

山精胶囊对心肌缺血大鼠 NF- κ B 信号通路 相关凋亡蛋白表达的影响

于栋华¹, 刘树民², 董培良¹, 王霄阳¹, 张宁¹, 于纯森^{3*}

- (1. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 哈尔滨 150040;
2. 黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040;
3. 黑龙江中医药大学 药学院, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**研究山精胶囊对心肌缺血大鼠核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路相关凋亡蛋白半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), 抗细胞凋亡 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 基因 (Bcl-2), 促细胞凋亡 Bcl-2 相关 X 蛋白基因 (Bax) 表达的影响, 探讨其对心肌缺血的保护作用和机制。**方法:**采用冠状动脉结扎法造模, 4 周后进行心电图检测, 提示慢性心肌缺血模型成功, 并筛选分组。山精胶囊低、中、高剂量组 *ig* 给药剂量分别为 283.5, 850.5, 1 701.0 mg·kg⁻¹; 阳性药心安胶囊 *ig* 给药剂量为 324.0 mg·kg⁻¹。假手术组和模型组 *ig* 给予同等剂量的 0.9% 的氯化钠注射液。每日 *ig* 给药 1 次, 连续给药 10 d。以心电图法观察其对大鼠心电图 ST 段的影响, 检测血清中乳酸脱氢酶 (LDH), 肌酸激酶 (CK), 天冬氨酸转氨酶 (AST) 的含量, 免疫组化法检测心肌组织中 NF- κ B, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白的表达。**结果:**与假手术组相比, 模型组 ST 段显著抬高 ($P < 0.05$), LDH, CK 和 AST 活性显著升高 ($P < 0.05$), 心肌组织中的 NF- κ B, Caspase-3, Bax 的蛋白表达水平显著增高 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较山精胶囊能明显抑制心肌缺血大鼠的 ST 段抬高, 降低血清心肌酶 LDH, CK, AST 的活性 ($P < 0.05$), 显著降低 NF- κ B, Caspase-3, Bax 蛋白表达 ($P < 0.05$), 提高 Bcl-2 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。**结论:**山精胶囊可能是通过调控 NF- κ B 信号通路相关凋亡蛋白的表达, 抑制心肌细胞凋亡, 减少缺血缺氧对心肌细胞的病理损害, 起到对心肌的保护作用。

[关键词] 山精胶囊; 心肌缺血; 核转录因子- κ B; 凋亡相关蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0141-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110141

Effects of Shanjing Capsule on NF- κ B Signal Pathway Related Apoptotic Proteins Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats YU Dong-hua¹, LIU Shu-min², DONG Pei-liang¹, WANG Xiao-yang¹, ZHANG Ning¹, YU Chun-miao^{3*} (1. *Research Institute of Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China*; 2. *Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China*; 3. *Pharmacy School, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ShanJing capsule on nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signal pathway relating apoptosis proteins caspases-3 (Caspase-3), anti-apoptotic genes B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), pro-apoptotic genes Bcl-2 associated X protein (Bax), explore its protective effects on myocardial ischemia and mechanisms. **Method:** Wistar rats the coronary artery of which were ligated were used for myocardial ischemia model, the changes of the ST section in electrocardiogram (ECG) were observed, and randomly divided into 5 groups: model (0.9% sodium chloride), Shanjing capsule high, medium and low dose (respectively 283.5, 850.5, 1 701.0 mg·kg⁻¹), Metoprolol capsules (324.0 mg·kg⁻¹), compared with sham group (0.9% sodium chloride). All groups were administered once daily for 10 days. The ST segment, serum

[收稿日期] 20141024(012)

[基金项目] 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”资助

[第一作者] 于栋华, 博士, 副研究员, 从事中药药性理论研究, Tel:0451-87266836, E-mail:yudonghua1015@163.com

