

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:34 网络出版地址: http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.010.html

乔松素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究

周甄¹, 马梦晴¹, 林先和², 刘和俊²

摘要 目的 探讨不同浓度的乔松素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤(IRI)的保护作用及其相关机制。方法 成年SD大鼠125只,45只用于前期筛选乔松素适宜用药浓度,另80只随机均分为假手术组、模型组、乔松素低、中、高剂量(3、10、30 mg/kg)组。通过结扎大鼠左冠状动脉前降支30 min并解开结扎线释放血流2 h建立大鼠在体 IRI 模型,乔松素组于缺血前1 h尾静脉给药,模型建立后HE染色观察心肌组织形态学改变;免疫荧光染色法检测自噬标志物LC3的表达及定位;TUNEL原位标记凋亡心肌细胞;Western blot法检测凋亡蛋白Bax、Caspase-3及自噬蛋白LC3、p62的表达。结果 HE染色结果显示,合适浓度的乔松素能有效改善心肌组织病理学改变,且呈剂量依赖性,但剂量较高时可能具有毒性作用;免疫荧光染色显示乔松素组LC3表达明显较模型组增多,在胞质中广泛表达,且呈剂量依赖性;TUNEL染色结果显示乔松素组与模型组比较,凋亡细胞均明显减少,且高剂量组优于中、低剂量组;Western blot结果显示乔松素组Bax、Caspase-3、p62蛋白表达水平较模型组明显降低($P < 0.05$),且高剂量组效果更佳($P < 0.01$);乔松素组LC3表达水平高于模型组($P < 0.05$),且高剂量组增高优于中、低剂量组($P < 0.01$)。结论 乔松素预处理对大鼠心肌 IRI 有保护作用,其主要作用机制可能与减少细胞凋亡和激活自噬有关。

关键词 乔松素; 心肌缺血再灌注; 细胞凋亡; 自噬

中图分类号 R 542.2; R 932

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1729-05

冠心病是一种常见心血管疾病,随着医学技术的发展,溶栓疗法、经皮腔内冠脉介入、冠状动脉旁路移植等再灌注疗法取得了良好的治疗效果,但针对治疗中出现的心肌缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)却没有理想的预防和治疗方案^[1],其损伤机制可能与细胞凋亡、氧自由基过多、钙超载、炎症反应等有关^[2]。乔松素是一种存在于植物和蜂胶中的含量较高的黄酮类天然化合物,具有抗

菌、抗原虫、抗诱变、抗氧化、抗凋亡等多种药理学活性^[3]。研究^[4]证实在大鼠脑 IRI 模型中,乔松素参与抑制凋亡和激活自噬拮抗 IRI,但对于心肌 IRI 是否有效尚未见报道。该研究通过建立大鼠心肌 IRI 模型,以细胞凋亡和自噬为研究对象,研究乔松素预处理对大鼠心肌 IRI 的干预作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 乔松素购自北京莱耀生物公司(产品编号:LY0734);荧光二抗、HRP-羊抗小鼠 IgG、DAPI 购自上海碧云天生物技术研究所;鼠源抗鼠 p62、Caspase-3、Bax 抗体均购自美国 Abcam 公司;LC3-B 购自德国 Sigma 公司;鼠源抗鼠 GAPDH、TUNEL 染色试剂盒购自南京凯基生物公司;兔抗 actin 抗体购自武汉博士德生物公司;ECL 发光试剂盒、BCA-400 蛋白质定量试剂盒购自美国 Thermo 公司。

