

Calpain 1 在黄芪甲苷抑制异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌凋亡中的作用

梅 蒙, 王洪新, 唐富天, 鲁美丽, 许崇花, 胡 进, 韩镭微
(辽宁医学院心血管药物研究重点实验室, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 黄芪甲苷; 心肌凋亡; Calpain 1; 异丙肾上腺素

[摘 要] 目的 探讨 Calpain 1 在黄芪甲苷抑制异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌凋亡中的作用。方法 SD 大鼠 48 只, 随机分为 6 组, 每组 8 只: 正常对照组、异丙肾上腺素组、异丙肾上腺素 + 普萘洛尔 40 mg/(kg · d) 组、异丙肾上腺素 + 黄芪甲苷 20 mg/(kg · d) 组、异丙肾上腺素 + 黄芪甲苷 40 mg/(kg · d) 组、异丙肾上腺素 + 黄芪甲苷 80 mg/(kg · d) 组。给药组连续灌胃 2 周, 并于灌胃 1 天后腹腔注射异丙肾上腺素 10 mg/(kg · d) 2 周。2 周后, 采用 TUNEL 检测心肌凋亡, 电镜观察心肌线粒体病变, Western blot 检测心肌线粒体 Calpain 1、凋亡诱导因子(AIF)的蛋白表达和心肌组织多聚 ADP 核糖聚合酶 1(PARP1)的蛋白表达。结果 与正常对照组相比, 异丙肾上腺素组凋亡率明显增加; 心肌线粒体肿胀、膜融合消失、嵴断裂; 心肌线粒体中 Calpain 1 表达增加, AIF 表达减少; 心肌组织中 PARP1 表达增加。与异丙肾上腺素组相比, 异丙肾上腺素 + 黄芪甲苷 40 mg/(kg · d) 组、异丙肾上腺素 + 80 mg/(kg · d) 组表现为心肌凋亡率减少; 心肌线粒体结构相对完整; 心肌线粒体 Calpain 1 表达减少, AIF 表达增加; 心肌组织 PARP1 表达减少, 且呈一定的剂量依赖性。结论 黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的心肌凋亡有一定的保护作用, 其机制可能与抑制线粒体 Calpain 1 表达, 从而减少线粒体 AIF 释放至胞浆并转位至核有关。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of Calpain 1 on Astragaloside IV Inhibiting Myocardial Apoptosis in Rats Induced by Isoproterenol

MEI Meng, WANG Hong-Xin, TANG Fu-Tian, LU Mei-Li, XU Chong-Hua, HU Jin, and HAN Rong-Hui
(Key Laboratory of Molecular Biology and Drug Research, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Astragaloside IV; Myocardial Apoptosis; Calpain 1; Isoproterenol

[ABSTRACT] Aim To explore the effect of Calpain 1 on astragaloside IV (ASIV) inhibiting myocardial apoptosis induced by isoproterenol (ISO). Methods 48 SD rats were randomly divided into 6 groups, 8 rats in each group: control group, ISO group, ISO + propranolol 40 mg/(kg · d) group, ISO + ASIV 20 mg/(kg · d) group, ISO + ASIV 40 mg/(kg · d) group and ISO + ASIV 80 mg/(kg · d) group. Administered groups received continually intragastric administration for 2 weeks, and ISO was intraperitoneal injected for 2 weeks in the day after that. 2 weeks later, TUNEL and electron microscopy experiments were performed to detect the myocardial apoptosis and mitochondrial changes respectively. Western blot was used to semi-quantify the expression of PARP1, mitochondrial Calpain 1 and apoptosis inducing factor (AIF). Results Compared to control group, ISO group had a higher apoptosis percentage and mitochondrial swelling, cristae breakage were observed. In addition, the expression of poly ADP ribose polymerase 1 (PARP1), mitochondrial Calpain 1 increased while mitochondrial AIF decreased. Compared to ISO group, ASIV group with different dose could decrease the apoptosis percentage and mitochondrial damage. Western blot results revealed that ASIV could decrease PARP1, mitochondrial Calpain 1 expression and increase mitochondrial AIF. Conclusions ASIV can protect myocardial apoptosis induced by ISO. The possible mechanism can be related to the inhibition of mitochondrial Calpain 1

expression, then reduce the release of mitochondria AIF into the cytosol and translocation to the nuclei.

