

大黄素激活 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路对 心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能保护作用

崔勤涛, 王俊华, 刘晓晨, 王学惠, 马海英, 苏国宝

摘要 目的 探究大黄素通过激活 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠心功能的保护作用。方法 大鼠随机分为假手术组、MIRI 模型组、辛伐他汀 40 mg/kg 组、大黄素 20、40、60 mg/kg 组,建立大鼠 MIRI 模型。心电图检测左室舒张末期压(LVEDP)、左室收缩压(LVSP)、左室内压力变化最大上升/下降速率($\pm dp/dt_{max}$),测量心肌梗死面积,生化分析仪检测血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)和肌钙蛋白(cTnI)浓度;HE 染色观察心肌组织病理改变;免疫组化检测裂解型半胱天冬酶(cleaved Caspase-3)阳性细胞率;试剂盒检测髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量;Western blot 检测核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素氧化酶 1(HO-1)蛋白水平;另设假手术组、MIRI 模型组、大黄素处理组、大黄素 + ML385 处理组,Nrf2 抑制剂 ML385 处理大黄素 + ML385 组大鼠后,检测大鼠心功能、病理改变、氧化应激各指标的变化。结果 与假手术组比较,MIRI 模型组大鼠 LVEDP、LVSP 升高, $\pm dp/dt_{max}$ 降低,心肌梗死面积增加,血清 CK、LDH、cTnI 浓度升高,组织呈明显病理改变,cleaved Caspase-3 阳性细胞率增加,MPO、MDA 含量升高,SOD 含量降低,Nrf2 和 HO-1 蛋白水平升高。大黄素处理对心功能损伤发挥保护作用,Nrf2 信号通路进一步激活;ML385 处理抑制了大黄素对心功能的保护作用。结论 大黄素可缓解 MIRI 损伤,其作用机制与 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路的激活有关。

关键词 大黄素;心肌缺血再灌注;核因子 E2 相关因子 2;血红素氧化酶 1

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0894-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.014

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)是心肌在缺血性损伤之后,恢复血液流通进一步造成更为严重的二次损伤的过程。常常导致心肌代谢紊乱和结构损伤,具有较高

的死亡率和致残率。MIRI 有着复杂的病理生理学机制,涉及诸如活性氧过度产生、炎症反应、钙超载、线粒体紊乱等一系列病理变化,氧化应激在其中扮演着最为重要的角色^[1]。大黄素是传统中药大黄的提取物,是一种蒽醌类衍生物,具有抗感染、免疫调节以及抗氧化等药理作用^[2]。研究^[3]表明,大黄素在大鼠 MIRI 中具有保护作用,然而对其保护作用机制的研究报道还有很多空缺。现通过建立心肌缺血再灌注大鼠模型,探讨在 MIRI 大鼠心肌中大黄素对 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路的激活作用及其对 MIRI 的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 大黄素、辛伐他汀购自北京索莱宝科技有限公司;ML385 购自美国 Selleck 有限公司;NBT 染色液、HE 染色液、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、DAB 显色液、ECL 显色液购自上海碧云天生物技术有限公司;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自南京建成生物研究所;裂解型半胱天冬酶 3(cleaved Caspase-3)、核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)、血红素氧化酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)一抗及对应的二抗购自美国 Santa Cruz 公司;动物人工呼吸机 ALC-V108 购自上海奥尔科特生物科技有限公司;实验动物心电图及购自上海精密仪器科学有限公司;全自动生化分析仪购自日本日立公司;HT7700 透射电镜购自日本 hitachi 公司;超波切片机构自德国徕卡公司;凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验动物及分组处理 80 只(体质量 200 ~ 250 g)健康雄性 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,恒温恒湿,明暗 12 h 交替的环境下在本院实验动物中心喂养 1 周。48 只大鼠随机均分为假手术组、MIRI 模型组、辛伐他汀 40 mg/kg 组、大黄素 20、40、60 mg/kg 组;假手术组和 MIRI 模型组大鼠每日采用等量生理盐水灌胃,辛伐他汀 40 mg/

2019-09-11 接收

基金项目:河南省二〇一八年科技发展计划项目(编号:182102310182)

