

基于缺氧诱导因子-1 α /Bcl2/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3 通路 探讨速效救心丸对冠心病大鼠的保护机制

郭坤, 金辉, 吴留广

作者单位: 周口市中心医院心脏血管外科, 河南 周口 466000

摘要: **目的** 探究速效救心丸对冠心病大鼠的保护作用, 初步探究其可能作用机制。 **方法** 将 40 只 SD 大鼠分为健康组、单纯模型组、速效救心丸组、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)激活剂奥替普拉(Oltipraz)组、速效救心丸+奥替普拉组, 每组 10 只大鼠。对大鼠心电图 ST 段、T 波变化进行检测, 采用酶法测定一氧化氮及血脂指标总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)水平, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、内皮素-1(ET-1)、前列环素 I₂(PGI₂)水平, HE 染色观察心肌组织病理形态学变化情况; DNA 断裂的原位末端标记法(TUNEL 法)检测心肌组织细胞凋亡情况; 蛋白质印迹法检测心肌组织中 HIF-1 α 、Bcl2/腺病毒 E1B 相互作用蛋白 3(BNIP3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达。 **结果** 与健康组相比, 单纯模型组 ST 段(0.36 $\pm$ 0.05)mV、T 波(0.26 $\pm$ 0.05)mV 升高, 三酰甘油(1.08 $\pm$ 0.14)mmol/L、总胆固醇升高, HDL(0.59 $\pm$ 0.05)mmol/L 降低, TNF- α (38.27 $\pm$ 1.36)pg/mL、ET-1(11.63 $\pm$ 1.84)ng/L 升高, 一氧化氮(28.58 $\pm$ 1.53) μ mol/L 降低, 心肌组织细胞凋亡率(46.72 $\pm$ 4.37)%升高, HIF-1 α (1.12 $\pm$ 0.15)、caspase-3(0.54 $\pm$ 0.05)蛋白表达升高, Bcl-2(0.36 $\pm$ 0.05)蛋白表达降低($P < 0.05$)。速效救心丸组 ST 段(0.23 $\pm$ 0.04)mV、T 波(0.15 $\pm$ 0.04)mV、三酰甘油(0.85 $\pm$ 0.07)mmol/L、TNF- α (24.69 $\pm$ 1.53)pg/mL、ET-1(7.18 $\pm$ 1.57)ng/L、细胞凋亡率(15.66 $\pm$ 3.51)%、HIF-1 α (0.49 $\pm$ 0.06)、caspase-3(0.42 $\pm$ 0.04)蛋白表达低于单纯模型组, 一氧化氮(36.43 $\pm$ 1.65) μ mol/L、Bcl-2(0.67 $\pm$ 0.07)高于单纯模型组($P < 0.05$)。奥替普拉组 ST 段(0.41 $\pm$ 0.05)mV、T 波(0.35 $\pm$ 0.03)mV、三酰甘油(1.27 $\pm$ 0.12)mmol/L、TNF- α (43.42 $\pm$ 1.59)pg/mL、ET-1(12.76 $\pm$ 1.45)ng/L、细胞凋亡率(62.88 $\pm$ 8.35)%、HIF-1 α (1.37 $\pm$ 0.26)、caspase-3(0.91 $\pm$ 0.09)蛋白表达高于单纯模型组, 一氧化氮(23.52 $\pm$ 1.84) μ mol/L、Bcl-2(0.25 $\pm$ 0.04)低于单纯模型组($P < 0.05$)。速效救心丸+奥替普拉组 ST 段(0.34 $\pm$ 0.06)mV、T 波(0.24 $\pm$ 0.05)mV、三酰甘油(1.06 $\pm$ 0.13)mmol/L、总胆固醇、TNF- α (35.23 $\pm$ 1.65)pg/mL、ET-1(11.24 $\pm$ 1.73)ng/L、细胞凋亡率(42.76 $\pm$ 5.16)%、HIF-1 α (1.06 $\pm$ 0.17)、caspase-3(0.52 $\pm$ 0.06)蛋白表达低于奥替普拉组, 一氧化氮(27.24 $\pm$ 1.32) μ mol/L、Bcl-2(0.38 $\pm$ 0.06)高于奥替普拉组($P < 0.05$)。 **结论** 速效救心丸可改善冠心病大鼠血脂、内皮功能, 降低机体炎症反应, 其可能是通过抑制 HIF-1 α /BNIP3 通路、降低心肌细胞凋亡实现的。

关键词: 冠心病/药物疗法; 缺氧诱导因子 1, α 亚基; 腺病毒 E1B 蛋白质类; 细胞凋亡; 细胞间黏附分子 1; 速效救心丸; 大鼠, Sprague-Dawley

Protective mechanism of *Suxiao Jiuxin* pills on rats with coronary heart disease based on HIF-1 α /BNIP3 pathway

