

引用本文:朱舜明,张荣怀,张学军,等.阿魏酸通过磷酸肌醇3激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶途径保护大鼠免受心肌缺血/再灌注损伤[J].安徽医药,2022,26(11):2203-2208.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.11.019.

◇ 药学研究 ◇



阿魏酸通过磷酸肌醇3激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶途径 保护大鼠免受心肌缺血/再灌注损伤

朱舜明¹,张荣怀¹,张学军¹,邴森²

作者单位:¹陕西省人民医院心内一科,陕西 西安 710068;

²西安市第三医院心内科,陕西 西安 710068

通信作者:邴森,男,副主任医师,研究方向为心血管内科疾病基础与临床,Email:bsdn008@163.com

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划(2018JM7114)

摘要: **目的** 研究阿魏酸对大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的保护作用及其可能的机制。**方法** 将雄性SD大鼠采用随机数字表法分为四组($n=12$):假手术组(Sham组),I/R模型组(I/R组);阿魏酸+I/R组(Fer+I/R组);阿魏酸+蛋白激酶抑制剂(LY294002)+I/R组(Fer+LY+I/R)。通过结扎左冠状动脉前降支30 min,然后再灌注2 h,建立I/R损伤大鼠模型。通过苏木精-伊红(HE)染色分析大鼠的左心室病理学变化,结合透射电子显微镜观察其超微结构;通过TUNEL/DAPI双重染色检测大鼠心肌细胞凋亡率。通过蛋白质印迹法(Western blotting)检测PI3K/Akt信号通路关键调控因子的蛋白表达水平[包括PI3K、p-Akt(Ser 473)、Akt、eNOS、p-eNOS(Ser1177)和p-mTOR(Ser2448)],以及血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)和IL-1 β 水平。**结果** HE染色结果显示,相较于假手术组,I/R组大鼠心肌中表现出明显的炎性细胞浸润、细胞膜损伤、细胞坏死和水肿;而Fer+I/R组大鼠表现心肌细胞坏死、炎性细胞浸润,细胞水肿均明显低于I/R组,并且心肌纤维结构清晰完整。TUNEL/DAPI双重染色结果显示,Fer+I/R组大鼠[(18.73 $\pm$ 1.01)%]心肌细胞凋亡率明显低于I/R组[(55.45 $\pm$ 1.14)%]($P<0.001$)。Western blotting检测结果表明,与I/R组相比,Fer+I/R组大鼠Cleaved caspase-3蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),PI3K、p-Akt、Akt、p-eNOS(Ser1177)和p-mTOR(Ser2448)蛋白表达明显上调($P<0.05$)。相较于I/R组,阿魏酸显著抑制MDA5、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达($P<0.05$),并上调SOD1蛋白表达水平($P<0.05$);而LY294002处理逆转了阿魏酸在I/R模型大鼠中对上述细胞因子的调控作用。**结论** 阿魏酸通过激活PI3K/Akt信号通路抑制心肌细胞凋亡,减轻炎症反应和氧化应激水平,保护大鼠免受缺血/再灌注诱导的心肌损伤。

关键词: 缺血再灌注; 阿魏酸; PI3K/AKT信号通路; 保护作用

Ferulic acid protects rats from myocardial ischemia/reperfusion injury via the phosphoinositide 3-kinase/serine/threonine protein kinase pathway

ZHU Shunming¹,ZHANG Ronghuai¹,ZHANG Xuejun¹,BING Sen²

Author Affiliation:¹Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China;

²Department of Cardiology, Xi'an No.3 Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect of ferulic acid on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats and its potential mechanism. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 4 groups ($n=12$): sham operation (sham) group, I/R group; ferulic acid+I/R (FER+I/R) group; and ferulic acid+LY294002 (protein kinase inhibitors)+I/R (FER+LY+I/R) group. A rat model of I/R injury was established by ligating the left anterior descending coronary artery for 30 min followed by reperfusion for 2 h. The pathological changes in the left ventricle of rats were analyzed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. The apoptosis rate of rat cardiomyocytes was detected by TUNEL/DAPI dual staining. Western blotting was used to detect the protein expression levels of key regulators of the PI3K/Akt signaling pathway, including PI3K, p-Akt (Ser473), Akt, eNOS, p-eNOS (Ser1177) and p-mTOR (Ser2448), and serum levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and IL-1 β . **Results** The results of HE staining showed that compared with the sham-operation group, the rats in the I/R group showed obvious inflammatory cell infiltration, cell membrane damage, cell necrosis and edema in the myocardium, while the rats in the Fer+I/R group showed myocardial cell necrosis, inflammatory cell infiltration and cell edema that were significantly lower than those in the I/R group, and the myocardial fiber structure was clear and complete. The results of TUNEL/DAPI dual staining showed that the apoptosis rate of cardiomyocytes in the Fer+I/R group was (18.73 $\pm$ 1.01)%, which was significantly lower than that in the I/R group (55.45 $\pm$ 1.14)% ($P<0.001$). Western blotting results showed that com-