作者单位:新乡医学院第一附属医院心血管外科,新乡 453000

作者简介:崔勤涛,男,硕士研究生,副主任医师,责任作者,E-mail: 330279754@qq.com

kg 组采用 40 mg/kg 辛伐他汀灌胃作为阳性对照, 大黄素 20、40、60 mg/kg 组每日采用对应剂量的大黄素进行灌胃, 灌胃每天给药 1 次, 连续 10 d, 建模前大鼠禁食禁水 12 h, 在最后 1 次灌胃 45 min 后建立大鼠 MIRI 模型。此外, 另设 32 只大鼠随机均分为假手术组、MIRI 模型组、大黄素处理组、大黄素 + ML385 处理组; 假手术组、MIRI 模型组按照前述对应组别处理方法进行处理, 大黄素处理组按照前述大黄素 60 mg/kg 组的处理方法进行处理, 大黄素 + ML385 处理组在大黄素 60 mg/kg 组处理方法的基础上, 在建模前的 1 h 腹腔注射 30 mg/kg 的 Nrf2 抑制剂 ML385 进行处理。

1.3 MIRI 模型建立 采用结扎冠状动脉前降支法建立 MIRI 模型, 大鼠通过 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉后打开胸腔, 剪开心包, 暴露心脏, 其中假手术组不进行结扎处理, 其余各组于大鼠左冠状动脉前降支起始段 2 mm 处穿线进行结扎, 以心肌颜色从红色变成灰白色, 并且心电图 ST 段明显抬高作为结扎成功的标志, 结扎 30 min 后, 松开结扎线恢复血流, 造成缺血再灌注, 再灌注持续 2 h 后, 处死大鼠用于后续实验。

1.4 心功能检测 麻醉的大鼠固定后, 经右侧颈动脉插管至左心室, 连接心电图, 检测大鼠左心室舒张末期压 (LVEDP)、左心室收缩压 (LVSP)、左室内压力变化最大上升/下降速率 ($\pm dp/dt_{\max}$)。

1.5 心肌梗死面积检测 取大鼠心脏, 4℃ 生理盐水清洗 3 次后称重, 将心室肌切片 0.125% NBT 染色液染色 15 min, 梗死区域为灰白色, 非梗死区域为暗紫色, 将梗死区心肌剪下称重, 心肌梗死面积通过梗死区心肌重量占全心肌重量的百分比来表示。

1.6 心肌损伤标志物检测 再灌注 2 h 后, 抽取颈动脉血 6 ml, 静置 30 min, 离心分离血清, -80℃ 冰箱中保存血清, 采用全自动生化分析仪检测肌酸激酶 (creatinine kinase, CK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和肌钙蛋白 (troponin, cTnI) 浓度。

1.7 HE 染色检测心肌组织病理性改变 4% 多聚甲醛固定心肌组织 24 h, 通过乙醇梯度脱水 30 min 后, 二甲苯透明处理, 石蜡包埋切至 2 μ m 薄片, HE 染色液进行染色, 显微镜下观察结果并拍照。

1.8 免疫组化检测 cleaved Caspase-3 阳性细胞率 心肌组织石蜡包埋切片后, 60℃ 恒温箱烘烤 2 h, 通过二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水化切片, 3% 过氧化氢消除内源过氧化物酶活性, 清洗后 PBS 缓冲液中进行抗原修复, 山羊血清封闭 15 min, 滴加 cleaved

Caspase-3 一抗 4℃ 孵育过夜, PBS 清洗后加入二抗室温孵育 2 h, PBS 清洗后通过 DAB 显色液进行显色, 苏木精复染, 清洗之后进行脱水、透明、封片, 显微镜下观察结果并拍照, Image Plus 图像分析软件分析阳性细胞数和总细胞数, 阳性细胞率 = 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.9 氧化应激标志物检测 取心肌组织, 洗涤后在冰冷的磷酸钾缓冲液中匀浆处理, 离心取上清液, 采用对应的试剂盒进行检测 MPO、MDA 和 SOD 在组织中的含量。

1.10 Western blot 检测蛋白表达 取心肌组织, 通过 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 试剂盒对每组总蛋白进行定量, 通过上样缓冲液沸水浴 10 min, 每组各取 20 μ g 总蛋白进行上样, SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品, 半干转膜法转移蛋白至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 弃残液, 1:1 000 cleaved Caspase-3 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 缓冲液清洗后加入 1:200 辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗室温孵育 2 h, 通过 ECL 显色液进行显影, 凝胶成像仪扫描灰度值进行相对定量。