GUO Kun, JIN Hui, WU Liuguang

Author Affiliation: Department of Cardiovascular Surgery, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan 466000, China

Abstract: **Objective** To explore the protective effect of *Suxiao Jiuxin* pills on rats with coronary heart disease and its possible mechanism. **Methods** Forty SD rats were assigned into Healthy group, model group, *Suxiao Jiuxin* pills group, HIF-1 α activator group (Oltipraz), *Suxiao Jiuxin* pills + Oltipraz group, with 10 rats in each group. The changes of ST segment of electrocardiogram in rats were detected, the levels of nitric oxide, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein (LDL) were determined by enzymatic method, the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), monocyte chemoattractant protein (MCP-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelin-1 (ET-1), and prostacyclin (PGI₂) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HE staining was used to observe the pathomorphologic changes of myocardium, the apoptosis of myocardial cells was detected by TUNEL method, and the expressions of HIF-1 α , BNIP3, Bcl-2, Bax and caspase-3 proteins in myocardium were detected by Western blotting. **Results** Compared with Healthy group, ST segment [(0.36 $\pm$ 0.05)mV and T wave [(0.26 $\pm$ 0.05)mV] increased, TG [(1.08 $\pm$ 0.14)mmol/L] and TC increased, HDL [(0.59 $\pm$ 0.05)mmol/L] decreased, TNF- α [(38.27 $\pm$ 1.36)pg/mL], ET-1 [(11.63 $\pm$ 1.84) ng/L] increased, NO [(28.58 $\pm$ 1.53) μ mol/L] decreased, apoptotic rate of myocardial cells [(46.72 $\pm$ 4.37)%] increased, expressions of HIF-1 α [(1.12 $\pm$ 0.15)], caspase-3 proteins [(0.54 $\pm$ 0.05)] increased and expression

of Bcl-2 protein $[(0.36 \pm 0.05)]$ decreased in Model group ($P < 0.05$). The ST segment $[(0.23 \pm 0.04) \text{mV}]$, T wave $[(0.15 \pm 0.04) \text{mV}]$, TG $[(0.85 \pm 0.07) \text{mmol/L}]$, TNF- α $[(24.69 \pm 1.53) \text{pg/mL}]$, ET-1 $[(7.18 \pm 1.57) \text{ng/L}]$, apoptotic rate $[(15.66 \pm 3.51)\%]$, HIF-1 α $[(0.49 \pm 0.06)]$, Caspase-3 proteins $[(0.42 \pm 0.04)]$ expressions in *Suxiao Jiuxin* pills group were lower than those in model group, while the expressions of NO $[(36.43 \pm 1.65) \mu\text{mol/L}]$ and Bcl-2 $[(0.67 \pm 0.07)]$ were higher than those in model group ($P < 0.05$). The ST segment $[(0.41 \pm 0.05) \text{mV}]$, T wave $[(0.35 \pm 0.03) \text{mV}]$, TG $[(1.27 \pm 0.12) \text{mmol/L}]$, TNF- α $[(43.42 \pm 1.59) \text{pg/mL}]$, ET-1 $[(12.76 \pm 1.45) \text{ng/L}]$, apoptotic rate $[(62.88 \pm 8.35)\%]$, HIF-1 α $[(1.37 \pm 0.26)]$, caspase-3 proteins $[(0.91 \pm 0.09)]$ expressions in Oltipraz group were higher than those in model group, while the expressions of NO $[(23.52 \pm 1.84) \mu\text{mol/L}]$ and Bcl-2 $[(0.25 \pm 0.04)]$ were lower than those in model group ($P < 0.05$). The ST segment $[(0.34 \pm 0.06) \text{mV}]$, T wave $[(0.24 \pm 0.05) \text{mV}]$, TG $[(1.06 \pm 0.13) \text{mmol/L}]$, total cholesterol, TNF- α $[(35.23 \pm 1.65) \text{pg/mL}]$, ET-1 $[(11.24 \pm 1.73) \text{ng/L}]$, apoptotic rate $[(42.76 \pm 5.16)\%]$, HIF-1 α $[(1.06 \pm 0.17)]$, caspase-3 proteins $[(0.52 \pm 0.06)]$ expressions in *Suxiao Jiuxin* pills + Oltipraz group were lower than those in Oltipraz group, while NO $[(27.24 \pm 1.32) \mu\text{mol/L}]$, Bcl-2 $[(0.38 \pm 0.06)]$ in *Suxiao Jiuxin* pills + Oltipraz group were higher than those in Oltipraz group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Suxiao Jiuxin* pills can improve blood lipid and endothelial function and reduce inflammatory reaction in rats with coronary heart disease, which may be achieved by inhibiting HIF-1 α /BNIP3 pathway and reducing cardiomyocyte apoptosis.

