

丹参乙酸镁抗大鼠心肌缺血再灌注细胞程序性坏死的作用及机制

王玉霞¹, 余浪², 罗秀菊³, 彭军²

(1.常德职业技术学院,湖南省常德市 415000;2.中南大学药学院药理学系,湖南省长沙市 410078;

3.中南大学湘雅医学院检验系,湖南省长沙市 410013)

[关键词] 丹参乙酸镁; 缺血再灌注; 心肌; 程序性坏死; 受体相互作用蛋白激酶

[摘要] **目的** 探讨丹参乙酸镁 (MLB) 抗心肌缺血再灌注 (IR) 细胞程序性坏死的作用及机制。**方法** 采用大鼠左冠状动脉侧支阻断法建立心肌梗死模型。缺血 1 h 后再灌注 3 h, 建立心肌 IR 损伤模型。将大鼠随机分为 7 组: 正常对照组、假手术组、IR 组、MLB 低剂量 (10 mg/kg) + IR 组、MLB 高剂量 (30 mg/kg) + IR 组、Necrostatin-1 (Nec-1; 3 mg/kg) + IR 组、溶媒 (生理盐水) + IR 组 ($n=6\sim 8$)。氯化三苯四唑染色法检测心肌梗死面积, HE 染色观察心肌组织形态变化, 分光光度法检测血清肌酸激酶 (CK) 活性, Western blot 检测程序性坏死相关蛋白受体相互作用蛋白激酶 1 (RIPK1) 及 RIPK3 表达水平。**结果** 高剂量 MLB 可显著减轻 IR 大鼠心肌梗死面积、CK 释放和改善心肌组织结构, 伴随抑制 RIPK1 及 RIPK3 蛋白表达上调, 该作用优于阳性对照药 Nec-1。**结论** MLB 具有抗心肌细胞程序性坏死作用, 其机制与抑制 RIPK1 和 RIPK3 的蛋白表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The effect of salvia magnesium lithospermate B on myocardial ischemia-reperfusion-induced programmed necrosis in rat and its mechanisms

WANG Yu-Xia¹, SHE Lang², LUO Xiu-Ju³, PENG Jun²

(1. Changde Vocational Technical College, Changde, Hunan 415000, China; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

[KEY WORDS] Salvia magnesium lithospermate B; Ischemia-reperfusion; Myocardium; Programmed necrosis; Receptor interacting protein kinase

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of salvia magnesium lithospermate B (MLB) on myocardial ischemia-reperfusion (IR)-induced cells programmed necrosis and its mechanism. **Methods** Myocardial infarction model was established by occlusion of the left anterior descending coronary artery in rats. After ischemia 1 h and reperfusion for 3 h, myocardial IR injury model was established. Rats were randomly divided into 7 groups: normal control group, sham operation group, IR group, MLB low dose (10 mg/kg) + IR group, MLB high dose (30 mg/kg) + IR group, necrostatin-1 (Nec-1; 3 mg/kg) + IR group and solvent (normal saline) + IR group ($n=6\sim 8$). Myocardial infarct area was detected by triphenyltetrazolium chloride staining. HE staining was used to observe the morphological changes of myocardial tissue. Serum creatine kinase (CK) activity was measured by spectrophotometry. The expression levels of programmed necrosis associated protein receptor interacting protein kinase 1 (RIPK1) and RIPK3 were detected by Western blot. **Results** High dose of MLB could significantly reduce the myocardial infarct size and CK release, and improve the myocardial tissue structure of IR rats, with the inhibition of RIPK1 and RIPK3 protein expression, which were better than the positive control drug Nec-1. **Conclusion** MLB has the function of resisting myocardial cell programmed necrosis, and its mechanism

[收稿日期] 2016-08-31

[修回日期] 2016-12-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81373409、81573430); 湖南省教育厅科研基金项目 (17C0204)

[作者简介] 王玉霞, 硕士, 讲师, 研究方向为药理学及药学教育, E-mail 为 47379952@qq.com。通讯作者罗秀菊, 博士, 副教授, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 xjluo22@csu.edu.cn。通讯作者彭军, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 junpeng@csu.edu.cn。

is related to the inhibition of RIPK1 and RIPK3 protein expressions.

