

西红花苷通过 C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 途径对缺血缺氧损伤心肌的保护作用

侯莉, 于颖, 丁力

(恩施州中心医院中医部心内科, 湖北省恩施州 445000)

[关键词] C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3; 西红花苷; 缺血缺氧; 损伤心肌; 保护作用

[摘要] 目的 探讨西红花苷对异丙肾上腺素所致心肌缺血缺氧模型大鼠的保护作用,并验证其作用机制是否与 C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 信号通路有关。方法 皮下注射异丙肾上腺素建立大鼠缺血缺氧模型后,分别灌胃给予西红花苷不同剂量干预(25、50、100 mg/kg)。比较各组大鼠血清 LDH-1、CK-MB、MDA、TNF- α 、NO 水平以及大鼠 CI 及心肌梗死面积;比较各组心肌 Akt、ERK1/2、C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3 蛋白及基因表达水平。结果 与空白对照组比较,模型组大鼠存活率极显著降低($P < 0.01$),血清 LDH-1、CK-MB、MDA、TNF- α 、NO 水平、CI 及心肌梗死面积均极显著升高($P < 0.01$);心肌纤维排列紊乱且炎性细胞浸润明显;心肌 Akt、ERK1/2 蛋白表达均显著升高($P < 0.05$),C/EBP- β 、UCP3 蛋白及 mRNA 表达均极显著升高($P < 0.01$),PGC-1 α 蛋白及 mRNA 表达极显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组大鼠存活率显著升高($P < 0.05$),血清 LDH-1、CK-MB、MDA、TNF- α 、NO 水平、心肌梗死面积均极显著降低($P < 0.01$),CI 显著降低($P < 0.05$),心肌纤维排列整齐且炎性细胞浸润明显减轻;Akt、ERK1/2 蛋白表达均极显著升高($P < 0.01$),C/EBP- β 蛋白及 mRNA 表达均极显著降低($P < 0.01$),PGC-1 α 蛋白表达极显著升高($P < 0.01$)而 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$),UCP3 蛋白表达无差异而 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$)。与模型组、对照组比较,西红花苷中、高剂量均可显著提高大鼠存活率($P < 0.05$);显著降低大鼠血清 LDH-1、CK-MB、MDA、TNF- α 及 NO 水平($P < 0.05$);显著降低 CI 及心肌梗死面积($P < 0.05$);减轻炎症浸润且提高心肌细胞完整程度;显著升高心肌 Akt、ERK1/2 蛋白表达水平($P < 0.05$);显著降低心肌 C/EBP- β 蛋白及 mRNA 表达水平($P < 0.05$),显著升高 PGC-1 α 、UCP3 蛋白及 mRNA 表达水平($P < 0.05$);其中高剂量组综合效果较好。结论 西红花苷对大鼠缺血缺氧损伤心肌具有明显的保护作用,其机制可能与调节 C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 信号通路相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Protective effects of crocin on myocardial ischemia and hypoxia induced by ischemia and hypoxia through C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 in rats

HOU Li, YU Ying, DING Li

(Department of Traditional Chinese Medicine Cardiology of Enshi Central Hospital, Enshi, Hubei 445000, China)

[KEY WORDS] C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3; crocetin; ischemia and hypoxia; myocardial injury; protective effect

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of crocetin on isoprenaline induced ischemia and hypoxia in rats, and to verify whether its mechanism is related to the C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 signaling pathway. **Methods** The rat model of ischemia and hypoxia was established by subcutaneous injection of isoproterenol, different doses of Crocin (25, 50, 100 mg/kg) were given intragastrically. The levels of serum LDH-1, CK-MB, MDA, TNF- α , NO, CI and myocardial infarct size, myocardial Akt, ERK1/2, C/EBP- β , PGC-1 α , UCP3 protein and gene expression were compared in each experimental group. **Results** Compared with the blank control group, the survival rate of the model group was significantly decreased ($P < 0.01$), the levels of serum LDH-1, CK-MB, MDA, TNF- α , NO, CI and myocardial infarction area were significantly increased ($P < 0.01$). The arrangement of myocardial fibers was disordered and the infiltration of

[收稿日期] 2018-12-05

[修回日期] 2019-03-10

[作者简介] 侯莉,主治医师,研究方向为心血管疾病中西医结合治疗,E-mail 为 2125988754@qq.com。通信作者于颖,硕士,主治医师,研究方向为心脑血管疾病,E-mail 为 2069638754@qq.com。

