

益气逐瘀方改善心肌梗死大鼠心肌损伤及对 miR-24/Bim 通路相关蛋白表达的影响

褚福永 刘巍 尚菊菊 刘红旭

(首都医科大学附属北京中医医院,北京,100010)

摘要 目的:探讨益气逐瘀方参元丹对急性心肌梗死大鼠心肌损伤及 miR-24/Bim 通路相关蛋白表达的影响。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,超声心动图检测左室功能,Western-blot 检测心肌组织 Bim、Bcl-2、Bax、caspase-9 蛋白表达。结果:实验结束时,与模型组比较,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 基因表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),降低左室舒张和收缩末期内径($P < 0.05$, $P < 0.01$),升高左室短轴缩短率及射血分数($P < 0.05$, $P < 0.01$),升高心肌组织 Bcl-2 蛋白表达($P < 0.05$),降低 Bim、Bax、caspase-9 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:益气逐瘀方参元丹可能通过调控 miR-24/Bim 信号通路相关细胞因子蛋白表达改善心肌梗死细胞损伤。

关键词 益气逐瘀方;参元丹;细胞梗死;miR-24

Effects of Yiqi Zhuyu Formula on Improving Cardiac Injury and miR-24/Bim Signal Pathway Related Protein Expression in Myocardial Infarction Rats

Chu Fuyong, Liu Wei, Shang Juju, Liu Hongxu

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

Abstract Objective: To investigate the effects of Yiqi Zhuyu formula Shenyuan Dan (SYD) on myocardium injury biomarkers, cardiac function, miR-24/Bim pathway protein expression in myocardial infarction rats. **Methods:** Fifty SD rats were randomly divided into five groups namely sham group, model group, high-, middle-, and low-dose SYD group, with 10 rats in each group. The rat myocardium ischemia model was established by ligating of anterior descending branch of coronary artery. The rats in treatment groups were performed with intragastric administration of SYD for 2 weeks. After the treatment, serum levels of creatine kinases (CK), lactate dehydrogenase (LDH), and cardiac function were measured. miR-24 mRNA expression was measured by RT-PCR. Bim, Bcl-2, Bax and caspase-9 protein expression in ischemic myocardium were measured by Western-blot. **Results:** At the end of the treatment, the serum levels of CK, LDH were significantly decreased in SYD (high, middle and low-dose) groups compared with those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The cardiac function was also improved with the LVEDD and LVESD significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the LVFS and EF significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression of miR-24 mRNA and Bcl-2 protein in ischemic myocardium were significantly increased and the Bim, Bax, caspase-9 protein were significantly decreased in SYD groups compared with those in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Yiqi Zhuyu formula SYD could relieve myocardial injury and the possible mechanism may be related to adjusting miR-24/Bim signal pathway and its related protein expression in ischemic myocardium.

Key Words Yiqi Zhuyu formula; Shenyuan Dan; Myocardial infarction; miR-24

中图分类号:R242;R256;R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.005

冠心病发病的主要病理过程是心肌缺血,细胞凋亡是缺血早期细胞损伤的重要病理机制^[1-2]。研究表明,miR-24 在心肌组织中高表达,并且能够通

过调控下游 Bim/caspase 凋亡信号通路发挥心肌保护作用^[3]。课题组前期研究发现,基于益气逐瘀法组方的参元丹(SYD)具有减轻心梗大鼠心肌损伤程

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81603561);北京市医院管理局“青苗”计划专项(QML20150901)

作者简介:褚福永(1981.06—),男,医学博士,副主任医师,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:cfy0629@126.com

通信作者:刘红旭(1963.01—),男,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

度,上调缺血心肌组织 miR-24 表达的作用^[4,6],然而其通过干预 miR-24 介导的下游 Bim/caspase 信号通路发挥心肌保护作用的具体作用机制尚不清楚。本研究通过观察 SYD 对心肌梗死大鼠心肌损伤标志物、心功能、miR-24/Bim 通路相关蛋白表达的影响,探讨 SYD 改善心肌缺血细胞损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 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。严格控制饲养条件,自由饮食,光照时间 6:00 ~ 18:00,明/暗周期为 12 h/12 h,温度(20 ± 3)℃,背景噪声(40 ± 10)db。

