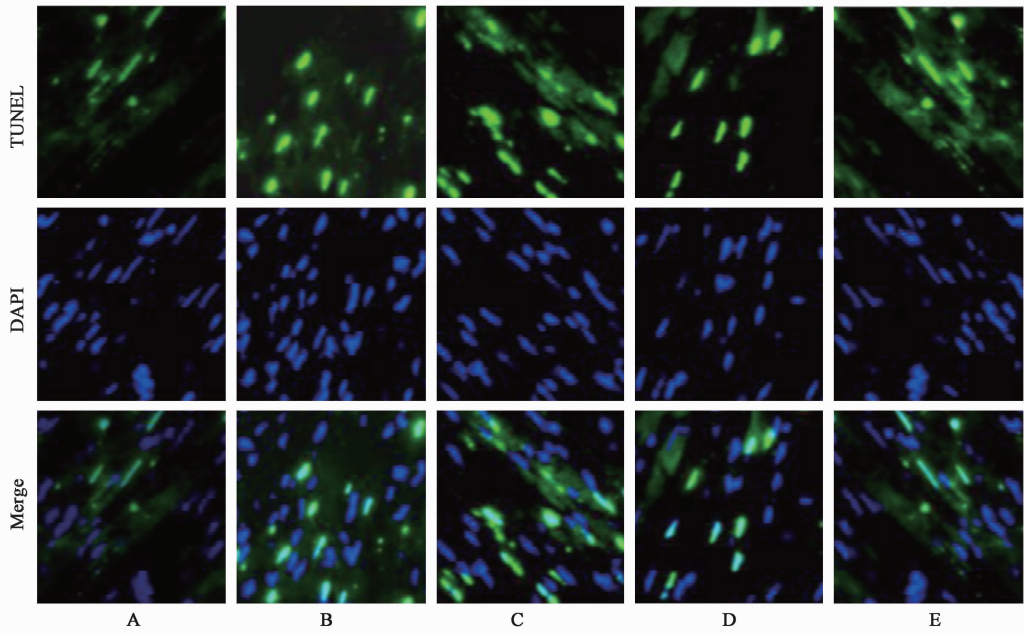
3.5 对大鼠心肌细胞凋亡影响 TUNEL 染色阳性细胞呈绿色荧光,与假手术组比较,模型组 TUNEL 阳性率显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,Sal-B 不同剂量组 TUNEL 阳性率均显著降低( $P < 0.01$ )。凋亡蛋白结果显示,与假手术组相比,模型组心肌细胞的 Bax 及 Caspase-3 的蛋白水平显著上升( $P < 0.01$ ),Bcl-2 的蛋白水平明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,Sal-B 不同剂量组可使上述 3 种蛋白水平有明显改善( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2,3,表 4。

3.6 对大鼠自噬相关蛋白表达水平的影响 与假手术组比较,模型组 LC3 II/LC3 I 及 Beclin-1 蛋白

表达显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,Sal-B 中、高剂量组 LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 蛋白均明显增加( $P < 0.05$ )。见图 4,表 5。

#### 4 讨论

50% 的严重脓毒症患者会出现不同程度的心肌抑制,脓毒症诱导的心肌损伤为心脏整体但可逆的功能障碍。但是不能及时有效地治疗,则导致患者病死率更高。脓毒症心肌损伤的发病机制复杂,涉及炎症介质失调、氧化应激、线粒体功能障碍、钙调节紊乱、自主神经系统失调和内皮功能障碍等<sup>[17]</sup>。脓毒症患者机体与外来微生物发生免疫反应可产生多种炎症因子,主要有 TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$  和 IL-6。由于



绿色为 TUNEL 染色,代表凋亡细胞核;蓝色为 DAPI 染色。

图 2 Sal-B 对脓毒症大鼠心肌凋亡影响(荧光显微镜, ×400)

Fig. 2 Effect of Sal-B on myocardial apoptosis in septic rats(fluorescence microscope, ×400)

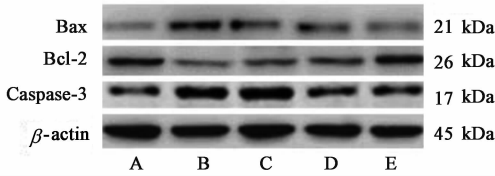


图 3 脓毒症大鼠凋亡蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of Sal-B of apoptotic proteins in septic rats

