

·方药研究·

加味丹参饮抑制 p38MAPK 表达保护缺氧/复氧 乳鼠心肌细胞损伤的实验研究

陈 聪, 廖 菁, 李 鑫, 宋厚盼, 黄政德*
(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 观察加味丹参饮含药血清对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)乳鼠心肌细胞 p38 MAPK 蛋白表达的影响, 以探讨其保护心肌的作用机制。**方法** 将 20 只 SD 乳鼠的心肌细胞进行原代培养, 建立 H/R 模型并随机分为 H/R 组、SB203580 (p38MAPK 阻断剂组)、加味丹参饮含药血清组, 正常心肌细胞组作为对照组。采用 T 淋巴细胞化学染色法鉴定心肌细胞, 罗丹明 B(Rhodamine B)染色法观察细胞形态, MTT 比色法检测含药血清对乳鼠心肌细胞的毒性, Western-blot 法检测 MKK3 (促分裂原活化蛋白激酶-激酶 3)、MKK6 (促分裂原活化蛋白激酶-激酶 6)、p38MAPK、phospho-p38MAPK 蛋白表达。**结果** 与正常血清对照组比较, H/R 组 MKK3、MKK6 的蛋白表达增多, p38MAPK 通路阻断剂 SB203580 和加味丹参饮均不能减少其表达; p38MAPK、phospho-p38MAPK 在 H/R 时表达均增加 ($P < 0.01$), 而 SB203580 和加味丹参饮含药血清均能减少其表达 ($P < 0.01$)。**结论** 加味丹参饮含药血清预处理可通过抑制缺氧、复氧心肌细胞 p38MAPK 信号通路发挥保护作用, 抑制 p38MAPK 表达及其磷酸化, 减轻心肌细胞损伤, 起到保护心肌细胞的作用。

[关键词] 加味丹参饮; 心肌细胞; 缺氧/复氧; p38MAPK 信号通路; 促分裂原活化蛋白激酶-激酶 3; 促分裂原活化蛋白激酶-激酶 6; 丹参; 檀香; 赤芍

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.02.010

Experimental Study of Modified Jiawei Danshen Decoction on the Protection of Hypoxia/Reoxygenation Myocardial Cells Injury by Inhibition of p38MARK Expression in Neonatal Rats

CHEN Cong, LIAO Jing, LI Xin, SONG Houpan, HUANG Zhengde*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the protective effect of modified Danshen Decoction containing serum on p38MARK expression in myocardial cells of hypoxia/reoxygenation (H/R) neonatal rats and investigate its underlying molecular mechanisms. **Methods** Cardiomyocytes from 20 neonatal SD rats were primary cultured, and the built H/R models were randomly divided into H/R group, SB203580 group (p38MAPK inhibitor group), modified Danshen Decoction-containing serum group, and the normal cultured cardiomyocytes were as the control group. Cardiomyocytes were identified by T cell chemical staining method, and the morphologic changes in cardiomyocytes were observed by the Rhodamine B staining. Cytotoxicity of drug-contained sera was determined by the MTT method. Expression of MAP Kinase Kinase 3 (MKK3), MKK6, p38MAPK, and phospho-p38MAPK were measured by the Western blotting. **Results** Compared with the normal serum control group, the expressions of MKK3 and MKK6 were increased in H/R group, which was not altered by SB203580 and modified Danshen Decoction; The levels of p38MAPK and phospho-p38MAPK at H/R were increased, while the p38MAPK and phospho-p38MAPK expression in SB203580 and modified Danshen Decoction groups were decreased. **Conclusion** The modified Danshen Decoction could protect

[收稿日期] 2015-09-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81373576); 湖南省中医药科研计划课题(B0347); 湖南省教育厅科学研究项目(14C0872); 湖南省科技厅科学研究项目(2014SK3034); 湖南省中医药管理局重点课题(201304); 湖南中医药大学优秀教师培养计划(2015)。

[作者简介] 陈 聪, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中医内科学心血管疾病。

[通讯作者]* 黄政德, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: Hzd112@163.com。

cardiomyocytes and decrease H/R-induced myocardial cells injury by inhibiting the expression and phosphorylation of p38MAPK through the inhibition of its p38MAPK signaling pathway.