pared with the I/R group, the expression level of cleaved caspase-3 protein in the Fer+I/R group was significantly decreased ($P < 0.05$), PI3K, p-Akt, Akt, p-eNOS (Ser1177) and p-mTOR (Ser2448) protein expression was significantly upregulated ($P < 0.05$). Compared with the I/R group, ferulic acid significantly inhibited the expression of MDA, TNF- α , IL-6 and IL-1 β ($P < 0.05$) and upregulated the expression level of SOD protein ($P < 0.05$). LY294002 treatment reversed the regulatory effect of ferulic acid on the aforementioned cytokines in I/R model rats. **Conclusion** Ferulic acid inhibited cardiomyocyte apoptosis by activating the PI3K/Akt signaling pathway, attenuated the level of the inflammatory response and oxidative stress, and protected rats from I/R-induced myocardial injury.

Key words: Ischemia-reperfusion; Ferulic acid; PI3K/Akt signaling pathway; Protective effect

急性心肌缺血后,通过药物或机械干预恢复病人冠状动脉血流(再灌注)对于挽救病人心肌功能至关重要^[1];但再灌注会引发病人机体局部氧化爆发和高水平炎症反应,进而引起心肌细胞损伤和细胞死亡,造成“再灌注损伤”^[2]。改善急性心肌梗死的临床结局,探索减轻缺血-再灌注(Ischemia/Reperfusion, I/R)损伤的新型治疗药物,对于该病的临床诊断和治疗至关重要^[3]。

阿魏酸(Ferulic acid)是一种广泛存在的酚类化合物,在诸如坚果、西红柿和当归(*Angelica sinensis*)等植物中均有发现,其对多种疾病具有良好的治疗活性^[2]。阿魏酸能够通过抑制环氧合酶(COX-2)、前列腺素 E2(PGE2)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)改善血管内皮功能^[4]。此外,阿魏酸通过降低活性氧(ROS)水平,进而预防慢性炎症性疾病^[5]。但对阿魏酸在心肌 I/R 所致细胞损伤中的作用目前仍未引起足够关注。

凋亡是程序性细胞死亡的主要类型,与 I/R 损伤紧密相关^[6-7]。胱天蛋白酶(caspase)是介导程序性细胞死亡信号级联反应的关键因子,其中 caspase-3 被认为是重要的凋亡启动子^[8]。尽管已证实磷酸肌醇 3 激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Phosphoinositide 3-kinase/serine/threonine protein kinase, PI3K/Akt)途径调控着细胞增殖、分化和凋亡^[9],但其在阿魏酸发挥神经保护作用中的分子机制还有待研究。

本研究自 2018 年 10 月至 2019 年 7 月通过结扎大鼠左冠状动脉前降支法构建心肌缺血再灌注大鼠模型,探究阿魏酸和 PI3K/Akt 的作用关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和实验动物 阿魏酸和 LY294002 购于美国 Sigma Chemical 公司。PI3K 和 Akt 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购于美国 Cusabio Biotech 公司。末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP-生物素缺口末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒购于德国 Roche Diagnostics 公司。抗 MDA5、SOD1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、Caspase-3、Cleaved caspase-3、PI3K、p-Akt(Ser473)、Akt、eNOS、p-eNOS(Ser1177)、p-mTOR(Ser2448)和 β -actin 蛋白一抗购于美国 Cell Signal-

ing Technology 公司。BCA 蛋白定量分析试剂盒和二抗购于中国 Beyotime Biotechnology 公司。其余试剂均为分析纯。雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(200 ~ 220 g)由陕西省人民医院[SYXK(陕)2016-006]提供。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 所有实验大鼠均可自由进食和饮水,饲养温度 22 ~ 24 °C,湿度 50% ~ 60%,12 h 明暗循环。48 只大鼠采用随机数字表法分为 4 组($n=12$):(1)假手术组(sham 组);(2)I/R 模型组(I/R 组);(3)阿魏酸+I/R 组(Fer+I/R 组);(4)阿魏酸+LY294002+I/R 组(Fer+LY+I/R 组)。

