

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.007

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20181227.1741.010.html(2018-12-28)

槲栎总黄酮对心肌梗死大鼠心肌损伤的保护作用及对 JNK 和 NF- κ B 通路的影响*

孙治霞,索红亮,王丽辉

(河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院重症医学科,郑州 450002)

[摘要] **目的** 探究槲栎总黄酮(COMF)对心肌梗死大鼠心肌损伤的保护作用及机制。**方法** 构建急性心肌梗死大鼠模型,随机分为 5 组,每组 20 只,sham 组和模型组灌胃给蒸馏水 10 μ L/g;阿托伐他汀钙片(ACT)组灌胃给予 ACT 8 mg/kg;槲栎总黄酮低剂量组(L-COMF)和槲栎总黄酮高剂量组(H-COMF)组分别灌胃给予槲栎总黄酮 80 μ g/g 和 160 μ g/g,连续给药 3 周。氯化三苯基四氮唑红(TTC)染色法检测心肌梗死面积;血流动力学检测心功能;苏木精-伊红(HE)染色检测组织学变化;TUNEL 法检测心肌细胞凋亡;酶链免疫吸附试验(ELISA)检测肿瘤坏死因子(TNF)- α 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平;Western blot 分析核因子(NF)- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)活性。**结果** 与 sham 组相比,模型组大鼠心肌梗死面积、TUNEL 阳性细胞数、TNF- α 和 MCP-1 水平、NF- κ B、p-ERK1/2、p-C-Jun N-末端激酶(JNK)、p-p38 MAPK、Bax 蛋白表达显著升高,Bcl-2 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比,ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠心肌梗死面积、TUNEL 阳性细胞数、TNF- α 和 MCP-1 水平、NF- κ B、p-JNK、Bax 蛋白表达显著降低,Bcl-2 蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。与 sham 组相比,模型组大鼠平均动脉压(MAP)、左心室收缩压(LVSP)显著降低,左心室舒张末压(LVEDP)显著升高,同时左室内压上升最大速率(LV+dp/dtmax)显著降低,左室内压下降最大速率(LV-dp/dtmax)显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠 MAP、LVSP 显著升高,LVEDP 显著降低,同时 LV+dp/dtmax 显著升高,LV-dp/dtmax 显著降低($P < 0.05$)。**结论** 槲栎总黄酮能够对心肌梗死大鼠心肌损伤发挥保护作用,这可能是通过抑制 JNK 和 NF- κ B 信号通路,从而下调心肌梗死引起的炎症损伤和细胞凋亡来实现的。

[关键词] 槲栎总黄酮;心肌梗死;心肌损伤;核因子- κ B;C-Jun N-末端激酶信号通路

[中图分类号] R285.5,R542.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)10-1646-06

Protective effects of total flavonoids of *Cydonia Oblonga* Mill on myocardial injury in myocardial infarction in rats and its effect on JNK and NF- κ B pathway*

SUN Zhixia, SUO Hongliang, WANG Lihui

(Department of Critical Care Medicine, Henan Traditional Chinese Medicine Hospital / the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of total flavonoids of *Cydonia Oblonga* Mill (COMF) on myocardial injury in myocardial infarction in rats and its possible mechanism. **Methods** Rat model of acute myocardial infarction was established and randomly divided into 5 groups, 20 rats in each group. The sham group and model group were given the intragastric administration of distilled water 10 μ L/g. The atorvastatin calcium tablets (ACT) group was given orally atorvastatin 8 mg/kg. The low-dose COMF (L-COMF) group and high-dose COMF (H-COMF) group were given COMF as 80 μ g/g and 160 μ g/g respectively, continuous intragastric administration for 3 weeks. The area of myocardial infarction was determined by TTC staining. And cardiac function was determined by hemodynamic detection. Histological changes were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. TUNEL assay was used to detect the apoptosis of myocardial cells. Enzyme chain immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and monocyte chemokine protein-1 (MCP-1) levels. Western blot was performed to analyze the activities of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPKs). **Results** Compared with the sham group, area of myocardial infarction, TUNEL positive cells, TNF- α and MCP-1, NF- κ B, p-ERK1/2, p-JNK, p-p38 MAPKs, Bax

* 基金项目:2018 年河南省科技研发专项经费项目(182102310084)。 作者简介:孙治霞(1980—),主治医师,硕士,主要从事心血管病研究。

expression in the ACT, L-COMF and H-COMF group significantly increased, Bcl-2 protein expression significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, area of myocardial infarction, TUNEL positive cells, TNF- α and MCP-1, NF- κ B, p-ERK1/2, p-JNK, Bax expression in the ACT, L-COMF and H-COMF group significantly decreased, Bcl-2 protein expression significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the sham group, mean arterial pressure (MAP), left ventricular systolic pressure (LVSP) and LV+dp/dtmax significantly decreased, while LV-dp/dtmax were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, MAP, LVSP and LV+dp/dtmax significantly increased, while LVEDP and LV-dp/dtmax significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** COMF plays a protective role in the myocardial injury of myocardial infarction rats, which may be through inhibition of JNK and NF- κ B signaling pathways and down-regulating the inflammatory injury and cell apoptosis induced by myocardial infarction.