[**Keywords**] modified Danshen Decocotion; cardiomyocytes; hypoxia/reoxygenation; p38MAPK signaling pathway; MAP Kinase Kinase 3; MAP Kinase Kinase 6; *Salvia miltiorrhiza*; sandalwood; red peony root

心肌缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤是目前心血管疾病研究的热点,新近研究显示了中医药预处理对心肌IR损伤保护的优势^[1]。p38丝裂原激活的蛋白激酶(p38MAPK)信号通路是1993年发现的一类MAPK信号通路,它通过转录因子磷酸化而改变基因的表达水平,参与多种胞内信息传递过程,被认为是细胞众多信号转导通路的中转站。在心肌IR时由于氧自由基和细胞因子的大量释放而激活p38MAPK,p38MAPK把信息传到核内,引起一些早期基因的表达^[2-3]。

加味丹参饮是从《时方歌括》中的丹参饮去砂仁,加川芎、当归等化裁而成,课题组前期临床与实验研究发现,采用加味丹参饮治疗心肌IR损伤能取得满意的疗效^[4-5]。加味丹参饮对冠心病有较好降脂作用,对家兔食饵性动脉粥样硬化具有显著的防治作用,对IR损伤心肌有保护作用。本研究通过观察加味丹参饮含药血清对缺氧/复氧(H/R)乳鼠心肌细胞的保护作用及p38MAPK蛋白表达影响研究,旨在为加味丹参饮治疗心肌细胞IR损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

选用20只12 h~1 d龄SD乳鼠,雌雄不拘;20只清洁级SD雄性大鼠,体质量200~250 g,均由湖南中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药物

加味丹参饮(丹参20 g,檀香6 g,赤芍10 g,川芎6 g,当归6 g,红花6 g,生地黄12 g)饮片购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,经水煎浓缩至含生药量为2 g/mL。

1.3 试剂

SB203580(p38MAPK抑制剂)(碧云天生物技术研究),促分裂原活化蛋白激酶-激酶3(MKK3)、促分裂原活化蛋白激酶-激酶6(MKK6)、p38MAPK、phospho-p38MAPK兔抗小鼠一抗(美国

CST公司),HRP标记羊抗兔二抗(美国KPL公司),RNAiso Plus reagent、PrimeScript™ RT Master Mix、SYBR Premix Ex Taq™ II(日本Takara生物公司)。

1.4 仪器设备

M2300二氧化碳培养箱(美国Sheldon公司),IX-71型倒置显微镜(日本Olympus公司),PowerPac Universal电泳仪、Mini-Sub Cell GT水平电泳槽、ChemiDoc™ XRS+成像仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 加味丹参饮含药血清制备

将20只SD成年大鼠随机分为正常血清对照组和药物血清组,分别制备正常血清和药物血清。药物血清组以6.42 g/kg加味丹参饮灌胃,正常血清对照组以等量生理盐水灌胃,均为每日2次,连续3 d。于末次给药1 h后在无菌条件下进行腹主动脉取血,分离血清;56 ℃、30 min灭活补体后,采用0.22 μm微孔滤膜滤过除菌,分装,置于-20 ℃保存备用。