1.1.2 药物 SYD 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^[4],将 SYD 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。

1.1.3 试剂与仪器 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,Bax、Bim、Bcl-2、caspase-9 多克隆抗体(英国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz),GAPDH 抗体(美国 Santa Cruz)。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),Thermo NanoDrop 2000 型分光光度计(美国 Thermo),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)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 采用冠状动脉前降支结扎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^[4],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/d 肌注预防感染。动物适应性喂养 3 d,禁食 12 h 后进行随机分为假手术组(Sham)、模型组(Model)、SYD 高剂量组(H-SYD)、SYD 中剂量组(M-SYD)、SYD 低剂量组(L-SYD),每组 10 只。

1.2.2 给药方法 从术后第 2 天开始给药,连续给药 14 d。其中,SYD 高、中、低剂量组分别按照 12 g/(kg·d)、6 g/(kg·d)、3 g/(kg·d)给予 SYD 药液

灌胃,假手术组和模型组分别给予等剂量的生理盐水灌胃。

1.2.3 检测指标与方法 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,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。全自动生化分析仪检测大鼠血清 CK、LDH 水平。超声心动图检测大鼠心功能,采用 GE VIVID-7 超声显像仪(探头频率 13MHz)于胸骨旁二维短轴平乳头肌水平采集左心室图像,测量左心室舒张期末内径(LVEDD)、左心室收缩期末内径(LVESD)、短轴缩短率(FS)及左心室射血分数(LVEF)。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'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';内参 U6 引物序列:上游 5'-GCTC GCTTCG GCAGCACA-3',下游:5'-GAGGTA TTCGCACCAGAGGA-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。Western blot 检测心肌组织 Bim、Bax、Bcl-2、caspase-9 蛋白表达 Western blot 检测心肌组织 Bim、Bax、Bcl-2、caspase-9 蛋白表达,取 30 mg 心肌组织经过匀浆、裂解、超声破碎、高速离心后,取上清,采用考马斯亮蓝法在分光光度仪上测定蛋白浓度,分装后 -20℃保存,为避免免疫印迹实验中标本蛋白量不同造成的影响,上述受体的免疫印迹结果用 GAPDH 进行校正。采用 Image-Pro Plus 4.1 软件分析蛋白条带的吸光度 [integrated absorbance, IA = 平均吸光度(A) × 面积],以靶蛋白 IA 与 GAPDH IA 的比值反映靶蛋白水平。

1.3 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,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 CK、LDH 水平及心脏功能参数比较 与假手术组比较,模型组大鼠血清 LDH、CK

表1 各组大鼠血清CK、LDH含量及miR-24基因表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	CK(U/L)	LDH(U/L)	miR-24/U6
假手术组	155.4 ± 25.6	176.6 ± 26.8	1.26 ± 0.13
模型组	298.7 ± 23.1**	374.5 ± 29.5**	0.42 ± 0.12**
SYD高剂量组	172.1 ± 19.4 ^{△△}	205.3 ± 28.5 ^{△△}	1.17 ± 0.09 ^{△△}
SYD中剂量组	203.4 ± 22.8 ^{△△}	228.4 ± 31.2 ^{△△}	1.02 ± 0.14 [△]
SYD低剂量组	236.9 ± 22.5 [△]	296.3 ± 25.3 [△]	0.64 ± 0.16

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表2 各组大鼠心脏功能参数比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	FS(%)	EF(%)
假手术组	6.14 ± 1.47	4.35 ± 0.93	33.42 ± 5.76	64.10 ± 8.33
模型组	8.96 ± 1.62**	7.23 ± 1.30**	18.22 ± 3.33**	36.28 ± 9.39**
SYD高剂量组	6.36 ± 1.45 ^{△△}	5.34 ± 1.46 ^{△△}	25.71 ± 4.52 ^{△△}	50.46 ± 8.27 ^{△△}
SYD中剂量组	7.54 ± 1.42 [△]	6.28 ± 1.56 [△]	22.34 ± 3.45 [△]	43.55 ± 8.04 [△]
SYD低剂量组	8.21 ± 1.69 [△]	6.84 ± 1.31 [△]	19.03 ± 3.76	39.40 ± 8.61 [△]

