

温阳通脉方通过 JAK2/STAT3 信号通路保护大鼠心肌缺血再灌注损伤

李媛媛, 张恒, 王笑, 石月萍

(锦州医科大学附属第一医院中医科, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 温阳通脉方; 心肌缺血再灌注损伤; JAK2/STAT3 信号通路; 水通道蛋白 1; 水通道蛋白 4

[摘要] **目的** 探讨温阳通脉方是否通过 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 (JAK2)/信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 信号转导通路, 调节水通道蛋白 (AQP) 的表达, 发挥对缺血再灌注心肌组织的保护作用。**方法** 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组, 每组 6 只: 假手术组、模型组及温阳通脉方低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组。将大鼠灌胃给药 14 天后, 结扎心脏左冠状动脉前降支, 按缺血 30 min 再灌注 120 min 的方法建立心肌缺血再灌注损伤模型。全自动生化分析仪检测各组大鼠的血清肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH); 心电图检测大鼠 ST 段抬高情况; HE 染色观察心脏组织病理形态学变化; 免疫组织化学染色检测心肌组织中 AQP1、AQP4 蛋白的表达; Western blot 检测 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、AQP1、AQP4 的蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中的 CK-MB、LDH 含量显著上升 ($P < 0.01$), 缺血 30 min 与再灌注 120 min 后心电图的 ST 段显著抬高 ($P < 0.01$), HE 染色显示模型组的心肌细胞损伤严重, AQP1、AQP4 免疫组织化学表达明显增多 ($P < 0.01$), JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、AQP1、AQP4 的蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 给药大鼠 CK-MB、LDH 水平明显降低 ($P < 0.01$), 缺血 30 min 与再灌注 120 min 后的 ST 段均降低 ($P < 0.01$), 心肌细胞损伤均可见不同程度减轻, AQP1、AQP4 免疫组织化学表达明显减少, JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 整体的表达呈升高趋势, 尤其是 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达 ($P < 0.01$), AQP1、AQP4 的水平均有不同程度降低 ($P < 0.01$)。**结论** 温阳通脉方的心肌保护作用可能与激活 JAK2/STAT3 信号通路, 下调 AQP1 和 AQP4 的表达有关。

[中图分类号] R256.22; R5

[文献标识码] A

Wenyang Tongmai decoction protects myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via JAK2/STAT3 pathway

LI Yuanyuan, ZHANG Heng, WANG Xiao, SHI Yueping

(Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] Wenyang Tongmai decoction; myocardial ischemia-reperfusion injury; JAK2/STAT3 pathway; aquaporin 1; aquaporin 4

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether Wenyang Tongmai decoction can regulate JAK2/STAT3 signal transduction pathway and the expression of aquaporins (AQP) to protect myocardial ischemia-reperfusion tissue. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into 5 groups, 6 in each group: sham operation group, ischemia-reperfusion group, low-dose treatment group, middle-dose treatment group, high-dose treatment group. After 14 days of intragastric administration, the model of myocardial ischemia-reperfusion injury was established by ligation of the left anterior descending coronary artery for 30 minutes and then releasing the ligated artery for 120 minutes. The serum levels of creatine kinase isoenzymes (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by automatic biochemical analyzer. The ST-segment elevation of the rats was counted in the electrocardiogram. Pathological changes in cardiac tissue were observed by

[收稿日期] 2019-01-13

[修回日期] 2019-04-02

[基金项目] 辽宁省科学技术基金资助项目(201602307)

[作者简介] 李媛媛, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合临床防治心血管疾病, E-mail 为 liyuanyuan0210@sina.com。通信作者石月萍, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合临床防治心血管疾病, E-mail 为 lnjzsy@163.com。

HE staining. The expressions of AQP1 and AQP4 in myocardial tissue were detected by immunohistochemical staining. The protein expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, AQP1 and AQP4 were detected by Western blot method.

