

基于网络药理学探究白藜芦醇抗大鼠 心肌缺血再灌注损伤的分子机制

张晓节, 蒋 磊

(安徽省第二人民医院药学部, 合肥 230041)

[摘要] 目的 基于网络药理学信息筛选方法, 探究白藜芦醇(resveratrol, RSV)抗大鼠心肌缺血再灌注(myocardial ischemia-reperfusion, MI/R)损伤的作用, 以及其在大鼠体内的作用机制。方法 利用TCMSP数据库筛选RSV作用基因靶点, 并利用GeneCards数据库筛选MI/R损伤相关靶基因。运用R语言软件对RSV和MI/R相关靶基因取交集, 筛选得到RSV治疗MI/R损伤可能的靶基因, 并通过Cytoscape软件绘制基因网络, 筛选出核心靶基因; 最后运用R语言软件对这些靶基因进行GO及KEGG通路分析。将30只SD大鼠随机分为假手术组(Sham)、缺血再灌注组(MI/R)和白藜芦醇给药组(RSV)。通过结扎左冠状动脉前降支诱导MI/R损伤大鼠模型, 然后测定大鼠血浆中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTn I)含量以及心肌梗死面积。HE染色观察心肌结构, TUNEL染色检测心肌细胞凋亡, 免疫组织化学和蛋白质印迹法检测心肌组织中凋亡相关蛋白caspase-3、Bcl-2和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)表达。结果 网络药理学信息筛选发现RSV治疗MI/R损伤的核心靶基因有86个, 主要涉及细胞因子受体、磷酸酶结合和死亡受体等生物学过程, 以及参与调控糖尿病并发症的AGE-RAGE信号通路和细胞凋亡信号通路。大鼠体内实验结果显示, 相比于Sham组, MI/R组心肌组织中TRAIL蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$), 血浆LDH、CK及cTn I含量明显增加(均 $P < 0.01$), 心肌梗死面积增大, 同时心肌组织中肌纤维排列紊乱, 细胞凋亡率和caspase-3蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), Bcl-2表达明显下调($P < 0.05$); 而RSV组心肌纤维排列相对规则, LDH、CK、cTn I含量及TRAIL蛋白表达量减少, 心肌梗死面积减少, 细胞凋亡率降低(均 $P < 0.05$)。结论 RSV可能通过调节TRAIL蛋白表达抑制细胞凋亡, 从而逆转MI/R损伤。

[关键词] 网络药理学; 白藜芦醇; 心肌缺血再灌注损伤; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 细胞凋亡; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)06-0496-10

急性心肌梗死是冠状动脉急性或持续性缺血缺氧导致心肌组织坏死。心肌细胞大量死亡, 严

重影响患者的预后。心肌缺血再灌注(myocardial ischemia-reperfusion, MI/R)损伤是指心肌短时间内供血不足或停止, 之后又恢复供血, 进而造成心肌组织损伤的过程^[1]。研究表明, 导致MI/R损伤的机制包括细胞坏死、细胞凋亡、钙超载, 以及过量氧自由基的产生等^[2-4]。目前, 治疗MI/R损伤的有效药物尚不完全明确。

[收稿日期] 2020-04-30

[作者简介] 张晓节(1992—), 女, 硕士, 药师, 研究方向: 药理学。E-mail: zxj19920202@126.com

[通信作者] 蒋 磊(1982—), 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药理学。E-mail: tonyjlei2020@163.com

白藜芦醇 (resveratrol, RSV) 是存在于桑树、花生或朝鲜槐等多种植物中的一种非黄酮类多酚化合物。既往研究证实, RSV 能够通过减少 MI/R 损伤、舒缓血管或者抗动脉粥样硬化等途径发挥保护心血管系统的作用^[5-6]。然而, 有关 RSV 治疗 MI/R 损伤的具体分子机制尚不清楚。网络药理学是基于整体构想, 通过构建多层次的复杂网络, 发现关键节点即关键靶基因, 然后以此对疾病的发病机制和药物干预作用机制进行有效预测。

本研究采用网络药理学信息筛选方法, 从 RSV 治疗 MI/R 损伤的整体分子作用角度出发, 探寻 RSV 治疗的有效靶基因, 然后通过动物体内实验验证 RSV 治疗 MI/R 损伤的分子机制, 为 RSV 应用于临床治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量为 (200 ± 20) g, 6~8 周龄, 由安徽医科大学实验动物中心提供[SCXK (皖) 2017-001]。所有大鼠在 25℃ 左右、相对湿度为 40%~70% 的环境[SYXK (皖) 2017-004]中适应性饲养 7 d, 然后进行动物实验。本实验方案通过安徽医科大学动物伦理委员会审核批准 (IACUC: 20170625006)

1.2 药物与试剂

RSV 粉末 (纯度高于 99%) 和戊巴比妥钠 (批号: 57-33-0) 均购自美国 Sigma 公司; 蛋白质印迹法检测用兔抗 caspase-3 单克隆抗体 (#9662) 和小鼠抗 Bcl-2 单克隆抗体 (#3498) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 小鼠抗肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 单克隆抗体 (15497-1-AP) 购自中国武汉三鹰生物技术有限公司; 兔抗 GAPDH 单克隆抗体 (AF5009)、一抗稀释液、二抗稀释液、HE 染色试剂盒和 TUNEL 染色试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗和山羊抗鼠二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司; 小鼠抗 TRAIL 一抗免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。大鼠血浆中乳

酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 和心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I) 含量测定用试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.3 RSV 与 MI/R 损伤靶基因筛选及调控网络图构建

通过中药系统药理学数据库 (<https://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 筛选得到 RSV 有效作用靶基因, 然后采用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 筛选得到 MI/R 损伤相关靶基因。最后运用 R 语言软件包中的 VennDiagram 程序包, 对 RSV 作用与 MI/R 损伤相关的靶基因取交集, 再利用 Cytoscape 软件 (<https://cytoscape.org/>), 导入这些交集基因, 构建基因调控网络。

1.4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析

运用 R 语言软件包中的 String 和 Colorspace 程序包, 对基因调控网络进行 GO 功能富集分析, 并画出关键基因的富集分析柱状图及气泡图。使用模糊聚类算法, 以注释共同度为基础, 对基因进行聚类计算, 得出聚类分值, 该分值代表该基因在基因调控网络中的重要性。然后根据 GO 富集分析结果, 运用 R 语言软件包中的 Bioconductor 程序包, 进行 KEGG 通路分析, 得到 RSV 治疗 MI/R 损伤涉及的主要信号通路。采用超几何分布设计法进行 KEGG 富集分析, 富集分析的显著性按照 Benjamini-Hochberg 校正法进行计算。

1.5 动物建模与分组

实验大鼠随机分为 3 组, 即假手术组 (Sham 组)、心肌缺血再灌注组 (MI/R 组) 及药物治疗组 (RSV 组), 每组各 10 只。采用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 取仰卧位固定, 大鼠四肢通过肢体导联针与呼吸机连接, 记录 II 导联心电图, 分离左侧冠状动脉。Sham 组只穿线不结扎左冠状动脉前降支; MI/R 组和 RSV 组结扎左冠状动脉前降支约 40 min, 然后松开结扎线再灌注 2 h。在整个过程中, 以缺血时心肌组织变白且心电图 ST 段抬高, 再灌注时心肌变红且 ST 段下降, 视为造模成功。RSV 组大鼠于舌下静脉滴注用生理盐水 (即 0.9% 氯化钠

溶液)配制的 RSV 溶液 (10 mg/kg), 而 Sham 组和 MI/R 组均注射等量的生理盐水。

1.6 血浆中 LDH、CK 和 cTn I 含量测定

对各组大鼠心脏取血, 并将收取的血液放置于抗凝离心管内, 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液。按照试剂盒操作说明书检测大鼠血浆中 LDH、CK 和 cTn I 的含量, 酶标仪测定吸光度值, 以此反映大鼠 MI/R 损伤后的心肌功能。

1.7 大鼠心肌梗死面积检测

颈椎脱臼法处死大鼠, 取各组大鼠心脏。垂直心脏长轴, 顺心尖向底部的方向将心脏组织切片, 切片厚度为 5 μm。将切片置于 37 °C、pH 为 7.4 的 TTC 溶液中染色 10 min, 然后用 4% 的多聚甲醛溶液固定。缺血心肌组织呈现白色, 正常的心肌组织为血红色, 心肌梗死面积相对百分比 = 白色区域面积 / 血红色区域面积 × 100%。

1.8 HE 染色观察心肌结构

取大鼠心肌组织, 用 4% 的多聚甲醛溶液进行固定, 再用不同体积分数的乙醇溶液梯度脱水, 然后用二甲苯进行组织透明, 最后经石蜡包埋, 切片。使用 HE 染色试剂盒, 根据试剂盒操作说明进行 HE 染色。光学显微镜下观察心肌组织结构。

1.9 TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡

将大鼠心肌组织的石蜡切片置于 60 °C 烤箱内脱蜡, 然后使用二甲苯浸洗 2 次, 每次约 5 min。之后用梯度乙醇溶液 (100%、95%、80%、70%) 清洗各 1 次, 每次约 3 min。采用 Proteinase K 工作液处理心肌组织切片 20 min, 并在室温条件下加入细胞通透液孵育 10 min。PBS 清洗切片, 滴加 TUNEL 反应混合液, 反应 30 min。切片风干后, 加入 50 μL 的 Converter-POD, 加上盖玻片, 37 °C 孵育 30 min。PBS 清洗切片后, 加入 DAB 显色液, 孵育 10 min, 光学显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞数目并拍照。细胞凋亡率 (%) = TUNEL 阳性细胞数目 / 细胞总数目 × 100%。

1.10 免疫组织化学法检测 TRAIL 蛋白表达

将大鼠心肌组织的石蜡切片置于 60 °C 烤箱内脱蜡, 然后二甲苯浸洗, 梯度乙醇溶液脱水。将心肌组织切片置于 10 nmol/L 的柠檬酸盐缓冲液

中, 90 °C 抗原修复 30 min。室温条件下, 自然冷却并用去离子水缓慢冲洗。采用 3% 的 H₂O₂ 溶液孵育 10 min 后, 加入 10% 的 BSA 溶液封闭 20 min。加入小鼠抗 TRAIL 单克隆抗体 (工作液体积稀释比例为 1 : 200), 4 °C 条件下孵育过夜。加入山羊抗小鼠二抗, 室温条件下孵育 30 min。滴加 DAB 显色液, 显色后拍照, 观察心肌组织中 TRAIL 蛋白表达情况。