心肌凋亡即心肌细胞程序性死亡,其在心肌肥厚、心衰及心肌缺血等心脏疾病的发病机制和预后中发挥着重要作用^[1-2],其包括内源性与外源性两条经典凋亡途径,前者主要是指 Fas 死亡受体介导细胞凋亡,而后者主要是线粒体途径。Calpain 为钙依赖性半胱氨酸蛋白水解酶家族,主要包括 Calpain 1 和 Calpain 2 两个亚型,其在心血管疾病中的作用得到了广泛研究^[3]。已有研究表明 Calpain 1 主要通过作用于线粒体凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、BH3 结构域凋亡诱导蛋白、钠钙交换蛋白等,参与调控心肌凋亡的病理过程^[4-6]。黄芪甲苷(astragaloside IV, ASIV)作为中药黄芪的有效成分之一,具有抗炎抗病毒、抗氧化、保护组织器官及抗凋亡等广泛的药理作用^[7-8]。本研究旨在用异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)制作心肌凋亡模型,探讨 Calpain 1 在 ASIV 抑制心肌凋亡中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠,4~6 周龄,体重 200 ± 20 g,由辽宁医学院实验动物中心提供,动物合格证号为 SCXK 2009-0004。

1.2 药品与试剂

ASIV(纯度 >98%,南京景竹生物科技有限公司);普萘洛尔、ISO(美国 Sigma 公司);TUNEL 试剂盒(罗氏公司);Calpain 1、AIF 一抗(武汉博士德生物科技有限公司); β -actin、等电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)、多聚 ADP 核糖聚合酶 1(poly ADP ribose polymerase 1, PARP 1)一抗(Santa Cruz 公司);组织线粒体分离试剂盒(碧云天生物技术研究所以);其它试剂均为国产分析纯。

1.3 实验分组及模型制备

SD 大鼠 48 只,随机分为 6 组,每组 8 只:正常对照组、ISO 组、ISO + 普萘洛尔 $40 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 组、ISO + AS IV $20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 组、ISO + AS IV $40 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 组、ISO + AS IV $80 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 组。AS IV 用 1% 羧甲基纤维素钠溶解,给药组连续灌胃 2 周,并于灌胃 1 天后腹腔注射 ISO $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 2 周。正常对照组予以 1% 羧甲基纤维素钠灌胃和生理盐水腹腔注射,ISO 组予以 1% 羧甲基纤维素钠灌胃。

1.4 TUNEL 染色检测心肌凋亡

取心肌组织常规固定,石蜡包埋,切片,60℃ 烤

片 2 h,二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,双蒸水浸洗 3 min, PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,以下步骤在暗湿盒进行:3% 过氧化氢-甲醇处理 10 min, PBS 浸洗 3 次,每次 5 min,0.1% Triton X-100 处理 8 min, PBS 浸洗 2 次,每次 5 min, TUNEL 反应混合液 37℃ 孵育 1 h, PBS 浸洗 3 次,每次 5 min, convert-POD 37℃ 孵育 30 min, PBS 浸洗 3 次,每次 5 min, DAB 避光显色 10 min, PBS 浸洗 3 次,每次 5 min, 苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。20× 光镜下观察,蓝色核为正常细胞核,棕黄色核为凋亡细胞核。每张切片随机选取 8 个视野,采用 Image-PRO Plus 软件分析凋亡率。

1.5 电镜观察心肌细胞线粒体

大鼠心脏经 2.5% 戊二醛灌流后,取材,3% 戊二醛固定 4 h, PBS 漂洗 3 次,每次 10 min, 1% 锇酸固定 2 h, PBS 漂洗 3 次,每次 10 min, 梯度酒精脱水,无水丙酮脱水 2 次,每次 10 min, 纯树脂包埋,分别于 37℃、45℃、60℃ 聚合,修块,切超薄切片,染色,电镜观察。

