

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.011
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190110.0843.002.html(2019-01-10)

三苦滴丸对大鼠心肌缺血再灌注损伤和心肌细胞凋亡的保护作用研究*

孙 野¹,舒遵华^{2△}

(1. 长春中医药大学附属医院, 长春 130021; 2. 长春中医药大学附属医院医疗保险办公室, 长春 130021)

[摘要] **目的** 探究三苦滴丸对大鼠心肌缺血再灌注(I/R)损伤和心肌细胞凋亡的保护作用研究。**方法** 取70只Wistar雄性大鼠,分为空白组($n=10$)、模型组($n=10$)、假手术组($n=10$)、阳性对照组(复方丹参滴丸, $n=10$)、给药组(三苦滴丸),给药组再分为高、中、低剂量组,每组10只。阳性对照组、给药组用药7d,其他组给等量蒸馏水,除空白组外其他组小鼠行心肌缺血再灌注造模,观察各组大鼠血清中肌酸激酶同工酶(CK-MB)以及心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平变化,采用Western blot法检测心肌Cleaved-Caspase3、Bcl-2基因表达,采用TUNEL法检测细胞凋亡。**结果** 与空白组比较,阳性对照组,假手术组,模型组,高、中、低剂量组的MDA、CK-MB水平均显著增高,而除假手术组外,其他组SOD水平均显著减低,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量组的MDA、CK-MB水平显著低于中、低剂量组,SOD水平显著高于低剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组,假手术组,高、中、低剂量组的Bcl-2水平均显著升高,而Cleaved-Caspase3、细胞凋亡数,NF- κ B水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高剂量组的Cleaved-Caspase3、细胞凋亡数水平显著低于中、低剂量组,Bcl-2水平显著高于中、低剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 三苦滴丸能抑制I/R损伤后氧化应激,减轻全身炎症反应,提高心肌对抗I/R的能力,其通过作用Caspase蛋白、调控Bcl-2基因表达保护心肌细胞。

[关键词] 肌细胞,心脏;再灌注损伤;中成药;血管细胞黏附因子-1
[中图分类号] R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1665-04

Protection of Sanku dropping pills on ischemia/reperfusion injury and myocardial cell apoptosis in rats*

SUN Ye¹, SHU Zunhua^{2△}

(1. the First Affiliated Hospital of Changchun University Of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130021, China; 2. Medical Insurance Office, Affiliated Hospital of Changchun University Of Chinese Medicine, Changchun, Jilin 130021, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective effect of Sanku (SK) dropping pills in rats with ischemia/reperfusion (IR) injury and myocardial cell apoptosis. **Methods** 70 Wistar male rats were selected and randomly assigned to the blank group ($n=10$), the model group ($n=10$), the sham group ($n=10$), the positive control group (compound Danshen dropping pills, $n=10$) and the drug group (SK dropping pills). The drug group including the high-, middle-, low-dose groups, each group had 10 rats. The positive control group and the drug group were medicated for 7 days, the other groups were treated with equivalent distilled water. Myocardial ischemia reperfusion was performed in all groups except for the blank group. The creatine kinase-MB (CK-MB) in serum, superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) contents in myocardial tissues were observed. Western blot was used to detect the gene expressions of Cleaved-Caspase3 and Bcl-2. TUNEL method was used to detect the cell apoptosis. **Results** MDA and CK-MB contents in the positive control group, the sham group, the model group, the high-, middle- and low-dose groups were higher than those in the blank group while the SOD contents reduced except for the sham group, and there were statistical differences ($P<0.05$). In the high-dose group, levels of MDA and CK-MB were significantly lower than those in the middle- and low-dose group, SOD level was significantly higher than that of the low-dose group. The difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, Bcl-2 gene expression in the positive control group, the sham group, the high-, middle-, low-dose group significantly increased while Cleaved-Caspase3

* 基金项目: 吉林省中医药科技项目(2017210)。 作者简介: 孙野(1982—), 副主任医师, 硕士, 主要从事心血管方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: 329128827@qq.com。

and apoptosis counts significantly decreased, there were statistical differences ($P < 0.05$). In the high-dose group, Cleaved-Caspase3 apoptosis counts, and level of NF- κ B were significantly lower while Bcl-2 gene expression was significantly higher than those in the middle- and low-dose group, there were statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusion** SK dropping pills can inhibit the oxidative stress, reduce the systemic inflammation response and increase the myocardial capacity after I/R injury. It protect the myocardial cells through the action on Caspase protein and the regulation of Bcl-2 gene expression.