1.11 蛋白质印迹法检测 caspase-3、Bcl-2 和 TRAIL 表达

取大鼠心肌组织, PBS 润洗 1~2 次, 加入细胞组织裂解液 (体积比为 1 : 5), 冰上裂解 1 h; 4 °C, 12 000 × g 离心 15 min, 收集上清液, 采用 BCA 法进行蛋白质定量检测; 然后取心肌细胞总蛋白 30 μg, 上样至聚丙烯酰胺凝胶, 80 V 电泳 30 min 后, 转 120 V 电泳 60 min, 溴酚蓝指示电泳至凝胶最底层。依据蛋白质指示 marker 和目的蛋白分子量大小, 切取目的胶条, 采用湿转法将目的蛋白转移至 PVDF 膜上, 转膜时长 2 h。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入兔抗 caspase-3 单克隆抗体 (1 : 1 000)、小鼠抗 Bcl-2 单克隆抗体 (1 : 1 000)、小鼠抗 TRAIL 单克隆抗体 (1 : 1 000) 和兔抗 GAPDH (1 : 5 000) 单克隆抗体, 4 °C 孵育过夜; 再加入对应的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗, 室温孵育 1 h; 摇床上加入 TPBS 洗涤 3 次, 5 min/次, 然后加入显影液, 显影并拍照。结果以各目的条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计结果分析。动物体内实验检测均独立重复 3 次, 结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析方法, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RSV 作用与 MI/R 损伤靶基因交集及其调控网络

通过对 RSV 作用的 128 个药效靶基因和 MI/R 损伤的 1 231 个基因靶点进行基因交集筛选, 得

到 86 个可能与 RSV 治疗 MI/R 损伤相关的基因作用靶点 (图 1A), 其中包括 PTGS1、PTGS2、MAOB、RELA、STAT3、AKT1、VEGFA、

CCND1、Bcl-2、Bcl-2-L1 和 caspase-3 等。然后通过 Cytoscape 软件成功构建 RSV 治疗 MI/R 损伤的相关基因调控网络, 如图 1B 所示。

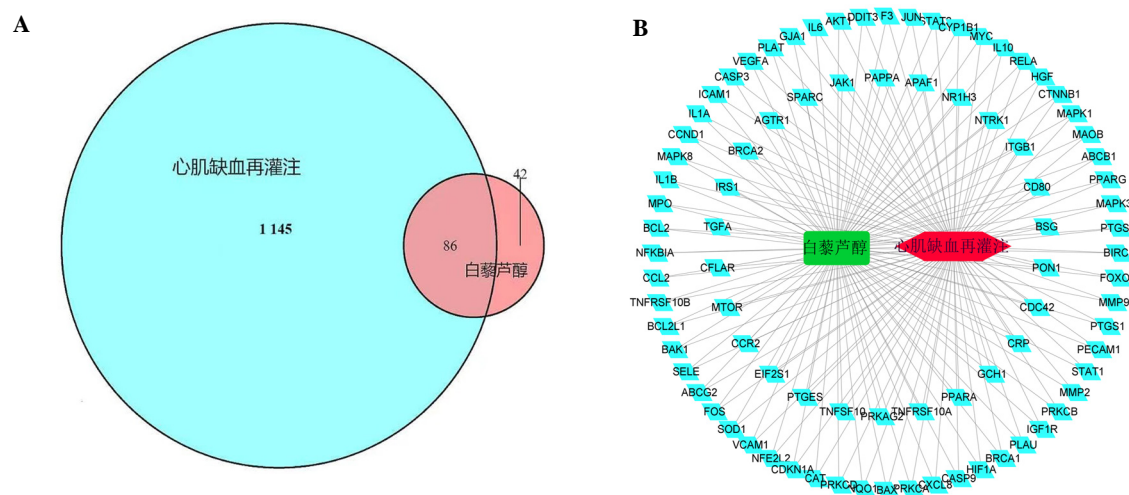


图 1 RSV 作用靶点和 MI/R 损伤相关基因的交集筛选图 (A) 及其调控网络图 (B)

Figure 1 Intersection screening diagram (A) and regulation network diagram (B) of resveratrol (RSV) target genes and myocardial ischemia-reperfusion (MI/R) damage-related genes

2.2 相关靶基因的 GO 富集功能与 KEGG 富集信号通路

GO 富集分析可得到特定功能层次上由基因或蛋白数目构成的有向无环图, 其中包括分子功能、细胞组分及生物过程 3 个方面。如图 2A 所示, 筛选得到的 86 个相关基因主要富集在细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、磷酸酶结合 (phosphatase binding)、蛋白磷酸酶结合 (protein phosphatase binding)、抑制转录因子结合 (repressing transcription factor binding) 和激活转录因子结合 (activating transcription factor binding) 等功能。

采用 R 语言软件包对筛选得到的 86 个靶基因进行 KEGG 信号通路富集分析。结果显示共有 157 条信号通路, 涉及参与糖尿病并发症调控的 AGE-RAGE 信号通路、卡波肉瘤相关性疱疹病毒感染通路和细胞凋亡信号通路 (图 2B)。其中细胞凋亡信号通路涉及的主要基因包括 TRAIL、caspase-3、Bcl-2 及 Bax 等 (图 2C)。