[通讯作者] * 于纯森, 博士, 副教授, 从事中药保健食品研制与开发, Tel:0451-87266881, E-mail:yuchunmiao@163.com

lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST) levels were observed. Immunohistochemistry was used to detect the NF- κ B, Caspase-3, Bax, Bcl-2 protein of myocardial tissue. **Result:** Compared with the sham group, ST segment elevation was significantly raised ($P < 0.05$), LDH, CK and AST activity was significantly higher ($P < 0.05$), NF- κ B, Caspase-3, Bax's protein expression levels of myocardial tissue were significantly higher ($P < 0.05$), Bcl-2 protein expression was significantly lower ($P < 0.05$) in the model group; Shanjing capsule could obviously ameliorate the raise of ST segment, and lower activity of CK, LDH and AST. Shanjing capsule could obviously decrease the protein expressions of NF- κ B, Caspase-3 and Bax and increase the protein expression of Bcl-2. **Conclusion:** Shanjing capsule could regulate the expressions of NF- κ B signaling pathway relating proteins, inhibit the myocardial apoptosis and reduce ischemia anoxic pathological damage of myocardial muscle cells to protect the myocardial muscle.

[**Key words**] Shanjing capsule; myocardial ischemia; nuclear transcription factor- κ B; apoptosis-related proteins

细胞凋亡,又称为程序性细胞死亡,是由促凋亡因素引发细胞内死亡程序而发生的细胞死亡的过程^[1]。实验证实,心肌缺血/再灌注损伤、动脉粥样硬化、慢性心衰和糖尿病并发心肌病等都发现了有心肌细胞的凋亡的出现。所以心肌缺血的发生与细胞凋亡关系十分密切^[2]。核转录因子- κ B (NF- κ B) 是核因子中重要的一组蛋白质,是一组存在于细胞和病毒中调控许多基因表达的重要转录调节因子之一。它在心肌细胞凋亡,心肌缺血及再灌注损伤中起重要作用。有实验表明,NF- κ B 的激活可能参与了心肌细胞凋亡的信号转导。其激活因素可能与心肌缺血缺氧后造成的氧化应激、复氧、内质网钙离子超载、游离基、一氧化氮(NO)和内毒素等因素有关。

山精胶囊由山楂叶、黄精、薤白 3 味药物组成,其功效是活血化瘀,通阳养阴,散结止痛。主要用于气滞血瘀所致的胸痹。本实验通过建立心肌缺血大鼠模型,观察山精胶囊对心肌缺血中 NF- κ B 信号通路相关凋亡蛋白半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3),促细胞凋亡基因 (Bax),抗细胞凋亡基因 (Bcl-2) 表达的影响,探讨其对心肌缺血保护作用及可能机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wista 大鼠,体重 (200 $\pm$ 20) g,雌、雄各半。由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK (黑)2008-004。

1.2 药品和试剂 山精胶囊 (黑龙江贵龙医药有限公司,批号 20111018),心安胶囊 (哈尔滨红太阳健康产业集团有限公司,批号 20110401),戊巴比妥钠 (北京金鑫天佑生物科技有限公司,批号 201312),乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒 (批号 110401),肌酸激酶 (CK) 测定试剂盒 (批号 110771),天冬氨酸转氨酶 (AST) 测定试剂盒 (批号

120921),均购自中生北控生物科技股份有限公司。兔抗 Bcl-2, Bax, Caspase-3 和 NF- κ B p65 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司);PV6001 二抗, DAB 显色剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 仪器 BL-420F 型生物机能实验系统和 HX-200 型动物呼吸机 (成都泰盟科技有限公司), Moticam 3000 型显微摄影成像系统 (麦克奥迪实业集团中国有限公司), A-6 型半自动生化分析仪 (北京松上技术有限公司)。

2 方法

2.1 模型的制备^[3] 大鼠称重后以 1% 戊巴比妥钠 (0.04 g $\cdot$ kg⁻¹) 腹腔注射麻醉,仰卧位固定于手术台上,气管切开后插管与呼吸机相连通 (呼吸频率 60 次/min,潮气量 10 mL $\cdot$ kg⁻¹,吸呼比为 2:1),针形电极插入四肢皮下,监测并记录标准 II 导联心电图。大约在第 3,4 肋间剥离肌肉组织,轻挤胸廓,挤出心脏,小心剥离心包膜,于主动脉圆锥与左心耳之间用手术线穿过冠脉左前降支血管并结扎 (假手术组只穿线不结扎);心脏复位,迅速缝合胸腔 (心包膜不缝合),伤口处涂擦青霉素,预防创口感染。关胸后稳定 10 min 并观察大鼠是否出现吞咽动作,注意呼吸的恢复情况及动态心电图,如有自主呼吸即可拔出气管插管,脱机后放回鼠笼,单笼饲养,以心电图 ST 段出现弓背抬高为急性心肌缺血造模成功。4 周后心电图检测,提示慢性心肌缺血造模成功,进行筛选分组。

