

益气逐瘀方对急性心肌梗死大鼠 miR-24 表达及心肌细胞凋亡的影响

褚福永 刘巍 刘红旭

(首都医科大学附属北京中医医院, 北京, 100010)

摘要 目的:观察益气逐瘀方参元丹对急性心肌梗死大鼠 miR-24 表达及心肌细胞凋亡的影响。方法:50 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、参元丹高、中、低剂量组,每组 10 只,采用左冠状动脉前降支结扎法复制心肌梗死模型,参元丹高、中、低剂量组从术后第 2 天开始给予参元丹药液灌胃,假手术组和模型组给予等剂量生理盐水灌胃,共给药 2 周。治疗结束后检测大鼠血清 CK、LDH 水平及心肌组织 miR-24 基因表达情况,TUNEL 法检测心肌细胞凋亡。结果:实验结束时,与模型组相比,参元丹高、中、低剂量组均能显著降低血清 CK、LDH 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),升高心肌组织 miR-24 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时降低心肌细胞凋亡指数($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:益气逐瘀方参元丹能够减轻心肌梗死大鼠心肌损伤及细胞凋亡,其作用机制可能与上调心肌梗死大鼠缺血心肌组织 miR-24 基因表达有关。

关键词 益气逐瘀方;参元丹;细胞凋亡;miR-24

Effects of Shen Yuan Dan on MIR-24 Expression and Myocardium Cell Apoptosis in Myocardial Infarction Rats

Chu Fuyong, Liu Wei, Liu Hongxu

(Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Shen Yuan Dan (SYD) on MIR-24 expression and myocardium cell apoptosis in myocardial infarction rats. **Methods:** Fifty SD rats were randomly divided into five groups, namely sham group, model group, high dose, middle dose, and low-dose SYD group, with 10 rats in each group. The myocardium ischemia models were established by ligating of anterior descending branch of coronary artery. The rats in treatment groups were treated with intragastric administration of SYD. The model and sham group were given 0.9% sodium chloride solution with the same volume. The treatment lasted for 2 weeks. Serum levels of creatine kinases (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and MIR-24 gene expression in ischemic myocardium were measured after the treatment. Myocardial apoptosis was measured by TUNEL. **Results:** At the end of the treatment, the serum level of CK and LDH significantly decreased in SYD (high, middle and low-dose) groups compared with those of the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And the MIR-24 mRNA expression in ischemic myocardium were significantly increased in SYD (high and middle-dose) groups compared with those of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, the myocardial apoptosis index also significantly decreased in STD groups (high, middle, and low-dose) compared with those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Yiqi Zhuyu formula SYD could relieve myocardial injury and cell apoptosis in myocardium infarction rats. The possible mechanism may relate to up regulating MIR-24 gene expression in ischemic myocardium.

Key Words Yiqi zhuyu formula; Shen Yuan Dan; Cell apoptosis; MIR-24

中图分类号:R256.22 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.03.005

急性心肌梗死 (Acute Myocardial Infarction, AMI) 是心肌急性缺血性坏死,是在冠状动脉病变的基础上,发生冠状动脉血供急剧减少或中断,使相应的心肌严重而持久的缺血导致心肌坏死,是冠心病的严重类型。细胞凋亡是心肌梗死早期细胞损伤的重要病理机制^[1]。近期研究表明,作为细胞凋亡信号通路上游的重要的调控分子,miR-24 能够通过抑制靶基因 Bim 及其下游线粒体细胞凋亡信号通路细

胞因子的表达抑制心肌缺血早期细胞凋亡,发挥心肌保护作用^[2]。参元丹是我院心内科刘红旭主任医师基于冠心病气虚血瘀的病机特点组方而成的特色院内制剂,目前在临床上广泛应用于冠心病的治疗。本研究通过观察参元丹对心梗大鼠心肌损伤标志物、细胞凋亡及 miR-24 基因表达的影响,初步探讨参元丹通过干预 miR-24 减轻心肌缺血细胞损伤的作用机理。

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项基金(编号:20131107120016);北京市科委首都特色应用专项(编号:Z131107002213152);北京市医院管理局“青苗”计划专项(编号:QML20150901);首都医科大学附属北京中医医院院级课题(编号:2014013)

作者简介:褚福永(1981—),男,医学博士,副主任医师

通信作者:刘红旭,主任医师,教授,研究方向:中西医结合防治心血管疾病基础与临床研究,Tel:(010)52176633,E-mail:lhx_@263.net

1 材料

1.1 实验动物 健康清洁级 SD 大鼠 50 只,体重(220±10) g,雌雄不限,购自北京市维通利华实验动物有限公司,合格证号:SCXK(京)2013-2014。