2.3 RSV 对大鼠心肌功能的影响

如表 1 显示, 与 Sham 组相比, MI/R 组大鼠的血浆中 LDH、CK 和 cTn I 含量均明显增加

($P < 0.01$), 心肌梗死面积也明显增大 ($P < 0.01$); 而相比于 MI/R 组, 在给予 RSV 药物干预后, 大鼠心肌功能得到明显改善, 血浆 LDH、CK 和 cTn I 含量均明显降低 ($P < 0.01$), 心肌梗死面积明显减少 ($P < 0.05$)。

2.4 RSV 对大鼠心肌结构的影响

HE 染色结果显示: Sham 组心肌结构正常; MI/R 组大鼠的心肌纤维排列紊乱, 且部分肌丝断裂, 间隙增宽; 相比于 MI/R 组, RSV 组大鼠的心肌纤维排列较为规则, 心肌间隙变小, 心肌细胞变形恢复较好 (图 3)。

2.5 RSV 对大鼠心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果 (图 4) 显示: 相比于 Sham 组, MI/R 组大鼠心肌细胞凋亡指数明显升高 ($P < 0.05$); 相比于 MI/R 组, RSV 组大鼠心肌细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。蛋白质印迹法检测结果 (图 5) 显示: 相比于 Sham 组, MI/R 组大鼠心肌组织中 caspase-3 表达明显上调 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 表达明显下调 ($P < 0.05$); 相比于 MI/R 组, RSV 组大鼠心肌组织中 caspase-3 表达明显下调 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。

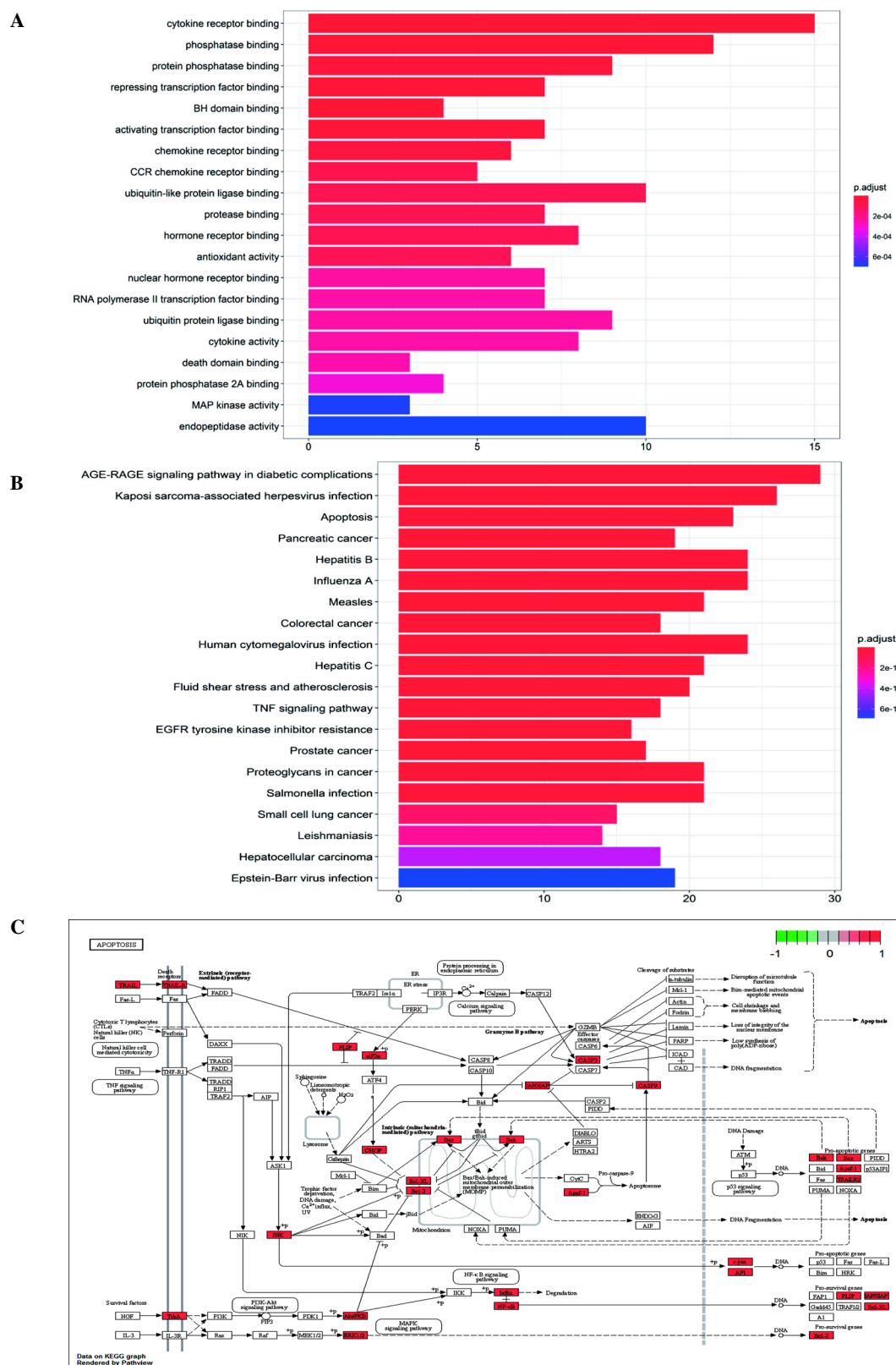


图2 关键靶向基因的GO富集分析(A)和KEGG富集分析(B)柱状图以及细胞凋亡信号通路图(C)

