

·方药研究·

加味丹参饮预处理调控自噬相关基因 Beclin-1 和 Atg5 表达抗大鼠心肌缺血再灌注损伤

彭霞,黄政德*,成细华,任婷,孙彦波,饶春梅
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

〔摘要〕 **目的** 探讨加味丹参饮预处理是否通过调节 Beclin-1 和 Atg5 表达调控自噬抗缺血再灌注损伤大鼠心肌。 **方法** 将 60 只健康 SD 大鼠随机分为空白对照(control group, C)组、假手术(sham, S)组、缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)组、IRI+加味丹参饮(Jiawei Danshen Yin, JDY)组、IRI+JDY+自噬抑制剂(inhibitor, I)组,每组 12 只。通过结扎-放松大鼠左冠状动脉前降支制备心肌 IRI 模型。通过氯化三苯基四氮唑(TTC)染色观察心肌梗死面积率;在透射电镜下观察自噬泡;采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测心肌 Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达;采用蛋白质印迹(western blot)法检测心肌 Beclin-1 蛋白表达变化。 **结果** IRI+JDY 组心肌梗死面积率显著低于 IRI 组及 IRI+JDY+I 组 ($P<0.01$)。电镜结果显示,IRI+JDY 组适度调节大鼠缺血再灌注损伤心肌细胞的自噬,改善心肌细胞结构。IRI 组大鼠心肌细胞中 Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达水平及 Beclin-1 蛋白表达较 SG 组显著升高($P<0.01$);IRI+JDY 组、IRI+JDY+I 组大鼠心肌细胞中 Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达水平及 Beclin-1 蛋白表达较 IRI 组显著降低($P<0.01$);IRI+JDY 组大鼠心肌细胞中 Beclin-1 和 Atg5 mRNA 表达水平及 Beclin-1 蛋白表达较 IRI+JDY+I 组显著升高 ($P<0.01$)。 **结论** 加味丹参饮通过调节缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞自噬相关基因 Beclin-1 和 Atg5 表达适度,调控缺血再灌注心肌细胞发生适度自噬,从而发挥细胞保护作用。

〔关键词〕 加味丹参饮;心肌缺血再灌注;自噬;Beclin-1;Atg5;丹参;檀香;川芎

〔中图分类号〕R285.5;R541.4 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.07.004

Pretreatment with Modified Danshen Decoction against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats by Regulating Autophagy Related Genes Beclin-1 and Atg5

PENG Xia, HUANG Zhengde*, CHENG Xihua, REN Ting, SUN Yanbo, RAO Chunmei
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the pretreatment with Jiawei Danshen decoction against myocardial ischemia reperfusion injury in rats whether by regulating Beclin-1 and Atg5 expression of autophagy. **Methods** The 60 healthy SD rats were randomly divided into control (C) group, sham-operation (S) group, ischemia reperfusion injury (IRI) group, IRI+Jiawei Danshen decoction (JDS) group, IRI+JDY+Inhibitor (I) group, 12 rats in each group. The IRI model was established by ligating-relaxing the left anterior descending coronary of rats. Myocardial infarction rate was measured by using triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The autophagic vacuoles were observed via transmission electron microscope (TEM). The mRNA expression of autophagy related gene Beclin-1 and Atg5 were detected by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the expression changes of myocardial Beclin-1 protein were detected by Western blot. **Results** The infarction rate in

〔收稿日期〕2016-03-10

〔基金项目〕国家自然科学基金资助项目(81373576,81503536);湖南省教育厅项目(14B136,14C0872);湖南省中医药管理局重点课题(201304);湖南省科技厅一般项目(2014SK3034);湖南省教育厅优秀青年项目(14B136);中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究湖南省高校科技创新团队科研项目。

〔作者简介〕彭霞,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管病研究。

〔通讯作者〕*黄政德,男,教授,博士研究生导师,E-mail:Hzdl12@163.com。

IRI+JDY group was significantly smaller than that in IRI group and IRI+JDY+I group ($P<0.01$). TEM showed that in IRI+JDY group, autophagy of cardiomyocytes could be regulated moderately and the structure of cardiomyocytes could be improved. The expression levels of Beclin-1 and Atg5 mRNA, and Beclin-1 protein in myocardium of rat in IRI group were significantly higher than SG group ($P<0.01$). The expression levels of Beclin-1 and Atg5 mRNA, and the expression of Beclin-1 protein in myocardium of rats in IRI+JDY group and IRI+JDY+I group were decreased significantly compared with the IRI group ($P<0.01$). The expression levels of Beclin-1 and Atg5 mRNA, and Beclin-1 protein in myocardium of rats with IRI+JDY group were significantly higher than that in IRI+JDY+I group ($P<0.01$). **Conclusion** The modified Danshen decoction can regulate the autophagy of ischemia reperfusion cardiomyocytes and protect the cells by regulating the autophagy related genes (Beclin-1 and Atg5).