1.6 大鼠心脏线粒体蛋白提取

取 100 mg 新鲜心脏,冰上剪碎,加入 1 mL 预冷的线粒体分离试剂,匀浆。将组织匀浆,4℃、600 g 离心 5 min,弃沉淀,取上清。将上清于 4℃、11000 g 离心 10 min,沉淀即为线粒体;取分离的线粒体,加入 100 μL 含 1% PMSF 的线粒体裂解液超声粉碎 30 s,冰上静置 30 min 后于 4℃、12000 r/min 离心 20 min,取上清即为线粒体蛋白。

1.7 Western blot 检测心肌组织 PARP1、心肌线粒体 Calpain 1 和 AIF 表达

取心肌组织约 100 mg,剪碎,加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液 1 mL。超声粉碎 30 s,冰上静置 30 min, 4℃、12000 r/min 离心 20 min,取上清液。BCA 法进行蛋白浓度测定,蛋白配平,加入适量 5×SDS 上样缓冲液,100℃ 煮 5 min。灌胶上样进行 SDS-PAGE 电泳,根据 Marker 移动情况适时终止电泳,转至 PVDF 膜,1% BSA 封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 Calpain 1、AIF、PARP1 一抗,4℃ 杂交过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,二抗室温杂交 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 显影,上机检测。

1.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间显著性检验采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ASIV对心肌凋亡的影响

与正常对照组相比,ISO 组凋亡率明显增加($P < 0.05$)。与 ISO 组相比,ASIV 80 mg/(kg · d)、ASIV 40 mg/(kg · d)、普萘洛尔 40 mg/(kg · d) 干预后能够明显降低凋亡率($P < 0.05$),而 ASIV 20 mg/(kg · d) 干预后凋亡率与 ISO 组比较无明显差别($P > 0.05$;图 1)。

