

柴松波,王振涛,张淑娟,等. 丹参酮 II A 对扩张型心肌病大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 57 - 64.

Chai SB, Wang ZT, Zhang SJ, et al. Effects of tanshinone II A on cardiomyocyte apoptosis and PI3K/Akt signaling in rats with dilated cardiomyopathy [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(6): 57 - 64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.06.010

丹参酮 II A 对扩张型心肌病大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响

柴松波, 王振涛, 张淑娟, 刘舜禹

(河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院心病科, 郑州 450002)

【摘要】 目的 探究丹参酮 II A(STS)对扩张型心肌病(DCM)大鼠心肌细胞凋亡的改善作用以及可能的作用机制。**方法** 制备 DCM 大鼠,随机数字表法分为 DCM 组、STS-L、STS-M、STS-H、卡维地洛组(CAR),另设置对照组,每组均 12 只大鼠,超声检测左心室收缩末期内径(LVIDs)和左心室舒张末期内径(LVIDd)、左心室射血分数(LVEF),HE、Masson 染色观察心肌组织病理损伤情况;ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)水平;TUNEL 染色法检测大鼠心肌细胞凋亡情况;免疫印迹(WB)、免疫组化法检测心肌组织中 p-磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、p-蛋白激酶 B(Akt)、Bax、caspase-3、Bcl-2 表达。**结果** 与对照组相比,DCM 组 LVIDs、LVIDd 增大,LVEF 降低,心肌组织病理学评分、心肌胶原纤维比例均升高,血清 TNF- α 、IL-6 水平升高,心肌细胞 AI 升高($P<0.05$);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组 LVIDs、LVIDd 降低,LVEF 提高,心肌组织病理学评分、心肌胶原纤维比例均降低,血清 TNF- α 、IL-6 水平降低,心肌细胞 AI 降低($P<0.05$)。与对照组相比,DCM 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达降低,caspase3、Bax 蛋白表达升高($P<0.05$);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达升高,caspase3、Bax 蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** STS 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路,抑制 DCM 大鼠心肌细胞凋亡,发挥对 DCM 大鼠的保护作用。

【关键词】 扩张型心肌病;丹参酮 II A;磷脂酰肌醇 3 激酶;蛋白激酶 B;心肌细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 06-0057-08

Effects of tanshinone II A on cardiomyocyte apoptosis and PI3K/Akt pathway in rats with dilated cardiomyopathy

CHAI Songbo, WANG Zhentao, ZHANG Shujuan, LIU Shunyu
(Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Henan Traditional Chinese Medicine
Hospital/Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of sodium tanshinone II A sulfonate (STS) on cardiomyocyte apoptosis in rats with dilated cardiomyopathy (DCM), and its potential mechanism of action. **Methods** DCM rats were randomly divided into DCM, STS-L, STS-M, STS-H, Carvedilol (CAR), and control groups, 12 rats in each group. Left ventricular internal diameter at end-systole (LVIDs) and left ventricular internal dimension at end-diastole (LVIDd), and left ventricular ejection fraction (LVEF) were measured by echocardiography. Pathological injury of myocardial tissues was

[基金项目] 抗纤益心方对扩张型心肌病气虚血瘀证患者心室重构影响的队列研究(162102310178)。

[作者简介] 柴松波(1980—),男,博士,研究方向:中医药防治心血管内科疾病的基础及临床研究,E-mail: chaisongbo168@126.com

observed using hematoxylin and eosin, and Masson trichrome staining. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels were quantified using enzyme-linked immunosorbent assays, while apoptosis in cardiomyocytes was detected using TUNEL staining. Expressions of phosphorylated phosphatidylinositol 3 kinase (p-PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), Bax, caspase-3, and Bcl-2 were detected by immunoblotting and immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the DCM group exhibited increased LVIDs and LVIDd, decreased LVEF, increased myocardial histopathologic scores and percentage of cardiac collagen fibers, increased serum levels of TNF- α and IL-6, and increased apoptosis index (AI) in cardiomyocytes ($P < 0.05$). Compared with the DCM group, the STS and CAR groups exhibited decreased LVIDs and LVIDd, increased LVEF, decreased myocardial histopathologic scores and percentage of cardiac collagen fibers, decreased serum levels of TNF- α and IL-6, and decreased apoptosis index (AI) in cardiomyocytes ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of p-PI3K, p-Akt, and Bcl-2 proteins were decreased in the DCM group, while expressions of caspase-3 and Bax proteins were increased ($P < 0.05$). Compared with the DCM group, the expressions of p-PI3K, p-Akt, and Bcl-2 proteins in STS and CAR groups were increased, while expressions of caspase 3 and Bax proteins were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** STS may inhibit cardiomyocyte apoptosis in DCM rats by activating PI3K/Akt signaling and exert protective effects.