2.2 乳鼠心肌细胞原代培养

无菌条件下,开胸取出SD乳鼠心脏,弃除与心脏相连大血管和心房组织,于4 ℃ PBS缓冲液中漂洗3次。接着采用眼科剪将心室组织剪成0.5~1 mm³碎块,加入1 mL 0.08%胰酶于37 ℃恒温水浴箱中消化5 min,弃除全部上清液。接着在沉淀中加入1 mL混合酶(0.06%胰酶+0.08% I型胶原酶)振荡消化5 min,静置后将上清液移入离心管,用含15%特级胎牛血清的DMEM-H培养液中止消化。重复以上消化步骤3次,收集各次上清液,经200目筛网滤过,850 r/min离心10 min。弃去上清液,用含15%特级胎牛血清的DMEM-H培养液吹散沉淀细胞,采用差速贴壁法弃除成纤维细胞。将未贴壁的心肌细胞浓度调整至5×10⁵/mL,接种于6孔板,每孔添加2.5 mL培养液。另以1×10⁴个/孔接种于96孔板内,每孔加

入 200 μL 培养液,以进行 MTT(噻唑蓝)检测。用培养液将药物血清调配成原浓度的 5%、10%、15%、20%、25%、30% 六个浓度,用于检测药物血清细胞毒性并确定最佳给药浓度。

2.3 心肌细胞缺氧/复氧模型的建立及分组处理

参考文献^[6]方法将培养的心肌细胞分别予以不同预处理,培养 30 min。接着配制不含血清的低糖 DMEM 培养基,加入双抗(青霉素+链霉素)。用无菌 N_2 (流速为 1 L/min) 将培养基充分饱和 30 min,使溶液氧分压从 20 KPa 降至 4 KPa。迅速将该饱和后的培养基置换六孔板内的原培养基,并将六孔板置入消毒的塑料袋,通入高纯度 N_2 ,于 37 $^\circ\text{C}$ 密封。3 h 后将含饱和 N_2 培养液换为正常培养液,置入充满医用氧气的消毒塑料袋内,37 $^\circ\text{C}$ 密闭,复氧 2 h,收集上清液。正常血清对照组在完全培养基中加入与含药血清同工作浓度的大鼠正常血清,连续常规培养 24 h;H/R 组为先缺氧 3 h,后复氧 2 h;SB203580 组在培养液中加入 p38MAPK SB203580(终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$);加味丹参饮含药血清组则在培养液中加入相应浓度的加味丹参饮含药血清。

2.4 检测项目及指标测定

2.4.1 心肌细胞鉴定与形态学观察 采用心肌特异性肌钙蛋白 T(cTnT)免疫细胞化学染色法对心肌细胞进行处理,通过倒置显微镜观察鉴定心肌细胞。缺氧处理后,采用罗丹明 B(Rhodamine B)染色。

2.4.2 MTT 比色法检测含药血清对乳鼠心肌细胞的细胞毒性 乳鼠心肌细胞给药预处理后,每孔继续加入 22.2 μL 5 mg/mL 的 MTT 溶液,吹打混匀,于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温孵育 4 h,接着吸弃含 MTT 的培养液,每孔加入 150 μL DMSO 通过酶标仪检测各孔在 490 nm 处的吸光度(OD 值)。

2.4.3 Western-blot 法检测 MKK3、MKK6、p38MAPK、磷酸化 p38MAPK 蛋白的表达 乳鼠心肌细胞给予受试药后,采用 RIPA 裂解液提取心肌细胞总蛋白,BCA 法对蛋白进行定量,制备 Western Blot 上样样品,接着进行 SDS-PAGE 电泳。停止电泳后,将海绵垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜组成的“三明治”结构放置于转膜液中恒流 200 mA 转膜 90 min。接着将 PVDF 膜置于含 5% BSA 的 TBST 中封闭 1 h,洗膜 3 次后分别用小鼠来源 β -actin、MKK6、p38MAPK、

phospho-p38MAPK 一抗和兔来源 MKK3 一抗 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗膜 3 次后加入相应二抗室温孵育 2 h,加入 ECL 发光液反应 5 min 后,在 ChemiDoc XR+ 成像仪中观察蛋白条带表达情况,并用仪器自带的 Image Lab 软件统计分析各组蛋白条带的光密度值。实验重复 3 次取光密度平均值。