炎症因子和自由基等损害,细胞膜通透性增加,心肌内肌钙蛋白裂解并释放到血液中,导致肌钙蛋白水平升高<sup>[18]</sup>。研究已证实丹酚酸 Sal-B 具有抗炎活性,可以抑制 Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子-κB (NF-κB)/TNF-α 通路来发挥心肌细胞损伤的保护作用<sup>[19]</sup>。Sal-B 下调 NF-κB,环氧合酶-2 和诱导型一氧化氮合成以及核因子的上调来阻止高脂肪饮食

表 4 Sal-B 对脓毒症大鼠心肌凋亡影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Sal-B on myocardial apoptosis in septic rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TUNEL/β-actin	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	Caspase-3/β-actin
假手术	-	2.13 ± 0.24	0.07 ± 0.01	0.42 ± 0.04	0.21 ± 0.03
模型	-	24.64 ± 5.03 <sup>1)</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.89 ± 0.04 <sup>1)</sup>
Sal-B	6	23.74 ± 6.15	0.18 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.19 ± 0.03	0.88 ± 0.05
	12	14.22 ± 2.61 <sup>3)</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>3)</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.62 ± 0.05 <sup>2)</sup>
	24	12.48 ± 3.17 <sup>3)</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>3)</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>3)</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>2)</sup>

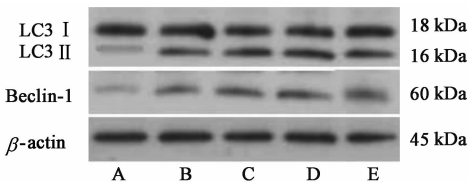


图 4 脓毒症大鼠自噬蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of Sal-B on autophagy in septic rats

表 5 Sal-B 对脓毒症大鼠自噬蛋白影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Sal-B on autophagy protein in septic rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	LC3 II/LC3 I	Beclin-1/β-actin
假手术	-	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.02
模型	-	0.58 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>1)</sup>
Sal-B	6	0.79 ± 0.18	0.25 ± 0.03
	12	0.92 ± 0.21 <sup>2)</sup>	0.32 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	24	0.82 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>2)</sup>

诱导的小鼠炎症<sup>[20]</sup>。本研究结果表明, Sal-B 可以降低脓毒症大鼠肌钙蛋白水平, 组织中炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平, 表明 Sal-B 可以通过降低心肌组织中炎症因子的水平发挥抗炎作用, 从而发挥保护心脏的作用。

脓毒症心肌损伤的治疗过程中, 加强抗氧化应激治疗有助于改善患者心功能, 提高临床疗效。SOD 是存在于细胞内的天然抗氧化剂, 能清除超氧阴离子、自由基, 其活性间接反映机体清除自由基的能力。MDA 是脂质过氧化的产物, 可以间接反映细胞损伤的程度<sup>[21]</sup>。文献报道, Sal-B 抑制过氧化反应和提高心肌细胞抗氧化能力<sup>[22]</sup>。本研究结果发现, 在 Sal-B 治疗, 治疗组大鼠心肌组织中 MDA 水平明显低于模型组, SOD 活性高于模型组, 提示 Sal-B 能抑制脓毒症大鼠体内氧自由基的释放, 增强抗氧化应激的能力。同时光镜下可见 Sal-B 组心肌组织炎性细胞浸润降低、心肌纤维波浪样改变等病理损害有所改善, 说明 Sal-B 能够减轻心肌损伤与其抗氧化应激能力有关。

脓毒症在其发生和发展的过程中, 心肌组织多出现缺血缺氧性改变, 最终因心肌细胞的凋亡、坏死影响心功能<sup>[23]</sup>。研究表明, 多种抑癌基因和促癌基因的异常表达均可导致心肌凋亡, 如 Bax, Bcl-2, Caspases 蛋白酶以及 Fas 等<sup>[24]</sup>。TUNEL 检测显示, Sal-B 可以减少脓毒症大鼠心肌细胞凋亡率; 同时在脓毒症大鼠心肌组织中, 抑癌基因 Bcl-2 的蛋白表达水平下降, 而促癌基因如 Bax 和 caspases-3 蛋白表达水平升高, 而 Sal-B 干预可以使上述蛋白表达水平部分恢复, 表明 Sal-B 有抗脓毒症大鼠心肌组织细胞凋亡的作用。