Results Compared with the sham group, the levels of CK-MB and LDH in the serum of the ischemia-reperfusion group were significantly increased ($P < 0.01$), and the ST-segments of the electrocardiogram were significantly elevated after ischemia for 30 minutes and reperfusion for 120 minutes ($P < 0.01$). HE staining showed that the myocardial cells in the ischemia-reperfusion group were severely damaged. The expressions of AQP1 and AQP4 in immunohistochemistry was significantly increased ($P < 0.01$). The results of Western blot showed that the expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, AQP1 and AQP4 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the ischemia-reperfusion group, the serum levels of CK-MB and LDH were significantly decreased in the treated rats ($P < 0.01$), and the ST-segments were decreased after 30 minutes ischemia and 120 minutes reperfusion ($P < 0.01$), myocardial cells' damage was alleviated to varying degrees in HE staining, the protein expressions of AQP1 and AQP4 in immunohistochemistry were significantly reduced, the expressions of JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3 were generally increased, especially the expressions of p-JAK2 and p-STAT3 ($P < 0.01$), AQP1 and AQP4 expression levels were reduced to varying degrees ($P < 0.01$). **Conclusion** The cardioprotective effect of Wenyang Tongmai decoction may be related to activation of JAK2/STAT3 signaling pathway and down-regulation of AQP1 and AQP4 expression.

冠心病是人类最常见的死因之一^[1]。临床常用血管再通等治疗手段缓解心肌缺血的状态,但有时也会造成心肌细胞不可逆性死亡,该病理过程即为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)^[2]。有效防治 MIRI 能够增强缺血性疾病的治疗效果。中医角度分析 MIRI 应属于“胸痹”、“真心痛”。枳实薤白桂枝汤为中医治疗胸痹的经典复方,临床效果明显,并能通过多种机制发挥作用^[3-8]。温阳通脉方是通过对临床经验和中医经典的研究总结,在其基础上增加人参和三七两味中药组成,方中瓜蒌涤痰散结;桂枝通阳散寒;厚朴燥湿化痰;薤白通阳散结,化痰散寒;枳实下气破结,消痞除满;再加上人参补益元气、三七活血止痛,在温振胸阳、开阻化痰的同时升阳益气、活血通脉,故命名为温阳通脉方^[9]。本实验旨在研究温阳通脉方能否通过调节 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2/信号转导和转录激活因子 3 (Janus protein tyrosine kinase 2/signal transduction and transcription activator 3, JAK2/STAT3) 信号通路保护 MIRI。

1 材料和方法

1.1 实验药品与试剂

温阳通脉方由七味中药颗粒剂混合溶解而成,具体组成为:枳实 12 g,薤白 12 g,厚朴 12 g,桂枝 6 g,瓜蒌 12 g,人参 12 g,三七 9 g。中药颗粒剂均购自北京康仁堂药业有限公司,药物批号:枳实 K14817027432000005002415、薤白 K4651701810300010001207、瓜蒌 K16617019472000020005161、厚朴 K21917027932000005013636、桂枝 K1741800115

3000005001247、三七 K3581702166220000200005733、人参 K35418001051000010004130。BCA 蛋白定量试剂盒 (wla004a)、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (wla013a)、Anti-JAK2 (WL02188)、Anti-p-JAK2 (WL02997)、Anti-STAT3 (WL01836)、Anti-p-STAT3 (WL1731) 和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (WLA023a) 均购自沈阳万类,高敏 ECL 化学发光试剂盒 (P0018S) 购自上海碧云天。

1.2 实验仪器

DH-150 型动物机械呼吸机(浙江医科大学仪器实验厂),动物心电图机(上海精密科学仪器有限公司),动物心电图监护仪(深圳辽瑞生物医疗电子股份有限公司),低温高速离心机(科大创新股份有限公司),荧光酶标分析仪(瑞士 TECAN 公司),BIO-RAD 电泳槽、转膜仪(美国伯乐公司),i2000SR 全自动化学发光仪(美国雅培公司),DP73 显微镜(日本 OLUMPUS 公司),Bio-Rad 化学发光成像仪(美国伯乐公司),石蜡切片机(德国 Leica 公司),电热恒温培养箱(天津泰斯特公司)。

1.3 动物分组与处理

健康雄性 SD 大鼠 30 只,SPF 级,6 周龄,体质量在 180 ~ 220 g 之间,由锦州医科大学实验动物中心提供,所有动物实验均得到锦州医科大学实验动物伦理委员会批准。

将 30 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 6 只:假手术组、模型组、低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组。适应性饲养 1 周后,按照计算出的低、中、高给药剂量分别给予对应组的大鼠,连续灌胃给药 14 天后给药结束。根据等效剂量系数折算法计算大鼠的给药剂量,即人与大鼠间接体表

面积折算的等效剂量比值 0.018, 计算出临床温阳通脉方颗粒剂大鼠相应的给药剂量正常应为 6.48 g/(kg·d), 故各组大鼠给药剂量如下: 给予假手术组和模型组蒸馏水, 低剂量治疗组为 3.24 g/(kg·d), 中剂量治疗组为 6.48 g/(kg·d), 高剂量治疗组为 12.96 g/(kg·d), 每只大鼠给药均为一天一次, 每次 2 mL。