1.11 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析实验结果, 剂量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 并用 SNK- q 检验进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对大鼠心脏功能的保护作用 如表 1 所示, 与假手术组比较, MIRI 模型组心功能指标 LVEDP 升高 ($P < 0.01$), 同时 LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 和 $-dp/dt_{\max}$ 降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义; 与 MIRI 模型组比较, 辛伐他汀 40 mg/kg 组 LVEDP 降低 ($P < 0.01$), LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 和 $-dp/dt_{\max}$ 升高 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义; 大黄素 40、60 mg/kg 组 LVEDP 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 和 $-dp/dt_{\max}$ 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 差异有统计学意义。

2.2 大黄素减轻 MIRI 大鼠心肌损伤 如表 2 所示, 与假手术组比较, MIRI 模型组心肌梗死面积、CK、LDH 和 cTnI 浓度均升高 ($P < 0.001$), 差异有统计学意义; 与 MIRI 模型组比较, 辛伐他汀 40 mg/kg 组心肌梗死面积、CK、LDH 和 cTnI 浓度降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义; 大黄素 40、60 mg/kg 组心肌梗死面积、CK、LDH 和 cTnI 浓度降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。

表1 大鼠心脏功能指标检测($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	LVEDP (mmHg)	LVSP (mmHg)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)
假手术	8.46 ± 0.40	115.0 ± 5.5	5030 ± 211	3765 ± 181
MIRI 模型	13.77 ± 0.76 ^{**}	80.4 ± 4.1 ^{**}	2520 ± 116 ^{**}	2421 ± 131 ^{**}
辛伐他汀 40 mg/kg	9.58 ± 0.47 ^{##}	108.2 ± 5.3 ^{##}	4055 ± 203 ^{##}	3240 ± 160 ^{##}
大黄素 20 mg/kg	13.41 ± 0.65	84.2 ± 4.2	2816 ± 130 [#]	2538 ± 136
大黄素 40 mg/kg	11.24 ± 0.54 [#]	98.3 ± 4.6 ^{##}	3423 ± 148 ^{##}	2812 ± 140 [#]
大黄素 60 mg/kg	9.78 ± 0.46 ^{##}	106.6 ± 5.0 ^{##}	4227 ± 203 ^{##}	3121 ± 106 ^{##}
F 值	119.7	66.58	236.8	95.32
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与假手术组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 MIRI 模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 表2 大鼠心肌损伤指标检测($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	心肌梗死面积 (%)	CK (U/L)	LDH (U/L)	cTnI (ng/ml)
假手术	—	742 ± 36	505 ± 22	16.71 ± 0.82
MIRI 模型	23.11 ± 1.21 ^{***}	3878 ± 172 ^{***}	1987 ± 88 ^{***}	72.40 ± 3.51 ^{***}
辛伐他汀 40 mg/kg	8.57 ± 0.42 ^{##}	1375 ± 65 ^{##}	927 ± 45 ^{##}	26.03 ± 1.29 ^{##}
大黄素 20 mg/kg	20.32 ± 1.00 [#]	3688 ± 181	1801 ± 91 [#]	68.40 ± 3.07
大黄素 40 mg/kg	14.70 ± 0.58 ^{##}	2510 ± 122 ^{##}	1418 ± 70 ^{##}	48.98 ± 2.32 ^{##}
大黄素 60 mg/kg	10.21 ± 0.50 ^{##}	1502 ± 77 ^{##}	1012 ± 51 ^{##}	32.66 ± 1.40 ^{##}
F 值	1056	907.0	585.3	801.2
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与假手术组比较: ^{***} $P < 0.001$; 与 MIRI 模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

2.3 大黄素减轻 MIRI 大鼠心肌组织病理变化

如图 1 所示,假手术组心肌纤维排列整齐,无纤维结构改变;MIRI 模型组心肌纤维紊乱,出现肌丝溶解,空泡变性等病理变化;辛伐他汀 40 mg/kg 组和大黄素 40、60 mg/kg 组病理变化较 MIRI 模型组得到明显改善。

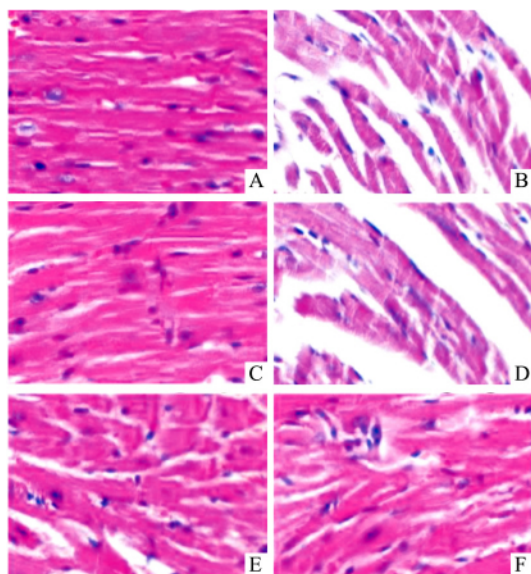


图1 HE 染色检测大鼠心肌组织病理变化 ×400

A: 假手术组; B: MIRI 模型组; C: 辛伐他汀 40 mg/kg 组; D: 大黄素 20 mg/kg; E: 大黄素 40 mg/kg; F: 大黄素 60 mg/kg