Key words: Coronary heart disease/pharmacotherapy; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; Adenovirus e1b proteins; Apoptosis; Intercellular adhesion molecule-1; *Suxiao Jiuxin* pill; Rats, Sprague-Dawley

冠心病属于临床常见心脏疾病,近年来冠心病发病率逐年升高,发病年龄逐渐趋向于年轻化^[1]。冠心病病人病情加重可发展为心肌梗死、脑卒中等不良心血管疾病,其中心肌细胞凋亡在冠心病的发生、发展中发挥重要作用^[2]。缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)属于缺氧反应重要调节因子,广泛参与细胞促凋亡或抗凋亡过程,近期研究发现HIF-1 α 可介导心肌细胞凋亡,Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(BNIP3)由HIF-1 α 诱导表达,同时也是心肌细胞重要的促凋亡蛋白因子^[3]。基于对冠心病心肌细胞凋亡的认知,HIF-1 α /BNIP3可能成为冠心病的治疗新靶点。速效救心丸由川芎、冰片、麝香、蟾酥等中药组成,可增加冠脉血流量,在治疗冠心病心绞痛方面效果较好,然而其具体药理机制目前尚不明确^[4]。本研究于2018年8月至2019年2月通过复制冠心病模型大鼠,给予速效救心丸治疗,旨在探究其药理机制,试图为速效救心丸的临床应用提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级别SD大鼠70只,雄性,购于河南省实验动物中心[使用许可证号:SYXK(豫)2018-0006],8周龄,体质量 $(223.54 \pm 15.37) \text{g}$ 。

1.2 实验药物 速效救心丸购于天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂,批号为180325;使用时将药丸用研钵研磨成细粉状,用双蒸水进行溶解,使其最终浓度为 1.28g/L ^[5]。HIF-1 α 激活剂奥替普拉(Oltipraz)购于美国Selleck Chemicals,货号为64224-21-1。

1.3 试剂与仪器 三酰甘油(批号180312)、总胆固醇(批号180328)、高密度脂蛋白(HDL)(批号

180411)、低密度脂蛋白(LDL)(批号180409)检测试剂盒购于南京建成生物工程公司,一氧化氮检测试剂盒[批号JK-(a)-2328]购于上海晶抗生物工程有限公司;内皮素-1(ET-1)(批号E06979r)、前列环素I2(PGI2)(批号E13706r)检测试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司;大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒(批号PT520)、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号C0105)、TUNEL染色试剂盒(批号C1088)均购于碧云天生物技术有限公司;单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)(批号180216A)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)(批号180308A)检测试剂盒购于美国R&D公司;RIPA裂解液(批号EX6020)购于金克隆(北京)生物技术有限公司;BCA检测试剂盒(批号23225)购于美国PIERCE公司;鼠抗HIF-1 α (批号36169)、BNIP3(批号44060)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)(批号5023)、 β -肌动蛋白(β -actin)(批号3700)购于美国CST公司;B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)(批号ab185002)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)(批号ab197202)、辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(批号ab205719)购于英国Abcam公司;酶标仪Synergy2购于美国Bio-Tek公司;自动生化检测仪MS-18购于澳普森公司;JVD-80垂直电泳仪购于IBI;伯乐ChemiDoc MP型凝胶成像仪购美国Bio-Rad公司;光学显微镜购于日本Olympus公司。

1.4 实验方法

1.4.1 模型制备 参考文献法^[6]复制冠心病大鼠,将大鼠分为健康组($n = 10$)以及模型组($n = 60$),模型组大鼠每日腹腔注射维生素D3,剂量为60万单位/kg,同时灌胃 10mL/kg 脂肪乳,连续造模12周。

造模结束前3 d,健康组大鼠腹腔注射1 mL/kg 0.9%氯化钠溶液,模型组大鼠腹腔注射30 U/kg垂体后叶素,间隔24 h注射1次,共注射3次,诱发冠状动脉痉挛,心电图检测以PR段为基线记录J点位移,当J点变化幅度超过0.1 mV视为发生心肌缺血。模型组最终40只大鼠造模成功,造模成功率为66.67%。

1.4.2 动物给药与分组 造模结束后,将40只模型大鼠分为单纯模型组、速效救心丸组、奥替普拉组、速效救心丸+奥替普拉组,每组10只大鼠。速效救心丸组:造模结束后,灌胃速效救心丸水溶液,剂量为1.28 g/kg,单纯模型组:每日灌胃等量双蒸水;奥替普拉组:造模结束后,灌胃奥替普拉,剂量为0.5 g/kg;速效救心丸+奥替普拉组:造模结束后,首先灌胃0.5 g/kg奥替普拉,15 min后灌胃1.28 g/kg速效救心丸水溶液。各组连续处理2周。