1.4 动物模型复制

腹腔注射 10% 乌拉坦 5 mL/kg, 待大鼠麻醉完全后固定于操作台, 备皮消毒, 连接心电监护仪, 待大鼠心电活动稳定后记录心电图。颈部正中做 2 cm 纵向切口, 充分暴露气管, 于气管软骨环间剪一小口插入气管导管, 连接呼吸机, 以 60 次/分给予机械通气。暴露心脏, 结扎左冠状动脉前降支, 心电图 S-T 段明显抬高, 心肌颜色明显变暗, 表示心肌缺血成功, 记录心电图。30 min 后剪开结扎线, 血流恢复灌注, 心电图 S-T 段显示逐渐下降, 即为再灌注成功。120 min 后记录心电图, 再灌注结束。假手术组大鼠同样给予机械通气, 但只开胸不结扎。造模结束后分离颈动脉取血, 留存血清待用; 摘取心脏, 心尖部置于 10% 福尔马林固定, 用于 HE 和免疫组织化学检测; 留存其余左心室部分 -80 °C 冻存待测。

1.5 心肌酶血清肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶含量的检测

各组大鼠的血液经离心机 3 000 r/min 离心 10 min 处理分离血清, 分装至 1 mL EP 管中于 -20 °C 冰箱冻存。待检测血清使用优利特半自动生化仪 (URIT-810) 检测其中血清肌酸激酶同工酶 (creatin kinase isoenzymes, CK-MB) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的含量。

1.6 心电图检测

造模时, 每只实验大鼠在其缺血 30 min 后及再灌注 120 min 后记录心电图, 并分别计数两个时刻心电图 S-T 段的抬高情况。

1.7 心肌组织病理形态学观察

将固定于 10% 福尔马林固定液中的心肌组织取出, 经洗涤后行常规处理脱水透明、石蜡包埋。然后将蜡块放入切片机中按照 4 μm 的规格进行切片, 将切片依次置入二甲苯 I、二甲苯 II、乙醇阶梯性脱水。苏木精、伊红水溶液中染色后梯度脱水, 树脂封片, 通风晾干。

1.8 免疫组织化学法检测心肌组织水通道蛋白 1 和水通道蛋白 4 表达

将石蜡切片置于 67 °C 烘箱中烘片 2 h, 然后脱蜡。将切片放在切片架上放入抗原修复缓冲液中

煮沸 10 min, 然后灭活内源性过氧化物酶。10% 山羊血清封闭, 37 °C、30 min。一抗孵育 [水通道蛋白 1 (aquaporin, AQP1) 1 : 800, 水通道蛋白 4 (aquaporin, AQP4) 1 : 1300], 4 °C 冰箱过夜。次日取出二抗孵育 30 min (1 : 2000)。然后进行 DAB 染色, 再将组织浸于苏木精染色液 4 min, 然后依次用自来水冲洗、盐酸乙醇分化、流水冲洗至返蓝, 显微镜下观察细胞核染色情况。然后再脱水透明和封片。

1.9 Western blot 法检测心肌组织中 JAK2/STAT3 信号通路蛋白及水通道蛋白的表达

将组织从 -80 °C 冰箱中取出, 称取 100 mg 组织分装加入 RIPA buffer 500 μL 并剪碎研磨, 冰上静置 30 min 使其充分裂解。然后 4 °C 低温离心 (12 000 r/min 离心 30 min), 取上清液。使用 BCA 法测定蛋白含量, 绘制标准品浓度-吸光度值标准曲线方程式, 设所需蛋白浓度为 4 g/L, 配制出蛋白浓度相等的样品, 95 °C 煮沸 10 min, 于 -20 °C 冰箱保存。按照 SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒的说明书配制所需要浓度的分离胶和浓缩胶, 凝固后加入蛋白样品, 以 90 V 电压电泳样品至分离胶, 再以 110 V 电泳 90 min。然后以恒流 300 A, 90 min 将蛋白转至 PVDF 膜。用 5% BSA 封闭 120 min。TBST 清洗 PVDF 膜后浸泡在相应的一抗液体中, 4 °C 摇床过夜。次日取出 PVDF 膜二抗孵育, 室温摇床 120 min。最后 ECL 显影, 化学发光成像系统曝光成像。成像结果用 Image J 分析。