[Keywords] Dilated cardiomyopathy; Sodium tanshinone II A sulfonate; phosphatidylinositol kinase; phosphatidylinositol 3 kinase; cardiomyocyte apoptosis

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)为临床常见心脏疾病,患者常出现心室收缩功能障碍、心室重构,若没有得到及时治疗,则会病情加重,发展为心力衰竭^[1]。近期研究显示心肌细胞凋亡是导致 DCM 发生时心室收缩功能不足、左心室功能恶化的主要原因,因此抑制心肌细胞凋亡可缓解心肌损伤以及心室重构^[2]。丹参酮 II A 为丹参中具有代表性的生物活性成分,丹参酮 II A 磺酸钠(sodium tanshinone II A sulfonate, STS)为其主要提取物,大量研究显示在心肌缺血再灌注损伤、心肌肥大、DCM 中均具有良好的疗效,然而其具体作用机制目前尚不明确^[3]。本研究通过制备 DCM 大鼠,并给予 STS 治疗,以观察 STS 对 DCM 大鼠心肌细胞凋亡的改善作用,并初步探讨可能作用机制,以期为 STS 应用于心肌梗死临床治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 7~8 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重 60~70 g,由河南省动物实验中心提供[SYXK(豫)2017-0002],所有大鼠均在 22℃~25℃,相对湿度 50% 的环境中统一饲养[SYXK(豫)2017-0016],大鼠自由饮水、摄食,保持通风、光照良好,正常饲养一周后用于模型制备。本研究经本院实验动物伦理委员会批准同意,且实验过程中的处理符合动物伦理学标准,伦理审批号:IACUC-20170208015。

1.2 主要试剂与仪器

STS 注射剂购于上海第一生化药业有限公司,批号:20170218;卡维地洛(carvedilol, CAR)购于齐鲁制药有限公司,批号:20170326;呋喃唑酮片购于长春新安药业有限公司批号:20170121;多普勒超声检测仪购于西门子公司;HE 染色试剂盒购于上海生工生物工程有限公司;Tunel 检测试剂盒购于杭州碧云天生物科技有限公司;蛋白检测试剂盒、BCA 测定试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗鼠 p-PI3K、p-Akt、caspase3、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、(Bcl-2 associated X protein, Bax)单抗购自英国 Abcam 公司,HRP 标记 IgG 二抗、 β actin 均购自美国 Sigma 公司;电子显微镜购于日本奥林巴斯公司;垂直电泳仪与凝胶成像仪购于美国 Bio-Rad 公司;SP 检测试剂盒购于北京康为世纪公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

参考文献^[4]制备 DCM 大鼠,选取 60 只大鼠,灌胃呋喃唑酮水溶液(按 1 kg 水加 700 mg 呋喃唑酮配置),每日更换一次。造模时间为 8 周。并用超声诊断仪完成心脏超声心动图监测,超声心动图显示左心室壁弥漫性运动减弱,射血分数较对照组大鼠射血分数均值减少 20% 为造模成功的标志。另设一正常对照组大鼠 12 只,自主饮水连续 8 周。

1.3.2 动物分组与给药

模型制备后,采用随机数字表法将大鼠分为 5 组,模型组(DCM 组)、STS 中、高、低剂量组、CAR

组,每组 12 只大鼠,STS 各组大鼠:模型结束后腹腔注射 17.5、35.0、70.0 mg/kg STS;卡维地洛组(阳性对照组):模型结束后腹腔注射 10 mg/kg CAR;每日上午 1 次,连续给药 4 周。对照组、DCM 组大鼠腹腔注射等量生理盐水,连续 4 周。

1.3.3 超声检测左心室功能。

末次给药结束后,麻醉大鼠,于二维超声引导下测定左心长轴切面左室收缩末期内径(left ventricular internal diameter at end-systole, LVIDs)和左心室舒张末期内径(left ventricular internal dimension at end-diastole, LVIDd)以及左心室射血分数(Left ventricular ejection fraction, LVEF),连续测定 4 个完整心动周期,重复测定 3 次,取平均值。

1.3.4 标本采集

心功能检测结束后,麻醉后处死大鼠,腹动脉取血 2 mL,3000 r/min 离心 5 min 后保留上层血清;取出心脏,清洗后,摘除非心肌组织,取心室横径最大部分心肌组织,一部分于-80℃中保存,一部分置于 4%多聚甲醛中固定。

1.3.5 血清 TNF- α 、IL-6 水平检测

采用 Elisa 试剂盒检测血清中 TNF- α 、IL-6 水平,具体参照试剂盒说明书进行操作。

1.3.6 心肌组织染色

常规制备心肌组织石蜡切片,烘烤后,在二甲苯中脱蜡,梯度乙醇中脱水,PBS 清洗后,采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒进行染色,将切片置于显微镜下,观察心肌组织病理形态学变化,统计心肌纤维化情况,无心肌纤维化为 0 分,纤维化区域比例<25%为 1 分,纤维化区域比例 25%~50%记为 2 分,51%~75%记为 3 分,>75%记为 4 分。