2.4 大黄素减轻 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡

如图

2 所示,与假手术组比较,MIRI 模型组心肌 cleaved Caspase-3 阳性细胞率增加 ($P < 0.001$),差异有统计学意义;与 MIRI 模型组比较,辛伐他汀 40 mg/kg 组阳性细胞率减少 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;大黄素 20、40、60 mg/kg 组阳性细胞率减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$),差异有统计学意义。

2.5 大黄素减轻 MIRI 大鼠氧化应激水平 如表 3 所示,与假手术组比较,MIRI 模型组大鼠心肌组织中 MPO、MDA 含量升高 ($P < 0.01$),同时 SOD 含量降低 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;与 MIRI 模型组比较,辛伐他汀 40 mg/kg 组大鼠心肌组织中 MPO、MDA 含量降低 ($P < 0.01$),SOD 含量升高 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;大黄素 40、60 mg/kg 组大鼠心肌组织 MPO、MDA 含量降低 ($P < 0.01$),SOD 含量升高 ($P < 0.01$),差异有统计学意义。

表3 大鼠心肌组织氧化应激标志物检测($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	MPO (U/g)	MDA (mmol/mg)	SOD (U/mg)
假手术	5.00 ± 0.22	5.05 ± 0.24	181.4 ± 9.0
MIRI 模型	24.11 ± 1.21 ^{**}	13.25 ± 0.62 ^{**}	103.2 ± 5.0 ^{**}
辛伐他汀 40 mg/kg	8.85 ± 0.43 ^{##}	7.20 ± 0.35 ^{##}	168.7 ± 6.9 ^{##}
大黄素 20 mg/kg	21.45 ± 1.05 [#]	12.20 ± 0.61 [#]	111.4 ± 5.3
大黄素 40 mg/kg	15.07 ± 0.70 ^{##}	9.84 ± 0.49 ^{##}	138.8 ± 6.9 ^{##}
大黄素 60 mg/kg	10.24 ± 0.51 ^{##}	7.55 ± 0.34 ^{##}	154.3 ± 7.7 ^{##}
F 值	758.4	369.6	161.8
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

与假手术组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 MIRI 模型组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

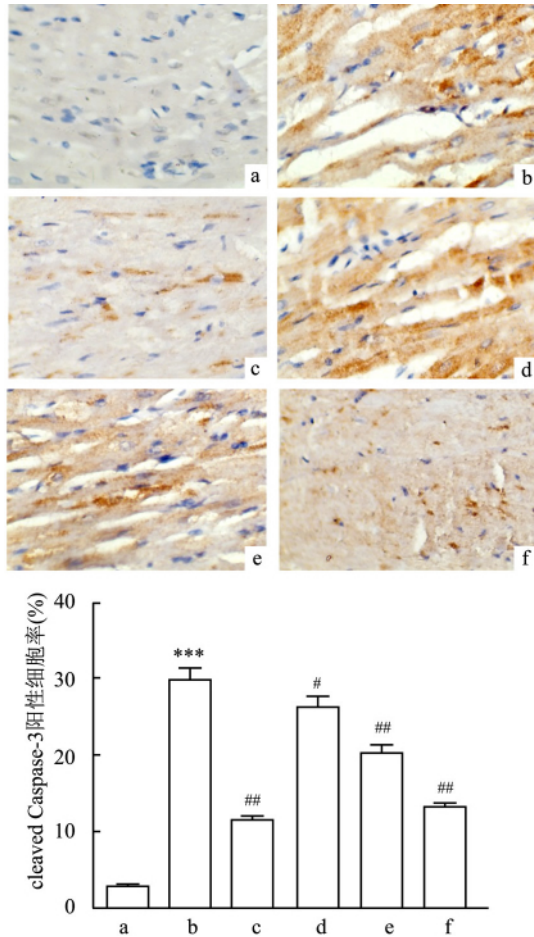


图2 免疫组化检测大鼠心肌组织 cleaved

Caspase-3 阳性细胞率 ×400

a: 假手术组; b: MIRI 模型组; c: 辛伐他汀 40 mg/kg 组; d: 大黄素 20 mg/kg 组; e: 大黄素 40 mg/kg 组; f: 大黄素 60 mg/kg 组; 与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与 MIRI 模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.6 大黄素促进 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路激活