[Key words] myocytes; cardiac; reperfusion injury; Chinese patent drugs; vascular cell adhesion molecule-1

冠心病在中医范畴内属于“胸痹心痛”^[1]。该病名最早记载于《灵枢·五邪》：“邪在心，则病心痛。”在《素问·脏气法时论》：“心病者，胸中痛，胁支满，胁下痛，膺背肩胛间痛，两臂内痛。”“真心痛，手足青至节，心痛甚，旦发夕死，夕发旦死。”《素问·缪刺论》又称为“厥心痛”“卒心痛”^[2]。前期阶段性研究表明，三苦滴丸对异丙肾上腺素所致大鼠心肌缺血显著改善，通过抗氧自由基、抑制炎性介质浸润等起作用^[3]。本研究通过观察三苦滴丸对大鼠造模后心肌细胞死亡、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平的影响，验证三苦滴丸的疗效，为研制冠心病心绞痛治疗新药提供科学依据，为临床冠心病心绞痛症状缓解提供客观、有效、不良反应小的科学方法，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 吉林大学药学院提供 Wistar 大鼠 70 只，体质量 250~270 g，雌雄各半。合格证号：SCXK-(吉)2007-0003。

1.1.2 药物及仪器 复方丹参滴丸(国药准字：Z10950111；天津天士力制药股份有限公司)，长春中医药大学研发中心提供三苦滴丸(试验室批号：20180128；主要成分：三七、苦碟子)，南京建成生物工程研究所提供 MDA、SOD，山东利尔康消毒股份有限公司生产碘伏消毒液，天津天泰精细化学品有限公司生产乙醚。德国 Bifuge stratos 生产的台式高速冷冻离心机。美国伯乐公司生产的 BIO0680 酶标仪，上海第二天秤仪器厂生产的 MP120-1 型电子天平。

1.2 方法

1.2.1 分组 将 70 只雄性 Wistar 大鼠分为空白组($n=10$)、模型组($n=10$)、假手术组($n=10$)、阳性对照组(复方丹参滴丸， $n=10$)、给药组(三苦滴丸)，给药组再分为高、中、低剂量组，每组 10 只。给药组再分为高、中、低剂量组。阳性对照组和给药组连续给药 7 d，其他组给予等量蒸馏水，于第 8 天造模。

1.2.2 造模 以 1.5% 戊巴比妥钠溶液(0.005 mL)麻醉大鼠后，取仰卧位并于操作台固定，对大鼠心脏情况采用心电图记录，连接呼吸机，于大鼠胸部行横行切开，肌肉层钝性分离，胸骨显露，距离胸骨 0.5 cm 左缘处，将胸腔在第 4 肋间打开，心包剪开，包膜撕开，在距离左冠状动脉 2.5 mm 处进针，将左心耳和肺

动脉圆锥予以带线缝合，假手术组不进行结扎，模型组、阳性对照组、给药组大鼠均结扎左冠脉的左前降支致缺血，缺血 0.5 h 后行再灌注 2 h。

1.2.3 实验药物给药 三苦滴丸按新的制备工艺进行制备，0.3 克/粒，按照药物出膏率 30% 的比例计算，正常人每日用药 12 g/d，按照人与大鼠体表面积核算，低、中、高剂量组分别为 120、240、360 mg·kg⁻¹·d⁻¹；阳性对照药物为复方丹参滴丸，规格：每丸 27 mg，用时以蒸馏水稀释成所需浓度。剂量为 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹。模型组、空白组：给予等体积蒸馏水 4 mL，以上各组每天灌胃 1 次，每只动物均灌胃 4 mL，共 1 周。