1.2 实验动物 125 只成年健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,重 200~250 g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.3 动物模型制备及给药方案 125 只大鼠中将 45 只均分为 9 组,分别为假手术组、IRI 组(模型组)、乔松素(1、3、10、20、30、40、50 mg/kg)组。用药组浓度参考相关文献^[4-5]设置,用于前期筛选乔松素合适的用药剂量。剩余 80 只随机均分为 5 组,分别为假手术组、模型组、乔松素低、中、高剂量(3、10、30 mg/kg)组。其中 8 只用于 Western blot 法检测,另外 8 只用于免疫荧光检测。给药方案:乔松素组于缺血再灌注前 1 h 尾静脉给药。乔松素粉剂使用 DMSO 溶解后生理盐水稀释配置相应浓度药物;其余各组给予等量生理盐水。模型制备:5%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉大鼠后,经口腔气管插管,接 HX300 小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司),调整呼吸频率 75 次/min,潮气量 6 ml。于大鼠四肢皮下插入电极连接 BL-420E 生物机能实验系统记录大鼠心电图变化。在大鼠左胸第 3、4 肋间处通过 2~2.5 cm 切口长度逐步钝性分离打开胸腔暴露心脏。于左心耳下方 1~2 mm 处使用 6-0 缝线结扎大鼠左冠状动脉前降支 30 min 并解开结扎线释放血流 2 h 建立大鼠在体 IRI 模型。缺血模型建立成功

2015-07-07 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1508085MH145)

作者单位:¹安徽医科大学第二临床医学院,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

作者简介:周甄,女,硕士研究生;

刘和俊,男,博士,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: 1981806821@qq.com

标志: 结扎线下心肌组织发白, 心电图显示 ST 段明显抬高。再灌注成功标志: 心肌局部充血, ST 段逐渐下降。造模结束后, 处死大鼠摘取心脏称重后于平行房室环水平处横切, HE 染色标本放置于 4% 福尔马林溶液中, 其余心肌组织放入液氮速冻, 然后转入 -80°C 冰箱进行长期保存。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 心肌组织形态学 HE 染色 取左心室前壁心肌组织, 制作石蜡切块, 切片后脱蜡行 HE 染色, 封片后于光学显微镜下观察各组大鼠心肌组织形态学的变化。

1.4.2 免疫荧光染色检测 LC3 蛋白表达 将冰冻组织从 -80°C 冰箱中取出, OCT 包埋组织, 冰冻, 制备冰冻组织切片(厚约 $3\ \mu\text{m}$)。切片在室温下晾干 1 h, 冷丙酮固定 10 min, 晾干后置于切片盒中 -20°C 冰箱保存。取出切片, PBS 洗涤 3 次, 每次 3 min, 1% 小牛血清室温封闭 15 min, 同时加入 LC3 和 actin 抗体(稀释浓度均为 1:1 000) 4°C 冰箱过夜。次日孵育荧光二抗, DAPI 复染 1 min, 蒸馏水冲洗后烘干, 抗荧光猝灭剂封片, 荧光显微镜(日本 Nikon 公司)下观察。

1.4.3 TUNEL 原位标记法检测心肌凋亡细胞 冰冻切片按照 TUNEL 试剂盒说明书步骤进行检测, DAPI 复染, 荧光显微镜下观察。

1.4.4 Western blot 法检测凋亡及自噬相关蛋白表达 取 100 mg 心肌组织, 加入 1 ml 裂解液(含 100 mmol/L PMSF $10\ \mu\text{l}$, 蛋白酶抑制剂 $10\ \mu\text{l}$) 后, 用 2 ml 组织匀浆器匀浆数次后, 置于冰上 5 min, 重复若干次, 待组织匀浆充分后, 用移液管将匀浆液转移至 1.5 ml EP 管中, 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量检测, 各组上清液用裂解液调至相同蛋白浓度, 加入 $5\times$ SDS 蛋白上样缓冲液, 沸水煮 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳并转膜于 PVDF 膜上, PVDF 膜用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 3 h。然后依次滴加 1:1 000 的鼠抗 p62、抗 Caspase-3、抗 Bax、抗 LC3 和 GAPDH 抗体 4°C 孵育过夜后 TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 使用 1:10 000 山羊抗鼠二抗孵育 1 h, TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。最后用 ECL 发光液进行曝光显影, Bio-Rad 照相系统拍照, 并用 Image-J 软件分析蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数之间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 乔松素预处理对心肌组织形态学变化的影响