1.4.3 心电图检测 末次给药结束后,所有大鼠采用心电监测仪记录标准II导联心电图变化。

1.4.4 大鼠血清中血脂相关水平检测 采集大鼠尾静脉血1 mL,3 000 g离心5 min分离血清,参照试剂盒说明书对血清总胆固醇、三酰甘油、HDL、LDL水平进行检测。

1.4.5 血清TNF- α 、MCP-1、ICAM-1水平检测 采用酶联免疫吸附试验检测血清中TNF- α 、MCP-1、ICAM-1含量,严格按照实试剂盒说明书进行操作。

1.4.6 血清一氧化氮、ET-1、PGI2水平检测 血清一氧化氮水平测定采用硝酸还原酶法检测,ET-1、PGI2水平采用酶联免疫吸附试验检测,依据试剂盒说明书进行测定。

1.4.7 HE染色观察大鼠心肌组织病理形态学变化 尾静脉血采集后将大鼠处死,获取心肌组织,置于4%多聚甲醛中过夜固定,常规制备心肌组织石蜡切片,经脱蜡、梯度乙醇脱水后,采用HE染色试剂盒对切片进行染色,在光学显微镜下观察心肌组织形态学变化情况。

1.4.8 DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL法)检测心肌组织细胞凋亡情况 将心肌组织石蜡切片在二甲苯中脱蜡、无水乙醇脱水后,用蛋白酶K室温下孵育20 min,磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗后,添加TUNEL检测液,37℃避光孵育1 h,PBS清洗2次,并在PBS中悬浮,采用荧光显微镜下观察细胞染色情况,发射波长为515~565 nm。采用Image-J软件定量分析心肌细胞凋亡率,细胞凋亡率=绿色荧光细胞/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.4.9 蛋白质印迹法检测心肌组织HIF-1 α 、BNIP3、Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白表达 将大鼠心肌组织用

裂解液裂解后提取组织总蛋白,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离蛋白后转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)上,BSA封闭后,用HIF-1 α 、BNIP3、Bcl-2、Bax、caspase-3一抗孵育膜,4℃过夜后添加二抗(1:3 000)孵育膜,37℃反应1 h,采用发光试剂盒显色后,在凝胶成像仪内采集图片,采用Image-J软件对蛋白条带进行定量分析。

1.5 统计学方法 采用统计学软件SPSS 22.0进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两对比采用SNK-*q*检验,当 $P < 0.05$ 时,则差异有统计学意义。

2 结果

2.1 速效救心丸对大鼠心电图ST段的影响 与健康组相比,单纯模型组ST段、T波明显升高($P < 0.05$);速效救心丸组ST段、T波显著低于单纯模型组,奥替普拉组ST段、T波显著高于单纯模型组($P < 0.05$);速效救心丸+奥替普拉组ST段、T波显著低于奥替普拉组($P < 0.05$)。见表1。

表1 健康大鼠和冠心病大鼠心电图ST段比较/(mV, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ST段	T波
健康组	10	0.15 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.03
单纯模型组	10	0.36 $\pm$ 0.05 ^a	0.26 $\pm$ 0.05 ^a
速效救心丸组	10	0.23 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.15 $\pm$ 0.04 ^{ab}
速效救心丸+奥替普拉组	10	0.34 $\pm$ 0.06 ^{ac}	0.24 $\pm$ 0.05 ^{ac}
奥替普拉组	10	0.41 $\pm$ 0.05 ^{abcd}	0.35 $\pm$ 0.03 ^{abcd}
F值		47.331	60.536
P值		<0.001	<0.001

注:与健康组相比,^a $P < 0.05$;与单纯模型组相比,^b $P < 0.05$;与速效救心丸组相比,^c $P < 0.05$;与速效救心丸+奥替普拉组相比,^d $P < 0.05$

2.2 速效救心丸对大鼠血脂指标的影响 与健康组相比,单纯模型组三酰甘油、总胆固醇显著升高,HDL显著降低($P < 0.05$)。速效救心丸组三酰甘油、总胆固醇显著低于单纯模型组,HDL显著高于单纯模型组($P < 0.05$);奥替普拉组三酰甘油、总胆固醇显著高于单纯模型组,HDL显著低于单纯模型组($P < 0.05$)。速效救心丸+奥替普拉组三酰甘油、总胆固醇显著低于奥替普拉组,HDL显著高于奥替普拉组($P < 0.05$)。见表2。

2.3 速效救心丸对大鼠血清炎症因子的影响 与健康组相比,单纯模型组TNF- α 、MCP-1、ICAM-1显著升高($P < 0.05$)。速效救心丸组TNF- α 、MCP-1、ICAM-1显著低于单纯模型组;奥替普拉组TNF- α 、MCP-1、ICAM-1显著高于单纯模型组($P < 0.05$)。速效救心丸+奥替普拉组TNF- α 、MCP-1、ICAM-1显著低于奥替普拉组($P < 0.05$)。见表3。