Masson 染色:石蜡切片加入、脱蜡脱水后进行铬化处理,参照 Masson 染色试剂盒进行染色,切片最后脱水、透明、封片后。采用 Metacard 6.0 软件计算心肌胶原纤维比例(%)=胶原面积/总面积 $\times 100\%$ 。

1.3.7 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况

制备心肌组织冷冻切片,根据 TUNEL 染色试剂盒说明书对组织进行染色,于光学显微镜下观察心肌细胞凋亡数情况,Image-Pro Plus 软件定量细胞阳性数量,计算心肌细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)=凋亡细胞阳性数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.8 蛋白免疫印迹

取出保存心肌组织研磨,添加裂解缓冲液裂解组织,抽提总蛋白,SDS-PAGE 电泳分离等量蛋白后进行转膜反应后,加入 5% BSA 封闭 1 h;加入 p-PI3K、p-Akt、caspase-3、Bax、Bcl-2、 β -actin 一抗(1:500),4℃过夜孵育;添加二抗(1:5000),室温孵育 1 h,发光显影后用 Tanon 软件采集图像并对蛋白进行量化分析。

1.3.9 免疫组化检测 p-PI3K、p-Akt、caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达

心肌组织切片石蜡切片添加柠檬酸钠抗原修复, H_2O_2 解除内源过氧化酶活性,封闭后,于 4℃加入 p-PI3K、p-Akt、caspase-3、Bax、Bcl-2 一抗孵育过夜,滴加 HRP 标记 IgG 二抗后,添加苏木精染液复染、氨水反蓝,置于梯度乙醇中脱水、二甲苯透明,用中性树脂封片后置显微镜下观察蛋白表达情况。

1.4 统计学处理

利用 SPSS 16.0 进行统计学分析,计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验或单因素方差分析进行差异性分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 STS 对 DCM 大鼠左心室功能的影响

与对照组相比,DCM 组 LVIDs、LVIDd 升高,LVEF 降低,差异具有显著性($P<0.05$);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组 LVIDs、LVIDd 降低,LVEF 升高,差异具有显著性($P<0.05$)。(图 1、表 1)

2.2 DCM 大鼠心肌组织病理学变化情况

对照组心肌细胞结构形态完整,心肌细胞以及胶原纤维排列紧密、规则。DCM 组大鼠心肌细胞结构破碎,出现坏死,细胞排列疏松、胶原纤维断裂、排列不规则,同时伴有大量炎性细胞浸润。STS 各组以及 CAR 组大鼠破碎、坏死心肌细胞明显减少,细胞以及胶原纤维形态结构逐渐恢复正常。

与对照组相比,DCM 组心肌组织病理学评分、心肌胶原纤维比例均升高,差异具有显著性($P<0.05$);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组病理学评分、心肌胶原纤维比例均降低,差异具有显著性($P<0.05$)。(图 2、表 2)

2.3 STS 对 DCM 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平的影响

与对照组相比,DCM 组 TNF- α 、IL-6 水平均升高,差异具有显著性($P<0.05$);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组 TNF- α 、IL-6 水平均降低,差异具有显著性($P<0.05$);TNF- α 、IL-6 水平均呈剂量依赖性($P<0.05$)。(表 3)

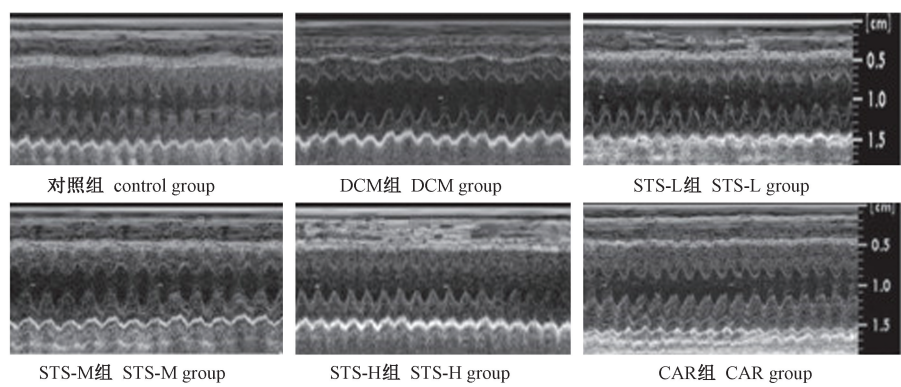


图 1 超声检测大鼠心脏的左心室功能

Figure 1 Echocardiographic detection of the left ventricular function in the rats

表 1 各组心脏的 LVIDs、LVIDd、LVEF 水平比较($n=12, \bar{x} \pm s$)
Table 1 LVIDs, LVIDd, and LVEF levels in the hearts of each group