各组心肌组织 HE 染色结果显示: 假手术组心肌细胞排列整齐, 胞膜完整, 界限清晰, 胞质染色均匀; 模型组及乔松素 $1\ \text{mg/kg}$ 组心肌细胞排列不齐, 界限不清, 胞质肿胀, 染色不均, 有炎性细胞浸润, 肌纤维溶解, 部分细胞空泡变性; 乔松素 $3\ \text{mg/kg}$ 组心肌细胞排列不齐, 界限不清, 胞质肿胀, 染色不均, 有炎性细胞浸润, 空泡变性较模型组减轻; 乔松素 $10\ \text{mg/kg}$ 组心肌细胞排列较不齐, 界限较清晰, 胞质染色稍不均, 少量炎性细胞浸润, 细胞水肿不明显; 乔松素 20 、 $30\ \text{mg/kg}$ 组细胞排列较整齐, 界限较清晰, 胞质染色较均匀, 仅有部分心肌纤维波纹样改变; 乔松素 40 、 $50\ \text{mg/kg}$ 组心肌细胞排列不齐, 界限较不清, 胞质较肿胀, 有少量炎性细胞浸润, 可能与药物本身毒性有关。根据上述实验结果, 本课题分别设置乔松素 3 、 10 、 $30\ \text{mg/kg}$ 为乔松素低、中、高剂量组进行进一步机制研究, 其中 $30\ \text{mg/kg}$ 为最佳用药剂量, 见图 1。

2.2 自噬标志蛋白 LC3 免疫荧光染色结果 乔松素组 LC3 蛋白表达明显较模型组增多, 广泛在胞质中表达, 呈剂量依赖性, 假手术组几乎无表达。LC3 表达的心肌细胞为黄色(心肌 actin 蛋白绿色荧光和 LC3 蛋白橙色荧光叠加效果), 如图 2 箭头所示。提示乔松素预处理能明显增加大鼠心肌 IRI 时细胞自噬水平。

2.3 TUNEL 染色结果 乔松素组凋亡细胞明显较模型组减少, 且高剂量组效果更佳。凋亡后的心肌细胞染色为绿色, 如图 3 箭头所示。提示乔松素预处理可能通过抑制心肌细胞凋亡减轻大鼠心肌 IRI。

2.4 乔松素预处理对大鼠心肌凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达的影响 Western blot 结果显示, 与模型组比较, 乔松素组凋亡蛋白 Bax 和 cleaved-Caspase-3 表达均明显减少($P < 0.05$), 其中, 乔松素高剂量组相对于低、中剂量组减少更明显($P < 0.01$), 表明乔松素预处理能明显减轻大鼠心肌 IRI 时细胞凋亡的发生, 与 TUNEL 染色结果一致, 见图 4。

2.5 乔松素预处理对大鼠心肌自噬相关蛋白 LC3-II 和 p62 表达的影响 Western blot 结果显示, 与模型组比较, 乔松素组自噬蛋白 LC3-II 表达均明显增多($P < 0.05$), 其中, 乔松素高剂量组 LC3-II 表达量相对于低、中剂量组增加更明显($P < 0.01$); 与模型组比较, 乔松素组自噬相关蛋白 p62 表达均明显降低($P < 0.05$), 其中乔松素高剂量组 p62 表达量相