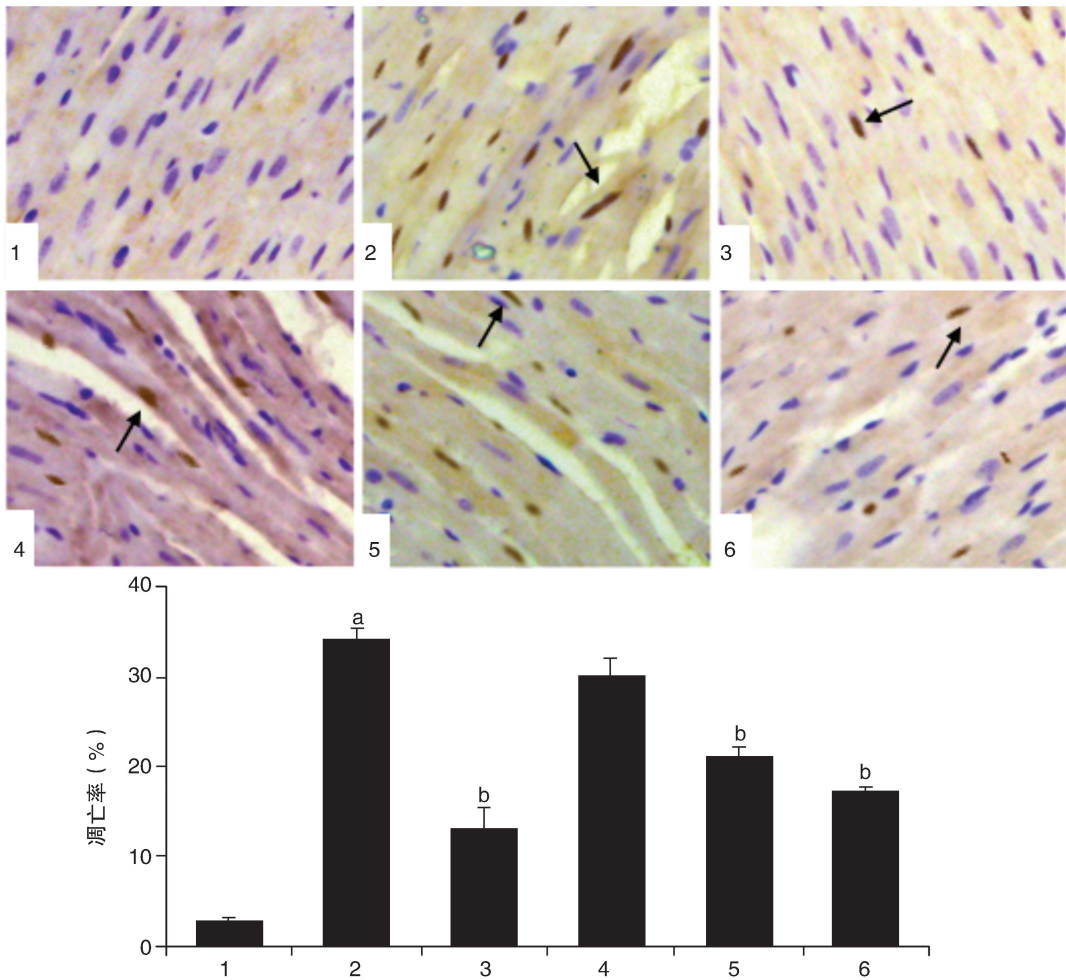


图 1. ASIV对心肌凋亡的影响(×200) 1 为正常对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO + 普萘洛尔 40 mg/(kg · d) 组,4 为 ISO + ASIV 20 mg/(kg · d) 组,5 为 ISO + ASIV 40 mg/(kg · d) 组,6 为 ISO + ASIV 80 mg/(kg · d) 组。a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 ISO 组比较。

Figure 1. Effects of ASIV on myocardial apoptosis(×200)

2.2 ASIV对心肌组织线粒体的影响

电镜下,正常对照组肌丝排列整齐,线粒体结构完整,嵴膜清楚;ISO 组肌纤维断裂,线粒体嵴断裂、空泡样变,膜融合消失;普萘洛尔 40 mg/(kg · d)、AS IV 80 mg/(kg · d)、AS IV 40 mg/(kg · d) 干预后心肌结构明显改善,肌纤维各带较为明显,线粒体结构较完整,呈杆状或椭圆形分布;ASIV 20 mg/(kg · d) 干预后心肌结构改善不明显,线粒体仍呈现肿胀、膜破裂等病变(图 2)。

2.3 ASIV对心肌组织线粒体 Calpain 1 的影响

与正常对照组相比,ISO 组线粒体 Calpain 1 表达明显增加($P < 0.05$);与 ISO 组相比,普萘洛尔 40

mg/(kg · d)、AS IV 80 mg/(kg · d)、AS IV 40 mg/(kg · d) 干预后线粒体 Calpain 1 表达减少($P < 0.05$),而 ASIV 20 mg/(kg · d) 干预后线粒体 Calpain 1 表达与 ISO 组比较无明显差别($P > 0.05$;图 3)。

2.4 ASIV对心肌组织线粒体 AIF 的影响

与正常对照组相比,ISO 组线粒体 AIF 表达明显减少($P < 0.05$);与 ISO 组相比,AS IV 40 mg/(kg · d)、AS IV 80 mg/(kg · d) 干预后线粒体 AIF 的表达随着 ASIV 剂量的递增而增加,普萘洛尔 40 mg/(kg · d) 干预后 AIF 表达增加($P < 0.05$),而 ASIV 20 mg/(kg · d) 干预后线粒体 AIF 表达减少,但差异无统计学意义($P > 0.05$;图 4)。