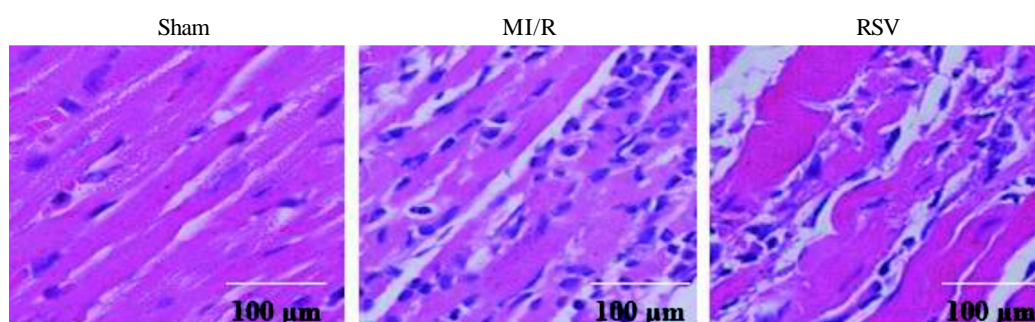
Figure 2 GO enrichment analysis (A) and KEGG enrichment analysis (B) histogram of key target genes and their related apoptosis signaling pathways (C)

表 1 RSV 对 MI/R 大鼠心肌功能的影响

Table 1 The effect of resveratrol (RSV) on the myocardial function of myocardial ischemia-reperfusion (MI/R) damaged rats

($\bar{x} \pm s, n=6$)				
组别	LDH 含量/(U · L ⁻¹)	CK 含量/(U · L ⁻¹)	cTn I 含量/(μg · L ⁻¹)	梗死面积相对百分比/%
Sham	230.20 ± 16.10	310.56 ± 41.09	5.19 ± 1.67	6.30 ± 2.10
MI/R	710.05 ± 55.12**	1210.88 ± 89.62**	47.54 ± 5.60**	43.78 ± 7.89**
RSV	290.30 ± 36.06##	689.36 ± 71.23##	30.32 ± 5.01 [#]	24.33 ± 5.64 [#]

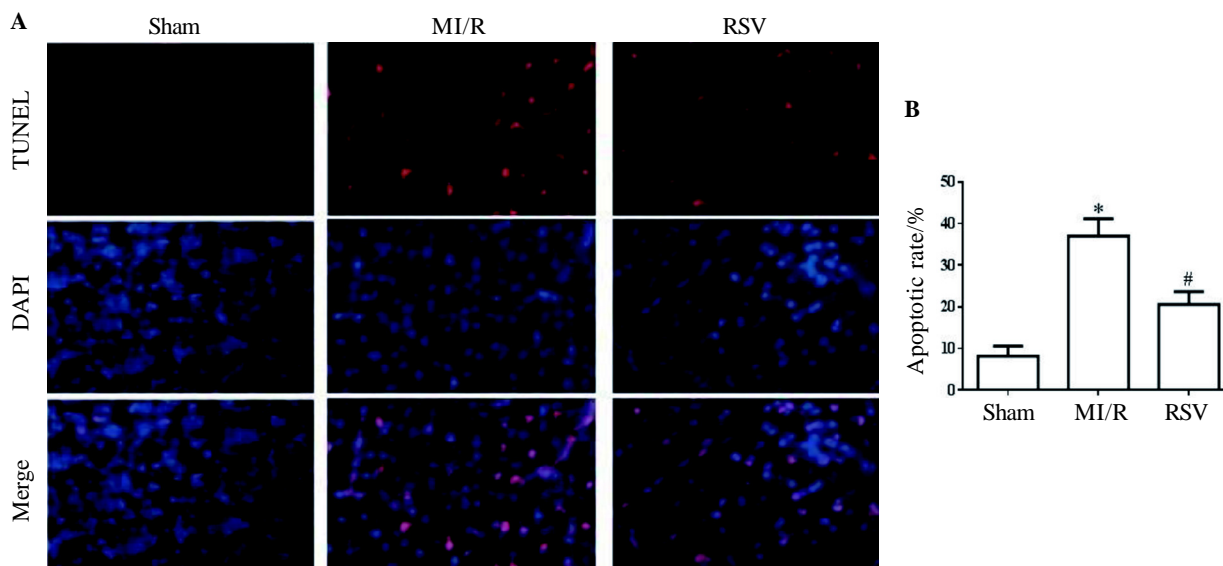
注: Sham 为假手术组, RSV 为白芦藜醇治疗组, MI/R 为大鼠心肌缺血再灌注损伤组。LDH 即乳酸脱氢酶, CK 即肌酸激酶, cTn I 即心肌肌钙蛋白 I。与 Sham 组相比, ** $P < 0.01$; 与 MI/R 组相比, [#] $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。