如图3所示,与假手术组比较,MIRI模型组大鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平升高 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;与 MIRI 模型组比较,辛伐他汀 40 mg/kg 组大鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平进一步升高 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;大黄素 40、60 mg/kg 组 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),差异有统计学意义。

2.7 ML385 抑制大黄素对 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路的激活作用

如图4所示,与假手术组比较,MIRI模型组大鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平升高 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;与 MIRI 模型组比较,大黄素处理组大鼠心肌组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平进一步升高 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;与大黄素处理组比较,大黄素 + ML385 处

理组心肌组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平降低 ($P < 0.01$),差异有统计学意义。

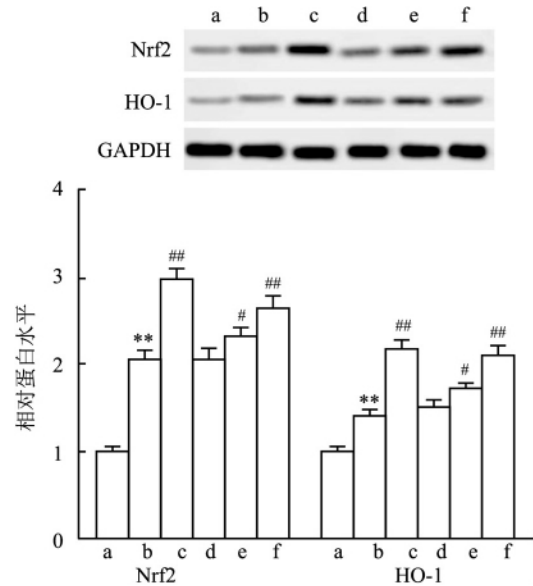


图3 Western blot 检测大鼠心肌组织

Nrf2/ARE/HO-1 通路蛋白表达

a: 假手术组; b: MIRI 模型组; c: 辛伐他汀 40 mg/kg 组; d: 大黄素 20 mg/kg 组; e: 大黄素 40 mg/kg 组; f: 大黄素 60 mg/kg 组; 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与 MIRI 模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

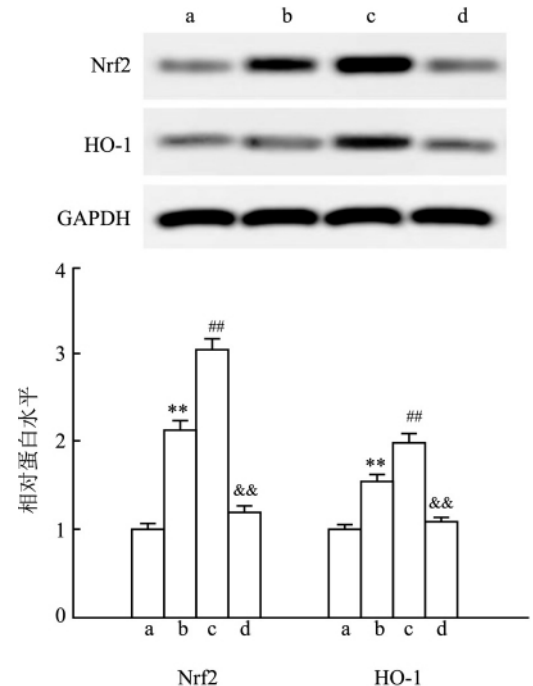


图4 Western blot 检测 ML385 对大鼠心肌组织

Nrf2/ARE/HO-1 通路蛋白表达的影响

a: 假手术组; b: MIRI 模型组; c: 大黄素处理组; d: 大黄素 + ML385 处理组; 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与 MIRI 模型组比较: ## $P < 0.01$; 与大黄素处理组比较: && $P < 0.01$

