

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.12.006

文章编号: 1005-8982(2017)12-0030-05

芪参益气滴丸对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究

陈君¹, 李蕾², 陈国华³, 刘传亮², 李文通¹

(1. 潍坊医学院 研究生院, 山东 潍坊 261042; 2. 山东省潍坊市人民医院 保健三科, 山东 潍坊 261041; 3. 山东省潍坊市人民医院 健康管理中心, 山东 潍坊 261041)

摘要: **目的** 探讨芪参益气滴丸(QS)对大鼠心肌缺血再灌注时, 心肌细胞尿路上皮癌抗原 1(UCA1)长链非编码 RNA、凋亡及凋亡相关基因表达的影响。 **方法** 结扎 SD 大鼠冠状动脉左前降支, 造成心肌缺血 40 min 后剪断结扎线, 再灌注 120 min, 复制实验性心肌缺血再灌注模型, 将 36 只大鼠随机分为假手术组(只穿刺不结扎, Control 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、QS 干预组(QS+I/R 组), 术后采用原位末端标记法检测心肌细胞凋亡指数, 采用荧光定量聚合酶链反应分析并检测 3 组大鼠心脏组织中 UCA1 的表达, Western blot 检测 p27 蛋白表达水平。 **结果** QS+I/R 组的细胞凋亡数与 I/R 组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与 I/R 组比较, QS+I/R 组 UCA1 整体表达水平上升, 而 p27 蛋白减少($P<0.05$); 并且 UCA1 与 p27 蛋白的表达呈负相关。 **结论** QS 能降低大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡率, 其可能通过上调 UCA1 水平, 减少 p27 蛋白表达, 保护损伤的心肌细胞。

关键词: 芪参益气滴丸; 心肌缺血再灌注; 细胞凋亡; 尿路上皮癌抗原 1; p27 蛋白

中图分类号: R285

文献标识码: A

Protective effect of Qishenyiqi Dripping Pills on rats with myocardial ischemia-reperfusion injury

Jun Chen¹, Lei Li², Guo-hua Chen³, Chuan-liang Liu², Wen-tong Li¹

(1. Graduate School, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261042, China; 2. The Third Department of Health, 3. Health Management Center, Weifang People's Hospital of Shandong, Weifang, Shandong 261041, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Qishenyiqi Dripping Pills on urothelial carcinoma antigen 1 (UCA1) lncRNA, apoptosis and apoptosis related gene expression of myocardial cells in rats with myocardial ischemia reperfusion. **Methods** Ischemia reperfusion injury model of SD rats was established by ligating left anterior descending branch of coronary artery for 40 min followed by reperfusion for 120 min. Thirty-six rats were randomly divided into sham operation group (only puncture without ligation), ischemia-reperfusion group (IR group) and Qishenyiqi intervention group (QS+IR group). After operation, the apoptosis index was detected by TUNEL method; fluorescence quantitative PCR technique and Western blot were used to detect the expression levels of UCA1 and p27 protein respectively. **Results** The number of apoptosis in the QS+IR group was significantly smaller than that in the IR group ($P<0.05$). The overall level of UCA1 expression significantly increased and p27 protein markedly decreased in the QS+IR group compared with the IR group ($P<0.05$); and the expression of UCA1 was negatively correlated with the expression of p27 protein. **Conclusions** Qishenyiqi Dripping Pills can reduce myocardial apoptosis rate in rats with myocardial ischemia and reperfusion, which may protect the injured myocardial cells by increasing the level of UCA1 and reducing the expression of p27

protein.
Keywords: Qishenyiqi Dropping Pill; myocardial ischemia reperfusion; apoptosis; urothelial carcinoma antigen 1; p27 protein

缺血性心脏病是冠状动脉疾病死亡的最常见原因。对缺血心肌的血流再恢复虽然能降低整体死亡率,但是增加了再灌注损伤,即心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI),这极易导致心力衰竭、心律失常,甚至猝死,严重影响患者心功能。目前,中药制剂防治 MIRI 研究已取得长足进展^[1-2]。大量研究表明,芪参益气滴丸(qishenyiqi dripping pills, QS)对 MIRI 具有一定保护作用^[3],但其作用机制却少有研究。本实验以 SD 大鼠复制 MIRI 模型,进一步探索研究芪参益气滴丸对 MIRI 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 复制心肌缺血再灌注模型