坏死和凋亡是细胞死亡的两种主要途径。传统观点认为,坏死是一种意外的、不受调控的被动死亡方式,而凋亡则是一种受到严密调控的主动死亡方式。最近的研究表明,坏死也受到信号通路严密调控,称为调节性坏死,包括程序性坏死(programmed necrosis)、铁坏死(ferroptosis)、pyronecrosis、parthanatos等,其中程序性坏死研究最为清楚^[1]。程序性坏死又称为坏死样凋亡(necroptosis),是受体相互作用蛋白激酶1(receptor interacting protein kinase 1, RIPK1)/RIPK3依赖的细胞死亡方式^[2]。研究表明,程序性坏死出现在多种损伤相关性疾病如心肌缺血、脑缺血等^[3-4]。RIPK1特异性抑制剂Necrostatin-1(Nec-1)能显著减轻大鼠心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤^[5],提示抑制程序性坏死是减轻心肌IR损伤的有效途径, RIPK1有望成为抗心肌缺血损伤的新靶点。

丹参乙酸镁(salvia magnesium lithospermate B, MLB)是已上市的抗心绞痛药丹参多酚酸盐的主要药理活性成分,可通过其抗氧化、抗血栓等作用对缺血心肌产生保护作用^[6]。已知心肌IR时程序性坏死显著增强, MLB抗心肌IR损伤作用是否涉及抑制程序性坏死尚不清楚。本研究将利用大鼠心肌IR损伤模型探讨MLB抗细胞程序性坏死的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 动物、细胞和试剂

SD雄性大鼠, 220~250 g, 购自中南大学实验动物部; H9C2心肌细胞株, 由中国科学院上海实验细胞中心提供, 来源于胚胎期BD1X大鼠心肌细胞。

氯化三苯四唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)染料及Nec-1购自Sigma公司, 高糖DMEM培养基购自Gibco公司, 胎牛血清购自BI公司, 肌酸激酶(creatine kinase, CK)试剂盒购自北京中生北控生物科技股份有限公司, 低分子量蛋白预染Marker、BCA蛋白定量检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究所, 兔抗RIPK1、兔抗RIPK3抗体购自Abcam公司, 小鼠抗GAPDH抗体购自Sigma公司, 山羊抗小鼠、山羊抗兔IgG购自碧云天公司, 聚偏二氟乙烯膜购自Milipore公司。

1.2 动物模型建立、实验分组与给药

将SD大鼠随机分为7组: 正常对照组、假手术

组、IR组、MLB低剂量(10 mg/kg)+IR组、MLB高剂量(30 mg/kg)+IR组、Nec-1(3 mg/kg)+IR组、溶媒(生理盐水)+IR组, 每组动物数为6~8只。造模时, 大鼠腹腔注射3%的戊巴比妥钠(30 mg/kg), 麻醉后行气管插管术, 连上呼吸机, 正压通气, 呼吸频率53次/分, 潮气量约15 mL/kg, 将大鼠四肢与心电图机相连以便观测心电变化。剪去胸毛, 于胸左侧第3、4肋间开胸, 撕开心包膜, 以左心耳及肺动脉圆锥间的左冠状静脉主干为标志, 用5号线结扎左冠状动脉前降支, 以心电图S-T段显著抬高、心尖变白等为标志, 表示造模成功, 缺血1 h后松开线结再灌注3 h。对MLB高剂量和低剂量组大鼠, 于心肌缺血30 min时尾静脉注射给药; 对Nec-1组和溶媒组大鼠, 于心肌缺血10 min时腹腔注射给药。

1.3 心肌梗死面积测定

取新鲜鼠心于-20℃冷冻30 min或-70℃冷冻10 min后, 以结扎部位为界, 从心尖处垂直心脏纵轴横切5~6片, 每片1 mm左右, 置于1% TTC染色液中37℃避光染色15 min, 3~5 min振摇1次, 使染色均匀, 再磷酸盐缓冲液洗涤后用4%多聚甲醛固定24 h左右拍照, Image J软件分别测定风险面积和梗死面积。梗死面积大小用二者比值表示。

1.4 肌酸激酶活性测定

再灌注结束后, 经左心室取血, 分离血浆, 按CK试剂盒说明书步骤操作, 反应结束后用全自动酶标仪于波长340 nm处测定吸光度(absorbance, A)值, 即 $A_{340\text{ nm}}$, 记录连续3 min的 $A_{340\text{ nm}}$ 变化率。按以下公式计算CK活性: $CK(U/I) = \Delta A / \text{消光系数} \times V_t / V_s \times 1000$ 。Vt: 反应总体积, 2.5 mL; Vs: 样品体积, 50 μL ; 消光系数: 6.3。

1.5 HE染色及心肌组织病变检测

各组处理结束后, 对鼠心用1%磷酸盐缓冲液和4%多聚甲醛进行在体灌流, 待心血充分洗净后, 将心用4%多聚甲醛4℃固定18~24 h, 再置于0.02% NaN_3 中4℃长期保存, 直至包埋, 制成厚约5 μm 的石蜡切片。进行HE染色后, 显微镜(Nikon Eclipse 80i, 日本)观察比较各组病变。