表2 健康大鼠和冠心病大鼠血脂指标水平比较/(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	三酰甘油	总胆固醇	HDL	LDL
健康组	10	0.65±0.06	1.82±0.18	1.13±0.29	0.57±0.09
单纯模型组	10	1.08±0.14 ^a	3.24±0.35 ^a	0.59±0.05 ^a	0.64±0.10 ^a
速效救心丸组	10	0.85±0.07 ^{ab}	2.24±0.29 ^{ab}	0.92±0.06 ^{ab}	0.63±0.09 ^{ab}
速效救心丸+奥替普拉组	10	1.06±0.13 ^{ac}	3.16±0.37 ^{ac}	0.61±0.06 ^{ac}	0.62±0.13 ^{ac}
奥替普拉组	10	1.27±0.12 ^{abcd}	3.78±0.43 ^{abcd}	0.45±0.04 ^{abcd}	0.58±0.08 ^{abcd}
<i>F</i> 值		47.618	56.751	40.356	0.980
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: HDL为高密度脂蛋白, LDL为低密度脂蛋白。与健康组相比, ^a*P*<0.05; 与单纯模型组相比, ^b*P*<0.05; 与速效救心丸组相比, ^c*P*<0.05; 与速效救心丸+奥替普拉组相比, ^d*P*<0.05

表3 健康大鼠和冠心病大鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平比较/(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	MCP-1	ICAM-1
健康组	10	18.57±2.15	36.85±2.16	21.03±1.89
单纯模型组	10	38.27±1.36 ^a	83.78±4.35 ^a	58.58±3.41 ^a
速效救心丸组	10	24.69±1.53 ^{ab}	47.25±2.28 ^{ab}	35.48±1.26 ^{ab}
速效救心丸+奥替普拉组	10	35.23±1.65 ^{ac}	78.29±4.62 ^{ac}	53.82±2.17 ^{ac}
奥替普拉组	10	43.42±1.59 ^{abcd}	92.39±4.84 ^{abcd}	66.42±2.73 ^{abcd}
<i>F</i> 值		367.933	399.393	589.332
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与健康组相比, ^a*P*<0.05; 与单纯模型组相比, ^b*P*<0.05; 与速效救心丸组相比, ^c*P*<0.05; 与速效救心丸+奥替普拉组相比, ^d*P*<0.05 健康组

2.4 速效救心丸对大鼠血管内皮指标的影响 与健康组相比, 单纯模型组一氧化氮、PGI2水平显著降低, ET-1水平升高(*P*<0.05)。速效救心丸组一氧化氮、PGI2水平显著高于单纯模型组, ET-1水平显著低于单纯模型组; 奥替普拉组一氧化氮、PGI2水平显著低于单纯模型组, ET-1水平显著高于单纯模型组(*P*<0.05)。速效救心丸+奥替普拉组 ET-1水平显著低于奥替普拉组, 一氧化氮、PGI2水平显著高于奥替普拉组(*P*<0.05)。见表4。

2.5 HE染色观察大鼠心肌组织病理形态学变化 健康组大鼠心肌细胞排列整齐、紧密, 细胞质染色均匀, 细胞核形态正常, 心肌纤维排列整齐, 未发生炎症细胞浸润; 单纯模型组心肌细胞排列紊乱, 细胞质染色不均匀, 细胞肥大, 细胞核变形, 伴有大量炎症细胞浸润, 细胞间隙变宽, 心肌纤维排列紊乱, 心肌纤维萎缩。与单纯模型组相比, 奥替普拉组心肌组织病理损伤更为严重, 速效救心丸组心肌组织损伤明显得到缓解, 炎症细胞浸润程度减轻, 细胞形态部分恢复正常。见图1。

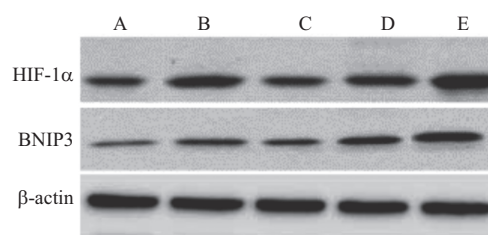
表4 健康大鼠和冠心病大鼠血清一氧化氮、内皮素-1(ET-1)、前列环素 I2(PGI2)水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	一氧化氮/ (μ mol/L)	ET-1/ (ng/L)	PGI2/ (ng/L)
健康组	10	42.68±2.66	4.32±0.87	152.52±10.69
单纯模型组	10	28.58±1.53 ^a	11.63±1.84 ^a	123.63±11.23 ^a
速效救心丸组	10	36.43±1.65 ^{ab}	7.18±1.57 ^{ab}	136.44±12.27 ^{ab}
速效救心丸+奥替普拉组	10	27.24±2.32 ^{ac}	11.24±1.73 ^{ac}	126.59±11.13 ^{ac}
奥替普拉组	10	23.52±1.84 ^{abcd}	12.76±1.45 ^{abcd}	125.32±10.84 ^{abcd}
<i>F</i> 值		143.176	53.811	212.847
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与健康组相比, ^a*P*<0.05; 与单纯模型组相比, ^b*P*<0.05; 与速效救心丸组相比, ^c*P*<0.05; 与速效救心丸+奥替普拉组相比, ^d*P*<0.05 健康组