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$,与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表3 各组大鼠凋亡相关因子蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Bim	caspase-9	Bax	Bcl-2
假手术组	1.36 ± 0.19	1.93 ± 0.23	1.46 ± 0.25	2.15 ± 0.43
模型组	2.54 ± 0.14*	3.76 ± 0.47*	2.77 ± 0.33*	2.20 ± 0.45
SYD高剂量组	1.27 ± 0.15 [△]	1.42 ± 0.24 [△]	1.28 ± 0.16 ^{△△}	3.46 ± 0.41 [△]
SYD中剂量组	1.93 ± 0.14 [△]	2.46 ± 0.30 [△]	1.83 ± 0.22 [△]	2.88 ± 0.44 [△]
SYD低剂量组	2.09 ± 0.18 [△]	2.71 ± 0.25 [△]	2.24 ± 0.28 [△]	2.42 ± 0.32

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

明显升高($P < 0.01$),SYD高、中、低剂量组均能显著降低AMI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。与假手术组比较,模型组大鼠LVEDD、LVESD明显升高($P < 0.01$),FS、EF明显降低($P < 0.01$)。SYD高、中、低剂量均能够显著降低模型大鼠LVEDD、LVESD水平,升高FS、EF水平,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表2。

2.2 大鼠心肌组织miR-24基因表达比较 与假手术组比较,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梗大鼠心肌组织miR-24表达,其中,SYD高、中剂量组和模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

2.3 大鼠心肌组织Bim、caspase-9、Bax、Bcl-2蛋白表达比较 与假手术组比较,模型组大鼠Bim、caspase-9、Bax、Bcl-2蛋白表达均明显升高($P < 0.05$)。SYD高、中、低剂量均能够显著降低大鼠Bim、Bax、caspase-9水平,升高Bcl-2水平,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表3、图1。

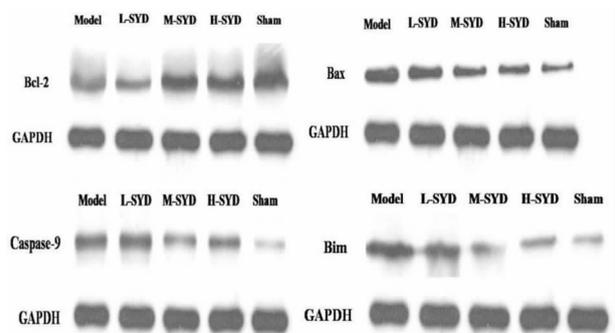


图1 各组大鼠心肌组织Bim、caspase-9、Bax、Bcl-2蛋白表达

3 讨论

冠状动脉粥样硬化性心脏病是最常见的人类死亡病因之一,其基本的病理生理过程是心肌缺血^[7]。细胞凋亡是心肌缺血早期细胞损伤的重要病理机制,近来研究表明,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^[8-9];此外,我们前期的临床研究也发现,不稳定型心绞痛(UAP)和急性心肌梗死(NSTEMI、STEMI)患者外周血miR-24表

达水平明显低于稳定型心绞痛和健康人群,miR-24 的表达与炎症反应和细胞凋亡因子呈明显的负相关,且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^[10]。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。

本研究表明,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 CK、LDH 和细胞凋亡水平明显升高,miR-24 表达明显降低,通过调控靶基因 Bim 及下游凋亡因子 Bax、Bcl-2、caspase-9 表达参与调控细胞凋亡。参元丹能够有效降低心肌梗死大鼠血清 CK、LDH 的水平,改善心功能,通过上调 miR-24 其下游抑凋亡因子 Bcl-2 表达水平,下调 Bim 及其下游促凋亡因子 Bax、caspase-9 表达水平发挥减轻心肌缺血细胞损伤的作用,且呈一定量效关系。本研究初步证实了参元丹具有减轻梗死大鼠心肌细胞损伤及细胞凋亡的作用,其机制可能与其上调梗死大鼠缺血区 miR-24 表达,从而抑制其靶基因 Bim 及下游促凋亡因子 Bax、caspase-9 基因表达有关。本研究将为益气逐瘀法在冠心病心肌缺血中的应用提供实验依据,也为临床上探寻冠心病新的治疗方法和药物靶点提供思路。

参考文献

[1] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol

Pathol, 2007, 35(4): 495-516.