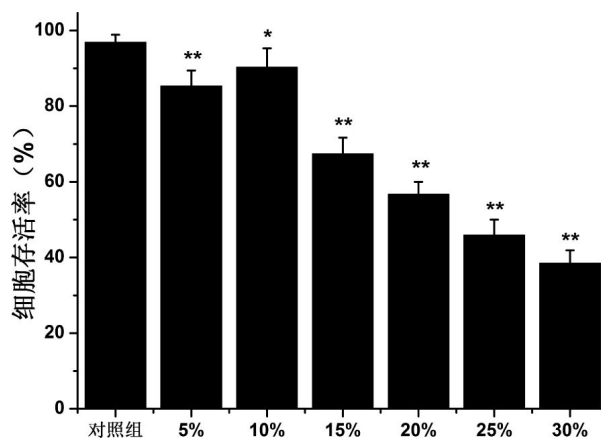
2.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析,所有计量资料数据均用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用 LSD 法,方差不齐者用 Dunnett's T3 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 心肌细胞的鉴定及最佳加味丹参饮含药血清测定

倒置显微镜下观察贴壁的心肌细胞呈多角形,大小较均匀,含 1~2 个细胞核,单个细胞可见自发性搏动。H/R 后的心肌细胞形态较为皱缩,自发性搏动的心肌细胞数目减少,搏动频率减慢,搏动幅度变小,同步化搏动几乎消失。采用 cTnT 免疫细胞化学染色法对上清液进行检测,确定为心肌细胞。经 MTT 法检测确定 10%浓度的加味丹参饮含药血清为最佳工作浓度(图 1)。



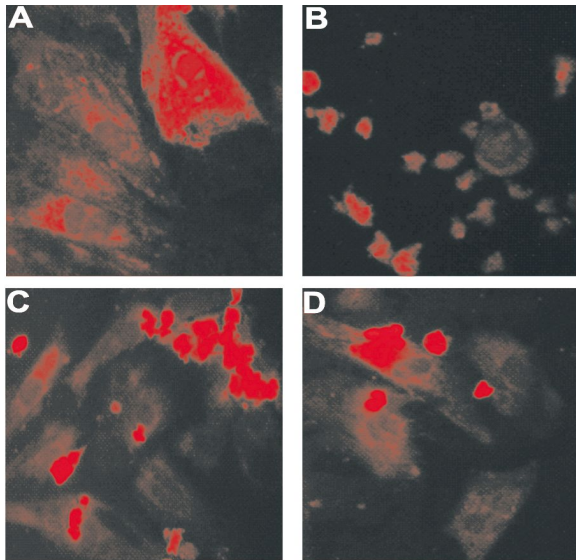
注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 1 加味丹参饮含药血清最佳工作浓度筛选柱形图

3.2 加味丹参饮对 H/R 心肌细胞形态学影响

正常心肌细胞呈圆形、梭形、菱形或多角形,细胞逐渐在皿底铺展,伸出伪足,形成不规则的星形并

相互接触交织成网,无碎片;H/R组细胞形态极不规则,可见大量细胞碎片;SB203580组心肌细胞形状较规则,碎片较多;10%加味丹参饮含药血清预处理后,心肌细胞形状较规则,碎片明显减少。见图2。