inflammatory cells was obvious. The expression of Akt and ERK1/2 protein was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of C/EBP- β , UCP3 protein and mRNA was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of PGC-1 α protein and mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$). The levels of serum LDH-1, CK-MB, MDA, TNF- α and NO in the positive control group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). The infarct size was significantly decreased ($P < 0.01$), CI was significantly decreased ($P < 0.05$), the myocardial fibers were arranged neatly and the infiltration of inflammatory cells was significantly reduced. The expression of Akt and ERK1/2 protein was significantly increased ($P < 0.01$), the expression of C/EBP- β protein and mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression of PGC-1 α protein was extremely high ($P < 0.05$). The expression of mRNA was significantly increased ($P < 0.01$), the expression of UCP3 protein was not different ($P > 0.05$), but the expression of mRNA was significantly increased ($P < 0.05$), which was compared with that of the model control group. The middle and high doses of Crocin could significantly increase the survival rate of rats ($P < 0.05$), significantly decrease the levels of serum LDH-1, CK-MB, MDA, TNF- α and NO ($P < 0.05$), and significantly decrease the areas of CI and myocardial infarction ($P < 0.05$). Reduce inflammatory infiltration and improve the integrity of cardiomyocytes; The expression of Akt and ERK1/2 protein was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of C/EBP- β protein and mRNA was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of PGC-1 α , UCP3 protein and mRNA was significantly increased ($P < 0.05$). The comprehensive effect of high dose group was better than that of high dose group. **Conclusion** Crocin has obvious protective effect on myocardial ischemia and hypoxia injury in rats, and its mechanism may be related to the regulation of C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 signaling pathway.

心血管疾病是目前世界上发病率最高的疾病,主要包括心绞痛、冠心病、高血压和心肌梗死(MI)等^[1]。相关研究调查预测,到2020年心血管疾病会发展为世界范围内死亡的主要原因,尤其是心律失常与猝死^[2]。因此预防心肌缺血缺氧损伤对心血管疾病至关重要。随着中医药在临床应用中的日趋成熟,采用传统中医药治疗心肌损伤已被广泛证实,已有研究表明,中药可能在细胞增殖、凋亡等多个方面影响心肌功能、心室重构的发生发展^[3]。此外,现有研究已证实他汀类药物、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素受体抑制剂等特异性药物通过增加心肌受损动物模型细胞凋亡和减少平滑肌细胞增殖来缓解缺血缺氧动物模型的心肌受损程度,发挥较好的保护作用^[4-5]。

西红花为鸢尾科植物番红花(*Crocus sativus* L.)的干燥柱头,又名藏红花。性味甘、微寒,归心、肝经,其功效与菊科药材红花相似,均可活血通经、祛瘀止痛,但西红花活血祛瘀之力较强。故常用于急性、重度血瘀不通之证。西红花苷(Crocin)为中药材西红花中一类具有较好生物活性的中药提取成分^[6]。其应用于传统医学的历史悠久,并被报道具有多种药理活性,如抗氧化、抗癌、抗炎、抗动脉粥样硬化、预防心血管疾病等^[7]。目前关于西红花苷的分离提取、纯化精制、鉴定等中药化学方面的研究较多,而对于西红花苷的药理作用研究尚处于初步阶段,或仅局限于动物模型的整体研究,缺乏对西红花苷作用机制的深入探讨。最新研究发现,

西红花苷不仅对异丙肾上腺素损伤心肌细胞具有一定的体外改善作用,而且对于ISO诱导的大鼠缺血缺氧损伤心肌具有体内保护作用,但其作用机制目前尚不完全清楚。基于此研究背景,本研究进一步验证西红花苷对于缺血缺氧损伤心肌的保护作用并探讨其潜在的分子机制,以期在西红花苷的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要药品、仪器和动物

西红花苷(上海源叶生物科技有限公司);丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、一氧化氮(NO)试剂盒均购于北京森美希克玛生物科技有限公司;C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3试剂盒及兔抗人多克隆抗体C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3均购自美国Sigma公司。Akt、ERK1/2试剂盒均购自杭州东岸生物科技有限公司。

倒置显微镜(日本Olympus公司);Neusoft全自动生化分析仪(沈阳东软医疗系统有限公司);TriStar2 LB 942型多功能酶标仪(德国伯托公司);紫外可见分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限责任公司);Trans-Blot SD型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司);超低温冰箱(美国Thermo公司);高速分散匀质器(常州丹瑞实验仪器设备有限公司);F3型全自动荧光与可见光凝胶成像分析系统(英国Syngene公司);低温高速离心机(盐城凯特实验仪

器公司)。

本实验所用大鼠均由武汉大学实验动物实验中心提供[SYXK(鄂)2014-0013]。SPF 级 Wistar 大鼠 72 只,雌雄各半,体质量 0.18~0.22 kg,将大鼠每笼 6 只适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 动物分组与缺血缺氧模型制备

参考文献^[8-10]方法构建大鼠心肌缺血缺氧损伤模型。具体方法如下:选取健康 Wistar 大鼠 72 只,随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组、西红花苷低、中、高剂量组共 6 组($n=12$)。除空白对照组注射生理盐水外,其余各组大鼠进行皮下多点注射异丙肾上腺素,以每天 20、10、5 mg/kg 递减剂量连续注射 3 d,再以每天 3 mg/kg 剂量连续注射 9 d,诱导大鼠产生慢性心力衰竭。末次给药 0.5 h 后,麻醉大鼠。腹主动脉采血后处死并摘取大鼠心脏等相关样本。