1.2 药物与试剂 Trizol(Invitrogen)、M-MLV 逆转录酶(Promega)、miR-24 逆转录试剂盒 TransStart® Green qPCR superMix(北京全式金生物技术有限公司),引物设计由 Invitrogen 公司完成,TUNEL 细胞凋亡试剂盒(Roche)。参元丹由丹参、党参、玄参、地龙、土鳖虫等组成,来源于北京中医医院中药制剂室。根据课题组前期研究资料^[3],将参元丹除去包衣,溶于蒸馏水中,以 10 倍量常水煮提 3 次,30 min/次,合并煮提液,浓缩至含生药 1 g/mL 的药液供用。

1.3 实验仪器 小动物呼吸机(成都泰盟科技),全自动生化分析仪(美国 BECKMAN),台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf),ABI 7300 Real time PCR 仪(美国 ABI),倒置荧光显微镜(日本 Olympus),-80℃超低温冰箱(美国 Thermo),TA1003 型精密电子天平(上海天平仪器)。

2 实验方法

2.1 动物模型制备 采用冠状动脉前降支结扎法建立大鼠心肌缺血模型,具体方法参照课题组前期研究结果进行^[3],假手术组开胸后只穿线不结扎,术后每只大鼠给予青霉素钠 20 万 U/日肌注预防感染。

2.2 分组与给药 动物适应性喂养 3 d,禁食 12 h 后进行随机分组:1)假手术组;2)模型组;3)参元丹高剂量组;4)参元丹中剂量组;5)参元丹低剂量组,每组 10 只。给药从术后第 2 天开始,连续给药 14 d。其中,参元丹高剂量组给予参元丹药液 12 g/(kg·d)灌胃,中剂量组给予参元丹药液 6 g/(kg·d)灌胃,低剂量组给予参元丹药液 3 g/(kg·d)灌胃,假手术组和模型组分别给予等剂量的生理盐水灌胃。

2.3 标本留取 实验结束时,大鼠戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血 3 mL,分离血清。采血后大鼠麻醉处死,去除心房及右心组织,于结扎点以下沿心脏纵轴方向分别横切三份 3~5 mm 心肌组织,1 份置于 4% 多聚甲醛溶液内固定 24 h,常规石蜡包埋,用于细胞凋亡检测,另 2 份分装入 DEPC 处理的 EP 管后放入液氮中,-80℃超低温冰箱保存待检。

2.4 血清 CK、LDH 检测 采用全自动生化分析仪检测大鼠血清 CK、LDH 水平。

2.5 心肌组织 miR-24 mRNA 表达 采用 Real time-PCR 法检测心肌组织 miR-24 mRNA 表达,以 U6 作为内参。心肌组织总 mRNA 提取参照 Trizol 试剂盒说明进行,每个样本取 400 ngRNA 模板合成 cDNA。miR-24 引物序列:上游 5'-GCGGCGGTG GCTCAGTACA GC-3',下游 5'-GTGCAGGCTCCGAG-GT-3';内参 U6 引物序列:上游 5'-GCTC GCTTCG GCAGCACA-3',下游:5'-GAGGTATTCGACCAGAG-GA-3',PCR 反应条件:93℃2 min 预变性,93℃1 min,55℃1 min,72℃1 min,工作 40 次循环,最后 72℃7 min 延伸,反应结束后,通过产物的溶解曲线判定引物的特异性。调整基线和阈值读出各孔的循环数(Cycle threshold,Ct),利用比较 Ct 法检测各样本 mRNA 的表达情况。

2.6 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,具体按试剂盒操作说明进行,正常心肌细胞核被染成蓝色,凋亡阳性心肌细胞核被染成棕褐色,光学显微镜下每张切片选取具有代表性的 10 个视野,计数凋亡细胞以及总的心肌细胞核数,计算心肌细胞凋亡指数(Apoptosis Index,AI)。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 15.0 进行统计分析,所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清 CK、LDH 水平变化 实验结束时,与假手术组相比,模型组大鼠血清 LDH、CK 明显升高($P < 0.01$),SYD 高、中、低剂量组均能显著降低心梗大鼠血清 CK、LDH 浓度($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈一定量效关系,见表 1。

表 1 各组大鼠血清 CK、LDH 含量的比较
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	CK(U/L)	LDH(U/L)
假手术组	155.4±25.6	176.6±26.8
模型组	298.7±23.1**	374.5±29.5**
参元丹高剂量组	172.1±19.4 $\Delta\Delta$	205.3±28.5 $\Delta\Delta$
参元丹中剂量组	203.4±22.8 $\Delta\Delta$	228.4±31.2 $\Delta\Delta$
参元丹低剂量组	236.9±22.5 Δ	296.3±25.3 Δ

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$,与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠心肌细胞凋亡情况比较 实验结束时,与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞凋亡指数显著升高($P < 0.01$),SYD 高、中、低剂量组均能显著降低心梗大鼠心肌组织细胞凋亡指数($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈一定量效关系,见表 2,图 1。