自噬是真核细胞中由溶酶体介导的细胞对自身结构的吞噬降解过程, 通过隔绝和降解损伤的细胞器和受损的蛋白质, 快速响应以应对损伤<sup>[25]</sup>。这个过程由一系列自噬相关基因组成, 如 Beclin-1 和 LC3 是评估自噬过程的蛋白标志物<sup>[26]</sup>。LC3 参与了自噬小体膜的形成, 包括 LC3 I 和 LC3 II 两种形式蛋白, 两者可相互转化。其中 LC3 I 广泛分布在胞质内, 经泛素化修饰后与自噬小体膜表面的磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3 II, LC3 II/LC3 I 与自噬小体的数量成正相关, 在一定程度上可反映细胞的自噬活性<sup>[27]</sup>。自噬在脓毒症发作后即开始, 并且由某些细菌, 细菌毒素如脂多糖和促炎细胞因子诱导<sup>[28]</sup>。已经证明, 自噬对感染性脓毒症的多种器官和系统具有保护作用, 涉及心脏, 肝脏, 肺, 肾, 脑和

凝血系统<sup>[29]</sup>。例如, 肝功能障碍表现为广泛的肝细胞凋亡和脓毒症期间血清转氨酶水平升高, 这可以通过自噬激活来逆转<sup>[30]</sup>。自噬可以调节脓毒症心肌细胞凋亡, 主要通过清除受损蛋白质和细胞器, 修复 DNA 损伤、激活 p62/Keap1/核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 信号通路等缓解氧化应激, 延缓细胞死亡。而自噬过程被阻断时, 加剧氧化应激<sup>[31]</sup>。由此可见, 自噬诱导构成的细胞器稳态可能成为改善脓毒症的有效靶点<sup>[32]</sup>。文献报道, Sal-B 是一种新型自噬诱导剂, 可以发挥心脏保护作用<sup>[33]</sup>。为了探索 Sal-B 抗脓毒症对自噬过程是否促进作用, 我们检测 Sal-B 对发脓毒症大鼠心肌自噬生物标志物影响。结果显示脓毒症大鼠心肌组织 LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 表达增高, 提示脓毒症时自噬水平增加; Sal-B 治疗使肺组织 LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 表达进一步增高, 表明 Sal-B 可上调大鼠心肌组织自噬水平。

总之, Sal-B 可降低脓毒症大鼠的心肌凋亡水平, 可能与其具有抗炎、抗氧化应激, 调节脓毒症大鼠凋亡蛋白的表达并促进自噬有关。

#### [参考文献]

- [1] Balk R A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? [J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 20-26.
- [2] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari N K, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. current estimates and limitations [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259-272.
- [3] Prescott H C, Dickson R P, Rogers M A M, et al. Hospitalization type and subsequent severe sepsis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(5): 581-588.
- [4] Hotchkiss R S, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(12): 862-874.
- [5] 李健, 张俭. 川芎嗪对脓毒症大鼠心肌抑制干预作用的研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(3): 263-265.
- [6] Chih-Wen L, Steven L, Chin H, et al. T-cell autophagy deficiency increases mortality and suppresses immune responses after sepsis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102066.
- [7] Oami T, Watanabe E, Hatano M, et al. Suppression of T cell autophagy results in decreased viability and function of T cells through accelerated apoptosis in a murine sepsis model [J]. *Crit Care Med*, 2017, 45(1):