[Key words] trichosanthes total flavonoids; myocardial infarction; myocardial injury; nuclear factor- κ B; C-Jun N-terminal kinase signaling pathway

急性心肌梗死是心血管疾病死亡的重要原因之一,其发病率和病死率呈逐年上升趋势^[1]。研究表明,急性心肌梗死的发病机制与遗传、氧化应激、炎症等心血管疾病危险因素密切相关,多种细胞信号通路在心肌梗死期间和之后发生的病理变化中起重要作用^[2]。核因子- κ B(NF- κ B)作为重要的细胞转录因子,是炎症反应和氧化应激反应的关键环节。C-Jun N-末端激酶(JNK)信号通路作为丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号转导通路之一,参与多种心血管疾病的发病机制。研究证实,从植物中提取的天然黄酮类化合物对急性心肌梗死大鼠心肌损伤具有保护作用^[3]。榅桲(Cydonia Oblonga Mill)是蔷薇科榅桲属灌木植物,富含鞣质、有机酸、黄酮等多种药用化学成分,其中榅桲提取物总黄酮能抗炎、抗氧化、抗血栓,同时还能改善自发性高血压大鼠的心脏结构和功能^[4-5]。但是,榅桲总黄酮对急性心肌梗死大鼠的保护作用及其相关机制尚不明确。本研究通过结扎左冠状动脉前降支构建心肌梗死大鼠模型,观察榅桲总黄酮对心肌梗死大鼠的心肌保护作用,并初步探讨可能的作用机制,以期为其临床应用提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特殊病原体(SPF)级成年雄性SD大鼠购自北京生命科学研究所以,体质量280~320 g,7~8周龄,合格证号:YXK(京)2015-0002。所有实验程序均经本院伦理委员会批准,并按照国家有关规定进行。

1.1.2 原材料及药品 榅桲叶购自张仲景大药房,经河南食品药品检验所检验为真品。阿托伐他汀钙片(ACT)购自北京嘉林药业股份有限公司,国药准字H20093819,批号201502。

1.1.3 主要试剂及仪器设备 水合氯醛购自美国Sigma公司,批号47335;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自英国Abcam公司,批号ab66108;DAPI购自英国Abcam公司,批号104139;TRIzol购自美国Sigma-

Aldrich公司,批号T9424;蛋白浓度测定试剂盒购自美国Solarbio公司,批号PC0030;RIPA裂解液购自碧云天生物技术研究所,批号P0013;大鼠p-细胞外信号调节激酶(ERK,批号sab1306604)、p-JNK(批号sab1305600)、p-p38 MAPK(批号sab4301534)、NF- κ B p68(批号HPA023128)、 β -actin(批号A1978)、Bax(批号sab2108447)、Bcl-2(批号srp0186)抗体购自Sigma-Aldrich公司;肿瘤坏死因子(TNF)- α 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号hz-0011c),单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)采用ELISA试剂盒(批号h-0253c),购自上海沪震实业有限公司。倒置显微镜CKX41购自日本Olympus公司;离心机购自无锡瑞江离心机厂;凝胶成像系统购自美国UVP公司;核酸蛋白定量仪K5500购自北京凯奥公司;电泳仪DYCZ-24DN购自北京六一仪器厂;Powerwave XS酶标仪购自中国基因有限公司;酶联免疫检测仪购自南京德铁实验设备有限公司;CM3050S冷冻切片仪购自美国Buffalo Grove公司。

1.2 方法

1.2.1 榅桲总黄酮的制备 榅桲叶洗净干燥后粉碎过筛,经石油醚脱脂后真空干燥。将干燥粉末经10倍量75%乙醇超声提取3次,真空干燥。加水溶解过滤后,洗脱3次,浓缩、干燥后得到总黄酮精制品,测定榅桲总黄酮纯度为66.75%。

1.2.2 急性心肌梗死大鼠模型制备 根据参考文献[6]建立急性心肌梗死模型。腹膜内注射戊巴比妥钠(40~60 mg/kg)使大鼠充分麻醉后,行左胸廓切开术。用6-0无菌丝线距左冠状动脉前降支根部1~2 mm结扎。当结扎部位下面的左心室颜色由红色变为白色时,证实结扎成功。假手术组(sham, $n=20$)不进行冠状动脉结扎。

1.2.3 动物分组及给药 将冠状动脉结扎后存活大鼠80只随机分成4组,每组20只:模型组、阿托伐他汀组(ACT组)、榅桲总黄酮低剂量组(L-COMF)和榅桲总黄酮高剂量组(H-COMF)。术后3 d开始,根据参考文献[7-8]对各组大鼠进行药物处理。sham组和

模型组灌胃给蒸馏水 10 $\mu\text{L/g}$; ACT 组:灌胃给予阿托伐他汀 8 mg/kg, 给药剂量按照人与大鼠体表面积折算等效剂量; L-COMF 组:灌胃给予槭梓总黄酮 80 $\mu\text{g/g}$; H-COMF 组:灌胃给予槭梓总黄酮 160 $\mu\text{g/g}$ 。每组大鼠每日灌胃给药 1 次, 灌胃容积为 10 $\mu\text{L/g}$, 连续给药 3 周。