组别 Groups	LVIDs(mm)	LVIDd(mm)	LVEF(%)
对照组 Control group	1. 86 $\pm$ 0. 17	4. 46 $\pm$ 0. 64	85. 33 $\pm$ 7. 87
DCM 组 DCM group	2. 54 $\pm$ 0. 25 *	6. 94 $\pm$ 0. 87 *	69. 95 $\pm$ 4. 31 *
STS-L 组 STS-L group	2. 31 $\pm$ 0. 28 [#]	6. 27 $\pm$ 0. 59 [#]	75. 15 $\pm$ 3. 96 [#]
STS-M 组 STS-M group	2. 27 $\pm$ 0. 33 [#]	6. 14 $\pm$ 0. 41 [#]	76. 33 $\pm$ 6. 28 [#]
STS-H 组 STS-H group	2. 19 $\pm$ 0. 25 [#]	5. 87 $\pm$ 0. 55 [#]	77. 94 $\pm$ 4. 67 [#]
CAR 组 CAR group	2. 08 $\pm$ 0. 14 [#]	5. 71 $\pm$ 0. 68 [#]	79. 75 $\pm$ 5. 84 [#]

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 DCM 组比较, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the DCM group, [#] $P<0.05$.

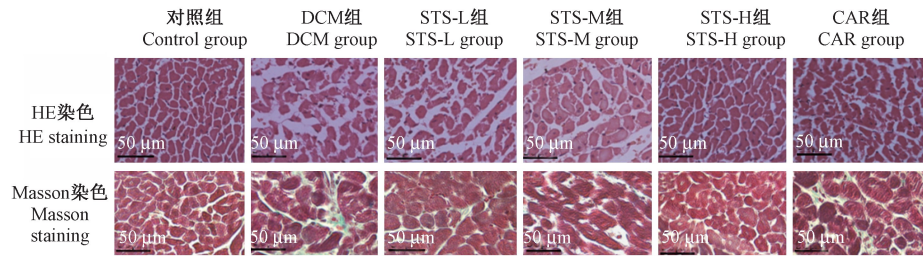


图 2 大鼠心肌组织的病理改变。HE、Masson 染色

Figure 2 Histological changes in the myocardium of the rats. Hematoxylin and eosin, and Masson trichrome staining

表 2 各组大鼠心肌组织病理损伤情况比较($n=12, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Histological changes in the myocardial tissues of rats in each group

组别 Groups	病理学评分 Pathological scores	心肌胶原纤维比例 Myocardial collagen fiber ratio
对照组 Control group	0. 16 $\pm$ 0. 03	6. 52 $\pm$ 0. 31
DCM 组 DCM group	3. 67 $\pm$ 0. 56 *	56. 42 $\pm$ 7. 39 *
STS-L 组 STS-L group	3. 25 $\pm$ 0. 33 [#]	45. 73 $\pm$ 5. 41 [#]
STS-M 组 STS-M group	2. 88 $\pm$ 0. 29 ^{#&}	34. 21 $\pm$ 6. 32 ^{#&}
STS-H 组 STS-H group	2. 09 $\pm$ 0. 28 ^{#&△}	30. 72 $\pm$ 4. 37 ^{#&}
CAR 组 CAR group	1. 96 $\pm$ 0. 35 [#]	24. 66 $\pm$ 3. 51 [#]

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 DCM 组比较, [#] $P<0.05$;与 STS-L 组比较, [&] $P<0.05$;与 STS-M 组比较, [△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the DCM group, [#] $P<0.05$. Compared with the STS-L group, [&] $P<0.05$. Compared with the STS-M group, [△] $P<0.05$.

表 3 各组血清 TNF-α、IL-6 水平比较 (n=12, $\bar{x} \pm s$)
Table 3 Serum TNF-α and IL-6 levels in each group

组别 Groups	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
对照组 Control group	16.52±2.31	53.47±4.29
DCM 组 DCM group	46.42±5.39 [*]	361.44±23.41 [*]
STS-L 组 STS-L group	35.73±5.41 [#]	216.33±19.07 [#]
STS-M 组 STS-M group	29.21±4.32 ^{#&}	178.19±21.22 ^{#&}
STS-H 组 STS-H group	23.72±4.37 ^{#&△}	131.66±10.95 ^{#&△}
CAR 组 CAR group	20.66±3.51 [#]	116.47±13.29 [#]

注:与对照组比较, ^{*}P<0.05;与 DCM 组比较, [#]P<0.05;与 STS-L 组比较, [&]P<0.05;与 STS-M 组比较, [△]P<0.05。
Note. Compared with the control group, ^{*}P<0.05. Compared with the DCM group, [#]P<0.05. Compared with the STS-L group, [&]P<0.05. Compared with the STS-M group, [△]P<0.05.