健康雄性 SD 大鼠 36 只,体重 210 ~ 240g,由潍坊医学院基础实验室提供。36 只大鼠随机分成 3 组,即假手术组(Control 组)、缺血再灌注组(I/R 组)及芪参益气滴丸(天津天士力股份有限公司)干预组(QS+I/R 组)。常规复制大鼠缺血再灌注模型^[4]。Control 组只穿线不结扎,用生理盐水灌胃,3 次/d,持续 4 周;I/R 组:缺血 40 min 后再灌注 120 min,复制心肌缺血再灌注模型前给予生理盐水灌胃,3 次/d 灌服,连续 4 周;QS+I/R 组:复制模型同 I/R 组,复制模型前给予芪参益气滴丸 1.5 g/(kg·次)灌胃,溶于 2 ml 生理盐水中,3 次/d 灌胃,连续灌服 4 周。

1.2 观察指标

1.2.1 心肌细胞凋亡测定 大鼠再灌注后 2%戊巴比妥钠麻醉(40 mg/kg,腹腔注射),采取静脉血 2.5 ml,快速取出心脏,摘除血管、脂肪等多余组织,10%甲醛固定,30%蔗糖脱水,取心肌组织约 5 mm 厚,石蜡包埋,制成 5 μm 切片。每只大鼠随机取 5 张切片,根据末端脱氧核苷酸转移酶介导的带荧光的 dUTP 缺口末端标记法,严格照说明书步骤对进行操作。切片放置光镜下观察,高倍镜下正常心肌细胞核呈深蓝色,显示棕色核者为凋亡细胞(见图 1)^[5]。细胞凋亡测定设备购自德国宝灵曼公司。每张切片中各选取 5 个高倍镜下视野,观察并计算心肌细胞凋亡率(心肌细胞凋亡率 = 镜下心肌细胞凋亡数 / 镜下心肌细胞总数 × 100%)。

1.2.2 心肌组织中尿路上皮癌胚抗原 1(urothelial carcinoma antigen 1, UCA1) 的表达 提取新鲜心肌组织中总 RNA,逆转为 cDNA 后,采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析并检测 3 组大鼠心脏组织中 UCA1 的表达,具体操作步骤参考文献[6]。

1.2.3 Western blot 检测 p27 蛋白的表达 各组大鼠处死后取出心脏,取结扎线以下的左心室心肌组织,加入蛋白裂解液中研磨,取其变性后的上清液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白转至聚偏氟乙烯膜,10%脱脂奶粉、三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline and tween 20, TBST)洗涤,加入 p27 一抗,4℃过夜,加入相应二抗孵育 30 min,用增强化学发光法试剂显影,凝聚成像系统进行扫描处理。Quality one 软件对显色后结果进行灰度分析,并计算出 p27 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,方差齐则两两比较用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪参益气滴丸对大鼠心肌细胞凋亡的影响

在荧光显微镜下, I/R 组、QS+I/R 组及 Control 组细胞凋亡率比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。QS+I/R 组大鼠的细胞凋亡率低于 I/R 组,但两组均高于 Control 组。见附表和图 1、2。

附表 3 组大鼠心肌细胞凋亡率、UCA1 及 p27 蛋白表达的比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率/%	UCA1	p27 蛋白
Control 组	2.34 ± 0.25	1.03 ± 0.13	0.58 ± 0.08
I/R 组	10.03 ± 0.97	0.39 ± 0.04	1.23 ± 0.12
QS+I/R 组	4.18 ± 0.59	0.72 ± 0.11	0.75 ± 0.10
F 值	8.330	26.590	10.350
P 值	0.002	0.007	0.015