1.6 Western blot检测程序性坏死标志蛋白表达水平

RIPA液裂解组织获取总蛋白并定量, 取30~50 μg 蛋白上样, SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白后, 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上; 封闭后孵育一抗(RIPK1: 1: 200; RIP3: 1: 200; GAPDH: 1: 1000)

4℃ 过夜。缓冲液洗涤后加相应二抗(山羊抗兔 IgG:1:2000;羊抗小鼠 IgG:1:2000)室温 1 h,ECL 显影。Image J 软件对条带进行灰度分析,以对照组的蛋白条带与内参的比值作为 1,其他组再用该比值标化。

1.7 统计学方法

统计分析均采用 SPSS 11.0 软件,计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数比较采用 ANOVA 及 Bonferroni's 多重比较 *t* 检验分析。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参乙酸镁可减轻心肌缺血再灌注损伤

将心肌组织切片作 TTC 染色,未梗死区红染,梗死区呈白色,梗死区域与左冠状动脉前支供血区

域吻合,表明造模成功。IR 组心肌梗死面积为 $56.9\% \pm 3.7\%$,明显高于假手术组。低剂量 MLB (10 mg/kg) 干预后,有降低梗死面积的趋势 ($51.5\% \pm 3.9\%$ 比 $56.9\% \pm 3.7\%$, $P > 0.05$);高剂量 MLB (30 mg/kg) 则显著降低 IR 所致的梗死面积 ($25.1\% \pm 1.8\%$ 比 $56.9\% \pm 3.7\%$, $P < 0.01$)。程序性坏死阳性对照药 Nec-1 也能显著减少 IR 所致的梗死面积 ($36.9\% \pm 1.9\%$ 比 $56.9\% \pm 3.7\%$, $P < 0.05$),但强度不如高剂量 MLB。MLB 溶媒(生理盐水)对 IR 所致的梗死面积没有明显影响(图 1)。

CK 为反映心肌损伤的生化金指标。与心肌梗死面积吻合,IR 组血清 CK 活性明显升高,高剂量 MLB 和程序性坏死阳性药均能降低血清 CK 活性,但 MLB 效果更强,MLB 溶媒(生理盐水)对 IR 所致的 CK 释放没有明显影响(图 1)。

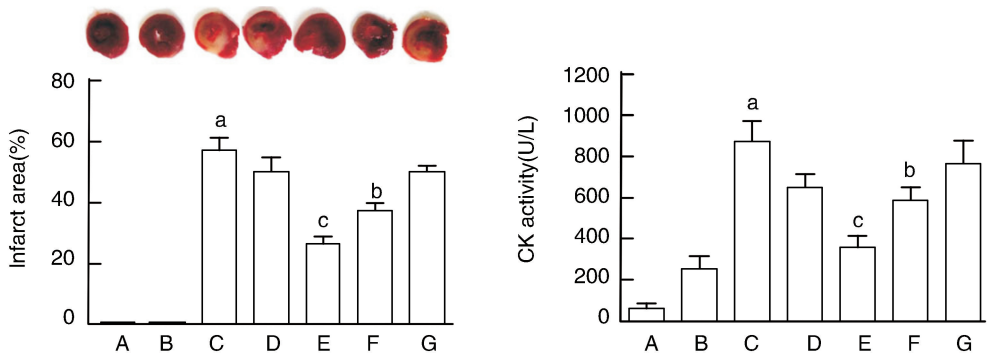


图 1. 丹参乙酸镁对心肌缺血再灌注损伤的影响 ($n = 6 \sim 8$) A 为正常对照组, B 为假手术组, C 为 IR 组, D 为 MLB 低剂量+IR 组, E 为 MLB 高剂量+IR 组, F 为 Nec-1+IR 组, G 为溶媒+IR 组。a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 IR 组比较。

Figure 1. Effect of MLB on myocardial ischemia-reperfusion injury ($n = 6 \sim 8$)

为了进一步观察心肌组织结构变化,我们对心肌组织进行了 HE 染色,发现 IR 组心肌纤维纹理紊乱、皱缩和溶解,细胞间隙中大量炎性细胞浸润、水肿,低剂量 MLB 干预后,有改善病变的趋势,高剂量 MLB 和程序性坏死阳性药 Nec-1 则能明显抑制该现象,但 MLB 效果更强,MLB 溶媒(生理盐水)对 IR 所致的心肌组织改变没有明显影响(图 2)。