Sham 为假手术组, MI/R 为心肌缺血再灌注损伤组, RSV 为白芦藜醇治疗组。

图 3 HE 染色检测大鼠心肌组织形态学变化

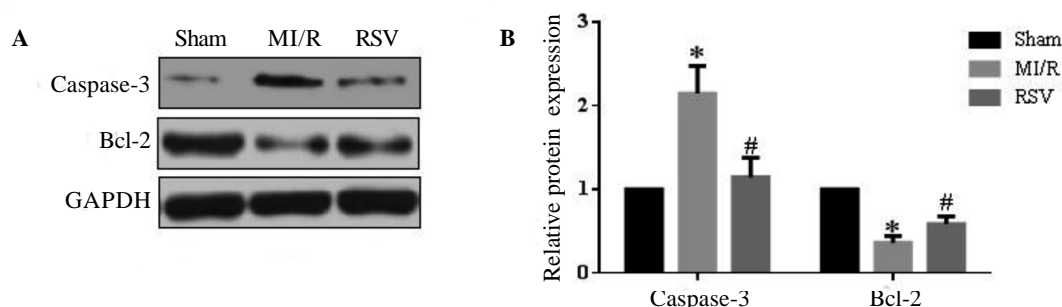
Figure 3 Morphological changes of rat myocardium tissues after HE staining



A 为 TUNEL 染色结果图, B 为细胞凋亡率分析。Sham 为假手术组, MI/R 为心肌缺血再灌注损伤组, RSV 为白芦藜醇治疗组。每组随机抽取 3 只大鼠进行独立实验; 与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 MI/R 组相比, [#] $P < 0.05$ 。

图 4 TUNEL 染色检测大鼠心肌细胞凋亡 (× 200)

Figure 4 Apoptosis of rat cardiomyocytes after TUNEL staining (× 200)



A 为蛋白质印迹条带图, B 为凋亡相关蛋白表达水平分析。Sham 为假手术组, MI/R 为心肌缺血再灌注损伤组, RSV 为白藜芦醇治疗组。n=3; 与 Sham 组相比, * $P < 0.05$; 与 MI/R 组相比, # $P < 0.05$ 。

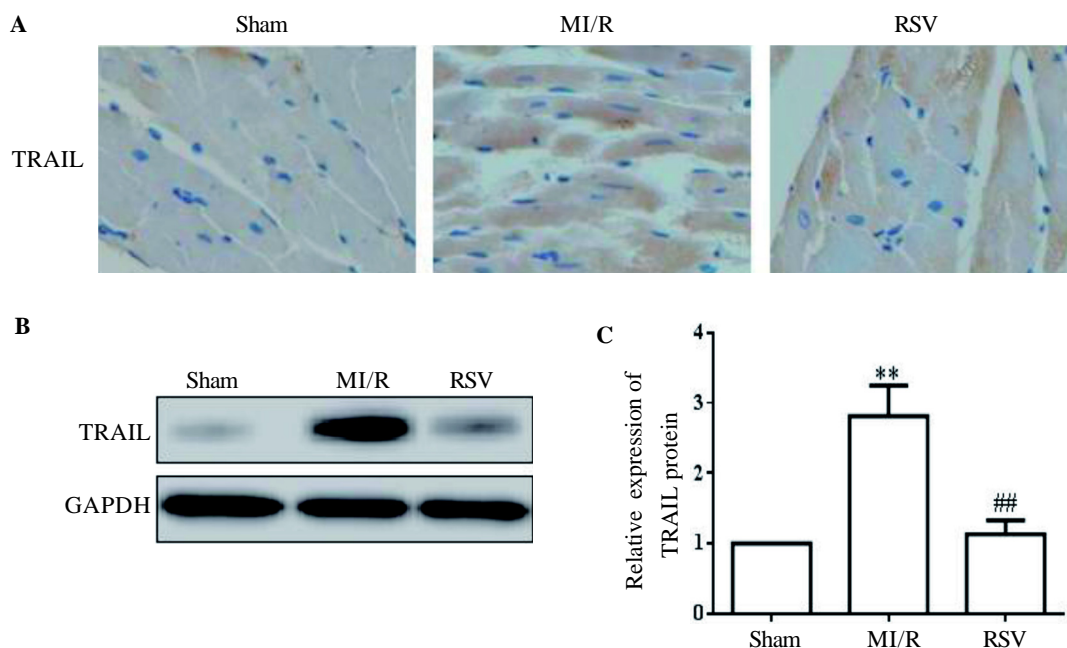
图 5 蛋白质印迹法检测 RSV 对心肌组织中凋亡相关蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of resveratrol (RSV) on the expressions of apoptosis-related proteins in rat myocardium by Western blotting

2.6 RSV 对 TRAIL 蛋白表达的影响

免疫组织化学法检测结果 (图 6A) 显示: MI/R 组大鼠心肌组织中 TRAIL 蛋白表达量增加, 而给予 RSV 药物处理后 TRAIL 表达水平降低。蛋

白质印迹法检测结果 (图 6B) 显示: 相比于 Sham 组, MI/R 组 TRAIL 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 相比于 MI/R 组, RSV 组 TRAIL 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。



注: A 为免疫组织化学法检测结果 (DAB 染色, ×400), B 为蛋白质印迹图, C 为 TRAIL 即肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体蛋白的相对表达水平分析。Sham 为假手术组, MI/R 为心肌缺血再灌注损伤组, RSV 为白藜芦醇治疗组。n=3; 与 Sham 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 MI/R 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 6 RSV 对大鼠心肌组织中 TRAIL 蛋白表达的影响

Figure 6 Effects of resveratrol (RSV) on the expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein in rat myocardium