2.2 实验分组及给药 将筛选后的心肌缺血大鼠模型除假手术组外,按体重随机分组。实验分为模型组、阳性药组 (心安胶囊 324.0 mg $\cdot$ kg⁻¹)、山精胶囊低、中、高剂量组 (283.5, 850.5, 1 701.0 mg $\cdot$ kg⁻¹)。假手术组和模型组给予同等剂量的 0.9%

的氯化钠注射液。每组 8 只,共 40 只,雌雄各半。每日 *ig* 给药 1 次,给药 10 d。

2.3 心电图检测 各组大鼠用 1% 戊巴比妥钠 (0.04 g·kg⁻¹) 腹腔麻醉,仰卧位固定于手术台上,针形电极插入四肢皮下,连接生物机能实验系统,监测肢体 II 导联心电图。记录大鼠造模前、后各组心电图,记录 ST 段变化。于末次给药 1 h 后记录给药后心电图。

2.4 血清心肌酶的检测 于末次给药 1 h 后,眼底静脉丛取血 2 mL,室温静置,3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离血清。按试剂盒说明书操作配制上机试剂,并用生化分析仪检测 CK,LDH,AST 活性。

2.5 心肌组织中的 NF-κB, Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的检测 于末次给药 1 h 后,取出心脏,10% 甲醛溶液固定。免疫组化 PV 二步法检测心肌组织中 NF-κB, Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。以积分吸光度 (*IA*) 代表 NF-κB, Caspase-3, Bax, 和 Bcl-2 蛋白相对表达量, *IA* = 阳性面积 × 平均吸光度 *A*。每组分析 6 例,每例随机分析 5 个高倍镜视野,取其均值

代表该例的相对表达量。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对心肌缺血大鼠心电图的影响 造模 4 周后,模型组及各给药组 ST 段明显抬高。给药后,与假手术组相比,模型组 ST 段显著抬高 (*P* < 0.05); 与模型组相比山精胶囊高、中、低剂量组、阳性药对照组的 ST 段显著降低 (*P* < 0.05),提示山精胶囊对于冠状动脉接扎造成的心肌缺血大鼠的 ST 段抬高有明显抑制作用。见表 1。

3.2 对心肌缺血大鼠血清心肌酶的影响 与假手术组相比,模型组 LDH,CK 和 AST 活性显著升高 (*P* < 0.05); 与模型组相比,山精胶囊高、中、低剂量组、阳性药组的 LDH,CK 和 AST 活性显著降低 (*P* < 0.05)。提示,山精胶囊能明显降低血清心肌 LDH,CK,AST 的活性,可减轻心肌缺血对心肌组织所造成的损伤。见表 2。

表 1 山精胶囊对心肌缺血大鼠心电图 ST 段的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ST 段/mV		
		造模前	造模 4 周	给药后
假手术	—	0.065 ± 0.016	0.064 ± 0.013	0.068 ± 0.031
模型	—	0.068 ± 0.042	0.238 ± 0.030 ¹⁾	0.229 ± 0.020 ¹⁾
山精胶囊	1 701.0	0.074 ± 0.038	0.247 ± 0.010 ¹⁾	0.121 ± 0.023 ²⁾
	850.5	0.071 ± 0.014	0.242 ± 0.003 ¹⁾	0.120 ± 0.021 ²⁾
	283.5	0.066 ± 0.025	0.239 ± 0.017 ¹⁾	0.181 ± 0.012 ²⁾
心安胶囊	324.0	0.068 ± 0.031	0.246 ± 0.024 ¹⁾	0.122 ± 0.022 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ *P* < 0.05;与模型组比较²⁾ *P* < 0.05 (表 2 ~ 3 同)。