从第 1 次注射异丙肾上腺素前 3 d 开始,阳性对照组给予盐酸普萘洛尔(每天 1.67 mg/kg),西红花苷低、中、高剂量组给予西红花苷(每天 25、50、100 mg/kg),空白对照组和模型组给予等体积的蒸馏水。所有药物均灌胃给予,连续给药 15 d。

1.3 大鼠一般状态及存活率

整个实验过程中,密切观察大鼠的一般状态,记录各实验组大鼠的存活状况,计算存活率。

1.4 全自动生化分析仪检测

实验结束后麻醉大鼠,腹腔静脉采血,低温高速离心机离心(3 500 r/min,10 min),分离血清后,严格按照采用全自动生化分析仪说明书操作步骤,测定血清心肌酶中乳酸脱氢酶 1(LDH-1)以及肌酸磷酸酶同工酶(CK-MB)的含量。

1.5 ELISA 法

实验结束后麻醉大鼠,腹腔静脉采血,低温高速离心机离心(3 500 r/min,10 min),分离血清,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤,测定血清中 MDA、TNF- α 、NO 的含量。

1.6 大鼠心脏指数(CI)及心肌梗死面积测定

采血完毕后处死大鼠,剥取心脏,以 4℃ 恒温预冷的生理盐水清洗心腔,至心腔内无血迹后立即用滤纸吸干水分。采用万分之一分析天平精密称量心脏质量,结合大鼠体质量计算心脏指数($CI=$ 全心质量/体质量,mg/g);称量结束后,立即置于-80℃ 冰箱冷冻 15 min,沿垂直长轴将心脏切片厚度为 0.1 cm 的组织切片,使用浓度为 0.1% 硝基四氮唑蓝(NBT)溶液进行组织切片染色,染色至均匀后

37℃ 恒温水浴 1 h,再置于 10% 福尔马林中固定 48 h,取出固定切片,将每个心肌切片中被染色的非梗死心肌组织准确剪除,然后精密称重未染色的梗死心肌质量,所得质量除去心脏称重质量,即为心肌梗死面积(%)。

1.7 HE 染色法

收集大鼠心肌组织,4℃ 预冷生理盐水洗净血迹后用滤纸吸干水分,4% 多聚甲醛固定 48 h,固定完成后常规步骤制作大鼠心肌石蜡切片,使用苏木精染色 10 min,流动水洗涤,加入 1% 盐酸乙醇进行分化后,继续使用流动水洗涤 5 min,再加入伊红染液染色 5 min,最后采用流动水洗涤,严格按照操作步骤进行常规梯度乙醇脱水,封片。在光镜下观察各组大鼠心肌组织病理学变化。

1.8 Western blot

收集大鼠心肌组织,4℃ 预冷生理盐水洗净滤纸吸干水分后,剪切至 200 mg 左右分装于一次性离心管内,-80℃ 冻存。检测前取出常温解冻,使用匀浆机制备组织匀浆,加入 300 μ L 蛋白裂解液后离心取上清(4℃,12 000 r/min,15 min),提取总蛋白,严格按照试剂盒操作步骤测定各实验组大鼠总蛋白的浓度(上样量为 50 μ g)。SDS-PAGE 电泳至半干状态,立即转至 PVDF 膜上,脱脂奶粉溶液常温封闭(5%,2 h),加入兔抗小鼠 Akt、ERK1/2、C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3 后与 5% 脱脂奶粉一抗稀释液共同置于 4℃ 恒温环境下孵育过夜。孵育结束后洗涤(TBST,每次 10 min,3 次)。末次洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2 000),于室温条件下孵育 1 h 后洗涤(TBST,每次 10 min,4 次)。配置发光液(A:B=1:1,V/V),将膜置于曝光板,滴加适量发光液后曝光,检测大鼠心肌组织蛋白激酶(Akt)、细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)、CCAAT 增强子结合蛋白 β (C/EBP- β)、过氧化体增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)、线粒体解偶联蛋白 3(UCP3)蛋白表达水平。

1.9 RT-PCR

将冻存心肌组织常温解冻,取 50 mg 加入适量液氮下研磨,研磨均匀加入 0.5 mL Trizol 后转移至 1.5 mL 一次性离心管内,提取总 RNA,按照试剂盒操作进行反转录,转录后的产物进行 PCR 扩增,引物序列见表 1,反应条件如下:94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 11 s,35 个循环。PCR 实验结束后,取扩增后的产物 8 μ L,加入 2 μ L 6 \times 上样缓冲液后行 2% 琼脂糖凝胶电泳,给予 EB 染色最后于 bio-rad Image Lab 仪器上观察及照相记录,使用 Quantity

One 软件分析结果,以 β -actin 为内参,计算心肌组织 CCAAT 增强子结合蛋白 β (C/EBP- β)、过氧化体

增殖物激活型受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)、线粒体解偶联蛋白 3 (UCP3) 产物的相对量。