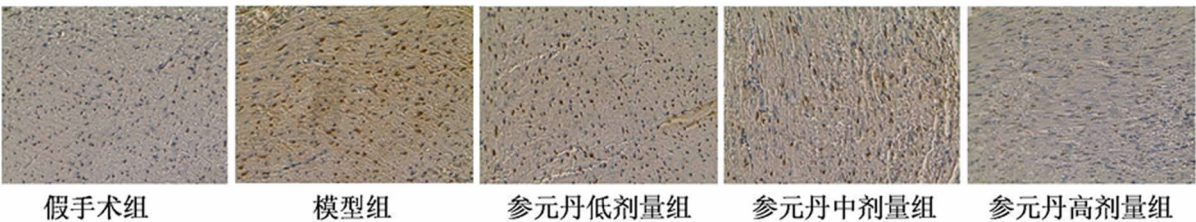


图 1 各组大鼠心肌细胞 TUNEL 染色结果(×400)

3.3 大鼠心肌组织 miR-24 基因表达情况 实验结束时,与假手术组相比,模型组大鼠心肌组织 miR-24 表达水平显著下降($P < 0.01$)。SYD 高、中、低剂量组均能够升高心肌梗死大鼠心肌组织 miR-24 表达,其中,SYD 高、中剂量组和模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组 miR-24 基因表达情况比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	miR-24/U6	凋亡指数(AI)
假手术组	1.26 ± 0.13	1.45 ± 0.96
模型组	0.42 ± 0.12**	63.56 ± 11.28**
参元丹高剂量组	1.17 ± 0.09 ^{△△}	35.17 ± 15.76 ^{△△}
参元丹中剂量组	1.02 ± 0.14 [△]	44.25 ± 14.99 ^{△△}
参元丹低剂量组	0.64 ± 0.16	56.28 ± 14.13 [△]

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$,与模型组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$ 。

4 讨论

细胞凋亡是一种受基因控制的细胞自身程序性死亡,其激发与抑制受多种基因调控^[4]。细胞凋亡在多种心脏疾病中有着重要意义,无论是持续性心肌缺血或缺血后再灌注期均已观察到明显的心肌细胞凋亡现象,而缺血早期则以细胞凋亡为主。

miR 是一类长约 22 个核苷酸的进化保守的内源性非编码单链小 RNA 分子,可在转录后水平抑制目标 mRNA 翻译或引起其降解发挥基因表达调控功能^[5]。在心血管系统,尤其是一些心肌特异性或高表达 miR,参与了心脏发育、血管新生、心力衰竭、心肌肥厚以及心律失常等生理和病理生理过程^[6]。近期研究表明^[2],miR-24 在哺乳动物心肌组织中高表达,并且在小鼠心肌缺血早期表达明显上调,并可能通过调控其靶基因 Bim 及其下游线粒体细胞凋亡信号通路关键细胞因子基因和蛋白的表达参与了缺血心肌自身修复过程;此外,我们前期的临床研究也发现,不稳定型心绞痛和急性心肌梗死患者血浆

miR-24 表达水平明显低于稳定型心绞痛和健康人群,随着冠脉病变支数和严重程度的增加,miR-24 的表达水平呈下降趋势,由此可见,miR-24 与冠心病发病过程关系密切,miR-24 在冠心病心肌缺血发病过程中可能发挥了重要的调控作用。

研究表明,心肌梗死后大鼠心肌组织由于缺血缺氧刺激,心肌损伤标志物和细胞凋亡水平明显升高,而 miR-24 表达明显下调,参元丹可以有效降低心肌梗死大鼠血清 CK、LDH 的含量,减轻细胞凋亡程度,升高 miR-24 表达水平,且呈一定量效果关系。本研究结果初步验证了参元丹可能通过调控 miR-24 介导的细胞凋亡信号通路发挥心肌缺血细胞损伤的作用机制,为下一步研究益气逐瘀法在心肌缺血细胞损伤的作用机理奠定了基础。

参考文献

[1] Krijnen P A, Nijmeijer R, Meijer CJ, et al. Apoptosis in myocardial ischemia and infarction [J]. Journal of Clinical Pathology, 2002, 55 (11): 801-811.

[2] Qian L, Van Laake LW, Huang Y, et al. miR-24 inhibits apoptosis and represses Bim in mouse cardiomyocytes [J]. Journal of Experimental Medicine, 2011, 208 (3): 549-560.

[3] Hong-xu Liu, Ju-ju Shang, Fu-yong Chu, et al. Protective effects of Shen-Yuan-Dan, a traditional Chinese medicine, against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 956397.

[4] Kale J, Liu Q, Leber B, et al. Shedding light on apoptosis at subcellular membranes [J]. Cell, 2012, 151 (6): 1179-1184.

[5] Schirle NT, Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Gene regulation. Structural basis for microRNA targeting [J]. Science, 2014, 346 (6209): 608-613.

[6] van Rooij E, Olson EN. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2012, 11 (11): 860-872.

(2016-02-24 收稿 责任编辑:洪志强)