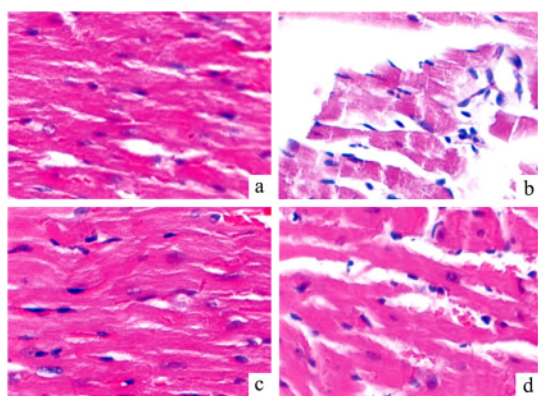
表4 ML385 处理大鼠心功能及心肌损伤标志物检测($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	LVEDP (mmHg)	LVSP (mmHg)	CK (U/L)	LDH (U/L)
假手术	8.68 ± 0.43	122.10 ± 6.1	805 ± 41	552 ± 27
MIRI 模型	15.22 ± 0.81 ^{**}	77.1 ± 3.9 ^{**}	4026 ± 193 ^{***}	2112 ± 116 ^{***}
大黄素处理	9.06 ± 0.56 ^{##}	109.1 ± 5.3 ^{##}	1201 ± 60 ^{##}	1051 ± 54 ^{##}
大黄素 + ML385 处理	12.81 ± 0.61 ^{&&}	96.24 ± 4.5 ^{&&}	2084 ± 101 ^{&&}	1488 ± 72 ^{&&}
F 值	205.7	116.9	1249	630.0
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与假手术组比较: ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$; 与 MIRI 模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与大黄素处理组比较: ^{&&} $P < 0.01$

2.8 ML385 抑制大黄素对心肌的保护作用 如表 4 所示,与假手术组比较,MIRI 模型组大鼠心功能指标 LVEDP 升高($P < 0.01$),LVSP 降低($P < 0.01$),同时血清中 CK 和 LDH 浓度升高($P < 0.001$),差异有统计学意义;与 MIRI 模型组比较,大黄素处理组大鼠 LVEDP 降低($P < 0.01$),LVSP 升高($P < 0.01$),并且血清 CK 和 LDH 浓度降低($P < 0.01$),差异有统计学意义;与大黄素处理组比较,大黄素 + ML385 处理组大鼠 LVEDP 升高($P < 0.01$),LVSP 降低($P < 0.01$),而血清 CK 和 LDH 浓度升高($P < 0.01$),差异有统计学意义。

2.9 ML385 抑制大黄素对减轻病理改变的作用 如图 5 所示,假手术组、MIRI 模型组以及大黄素处理组的病理变化均与之前的结果一致,相比于大黄素处理组,经过 ML385 处理的大黄素 + ML385 组出现明显的心肌纤维紊乱,肌丝溶解,空泡变性等病理变化。

图5 HE 染色检测 ML385 处理大鼠心肌组织病理变化 $\times 400$

a: 假手术组; b: MIRI 模型组; c: 大黄素处理组; d: 大黄素 + ML385 处理组

2.10 ML385 抑制大黄素对氧化应激的调控作用

如表 5 所示,与假手术组比较,MIRI 模型组大鼠心肌组织 MPO 升高($P < 0.01$),同时氧化应激标志物 MDA 含量升高($P < 0.01$),SOD 含量降低($P <$

0.01),差异有统计学意义;与 MIRI 模型组比较,大黄素处理组心肌组织 MPO 降低($P < 0.01$),同时 MDA 降低($P < 0.01$),SOD 升高($P < 0.01$),差异有统计学意义;与大黄素处理组比较,大黄素 + ML385 处理组心肌组织 MPO 升高($P < 0.01$),MDA 升高($P < 0.01$),SOD 降低($P < 0.01$),差异有统计学意义。

表5 ML385 处理大鼠心肌组织氧化应激标志物检测($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MPO (U/g)	MDA (mmol/mg)	SOD (U/mg)
假手术	6.32 ± 0.31	6.20 ± 0.30	195.0 ± 9.6
MIRI 模型	25.22 ± 1.23 ^{**}	14.87 ± 0.74 ^{**}	100.4 ± 5.1 ^{**}
大黄素处理	10.85 ± 0.50 ^{##}	7.75 ± 0.33 ^{##}	152.2 ± 7.5 ^{##}
大黄素 + ML385 处理	17.20 ± 0.92 ^{&&}	10.28 ± 0.52 ^{&&}	121.6 ± 6.1 ^{&&}
F 值	795.7	452.0	255.0
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

与假手术组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 MIRI 模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与大黄素处理组比较: ^{&&} $P < 0.01$