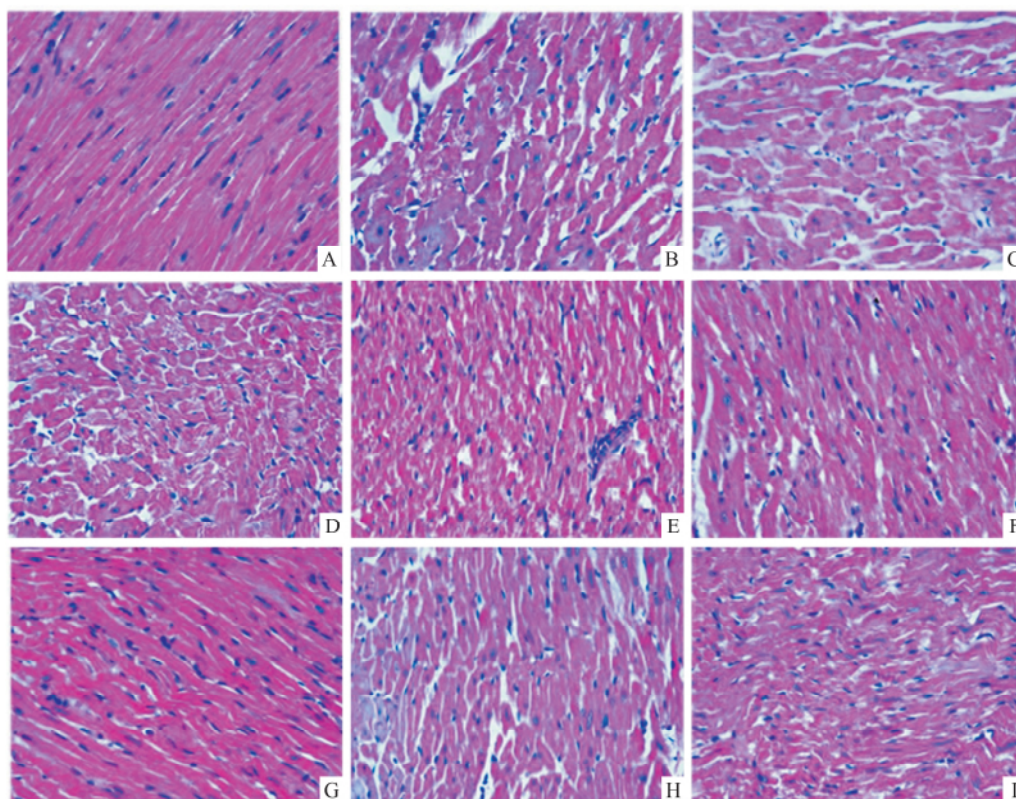


图1 大鼠心肌组织形态学染色 HE ×400

A: 假手术组; B: 模型组; C ~ I: 乔松素 1、3、10、20、30、40、50 mg/kg 组

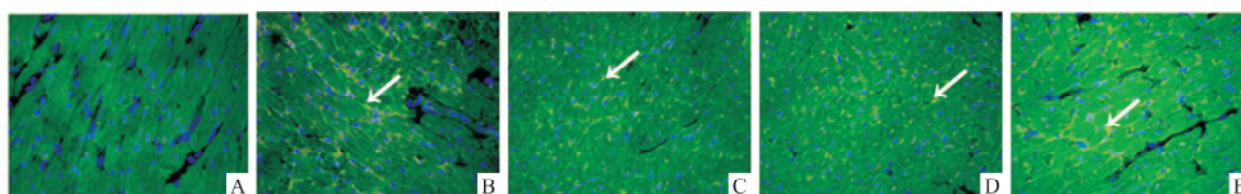


图2 LC3 蛋白免疫荧光染色 ×400

A: 假手术组; B: 模型组; C ~ E: 乔松素 3、10、30 mg/kg 组

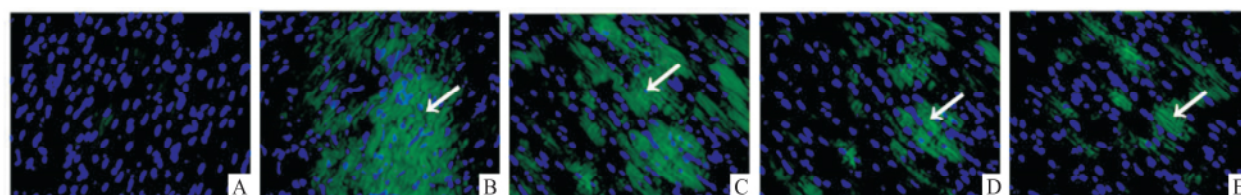


图3 TUNEL 法荧光染色标记凋亡心肌细胞 ×400

A: 假手术组; B: 模型组; C ~ E: 乔松素 3、10、30 mg/kg 组