2.2 丹参乙酸镁对程序性坏死标志蛋白表达的影响

与假手术组相比,IR 组的 RIPK1 和 RIPK3 均明显上调 ($P < 0.01$);低剂量 MLB (10 mg/kg) 干预后,有抑制 RIPK1 和 RIPK3 表达上调趋势,高剂量 MLB (30 mg/kg) 则显著抑制 RIPK1 和 RIPK3 表达上调 ($P < 0.01$);RIPK1 的抑制剂 Nec-1 能阻止

RIPK1 表达上调 ($P < 0.01$),但对 RIPK3 表达变化无影响;MLB 溶媒对 RIPK1 和 RIPK3 表达变化无明显影响(图 3)。

3 讨论

心肌缺血的直接后果是导致心肌细胞死亡。降低心肌耗氧,恢复心肌供血是目前治疗心肌缺血的基本原则,但血液再灌注后会出现心肌缺血损伤进一步加重现象,即 IR 损伤^[7]。坏死和凋亡是 IR 后心肌细胞死亡的两种主要方式,其中坏死占主导地位。传统观点认为,坏死是一种被动死亡方式,不受调控;而凋亡则是一种主动死亡方式,受到严密调控。基于这一观点,目前抗心肌细胞坏死的药

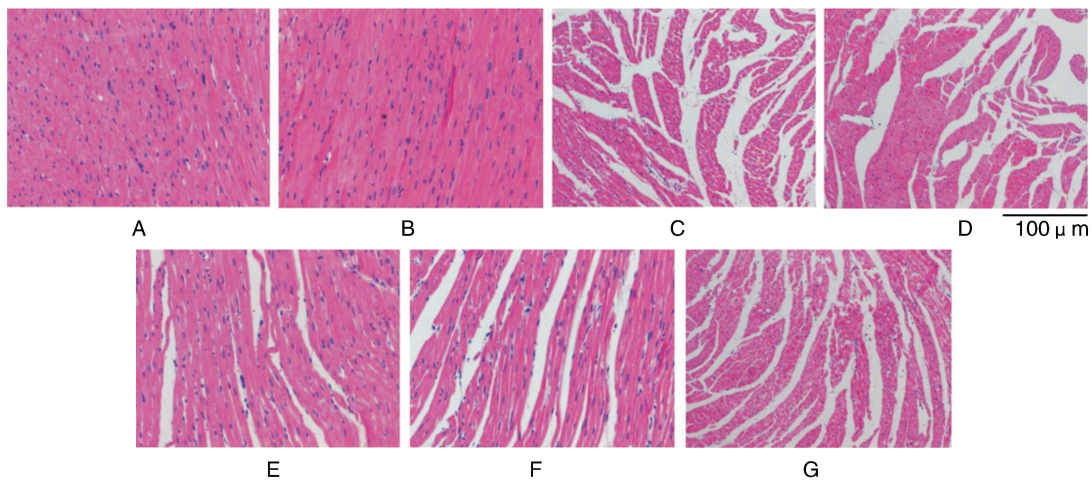


图 2. 丹参乙酸镁对心肌缺血再灌注所致心肌组织结构变化的影响 A 为正常对照组, B 为假手术组, C 为 IR 组, D 为 MLB 低剂量+IR 组, E 为 MLB 高剂量+IR 组, F 为 Nec-1+IR 组, G 为溶媒+IR 组。

Figure 2. Effect of MLB on morphological changes in heart tissue induced by myocardial ischemia-reperfusion

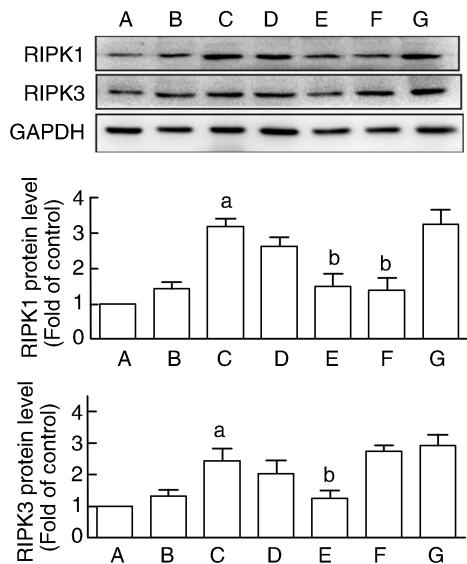


图 3. 丹参乙酸镁对程序性坏死标志蛋白表达的影响($n=6\sim 8$) A 为正常对照组, B 为假手术组, C 为 IR 组, D 为 MLB 低剂量+IR 组, E 为 MLB 高剂量+IR 组, F 为 Nec-1+IR 组, G 为溶媒+IR 组。a 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与 IR 组比较。