[**Keywords**] modified Danshen decoction; myocardial ischemia reperfusion; autophagy; Beclin-1; Atg5; *Salvia miltiorrhiza*; sandalwood; Chuanxiong

心肌缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI) 指心肌在缺血的基础上恢复血液供应后组织损伤反而加重,出现梗死面积增大、心律失常等心肌细胞损伤现象,是近年来临床心血管病治疗中备受关注且较突出的问题。目前自噬现象在 IRI 的研究中引起了广泛关注。正常情况下,心脏维持一个低水平的自噬,低氧、能量缺少或炎症或其他应激状态都可以激活自噬^[1]。从目前研究成果来看,自噬就像一把“双刃剑”,它既能减缓疾病的进程,促进损伤恢复,也能致使细胞死亡。自噬的发生机制、调控因素及药物干预是目前心脏疾病研究领域的一个热点。

加味丹参饮是经过长期临床应用总结出的防治缺血性心肌病的有效方剂。前期研究表明^[2-5],加味丹参饮能够减少 IRI 心肌细胞凋亡,防止细胞内钙离子超载,降低炎症因子水平,改善机体血液流变性,降低炎症因子水平,改善机体血液流变性,从而起到保护心肌的作用。本实验通过观察加味丹参饮预处理是否通过调节自噬相关基因 Beclin-1 和 Atg5 表达而调控自噬,从而对抗大鼠 IRI,进一步探讨其保护心肌的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,220~300 g。购于湖南中医药大学实验动物中心。许可证号:SYXK(湘)2013-0005。

1.2 药物与试剂

加味丹参饮(丹参 20 g,檀香 6 g,川芎 6 g,红花 6 g,赤芍 10 g,黄芪 20 g,当归 6 g,生地黄 12 g),购于湖南中医药大学第一附属医院药房。Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司,美国);PCR 逆转录试剂盒(Fermentas 公司,立陶宛);PCR 引物(由长沙南科生物技术有限公司设计);SYBR Green PCR

Master Mix 试剂(ABI 公司,美国);Beclin-1 一抗(Abcam 公司,英国);Beclin-1 二抗、聚丙烯酰胺凝胶试剂盒及 3-甲基腺嘌呤(3-MA,Sigma 公司,美国),ECL 化学发光试剂盒(Pierce 公司,美国)。

1.3 实验仪器

DH-8 型人工呼吸机(浙江大学医学实验仪器厂);MPI50 型十六导生理记录仪(Biopac 公司,美国);Tecna G2 透射电镜(FEI 公司,美国);7900 型 Realtime-PCR 仪(ABI 公司,美国);JY-SPC 型水平电泳槽(北京君意东方仪器公司);DG-III 双稳数显电泳仪(北京鼎国生物技术发展中心);1-13 型高速离心机(SIGMA,德国);170-3930 型电转仪及附件(Bio-Rad 公司,美国);88018 NC 膜(Pierce 公司,美国);3MM CHR 滤纸(Whatman 公司,美国);胶片(Kodak 公司,美国)。

2 实验方法

2.1 实验分组及给药

将 SD 大鼠按性别、体质量分层随机分为 5 组,空白对照(control,C)组、假手术(sham,S)组、IRI 组、IRI+加味丹参饮(Jiawei Danshen Yin,JDY)组、IRI+JDY+自噬抑制剂(inhibitor,I)组;每组 12 只。C 组:处理前 7 d 灌胃与加味丹参饮等容量的生理盐水 2 次/d,连续 7 d,末次灌胃后 1 h 后行开胸取出心脏;S 组:开胸左冠状动脉前降支下穿线不结扎,余同空白组;IRI 组:开胸结扎左冠状动脉前降支 30 min 后松线,再灌注 1 h,余同空白组;IRI+JDY 组:大鼠造模前 7 d 予加味丹参饮灌胃,按 7.74 g/(kg·d),溶液浓度 1.548 g/mL,2 次/d,连续 7 d,于末次灌胃 1 h 后行开胸结扎左冠状动脉前降支;IRI+JDY+I 组:处理同 D 组,灌胃期间同时予以腹腔注射 3-MA,15 mg/kg,1 次/d,连续 7 d。