3 讨论

MIRI 是常见的临床心脏疾病,常发生于心肌梗死以及心脏搭桥手术、心脏移植手术等手术之后,对治疗的预后产生了严重的影响^[4]。传统中药提取成分大黄素被报道在 MIRI 过程中具有心肌保护作用, Du et al^[5] 研究表明大黄素以及石竹素预处理可增强线粒体抗氧化成分的产生而减轻 MIRI 造成的心肌损伤,提示大黄素的保护性作用与增强心肌的抗氧化能力有关^[5-6]。本研究检测了大鼠 LVEDP、LVSP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 等心功能指标,显示大黄素的处理减轻了 MIRI 引起的心功能紊乱。同时本研究检测了大鼠血清中 CK、LDH、cTnI 等心肌损伤标志物,表明大黄素处理减轻了 MIRI 造成了心肌损伤。此外通过组织病理染色发现,大黄素处理减轻了 MIRI 大鼠心肌组织发生的病理性改变,并且 cleaved Caspase-3 阳性细胞率降低。cleaved Caspase 3 是细胞凋亡途径中的执行因子,其水平变化可反映出细

胞凋亡发生的情况^[7-8]。以上结果表明,大黄素可在 MIRI 过程中对大鼠心肌发挥保护性作用,与之前的研究结果一致。

氧化应激是一种具有破坏性的生物学反应机制,当诸如活性氧等反应分子过度产生时,动物自身清除过氧化物的能力无法及时清除活性氧,导致体内的氧化和抗氧化平衡被打破,造成组织氧化损伤^[9]。当 MIRI 发生时,过量的活性氧由黄嘌呤氧化酶系统、中性粒细胞异常活化以及线粒体呼吸链功能异常产生,造成了心肌功能损伤以及细胞死亡^[10]。在氧化应激发生时,细胞膜脂发生过氧化产生大量 MDA,同时伴随着抗氧化酶 SOD 的消耗,两者常作为衡量氧化应激反应的标志物^[11]。MPO 是血红素过氧化物酶超家族成员之一,主要由中性粒细胞、单核细胞分泌,中性粒细胞在 MIRI 病理过程中扮演着重要角色,MPO 可催化产生一系列氧化剂,作用于很多细胞内成分,并最终造成细胞损伤。因此 MPO 被认为是心血管疾病中连接炎症与氧化应激的枢纽^[12]。本研究显示大黄素可提高 SOD 水平,同时降低 MPO 和 MDA 水平,表明大黄素对 MIRI 大鼠心肌保护作用是通过抑制氧化应激实现的。

Nrf2 是诱导细胞产生抗氧化酶以对抗氧化应激的最主要的转录因子,在非胁迫条件下,Nrf2 与细胞质中的接头 Keap1 结合,此时为非活性状态并很快发生泛素化被蛋白酶体降解。当发生氧化应激时,Nrf2 与 Keap1 分离,并进入细胞核,与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE) 相互结合,激活 Nrf2 下游的基因表达。而 HO-1 则是 Nrf2 下游重要的对抗氧化应激的酶类^[13]。研究^[14]表明 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路在 MIRI 中对心肌发挥着重要的保护性作用,Nrf2 可通过调控心肌细胞凋亡、内质网应激、线粒体功能、抗氧化、抗感染以及自噬等多个方面发挥心肌保护作用。尽管大黄素是否可以通过调控 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路减轻 MIRI 心肌损伤还未见于报道,而在诸如骨肉瘤等其他疾病中发现的大黄素的调控作用暗示着大黄素减轻 MIRI 心肌损伤的作用可能与 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路有关^[15]。本研究显示大黄素可在氧化应激引起 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路激活的基础上,进一步提高通路的活化水平。通过 Nrf2 抑制剂对 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路进行抑制后发现,大黄素对心肌功能、心肌损伤、病理改变以及氧化应激各指标的调控作用均受到抑制。结果表明大黄素对 MIRI 大鼠心肌保护作用与 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路的激

活有关。

综上所述,大黄素可通过激活 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路,提高 HO-1 等抗氧化应激基因的表达,从而抑制氧化应激水平,缓解 MIRI 大鼠心肌损伤及功能紊乱。本研究初步探究了 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路在大黄素对 MIRI 心肌保护中所发挥的作用,为大黄素 MIRI 治疗的临床应用提供了新的实验基础。