1.2.2 I/R 大鼠模型建立及给药处理 通过腹膜内注射戊巴比妥钠(45 mg/kg),待大鼠完全麻醉后,仰卧位固定。再分别接入动物呼吸机以及心电监护仪,于大鼠胸部左侧第 5 根肋骨处纵向切开,钝性分离肌肉组织,暴露胸腔。剪开心包膜后,用 6-0 丝线将冠状动脉左前降支(LAD)结扎。当监护仪指标显示脉搏减弱、左心室心肌颜色发白,并且其心电图的 ST 段显著抬高,表示结扎成功。结扎 30 min 后持续对大鼠灌注 3 h,当 ST 段出现 50% 以上回落,则判定为 I/R 大鼠模型建立成功。

假手术组大鼠仅打开胸腔,不结扎。在 I/R 建模 30 min 前,假手术组和 I/R 组按 100 mg/kg 腹膜注射 0.9% 氯化钠注射液, Fer+I/R 组大鼠腹膜内注射阿魏酸(10 mg/kg)。Fer + LY + I/R 组大鼠在 I/R 建模 30 min 前腹膜内注射阿魏酸(10 mg/kg),再于麻醉后, LAD 结扎前,通过尾静脉注射 LY294002(0.3 mg/kg)。

1.2.3 HE 染色 脊椎脱臼法处死大鼠后,暴露胸腔后取出心脏,使用预冷生理盐水清洗,去除大血管及结缔组织,用滤纸拭干。再将大鼠左心室心肌用 4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,横向切成 4 μ m 厚切片,并用苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜(IX51, Olympus, 日本)下观察。病变程度量化:(-)无病变; (+)局部病变; (++)零星散布病变; (+++)融合性病变; (++++)大量块状病变。

1.2.4 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 各组大鼠心脏组织经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,使用

商业试剂盒(Roche)进行TUNEL测定,以评估不同组大鼠心肌细胞凋亡程度。Fluorescein-dUTP着色为凋亡细胞数,呈绿色;4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)着色为总细胞数,呈蓝色。为确定心肌细胞凋亡程度,每组随机选择6个视野($\times 200$),使用Image Pro Plus 6.0计算细胞凋亡指数(apoptotic index, AI), AI=凋亡细胞数/总细胞数。

1.2.5 心肌超微结构观察 分离大鼠心脏组织,先用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)清洗,再于4℃磷酸盐缓冲液中用1%四氧化锇固定2 h。使用Araldite CY212包埋后,通过超薄切片机(Ultracut E, Reichert, 奥地利)制备70~80 nm超薄切片。再用乙酸铀酰和乙酸铅染色,在透射电子显微镜(Morgagni 268D, FeiCo, 荷兰)下观察记录各组心肌细胞形态轮廓,线粒体和细胞核结构,以及闰盘Z线变化情况。

1.2.6 ELISA检测 按照试剂盒说明书要求,使用PI3K和Akt ELISA试剂盒检测各组大鼠心肌组织中PI3K和Akt表达水平。

1.2.7 蛋白质印迹法(Western blotting) 处死大鼠后开胸取出心脏,称取约200 mg心脏组织,剪碎并用磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.4)清洗。再加入预冷RIPA裂解缓冲液提取总蛋白;裂解液在4℃、12 000 r/min离心5 min。使用BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白质浓度。将等量的蛋白样品通过SDS-PAGE电泳分离,再转移到PVDF膜。将膜与5%脱脂牛奶在Tris缓冲液中4℃孵育过夜封闭。封闭膜后,再与抗MDA5、SOD1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、Caspase-3、Cleaved caspase-3、PI3K、p-Akt (Ser 473)、Akt、eNOS、p-eNOS (Ser1177)、p-mTOR (Ser2448)和 β -actin一抗孵育过夜。用TBST洗涤3次,再与辣根过氧化物酶偶联的IgG室温孵育1 h。使用ECL-PUS系统检查蛋白质表达水平变化情况。通过Image Pro Plus 6.0软件进行灰度分析。