2.2 梗死面积率的测定

再灌注结束后取下心脏,置于-20℃冰箱冰冻1 h后,沿垂直心脏长轴方向从心尖到结扎线下方切片,每片厚约1~2 mm,放入1%TTC磷酸盐缓冲液(pH7.4)37℃水浴箱中孵育20 min,然后浸泡10%甲醛中固定过夜。扫描后应用图像分析软件(Image J)计算心肌梗死面积占心肌总面积百分比,非梗死区呈暗红色,梗死区呈灰白色。心肌梗死面积率=(所有切片梗死面积之和/心肌总面积之和)×100%。

2.3 电镜观察心肌组织结构改变

取大鼠左心室前壁组织,组织块约1 mm×1 mm×3 mm,将其置于2.5%戊二醛固定液中固定2 h,经0.1 mol/L磷酸漂洗液漂洗3次后再用1%锇酸固定2 h,丙酮梯度脱水。纯丙酮和环氧树脂浸泡、包埋,烘箱内烘烤固化。固化后制作超薄切片(50~100 nm),3%醋酸铀-硝酸铅双染色后,在透射电镜下观察、拍片。

2.4 RT-PCR法检测大鼠心肌Beclin-1、Atg5 mRNA的表达

取心肌组织约30 mg,碾磨匀浆,加入1 mL RNA提取试剂Trizol,离心后提取心肌细胞总RNA。根据反转录试剂盒说明书,将RNA反转录为cDNA,用于RT-PCR检测。RT-PCR引物序列为 β -actin(228 bp):5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'和5'-CTCTCAGCTGTGCTGCTGAA-3';Beclin-1(249 bp):5'-GTGCTCCTGTGGAATGGAAT-3'和5'-GCTGCACACAGTCCAGAAAA-3';Atg5(187bp):5'-GGGACCTCCTGAATCTCACA-3'和5'-CCAACAGGACAGCAGAGACA-3'。扩增程序为:95℃变性5 min,然后按照94℃变性20 s,60℃退火20 s的程序进行40个循环反应。最后行溶解曲线分析。目的基因mRNA相对含量以含量最低的样本为标准,其余各样本的含量均为相对该样本的倍数^[6]。

2.5 Western Blotting检测大鼠心肌Beclin-1蛋白表达

剪取约0.5 mg组织置于匀浆器中,加入1 mL总蛋白提取液(RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂)匀浆,低温下超声细胞破碎仪裂解3次,每次3 s,将匀浆液吸出放到1.5 mL离心管中,9000 r/min离心10 min后取上清液。调样品体积:5×loading buffer体积=5:1,拌匀,于100℃条件下加热3 min,使蛋白质变性。BCA法定量20 μg蛋白,经10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,通过电转仪将蛋白转移至

NC膜。电转结束后,将电转膜置于37℃下5%的脱脂奶粉(PBS配制)中封闭2 h。封闭的膜用PBST漂洗2~3次,切下膜条(3~5 mm宽)按顺序放于加样槽内,加入一抗Beclin-1约1 mL(按照体积比为1:1000稀释),室温下于摇床孵育2 h。弃去一抗,每个槽加入PBST约2 mL洗涤5~10 min,再加入二抗1 mL 4℃过夜。每条膜加入适量的发光底物试剂行化学发光,获得胶片。阳性条带用Gel pro 4.0版凝胶光密度软件分析,测累积光密度值(integrated optical density,IOD)。

2.6 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件处理,实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”描述,多组间均数比较采用单因素方差分析。方差不齐采用非参数检验。 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 加味丹参饮对大鼠IRI梗死面积率的影响

与C组相比,S组梗死面积率差异无统计学意义($P>0.05$);与S组相比,IRI组、IRI+JDY组及IRI+JDY+I组梗死面积率升高($P<0.01$);与IRI组相比,IRI+JDY组、IRI+JDY+I组梗死面积率均下降($P<0.01$);与IRI+JDY组相比,IRI+JDY+I组梗死面积率升高($P<0.01$)。见表1。

表1 各组间大鼠心肌梗死面积率的比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	心肌梗死面积率(%)
C	6.176±0.371
S	6.642±0.315
IRI	48.736±0.533 [△]
IRI+JDY	26.214±0.514 ^{△▲}
IRI+JDY+I	34.210±0.513 ^{△▲#}
F	7 985.971
P	0.000