对于低、中剂量组减少更明显 ($P < 0.01$)。表明乔松素预处理能明显激活并增加大鼠心肌 IRI 时细胞自噬水平, 与免疫荧光染色结果一致, 见图 5。

3 讨论

心肌 IRI 是导致心律失常、心肌梗死、慢性心力

衰竭难以逆转的最主要、最常见的病理损伤, 如何有效预防其发生已成为心血管系统面临的重要难题。研究^[3]表明, 乔松素在大鼠全脑缺血模型中, 能够有效改善大鼠神经行为学评分, 减少神经元死亡和梗死面积, 提高大鼠存活率, 并通过提高线粒体内 ATP 的生成, 有效保护线粒体结构形态, 减少活性氧

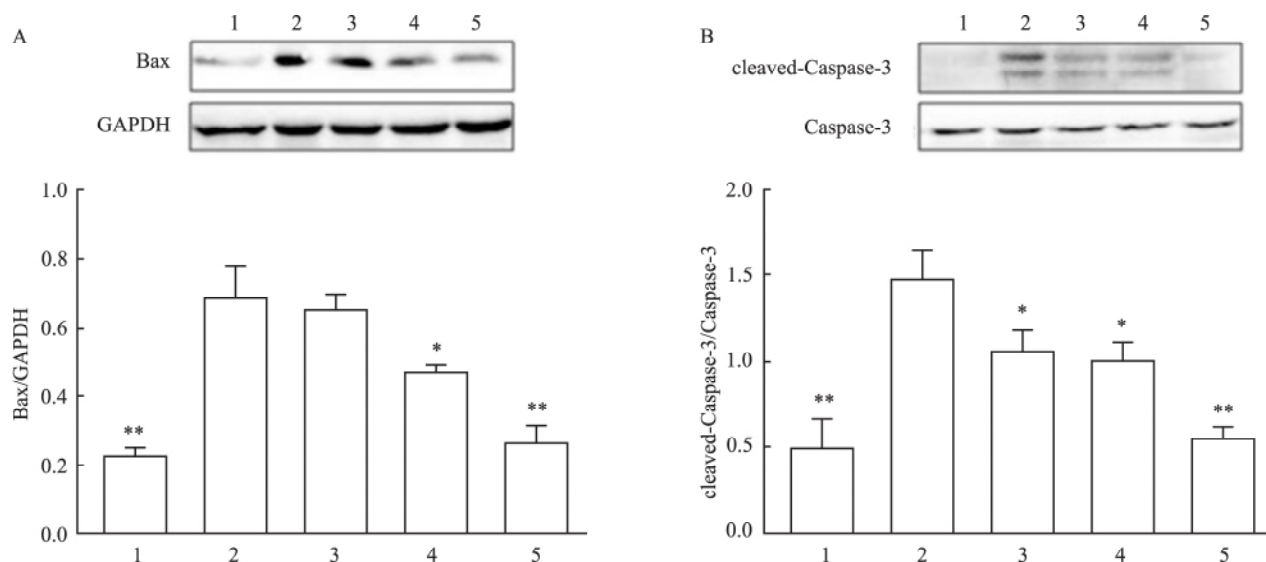


图4 Western blot 法检测凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 在大鼠心肌 IRI 中的表达