表 1. 引物序列表

Table 1. Primer sequence listing

基因	上游	下游	长度 (bp)
C/EBP- β	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	5'-ATGCTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	196
UCP3	5'-GTGCTCGGTACCATCCTGGACTA-3'	5'-TGGAGTGGTCCGTTCTTTG-3'	163
PGC-1 α	5'-ATGTGTCGCCTTCTTGCTCT-3'	5'-TCGTGCTCATTGGCTTCATA-3'	325
β -actin	5'-CGCGAGTACAACCTTCTTGC-3'	5'-CAACACAGCCTGGATGGCTA-3'	480

1. 10 统计学方法

实验所得数据均采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,多组间比较采用单因素方差分析,存活率的比较应使用 χ^2 检验,两两比较使用 t 检验,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态及存活率的比较

造模开始前,所有大鼠均状态良好、反应敏捷、毛发致密有光泽、进食、活动正常;造模开始后,除空白对照组外,各实验组大鼠均表现出不同程度毛发发黄、精神萎靡、饮食饮水减少、喜聚集成堆、活动较少等症状;给药一段时间后,阳性对照组、西红花苷中、高剂量组大鼠状态有所改善,毛发色白、反应活动较灵敏、饮食饮水量增加。与空白对照组比较,模型组大鼠存活率显著降低 ($P < 0.01$);与模型组、对照组比较,西红花苷中剂量组大鼠存活率显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),西红花苷高剂量组大鼠存活率显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图 1。

2.2 各组 LDH-1 和 CK-MB 含量比较

与空白对照组比较,模型组大鼠血清心肌酶

LDH-1、CK-MB 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,西红花苷低剂量组大鼠血清中心肌酶 CK-MB 含量显著降低 ($P < 0.05$),西红花苷中、高剂量组大鼠血清心肌酶 CK-MB、LDH-1 含量均显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

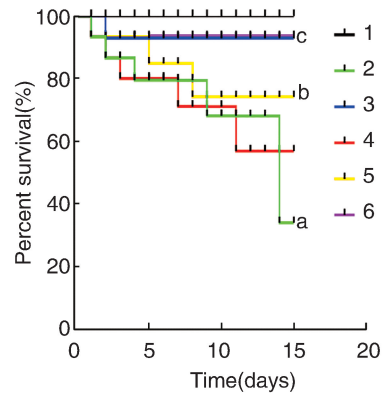


图 1. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠存活率的影响 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阳性对照组,4 为西红花苷低剂量组,5 为西红花苷中剂量组,6 为西红花苷高剂量组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 1. Effect of crocetin on survival rate of rats with ischemia and hypoxia injury

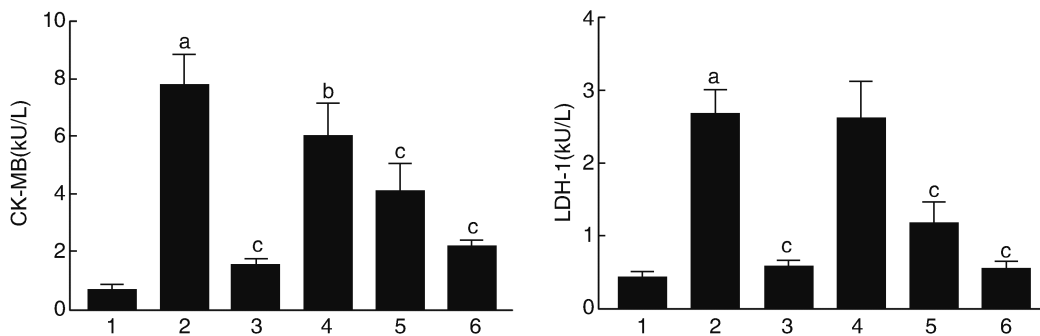


图 2. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠血清心肌酶 LDH-1、CK-MB 的影响 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阳性对照组,4 为西红花苷低剂量组,5 为西红花苷中剂量组,6 为西红花苷高剂量组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 2. Effect of crocetin on serum myocardial enzyme LDH-1,CK-MB in rats with ischemia and hypoxia injury

2.3 各组 MDA、TNF- α 和 NO 含量的比较

与空白对照组比较,模型组大鼠血清 MDA、TNF- α 、NO 含量均显著升高, ($P < 0.01$);与模型组比较,西红花苷中剂量组大鼠血清 MDA、TNF- α 、NO

均显著降低 ($P < 0.05$),西红花苷高剂量组大鼠血清 MDA、TNF- α 、NO 均极显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图 3。