1.10 统计学分析方法

应用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计分析。结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 One-Way ANOVA 为统计方法进行组间比较, 检验数据的正态性与方差齐性, 若方差齐则用 LSD 法比较, 若方差不齐则用 Dunnett's T3 法比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清肌酸激酶同工酶和乳酸脱氢酶的含量

与假手术组相比, 模型组大鼠血清中 CK-MB 和 LDH 的含量显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 给药大鼠低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组血清中 CK-MB 和 LDH 的含量显著降低 ($P < 0.01$); 与低剂量治疗组相比, 中剂量治疗组和高剂量治疗组大鼠的 CK-MB 和 LDH 含量均显著降低 ($P < 0.05$); 与中剂量治疗组相比, 高剂量治疗组的 CK-MB 含量虽然有所降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 LDH 含量也显著降低 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1. 血清中 CK-MB 和 LDH 含量($n=6$)Table 1. Serum CK-MB and LDH levels($n=6$)

分 组	CK-MB(U/L)	LDH(U/L)
假手术组	584.0±67.6	246.3±37.2
模型组	1881.3±82.9 ^a	818.2±33.7 ^a
低剂量治疗组	1218.4±76.0 ^{ab}	470.2±32.7 ^{ab}
中剂量治疗组	1031.7±118.2 ^{abd}	415.3±35.4 ^{abc}
高剂量治疗组	1016.8±65.9 ^{abd}	358.4±47.5 ^{abcde}

a 为 $P<0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P<0.01$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与低剂量治疗组比较; e 为 $P<0.05$, 与中剂量治疗组比较。

2.2 大鼠心电图 ST 段的改变

与假手术组相比, 缺血 30 min 与再灌注 120 min 后模型组大鼠心电图 ST 段均显著抬高($P<0.01$); 与模型组相比, 缺血 30 min 与再灌注 120 min 后给药大鼠低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组大鼠心电图 ST 段均显著降低($P<0.01$)。缺血 30 min 后, 与低剂量治疗组相比, 中剂量治疗组和高剂量治疗组大鼠的 ST 段均显著降低($P<0.01$); 与中剂量治疗组相比, 高剂量治疗组的 ST 段虽然有所降低, 但差异无统计学意义($P>0.05$)。再灌注 120 min 后, 与低剂量治疗组相比, 中剂量治疗组和高剂量治疗组大鼠的 ST 段均显著降低($P<0.05$); 与中剂量治疗组相比, 高剂量治疗组的 ST 段也显著降低($P<0.05$) (表 2 和图 1)。

2.3 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

HE 染色可见, 假手术组大鼠的心肌细胞排列整齐, 紧密有序, 且细胞核居中, 无破坏溶解, 排列整齐, 心肌细胞及细胞核均正常大小, 未见肿胀, 未见炎细胞浸润。模型组心肌细胞发生明显肿胀, 细胞胞质染色不均匀, 细胞大小不一, 排列紊乱, 可见坏死的心肌细胞及破裂溶解的细胞核, 细胞间的间

隙增大, 导致肌纤维排列紊乱、间隙增大, 严重者甚至断裂, 组织间可见大量中性粒细胞浸润。与模型组相比, 给药大鼠低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组均有不同程度的改善, 心肌细胞肿胀减轻, 细胞排列较为整齐, 中性粒细胞浸润减少等。给药组组间比较显示, 与低剂量治疗组相比, 中剂量治疗组和高剂量治疗组的改善程度更佳 (图 2)。

表 2. 各组大鼠缺血 30 min 与再灌注 120 min 心电图 ST 段改变($n=6$)Table 2. ECG ST segment changes in 30 minutes of ischemia and 120 minutes of reperfusion in each group($n=6$)

分 组	缺血 30 min(mV)	再灌注 120 min(mV)
假手术组	0±0	0±0
模型组	0.75±0.05 ^a	0.49±0.05 ^a
低剂量治疗组	0.58±0.04 ^{ab}	0.37±0.08 ^{ab}
中剂量治疗组	0.48±0.03 ^{abd}	0.30±0.05 ^{abc}
高剂量治疗组	0.45±0.05 ^{abd}	0.22±0.04 ^{abcde}

a 为 $P<0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P<0.01$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与低剂量治疗组比较; e 为 $P<0.05$, 与中剂量治疗组比较。