1.2.4 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色 给药 3 周后, 各组分别取 10 只大鼠, 取出心脏, 冷生理盐水洗涤后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。将心脏置于 1% 氯化三苯基四氮唑红(TTC)中孵育 10 min 后, 经 4% 多聚甲醛固定 24 h, 选取周长最长切片使用 Image J 进行扫描并计算梗死区域面积和缺血危险区面积(AAR), 心肌梗死面积 = 梗死区面积/缺血危险区面积 $\times 100\%$ 。

1.2.5 血流动力学检测 给药 3 周后, 每组各取 10 只大鼠, 经右颈总动脉将导管插入左心室, 记录平均动脉压(MAP)、左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末压(LVEDP)、左心室内压上升最大速率(LV+dp/dtmax)、左心室内压下降最大速率(LV-dp/dtmax)。

1.2.6 标本采集 血流动力学检测完毕后, 腹主动脉取血 3 mL 并迅速取出心脏。将血液置于乙二胺四乙酸(EDTA)管中, 轻轻搅动试管并将血液离心 30 min 后, 将血清标本置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 待测。心脏经生理盐水洗涤后, 剔除非心肌组织部分吸去水分, 一部分取心室周长最大心肌片段, 置于 10% 甲醛缓冲液中固定 24 h 后, 经石蜡包埋待测; 一部分取心肌梗死周围组织, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

1.2.7 组织形态学检测 取石蜡包埋大鼠心肌组织, 经切片(5 μm)、烘烤后, 经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水合, 洗涤后, 经苏木精-伊红(HE)染色, 中性树胶封片后, 于显微镜下观察。

1.2.8 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 使用冷冻切片机将冷冻心肌切片(7 μm), 使用 TUNEL 染色试剂盒对切片进行染色, 根据制造商说明书检测凋亡细胞。心肌细胞用 Desmin 抗体进行染色标记, 细胞核用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色。盖玻片包埋后, 通过倒置激光扫描共聚焦显微镜于 $\times 100$ 倍放大率下进行成像, 使用 Image J 软件定量 TUNEL 阳性核的百分比。

1.2.9 ELISA 检测 TNF- α 、MCP-1 水平 采用

ELISA 检测血清标本中 TNF- α 和 MCP-1 水平, 所有操作均严格按照制造商说明书进行。

1.2.10 Western blot 分析 取冻存心肌梗死周围组织, 提取总蛋白后, 将蛋白质于 15% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜上。3% TBST 封闭后, 与 p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 MAPK、NF- κB p68、 β -actin、Bax、Bcl-2 的一抗孵育后, 与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗孵育, 用增强型化学发光加检测系统进行检测。使用图像分析软件对条带进行量化。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS 21.0 进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 两组间的比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槭梓总黄酮对心肌梗死大鼠发挥心肌保护作用 经 TTC 染色后, 正常心肌组织呈蓝色, 危险区呈砖红色, 坏死区域呈灰白色。模型组大鼠心肌组织可观察到大片灰白色和砖红色区域, ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠心肌组织中灰白色区域和砖红色区域面积有所降低。见图 1。定量分析显示, 与 sham 组[(18.65 \pm 2.91)%]相比, 模型组大鼠心肌梗死面积[(35.82 \pm 4.68)%]显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, ACT 组[(21.36 \pm 4.03)%]、L-COMF 组[(26.42 \pm 3.22)%]、H-COMF 组[(22.18 \pm 3.09)%]大鼠心肌梗死面积显著降低($P < 0.05$)。



图 1 心肌梗死大鼠心肌组织 TTC 染色

2.2 槭梓总黄酮对心肌梗死大鼠心功能的影响 与 sham 组相比, 模型组大鼠 MAP、LVSP 显著降低, LVEDP 显著升高, 同时 LV+dp/dtmax 显著降低, LV-dp/dtmax 显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠 MAP、LVSP 显著升高, LVEDP 显著降低, 同时 LV+dp/dtmax 显著升高, LV-dp/dtmax 显著降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血流动力学变化($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	MAP(mm Hg)	LVSP(mm Hg)	LVEDP(mm Hg)	LV+dp/dtmax(mm Hg/s)	LV-dp/dtmax(mm Hg/s)
sham 组	118.06 \pm 10.73	133.24 \pm 14.93	6.51 \pm 0.94	3 895.72 \pm 288.73	-3 903.18 \pm 254.35
模型组	98.73 \pm 9.06 ^a	110.96 \pm 10.22 ^a	15.01 \pm 3.26 ^a	2 914.06 \pm 300.07 ^a	-2 603.15 \pm 313.24 ^a
ACT 组	117.20 \pm 10.18 ^b	132.54 \pm 12.93 ^b	6.61 \pm 1.35 ^b	3 882.73 \pm 311.36 ^b	-3 894.72 \pm 283.47 ^b
L-COMF 组	109.19 \pm 8.76 ^b	125.33 \pm 11.02 ^b	7.98 \pm 1.54 ^b	3 316.41 \pm 291.64 ^b	-3 179.08 \pm 323.17 ^b
H-COMF 组	116.55 \pm 9.32 ^b	131.68 \pm 12.97 ^b	6.71 \pm 1.16 ^b	3 861.25 \pm 315.73 ^b	-3 885.25 \pm 303.24 ^b