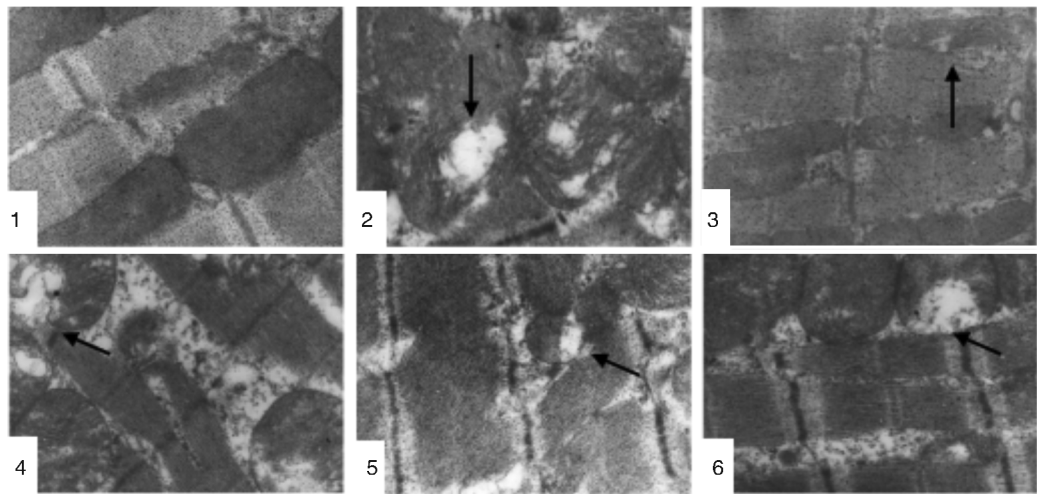


图 2. ASIV对心肌线粒体的影响(×15000) 1 为正常对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO + 普萘洛尔 40 mg/(kg · d)组,4 为 ISO + ASIV 20 mg/(kg · d)组,5 为 ISO + ASIV 40 mg/(kg · d)组,6 为 ISO + ASIV 80 mg/(kg · d)组。

Figure 2. Effects of ASIV on myocardial mitochondria(×15000)

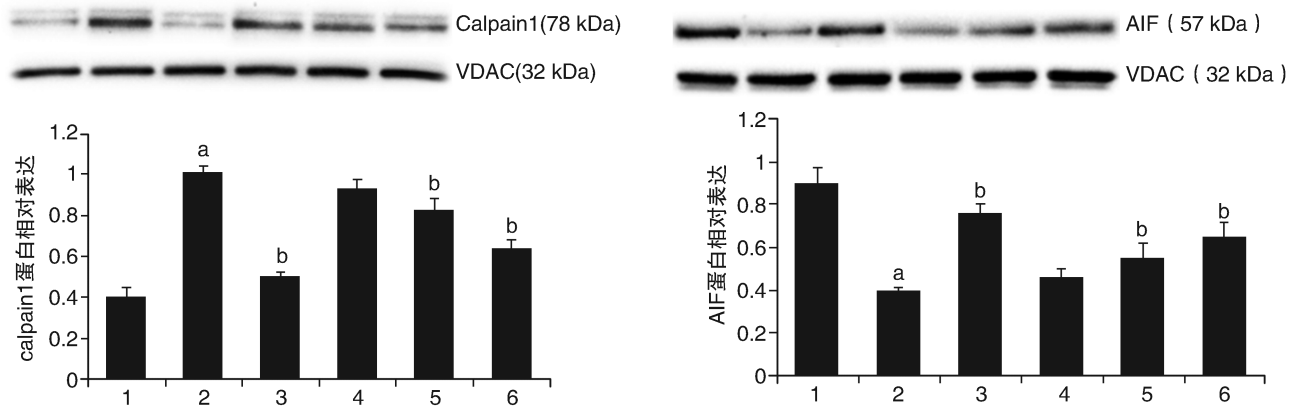


图 3. ASIV对心肌线粒体 Calpain 1 蛋白表达的影响($n=8$) 1 为正常对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO + 普萘洛尔 40 mg/(kg · d)组,4 为 ISO + AS IV 20 mg/(kg · d)组,5 为 ISO + AS IV 40 mg/(kg · d)组,6 为 ISO + ASIV 80 mg/(kg · d)组。a 为 $P<0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 ISO 组比较。