3 讨论

RSV 是一种天然多酚类化合物, 广泛存在于多种植物中, 具有抗心血管疾病和抗肿瘤等多种生物活性。以往研究发现, 在大鼠 MI/R 损伤模型中, RSV 能有效缩短室性心动过速及室颤发生的持续时间, 改善心肌损伤^[7]。另外, RSV 也能够通过抗氧化、抗自由基作用, 减少心肌细胞坏死^[8]。RSV 还能通过调控一氧化氮合酶/一氧化氮 (NO) 通路, 促进 NO 释放, 发挥对 MI/R 损伤的保护作用^[9]。

已知氧化应激在 MI/R 损伤中扮演重要作用。有文献显示, 在 MI/R 损伤大鼠模型中, 心肌细胞线粒体功能出现严重损伤, 活性氧产生量异常增加, 导致心肌梗死面积增大; 而用 RSV 预处理 MI/R 损伤模型大鼠后, 心肌细胞线粒体功能得到明显改善^[10]。同时, 炎症反应是 MI/R 损伤的重要病理生理学机制^[11]。在 MI/R 损伤的大鼠模型中炎症细胞因子水平显著升高, 而给予 RSV 处理后上述炎症细胞因子水平明显降低, 提示通过早期的 RSV 处理抑制炎症反应, 能够有效地减轻 MI/R 损伤^[12]。

在上述文献研究的基础上, 本研究通过网络药理学预测 RSV 治疗 MI/R 损伤的关键靶基因。结果发现: 用 TCMSP 数据库筛选得到 RSV 作用有效基因靶点共 128 个, 用 GeneCards 筛选得到 MI/R 损伤相关靶基因共 1 231 个, 两者交集后共有 86 个可能成为 RSV 治疗 MI/R 损伤的相关基因, 其中包括 Bcl-2、caspase-3 和 TRAIL 等。以往研究表明, RSV 能够通过抑制 caspase-3 活性, 促进 Bcl-2 蛋白表达, 进而降低心肌细胞凋亡率, 减轻 MI/R 损伤^[13-14]。本研究进一步采用 Cytoscape 软件成功构建了 RSV 治疗 MI/R 损伤的基因调控网络拓扑图, 涉及 86 个关键靶基因。通过 GO 功能富集分析发现, 关键靶基因主要富集在细胞因子受体结合、磷酸酶结合、蛋白磷酸酶结合和抑制转录因子结合等生物学功能, 而 KEGG 通路富集共涉及 157 条信号通路, 其中排在前 3 位的是参与糖尿病并发症调控的 AGE-RAGE 信号通路 (29/86)、卡波肉瘤相关性疱疹病毒感染通路

(26/23) 和细胞凋亡信号通路 (23/86)。而在细胞凋亡信号通路中涉及 23 个基因, 包括 TRAIL、caspase-3 和 Bcl-2 等基因。因此, 本研究进一步通过大鼠体内实验验证 RSV 治疗 MI/R 损伤可能与细胞凋亡通路及这 3 个基因表达有关。

TRAIL 是肿瘤坏死因子超家族成员之一, 通过与其不同的受体结合, 参与调控细胞增殖、凋亡和炎症反应等病理生理学过程^[15-16]。有文献显示, 在胰腺癌细胞系 (SW1990、PaTu8988 和 BxPC3) 中, 过表达 TRAIL 能够上调 TRAIL 受体 1 和 2 的表达, 促进肿瘤细胞凋亡^[17]; 在急性淋巴细胞白血病细胞株中, 体外联合枸杞多糖和 TRAIL 能够激活 caspase-3 活性, 增加肿瘤细胞对 TRAIL 诱导细胞凋亡的敏感性^[18]。以上研究结果共同表明, TRAIL 在细胞凋亡中发挥重要作用。但是有关 TRAIL 对 MI/R 损伤引起心肌细胞凋亡的作用尚未见报道。因此, 笔者基于前期的网络药理学分析结果推测, RSV 可能通过调控 TRAIL 表达, 逆转 MI/R 损伤。因此, 本课题组构建了 MI/R 损伤大鼠模型, 探究 RSV 能否通过抑制 TRAIL 表达, 降低心肌细胞凋亡, 进而减轻心肌损伤。HE 染色结果显示, 与 MI/R 组大鼠相比, RSV 组大鼠心肌纤维排列规则, 心肌间隙变小。TUNEL 染色结果显示, 心肌细胞凋亡率显著降低。进一步通过蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白表达, 结果发现与 MI/R 组相比, RSV 组 caspase-3 表达水平显著降低, Bcl-2 表达水平显著升高。为明确 RSV 能否通过调控 TRAIL 表达来抑制细胞凋亡, 本研究采用免疫组织化学法和蛋白质印迹法检测 TRAIL 蛋白表达, 结果显示: 相比于 Sham 组, MI/R 组 TRAIL 表达量显著增加, 而 RSV 处理后 TRAIL 表达水平显著降低。以上结果表明, RSV 能够通过调控 TRAIL 表达抑制 MI/R 心肌细胞凋亡。

综上所述, 本研究通过网络药理学预测以及大鼠体内实验验证发现, RSV 能够抑制 TRAIL 蛋白表达, 降低心肌细胞凋亡, 进而减轻 MI/R 损伤; 这为今后应用 RSV 治疗 MI/R 损伤提供了新的理论基础。