^a: $P < 0.05$, 与 sham 组相比; ^b: $P < 0.05$, 与模型组相比

2.3 组织形态学检测 HE 染色显示, sham 组大鼠观察到正常心肌组织结构, 心肌细胞形态完整, 肌原纤维排列整齐。模型组大鼠观察到心肌细胞破裂、变性、坏死, 心肌纤维排列紊乱、断裂, 并出现炎性细胞浸润, 心肌组织损伤严重。ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠心肌细胞破裂减少, 局部散在心肌细胞坏死, 肌原纤维排列较整齐, 心肌损伤程度减轻。见图 2。

2.4 槲寄生总黄酮对心肌细胞凋亡的影响 Desmin 抗体、TUNEL 和 DAPI 染色共定位证实大多数凋亡细胞为心肌细胞。sham 组大鼠 TUNEL 阳性细胞极少, 而模型组大鼠心肌组织中阳性细胞明显增加, ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠心肌组织中 TUNEL 阳性细胞明显减少(图 3)。定量分析发现, 与 sham 组(每 100 个细胞 0.85 ± 0.06)相比, 模型组大鼠 TUNEL 阳性细胞数(每 100 个细胞 2.11 ± 0.18)显著增加($P < 0.05$)。与模型组相比, ACT 组(每 100 个细胞 0.89 ± 0.06)、L-COMF 组(每 100 个细胞 1.05 ± 0.08)、H-COMF 组(每 100 个细胞 0.91 ± 0.14)大鼠阳性细胞数显著降低($P < 0.05$)。

2.5 槲寄生总黄酮对血清 TNF- α 和 MCP-1 水平的影响 与 sham 组相比, 模型组大鼠 TNF- α 和 MCP-1 水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠 TNF- α 和 MCP-1 水平显著降低($P < 0.05$)。见表 2。

2.6 槲寄生总黄酮对心肌组织中 NF- κ B 表达的影响

与 sham 组(1.01 ± 0.01)相比, 模型组大鼠 NF- κ B 蛋白表达(3.26 ± 0.08)显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比, ACT 组(1.21 ± 0.05)、L-COMF 组(2.96 ± 0.06)、H-COMF 组(1.25 ± 0.06)大鼠 NF- κ B 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。见图 4。