Figure 3. Effects of ASIV on Calpain 1 expression in myocardial mitochondria($n=8$)

2.5 ASIV对心肌组织 PARP1 的影响

与正常对照组相比,ISO 组 PARP1 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与 ISO 组相比,AS IV 40 mg/(kg · d)、ASIV 80 mg/(kg · d)、普萘洛尔 40 mg/(kg · d)干预后 PARP1 表达明显减少 ($P < 0.05$),而 ASIV 20 mg/(kg · d)干预后 PARP1 的表达与 ISO 组比较未见明显减少(图 5)。

3 讨论

心肌凋亡与许多心脏疾病的发生和发展密切

图 4. ASIV对心肌线粒体 AIF 蛋白表达的影响($n=8$)

1 为正常对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO + 普萘洛尔 40 mg/(kg · d)组,4 为 ISO + AS IV 20 mg/(kg · d)组,5 为 ISO + AS IV 40 mg/(kg · d)组,6 为 ISO + ASIV 80 mg/(kg · d)组。a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 ISO 组比较。

Figure 4. Effects of ASIV on AIF expression in myocardial mitochondria($n=8$)

相关,已有研究结果表明心肌凋亡与氧化应激、线粒体电子传递链障碍及钙敏感受体激活等有关^[9-10]。近几年,Calpain 1 作为研究凋亡机制的新靶点被提出,线粒体 Calpain 1 主要定位于线粒体内膜,成熟的 AIF 也锚定于线粒体内膜,线粒体 Calpain 1 激活后作用于 AIF,导致 AIF 从线粒体释放至胞浆,继而转位至胞核;而 PARP1 主要存在于细胞核,其被过度活化后亦可引起 AIF 的释放和转位,继而引起核染色质固缩,DNA 片段化,细胞凋亡^[11-12]。

以往研究结果表明 ASIV能通过激活 PI3K/Akt 通路^[13],促进 TERT 表达,保护受损心肌线粒体^[14],

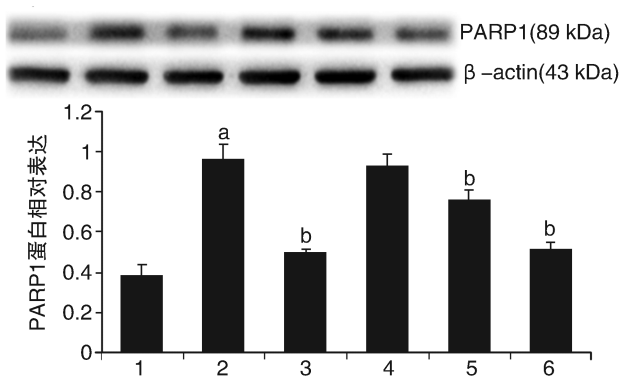


图 5. ASIV 对心肌 PARP 1 蛋白表达的影响($n=8$) 1 为正常对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO + 普萘洛尔 40 mg/(kg·d) 组,4 为 ISO + ASIV 20 mg/(kg·d) 组,5 为 ISO + ASIV 40 mg/(kg·d) 组,6 为 ISO + ASIV 80 mg/(kg·d) 组。a 为 $P<0.01$,与正常对照组比较;b 为 $P<0.05$,与 ISO 组比较。

Figure 5. Effects of ASIV on PARP1 expression in myocardial tissue($n=8$)