参考文献:

- [1] Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(7):165768.
- [2] Aslan G, Atessahin A, Sahna E. The inhibition of apoptosis through myocardial postconditioning by affecting Fas/FasIg signaling through miR139-3p and miR181a-1[J]. *J Card Surg*, 2020, 35(3):564-570.
- [3] 刘丽凤, 王禹. 细胞程序性死亡与心肌再灌注损伤的研究进展[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2015, 17(5):549-550.
- [4] 符武岛, 曾敏, 陈娟, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯通过抑制心肌细胞凋亡缓解心肌缺血再灌注损伤的机制研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(16):2187-2192.
- [5] Xu RY, Xu XW, Deng YZ, et al. Resveratrol attenuates myocardial hypoxia/reoxygenation-induced cell apoptosis through DJ-1-mediated SIRT1-p53 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(2):401-406.
- [6] Guo Y, Zhang L, Li F, et al. Restoration of sirt1 function by pterostilbene attenuates hypoxia-reoxygenation injury in cardiomyocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016(776):26-33.
- [7] 尹佳, 杨若晗, 赵晓东, 等. 蒙药广枣叶总黄酮对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(16):2253-2257.
- [8] Hung LM, Su MJ, Chu WK, et al. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 135(7):1627-1633.
- [9] 李先宽, 李赫宇, 李帅, 等. 白藜芦醇研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(14):2568-2578.
- [10] Xu G, Zhao X, Fu J, et al. Resveratrol increase myocardial Nrf2 expression in type 2 diabetic rats and alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI)[J]. *Ann Palliat Med*, 2019, 8(5):565-575.
- [11] Li J, Xie C, Zhuang J, et al. Resveratrol attenuates inflammation in the rat heart subjected to ischemia-reperfusion: Role of the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2):1120-1126.
- [12] Cheng L, Jin Z, Zhao R, et al. Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia-reperfusion injury: role of Nrf2/ARE pathway [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7):10420-10428.
- [13] Xu H, Cheng J, Wang X, et al. Resveratrol pretreatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting STIM1-mediated intracellular calcium accumulation [J]. *J Physiol Biochem*, 2019, 75(4):607-618.
- [14] Wang B, Yang Q, Sun YY, et al. Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(8):1599-1611.
- [15] Beyer K, Baukloh AK, Stoyanova A, et al. Interactions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) with the immune system: implications for inflammation and cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1161.
- [16] Nash M, McGrath JP, Cartland SP, et al. Tumour necrosis factor superfamily members in ischaemic vascular diseases [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(4):713-720.
- [17] 田锐, 秦仁义, 杜志勇, 等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的抗胰腺癌细胞的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 7(11):821-825.
- [18] 陈诚, 马钰, 李义德, 等. 枸杞多糖单独或联合TRAIL对MLL基因重排急性淋巴细胞白血病细胞凋亡的影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(4):1104-1110.

Molecular Mechanism of Resveratrol Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats Based on Network Pharmacology

ZHANG Xiaojie, JIANG Lei

(Department of Pharmacy, Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei 230041, China)

Correspondence to: JIANG Lei, E-mail: tonyjlei2020@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of resveratrol (RSV) against myocardial ischemia-reperfusion (MI/R) injury and its mechanism in rats based on the network pharmacological information screening method. **Methods** TCMSP database was used to screen the target genes of RSV, and GeneCards database was used to screen MI/R injury-related target genes. R programming language was used to achieve the intersection of the two sets, indicating the possible target genes for RSV treating MI/R injury, then a gene network was drawn by Cytoscape software to screen out the core target genes. Finally, the GO function and KEGG pathway of the screened gene targets were analyzed by R language. Thirty SD rats were randomly divided into a sham operation group (Sham group), an ischemia-reperfusion group (MI/R group) and a RSV administration group (RSV group). The MI/R injury rat model was induced by ligating the anterior descending coronary artery. The serum contents of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and cardiac troponin I (cTn I) as well as the size of myocardial infarction area in the MI/R injury model rats induced by ligation of left anterior descending of coronary artery were determined. Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe the structure of myocardium, TUNEL staining was used to detect cardiomyocyte apoptosis, immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the expressions of apoptosis-related proteins (caspase-3 and Bcl-2) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **Results** According to the screening of pharmacology information, there were 86 core genes in RSV treatment of MI/R injury, which mainly involved the biological processes such as cytokine receptors, phosphatase binding, and death receptors, as well as the AGE-RAGE signaling pathway, apoptosis and other signaling pathways regulating diabetic complications. Compared with the Sham group, the expression of TRAIL protein, the contents of LDH, CK and cTn I, and the infarct size increased ($P<0.01$, or $P<0.05$), while the arrangement of myocardial muscle fibers was disordered, and the apoptosis rate and caspase-3 protein expression level increased ($P<0.05$), but the expression of Bcl-2 was down-regulated ($P<0.05$). However, in the RSV group, the arrangement of myocardial muscle fibers was relatively regular, while the expression of TRAIL protein, the contents of LDH, CK and cTn I, as well as the infarct size and apoptosis rate were significantly reduced (all $P<0.05$). **Conclusion** RSV may inhibit apoptosis and reverse MI/R injury by regulating TRAIL protein expression.

[Key words] Network pharmacology; Resveratrol; Myocardial ischemia-reperfusion; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Apoptosis; Rats