2.6 速效救心丸对大鼠心肌组织细胞凋亡影响 与健康组(0.00±0.00)%相比, 单纯模型组心肌组织细胞凋亡率(46.72±4.37)%显著升高(*P*<0.05)。速效救心丸组细胞凋亡率(15.66±3.51)%显著低于单纯模型组; 奥替普拉组细胞凋亡率(62.88±8.35)%显著高于单纯模型组(*P*<0.05)。速效救心丸+奥替普拉组细胞凋亡率(42.76±5.16)%显著低于奥替普拉组(*F*=250.867, *P*<0.001)。见图2。

2.7 速效救心丸对大鼠心肌组织 HIF-1 α /BNIP3 通路蛋白表达的影响 与健康组相比, 单纯模型组心肌组织 HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达显著升高(*P*<0.05)。速效救心丸组 HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达显著低于单纯模型组; 奥替普拉组 HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达显著高于单纯模型组(*P*<0.05)。速效救心丸+奥替普拉组 HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达显著低于奥替普拉组(*P*<0.05)。见图3, 表5。



注: HIF-1 α 为缺氧诱导因子-1 α , BNIP3为Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3, β -actin为 β -肌动蛋白

图3 蛋白质印迹法检测健康大鼠和冠心病大鼠HIF-1 α 、BNIP3蛋白表达情况: A为健康组; B为单纯模型组; C为速效救心丸组; D为速效救心丸+奥替普拉组; E为奥替普拉组

2.8 速效救心丸对大鼠心肌组织凋亡蛋白表达的影响 与健康组相比, 单纯模型组Bcl-2蛋白表达显著降低, Bax、caspase-3蛋白表达升高(*P*<0.05)。速效救心丸组Bcl-2蛋白表达显著高于单纯模型组, Bax、caspase-3蛋白表达显著低于单纯模型组; 奥替

表5 健康大鼠和冠心病大鼠缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、Bcl2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(BNIP3)蛋白表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	HIF-1 α / β -actin	BNIP3/ β -actin
健康组	10	0.35 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.04
单纯模型组	10	1.12 $\pm$ 0.15 ^a	0.32 $\pm$ 0.03 ^a
速效救心丸组	10	0.49 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.26 $\pm$ 0.03 ^{ab}
速效救心丸+奥替普拉组	10	1.06 $\pm$ 0.17 ^{ac}	0.36 $\pm$ 0.04 ^{ac}
奥替普拉组	10	1.37 $\pm$ 0.26 ^{abcd}	0.46 $\pm$ 0.06 ^{abcd}
<i>F</i> 值		76.799	60.581
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: β -actin为 β -肌动蛋白。与健康组相比,^a P <0.05;与单纯模型组相比,^b P <0.05;与速效救心丸组相比,^c P <0.05;与速效救心丸+奥替普拉组相比,^d P <0.05健康组

普拉组 Bcl-2 蛋白表达显著低于单纯模型组, Bax、caspase-3 蛋白表达显著高于单纯模型组(P <0.05)。速效救心丸+奥替普拉组 Bcl-2 蛋白表达显著高于奥替普拉组, Bax、caspase-3 蛋白表达显著高于奥替普拉组(P <0.05)。见图4,表6。

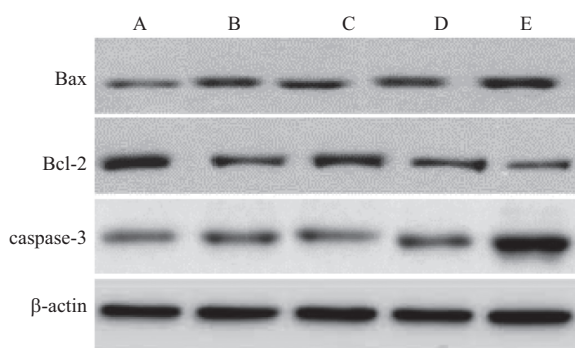


图4 蛋白质印迹法检测健康大鼠和冠心病大鼠Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达情况:A为健康组;B为单纯模型组;C为速效救心丸组;D为速效救心丸+奥替普拉组;E为奥替普拉组