参考文献

- [1] Yamamoto M, Nishimori H, Fukutomi T, et al. Dynamics of oxidative stress evoked by myocardial ischemia reperfusion after off-pump coronary artery bypass grafting elucidated by bilirubin oxidation [J]. *Circ J*, 2017, 81(11): 1678-85.
- [2] Dong X, Fu J, Yin X, et al. Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2016, 30(8): 1207-18.
- [3] 李少珂, 张鹤鹏, 王立成, 等. 大黄素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(8): 1852-4.
- [4] Niemann B, Schwarzer M, Rohrbach S. Heart and mitochondria: pathophysiology and implications for cardiac surgeons [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 66(1): 11-9.
- [5] Du Y, Ko K M. Effects of pharmacological preconditioning by emodin/oleanolic acid treatment and/or ischemic preconditioning on mitochondrial antioxidant components as well as the susceptibility to ischemia-reperfusion injury in rat hearts [J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 288(1-2): 135-42.
- [6] 孔倩倩, 马会杰, 王喆, 等. 大黄素对大鼠离体心脏缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(12): 1721-5.
- [7] 侯经远, 谢运泉, 赵平森, 等. 中国南方客家人群乙醛脱氢酶 2 基因多态性与急性心肌梗死的相关性研究 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(3): 170-5.
- [8] 孙超, 王学民, 曹赫然, 等. miR-338-3p 靶向 TCF4 对人肾癌细胞增殖、凋亡和转移的调节 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2019, 16(1): 62-8.
- [9] Kurian G A, Rajagopal R, Vedantham S, et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1656450.
- [10] Kahles T, Brandes R P. NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(14): 2345-63.
- [11] Amin M M, Rafiei N, Poursafa P, et al. Association of benzene exposure with insulin resistance, SOD, and MDA as markers of oxidative stress in children and adolescents [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(34): 34046-52.
- [12] Ndrepepa G. Myeloperoxidase-A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease [J]. *Clin Chim Acta*,

- 2019, 493: 36–51.
- [13] Smith R E, Tran K, Smith C C, et al. The role of the Nrf2/ARE antioxidant system in preventing cardiovascular diseases [J]. *Dis-eases*, 2016, 4(4): E34.
- [14] Shen Y, Liu X, Shi J, et al. Involvement of Nrf2 in myocardial is-chemia and reperfusion injury [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 496–502.
- [15] Yan L, Hu R, Tu S, et al. Emodin mitigates the oxidative stress induced by cisplatin in osteosarcoma MG63 cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1981–5.

Protective effect of emodin on cardiac function in rats with myocardial ischemia reperfusion injury by activating Nrf2/ARE/HO-1 signaling pathway

Cui Qintao, Wang Junhua, Liu Xiaochen et al

(Cardiovascular Surgery Dept, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453000)

Abstract Objective To investigate the protective effect of emodin on cardiac function in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) by activating Nrf2/ARE/HO-1 signaling pathway. **Methods** Rats were randomly divided into Sham group, MIRI group, Positive control group, emodin 20, 40, 60 mg/kg group, then MIRI model of rats were established, ECG detection of left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular systolic pressure (LVSP), maximal rise/fall rate of left ventricular pressure change ($\pm dp/dt_{\max}$), myocardial infarct size was measured, biochemical analyzer was used to detect the concentration of serum creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and troponin (cTnI), myocardial tissue pathological changes were observed by HE staining, cleaved Caspase-3 positive cell rate was detected by immunohistochemistry, the content of myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), Superoxide dismutase (SOD) was measured by kits, Western blot was used to detect the protein levels of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (HO-1). Then rats were randomly divided into Sham group, MIRI group, emodin group and emodin + ML385 group, rats in emodin + ML385 group were treated by Nrf2 inhibitor ML385, and changes of cardiac function, pathological changes, inflammation and oxidative stress were detected. **Result** Compared with Sham group, the rats in MIRI group had elevated LVEDP and LVSP, decreased $\pm dp/dt_{\max}$, increased myocardial infarct size, increased serum CK, LDH, and cTnI concentrations, obvious pathological changes in tissues, and the positive cell rate of cleaved Caspase-3 increased, the MPO and MDA content increased, SOD content decreased, protein levels of Nrf2 and HO-1 increased. Emodin treatment played a protective role for cardiac function damage, Nrf2 signaling pathway was further activated. ML385 treatment significantly inhibited emodin induced protective effect of cardiac function. **Conclusion** Emodin can alleviate MIRI injury, and its mechanism is related to the activation of Nrf2/ARE/HO-1 signaling pathway.

Key words emodin; myocardial ischemia-reperfusion; nuclear factor E2 related factor 2; heme oxygenase 1