注:与S组比较,△ $P<0.01$;与IRI组比较,▲ $P<0.01$;与IRI+JDY组比较,# $P<0.01$ 。

3.2 加味丹参饮对大鼠IRI中自噬泡的影响

透射电镜下观察发现,C组与S组大鼠心肌纤维排列基本规则、整齐,肌丝清晰;心肌细胞核质分布均匀,染色较淡,无核裂解及固缩现象;线粒体基本完整,无明显肿胀、聚集,线粒体嵴排列整齐、无断裂,线粒体内无空泡化现象;无明显自噬泡。IRI组心肌纤维排列紊乱、断裂,甚至消失;细胞核染色体固缩、边聚,核形不规则;线粒体明显肿胀,线粒体聚

集、大小不等,嵴明显减少,变短,甚至消失;细胞质中空泡多,有的被双层膜环绕,形成典型的自噬体和自噬溶酶体的自噬现象。IRI+JDY 组心肌纤维排列欠整齐;细胞核颜色较深,核形不规则;线粒体肿胀、少数线粒体嵴断裂,部分空泡化;可见少量自噬泡存在。IRI+JDY+I 组心肌纤维断裂、消失;细胞核染色体固缩、边聚,颜色深,核形不规则,核碎裂;线粒体聚集、大小不等,嵴断裂现象严重,甚至消失;细胞质大部分呈空泡化,无明显自噬泡。见图 1。

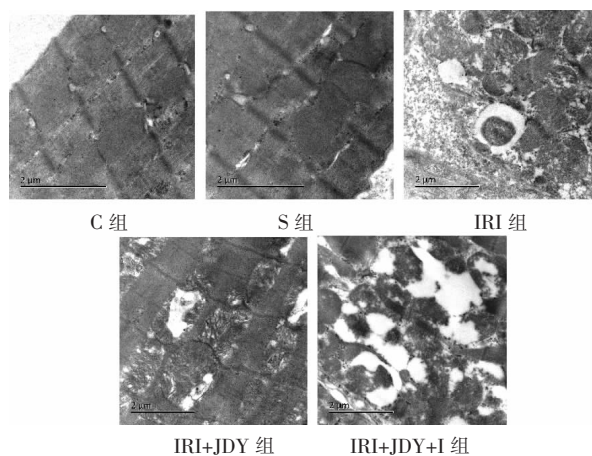


图 1 各组心肌细胞的自噬泡透射电镜观察图

3.3 加味丹参饮对大鼠心脏 IRI 自噬 Beclin-1、Atg5 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示:与 C 组相比,S 组 Beclin-1、Atg5 mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$);与 S 组相比,IRI 组、IRI+JDY 组 Beclin-1、Atg5mRNA 表达量均显著升高 ($P < 0.01$),IRI+JDY+I 组 Beclin-1mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)、Atg5mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.01$);与 IRI 组相比,IRI+JDY 组、IRI+JDY+I 组 Beclin-1、Atg5mRNA 表达量均显著下降($P < 0.01$);与 IRI+JDY 组相比,IRI+JDY+I 组 Beclin-1、Atg5mRNA 表达量均显著下降($P < 0.01$)。见表 2。

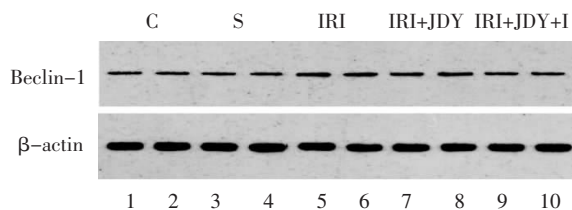
表 2 各组 Beclin-1、Atg5 mRNA 相对表达变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Beclin-1	Atg5
C	1.065±0.038	1.024±0.003
S	1.071±0.039	1.032±0.006
IRI	1.939±0.023 [△]	1.594±0.010 [△]
IRI+JDY	1.531±0.037 ^{△▲}	1.217±0.007 ^{△▲}
IRI+JDY+I	1.073±0.039 ^{▲#}	1.132±0.007 ^{△▲#}
F	721.220	6 956.459
P	000	0.000