抑制心肌凋亡。本研究结果发现,ISO 组凋亡率明显增加,线粒体发生肿胀,外膜破裂,嵴断裂等病变,而 ASIV 80 mg/(kg·d) 可有效对抗这种改变。通过 Western blot 对心肌组织 PARP1 和心肌线粒体 Calpain 1、AIF 蛋白水平半定量的检测结果来看,ISO 组能够上调心肌线粒体 Calpain 1 的表达,下调线粒体 AIF 的表达,使 PARP1 的表达增加;而 ASIV 可以减弱心肌线粒体 Calpain 1 的激活,抑制 AIF 的转位和 PARP1 的活化,从而提示 ASIV 可能是通过抑制 Calpain 1 的激活,减少 AIF 从线粒体释放至胞浆并转位至胞核,并减少 PARP 的活化裂解,抑制心肌凋亡。

综上所述,ISO 可以诱导心肌凋亡、线粒体病变以及线粒体 Calpain 1 的激活,而 ASIV 可以减少 ISO 所致的凋亡,减轻线粒体损伤,其机制可能与降低心肌线粒体 Calpain 1 表达,继而减少线粒体 AIF 转位和 PARP1 过度活化有关,而具体作用机制可以采用 Calpain 基因敲除大鼠进一步探究。另外,本实验室前期研究显示,在离体心肌细胞水平上 ASIV 可以降低 ISO 引起的 Ca^{2+} 浓度增高,从而保护心肌细胞^[15]。而 Calpain 1 可被微摩尔级浓度的 Ca^{2+} 激活,ASIV 抑制 ISO 诱导的凋亡是否与其降低 Ca^{2+} 浓度进而减少 Calpain 1 激活有关,具体的作用机制还有待进一步的研究证实。

[参考文献]

[1] Shen M, Wu RX, Zhao L, et al. Resveratrol attenuates ischemia/

reperfusion injury in neonatal cardiomyocytes and its underlying mechanism[J]. PLoS One, 2012, 7 (12): e51223.

[2] Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, et al. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart-a critical review from definition and classification of cell death [J]. Int J Cardiol, 2013, 167 (6): 2373-2386.

[3] Maziere C, Gomila C, Maziere JC. Oxidized low-density lipoprotein increases osteopontin expression by generation of oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48 (10): 1382-387.

[4] Chen Q, Paillard M, Gomez L, et al. Activation of mitochondrial mu-calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia-reperfusion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 415 (4): 533-538.

[5] Chen M, He H, Zhan S, et al. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (33): 30724-728.

[6] Kar P, Chakraborti T, Samanta K, et al. mu-Calpain mediated cleavage of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger in isolated mitochondria under A23187 induced Ca^{2+} stimulation [J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 482 (1-2): 66-76.

[7] Ren S, Zhang H, Mu Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33 (3): 413-416.

[8] Li L, Tao HY, Chen JB. Anti-apoptosis effect of astragaloside on adriamycin induced rat's cardiotoxicity[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2006, 26 (11): 1011-014.

[9] Lu F, Xing J, Zhang X, et al. Exogenous hydrogen sulfide prevents cardiomyocyte apoptosis from cardiac hypertrophy induced by isoproterenol[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 381 (1-2): 41-50.

[10] Lu FH, Fu SB, Leng X, et al. Role of the calcium-sensing receptor in cardiomyocyte apoptosis via the sarcoplasmic reticulum and mitochondrial death pathway in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31 (4-5): 728-743.

[11] Norberg E, Gogvadze V, Ott M, et al. An increase in intracellular Ca^{2+} is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death [J]. Cell Death Differ, 2008, 15 (12): 1857-864.

[12] Xiao T, Zhang Y, Wang Y, et al. Activation of an apoptotic signal transduction pathway involved in the upregulation of calpain and apoptosis-inducing factor in aldosterone-induced primary cultured cardiomyocytes[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 53: 364-370.

[13] Jia Y, Zuo D, Li Z, et al. Astragaloside IV inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis mediated by mitochondrial apoptotic pathway via activating the PI3K/Akt pathway [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2014, 62 (1): 45-53.

[14] 胡鸣旭, 刘莉. 黄芪甲苷对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21 (1): 40-42.

[15] 王秋宁, 王洪新, 杨育红, 等. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的乳大鼠心肌细胞肥大的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25 (1): 29-33.

(此文编辑 文玉珊)