2.2 芪参益气滴丸对大鼠心肌细胞 UCA1 表达水平的影响

I/R 组、QS+I/R 组及 Control 组长链非编码 RNA (long noncoding RNA, LncRNA)UCA1 表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。QS+I/R 组和 I/R 组大鼠 UCA1 表达较 Control 组下降,但 QS+I/R 组大鼠 UCA1 表达下降程度低于 I/R 组。见附表和图 3。

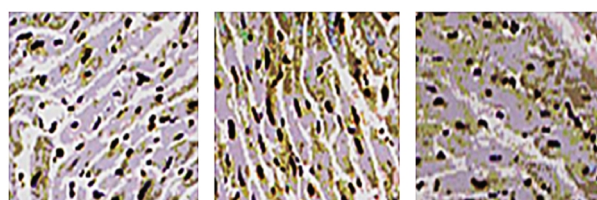


图 1 3 组大鼠心肌细胞凋亡情况 (荧光显微镜 $\times 200$)

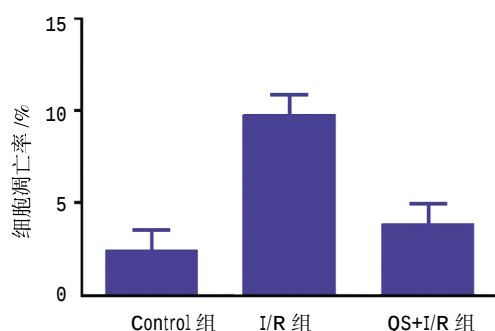


图 2 3 组大鼠心肌细胞凋亡率比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

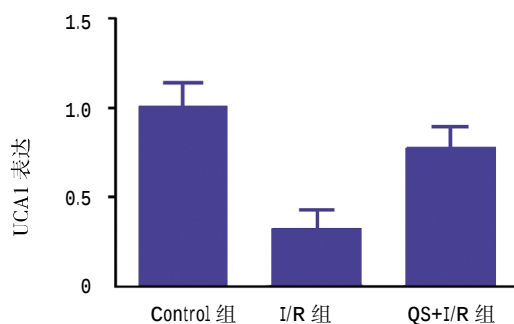


图 3 3 组大鼠心肌细胞 UCA1 相对表达量 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

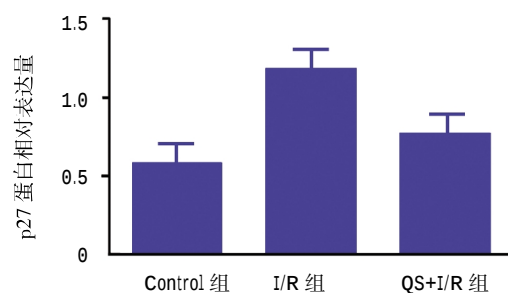


图 4 3 组大鼠心肌细胞 p27 蛋白相对表达量 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

2.3 芪参益气滴丸对大鼠心肌细胞 p27 蛋白表达的影响

I/R 组、QS+I/R 组及 Control 组 p27 蛋白表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。QS+I/R 组和 I/R 组大鼠 p27 蛋白表达较 Control 组升高,但 QS+I/R 组大鼠 p27 蛋白表达水平低于 I/R 组。见附表和图 4、5。

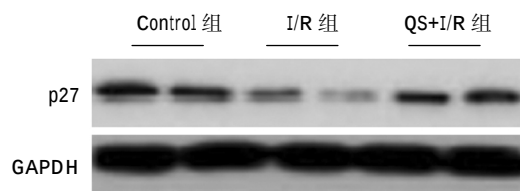


图 5 p27 蛋白的表达

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是临床上冠状动脉内溶栓、冠状动脉搭桥及心血管介入治疗中常见的严重并发症,其发生机制复杂^[7]。研究发现,细胞凋亡参与 MIRI 过程,并在缺血再灌注诱导的病理过程中发挥重要作用^[8]。抑制心肌细胞凋亡可显著缩减 I/R 后心肌梗死体积,减轻心肌损伤,改善心功能^[9-10]。因此,减少或抑制 MIRI 中心肌细胞凋亡,对临床治疗和预防 MIRI,改善心肌梗死患者预后具有重要意义。最新研究发现,LncRNA UCA1 可通过下调肿瘤抑制基因 p27,对心肌细胞凋亡产生影响^[11]。这对研究 MIRI 中有关参与调节细胞凋亡程序的分子成分提供新的视角。