表 2 山精胶囊对心肌缺血大鼠血清心肌酶 LDH,CK,AST 变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Shanjing capsule on blood serum LDH, CK and AST in myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	LDH /mmol·L ⁻¹	CK /mmol·L ⁻¹	AST /mmol·L ⁻¹
假手术	—	111 ± 24	675 ± 129	147 ± 19
模型	—	810 ± 102 ¹⁾	2 481 ± 373 ¹⁾	279 ± 18 ¹⁾
山精胶囊	1 701.0	399 ± 60 ²⁾	1 289 ± 238 ²⁾	200 ± 11 ²⁾
	850.5	217 ± 65 ²⁾	921 ± 62 ²⁾	182 ± 18 ²⁾
	283.5	555 ± 60 ²⁾	1 912 ± 161 ²⁾	248 ± 13 ²⁾
心安胶囊	324	365 ± 55 ²⁾	1 291 ± 252 ²⁾	207 ± 12 ²⁾

3.3 对心肌缺血大鼠心肌组织中 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白阳性表达呈现黄色或棕黄色,主要表达在心肌细胞胞质中。与假手术组相比,模型组心肌组织的 NF-κB, Caspase-3, Bax 的蛋白表达水平显著增高 (*P* < 0.05), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.05); 与模型组相比,山精胶囊高、中、低剂量组、心安胶囊组的 NF-κB, Caspase-3, Bax 蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.05), Bcl-2 的蛋白表达水平显著增高 (*P* < 0.05)。见表 3,图 1 ~ 4。

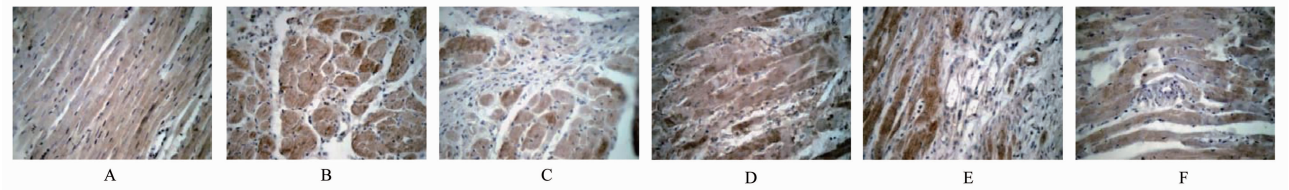
4 讨论

与心肌缺血损伤中细胞凋亡的相关调控基因

表 3 山精胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织中 NF-κB,Caspase-3,Bax,Bcl-2 相对表达量影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Shanjing capsule on relative expression of NF-κB, Caspase-3, Bax, Bcl-2 in myocardial ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NF-κB/IA	Caspase-3/IA	Bax/IA	Bcl-2/IA
假手术	—	41 514 ± 4 317	28 420 ± 4 577	46 612 ± 5 411	131 764 ± 13 117
模型	—	78 546 ± 2 867 ¹⁾	81 295 ± 5 977 ¹⁾	121 170 ± 12 480 ¹⁾	56 114 ± 9 274 ¹⁾
山精胶囊	1 701.0	58 230 ± 9 152 ²⁾	40 887 ± 6 724 ²⁾	62 949 ± 2 700 ²⁾	95 828 ± 10 520 ²⁾
	850.5	50 116 ± 31 478 ²⁾	40 349 ± 7 650 ²⁾	58 504 ± 7 388 ²⁾	108 434 ± 8 063 ²⁾
	283.5	67 033 ± 3 731 ²⁾	53 816 ± 5 631 ²⁾	86 114 ± 8 023 ²⁾	72 286 ± 3 643 ²⁾
心安胶囊	324.0	49 086 ± 1 902 ²⁾	49 056 ± 2 103 ²⁾	67 345 ± 2 390 ²⁾	98 971 ± 5 543 ²⁾



A. 假手术组;B. 模型组;C 山精胶囊 1701.0 mg·kg⁻¹. 组;D. 山精胶囊 850.5 mg·kg⁻¹. 组;E. 山精胶囊 283.5 mg·kg⁻¹ 组;F. 心安胶囊 324.0 mg·kg⁻¹ 组(图 2 ~4 同)