- [2] Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, et al. Apoptosis in myocardial ischemia and infarction[J]. Journal of Clinical Pathology, 2002, 55(11): 801-811.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 褚福永, 刘巍, 刘红旭. 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[J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 392-394.
- [6] 褚福永, 刘巍, 刘红旭. 益气逐瘀方对心肌梗死大鼠心肌损伤标志物及 miR-24 基因表达的影响[J]. 北京中医药, 2015, 34(3): 187-189.
- [7] Kale J, Liu Q, Leber B, et al. Shedding light on apoptosis at sub-cellular membranes[J]. Cell, 2012, 151(6): 1179-1184.
- [8] Kim GH. MicroRNA regulation of cardiac conduction and arrhythmias[J]. Transl Res, 2013, 161(5): 381-392.
- [9] WY Zhang, LM Yan, YM Li, et al. Roles of miRNA-24 in regulating endothelial nitric oxide synthase expression and vascular endothelial cell proliferation[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2015, 405: 1-2.
- [10] 褚福永, 刘红旭, 程敏. 急性冠状动脉综合征患者外周血 miR-24 表达与细胞凋亡及炎症因子的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(8): 808-812.

(2018-07-20 收稿 责任编辑:徐颖)

《世界中医药》杂志中药研究栏目征稿通知

《世界中医药》杂志(CN 11-5529/R; ISSN 1673-7202)由国家中医药管理局主管,世界中医药学会联合会主办,创刊于 2006 年,是中国第一本面向国内外公开发行的中医药类综合性学术期刊,月刊。2009 年被国家科技部收录为“中国科技核心期刊”。杂志全文收录在《中国期刊全文数据库》《中文科技期刊数据库》《中国核心期刊数据库》《中文科技期刊综合评价数据库》《美国乌利希期刊指南收录期刊数据库》《美国化学文摘 CA 收录期刊数据库》等一系列检索系统。《世界中医药》杂志为世界中医药学会联合会的会刊,目前,该会已经成立了 26 个中药相关专业(如中药、中药新剂型、中药药剂、中药分析、中药化学、中药药理、药材资源、中药鉴定、方剂、中药饮片等)委员会,这些专业委员会在各自的学科建设、学术交流、人才培养等方面都发挥着重要的作用,本杂志与各专业委员会联手,产、学、研、用、政结合,优化学科建设,解决中药领域面临的实际困难,实现“学术、创新、转化、共赢”为目的,共同推动学科的发展,在中药领域的推广应用等方面做出了突出贡献。

本杂志近几年稳步发展,办刊质量逐步提升,影响不断

扩大,2016 年度科技核心期刊的各项指标统计数据,《世界中医药》杂志(中文刊)核心影响因子为 0.697,在同类期刊中上升至第 4 名,自 2009 年 9 月进入统计源期刊以来,连续第 9 年被评定为中国科技核心期刊。杂志设置“中药研究”栏目,陆续宣传展示国内外中医学研究进展和最新动态,是中药研究高学术水平的交流平台。如果您致力于中药领域的研究,请将您在新药研发、中药资源与鉴定、中药分析、药剂学、中药化学、药理、不良反应等方向的新成果、新技术、新方法与新思路撰写成有创新性的文章或综述,在本杂志上发表,内容以 8 500 字符以上为宜,稿件一经录用,优先安排发表。

欢迎您踊跃投稿!

投稿请通过《世界中医药》杂志社官方网站: www.sjzyyz.com,“在线投稿”入口注册投稿,并注明“中药征稿”字样。

联系电话:0086-10-58650023,58239055。

传真:0086-10-58650236; E-mail: sjzyyz@vip.126.com