1.3 统计学方法 所有计量数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,使用SPSS 16.0软件进行数据分析;多组数据比较采用单因素方差分析,多组间两两比较SNK-*q*法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿魏酸干预明显减轻I/R大鼠心脏组织病理学变化 通过苏木精-伊红染色对I/R诱导损伤和阿魏酸干预对大鼠心脏组织损害程度进行分析。染色结果显示,相较于假手术组,I/R组大鼠心肌中表现出明显的炎性细胞浸润、细胞膜损伤、细胞坏死和水肿。在Fer+I/R组大鼠中,心肌细胞坏死、炎性细胞浸润,及细胞水肿病变均明显低于I/R组,且心肌

纤维结构更清晰完整(图1和表1)。

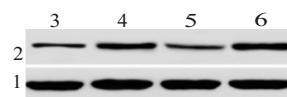
表1 不同实验组大鼠心肌组织病理学分级

组别	鼠数	坏死	水肿	炎症
假手术组	12	—	—	—
I/R组	12	+++	+++	++++
Fer+I/R组	12	—	—	+

注:—为无病变,+为局部病变,++为零星散布病变,+++为融合性病变,++++为大量块状病变。

2.2 阿魏酸干预抑制I/R大鼠心肌细胞凋亡 TUNEL/DAPI双重染色结果显示,I/R组[(55.45 $\pm$ 1.14)%]大鼠存在严重的心肌组织损伤,Fer+I/R组[(18.73 $\pm$ 1.01)%]大鼠TUNEL阳性心肌细胞百分比明显低于I/R组($P < 0.001$);Fer+LY+I/R组[(46.81 $\pm$ 1.56)%]凋亡指数明显高于Fer+I/R组($P < 0.01$)(图2)。

Western blotting分析结果表明,与I/R组(3.98 $\pm$ 0.28)相比,Fer+I/R组(2.01 $\pm$ 0.14)大鼠活性Cleaved caspase-3蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),而Fer+LY+I/R组(3.76 $\pm$ 0.25)大鼠Cleaved caspase-3蛋白表达高于Fer+I/R组($P < 0.05$)(图3)。



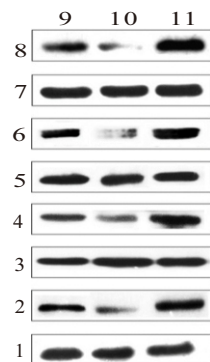
注:1— β -actin;2—Cleaved caspase-3;3—假手术组;4—I/R组;5—Fer+I/R组;6—Fer+LY+I/R组。

图3 阿魏酸显著抑制I/R诱导大鼠心肌细胞凋亡的Cleaved caspase-3免疫印迹结果

2.3 阿魏酸干预显著激活PI3K/Akt信号通路 心肌组织PI3K和Akt蛋白ELISA检测结果显示,I/R组[PI3K: (14.58 $\pm$ 0.96) ng/L; Akt: (0.27 $\pm$ 0.07) μ g/L]大鼠心肌组织中PI3K和Akt蛋白表达水平均低于假手术组[PI3K: (21.32 $\pm$ 1.26) ng/L; Akt: (0.38 $\pm$ 0.08) μ g/L]; Fer+I/R组[PI3K: (27.52 $\pm$ 2.73) ng/L; Akt: (0.72 $\pm$ 0.15) μ g/L]大鼠PI3K和Akt蛋白表达水平均明显高于I/R组($P < 0.05$)。

PI3K/Akt信号通路各蛋白Western blotting检测结果显示,与假手术组相比,I/R组大鼠PI3K、p-Akt和Akt蛋白表达水平明显下调,PI3K/Akt信号通路下游靶标p-eNOS (Ser1177)和p-mTOR (Ser2448)蛋白表达水平也明显低于假手术组($P < 0.05$);而Fer+I/R组上述蛋白表达水平均高于I/R组($P < 0.05$)(图4和表2)。

2.4 阿魏酸干预可保护I/R损伤后大鼠心肌结构完整性 TEM心肌超微结构分析结果显示,与假手术组相比,I/R组大鼠出现明显肌原纤维变性、线粒体



注:1—mTOR;2—p-mTOR;3—eNOS;4—p-eNOS;5—Akt;6—p-Akt;7—β-actin;8—PI3K;9—假手术组;10—I/R组;11—Fer+I/R组。