LncRNA UCA1 是最近几年发现的一种长链非编码 RNA,其最早在人膀胱移行细胞癌中发现,并在膀胱癌患者的尿液中检出^[12]。在正常成人中,UCA1 基因仅在心脏、脾脏表达,并且心脏表达水平较高,表明其可能是潜在的心血管疾病的标志物^[13-14]。有研究表明,在膀胱恶性肿瘤细胞中,膀胱癌细胞中 UCA1 下调能够降低膀胱癌细胞的增殖,促进细胞凋亡,提示心肌组织中 UCA1 表达下调可能起抑制心肌细胞增殖,促进心肌细胞凋亡的作用,表明 UCA1 可能在心脏保护方面发挥重要作用^[15]。

p27 蛋白作为一种肿瘤抑癌基因,可参与多种基因和蛋白的调控,主要是通过抑制细胞周期或者其他不确定机制来实现^[16],TAMAMORI-ADACHI 等^[17]报道,p27 蛋白表达的下调能够促进大鼠新生心肌细胞的增殖。本研究结果表明,I/R 组大鼠不仅细胞凋

亡数增加,而且心肌细胞 p27 蛋白表达也上升,提示 p27 上调与细胞凋亡紧密相关。有研究证实,p27 蛋白的过度表达抑制心肌活性,促进细胞凋亡^[18]。

本实验中笔者发现,UCA1 水平在大鼠缺血性心肌再灌注后降低,而 p27 蛋白的表达却增加,p27 蛋白的过度表达抑制心肌活性,促进细胞凋亡。研究表明,p27 引发细胞凋亡机制与 Caspase-3 的激活有一定关联^[19]。心肌细胞凋亡潜在的确切分子机制可能包括依赖于 UCA1 下调的 p27 过度表达^[14]。

参益气滴丸是纯中药制剂,是中医理论上取自黄芪、丹参、降香及三七 4 味中药精制而成的益气活血处方。方中重用黄芪为君,取其补气血、促血行和培元固本之效;丹参活血调血,兼养心血,安神定志,用之为臣;三七活血散瘀,助丹参祛瘀止痛,为佐药;最后辅以降香行气解郁,温通行滞。诸药合用,发挥良好协同作用,起到通络止痛、益气活血之效。现代药理学研究表明,黄芪能够增强心肌收缩,扩张冠状动脉,并能够使患者的血浆内皮素、肿瘤坏死因子、心钠素、血管紧张素下降,有效修复心肌供血,调理患者血压,对缺血心肌有保护作用^[20]。丹参具有抗氧化、清除自由基和抑制细胞内钙超载、维持心肌能量代谢、减少血小板聚集、降低血液黏度、降低细胞凋亡因子的表达等作用,有效缓解冠状动脉痉挛,改善心肌血供和代谢,临床广泛应用于心血管疾病的治疗^[21]。三七中的三七总皂成分具有扩张冠状动脉、增加冠状动脉血流量的作用,还能够降低血压,改善心肌供血,提高心功能;降香能够降低炎症反应,抑制细胞坏死,抑制血栓形成,改善局部微循环^[22-23]。综上所述,芪参益气滴丸通过多层面、多体系的参与,对心肌缺血再灌注损伤起到一定保护作用。

本研究重点观察芪参益气滴丸对缺血再灌注模型大鼠心肌 UCA1 和 p27 蛋白表达的影响,结果显示,芪参益气滴丸治疗组的细胞凋亡数少于 I/R 组。与 I/R 组比较,QS+I/R 组 UCA1 表达水平上升,同时 p27 蛋白降低。并且发现 UCA1 与 p27 蛋白的表达呈负相关,提示芪参益气滴丸可能通过上调 UCA1 水平,减少 p27 蛋白表达,减少心肌细胞凋亡。已有研究证实,UCA1 可通过下调肿瘤抑制基因 p27,对心肌细胞凋亡产生影响^[14]。