图 1 山精胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织中 NF-κB 相对表达的影响(PV, ×400)

Fig.1 Effects of Shanjing capsule on NF-κB expression by immunohistochemical staining of myocardial tissue in each group (PV, ×400)

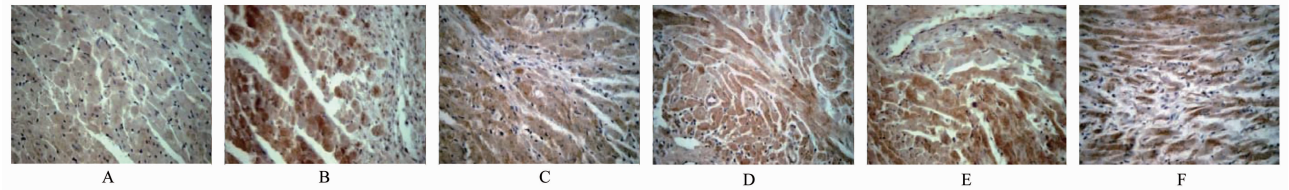


图 2 山精胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织中 Caspase-3 相对表达的影响(PV, ×400)

Fig.2 Effects of Shanjing capsule on Caspase-3 expression by immunohistochemical staining of myocardial tissue in each group (PV, ×400)

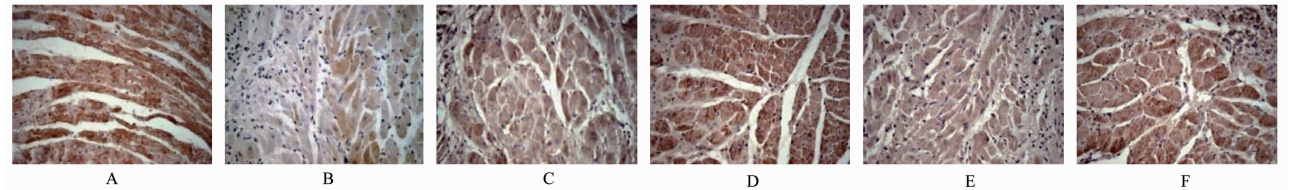


图 3 山精胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织中 Bcl-2 相对表达的影响(PV, ×400)

Fig.3 Effects of Shanjing capsule on Bcl-2 expression by immunohistochemical staining of myocardial tissue in each group (PV, ×400)

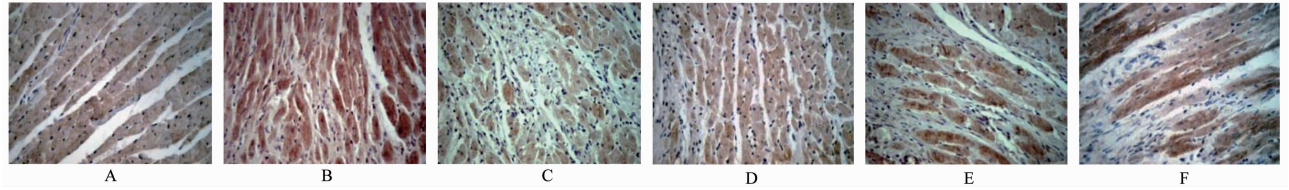


图 4 山精胶囊对心肌缺血大鼠心肌组织中 Bax 相对表达的影响(PV, ×400)

Fig.4 Effects of Shanjing capsule on Bax expression by immunohistochemical staining of myocardial tissue in each group (PV, ×400)

有:①半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族 其中的 Caspase-3 被认为是各种凋亡刺激因子激活的 Caspase 家族中的关键蛋白酶,也是凋亡的关键蛋
白酶,Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者,它能够被 Caspase-8, Caspase-9, Caspase-10 以及颗粒酶 B 所激活,激活后马上发生下游的级联反应,使凋亡不

可避免,因而 Caspase-3 也被称为“死亡蛋白酶”^[4-5],是凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。