图4 PI3K/Akt信号通路相关蛋白的蛋白质印迹检测

表2 PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达水平

组别	PI3K/β-actin	p-Akt/Akt	p-eNOS/eNOS	p-mTOR/mTOR
假手术组	0.48±0.13	1.23±0.14	0.49±0.07	0.53±0.07
I/R组	0.19±0.07 ^①	0.54±0.08 ^①	0.36±0.09 ^①	0.33±0.04 ^①
Fer+I/R组	1.21±0.17 ^{①②}	1.38±0.18 ^{①②}	0.90±0.13 ^{①②}	1.35±0.16 ^{①②}
F值	201.56	123.34	113.32	317.31
P值	<0.001	<0.05	<0.001	<0.001

注:①与假手术组比较, $P<0.05$ 。②与I/R组比较, $P<0.01$ 。

肿胀、不规则线粒,以及心肌细胞闰盘Z线扭曲。在Fer+I/R组大鼠中,心肌细胞核及其线粒体结构均保持完整,没有明显的肌原纤维变性,与假手术组大鼠心肌组织结构相近。而Fer+LY+I/R组大鼠心肌组织细胞排列紊乱,有明显心肌纤维断裂,细胞变性坏死严重,其心肌超微结构病变与I/R组相似(图5)。

2.5 阿魏酸干预抑制I/R大鼠氧化应激和炎症反应 Western blotting分析结果显示,与假手术组相比,I/R组大鼠MDA5蛋白表达水平,促炎细胞因子TNF-α、IL-6和IL-1β蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),SOD1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与I/R组相比,Fer+I/R组大鼠MDA5、TNF-α、IL-6和IL-1β蛋白表达水平均显著下调($P<0.05$),SOD1蛋白表达水平明显上调($P<0.05$)。而与Fer+I/R组相比,Fer+LY+I/R组大鼠SOD1含量明显下调,MDA5、

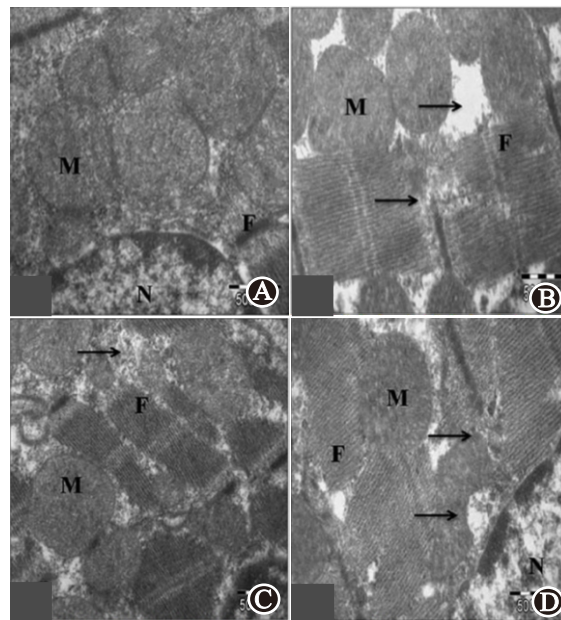
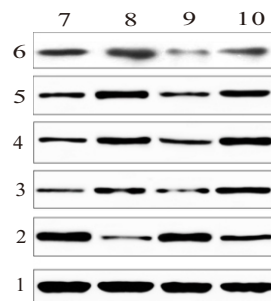


图5 阿魏酸显著改善I/R大鼠心肌超微结构:A为假手术组;B为I/R组;C为Fer+I/R组;D为Fer+LY+I/R组。

注:M为线粒体;N为细胞核;F为肌原纤维;箭头(→)表示肌原纤维结构变性。

TNF-α、IL-6和IL-1β蛋白表达水平显著上调($P<0.05$)(图6和表3)。



注:1—β-actin;2—SOD1;3—IL-1β;4—IL-6;5—TNF-α;6—MDA5;7—假手术组;8—I/R组;9—Fer+I/R组;10—Fer+LY+I/R组。

图6 阿魏酸显著抑制I/R大鼠氧化应激和炎症反应水平

3 讨论

I/R是一个复杂的病理生理过程,涉及细胞凋亡、炎症反应和氧化应激调控^[10]。研究显示诱导I/R后,大鼠心肌细胞损伤明显,出现典型的细胞凋亡表型^[11];与永久性缺血大鼠相比,再灌注大鼠心肌