表6 健康大鼠和冠心病大鼠心肌组织中Bcl-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)蛋白表达比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	caspase-3/ β -actin
健康组	10	0.21 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.03
单纯模型组	10	0.34 $\pm$ 0.03 ^a	0.36 $\pm$ 0.05 ^a	0.54 $\pm$ 0.05 ^a
速效救心丸组	10	0.28 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.68 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.42 $\pm$ 0.04 ^{ab}
速效救心丸+奥替普拉组	10	0.32 $\pm$ 0.06 ^{ac}	0.38 $\pm$ 0.06 ^{ac}	0.52 $\pm$ 0.06 ^{ac}
奥替普拉组	10	0.44 $\pm$ 0.05 ^{abcd}	0.25 $\pm$ 0.04 ^{abcd}	0.91 $\pm$ 0.09 ^{abcd}
<i>F</i> 值		32.072	183.488	153.144
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: β -actin为 β -肌动蛋白。与健康组相比,^a P <0.05;与单纯模型组相比,^b P <0.05;与速效救心丸组相比,^c P <0.05;与速效救心丸+奥替普拉组相比,^d P <0.05健康组

3 讨论

冠心病主要以脂质沉淀、炎症细胞浸润及纤维组织增生等为病理特征的慢性疾病,病人病情加重

可发展为心肌梗死,其中脂质代谢异常以及过度炎症反应贯穿于冠心病发展整个过程^[7]。本研究构建冠心病模型发现,大鼠ST段升高,血清中三酰甘油、总胆固醇水平明显升高,HDL降低,提示大鼠出现冠状动脉痉挛发生心肌缺血,且血脂水平代谢异常。TNF- α 可介导多种炎症反应,一定程度上可反映动脉粥样硬化程度^[8]。MCP-1可调控单核细胞与巨噬细胞迁移至斑块,造成斑块的不稳定性。炎症反应与内皮细胞功能损伤有关,内皮功能损伤后造成炎症因子水平升高^[9],本研究发现模型大鼠TNF- α 、MCP-1、ICAM-1、ET-1水平显著升高,一氧化氮、PGI2水平降低,提示大鼠存在炎症反应及内皮功能不全。组织学检测发现单纯模型组心肌细胞排列紊乱,细胞质染色不均匀,细胞肥大,细胞核变形,伴有大量炎症细胞浸润,细胞间隙变宽,心肌纤维排列紊乱,心肌纤维萎缩,表明模型大鼠发生严重心肌损伤、心肌炎症反应。以上均符合以往冠心病模型大鼠基本特征,提示模型复制成功。

速效救心丸中重要的中药成分为冰片、川芎,药理学研究显示川芎具有扩张冠状动脉,增加冠状动脉血流,改善心功能,抗氧化等功效;冰片具有消炎、镇痛,降低心肌耗氧量等功效^[10]。临床研究显示,速效救心丸对冠心病心血瘀阻证稳定型心绞痛具有一定的改善作用,同时降低机体炎症损伤^[11]。动物研究发现速效救心丸能够降低冠心病大鼠LDL,升高HDL,进而抑制动脉粥样硬化斑块的形成^[12]。本研究发现速效救心丸干预后可明显降低模型大鼠三酰甘油、总胆固醇、TNF- α 、MCP-1、ICAM-1、ET-1水平,升高HDL、一氧化氮、PGI2水平,组织学发现大鼠心肌组织损伤明显得到缓解,炎症细胞浸润程度减轻,心肌细胞形态部分恢复正常,提示速效救心丸可平衡冠心病大鼠血脂水平,减轻内皮功能损伤,缓解心肌组织损伤,关于其具体机制,目前尚不明确。

HIF-1 α 为缺氧反应的重要调控因子,常规氧状态下可通过泛素连接酶E3泛素化降低,维持细胞中较低水平的HIF-1 α ,低氧环境下则通过抑制E3水平的泛素进而上调细胞中HIF-1 α 水平。研究发现缺氧缺血状态下心肌细胞损伤与冠心病、心脏手术病人不良预后有关^[13]。基础研究显示下调HIF-1 α 表达可降低低氧条件诱导的心肌细胞凋亡。冠心病病人HIF-1 α 水平与病人心肌缺血程度有关,且HIF-1 α 可影响血清血管内皮生长因子(VEGF)水平。HIF-1 α 介导的细胞凋亡机制较复杂,目前多数认为HIF-1 α 可能通过上调促凋亡蛋白发挥对缺氧细胞的凋亡作用^[14]。BNIP3为Bcl-2家族BH3-only亚家族促凋亡蛋白,

