

• 论 著 •

黄连素抑制心肌细胞凋亡改善大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制研究

陈 强¹, 姜 益¹, 郝军军¹, 赵 硕^{2△}

西安交通大学第一附属医院: 1. 心血管外科; 2. 外科重症加护病房, 陕西西安 710061

摘 要: **目的** 探讨黄连素预防大鼠急性心肌缺血再灌注损伤中的机制。 **方法** 大鼠随机分为空白对照组、假手术组、模型组和黄连素给药组, 每组 15 只。黄连素给药组灌胃 100 mg/kg 的黄连素药物, 其余 3 组灌胃相应体积的药物溶剂, 每天定时灌胃 1 次。给药两周后模型组和黄连素给药组进行大鼠急性心肌缺血再灌注造模, 假手术组不造成动物心肌急性缺血, 对照组大鼠只麻醉, 其余操作相同。检测各组超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)及丙二醛(MDA)水平, 以及凋亡相关蛋白含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)水平。 **结果** 黄连素给药组[(43.29±5.58)%]大鼠心肌梗死面积低于模型组[(25.39±4.26)%], 差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较, 模型组 SOD 水平降低, LDH、MDA 水平上升, Bax、Caspase-3 的蛋白和基因表达水平上升, Bax/Bcl-2 基因表达水平上升, Bcl-2 的蛋白和基因表达水平降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 与模型组比较, 黄连素给药组 SOD 水平上升, LDH、MDA 水平降低, Bax、Caspase-3 的蛋白和基因表达水平降低, Bax/Bcl-2 基因表达水平降低, Bcl-2 的蛋白和基因表达水平上升, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。 **结论** 黄连素可通过降低心肌过氧化进而抑制心肌细胞凋亡改善大鼠急性心肌缺血再灌注损伤。

关键词: 黄连素; 细胞凋亡; 心肌缺血再灌注损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.013

中图法分类号: R282.5

文章编号: 1673-4130(2021)01-0056-04

文献标志码: A

Effect of berberine on myocardial apoptosis and myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

CHEN Qiang¹, JIANG Yi¹, HAO Junjun¹, ZHAO Shuo^{2△}

1. Department of Cardiovascular Surgery; 2. Department of Surgical Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of berberine in preventing acute myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Rats were randomly divided into blank control group, sham operation group, model group and berberine group with 15 rats in each group. The berberine group was given 100 mg/kg berberine by gavage, and the other three groups were given corresponding volume of drug solvent, once a day. Two weeks after administration, the model group and berberine group were subjected to myocardial ischemia-reperfusion. The sham operation group did not cause acute ischemia, while the control group was anesthetized, and the other operations were the same. The levels of superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and the relative expression levels of apoptosis related proteins cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-3 (Caspase-3), B lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 related x protein (Bax) were detected. **Results** The infarct size of berberine group [(43.29±5.58)%] was lower than that of model group [(25.39±4.26)%], and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with the control group, the levels of SOD was decreased, the levels of LDH and MDA were increased, the protein and gene expression levels of Bax and Caspase-3 were increased, the expression level of Bax/Bcl-2 gene was increased, and the protein and gene expression levels of Bcl-2 were decreased in the model group ($P<0.05$); compared with the model group, the level of SOD was increased, the levels of LDH and MDA were decreased, the protein and gene expression levels of Bax, Caspase-3 were decreased, the gene expression level of Bax/Bcl-2 was decreased, and the protein and gene expression levels of Bcl-2 were increased ($P<0.05$) in berberine group. **Conclusion** Berberine can improve the acute myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by reducing myocardial peroxidation and then inhibiting cardiomyocyte apoptosis.

作者简介: 陈强, 男, 主治医师, 主要从事心血管相关研究。 [△] **通信作者,** E-mail: cyobng@163.com。

本文引用格式: 陈强, 姜益, 郝军军, 等. 黄连素抑制心肌细胞凋亡改善大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(1): 56-58.