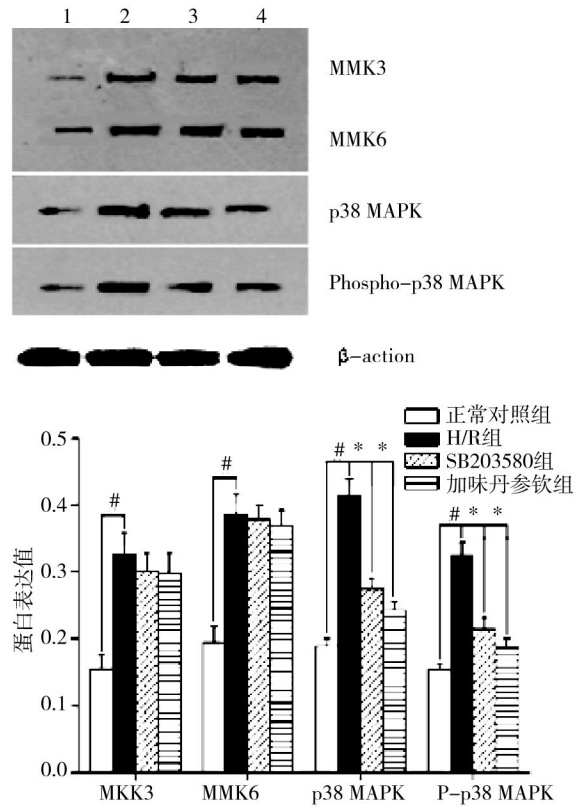


注:A.正常血清对照组,B.H/R组,C.SB203580组, D:加味丹参饮含药血清组

图2 H/R心肌细胞形态倒置显微镜观察图(Rhodamine B染色,×400)。

3.3 加味丹参饮对H/R心肌细胞MKK3、MKK6、p38MAPK、phospho-p38MAPK蛋白表达的影响

与正常血清对照组比较,H/R组乳鼠心肌细胞的MKK3、MKK6、p38MAPK、phospho-p38MAPK蛋白表达均明显增加($P < 0.01$);与H/R组比较,SB203580组及加味丹参饮含药血清组乳鼠心肌细胞的MKK3、MKK6蛋白表达均无明显变化($P > 0.05$),而p38MAPK、phospho-p38MAPK蛋白表达均明显减少($P < 0.01$);与SB203580组比较,加味丹参饮含药血清组乳鼠心肌细胞的MKK3、MKK6、p38MAPK、phospho-p38MAPK蛋白表达均无明显变化($P > 0.05$)。以上结果提示,H/R时MKK3、MKK6的蛋白表达增多,而p38MAPK通路阻断剂SB203580和加味丹参饮均不能减少其表达;p38MAPK、phospho-p38MAPK在H/R时表达亦均增加,但SB203580和加味丹参饮含药血清均能减少其表达。见图3。



注:1.正常血清对照组,2.H/R组,3.SB203580组, 4.加味丹参饮含药血清组。

与正常血清对照组比较#($P < 0.01$),与H/R组比较*($P < 0.01$)。

图3 加味丹参饮含药血清对H/R心肌细胞MKK3、MKK6、p38MAPK、phospho-p38MAPK蛋白表达影响(上为电泳图,下为柱状图)

4 讨论

大量研究表明,心肌IR可导致心肌细胞超微结构、功能、代谢及电生理方面发生进一步损伤^[7]。减轻和消除心肌IR造成的心肌组织损伤是心血管研究领域亟待解决的重大科学问题,引起了国内外研究者的高度关注。有研究表明,p38MAPK信号通路的激活在心肌IR的病理生理进程中具有重要作用^[2-3,8-9]。研究认为,心肌IR时,细胞因子和氧自由基的大量释放,促进p38MAPK信号通路的特异性激活物MKK3、MKK6的磷酸化,进而激活p38MAPK信号通路,促进多核白细胞、黏附分子和细胞活化素等在心肌再灌注区域聚集,从而加剧炎症反应,造成心肌损伤^[8-10]。因此,抑制p38MAPK信号通路的活化可能是治疗心肌IR的重要靶标。