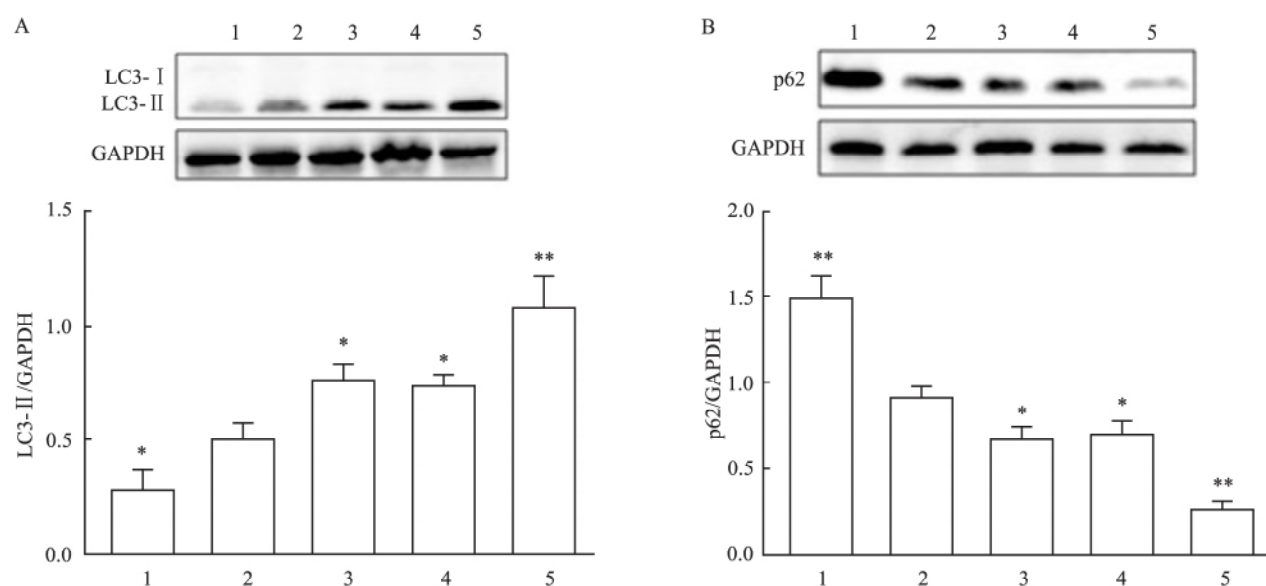
A: Bax; B: Caspase-3; 1: 假手术组; 2: 模型组; 3~5: 乔松素 3、10、30 mg/kg 组; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图5 Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3 和 p62 在大鼠心肌 IRI 中的表达

A: LC3; B: p62; 1: 假手术组; 2: 模型组; 3~5: 乔松素 3、10、30 mg/kg 组; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

生成,从而保护神经细胞拮抗 IRI。研究^[6]还证实了乔松素能够通过保护大鼠微血管内皮细胞,减少脑水肿和血脑屏障通透性,以及减轻血脑屏障超微结构的病理改变抵抗全脑 IRI。本实验显示乔松素能有效改善并减轻心肌 IRI 病理学损伤,并在一定浓度范围内呈剂量依赖性,但浓度过高时可能会因其药物毒性而加重损伤发生,本实验最佳用药剂量为 30 mg/kg 尾静脉给药。TUNEL 染色结果显示乔松素组心肌凋亡细胞数目明显少于模型组; Western blot 结果也进一步提示乔松素组的凋亡蛋白 Bax 和

Caspase-3 表达水平均明显低于模型组,且高剂量组效果更佳,表明乔松素可能通过抑制细胞凋亡拮抗心肌 IRI。

过去认为心肌细胞丢失的机制主要涉及心肌细胞的坏死与凋亡,近年来,随着对细胞死亡方式的更深层次的理解和探究,另一种细胞死亡方式—自噬,也参与该过程,其是细胞降解损伤的细胞器和多余蛋白质等物质的主要途径^[7]。乔松素已被证实在大鼠 IRI 大鼠模型中能有效提高大鼠行为学评分,减轻脑水肿及脑梗死面积,其保护机制可能与抑制凋