Key words: berberine; apoptosis; myocardial ischemia-reperfusion injury

急性心肌梗死是严重的致死、致残性疾病^[1],由于现代人生活方式的改变,急性心肌梗死的发病年龄趋于年轻化^[2],目前临床中治疗急性心肌梗死最主要的手段仍然是及时进行缺血部位再灌注,恢复缺血部位的血流供应^[3]。但是随着及时血液的再灌注的发展,再灌注损伤的概率逐年增加^[4-6]。研究发现在再灌注过程中可能进一步增加心肌梗死面积,降低心脏收缩功能,引起心脏超微结构改变,甚至诱发严重的心律失常,最终导致患者死亡^[7-9]。

心肌缺血再灌注损伤的发生过程较为复杂,其涉及多种致病机制,目前研究较多的是氧化应激、钙超载、心肌细胞凋亡及心肌细胞能量代谢紊乱等^[10-11],缺血再灌注损伤是多种致病机制交叉的作用结果。

黄连素是传统中药黄连的主要提取物质,主要用于治疗腹泻、痢疾及其他胃肠道疾病。黄连具有抗心律失常、降血脂、降血压等药理学活性。

鉴于以上原因,本研究构建大鼠体内急性心肌缺血再灌注模型,探讨急性心肌缺血再灌注损伤中心肌细胞的凋亡水平,以及黄连素在大鼠急性心肌缺血再灌注损伤中保护心肌细胞的机制,为黄连素在急性心肌缺血再灌注损伤的预防及治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 自西安交通大学医学部动物实验中心购买健康 SD 雄性大鼠 60 只,体质量 220~240 g,许可证号:SCXK(陕)2018-001,饲养于西安交通大学医学部动物实验中心,饲养环境保持室温 25℃,昼夜交替各 12 h,大鼠可自由饮水和摄食。适应性喂养 1 周后开始正式实验,将所有大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组和黄连素给药组(100 mg/kg),每组 15 只。动物手术前预防给药 14 d,黄连素组灌胃 100 mg/kg 的黄连素药物,其余 3 组灌胃相应体积的药物溶剂,每天定时灌胃 1 次。给药两周后进行大鼠心肌缺血再灌注造模。

1.2 大鼠急性心肌缺血再灌注模型的构建 大鼠急性心肌缺血再灌注模型的构建参照王世玉等^[12]的造模方式,模型组及黄连素给药组大鼠在造模前采用 4% 的水合氯醛水溶液(10 μL/g)腹腔注射麻醉,待大鼠进入深度麻醉状态后将其固定于保温手术台上。腹部朝上,剔除颈部、腹部及四肢处所有毛发,经气管插管,连接于小动物人工呼吸机(呼吸比为 1:2,呼吸频率为 75 次/分)。剪开心包膜,在左心耳下端找出左冠状动脉前降支,将结扎细线从下穿过,收紧细线,缺血操作 30 min 后松开细线,继续灌注 120 min,完成动物造模后用预先装有抗凝剂肝素钠的小型离心管收集眼眶血 2 mL,以备后用,同时拖颈处死大鼠后收集心肌组织进行后续研究。假手术组动物经历上述相似操作,不收紧细线,不造成动物心肌急性缺血。

其余操作相同,对照组大鼠只麻醉,其余操作相同。

1.3 指标检测

1.3.1 计算心肌梗死面积 每组随机取 5 只大鼠心肌组织,取出冷冻的心肌组织,在解冻之前将其切成厚度为 1~2 mm 的薄片,将薄片浸泡在 1% 的 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)溶液中,37℃避光染色 30 min,染色结束后用蒸馏水漂洗 3 min,吸干残余水分后在 4% 的多聚甲醛中浸泡固定 48 h,取出后用相机拍照,采用 Image J 软件分析染色后的心肌组织,红色或者粉红色即为正常组织,白色或灰白色为梗死组织,计算心肌梗死面积百分比(梗死面积百分比=梗死心肌面积/总心肌面积×100%)。

1.3.2 测定相关指标水平 每组随机取 5 只大鼠的左心室相同部位,加入 9 倍体积的生理盐水制备 10% 的组织匀浆液,于 4℃ 6 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,测定上清液中超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)及丙二醛(MDA)水平。

1.3.3 检测大鼠凋亡状态 使用传统 Trizol 法提取大鼠心肌组织 RNA,反转录后使用实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测与心肌细胞凋亡相关的蛋白含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)的表达水平。使用蛋白裂解液提取大鼠心肌组织细胞蛋白,蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 的表达水平,测定心肌组织细胞凋亡状态。