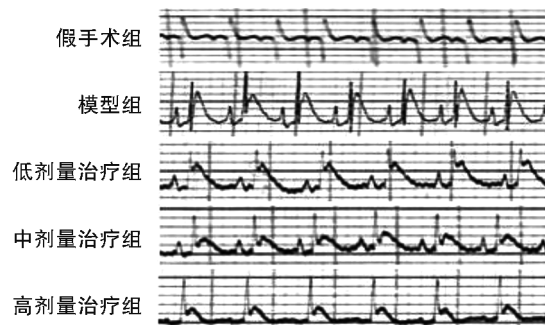
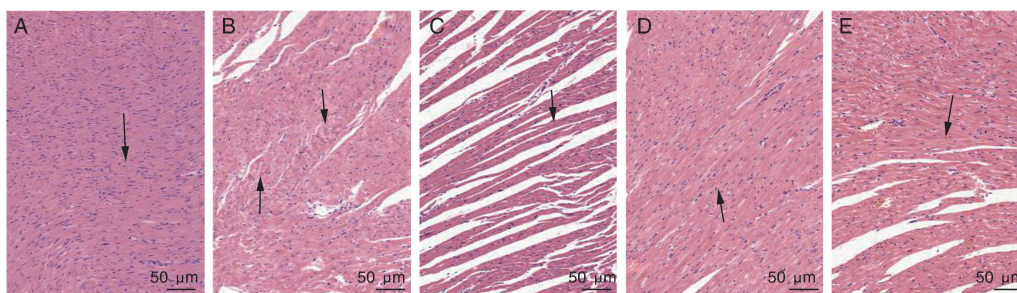
图 1. 各组大鼠再灌注 120 min 后心电图 ST 段改变($n=6$)Figure 1. ST segment changes in electrocardiogram after 120 minutes of reperfusion in each group of rats($n=6$)

图 2. 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果 A 为假手术组, B 为模型组, C 为低剂量治疗组, D 为中剂量治疗组, E 为高剂量治疗组。

Figure 2. HE staining results of myocardial tissue in each group

2.4 各组大鼠心肌组织中水通道蛋白1、水通道蛋白4免疫组织化学染色结果

大鼠心肌组织中 AQP1 和 AQP4 的阳性表达在图中显示为棕黄色颗粒。与假手术组相比,模型组大鼠的 AQP1 和 AQP4 表达量明显增多,差异有显著性($P<0.01$);与模型组相比,低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组大鼠心肌的 AQP1 和

AQP4 表达均显著降低($P<0.05$);给药组组间比较显示,与低剂量治疗组相比,中剂量治疗组和高剂量治疗组大鼠的 AQP1 和 AQP4 蛋白表达明显降低($P<0.05$);与中剂量治疗组相比,高剂量治疗组大鼠心肌的 AQP1 和 AQP4 表达虽然有所降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)(图3和表3)。