1.2.4 指标检测

1.2.4.1 Western blot 检测 每组取 6 只大鼠，依据试剂说明书提取蛋白，以蛋白定量检测法(bicinchoninic acid, BCA)绘制标准蛋白稀释浓度曲线，计算蛋白浓度并调整，后上样，设定电泳条件，转印至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上，采用封闭液在室温条件下封闭。加一抗(1:1 000)孵育过夜，以磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered solution, PBST)冲洗，加二抗，室温孵育，PBST 冲洗后显色曝光，扫描显色图片采用购自上海天能科技有限公司的 Gel Image System Ver. 4.00 软件行灰度分析，蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。

1.2.4.2 血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)测定 大鼠再灌注 2 h 后处死，取 3 mL 大鼠心尖血，4℃ 3 000 r/min 离心 10 min，后取上清液测 CK-MB 水平，严格按试剂盒说明书操作。

1.2.4.3 心肌组织 SOD、MDA 测定 在取心尖血后以生理盐水洗净心脏残血，剪取大鼠缺血区心肌制成 10% 组织匀浆液，测 SOD、MDA 水平，严格按试剂盒说明书操作。

1.2.4.4 细胞凋亡检测 将大鼠心脏组织制作石蜡切片，将组织切片、脱蜡，蛋白酶 K 中孵育脱水，避光加稀释液、TUNEL 反应液，室温中放置 1 h，并在 37℃ 烤箱中放置 30 min，磷酸盐缓冲液(PBS)清洗、二氨基联苯胺(diaminobezidin, DAB)显色，最后自来水稍洗脱水、透明、封片显微镜观察、拍照，找到凋亡细胞区，后随机取每张切片 5 个高倍视野，计算视野中的凋亡细胞数占总细胞数的百分比，取平均值为凋亡指数。

1.3 统计学处理 全部数据用 SPSS19.0 统计学系统进行处理,计数资料用 $n(\%)$ 表示,比较采用 χ^2 检验;计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用 F 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清 MDA、SOD、CK-MB 的检测 与空白组比较,模型组、阳性对照组、假手术组及高、中、低剂量组的 MDA、CK-MB 水平均显著增高。除假手术组外,其余组 SOD 水平均显著减低,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。高剂量组的 MDA、CK-MB 水平显著低于中、低剂量组,SOD 水平显著高于低剂量组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 1。