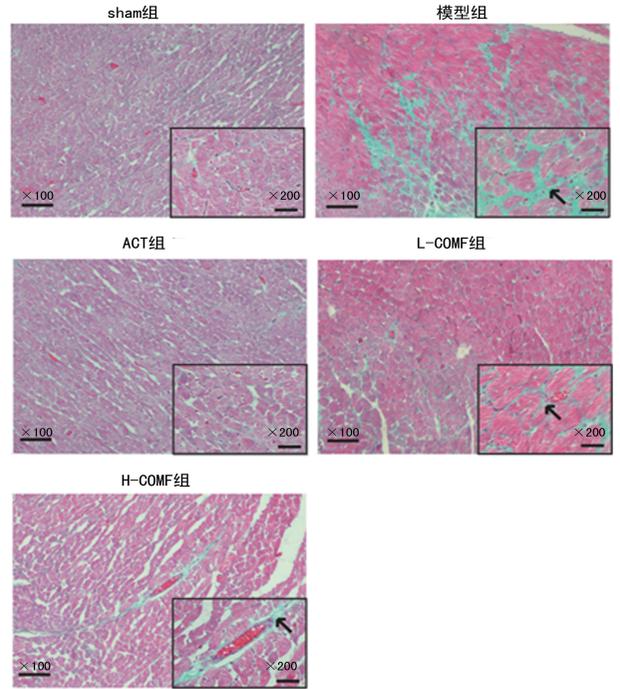


图 2 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

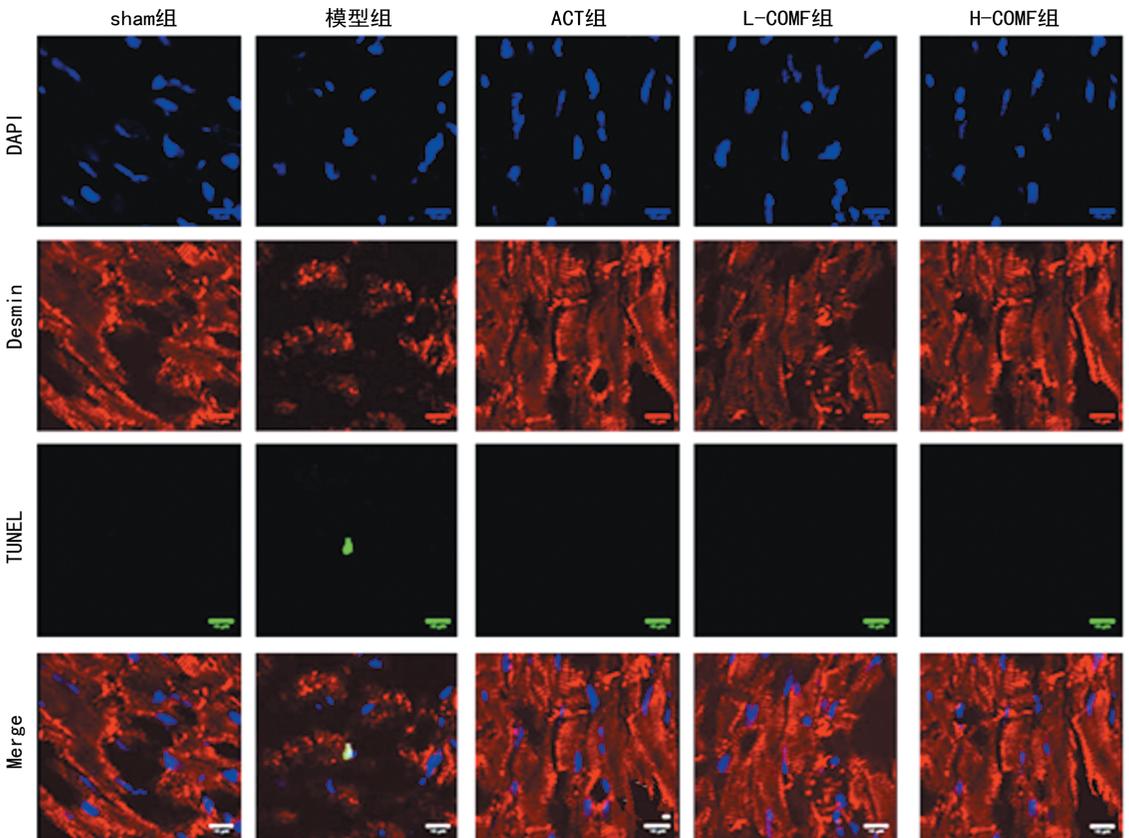


图 3 各组大鼠心肌细胞凋亡的变化($\times 100$)

表 2 各组大鼠炎症相关因子 MCP-1 和 TNF- α 水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	MCP-1 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
sham 组	18.43 \pm 3.66	54.36 \pm 4.52
模型组	38.09 \pm 5.03 ^a	110.71 \pm 8.35 ^a
ACT 组	19.17 \pm 3.13 ^b	56.75 \pm 5.26 ^b
L-COMF 组	28.11 \pm 4.03 ^b	91.33 \pm 7.81 ^b
H-COMF 组	21.24 \pm 3.21 ^b	63.06 \pm 5.11 ^b

^a: $P < 0.05$, 与 sham 组相比; ^b: $P < 0.05$, 与模型组相比

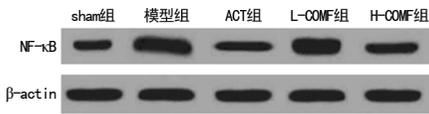


图 4 Western blot 分析 NF- κ B 蛋白表达

2.7 槲寄生总黄酮对心肌组织中 MAPKs 信号通路的影响 与 sham 组相比,模型组大鼠 p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 MAPK 蛋白表达水平均显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组相比,ACT 组、L-COMF 组、和 H-COMF 组大鼠 p-JNK 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。而 L-COMF 组和 H-COMF 组大鼠心肌组织中 p-ERK1/2、p-p38 MAPK 蛋白表达与模型组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),且明显高于 sham 组 ($P < 0.05$)。见图 5、表 3。

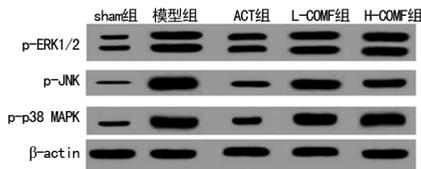


图 5 Western blot 分析 MAPKs 信号通路相关蛋白表达

表 3 各组大鼠心肌组织中 MAPKs 信号通路相关蛋白表达的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	p-ERK1/2	p-JNK	p-p38 MAPK
sham 组	1.00 \pm 0.01	1.01 \pm 0.02	1.00 \pm 0.02
模型组	2.97 \pm 0.09 ^a	4.01 \pm 0.11 ^a	3.02 \pm 0.10 ^a
ACT 组	1.73 \pm 0.08 ^b	1.57 \pm 0.09 ^b	1.18 \pm 0.09 ^b
L-COMF 组	2.95 \pm 0.09 ^a	3.04 \pm 0.10 ^b	2.99 \pm 0.11 ^a
H-COMF 组	2.92 \pm 0.08 ^a	2.64 \pm 0.11 ^b	2.97 \pm 0.10 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 sham 组相比; ^b: $P < 0.05$, 与模型组相比

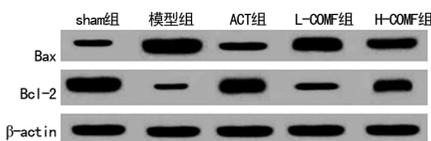


图 6 Western blot 分析心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达

2.8 槲寄生总黄酮对心肌组织 Bax、Bcl-2 表达的影响 与 sham 组相比,模型组大鼠 Bax 蛋白表达显著增加,Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,ACT 组、L-COMF 组、H-COMF 组大鼠 Bax 蛋白表达显著降低,Bcl-2 蛋白表达显著增加 ($P <$