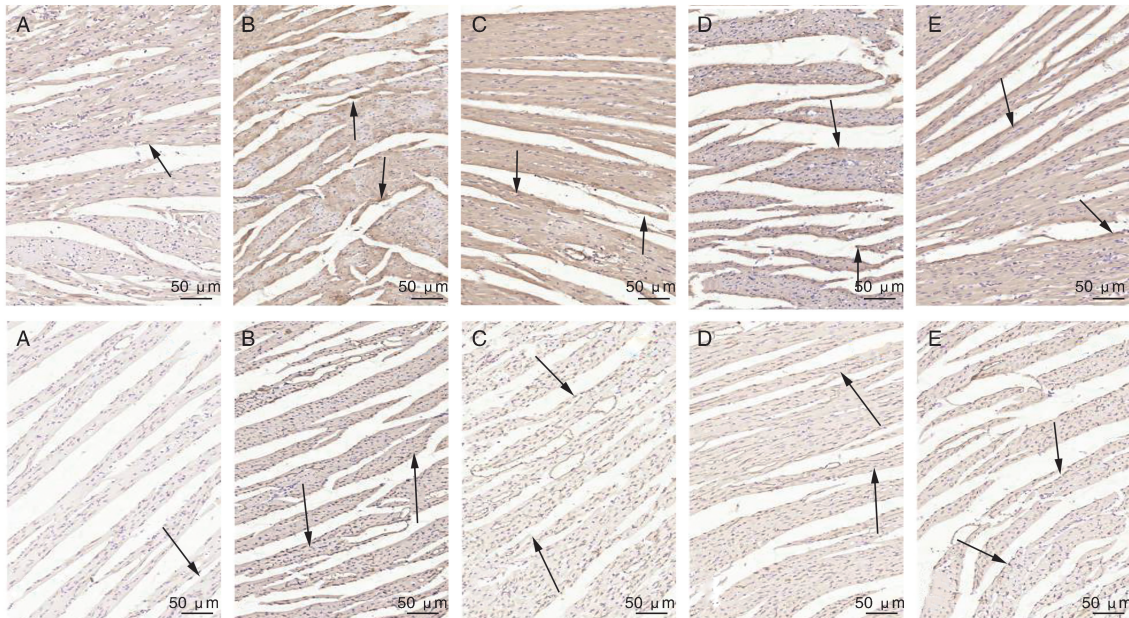


图3. 各组大鼠 AQP1(上图)和 AQP4(下图)免疫组织化学染色结果 A 为假手术组,B 为模型组,C 为低剂量治疗组,D 为中剂量治疗组,E 为高剂量治疗组。

Figure 3. Immunohistochemical staining results of AQP1(upper) and AQP4 (below) in each group

表3. 各组大鼠 AQP1 和 AQP4 免疫组织化学 IOD 值

Table 3. Results of immunohistochemical IOD values of AQP1 and AQP4 in rats in each group

分组	n	AQP1	AQP4
假手术组	6	0.027±0.001	0.036±0.002
模型组	6	0.095±0.002 ^b	0.073±0.006 ^b
低剂量治疗组	6	0.036±0.005 ^{bd}	0.056±0.009 ^{bc}
中剂量治疗组	6	0.032±0.001 ^{ade}	0.042±0.003 ^{bde}
高剂量治疗组	6	0.029±0.004 ^{df}	0.041±0.004 ^{de}

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与假手术组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与模型组比较; e 为 $P<0.05$, f 为 $P<0.01$, 与低剂量治疗组比较。

2.5 Western blot 法测定大鼠心肌组织中 JAK2/STAT3 信号通路蛋白及水通道蛋白的表达结果

与假手术组相比,模型组大鼠的 JAK2 和 p-JAK2 表达均明显增多($P<0.01$);与模型组相比,低剂量治疗组和中剂量治疗组的 JAK2 表达量也显著升高($P<0.01$),高剂量治疗组的 JAK2 表达有所下

降($P<0.05$);与模型组相比,低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组大鼠心肌的 p-JAK2 表达显著增加($P<0.01$)(图4和表4)。

与假手术组相比,模型组大鼠的 STAT3 和 p-STAT3 表达均明显增多($P<0.01$);与模型组相比,低剂量治疗组的 STAT3 表达量有所下降,高剂量治疗组 STAT3 表达显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$),而中剂量治疗组的 STAT3 表达变化无统计学意义($P>0.05$);p-STAT3 结果显示,与模型组相比,低剂量治疗组、中剂量治疗组大鼠心肌的 p-STAT3 表达均显著增加,高剂量治疗组有所降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)(图4和表4)。

与假手术组相比,模型组大鼠的 AQP1 和 AQP4 表达均明显增加($P<0.01$);与模型组相比,低剂量治疗组、中剂量治疗组和高剂量治疗组的 AQP1 和 AQP4 蛋白表达均显著降低($P<0.01$);与低剂量治疗组相比,中剂量治疗组大鼠的 AQP1 表达显著降低($P<0.01$),高剂量治疗组差异无显著性($P>$

0.05);与中剂量治疗组相比,高剂量治疗组大鼠心脏的 AQP1 表达有所增加,差异有显著性($P < 0.01$)。与低剂量治疗组相比,中剂量治疗组和高

剂量治疗组大鼠的 AQP4 表达明显降低($P < 0.01$);与中剂量治疗组相比,高剂量治疗组大鼠的 AQP4 表达也明显降低($P < 0.01$)(图 4 和表 4)。

表 4. 各组大鼠 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、AQP1 和 AQP4 蛋白表达结果

Table 4. Expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, AQP1 and AQP4 proteins in each group