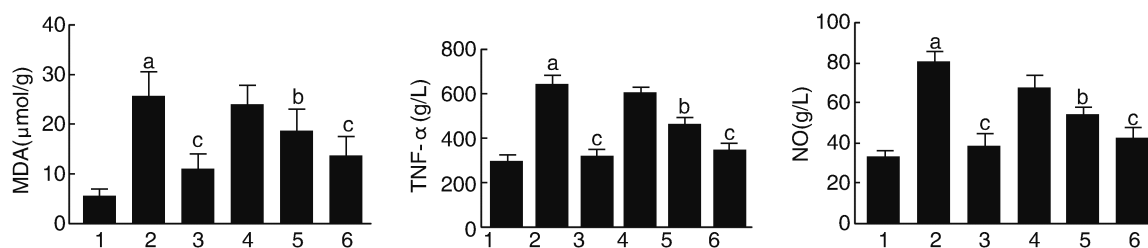


图 3. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠血清 MDA、TNF- α 、NO 的影响 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阳性对照组,4 为西红花苷低剂量组,5 为西红花苷中剂量组,6 为西红花苷高剂量组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 3. Effect of crocetin on serum MDA, TNF- α and NO in rats with ischemia and hypoxia injury

2.4 各组大鼠心脏指数 (CI) 及心肌梗死面积的比较

与空白对照组比较,模型组大鼠 CI 极显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,西红花苷高剂量组大鼠 CI 显著降低 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较,模型

组大鼠心肌梗死面积极显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,西红花苷低剂量组大鼠心肌梗死面积显著降低 ($P < 0.05$),西红花苷中、高剂量组大鼠心肌梗死面积极显著降低 ($P < 0.01$)。结果见图 4。

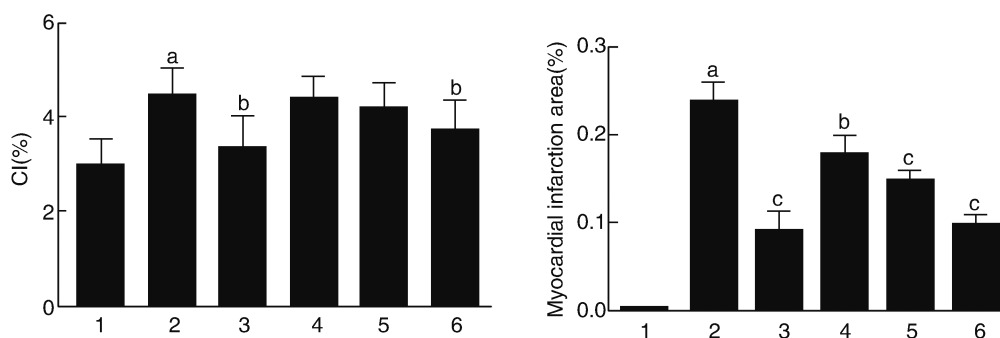


图 4. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠心脏指数、心肌梗死面积的影响 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阳性对照组,4 为西红花苷低剂量组,5 为西红花苷中剂量组,6 为西红花苷高剂量组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 4. Effect of crocetin on cardiac index and myocardial infarction size in rats with ischemia and hypoxia injury

2.5 各组大鼠心肌病理切片 HE 染色观察

显微镜观察明显可见空白对照组大鼠心肌切片形态未见异常,心肌纤维排列整齐有序,心肌细胞完整且细胞核分布均匀,整体心肌结构整齐清晰;模型组大鼠心肌结构模糊不清,心肌纤维排列紊乱,心肌细胞多有破裂且细胞核消融;阳性对照组、西红花苷中、高剂量组大鼠心肌组织病变有所减轻,尤其西红花苷高剂量组大鼠心肌纤维排列整齐,未出见炎性细胞浸润。结果见图 5。

2.6 各组大鼠 Akt 和 ERK1/2 蛋白表达水平的比较

与空白对照组比较,模型组大鼠心肌组织 Akt、ERK1/2 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$);与模

型组比较,西红花苷中剂量组大鼠心肌组织 Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$),西红花苷高剂量组大鼠心肌组织 Akt、ERK1/2 蛋白表达水平均极显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图 6。

2.7 各组 C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3 蛋白表达水平的比较

与空白对照组比较,模型组大鼠心肌组织 C/EBP- β 蛋白表达水平极显著升高 ($P < 0.01$), PGC-1 α 、UCP3 蛋白表达水平极均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,西红花苷低剂量组大鼠心肌组织各项指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$);西红花苷中剂量组大鼠心肌组织 C/EBP- β 蛋白表达水平显著降

低 ($P < 0.05$), PGC-1 α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 西红花苷高剂量组大鼠心肌组织 C/EBP- β 蛋白表达水平极显著降低 ($P < 0.01$), UCP3 蛋白表

达水平显著升高 ($P < 0.05$), PGC-1 α 蛋白表达水平极显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图 7。