2.4 STS 对 DCM 大鼠心肌细胞凋亡的影响

与对照组相比,DCM 组心肌细胞 AI 升高,差异具有显著性(P<0.05);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组心肌细胞 AI 均降低,差异具有显著性(P<0.05);随着剂量的升高,心肌细胞凋亡率降低(P<0.05)。(图 3、表 4)

2.5 Western blot 法检测大鼠心肌组织 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、caspase-3、Bax 蛋白表达

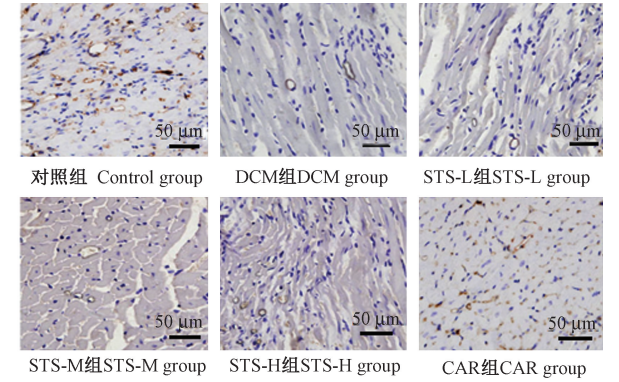


图 3 TUNEL 法观察各组大鼠心肌细胞凋亡情况(×100)
Figure 3 Apoptosis in cardiomyocytes in the rat heart tissues in each group. TUNEL staining.

表 4 各组大鼠心肌细胞凋亡情况的比较 (n=12, $\bar{x} \pm s$)
Table 4 Apoptosis in the rat cardiomyocytes of each group

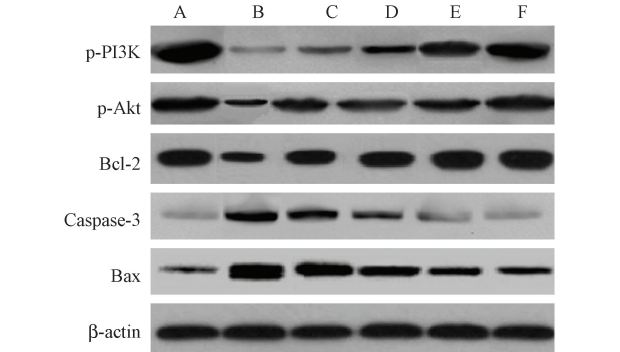
组别 Groups	细胞凋亡(%) Apoptosis index
对照组 Control group	11.56±1.32
DCM 组 DCM group	42.17±3.78 [*]
STS-L 组 STS-L group	32.81±3.26 [#]
STS-M 组 STS-M group	25.37±3.01 ^{#&}
STS-H 组 STS-H group	19.56±2.27 ^{#&△}
CAR 组 CAR group	18.74±2.34 [#]

注:与对照组比较, ^{*}P<0.05;与 DCM 组比较, [#]P<0.05;与 STS-L 组比较, [&]P<0.05;与 STS-M 组比较, [△]P<0.05。
Note. Compared with the control group, ^{*}P<0.05. Compared with the DCM group, [#]P<0.05. Compared with the STS-L group, [&]P<0.05. Compared with the STS-M group, [△]P<0.05.

与对照组相比,DCM 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达降低,caspase-3、Bax 蛋白表达升高,差异具有显著性(P<0.05);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达升高,caspase-3、Bax 蛋白表达降低,差异具有显著性(P<0.05);p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、caspase-3、Bax 蛋白表达呈剂量依赖性(P<0.05)。(图 4、表 5)

2.6 免疫组化法检测各组大鼠心肌 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、caspase3、Bax 蛋白阳性表达情况

与对照组相比,DCM 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白阳性表达率降低,caspase-3、Bax 阳性表达率表达升高,差异具有显著性(P<0.05);与 DCM 组相比,STS 各组以及 CAR 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白阳性表达率升高,caspase-3、Bax 蛋白阳性表达率降低,差异具有显著性(P<0.05);随着 STS 剂量的升高,caspase-3、Bax 蛋白阳性表达率逐渐降低,p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达显著升高。(图 5、表 6)



注:A:对照组;B:DCM 组;C:STS-L 组;D:STS-M 组;E:STS-H 组;F:CAR 组。

图 4 Western blot 检测心肌组织中 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、caspase-3、Bax 蛋白表达
Note. A, Control group. B, DCM group. C, STS-L group. D, STS-M group. E, STS-H group. F, CAR group.

Figure 4 The expressions of p-PI3K, p-Akt, Bcl-2, Caspase-3 and Bax in the rat myocardial tissues of each group, detected by western blotting

表 5 各组心肌 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、caspase-3、Bax 蛋白表达的比较($n=12, \bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of protein expressions of p-PI3K, p-Akt, Bcl-2, Caspase-3 and Bax in the rat myocardia of different groups

组别 Groups	p-PI3K	p-Akt	Bcl-2	Caspase-3	Bax
对照组 Control group	1.35±0.29	1.13±0.14	0.89±0.11	0.17±0.03	0.19±0.03
DCM 组 DCM group	0.18±0.03 [*]	0.20±0.03 [*]	0.22±0.03 [*]	0.76±0.04 [*]	0.97±0.08 [*]
STS-L 组 STS-L group	0.33±0.04 [#]	0.43±0.04 [#]	0.35±0.04 [#]	0.69±0.08 [#]	0.86±0.05 [#]
STS-M 组 STS-M group	0.57±0.04 ^{#&}	0.76±0.08 ^{#&}	0.48±0.11 ^{#&}	0.41±0.06 ^{#&}	0.62±0.07 ^{#&}
STS-H 组 STS-H group	0.89±0.06 ^{#&△}	0.89±0.05 ^{#&△}	0.71±0.07 ^{#&△}	0.21±0.03 ^{#&△}	0.38±0.04 ^{#&△}
CAR 组 CAR group	1.05±0.13 [#]	0.93±0.14 [#]	0.77±0.11 [#]	0.13±0.04 [#]	0.25±0.03 [#]