0.05)。见图 6、表 4。

表 4 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2
sham 组	1.01 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01
模型组	3.85 \pm 0.10 ^a	0.21 \pm 0.04 ^a
ACT 组	1.07 \pm 0.09 ^b	0.98 \pm 0.05 ^b
L-COMF 组	3.16 \pm 0.11 ^b	0.40 \pm 0.04 ^b
H-COMF 组	2.33 \pm 0.08 ^b	0.76 \pm 0.04 ^b

^a: $P < 0.05$, 与 sham 组相比; ^b: $P < 0.05$, 与模型组相比

3 讨论

本研究通过结扎左冠状动脉前降支构建急性心肌梗死模型,并用组织学检测观察到心肌梗死大鼠心肌细胞破裂、变性、坏死,心肌纤维排列紊乱、断裂,出现炎性细胞浸润。同时,TUNEL 检测观察到心肌细胞凋亡,提示建模成功。心肌缺血过程中心脏炎症反应的直接后果是引起心肌细胞凋亡,心肌细胞凋亡能够导致心功能受损,是引起左心室重构和心力衰竭的重要因素之一^[9]。本研究发现模型组大鼠 MAP、LVSP 显著降低,LVEDP 显著升高,同时 LV + dp/dtmax 显著降低,LV - dp/dtmax 显著升高,提示心肌梗死大鼠心肌舒缩功能受损和血流动力学异常。心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡、坏死,引起梗死区严重炎症反应,心肌炎性反应进一步加剧心肌细胞凋亡,最终引起心功能失调。同时本研究还发现,槲寄生总黄酮治疗能够降低心肌梗死大鼠危险区和坏死心肌面积,对心肌梗死大鼠有心肌保护作用,可能是由于槲寄生总黄酮能够缓解心脏过度收缩并降低心室舒张压,改善心脏收缩功能,恢复缺血引起的心脏结构改变,从而改善心肌梗死大鼠心功能。上述结果均表明槲寄生总黄酮能够显著改善心肌梗死大鼠炎症反应、心肌细胞凋亡和心功能,从而发挥心肌损伤保护作用,然而具体作用机制尚不明确。

MCP-1 作为主要的趋化因子,能够募集和活化心肌组织中的炎性细胞到达炎症反应部位,从而引发和维持炎症反应,在动脉粥样硬化、心肌梗死、心室重构等心血管疾病中起重要作用^[10-11]。TNF- α 作为一种重要的炎性因子,在衰竭心肌中大量表达,与临床血流动力学严重程度密切相关。研究表明,心力衰竭组织中 TNF- α 高表达能够引起心肌细胞凋亡、心肌肥大和心室重构^[12]。而 NF- κ B 对炎性因子和趋化因子起重要调控作用,NF- κ B 是真核生物中广泛存在的特异性 DNA 结合蛋白,具有多向转录调控作用,在调控心肌缺血引起的炎症反应中起重要作用^[13]。炎性因子能够激活 NF- κ B,使 NF- κ B 从胞质中快速转移至细胞核,同时 NF- κ B 的激活能够进一步诱导包括炎性因子和趋化因子在内的多种靶基因表达,导致细胞凋

亡和组织损伤,从而参与包括冠心病和急性心肌梗死在内的多种病理生理过程^[14-15]。本研究发现,模型组大鼠 TNF- α 和 MCP-1 水平均显著升高,同时 NF- κ B 蛋白表达显著升高,表明心肌梗死后心肌损伤与机体炎症反应有关;经槭寄生总黄酮治疗后, TNF- α 和 MCP-1 水平显著降低,同时心肌组织中 NF- κ B 蛋白表达显著降低。结合过往研究推测,槭寄生总黄酮可能通过降低心肌梗死后炎症相关因子的表达,从而抑制 NF- κ B 活化,而 NF- κ B 活性的抑制又进一步降低炎症因子和趋化因子的表达。

MAPKs 信号途径作为细胞内重要的信号转导通路,能够被炎症介质激活,而激活的 MAPKs 能够连接并激活不同的目标激酶,参与多种级联反应调节,从而参与调控多种生理和病理过程。MAPK 信号转导途径可作用于下游底物 NF- κ B,促进促炎基因的转录。已证实,在哺乳类动物细胞中存在 3 条并行的 MAPK 信号通路:p38 MAPK、细胞外信号调节激酶(ERK)和 JNK,MAPK 上特定氨基酸序列磷酸化可将 3 条通路全部激活,且它们在调控细胞功能时不仅能独自发挥作用,而且能相互交错^[16],且与多种心血管疾病均密切相关^[17-18]。本研究发现,心肌梗死大鼠心肌组织中 ERK1/2、JNK、p38 MAPK 磷酸化水平升高,提示 MAPKs 信号通路活化。经槭寄生总黄酮治疗后,心肌梗死大鼠心肌组织中 JNK 磷酸化水平显著,而 ERK1/2、p38 MAPK 磷酸化水平未发生明显变化,提示槭寄生总黄酮能够阻止心肌梗死引起的 JNK 信号通路活化,而对 ERK1/2、p38 MAPK 信号通路无明显影响。研究发现,JNK 能够被 TNF- α 等炎症细胞因子激活,参与调控心肌细胞凋亡和炎症反应,在心肌损伤中发挥重要作用^[19]。该研究还显示,心肌梗死大鼠 JNK 的活化能够激活 NF- κ B,使其从细胞质易位至细胞核,从而引起炎症损伤和细胞凋亡。结合过往研究推测,槭寄生总黄酮能够通过调控 JNK 信号通路,降低炎症反应和心肌细胞凋亡,改善心肌梗死大鼠心肌功能。