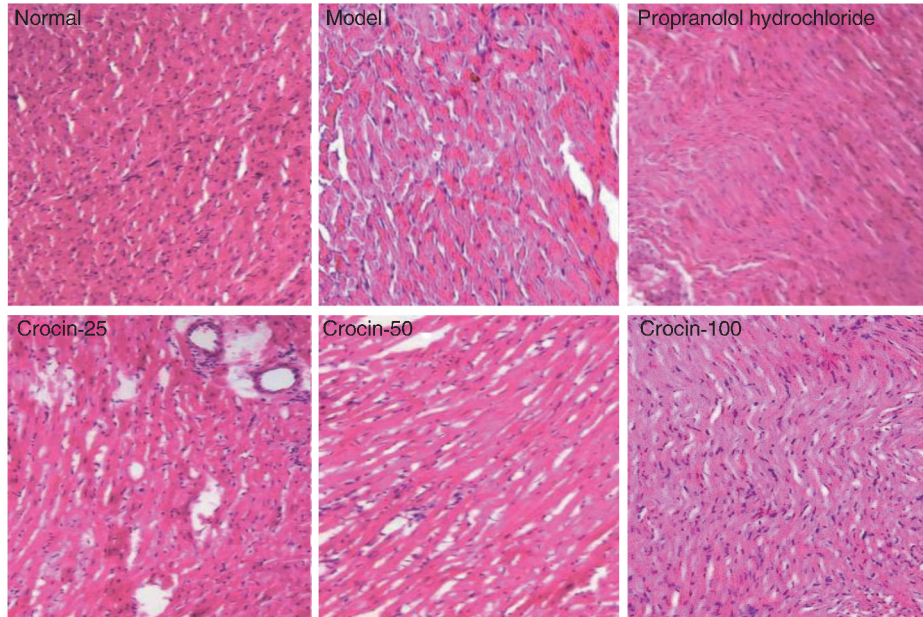


图 5. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠心肌病理学影响(400 \times)

Figure 5. Effect of crocetin on myocardial pathology in rats with ischemia and hypoxia injury (400 \times)

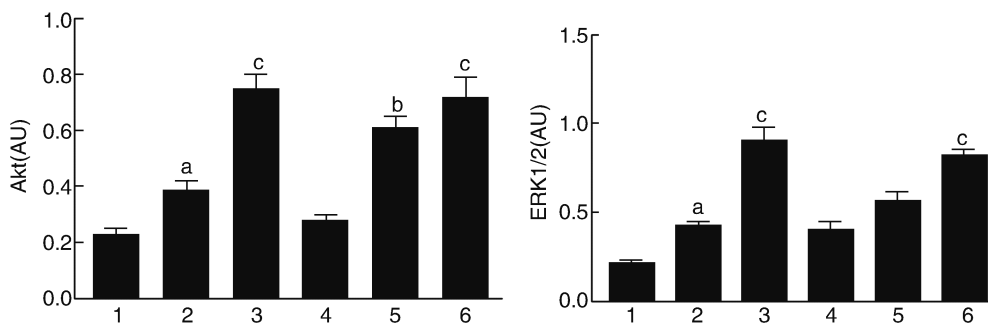


图 6. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠心肌组织 Akt、ERK1/2 蛋白表达水平的影响 1 为空白对照组, 2 为模型组, 3 为阳性对照组, 4 为西红花苷低剂量组, 5 为西红花苷中剂量组, 6 为西红花苷高剂量组。a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

Figure 6. Effect of crocetin on the expression of Akt, ERK1/2 protein in myocardial tissue of rats with ischemia and hypoxia injury

2.8 各组 C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3 mRNA 表达水平的比较

与空白对照组比较, 模型组大鼠心肌组织 C/EBP- β mRNA 表达水平极显著升高 ($P < 0.01$), PGC-1 α 、UCP3 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 西红花苷低剂量组大鼠心肌组织各项指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 西红花

苷中剂量组大鼠心肌组织 C/EBP- β mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), PGC-1 α mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 西红花苷高剂量组大鼠心肌组织 C/EBP- β mRNA 表达水平极显著降低 ($P < 0.01$), UCP3 mRNA 表达水平显著升高, ($P < 0.05$), PGC-1 α mRNA 表达水平极显著升高 ($P < 0.01$)。结果见图 8。