2.2 Cleaved-Caspase3、Bcl-2、细胞凋亡数、核因子(NF)- κ B 蛋白的检测 与模型组比较,阳性对照组,假手术组,高、中、低剂量组的 Bcl-2 水平均显著升高,

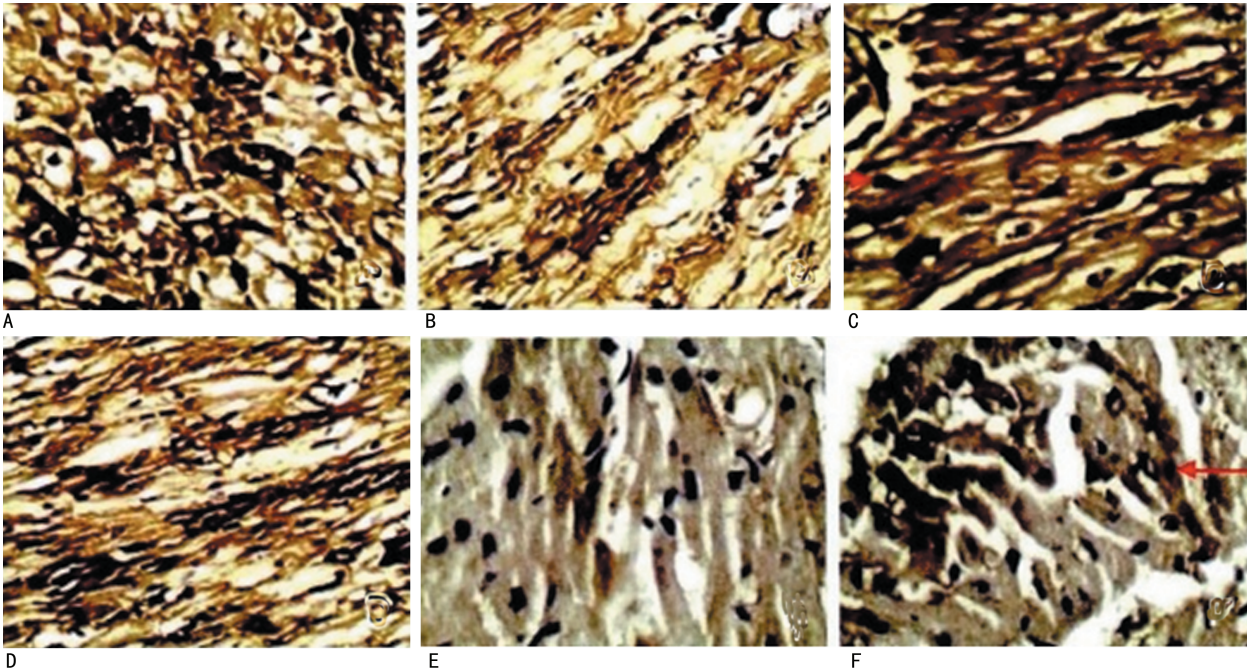
而 Cleaved-Caspase3、细胞凋亡数、NF- κ B 水平显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。高剂量组的 Cleaved-Caspase3、细胞凋亡数、NF- κ B 水平显著低于中、低剂量组,Bcl-2 水平显著高于中、低剂量组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2、图 1。

表 1 各组心肌缺血大鼠血清 MDA、SOD、CK-MB 水平 ($n=10, \bar{x}\pm s$)			
组别	MDA($\mu\text{mol/L}$)	SOD($\mu\text{mol/L}$)	CK-MB(U/L)
阳性对照组	3.62 $\pm$ 1.23 ^a	0.49 $\pm$ 0.12 ^a	90.49 $\pm$ 10.12 ^a
假手术组	3.87 $\pm$ 1.22 ^a	0.59 $\pm$ 0.21	100.59 $\pm$ 20.21 ^a
空白组	3.29 $\pm$ 0.54	0.60 $\pm$ 0.22	70.60 $\pm$ 10.23
高剂量组	3.92 $\pm$ 0.82 ^a	0.48 $\pm$ 0.08 ^a	230.48 $\pm$ 10.08 ^a
中剂量组	4.52 $\pm$ 1.12 ^a	0.45 $\pm$ 0.07 ^a	340.45 $\pm$ 20.07 ^a
低剂量组	4.60 $\pm$ 1.13 ^a	0.42 $\pm$ 0.06 ^a	420.42 $\pm$ 50.06 ^a
模型组	5.28 $\pm$ 1.37 ^a	0.32 $\pm$ 0.02 ^a	520.32 $\pm$ 80.02 ^a