还有研究证实,心肌梗死后心肌细胞凋亡能够导致左心室重构,是引起心力衰竭发生的重要机制,而持续而强烈的炎症反应是引起心肌细胞凋亡的重要原因^[20]。JNK 的激活通过调控凋亡相关 Bcl-2 家族蛋白活性,从而诱导细胞凋亡^[21]。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族最重要的细胞凋亡相关基因,二者结合通过形成异构二聚体或共同调节胞内 Ca²⁺ 浓度从而发挥抗凋亡作用^[22-23]。本研究发现,模型组大鼠 Bax 蛋白表达显著增加,Bcl-2 蛋白表达显著降低,证实心肌梗死后心肌细胞凋亡,而经槭寄生总黄酮治疗后,Bax 蛋白表达显著降低,Bcl-2 蛋白表达显著增加,提示槭寄生总黄酮能够通过调控 Bcl-2 蛋白家族,降低心肌梗死引起的心肌细胞凋亡,发挥心肌保护作用。

综上所述,槭寄生总黄酮能够对心肌梗死大鼠心肌损伤发挥保护作用,这可能是通过抑制 JNK 和 NF- κ B 信号通路,从而下调心肌梗死引起的炎症损伤和细胞凋亡来实现的。然而心肌梗死引起心肌损伤的过程极其复杂,所涉及信号通路及蛋白还需进行深入探究,以期能为疾病的治疗提供更充分的理论依据。

参考文献

- [1] 徐勤勤,单伟超,闫宏伟,等. 心肌梗死患者延续性护理的研究进展[J]. 重庆医学,2015,44(19):2691-2693.
- [2] 栗志勇,张慧,张婷,等. 丹皮酚对急性心肌梗死大鼠氧化应激和内皮型一氧化氮合酶信号通路的影响[J]. 新乡医学院学报,2017,34(5):356-360.
- [3] 刘一杰,薛永常. 植物黄酮类化合物的研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2016,36(9):81-86.
- [4] PRZEMYSŁAW J S, SANDRA M P, SZUMNY A, et al. Quality parameters, bio-compounds, antioxidant activity and sensory attributes of Spanish quinces (*Cydonia oblonga*, Miller)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 165(3): 163-170.
- [5] 周文婷, 马虎, 阿迪力·阿不都热合曼, 等. 槭寄生总黄酮对自发性高血压大鼠心脏结构和功能的影响[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2313-2318.
- [6] 马晓娟, 郭春雨, 张莹, 等. 活血及活血解毒配伍对急性心肌梗死大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(9): 960-963.
- [7] 周文婷, 王雪飞, 郭利娅·伊明, 等. 槭寄生总黄酮对自发性高血压大鼠心肌肥厚的抑制作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1540-1546.
- [8] 赵洋, 李艳. 阿托伐他汀对心肌梗死大鼠心肌损伤的保护作用及机制[J]. 安徽医药, 2016, 20(2): 240-243.
- [9] 马丕勇. 生长激素对缺血性心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[D]. 吉林大学, 2011.
- [10] 蒋易, 燕艳丽, 白建文. CCL21/CCR7 对小鼠急性心肌梗死后炎症反应及梗死面积的影响[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(3): 589-594.
- [11] 姚若花, 杨星, 曹洁. 单核细胞趋化蛋白-1 与动脉粥样硬化关系的研究现状与进展[J]. 西南军医, 2015, 17(4): 419-421.
- [12] 刘中勇, 李林, 方家. 真武汤对心力衰竭模型大鼠心室重构及心肌细胞凋亡、纤维化的影响[J]. 中医杂志, 2017, 58(14): 1218-1223.
- [13] 刘新育, 顾剑民, 薛松. NF- κ B 与心肌缺血再灌注损伤的研究现状及展望[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2016, 32(1): 55-58.
- [14] JING C, HONG J, JIAN Y, et al. Down-regulation of CREB-binding protein expression blocks thrombin-mediated endothelial activation by inhibiting acetylation of NF- κ B[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 154(2): 147-152.
- [15] 陈彭生. 五味子乙素促进心肌梗死小鼠心功能的研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2014.
- [16] 何辉霞, 郑维银. P38MAPK 信号通路(下转第 1656 页)