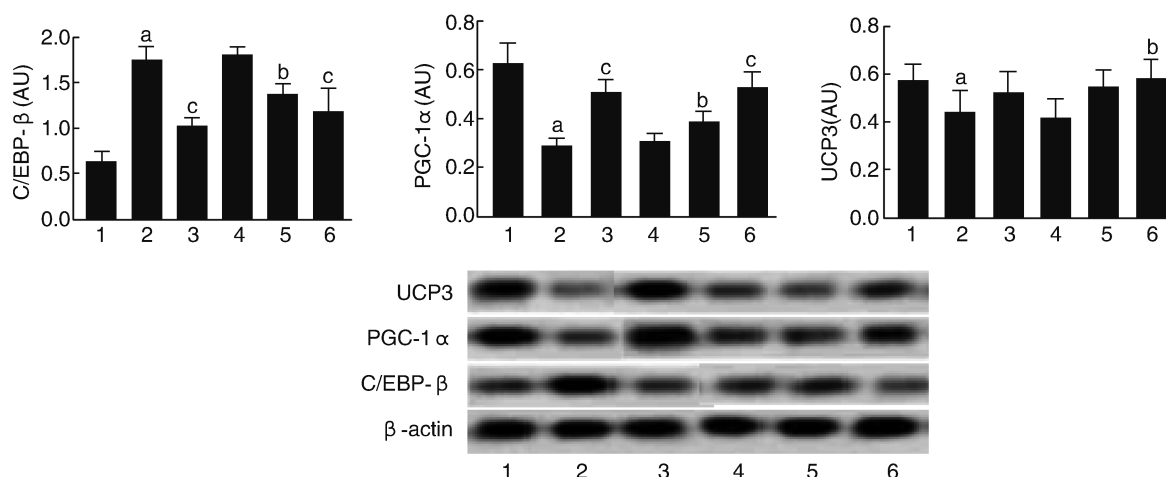


图 7. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠心肌 C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3 蛋白表达水平的影响 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阳性对照组,4 为西红花苷低剂量组,5 为西红花苷中剂量组,6 为西红花苷高剂量组。a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

Figure 7. Effect of crocetin on the expression of C/EBP- β , PGC-1 α and UCP3 protein in myocardium of rats with ischemia and hypoxia injury

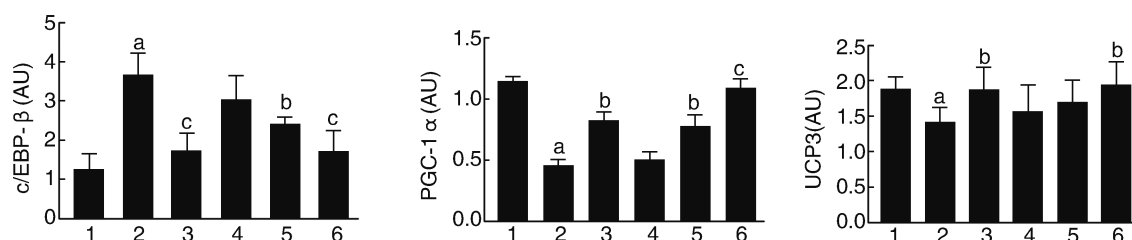


图 8. 西红花苷对缺血缺氧损伤大鼠心肌 C/EBP- β 、PGC-1 α 、UCP3 mRNA 表达水平的影响 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为阳性对照组,4 为西红花苷低剂量组,5 为西红花苷中剂量组,6 为西红花苷高剂量组。a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

Figure 8. Effect of crocetin on the expression of C/EBP- β , PGC-1 α and UCP3 genes in myocardium of rats with ischemia and hypoxia injury

3 讨论

心肌缺血、缺氧是临床极常见的一类病理过程,是由于心肌组织和心肌细胞得不到充足的氧气或血液供应,而导致心脏形态结构、生理功能、代谢活动等发生一系列异常改变^[11]。因此,提高机体的耐缺血缺氧能力,减弱缺血缺氧对机体的损伤,使机体尽可能在缺血缺氧环境中维持较为正常的生理机能对于缺血缺氧证候群体是极为关键的。

本研究通过采用多点注射异丙肾上腺素的方法构建大鼠心肌缺血缺氧损伤模型,探讨西红花苷的保护作用,并进一步探讨其作用机制是否与 C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 信号通路相关。该方法具有以下优势,其一,异丙肾上腺素为 β 肾上腺素受体激动剂,其对心肌具有正性变力作用,可使心肌收缩力加强、心率增快、心肌耗氧量增加,导致心肌细

胞缺血缺氧。此种造模方法在原发性损伤后,不存在持续损伤因素,更接近于心肌缺血缺氧导致衰老的自然病理过程,没有持续存在的损伤因素,能够更好地模拟心衰的自然病理过程。其二,有研究表明,在心肌缺血缺氧损伤过程中,线粒体是各损伤因素作用的集中点,由于线粒体损伤导致的能量代谢衰竭以及 MPTP 的开放是心肌缺血缺氧等损伤的主要特征^[12]。故所选评价指标中,PGC-1 α 可通过激活 PPAR- α 来增强机体的脂肪酸氧化、提高机体线粒体中脂肪酸氧化相关酶的表达等,从而改善心肌缺血缺氧等损伤,治疗心衰;UCP3 可通过影响线粒体质子渗漏而调控线粒体能量呼吸链以及活性氧的产生;C/EBP- β 不仅能能量代谢调控,尤其在控制脂类的代谢过程中具有突出作用^[13]。因此,C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 信号通路在调节心肌缺血缺氧损伤大鼠线粒体能量代谢的过程中具有一定的