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与 DCM 组比较，[#] $P<0.05$ ；与 STS-L 组比较，[&] $P<0.05$ ；与 STS-M 组比较，[△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the DCM group, [#] $P<0.05$. Compared with the STS-L group, [&] $P<0.05$. Compared with the STS-M group, [△] $P<0.05$.

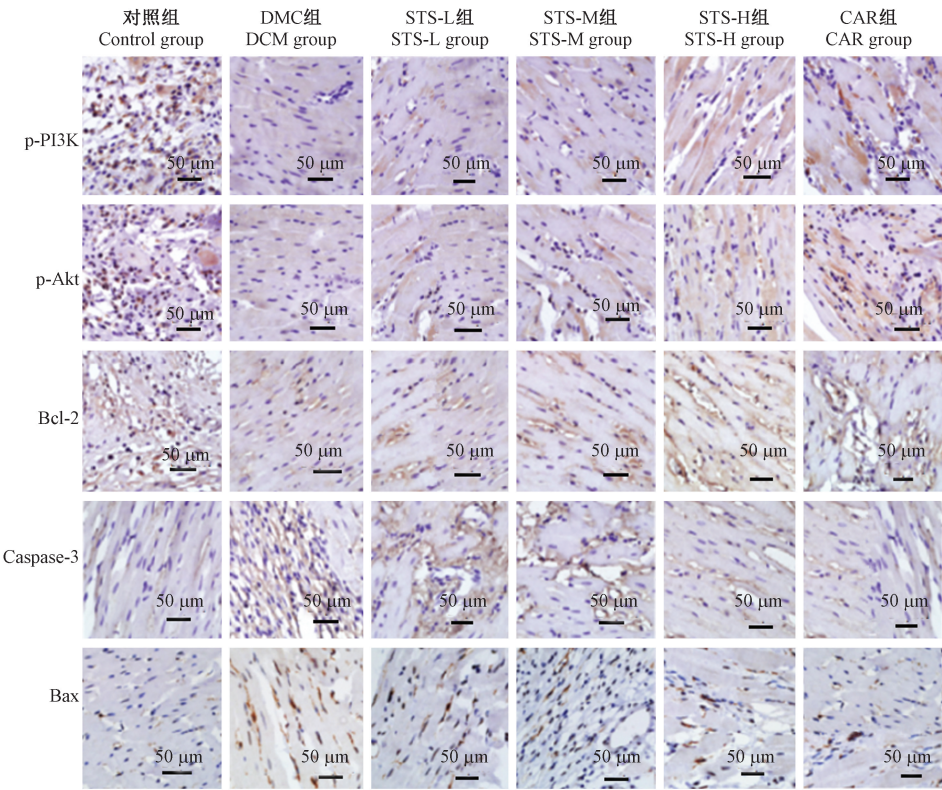


图 5 心肌组织中 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、caspase-3、Bax 蛋白的表达。免疫组化染色。

Figure 5 Expression of p-PI3K, p-Akt, Bcl-2, caspase-3, and Bax proteins in the rat myocardial tissues. Immunohistochemical staining.

表 6 各组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、caspase3、Bax 蛋白阳性率比较($n=12, \bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of the positive rates of p-PI3K, p-Akt, Bcl-2, caspase 3, and Bax proteins in the rat myocardial tissues in each group

组别 Groups	p-PI3K	p-Akt	Bcl-2	Caspase-3	Bax
对照组 Control group	60.34±6.44	66.73±6.18	48.17±6.74	10.86±2.13	10.57±1.82
DCM 组 DCM group	13.58±2.13 [*]	15.16±3.09 [*]	11.27±2.09 [*]	48.08±5.29 [*]	45.19±4.03 [*]
STS-L 组 STS-L group	20.16±2.87 [#]	22.63±3.17 [#]	19.14±2.27 [#]	32.13±9.18 [#]	38.13±3.48 [#]
STS-M 组 STS-M group	29.24±3.16 ^{#&}	34.52±5.37 ^{#&}	32.72±3.15 ^{#&}	28.17±4.34 [#]	29.18±2.24 ^{#&}
STS-H 组 STS-H group	38.47±3.35 ^{#&△}	46.53±7.48 ^{#&△}	38.17±6.74 ^{#&△}	23.08±4.18 ^{#&△}	18.87±4.03 ^{#&△}
CAR 组 CAR group	54.08±1.59 [#]	54.26±6.87 [#]	41.42±3.43 [#]	21.16±1.35 [#]	17.74±3.39 [#]

注：与对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与 DCM 组比较，[#] $P<0.05$ ；与 STS-L 组比较，[&] $P<0.05$ ；与 STS-M 组比较，[△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the DCM group, [#] $P<0.05$. Compared with the STS-L group, [&] $P<0.05$. Compared with the STS-M group, [△] $P<0.05$.