表3 I/R大鼠氧化应激和炎症反应相关蛋白的表达水平

组别	鼠数	SOD1/β-actin	MDA5/β-actin	TNF-α/β-actin	IL-6/β-actin	IL-1β/β-actin
假手术组	12	0.50±0.14	0.22±0.03	0.53±0.09	0.33±0.07	0.15±0.02
I/R组	12	0.20±0.04 ^①	0.45±0.12 ^①	1.22±0.20 ^①	1.30±0.18 ^①	0.52±0.12 ^①
Fer+I/R组	12	0.41±0.09 ^{①②}	0.31±0.07 ^{①②}	0.37±0.04 ^{①②}	0.24±0.03 ^{①②}	0.26±0.06 ^{①②}
Fer+LY+I/R组	12	0.28±0.07 ^{①③}	0.41±0.08 ^{①③}	1.15±0.09 ^{①③}	0.78±0.09 ^{①③}	0.48±0.06 ^{①③}
F值		26.19	20.54	159.20	253.19	49.09
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与假手术组比较, $P<0.05$ 。②与I/R组比较, $P<0.01$ 。③与Fer+I/R组比较, $P<0.05$ 。

细胞凋亡率也显著增加^[12]。

I/R 可能激活 caspase 凋亡蛋白级联反应。其中, caspase-3 是细胞凋亡的重要调控因子, 活性 caspase-3 直接参与诱导蛋白质、酶和 DNA 等生物活性大分子降解。紫草素(Shikonin)和褪黑素(Melatonin)通过下调 caspase-3 表达, 抑制内质网应激诱导的心肌细胞凋亡, 明显缓解 I/R 模型动物心肌损伤^[13-14]。本研究 TUNEL/DAPI 双重染色及 Western blotting 实验结果显示, 假手术组大鼠未检测到心肌组织 caspase-3 过度激活; 阿魏酸干预能显著下调 I/R 大鼠活性 caspase-3 蛋白表达水平, 抑制心肌细胞凋亡, 以减轻 I/R 大鼠再灌注期间心肌组织病理损伤。这表明, 抑制 I/R 后心肌细胞凋亡是阿魏酸损伤发挥心脏保护作用的机制之一。

心肌再灌注期间通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 降低氧化应激, 抑制炎症级联反应以及抑制心肌细胞凋亡, 可以明显降低 I/R 损伤的发病率和死亡率^[15-16]。受 PI3K 调控的 Akt 在 Ser473 位点磷酸化后激活^[17], 产生 p-Akt, 进一步刺激下游效应靶标, 如 eNOS、mTOR、NF- κ B、Bcl-2 蛋白家族和 caspase 蛋白家族^[18], 调节细胞凋亡和细胞转录活性, 以提高心肌细胞存活率^[9]。其中, eNOS 磷酸化及其产生的 NO 在 Akt 介导的抗凋亡作用中发挥着关键作用^[19]。因此, 本研究研究了阿魏酸干预对 PI3K/Akt 信号通路关键调控蛋白表达的影响。免疫组化和蛋白质印迹检测结果显示, eNOS 磷酸化水平增加与 PI3K 蛋白上调和 Akt 磷酸化同时发生。LY294002 是一种特异性阻断 PI3K 细胞信号传导通路的蛋白激酶抑制剂^[20], 结合 TEM 心肌超微结构分析, 发现 Fer+I/R 组大鼠心肌细胞核及其线粒体结构均保持完整; 而阿魏酸+LY294002 组观察到明显肌原纤维变性、线粒体结构不规则, 以及 Z 线扭曲。LY294002 处理逆转了阿魏酸对 I/R 大鼠心肌细胞的保护作用。上述结果表明, 阿魏酸通过激活 PI3K/Akt/eNOS 途径保护 I/R 大鼠心脏免受 I/R 诱导损伤。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是一种重要的抗氧化金属酶, 通过调控胞内活性氧水平, 在信号转导和物质代谢过程中发挥着重要作用^[21]。细胞氧化应激失衡导致丙二醛(malondialdehyde, MDA)不断积累, 对线粒体和溶酶体造成不可逆损伤^[22]。IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等分泌型炎症调控因子表达水平失衡会明显加剧 I/R 病理发展^[23]。本文实验结果显示, 阿魏酸明显抑制 I/R 大鼠 MDA5、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 蛋白质表达, 并上调 SOD1 蛋白水平。这表明阿魏酸对 I/R 大鼠发挥心脏保护作用与其抗炎和抗氧化特性有关。

本研究也存在一定局限性。首先, 尽管选择使用 LY294002 阻断 PI3K/Akt 信号通路, 但关于 LY294002 是否对心肌组织存在影响并没有做详细的研究。在后续研究中, 我们也将以大鼠为动物模型, 进一步分析 LY294002 对大鼠心肌组织的作用, 以期能够更为全面地解析阿魏酸对 PI3K/Akt 途径与大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响关系。其次, 本文结果仍需要结合临床研究数据做进一步佐证。