1.4 统计学处理 运用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 TTC 染色梗死面积比较 通过计算各组心肌梗死面积百分比,结果显示使用黄连素预防给药组[(43.29±5.58)%]大鼠心肌梗死面积低于模型组[(25.39±4.26)%],差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 大鼠心肌组织 SOD、LDH 及 MDA 水平测定 结果显示,与对照组比较,模型组 SOD 水平降低,LDH、MDA 水平上升,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,黄连素给药组 SOD 水平上升,LDH、MDA 水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

2.3 大鼠心肌组织细胞凋亡相关基因检测 结果显示,与对照组比较,模型组 Bax、Caspase-3、Bax/Bcl-2 基因相对表达水平上升,Bcl-2 基因相对表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,黄连素给药组 Bax、Caspase-3、Bax/Bcl-2 基因相对表达水平降低,Bcl-2 基因相对表达水平上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

2.4 大鼠心肌组织细胞凋亡相关蛋白检测 结果显

示,与对照组比较,模型组 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平上升,Bcl-2 蛋白表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,黄连素给药组 Bax、

Caspase-3 蛋白表达水平降低,Bcl-2 蛋白表达水平上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

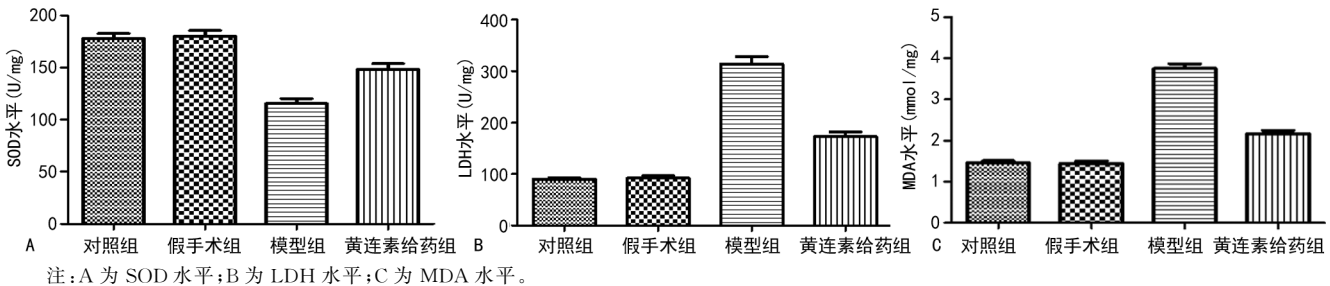


图 1 大鼠心肌组织 SOD、LDH 及 MDA 水平

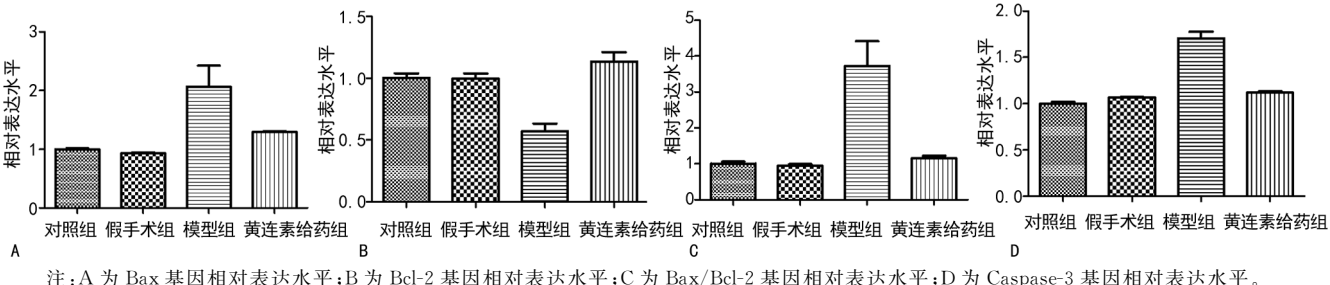


图 2 大鼠心肌组织细胞凋亡相关基因表达水平

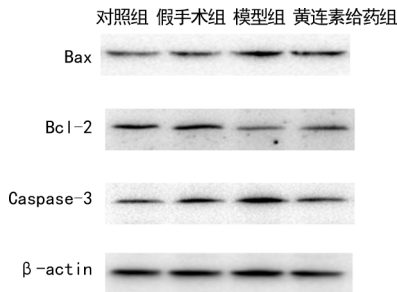