②Bcl-2 家族 分为抗细胞凋亡基因:Bcl-2, Bcl-xl 等;促细胞凋亡基因:Bax, Bak 等。Bcl-2 基因是凋亡抑制蛋白,也是首个被确定可以抑制细胞凋亡的基因,它的高度表达可能是通过抑制氧化剂诱导的凋亡、影响细胞内钙内流、蛋白间的相互作用及改变核转运阻抑等因素引起的细胞凋亡,也有“长寿基因”之称。Bax 是 Bcl-2 家族的促凋亡成员之一,与 Bcl-2 相反,可以诱导细胞死亡,表达产物 Bax 与 Bcl-2 形成异二聚体,从而抑制 Bcl-2 的抗凋亡作用^[6-7]。

③核因子 NF- κ B 近年来研究发现 NF- κ B 激活剂可介导心肌细胞凋亡,诱导心肌细胞凋亡过程中伴有 NF- κ B 的活化,通过抑制 NF- κ B 的活化可降低缺氧诱导的抗凋亡因子 Bcl-2 表达的下降幅度等^[8]。

本实验研究发现:山精胶囊对心肌缺血所致的心电图改变具有明显的改善作用,明显降低心肌酶的外漏,改善了能量代谢,减轻了心肌细胞膜的损伤。通过抑制 NF- κ B 的活化、使 Bax 的表达下调, Bcl-2 的表达水平上调,继而也抑制了 Caspase-3 的活化,从而抑制了心肌细胞的凋亡。以上研究表明山精胶囊可能是通过对 NF- κ B 信号通路的调控途径,调节凋亡相关蛋白表达,从而抑制了心肌细胞凋亡,减少缺血缺氧对心肌细胞的病理损害,起到对心肌的保护作用。综上所述,山精胶囊能有效对抗心肌缺血所致的心肌损伤,可能是通过对 NF- κ B 信号通路的调控途径,调节凋亡相关蛋白的表达,从而抑

制了心肌细胞凋亡,减少缺血缺氧对心肌细胞的病理损害,起到对心肌的保护作用。

[参考文献]

[1] Gorczyca W, Melamed M R, Darzynkiewicz Z. Programmed death of cells (apoptosis) [J]. Patol Pol, 1993, 44(3):113-119.

[2] Scarabelli T M, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium [J]. Curr Probl Cardiol, 2006, 31(3):2635-2641.

[3] 李玉光,丁洽烽,谭学瑞,等. 长时间慢性心肌缺血实验动物模型的构建技术 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(23):42-43.

[4] 赵瑞杰,李引乾,王会,等. Caspase 家族与细胞凋亡的关系 [J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(17):73-78.

[5] 郭海,才秀莲. Caspase 家族与细胞凋亡及诱发因素研究进展 [J]. 河南职工医学院学报, 2012, 24(6):847-850.

[6] Willis S N, Chen L, Dewson G, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mc-1 and Bcl xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins [J]. Genes Dev, 2005, 19(11):1294-1305.

[7] Willis S N, Fletcher J I, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak [J]. Science, 2007, 315(5813):856-859.

[8] 黎海燕. 核转录因子与心肌 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4(8):19-20.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国中药杂志》2015 年征订启事

《中国中药杂志》创刊于 1955 年 7 月,是由中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中医药学术期刊,在国际国内医药学领域内具有广泛影响。位居中国中文核心期刊、中国科技核心期刊“双核心”首位。曾荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊、国家新闻出版广电总局“中国百强报刊”,以及历届国家中医药管理局全国优秀中医药期刊评比一等奖、百种中国杰出学术期刊、中国精品科技期刊等奖项。在国际上被 Medline, Scopus 等国外十余家著名数据库收录。全面反映我国中药与天然药物学科领域最新进展与研究动态。主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、临床等专业。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、民族药、学术探讨、药事管理等栏目。主要读者对象为各级管理部门、科研院所、大专院校、工厂企业以及医院等从事中医药科研、管理、生产、医院制剂及临床等方面的人员。

2015 年本刊每期定价为 50 元,208 页,全年定价 1200 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。欢迎广大读者到本编辑部或当地邮局订阅,邮发代号 2-45。本刊地址:北京东直门内南小街 16 号;邮政编码 100700;电子信箱 cjcmm2006@188.com;联系方式详见中国中药杂志网站 www. cjcmm. com. cn