3 讨论

DCM 主要表现为心室扩张以及收缩功能减弱,调查显示 1985 年美国某地区流行病学调查显示 DCM 患病率为 36.5/10 万,2002 年中国分层整群抽样调查显示 DCM 患病率约为 19/10 万,且近几年发病率仍逐渐升高,严重影响患者生命健康^[5]。DCM 具体发病原因目前尚不明确,缺乏有效治疗手段,因此探究其发病机制,寻找新型治疗药物是目前的重要任务。

本研究通过灌胃呋喃唑酮水溶液制备 DCM 大鼠,结果显示与对照组比较,DCM 组 DCM 组 LVIDs、LVIDd 升高,LVEF 降低,血清 TNF- α 、IL-6 水平升高,HE 染色发现心肌细胞形态破碎,排列疏松,出现大量炎性细胞浸润,表明 DCM 大鼠左心室扩张,收缩功能降低,且心肌组织伴有炎症损伤,符合以往 DCM 模型典型特征^[6],提示 DCM 模型复制成功。

STS 是从中草药丹参茎中提取的二萜醌类化合物,通过磺化反应制成的药物,其中丹参酮 II A 为主要药理成分,药理学研究显示丹参酮 II A 能够降低血液黏稠度,消除过量氧自由基,使冠状动脉扩张,提高心肌组织血流量,进而提高心肌能量储备,使心肌收缩力增强^[7]。本研究显示与 DCM 组比较,STS 各组 LVIDs、LVIDd 降低,LVEF 升高,血清 TNF- α 、IL-6 水平降低,HE 染色发现心肌细胞坏死数减少,心肌细胞以及胶原纤维形态逐渐恢复正常,炎性细胞浸润明显较少,随着 STS 剂量的升高,大鼠心脏功能逐渐恢复,心肌损伤程度逐渐降低,且 STS 高剂量组与 CAR 组效果相似。刘崇斌等^[8]研究发现,STS 可改善 DCM 大鼠心功能,减轻左室重构,减少心肌纤维化进而保护心肌组织,与本研究结果一致。以上研究结果提示 STS 可缓解大鼠心肌损伤,改善 DCM 大鼠左心室功能保护心肌组织。

心肌组织受损是由多因素共同参与、作用的结果,与细胞凋亡密切相关。一般情况细胞凋亡有利于维持机体健康状态非常重要;当细胞受到外界以及内部刺激时,细胞正常凋亡程序紊乱,引发细胞异常凋亡,引起组织细胞坏死等病理损伤^[9-10]。本研究发现,与对照组比较,DCM 组心肌细胞凋亡指数显著升高;与 DCM 组比较,STS 组大鼠心肌细胞凋亡指数显著降低,提示 STS 能够有效抑制 DCM 大鼠心肌细胞凋亡。

本研究显示与对照组比较,DCM 组心肌 p-PI3K、p-Akt 表达降低,表明活 PI3K/Akt 信号通路可能参与 DM 的发生。PI3K 作为 PI3K/Akt 信号通路起始因子,在机体内生长因子、能量信号改变后激活 IRS,随后结合 PI3K,产生 PTP2 以及 PTP3, Akt 在 PTP2 的刺激下产生二聚体并在 PTP3、PDK 的共同作用下使 AKT 与细胞膜相结合,进一步使 Akt 发生磷酸化,随后从细胞膜上释放出来进入细胞质内传递信号^[11-12]。过往研究显示 STS 通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抵抗抗内皮细胞氧化应激损伤^[13]。金云晔等^[14]研究显示 STS 通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路降低因缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡,保护心肌功能。李佳等^[15]研究显示,给予心肌缺血再灌注损伤大鼠 PI3K 特异性抑制剂后,大鼠心肌细胞凋亡率明显升高。以上研究表明,在心肌缺血再灌注损伤大鼠中发现激活 PI3K/Akt 信号通路,能够保护心室功能,降低心肌梗塞面,减少心肌坏死细胞^[16]。本研究发现与 DCM 组比较,STS 组大鼠心肌组织中 p-PI3K、p-Akt 表达升高,随着 STS 剂量的升高 p-PI3K、p-Akt 表达升高,逐渐升高,STS 高剂量组与 CAR 组表达水平相近,提示 STS 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制 DCM 大鼠心肌细胞凋亡,进而缓解心肌组织损伤,保护心肌功能。