^a: $P<0.05$,与空白组比较

表 2 各组心肌缺血大鼠 Cleaved-Caspase3、Bcl-2、细胞凋亡数水平 ($\bar{x}\pm s, \%$)				
组别	Cleaved-Caspase3	Bcl-2	细胞凋亡数	NF- κ B
阳性对照组	123.62 $\pm$ 11.23 ^a	100.49 $\pm$ 30.12 ^a	170.49 $\pm$ 37.12 ^a	8 970.49 $\pm$ 756.12 ^a
假手术组	223.87 $\pm$ 13.22	110.59 $\pm$ 31.21	180.59 $\pm$ 41.21	5 680.59 $\pm$ 642.45
空白组	223.86 $\pm$ 13.23	110.24 $\pm$ 31.03	180.76 $\pm$ 41.39	5 680.25 $\pm$ 641.42 ^a
高剂量组	164.60 $\pm$ 7.13 ^a	300.48 $\pm$ 50.08 ^a	150.48 $\pm$ 20.08 ^a	7 150.56 $\pm$ 1 020.17 ^a
中剂量组	224.52 $\pm$ 10.12 ^a	270.45 $\pm$ 40.07 ^a	230.45 $\pm$ 30.07 ^a	8 230.45 $\pm$ 730.26 ^a
低剂量组	253.92 $\pm$ 16.82 ^a	140.42 $\pm$ 30.06 ^a	300.42 $\pm$ 40.06 ^a	9 300.38 $\pm$ 840.06 ^a
模型组	345.28 $\pm$ 24.37 ^a	46.32 $\pm$ 20.02 ^a	398.32 $\pm$ 50.02 ^a	14 187.32 $\pm$ 1 150.02 ^a

^a: $P<0.05$,与空白组比较



A:空白组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量组;E:中剂量组;F:高剂量组

图 1 三苦滴丸对大鼠心肌细胞凋亡的影响(TUNEL 染色 $\times 40$)

3 讨 论

心肌缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R)是心肌组织在长时间缺血后恢复血液灌注,反而出现比再灌注前更严重的损伤和功能障碍^[3-4]。迄今为止,经研究在心肌缺血方面取得了一定的进

展,其机制研究存在多种假说,主要包括氧自由基的生成、钙超载、能量代谢障碍、细胞凋亡、坏死和自噬,血小板聚集和微血栓,免疫激活和炎症反应等^[5-6]。近年来,在心肌缺血再灌注损伤的方面进行了深入的研究^[7-8]。

本研究探析三苦滴丸对大鼠心肌缺血再灌注损伤和心肌细胞凋亡的缓解技术研究,结果与孙凤娟等^[9]的研究结果大体一致。近年来,国内外学者对苦碟子进行了大量研究工作,发现苦碟子的化学成分十分复杂^[10-11]。心脏内存在大量的酶类物质完成心脏的正常生理功能,因心肌缺氧缺血损伤及细胞膜的通透性增高,促使心肌内含有的天门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、CK-MB、肌酸激酶等大量释放入血,促使血清中浓度增高。本研究发现,高剂量组的MDA、CK-MB水平显著低于中、低剂量组,SOD水平显著高于中、低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明三苦滴丸可改善心肌缺血模型大鼠心肌酶CK、CK-MB有改善作用,减轻心肌损伤,其中三苦滴丸高剂量组效果更佳。心肌缺血的发生、发展及转归中,信号转导可以调控心肌细胞的损伤,心肌缺血时存在复杂而广泛的信号传导系统交汇,并对缺血心肌发挥网络调控作用。NF- κ B是Rel蛋白家族成员,可与免疫球蛋白重链及 κ 轻链基因增强子序列特异结合。NF- κ B是由p65级多肽p50亚基形成的二聚体,包括异源性或同源性二聚体,最常见及最多发挥生理功能的是p50~p65异源二聚体。本研究发现,高剂量组的Cleaved-Caspase3、细胞凋亡数、NF- κ B水平显著低于中、低剂量组,高剂量组的Bcl-2水平显著高于中、低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示三苦滴丸可升高心肌组织内的NF- κ B蛋白表达水平,进而对NF- κ B水平产生抑制作用,减轻心肌缺血。临床试验和药理学研究表明,苦碟子有心血管、抗肿瘤和降血脂等多方面的生物活性^[12-13]。经化学分析,其主要成分为黄酮类及腺苷类物质。在心血管疾病方面,苦碟子对扩张冠状血管有显著疗效,可改善心肌微循环和增加冠脉血流量;研究证明苦碟子在心、脑血管方面具有显著的疗效^[14-15]。苦碟子现常用于治疗冠心病、缺血性脑血管疾病,有效率达93.3%。较治疗前差异有统计学意义($P < 0.05$),血瘀症患者血液流变学相关指标及血管内皮素的水平增高,证明了苦碟子确切的活血化瘀功效^[16-18]。表明三苦滴丸能通过作用Caspase蛋白、调控Bcl-2基因表达来减少细胞凋亡,抑制I/R损伤后氧化应激,减轻全身炎症反应,提高心肌对抗I/R的能力,有效保护心肌细胞。