Figure 3. Effect of MLB on the relevant protein expression in programmed necrosis($n=6\sim 8$)

物均为广谱的抗氧化、抗炎症等药物,尚缺少抗心肌细胞坏死的特异性药物。新近的研究表明,细胞坏死也可受信号通路严密调控,称为调节性坏死^[8-9],其中以程序性坏死的信号通路研究最为透彻。

程序性坏死可由多种因子诱导发生,其中 RIPK1 和 RIPK3 是其中的关键激酶, RIPK1 的激酶活性可影响程序性坏死的启动。当 RIPK1 的 Ser89 位发生磷酸化或者当 RIPK1 的 138 位天冬氨酸发

生突变,破坏 RIPK1 的激酶活性,可中断 RIPK1 依赖的程序性坏死。RIPK1 抑制剂(Nec-1)也可阻断肿瘤坏死因子 α 诱导的程序性坏死^[10]。RIPK1 和 RIPK3 结合形成坏死复合物是介导程序性坏死发生的重要机制。研究报道,IR 时 RIPK1 和 RIPK3 的蛋白表达水平均显著上升^[11],提示程序性坏死通路被激活;Nec-1 能显著减轻心肌 IR 损伤^[12],提示程序性坏死通路被抑制。本实验发现,大鼠心肌 IR 后,心肌组织 RIPK1 和 RIPK3 的蛋白表达上调,给予 Nec-1 处理后能显著降低心肌梗死面积,减少 CK 释放和改善心肌组织结构。这些结果表明,抑制心肌细胞程序性坏死是减轻 IR 损伤的有效手段,但目前除了少数工具药物外,有关具有抗心肌程序性坏死药物的报道非常有限。

MLB 是已用于临床的抗心绞痛药丹参多酚酸盐的主要药理活性成分,具有抗氧化、抗血栓等作用,可明显改善心肌缺血症状。本实验结果显示,MLB 可显著降低心肌梗死面积,减少 CK 释放和改善心肌组织结构,伴随抑制心肌组织 RIPK1 和 RIPK3 的蛋白表达上调,表明 MLB 具有抗 IR 诱导的心肌细胞程序性坏死的作用。如前所述, Nec-1 抗程序性坏死作用主要通过抑制 RIPK1 而实现,对 RIPK3 无明显影响;而 MLB 不仅可以抑制 RIPK1,也可抑制 RIPK3。虽然 MLB 和 Nec-1 均可显著减轻心肌 IR 损伤,但 MLB 效果更明显,这可能与 MLB 抗程序性坏死以外的作用有关,如 MLB 的抗凋亡、抗氧化损伤等作用。

总之,本研究首次证明了 MLB 具有抗心肌细胞程序性坏死作用,其机制与抑制 RIPK1 和 RIPK3 的

蛋白表达有关,这为 MLB 抗心肌 IR 损伤机制提供了新的解释,也为寻找抗 IR 损伤新药提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Vanden BT, Linkermann A, Jouan LS, et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2): 135-147.
- [2] 于辛,陈丽香,周晓辉. 程序性细胞坏死及其信号通路[J]. *微生物与感染*, 2015, 10(1): 61-66.
- [3] Jouan LS, Riquet F, Duprez L, et al. Necroptosis, in vivo detection in experimental diseases models[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 35(2): 2-13.
- [4] 刘丽凤,王禹. 细胞程序性死亡与心肌再灌注损伤的研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015, 17(5): 549-550.
- [5] 陆立慧,赵明月,吴思媛,等. 抑制程序性坏死对缺氧/复氧 H9c2 心肌细胞损伤的影响[J]. *生物医学工程学杂志*, 2015, 32(2): 393-399.
- [6] 娄峥,彭军. 丹参乙酸镁的心脑血管保护作用及机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(9): 855-858.
- [7] 叶周恒,刘文武,孙学军. 程序性坏死机制与缺血再灌注损伤[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(3): 414-417.
- [8] Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms[J]. *Cell Dev Biol*, 2014, 30(30): 337-356.
- [9] Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 348-366.
- [10] Shi H, Jennifer AF. Exposure to the complement C5b-9 complex sensitizes 661W photoreceptor cells to both apoptosis and necroptosis[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(4): 433-435.
- [11] Ying Y, Padanilam BJ. Regulated of necrotic cell death: P53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(11): 2309-324.
- [12] Feoktistova M, Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling[J]. *FEBS J*, 2015, 282(1): 19-31.

(此文编辑 曾学清)