新近研究显示,中医药预处理能有效保护心肌IR损伤^[11-12]。课题组前期研究显示,无论是临床研

究,抑或是实验研究,加味丹参饮均对心肌 IR 损伤具有良好的保护作用^[5,12-15]。本课题组采用心肌细胞 H/R 损伤模型以模拟心肌 IR 损伤模型,对加味丹参饮保护心肌 IR 损伤的作用机制进行详尽的探讨。研究结果显示,加味丹参饮对乳鼠心肌细胞 p38MAPK 及 phospho-p38MAPK 蛋白均有较好的抑制作用,而对上游 MKK3、MKK6 蛋白表达无影响。研究提示,加味丹参饮可能是直接作用于 p38MAPK 和 phospho-p38MAPK 蛋白而发挥其保护心肌 IR 损伤作用。

综上所述,加味丹参饮预处理对心肌 IR 损伤具有良好的保护作用,其作用机制可能与抑制 p38MAPK 信号通路的活化,进而抑制多核白细胞、黏附分子和细胞活化素等炎性细胞在心肌再灌注区域聚集有关。

参考文献:

- [1] Liang Z, Liu LF, Yao TM, et al. Cardioprotective effects of Guanxinshutong (GXST) against myocardial ischemia/ reperfusion injury in rats[J]. J Geriatr Cardiol, 2012, 9(2):130-136.
- [2] Ran K, Gong ZX, Yang DL, et al. Effect of morphine preconditioning in the delayed phase on the expression of p38Mitogen-activated protein kinase in a rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2):6 642-6 648.
- [3] Kim SJ, Jeong CW, Bae HB, et al. Protective effect of sauchinone against regional myocardial ischemia/reperfusion injury: inhibition of p38MAPK and JNK death signaling pathways [J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(5):572-575.
- [4] 吴若霞,黄政德,谢雪姣,等.黄政德教授治疗冠心病心绞痛临床经验[J].湖南中医药大学学报,2015,35(4):33-35.
- [5] 陈 辉,黄政德.不同剂量加味丹参饮预处理对缺血再灌注损伤大鼠超敏 C 反应蛋白的影响[J].湖南中医杂志,2014,30(10):145-147.
- [6] Pi Y, Goldenthal MJ, Marin-Garcia J. Mitochondrial involvement in IGF-1 induced protection of cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 301(1-2):181-189.
- [7] Nagaoka K, Matoba T, Mao Y, et al. A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction: Nanoparticle-Mediated Delivery of Pitavastatin Induces Cardioprotection from Ischemia-Reperfusion Injury via Activation of PI3K/Akt Pathway and Anti-Inflammation in a Rat Model [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132451.
- [8] Wang J, Yang H, Hu X, et al. Dobutamine-mediated heme oxygenase-1 induction via PI3K and p38MAPK inhibits high mobility group box 1 protein release and attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo [J]. J Surg Res, 2013, 183(2):509-516.
- [9] Gao F, Yue TL, Shi DW, et al. p38MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(2):414-422
- [10] 段明军,陈冰心,任 澎,等.心肌缺血再灌注损伤中信号分子 p38MAPK 的作用[J].生物医学工程研究,2014,33(1):19-23.
- [11] 徐 冰,刘 蓓,朱海燕,等.黄芪多糖对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌信号 p38 通路的影响[J].中医杂志,2012,53(1):52-54.
- [12] 李鑫辉,黄政德,葛金文.加味丹参饮对血瘀证兔心肌缺血再灌注损伤的影响[J].中国中医药信息杂志,2011,18(6):37-39.
- [13] 李鑫辉,黄政德,葛金文.加味丹参饮对血瘀证兔心肌缺血再灌注损伤家兔内皮细胞保护作用研究[J].中国药师,2011,14(1):3-6.
- [14] 黄政德,王庆高,刘东亮,等.加味丹参饮预处理对心肌细胞内钙超载的延迟保护作用[J].湖南中医药大学学报,2007,27(2):37-39.
- [15] 李鑫辉,黄政德,葛金文.加味丹参饮对血瘀证兔肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素-2 的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(1):53-55.

(本文编辑 杨 瑛)