分 组	n	JAK2	p-JAK2	STAT3	p-STAT3	AQP1	AQP4
假手术组	6	0.70±0.03	0.61±0.02	0.55±0.02	0.71±0.01	0.47±0.01	0.86±0.02
模型组	6	0.83±0.03 ^a	0.69±0.02 ^a	0.80±0.03 ^a	0.86±0.02 ^a	0.95±0.02 ^a	1.18±0.02 ^a
低剂量治疗组	6	0.96±0.04 ^{ac}	1.06±0.03 ^{ac}	0.65±0.02 ^{ac}	0.94±0.02 ^{ac}	0.59±0.01 ^{ac}	1.12±0.01 ^{ac}
中剂量治疗组	6	1.01±0.04 ^{ac}	0.95±0.01 ^{acd}	0.79±0.03 ^{ad}	1.06±0.02 ^{acd}	0.48±0.01 ^{cd}	1.06±0.01 ^{acd}
高剂量治疗组	6	0.75±0.04 ^{bde}	0.96±0.01 ^{acd}	1.00±0.03 ^{acde}	0.81±0.01 ^{acde}	0.59±0.02 ^{ace}	0.84±0.00 ^{cde}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; d 为 $P < 0.01$, 与低剂量治疗组比较; e 为 $P < 0.01$, 与中剂量治疗组比较。

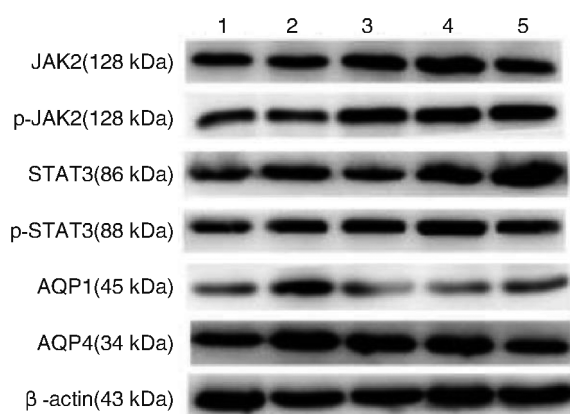


图 4. 各组大鼠 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、AQP1 和 AQP4 蛋白表达结果($n=6$) 1 为假手术组, 2 为模型组, 3 为低剂量治疗组, 4 为中剂量治疗组, 5 为高剂量治疗组。

Figure 4. Expression of JAK2, p-JAK2, STAT3, p-STAT3, AQP1 and AQP4 proteins in each group($n=6$)

3 讨 论

MIRI 的发生机制十分复杂,包括氧化应激、能量代谢、炎症反应、细胞凋亡、自噬、钙超载等,现代医学研究发现可以通过其机制中的众多靶点防治 MIRI。中医认为 MIRI 属于“胸痹”、“真心痛”,由于正气亏虚,饮食、情志、寒邪等因素引起痰浊、瘀血、气滞、寒凝等病理产物痹阻心脉而发作。张仲景在《金匮要略》中提出“夫脉当取太过不及,阳微阴弦,即胸痹而痛,所以然者,责其极虚也。今阳虚知在上焦,所以胸痹、心痛者,以其阴弦故也。平人无寒热,短气不足以息者,实也”,“胸痹心中痞,留气结在胸,胸满,胁下逆抢心,枳实薤白桂枝汤主之”^[3]。大量研究发现枳实薤白桂枝汤能够通过多机制多

途径发挥作用^[10]。前期研究表明温阳通脉方能够通过腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)/环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路调节水通道蛋白的表达发挥保护缺血再灌注心脏的作用^[6]。通过磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)信号通路抑制氧化应激,进而保护心脏功能^[11]。还能够减少线粒体细胞色素 C 的释放,降低含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, caspase)3 和 9 的活化表达,减少心肌细胞凋亡^[7]。

本实验研究发现,温阳通脉方能够显著降低给药大鼠血清中 CK-MB 和 LDH 水平,降低其心电图缺血 30 min 与再灌注 120 min 后的 ST 段抬高情况,并且 HE 染色可见给药大鼠的心肌细胞损伤较模型组不同程度减轻,说明温阳通脉方能够发挥保护心肌组织的作用,降低缺血再灌注对心肌造成的损伤。大量研究发现, JAK/STAT 信号通路在人体内参与多种生理、病理调节机制^[12-14]。其中 JAK2/STAT3 信号通路主要在心脏发挥作用^[15]。本实验中 JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 通路蛋白整体表达呈升高趋势,尤其是蛋白的磷酸化水平增加,提示温阳通脉方能够激活 JAK2/STAT3 信号转导通路。AQP1、AQP4 的免疫组织化学和 Western blot 结果显示,给药组大鼠的 AQP1、AQP4 水平均不同程度低于模型组,且差异具有显著性,表明温阳通脉方能够通过调节某些蛋白下调 AQP1 及 AQP4 的表达。