亡和激活细胞自噬有关^[4]。本实验中乔松素组的自噬标志蛋白 LC3 表达明显高于模型组, p62 明显低于模型组, 并且呈剂量依赖性。免疫荧光染色提示乔松素组 LC3 蛋白表达水平明显高于模型组和假手术组, 表明乔松素能有效激活细胞自噬, 并呈剂量依赖性, 提示可能通过激活自噬参与拮抗心肌梗死 IRI, 推测可能与改善能量平衡代谢障碍、清除代谢废物、减少氧自由基形成及参与抑制细胞凋亡有关, 具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 潘国焰, 林 荣. 心肌缺血/再灌注损伤保护作用机制的研究[J]. 医学综述 2013, 19 (8): 1368-72.
- [2] 位 凯, 王 飞, 张 瑾, 等. 天麻素预处理减轻大鼠心肌梗死再灌注损伤的可能机制[J]. 安徽医科大学学报 2014, 49 (6): 756-8.
- [3] 时丽丽, 强桂芬, 高 梅, 等. 匹诺塞林对脑线粒体呼吸功能的促进作用[J]. 药学通报 2011, 46 (6): 642-9.
- [4] Zhao G, Zhang W, Li L, et al. Pinocembrin protects the brain against ischemia-reperfusion injury and reverses the autophagy dysfunction in the penumbra area [J]. *Molecules* 2014, 19 (10): 15786-98.
- [5] Wang S B, Pang X B, Gao M, et al. Pinocembrin protects rats against cerebral ischemic damage through soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids [J]. *Chin J Nat Med* 2013, 11 (3): 207-13.
- [6] Meng F, Liu R, Gao M, et al. Pinocembrin attenuates blood-brain barrier injury induced by global cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Brain Res* 2011, 1391: 93-101.
- [7] 赵红星, 丁佩山, 刘荣玉. 吞噬及饥饿诱导巨噬细胞自噬对其吞噬功能的影响[J]. 安徽医科大学学报 2011, 46 (5): 401-4.

The protective effect of pinocembrin pre-conditioning on rats after myocardial ischemic-reperfusion injury

Zhou Zhen¹, Ma Mengqing¹, Lin Xianhe², et al

(¹The Second Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the protective effect and its mechanism of pinocembrin pre-conditioning on rats after myocardial ischemic-reperfusion injury (IRI). **Methods** 45 male sprague-dawley rats were used for exploring the suitable concentration of the pinocembrin and 80 rats were equally divided into 5 groups: sham group, model group, low, middle, high dose (3, 10, 30 mg/kg) group. The IRI models were set up by ligating rat's left anterior descending coronary artery for 30 minutes then loosening it for 2 hours. Pinocembrin was given 1 hour *via* tail intravenous injection before ischemic-reperfusion. The morphological changes of myocardial tissues were observed by HE staining. The LC3 expression and position were measured by immunofluorescence. The apoptosis of myocardial cells was measured by TUNEL staining. The expression of apoptosis-related protein such as Bax, Caspase-3, p62 and autophagy-related protein LC3 were detected by Western blot. **Results** HE staining showed that the pathological changes of myocardial tissues were improved by pinocembrin and presented a dose-dependence. However, high-dose of drug might bring the drug toxicity. The expression of LC3 was more in the test group than the model group as evidenced by immunofluorescence staining and in a dose dependent fashion. Compared with the model group, the TUNEL-labeled myocardial cells were significantly decreased in pinocembrin groups, and the level of apoptotic cells were negatively related to the pinocembrin concentration. Western blot results showed that Bax, Caspase-3 and p62 in pinocembrin groups were significantly lower than in model group. The levels of apoptotic proteins were negatively related to the pinocembrin concentration. In reverse, compared with the model group, the autophagic-related protein LC3 showed an increasing trend in the pinocembrin groups and presented a positive relation to drug's concentration. **Conclusion** The results indicate that the pinocembrin pre-conditioning shows the protective effect on rats after myocardial IRI. The mainly protective mechanisms are possibly related to the inhibition of apoptosis and activation of autophagy.

Key words pinocembrin; myocardial ischemic-reperfusion; cell apoptosis; autophagy