综上, 阿魏酸干预可有效预防 I/R 大鼠心肌损伤。阿魏酸通过激活 PI3K/AKT 信号通路, 减少心肌细胞凋亡, 抑制炎症反应和氧化应激水平, 以缓解 I/R 诱导心肌损伤。在未来, 阿魏酸有望为临床预防 I/R 心肌损伤提供新的思路。

(本文图 1, 2 见插图 11-1)

参考文献

- [1] 刘麟文, 姚俊岩. 神经系统缺血再灌注损伤保护措施的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(4): 723-728.
- [2] 张国治, 杨徐宁, 许柠. 阿魏酸的功能性研究进展[J]. 粮食加工, 2019, 44(6): 52-56.
- [3] 郝霏霏. 九藤总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠 pi3k/akt 信号通路的调控作用及机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2016.
- [4] 王立霞, 王枫, 陈欣, 等. 阿魏酸钠的心脑血管药理作用研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(3): 772-777.
- [5] 魏宏儒. 阿魏酸对脑微血管内皮细胞氧化损伤的保护作用[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [6] 陈雅岚, 孟涛, 马骞, 等. 丁苯酞对小鼠脑缺血再灌注损伤保护作用及对 MMP-9、TIMP-1 及 Caspase-3 表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(3): 250-254.
- [7] 邹海波, 施鹏, 孙晓峰. 大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤时姜黄素后处理对肝细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(14): 2211-2216.
- [8] 苏胜有. Caspase 家族与神经细胞凋亡的研究进展[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2019, 19(80): 76-77. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2019.80.034.
- [9] 洗展超, 王丽丽, 曾繁芳, 等. 缺血后处理对心肌缺血再灌注大鼠心肌功能和 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(20): 2164-2168.
- [10] 夏凡. 右美托咪定预处理通过胆碱能抗炎通路减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [11] 夏君彦, 李冬. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(21): 3329-3334.
- [12] 宋艳玲, 麦华德, 林芸芸, 等. 山莨菪碱对心肌缺血再灌注大鼠氧化应激、心肌损伤及线粒体凋亡通路的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(24): 2958-2963.
- [13] 白文伟, 杨华, 刘小永, 等. 紫草素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(16): 1944-1950.
- [14] ZHAI M, LI BY, DUAN WX, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through sirt3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis[J/OL]. Journal of pineal research, 2017, 63(2): e12419. DOI: 10.1111/jpi.12419.
- [15] 叶楨干, 王雪静. 血根碱通过 PI3K/AKT 信号通路减轻心肌缺血再

- 灌注损伤[J].河南科技大学学报(医学版),2019,37(1):18-21.
- [16] ZHANG CX, PAN S, AISHA A, et al. Recombinant human brain natriuretic peptide regulates pi3k/akt/mtor pathway through lncrna egot to attenuate hypoxia-induced injury in h9c2 cardiomyocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(3): 1186-1193.
- [17] XING XW, GUO S, ZHANG GH, et al. Mir-26a-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J/OL]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(3): e9106. DOI: 10.1590/1414-431X20199106.
- [18] 聂阳, 丁立, 黄海潮, 等. PI3K/Akt-eNOS 信号通路在甘木通总黄酮后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(23): 4692-4697.
- [19] LUO R, CHEN XP, MA HH, et al. Myocardial caspase-3 and NF- κ B activation promotes calpain-induced septal apoptosis: the role of Akt/eNOS/NO pathway[J]. Life Sciences, 2019, 222: 195-202.
- [20] PENG XC, ZHOU JR, LI B, et al. Notch1 and PI3K/Akt signaling blockers dapt and ly294002 coordinately inhibit metastasis of gastric cancer through mutual enhancement [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85(2): 309-320.
- [21] 袁峰, 孙凯, 杨鹏举. 右美托咪定对心肌缺血大鼠超氧化物歧化酶、丙二醛及髓过氧化物酶的影响[J]. 安徽医药, 2017, 21(11): 1983-1986.
- [22] WANG W, ZHANG LY, BATTIPROLU PK, et al. Malonyl CoA decarboxylase inhibition improves cardiac function post-myocardial infarction[J]. JACC Basic to translational science, 2019, 4(3): 385-400.
- [23] 赵位昆. 不同剂量 6-姜酚对心肌缺血再灌注损伤炎症反应的影响[D]. 桂林: 桂林医学院, 2019.
- (收稿日期: 2020-03-30, 修回日期: 2020-05-09)

引用本文: 李霞, 李慧, 许聪聪, 等. 肉灵芝提取物调控长链非编码 RNA BRCA1 相邻基因 2/双特异性磷酸酶 4/细胞外信号调节激酶通路对肝癌细胞 Hep3B 增殖及凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(11): 2208-2212. DOI: 10.3969/j.

issn.1009-6469.2022.11.020.