BNIP3 为 HIF-1 α 的目的基因,基础研究发现在缺氧诱导的心肌细胞中,BNIP3 为 100 个缺氧诱导基因中上调表达最为显著的基因之一,提示其可能参与 HIF-1 α 介导的心肌细胞凋亡过程^[15]。本研究发现模型大鼠心肌组织中 HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达明显升高,心肌细胞凋亡率明显升高,进一步检测凋亡相关蛋白发现心肌组织中 Bax、caspase-3 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低;而经速效救心丸治疗后 HIF-1 α 、BNIP3 蛋白表达明显降低,心肌细胞凋亡率也降低,Bax、caspase-3 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高,推测速效救心丸诱导心肌凋亡的降低可能与其对 HIF-1 α /BNIP3 通路的抑制有关。为验证这一推测,本研究采用奥替普拉处理模型大鼠发现,经奥替普拉处理后,大鼠心肌组织学损伤更严重,且血脂、炎症因子水平均显著高于单纯模型组,心肌组织中 HIF-1 α 、BNIP3 表达水平以及心肌组织细胞凋亡率均明显高于单纯模型组,提示 HIF-1 α 过表达能够加重冠心病大鼠炎症反应,扰乱血脂平衡,并进一步破坏内皮功能,加重心肌损伤。进一步采用速效救心丸治疗奥替普拉处理的模型大鼠,则能够显著缓解心肌组织及内皮功能损伤,降低炎症反应,恢复血脂平衡,降低心肌细胞凋亡,提示速效救心丸能够通过抑制 HIF-1 α /BNIP3 通路的活化,调节冠心病的血脂水平、炎症反应,改善大鼠内皮功能损伤、心肌细胞凋亡。

综上所述,速效救心丸能够通过抑制 HIF-1 α /BNIP3 信号通路活化,减轻冠心病炎症反应、内皮损伤,调节血脂平衡,减少心肌组织细胞凋亡,从而发挥对冠心病大鼠的保护作用。速效救心丸的这一新发现可能为冠心病临床治疗提供新思路。然而冠心病的发生机制较复杂,速效救心丸是否可能通过 HIF-1 α /BNIP3 信号通路下游其它途径减轻心肌组织损伤,还有待后续深入研究。

(本文图 1,2 见插图 6-1)

参考文献

- [1] 毕颖斐,王贤良,赵志强,等.冠心病现代中医证候特征的临床流行病学调查[J].中医杂志,2017,58(23):2013-2019.
- [2] 杨戈,姜燕,李军,等.复方丹参滴丸干预冠心病血瘀证凋亡相关基因临床分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(20):153-157.
- [3] FENG CC, LIN CC, LAI YP, et al. Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1 α -IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP3 expression[J]. Growth Factors, 2016, 34(3/4):73-86.
- [4] 王巍巍,黄元升,卓琳,等.速效救心丸与消心痛治疗冠心病心绞痛效果比较的 Meta 分析[J].中国循证心血管医学杂志,2015,7(3):298-303.
- [5] 陈亚妮,高俊杰,朱文叶,等.速效救心丸干预心肌缺血/再灌注大鼠线粒体通透性转换孔及心肌细胞凋亡[J].中成药,2015,37(3):469-473.
- [6] 郑丽莉.芎归六君子汤对实验性大鼠冠心病的治疗作用[J].中国比较医学杂志,2018,28(1):23-27.
- [7] ARONOV DM, BUBNOVA MG, PEROVA NV, et al. The effect of maximal vs submaximal exertion on postprandial lipid levels in individuals with and without coronary heart disease[J]. J Clin Lipidol, 2017, 11(2):369-376.
- [8] ZHANG Y, YANG X, BIAN F, et al. TNF- α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells: crosstalk between NF- κ B and PPAR- γ [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 72(7):85-94.
- [9] WANG X, LIN Y, LUO N, et al. Short-term intensive atorvastatin therapy improves endothelial function partly via attenuating perivascular adipose tissue inflammation through 5-lipoxygenase pathway in hyperlipidemic rabbits[J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(16):2953-2959.
- [10] 王喆,宋德明,郑元喜,等.冠状动脉慢血流治疗的研究进展[J].安徽医药,2017,21(9):1566-1569.
- [11] 刘淑玲,蔡海荣,林黄果,等.速效救心丸联合穴位贴敷治疗心血瘀阻证稳定型心绞痛的疗效观察[J].时珍国医国药,2019,30(1):138-139.
- [12] 王莎莎,曲竹秋.速效救心丸对动脉粥样硬化大鼠血脂、主动脉形态及主动脉壁 ABCA1 表达的影响[J].天津中医药,2018,35(6):445-449.
- [13] GLAZACHEV O, KOPYLOV P, SUSTA D, et al. Adaptations following an intermittent hypoxia-hyperoxia training in coronary artery disease patients: a controlled study[J]. Clin Cardiol, 2017, 40(6):370-376.
- [14] 魏亚宁,李小芳,谭莉莉,等.晚期胃癌中缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子的表达与替吉奥联合多西紫杉醇化疗疗效的关系[J].安徽医药,2015,19(8):1602-1603.
- [15] GRAHAM RM, THOMPSON JW, WEBSTER KA. BNIP3 promotes calcium and calpain-dependent cell death[J]. Life Sci, 2015, 142(12):26-35.

(收稿日期:2019-08-06,修回日期:2019-09-09)