- 习记忆功能的影响及其可能的机制[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(9): 829-832.
- [2] 丁洪艳, 张雪飞, 王志伟, 等. 七氟烷和丙泊酚对老年患者腹腔镜胆囊切除术后认知功能的影响研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(28): 3920-3921, 3924.
- [3] 李海涛, 李桂花, 哈斯也提·依不来音, 等. 载脂蛋白 E ϵ 4 基因对轻度认知功能障碍患者脑白质微细结构损害研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(26): 3175-3179.
- [4] 王权, 张超, 王义, 等. 新生期间断重复吸入七氟醚对大鼠学习记忆及 Tau 蛋白和 p-Tau 蛋白的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(3): 257-261.
- [5] 江君丽, 任娟娟, 唐春春, 等. 新生期大鼠重复吸入七氟醚对其幼年及成年学习、记忆能力及脑脊液中 ApoE 浓度的影响[J]. 山东医药, 2016, 56(28): 26-28.
- [6] FREDRIKSSIN A, PONTÉN E, GORDH T, et al. Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits[J]. *Anesthesiology*, 2007, 107(3): 427-436.
- [7] 朱宇航, 朱昭琼, 张超, 等. 七氟醚麻醉对大鼠海马载脂蛋白 EmRNA 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(2): 172-174.
- [8] MC DONALD J, KRAINIC D. Alzheimer gene APOE epsilon 4 linked to brain development in infants[J]. *JAMA*, 2014, 311(3): 298.
- [9] SHEN X, LIU S. Early Life exposure to seboflurane impairs adulthood spatial memory in the rat[J]. *Neurotoxicology*, 2013(39): 45-56.
- [10] 郑淑文, 朱昭琼, 马欢欢, 等. 哺乳期大鼠反复七氟醚麻醉对远期认知功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(6): 669-671.
- [11] 吕小荣, 钟远. 轻度认知障碍及阿尔茨海默病与载脂蛋白 E 基因多态性的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(5): 917-919.
- [12] BORENSTEIN A R, MORTIMER J A, SCHELLENBERG D D, et al. Effects of apolipoprotein e-epsilon 4 and -epsilon 2 in amnesic mild cognitive impairment and dementia in Shanghai; SCOBHI-P[J]. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2010, 25(3): 233-238.
- [13] 黄高雅, 王德生, 汤颖. 载脂蛋白 E 与阿尔茨海默病相关性研究进展[J]. 中国临床神经科学, 2016, 24(1): 102-108.
- [14] HANSON A J, CRAFT S, BANKS W A. The APOE genotype: modification of therapeutic responses in Alzheimer's disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(1): 114-120.
- [15] GOSHEN I, BRODSKY M, PRAKASH R, et al. Dynamics of retrieval strategies for remote memories[J]. *Cell*, 2011, 147(3): 678-689.
- [16] NGUYEN L B, RICCIARDI T N, MALOUF A T. Reinnervation of stratum lucidum by hippocampal mossy fibers is developmentally regulated[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1996, 95(2): 184-193.
- [17] JIANG J, TANG C, REN J, et al. Effect of multiple neonatal sevoflurane exposures on hippocampal apolipoprotein E ϵ levels and learning and memory abilities[J]. *Pediatr Neonatol*, 2018, 59(2): 154-160.
- [18] ALZATE O, OSORIO C, DEKROON R M, et al. Differentially charged isoforms of apolipoprotein E from human blood are potential biomarkers of Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2014, 6(4): 43.
- [19] LIANG X L, ZHANG Y I, ZHANG C, et al. Effect of repeated neonatal sevoflurane exposure on the learning, memory and synaptic plasticity at juvenile and adult age[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11): 4974-4983.
- [20] 朱霞, 朱贵芹, 张励才. 不同浓度七氟醚对幼鼠学习记忆及海马 NR2B Tyr1472 磷酸化表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(12): 1717-1721.

(收稿日期: 2018-08-18 修回日期: 2018-11-25)

(上接第 1651 页)

- 在血管内皮细胞凋亡作用中的研究进展[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(20): 9317-9319.
- [17] 张云, 旦菊花, 孙鑫, 等. MAPKs 信号通路在动脉粥样硬化发生发展中的调控作用[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(5): 968-970.
- [18] KIM E K, CHOI E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(6): 867-82.
- [19] 呼雅丽. 黄葵固体分散体通过抑制 JNK 保护心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究[D]. 吉林大学, 2015.
- [20] 张腾, 张艳军, 庄朋伟, 等. 瓜蒌对心梗后心衰大鼠心功能及心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8): 1183-1184.
- [21] GUO C, YANG M, JING L, et al. Amorphous silica nanoparticles trigger vascular endothelial cell injury through apoptosis and autophagy via reactive oxygen species-mediated MAPK/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 5257-5276.
- [22] BITTREMIEUX M, BULTYNCK G. p53 and Ca²⁺ signaling from the endoplasmic reticulum: partners in anticancer therapies[J]. *Oncoscience*, 2015, 2(3): 233-238.
- [23] KOKAWA K, SHIKONE T, OTANI T, et al. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix[J]. *Cancer*, 2015, 85(8): 1799-1809.

(收稿日期: 2018-08-22 修回日期: 2018-12-01)