大量文献表明, JAK2/STAT3 信号通路是炎症

反应中的经典通路,可通过对下游众多靶点发挥调控作用,如糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3- β)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、eNOS 以及肿瘤坏死因子 α 等^[16-18]。AQP 是存在于细胞膜上的膜蛋白分子,在细胞膜上形成“孔道”,控制水分子和甘油、尿素等小分子进出细胞^[19]。其主要生理功能是维持细胞内外的水平衡,除此之外,近年来研究发现 AQP 还参与血管功能的调节,并能够影响脑缺血、缺血性心脏病、肿瘤新生血管等疾病的发生发展进程^[20]。AQP 可以调节细胞迁移和跨上皮细胞运输、调节钠和水过多流入以及细胞肿胀等问题。同时 AQP 还能够调控细胞黏附、信号传导、细胞体积调节和蛋白表达等^[21]。可见 AQP 也可在炎症反应相关机制中起到重要作用。

因此,本研究认为,温阳通脉方能够降低大鼠血清中 CK-MB 和 LDH 水平,降低 ST 段抬高水平,减轻心肌细胞损伤;该心肌保护作用可能与激活 JAK2/STAT3 信号通路、下调 AQP1 和 AQP4 的表达有关,且实验结果表明温阳通脉方中剂量和高剂量的保护效果较低剂量更佳。进而猜想,温阳通脉方可能通过炎症反应相关机制发挥作用,通过降低细胞膜对水分子的通透性保护心肌细胞,为温阳通脉方的炎症相关作用机制的深入研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Hodgson H. Global health watch 5: an alternative world health report [J]. *Med Confl Surviv*, 2017, 33(4): 1-2.
- [2] Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(3): 360-368.
- [3] 杨旭,邹澍宣.《金匱要略》胸痹治疗思想临床浅析[J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(11): 75-76.
- [4] 曹风华. 枳实薤白桂枝汤预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[D]. 长春: 长春中医药大学, 2014: 1-38.
- [5] 朱德建,陆曙. 枳实薤白桂枝汤对不稳定型心绞痛患者 Hcy 及 hs-CRP 影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(6): 209-212.
- [6] 李楠楠,石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤通过 AC/cAMP 通路对缺血再灌注大鼠心肌组织水通道蛋白表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(3): 237-244.
- [7] 刘春晓,石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤对大鼠心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡及 Caspase 相关蛋白的影响[J].

中药药理与临床, 2017, 33(1): 13-16.

- [8] 李文珏. 枳实薤白桂枝颗粒对心肌缺血作用及机制的初步探讨[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015: 1-45.
- [9] 石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤治疗冠心病心绞痛[J]. *辽宁中医杂志*, 2009, 36(6): 962-963.
- [10] 石珊,孔祥英. 枳实薤白桂枝汤治疗冠心病心绞痛的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(45): 111-112.
- [11] 徐萍,石月萍. 加减枳实薤白桂枝汤对大鼠心肌缺血再灌注过氧化损伤的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(3): 16-20.
- [12] 刘永强,冷玉芳,叶元梅,等. JAK2/STAT3 信号通路在羟考酮预处理预防心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *兰州大学学报·医学版*, 2017, 43(1): 26-30.
- [13] 黄良珠,田英,龙石银. JAK/STAT 信号通路及其负调控因子 SOCS 与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(8): 665-668.
- [14] Zhang M, Wang X, Wang X, et al. Oxymatrine protects against myocardial injury via inhibition of JAK2/STAT3 signal in rat septic shock [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4): 1293-1299.
- [15] Yang FH, Xue L, Han ZQ, et al. Vaspin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via activating autophagic flux and restoring lysosomal function [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 501-507.
- [16] Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(2): H827-834.
- [17] 尹建国,张社兵,彭道泉. 载脂蛋白 A I 通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制肿瘤坏死因子 α 的转录表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(6): 566-570.
- [18] He Y, Li C, Ma Q, et al. Esculetin inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(1): 139-144.
- [19] Agre P. Aquaporin water channels: from atomic structure to clinical medicine [J]. *Nanomedicine*, 2006, 2(4): 266-267.
- [20] Schorn C, Frey B, Lauber K, et al. Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(1): 35-41.
- [21] Kitchen P, Day RE, Salman MM, et al. Beyond water homeostasis: diverse functional roles of mammalian aquaporins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(12): 2410-2421.

(此文编辑 许雪梅)