综上所述,三苦滴丸可以减轻缺血再灌注后大鼠氧化应激,减少细胞凋亡,有效减轻心肌损失。

参考文献

- [1] 杨天睿,苗云波,张彤,等.停灌与再灌注时间对心肌缺血再灌注损失程度的影响研究[J].中国全科医学,2018,18(11):134-135.
- [2] 孙月,王禹雪,杨秘,等.兔心肌缺血再灌注损伤模型制备的心肌声学造影研究[J].中国超声医学研究杂志,2017,8(2):181-182.
- [3] 王赞,刘莉,张喆,等.富氢水对心肌缺血再灌注模型大鼠心肌损伤的保护作用[J].中国组织工程研究,2018,19(8):183-185.
- [4] 王日军,王敬萍,徐继尧,等.姜黄素对缺血再灌注损伤大鼠心肌线粒体呼吸链的影响[J].中国心血管病研究,2017,21(4):143-144.
- [5] 田心,王渊博.丹红注射液激活AMPK保护心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的实验研究[J].中国中医急症,2017,18(12):136-138.
- [6] 李峰杰,李一奎,何萍,等.双龙方对大鼠心肌缺血/再灌注后无复流影响的研究[J].中国药理学通报,2018,18(4):134-135.
- [7] 郭冲,岳霄,贾大林.舒芬太尼后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤时Nrf2-ARE信号通路的影响[J].中国现代医学杂志,2018,8(16):181-182.
- [8] 黄婷,李绍但,杨明会,等.大鼠心肌缺血再灌注实验技巧的经验总结[J].中国比较医学杂志,2017,19(9):183-185.
- [9] 孙凤娟,赵圣刚,蒋丽琴.PI3K/AKT信号通路与心肌缺血再灌注损伤[J].中国心血管病研究,2017,11(11):303-304.
- [10] 柴丽娜,杜蕊,张艳艳.银杏内酯B对心肌缺血再灌注心律失常大鼠的作用及机制研究[J].中国中医急症,2018,19(4):183-185.
- [11] PELL V R, SPIROSKI A M, MULVEY J, et al. Ischemic preconditioning protects against cardiac ischemia reperfusion injury without affecting succinate accumulation or oxidation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 14(1): 72.
- [12] 李文凯,尚斌,连小鹏,等.心肌缺血再灌注损伤模型大鼠经艾塞那肽预处理后心肌细胞的凋亡[J].中国组织工程研究,2015,18(27):136-138.
- [13] 苏振宇,李小兵,李军鹏,等.TMEM16A氯通道对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国心血管病研究,2018,18(4):134-135.
- [14] 杨丽,张俊峰,杨文龙,等.ALDH2对大鼠心肌缺血/再灌注损伤与凋亡的影响及机制的研究[J].中国循证心血管医学杂志,2018,8(4):181-182.
- [15] 赵一灿,张丽华,赵文,等.芦丁对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].郑州大学学报(医学版),2017,19(5):183-185.
- [16] MUDALIAR H, RAYNER B, BILLAH M, et al. Remote ischemic preconditioning attenuates EGR-1 expression following myocardial ischemia reperfusion injury through activation of the JAK-STAT pathway[J]. Int J Cardiol, 2017, 228: 729-741.
- [17] CHEN Y, BA L, HUANG W, et al. Role of carvacrol in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/ERK and Akt/eNOS signaling pathways[J]. Euro J Pharmacol, 2017, 796: 90-100.
- [18] CHARLES B B G, SUETOMI T, XIANG S, et al. CaMKII δ subtypes differentially regulate infarct formation following ex vivo myocardial ischemia/reperfusion through NF- κ B and TNF- α [J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 103(1): 48-55.