◇ 药学研究 ◇



肉灵芝提取物调控长链非编码 RNA BRCA1 相邻基因 2/ 双特异性磷酸酶 4/细胞外信号调节激酶通路 对肝癌细胞 Hep3B 增殖及凋亡的影响

李霞¹, 李慧², 许聪聪², 李军峰³, 张冬冬²

作者单位: ¹枣庄矿业集团中心医院肿瘤内科, 山东 枣庄 277800;

²枣庄矿业集团枣庄医院肿瘤科, 山东 枣庄 277800;

³枣庄市薛城区人民医院肿瘤科, 山东 枣庄 277800

摘要: 目的 探讨肉灵芝提取物是否可通过长链非编码 RNA BRCA1 相邻基因 2(LncRNA NBR2)/双特异性磷酸酶 4/细胞外信号调节激酶(DUSP4/ERK)通路而影响肝癌 HepB 细胞增殖及凋亡。方法 体外培养肝癌 HepB 细胞, 分为 1 mg/L 肉灵芝提取物组、2 mg/L 肉灵芝提取物组、4 mg/L 肉灵芝提取物组、si-NC 组、si-LncRNA NBR2 组、pcDNA-NC 组、pcDNA-LncRNA NBR2 组、肉灵芝提取物+si-NC 组、肉灵芝提取物+si-LncRNA NBR2 组; 采用 MTT 检测肝癌 HepB 细胞增殖; 流式细胞术检测肝癌 HepB 细胞凋亡; RT-qPCR 检测 LncRNA NBR2 的表达量; 蛋白质印迹法(Western blotting)检测增殖细胞核抗原(PCNA)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Cleaved-caspase-3)、DUSP4、p-ERK 蛋白表达量。结果 肉灵芝提取物可明显降低肝癌 HepB 细胞增殖率与 PCNA、DUSP4、p-ERK 蛋白水平($P < 0.05$), 提高肝癌 HepB 细胞凋亡率、Cleaved-caspase-3 蛋白水平及 LncRNA NBR2 的表达水平($P < 0.05$); 转染 si-LncRNA NBR2 后可明显提高肝癌 HepB 细胞增殖率及 PCNA、DUSP4、p-ERK 蛋白水平($P < 0.05$), 降低凋亡率及 Cleaved-caspase-3 蛋白水平($P < 0.05$), 而转染 pcDNA-NBR2 可明显减弱转染 si-LncRNA NBR2 对肝癌 HepB 细胞增殖及凋亡的作用; 与肉灵芝提取物+si-NC 组比较, 肉灵芝提取物+si-LncRNA NBR2 组肝癌 HepB 细胞增殖率及 PCNA、DUSP4、p-ERK 蛋白水平升高($P < 0.05$), 凋亡率及 Cleaved-caspase-3 蛋白水平降低($P < 0.05$)。结论 肉灵芝提取物可通过上调 LncRNA NBR2 的表达而抑制 DUSP4/ERK 信号通路的活化从而抑制肝癌 HepB 细胞增殖及诱导细胞凋亡。

关键词: 肉灵芝提取物; 长链非编码 RNA; BRCA1 相邻基因 2; DUSP4/ERK; 肝癌

Effects of Ganoderma lucidum extract on the proliferation and apoptosis of Hep3B hepatocellular carcinoma cells by regulating the lncRNA NBR2/DUSP4/ERK pathway

LI Xia¹, LI Hui², XU Congcong², LI Junfeng³, ZHANG Dongdong²

Author Affiliations: ¹Department of Oncology, Central Hospital of Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong 277800, China; ²Department of Oncology, Zaozhuang Hospital, Zaozhuang Mining Group, Zaozhuang, Shandong 277800, China; ³Department of Oncology, People's Hospital of Xuecheng District, Zaozhuang, Shandong 277800, China