综上所述,芪参益气滴丸可减少心肌细胞凋亡,对缺血再灌注心肌损伤有一定保护作用,其作用机制

可能与上调 UCA1 水平、减少 p27 蛋白表达相关。

参 考 文 献:

- [1] GINISTY H, SICARD H, ROGER B, et al. Structure and functions of nucleolin[J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 6): 761-772.
- [2] 李伟,沈明勤,陆晓晖.中药防治心肌缺血再灌注损伤作用机制的研究进展[M]. 中华中医药杂志, 2011, 26(3): 549-553.
- [3] 林色奇,韩晶岩,刘红宁.芪参益气滴丸及其组成中药抗缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(6): 96-100.
- [4] 马瑞松,江洪,李元红,等.青蒿素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其作用机制探讨[J]. 海南医学, 2016, 27(11): 1734-1736.
- [5] GAVRIELI Y, SHERMAN Y, SHMUEL A, et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119: 493-501.
- [6] 李芳,李旭,王帆,等.荧光定量 PCR 检测 UCA1 mRNA 方法学建立及临床评估[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(3): 171-176.
- [7] TURER AT, HILL JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy[J]. Am J Cardiol, 2010, 106(3): 360-368.
- [8] SMITH C C, DAVIDSON S M, LIM S Y, et al. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2007, 21: 227-233.
- [9] LEE P, SATA M, LEFER D J, et al. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(2): H456-H463.
- [10] BROCHERIOU V, HAGEGE A A, OUBENAISSA A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury[J]. J Gene Med, 2000, 2(5): 326-333.
- [11] LIU Y, ZHOU D, LI G, et al. Long non coding RNA-UCA1 contributes to cardiomyocyte apoptosis by suppression of p27 expression[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(5): 1986-1998.
- [12] WANG X S, ZHANG Z, WANG H C, et al. Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(16): 4851-4858.
- [13] GAZZAR M, CHURCH A, LIU T, et al. MicroRNA-146 regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- α during TLR4-induced gene reprogramming[J]. J Leukoc Biol, 2011, 90: 509-519.
- [14] WANG X S, ZHANG Z, WANG H C, et al. Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(16): 4851-4858.
- [15] EL GAZZAR M, CHURCH A, LIU T, et al. MicroRNA-146 regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- α during TLR4-induced gene reprogramming [J]. J Leukoc Biol, 2011, 90: 509-519.
- [16] 张欣,张志刚. p27 基因和蛋白表达的调控及其在肿瘤发生机制

- 中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009, 29(2): 170-174.
- [17] TAMAMORI-ADACHI M, HAYASHIDA K, NOBORI K, et al. Down-regulation of p27Kip1 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear ex-pression of cyclin D1 and CDK4. Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation[J]. J Biol Chem, 2004, 279(48): 50429-50436.
- [18] SUN Y, WANG Y, YIN Y, et al. GSTM3 reverses the resistance of hepatoma cells to radiation by regulating the expression of cell cycle/apoptosis-related molecules [J]. Oncology Letters, 2014, 8: 1435-1440.
- [19] HUANG J, ZHOU N, WATABE K, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumorgrowth by suppression of p27 (Kip1)[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: DOI: 10.1038/cddis.2013.541.
- [20] 李玉萍, 顾兵, 刘建涛. 丹参酮 IIA 的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1770-1772.
- [21] 蒙定水, 赵清雨. 活血化瘀法在冠心病心绞痛治疗中的重要作用[J]. 吉林中医药, 2005, 10(8): 16-18.
- [22] 李晓红, 吴小刚. 芪参益气滴丸治疗慢性充血性心力衰竭疗效观察[J]. 临床合理用药, 2010, 3(15): 41-42.
- [23] 贾海莲. 芪参益气滴丸对缺血性心脏病心力衰竭患者心功能及 NT-proBNP 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 228-230.
- (童颖丹 编辑)