图 3 大鼠心肌组织细胞凋亡相关蛋白表达水平

3 讨论

急性心肌缺血的发病逐渐年轻化,同时急性心肌缺血的病死率居高不下,是临床中亟待解决的一类致死、致残率极高的心脏疾病^[2],目前治疗策略主要是及时通过多种途径恢复心肌缺血部位的血液供应^[13],但有研究表明在心肌缺血后及时灌注新鲜血液常常引起多种心脏疾病,加剧患者病情,主要有严重的心律失常、心脏收缩功能降低,以及对应心脏超微结构的功能性改变^[9]。目前急性心肌缺血再灌注损伤的机制主要有氧化应激、钙超载、心肌细胞凋亡及心肌细胞能量代谢紊乱等^[10-11],急性心肌缺血再灌注损伤可能是多种致病机制相互交叉作用的结果。目前对于急性心肌缺血再灌注损伤的治疗主要是试图减少心肌梗死面积及降低急性心肌缺血再灌注损伤中的过氧化水平^[14]。

黄连素是传统中药黄连的主要提取物质,主要用于治疗胃肠道类疾病,在降血脂、降血压及抗心律失常中有良好的治疗效果。结合上述原因,本研究选择使用黄连素探讨其在大鼠急性心肌缺血再灌注损伤

中的预防性治疗效果及其作用机制。

本研究首先采用结扎的手术方法,阻断左冠状动脉前降支 30 min 后恢复血流 120 min、人工模拟急性心肌缺血再灌注损伤。结果显示,与模型组比较,在预防性给黄连素后,能够有效地降低缺血后的心肌梗死面积,同时在黄连素给药组中大鼠的心肌组织中 LDH 水平降低,这与张宏考等^[15]的研究结果相似,提示黄连素能够有效地保护心肌梗死。本研究发现模型组大鼠心肌组织中 SOD 的水平降低,这提示心肌组织存在着大量的氧自由基亟待清除,同时发现心肌中 MDA 的水平上升,提示存在着心肌组织脂质过氧化。已有研究表明,过多的活性氧能够促进心肌细胞的凋亡^[16],结合本研究可以发现在急性心肌缺血再灌注中存在心肌细胞的凋亡,主要表现为抗凋亡蛋白 Bcl-2 的基因及蛋白表达水平在急性心肌缺血再灌注损伤模型中降低,而促进细胞凋亡的 Bax 的基因及蛋白表达水平上升,黄连素能够有效地调节 Bax 与 Bcl-2 的蛋白及基因表达水平的平衡,与此同时模型中存在着 Caspase-3 蛋白的高表达,这进一步提示在急性心肌缺血再灌注损伤中存在着 Caspase 依赖性心肌细胞凋亡,这与张煜等^[17]的研究结果相符。

综上所述,黄连素可通过降低心肌过氧化进而抑制心肌细胞凋亡改善大鼠急性心肌缺血再灌注损伤。

参考文献

[1] 王永,侯爱洁. 辽北贫困地区急性心肌梗死救治现状及其改进方向[J]. 中国临床实用医学,2017,8(6):1-2.
[2] 初慧中. 急性心肌梗死患者性别差异的临(下转第 63 页)