- e77-e85.
- [ 8 ] HE H B, SHI M Q, YANG X Z, et al. Comparison of cardioprotective effects using salvianolic acid B and benazepril for the treatment of chronic myocardial infarction in rats [ J ]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009, 380(1) : 95.
- [ 9 ] JIANG B, CHEN J, XU L, et al. Salvianolic acid B functioned as a competitive inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and efficiently prevented cardiac remodeling [ J ]. *BMC Pharmacol*, 2010, 25(10) : 10.
- [ 10 ] PAN C S, LIU Y H, LIU Y Y, et al. Salvianolic acid B ameliorates lipopolysaccharide-induced albumin leakage from rat mesenteric venules through Src-regulated transcellular pathway and paracellular pathway [ J ]. *PLoS One*, 2015, 19, 10(5) : e0126640.
- [ 11 ] LIN Y L, WU C H, LUO M H, et al. *In vitro* protective effects of salvianolic acid B on primary hepatocytes and hepatic stellate cells [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105(1/2) : 215-222.
- [ 12 ] YANG M C, YOU F L, WANG Z, et al. Salvianolic acid B improves the disruption of high glucose-mediated brain microvascular endothelial cells via the ROS/HIF-1 $\alpha$ /VEGF and miR-200b/VEGF signaling pathways [ J ]. *Neurosci Lett*, 2016, 630 : 233-240.
- [ 13 ] ZHAO J, FEI W, ZHOU J, et al. Salvianolic acid B, a novel autophagy inducer, exerts antitumor activity as a single agent in colorectal cancer cells [ J ]. *Oncotarget*, 2016, 7(38) : 61509-61519.
- [ 14 ] ZHANG J Q, WU X H, FENG Y, et al. Salvianolic acid B ameliorates depressive-like behaviors in chronic mild stress-treated mice; involvement of the neuroinflammatory pathway [ J ]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(9) : 1141-1153.
- [ 15 ] 王丛, 梁群. 化纤胶囊对脓毒症大鼠凝血功能的影响 [ J ]. *中国中医急症*, 2018, 27(12) : 2086-2088.
- [ 16 ] 刘咏梅, 孙秀玲, 刘瑞华, 等. 三七总皂苷调控 miRNA-466b 抑制急性心梗大鼠心肌细胞凋亡的研究 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22) : 6-10.
- [ 17 ] 张二飞, 赵晓英, 张莉, 等. 脓毒症引起心肌病的研究进展 [ J ]. *中国心血管杂志*, 2018, 23(5) : 433-436.
- [ 18 ] van Bockel E A, Tulleken J E, Muller K A C, et al. Cardiac troponin I release and cytokine response during experimental human endotoxaemia [ J ]. *Intensive Care Med*, 2003, 29(9) : 1598-1600.
- [ 19 ] 林超, 刘兆国, 钱星, 等. 丹酚酸 B 在心血管疾病中药理作用研究进展 [ J ]. *中国药理学通报*, 2015, 31(4) : 449-452.
- [ 20 ] WANG B, SUN J, SHI Y, et al. Salvianolic acid B inhibits high-fat diet-induced inflammation by activating the Nrf2 pathway [ J ]. *J Food Sci*, 2017, 82(8) : 1953-1960.
- [ 21 ] 褚永果, 齐洪娜, 张建军, 等. 严重脓毒症心肌损伤患者应用舒血宁治疗前后早期心肌损伤指标及氧化应激水平的变化 [ J ]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(6) : 804-809.
- [ 22 ] 陈雪, 沈楠, 安英, 等. 丹酚酸 B 对氧化应激损伤乳鼠心肌细胞的保护作用及其机制 [ J ]. *吉林大学学报: 医学版*, 2018, 44(5) : 974-978.
- [ 23 ] Gotts J E, Matthay M A. Sepsis: pathophysiology and clinical management [ J ]. *BMJ*, 2016, doi: 10.1136/bmj.i1585.
- [ 24 ] 王军, 张虹, 谢凤杰, 等. 甘草酸预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及 Bel-2 和 Bax 表达的影响 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6) : 126-132.
- [ 25 ] Mizumura K, Cloonan S, Choi M E, et al. Autophagy: friend or foe in lung disease [ J ]. *Ann Am Thorac Soc*, 2016, 13(Suppl 1) : S40-S47.
- [ 26 ] DENG Z, Purtell K, Lachance V, et al. Autophagy receptors and neurodegenerative diseases [ J ]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(7) : 491-504.
- [ 27 ] Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, et al. Regulation of autophagy by NF $\kappa$ B transcription factor and reactive oxygen species [ J ]. *Autophagy*, 2007, 3(4) : 390-392.
- [ 28 ] Piquereau J, Godin R, Deschênes S, et al. Protective role of PARK2/Parkin in sepsis-induced cardiac contractile and mitochondrial dysfunction [ J ]. *Autophagy*, 2013, 9(11) : 1837-1851.
- [ 29 ] Dancourt J, Melia T J. Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process [ J ]. *Autophagy*, 2014, 10(8) : 1470-1471.
- [ 30 ] Cho H I, Kim S J, Choi J W, et al. Genipin alleviates sepsis-induced liver injury by restoring autophagy [ J ]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(6) : 980-991.
- [ 31 ] Filomeni G, de Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs [ J ]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3) : 377-388.
- [ 32 ] CHANG A L, Ulrich A, Suliman H B, et al. Redox regulation of mitophagy in the lung during murine *Staphylococcus aureus* sepsis [ J ]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 1(78) : 179-189.
- [ 33 ] LIN C, LIU Z, YING L, et al. Cardioprotective effect of Salvianolic acid B on acute myocardial infarction by promoting autophagy and neovascularization and inhibiting apoptosis [ J ]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(7) : 941-952.

[责任编辑 孙丛丛]