调控作用。此外,LDH-1、CK-MB 为心肌损伤程度的特异性标志物,心肌细胞的缺血缺氧使细胞膜的完整性受损,膜通透性增加,引起心肌酶释放增多,使血清中心肌酶表达上调,引起心肌细胞代谢紊乱。NO 是血管内皮细胞利用 L-精氨酸在 NOS 作用下合成的具有扩张血管作用的内源性物质,被认为具有内源性心脏保护作用,通过激活平滑肌细胞中 cGMP 依赖的途径介导血管舒张^[14],Akt 和 ERK1/2 不仅可参与心血管组织 iNOS 活性或表达的调节,从而介导 NO 生成;AKT/ERK1/2 信号通路还可通过调控肝细胞生长因子、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 等多种生长因子调节内皮细胞血管生成。在受损心肌的恢复过程中发挥多重作用。TNF- α 是经典促炎因子,在炎症反应中最早表达,不仅可通过鞘氨醇依赖机制诱导心肌细胞凋亡,还能促进白细胞与内皮细胞的黏附和相互作用,加重缺血缺氧再灌注后的心肌损伤^[15]。此外还能促进其他参与心肌损伤的炎症细胞因子产生^[16]。

本研究结果显示,西红花苷不同剂量均可改善大鼠一般状态并提高大鼠存活率;降低大鼠心脏指数及心肌梗死面积;改善心肌细胞损伤程度及心肌组织结构;降低大鼠血清中 LDH-1、CK-MB、MDA、TNF- α 、NO 等含量;升高心肌组织 Akt、ERK1/2 蛋白表达水平;同时降低心肌组织 C/EBP- β 蛋白表达水平,升高 PGC-1 α 、UCP3 蛋白表达水平;降低大鼠心肌组织和 C/EBP- β 基因 mRNA 表达水平,升高大鼠心肌组织 PGC-1 α 、UCP3 基因 mRNA 表达水平。且高剂量组的综合效果优于其他剂量组,提示西红花苷高剂量对于心肌缺血缺氧损伤大鼠具有较好的保护作用,且其作用机制可能与调节 C/EBP- β /PGC-1 α /UCP3 信号通路有关。

[参考文献]

- [1] Ren-an Q, Juan L, Chuyuan L, Wenjuan F, et al. Study of the protective mechanisms of Compound Danshen Tablet (Fufang Danshen Pian) against myocardial ischemia/reperfusion injury via the Akt-eNOS signaling pathway in rats[J]. *Ethnopharmacol*, 2014, 156(23): 190-198.
- [2] Shimokawa H, Yasuda S. Myocardial ischemia: current concepts and future perspectives[J]. *J Cardiol*, 2008, 52(2): 67-78.
- [3] Li SY, Wang XG, Ma MM, et al. Ginsenoside-Rd potentiates apoptosis induced by hydrogen peroxide in basilar artery smooth muscle cells through the mitochondrial

pathway[J]. *Apoptosis*, 2012, 17: 113-120.

- [4] Yang W, Xu L, Xiaoliang W, et al. Ginsenoside Rd attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via Akt/GSK-3 β signaling and inhibition of the mitochondria-dependent apoptotic pathway[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e70956.
- [5] Zhu J, Qiu Y, Wang Q, et al. Low dose cyclophosphamide rescues myocardial function from ischemia-reperfusion in rats [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008, 34(3): 661-666.
- [6] Lee IA, Lee JH, Baek NI, et al. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite crocetin[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(11): 2106-2110.
- [7] Farkhondeh T, Samarghandian S. The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients on the management of diabetes mellitus and dislipidemia[J]. *Afr J Pharm Pharmacol*, 2014, 8(20): 541-549.
- [8] 张秀芹. 染料木素对大鼠心肌缺血缺氧损伤的保护作用[D]. 衡阳: 南华大学, 2016: 7-8.
- [9] 李军鸽, 朱凯, 李娜, 等. 红景天酪醇对老年大鼠心肌缺血缺氧型冠心病的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(9): 2317-2318.
- [10] 刘晓帅, 王果, 汪林, 等. 桂枝茯苓胶囊耐缺血缺氧能力的实验研究[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2016, 37(4): 590-593.
- [11] Zhou QM, Song W, Hui Z, et al. The combination of baicalin and baicalein enhances apoptosis via the ERK/p38 MAPK pathway in human breast cancer cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(12): 1648-1658.
- [12] 陈意雄. 解偶联蛋白 3 在抗心脏缺血/再灌注损伤中的作用和机制 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014: 20-21.
- [13] 许柳霞. 有氧运动对高脂饮食诱导胰岛素抵抗大鼠心肌 C/EBP β 表达的影响 [D]. 广州: 广州体育学院, 2014: 31-32.
- [14] Sudar E, Dobutovic B, Soskic S, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase activity/expression in rat hearts from ghrelin-treated rats[J]. *J Physiol Biochem*, 2011, 67(2): 195-204.
- [15] Zhou S, Wang G, Zhang W. Effect of TLR4/MyD88 signaling pathway on sepsis-associated acute respiratory distress syndrome in rats, viaregulation of macrophage activation and inflammatory response [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4): 3376.
- [16] Nizamutdinova IT, Guleria RS, Singh AB, et al. Retinoic acid protects cardiomyocytes from high glucose-induced-apoptosis via inhibition of sustained activation of NF- κ B signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(2): 380.

(此文编辑 朱雯霞)