- [3] LIU J, WANG D, XIONG Y, et al. Association of elevated high sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) levels with hemorrhagic transformation and 3-month mortality in acute ischemic stroke patients with rheumatic heart disease in china [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148444.
- [4] BOEDDINGHAUS J, NESTELBERGER T, KOECHLIN L, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with point-of-care high-sensitivity cardiac troponin I [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 75(10): 1111-1124.
- [5] NEAL B, PERKOVIC V, MAHAFFEY K W, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med, 2017, 377(21): 2099.
- [6] RYMER J A, GRANGER C B. Review: a single hs-cTnT with a cutpoint < limit of detection plus a nonischemic ecg can rule out acute MI [J]. Ann Intern Med, 2017, 167(4): JC23.
- [7] 霍卫松, 张磊, 高宇哲, 等. 心衰标志物可视化联合检测方法研究 [J]. 影像科学与光化学, 2015, 33(4): 275-284.
- [8] EGGERS K M, VENGE P, LINDAHL B. High-sensitive cardiac troponin t outperforms novel diagnostic biomarkers in patients with acute chest pain [J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(13/14): 1135-1140.
- [9] SANCHIS-GOMAR F, ALIS R, RAMPININI E, et al. Hs-cTnT levels in professional soccer players throughout a season: no evidence of sustained cardiac damage [J]. Int J Cardiol, 2015, 197: 292-293.
- [10] GURURAJAN P, GURUMURTHY P, NAYAR P, et al. Heart fatty acid binding protein (H-FABP) as a diagnostic biomarker in patients with acute coronary syndrome [J]. Heart Lung Circ, 2010, 19(11): 660-664.
- [11] HAUSFATER P, HAJAGE D, BULSEI J, et al. Impact of point of care testing on length of stay of patients in the emergency department: a cluster randomized controlled study [J]. Acad Emerg Med, 2020, 27(10): 974-983.
- [12] LOEFFELHOLZ M J, TANG Y W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections-the state of the art [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 747-756.
- [13] MENG F D, HUO W S, HE M L, et al. A microfluidic fluorescence immunoassay test card for rapid detection of heart-type fatty acid binding protein. [J]. Chinese J Analyt Chem, 2016, 44(4): 633-639.
- [14] KOST G J. Geospatial science and point-of-care testing: creating solutions for population access, emergencies, outbreaks, and disasters [J]. Front Public Health, 2019, 7: 329.
- [15] 高宇哲, 张磊, 霍卫松, 等. 巨磁阻微流体免疫传感器快速定量检测 d-二聚体 [J]. 分析化学, 2015, 43(6): 802-807.

(收稿日期: 2020-05-03 修回日期: 2020-08-26)

(上接第 58 页)

- 床比较分析 [J]. 中国当代医药, 2017, 10(36): 36-38.
- [3] MIHANFAR A, NEJABATI H R, FATTAHI A, et al. The role of sphingosine 1 phosphate in coronary artery disease and ischemia reperfusion injury [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2083-2094.
- [4] ELIZABETH M, CHARLES S. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 581-609.
- [5] ZHOU H, SHI C, Hu S Y, et al. B1 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury via repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways [J]. Angiogenesis, 2018, 21(3): 599-615.
- [6] ZHU B M, YU L L, CHEN D, et al. Electrical acupuncture moderately decreases cardiac ischemiareperfusion injury in rats [J]. Acupunct Ele Therap Res, 2017, 42(3): 203-216.
- [7] 孙红琼, 柯亭羽. 脂联素在糖尿病心肌缺血再灌注损伤中的变化研究 [J]. 健康之路, 2017, 74(12): 8.
- [8] 陈福晖, 刘达兴, 容松. 心肌缺血再灌注损伤发生机制的研究进展 [J]. 安徽医药, 2017, 21(12): 2145-2148.
- [9] JANG S, LEWIS T S, POWERS C, et al. Elucidating mitochondrial electron transport chain supercomplexes in the heart during ischemia-reperfusion [J]. Antioxid Redox Signal, 2017, 27(1): 57-69.
- [10] 陈福晖, 刘达兴, 容松. 心肌缺血再灌注损伤发生机制的研究进展 [J]. 安徽医药, 2017, 21(12): 2145-2148.
- [11] DAI S H, XU Q R, LIU S, et al. Role of autophagy and its signaling pathways in ischemia/reperfusion injury [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(10): 4470-4480.
- [12] 王玉玉, 崔昕龙, 薛富善, 等. PI3K/Akt 或 JAK/STAT-3 信号通路在肢体缺血联合吗啡后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(3): 361-365.
- [13] 孙洋洋. 表观遗传调控在心肌缺血作用机制中的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(12): 3802-3812.
- [14] 沈继龙, 朱克军, 顾红军, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤不同时相氧化应激相关指标的变化 [J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(3): 177-178.
- [15] 张宏考, 方明, 肖俊会, 等. 黄连素预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 湖北医药学院学报, 2009, 28(1): 20-22.
- [16] 王国权, 庞素秋, 邱飞, 等. 熊果酸对心肌缺血再灌注损伤的 H9c2 细胞的保护作用 (英文) [J]. 华侨大学学报 (自然科学版), 2018, 39(1): 62-69.
- [17] 张煜, 邱朝晖, 郭新贵, 等. Caspase-3 特异性抑制剂对缺血再灌注损伤诱导的大鼠心肌细胞凋亡的作用 [J]. 中国临床医学, 2009, 16(1): 17-20.

(收稿日期: 2020-05-11 修回日期: 2020-09-03)