细胞凋亡过程中涉及多种凋亡诱导、抑制因子,Bcl-2 家族中包括多种与细胞凋亡密切相关的蛋白成员,包括 Bcl-2 抗凋亡因子以及促凋亡因子 Bax^[17]。细胞未受损时,Bcl-2、Bcl-XL 与 Bax 形成二聚体,受到损伤刺激后 Bax 蛋白大量表达,二聚体含量升高聚集于线粒体膜导致线粒体膜通透性增加,AIF 凋亡因子进入细胞质,激活 caspase-3 级联反应引发细胞凋亡^[18-19]。本研究发现,DCM 组 caspase-3、Bax 表达显著升高,Bcl-2 表达显著降低;STS 干预后,caspase-3、Bax 蛋白表达显著降低,Bcl-2 蛋白表达显著升高,随着 STS 剂量的升高,caspase-3、Bax 蛋白表达逐渐降低,Bcl-2 蛋白表达显著升高,STS 高剂量组与 CAR 组表达相近,提示 STS 可抑制 caspase-3 信号通路的激活抑制细胞凋亡,结合以上研究提示 STS 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路,进而抑制 caspase-3 凋亡通路激活,减少心肌细胞凋亡,发挥心肌损伤保护作用。

综上所述,STS 可减轻 DCM 大鼠心肌损伤,减少心肌细胞凋亡,其机制可能与激活 PI3K/Akt 信号

通路,抑制 caspase-3 凋亡通路激活有关,但 STS 仅能部分缓解心肌组织损伤并非完全逆转,这可能与药物剂量有关,也有可能是其它因素造成,还有待后续深入研究,以期 DCM 的治疗提供充分的实验依据。

参考文献:

[1] Ushigome R, Sakata Y, Nochioka K, et al. Recent trends in clinical characteristics, management and prognosis of patients with dilated cardiomyopathy in Japan — A report from the CHART studies [J]. J Card Fail, 2014, 20(8): S45.

[2] Metzger M, Higuchi ML, Moreira LF, et al. Relevance of apoptosis and cell proliferation for survival of patients with dilated cardiomyopathy undergoing partial left ventriculectomy [J]. Eur J Clin Invest, 2002, 32(6): 394-399.

[3] 段媛媛, 郭振丰, 李雪连. 丹参酮ⅡA 治疗心血管疾病研究机制新进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(19): 1817-1820.

[4] 黄荣杰, 刘唐威, 伍伟锋, 等. 呋喃唑酮制备大鼠扩张型心肌病模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 23(10): 2147-2150.

[5] 杨杰孚, 廖玉华, 袁璟, 等. 中国扩张型心肌病诊断和治疗指南 [J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(5): 421-434.

[6] Arumugam S, Sreedhar R, Karuppagounder V, et al. Comparative evaluation of torasemide and spironolactone on adverse cardiac remodeling in a rat model of dilated cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Ther, 2017, 35(5): 12283.

[7] Liu Z, Wang J, Huang E, et al. Tanshinone IIA suppresses cholesterol accumulation in human macrophages: role of heme oxygenase-1 [J]. J Lipid Res, 2014, 55(2): 201-213..

[8] 刘崇斌, 王伊林, 柴花, 等. 丹参多酚酸盐对阿霉素诱导的扩张型心肌病大鼠心功能的影响及机制研究 [J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(2): 134-138.

[9] Gill SE, Rohan M, Mehta S. Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo [J]. Respir Res, 2015, 16(1): 109.

[10] Hassan MQ, Akhtar MS, Akhtar M, et al. Edaravone protects rats against oxidative stress and apoptosis in experimentally induced myocardial infarction: Biochemical and ultrastructural evidence [J]. Redox Rep, 2015, 20(6): 275-281.

[11] Janku F, Wheler JJ, Westin SN, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in patients with breast and gynecologic malignancies harboring PIK3CA mutations [J]. J Clin Oncol, 2015, 30(8): 777-782.

[12] Chen K, Li G, Geng F, et al. Berberine reduces ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis via activating AMPK and PI3K-Akt signaling in diabetic rats [J]. Apoptosis, 2014, 19(6): 946-957.

[13] 曹慧敏, 宋囡, 张妮, 等. 丹参酮ⅡA 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控自噬抗内皮细胞氧化应激损伤研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(11): 933-939.

[14] 金云晔, 翟昌林, 沈震, 等. 丹参酮ⅡA 磺酸钠对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(6): 1414-1416.

[15] 李佳. PI3K/AKT/GSK3-β 信号转导通路在红景天苷保护大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(22): 2621-2624.

[16] 韩军, 宣佳利, 胡浩然, 等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 118-123.

[17] Opferman JT. Attacking cancer's Achilles heel: Antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members [J]. FEBS J, 2016, 283(14): 2661-2675.

[18] Vasilikos L, Spilgies LM, Knop J, et al. Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins [J]. Immunol Cell Biol, 2017, 95(2): 160-165.

[19] 王厚磊, 卢伟, 李德芳, 等. 大鼠椎间盘髓核细胞体外凋亡模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 607-611.

[收稿日期] 2018-10-31