注:与 S 组比较,△ $P < 0.01$;与 IRI 组比较,▲ $P < 0.01$;与 IRI+JDY 组比较,# $P < 0.01$ 。

3.4 加味丹参饮对缺血/再灌注心肌自噬 Beclin-1 蛋白表达量的影响

Western Blot 印迹结果显示:与 CG 组相比,SG 组 Beclin-1 蛋白表达量无明显变化($P > 0.01$);与 SG 组相比,IRI 组及 IRI+JDY 组 Beclin-1 蛋白表达量均显著升高($P < 0.01$),IRI+JDY+I 组 Beclin-1 蛋白表达量显著下降($P < 0.01$);与 IRI 组相比,IRI+JDY 组、IRI+JDY+I 组 Beclin-1 蛋白表达量均显著下降 ($P < 0.01$);与 IRI+JDY 组相比,IRI+JDY+I 组 Beclin-1 蛋白表达量显著下降($P < 0.01$)。见图 2,表 3。



注:C.1-2; S.3-4; IRI.5-6; IRI+JDY.7-8; IRI+JDY+I.9-10。

图 2 各组 Beclin-1 蛋白表达 Western Blot 条带

表 3 Beclin-1 蛋白表达值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Beclin-1
C	0.090±0.002
S	0.091±0.001
IRI	0.137±0.002 ^{△#}
IRI+JDY	0.120±0.002 ^{△▲#}
IRI+JDY+I	0.085±0.002 ^{△▲#}
F	950.825
P	0.000

注:与 S 组比较,△ $P < 0.01$;与 IRI 组比较,▲ $P < 0.01$;与 IRI+JDY 组比较,# $P < 0.01$ 。

4 讨论

自噬的全过程是由基因调控的,其中许多基因与自噬体形成有关。Beclin-1 基因是目前研究较多的自噬相关基因,对细胞自噬的调控过程中发挥重要作用,其表达强度与自噬活性密切相关,上调可刺激自噬的发生^[7]。有研究发现,通过自噬抑制剂干预或者敲出 Beclin-1 基因降低自噬后,可以降低 IRI 心肌细胞的死亡^[8]。Atg5 与 Atg12、Atg16 在自噬体膜上构成复合物,是一种泛素样蛋白结合系统,特异性地促进蛋白与脂质,在自噬体形成过程当中起重要作用^[9]。Beclin-1 及 Atg5 在自噬小体的形成过程中均发挥着不可或缺的作用,它们表达水平的上调可以促进自噬的发生,一旦自噬过度发生则导致细

胞凋亡。

以药物介导细胞自噬的发生有可能成为心肌 IRI 的治疗方式。雷萌等^[10]认为影响心肌自噬的化学药物有两类:他汀类药物及抗氧化剂丙泊酚。在心肌 IRI 损伤中,给予丙泊酚后,自噬小泡数量减少,Beclin-1 表达下调,与此同时,加快了丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(mTOR)信号通路的表达,抑制自噬的发生,对心脏具有保护作用^[11]。黄莉^[12]等发现黄芪甲苷可以减少大鼠心肌缺血再灌注梗死的面积,其机制与调节自噬相关基因 Beclin1 的表达有关。孙瑶^[13]等发现九龙藤总黄酮可能在缺血期诱导自噬的发生,而在再灌注期抑制自噬的过度表达,从而发挥抗 IRI 作用。李丽静等^[14]用参附汤血中移行成分作用于缺氧复氧的大鼠心肌与模型组对比,发现明显提高心肌细胞存活率,与抑制 Beclin-1 表达密切相关。本研究发现,IRI+JDY 组心肌梗死面积率明显低于 IRI 及 IRI+JDY+I 组,且电镜示 IRI+JDY 组心肌细胞损伤程度轻于 IRI 及 IRI+JDY+I 组,IRI+JDY 组的 Beclin-1 及 Atg5 均显著低于 IRI 组、同时显著高于 IRI+JDY+I 组。因此,心肌缺血/再灌注致过度自噬使心肌损伤加重,加自噬抑制剂(3-MA)过度抑制自噬使损伤加重,而加味丹参饮能调节适度自噬,从而发挥对心肌的保护作用。

综上所述,加味丹参饮可能通过 Beclin-1 和 Atg5 适度表达调控自噬,从而对抗大鼠 IRI,但相关机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 曾敏,颜红兵.自噬与心肌缺血再灌注[J].中华心血管病杂志,2012,40(8):711-713.
[2] 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.

- [3] 李鑫辉,黄政德,葛金文.加味丹参饮对心肌缺血再灌注损伤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.
[4] 李鑫辉,黄政德,喻嵘,等.益气活血法对瘀血证心肌缺血再灌注损伤兔血液流变性及内皮素的影响[J].中国中医急症,2010,19(2):269-271.
[5] 陈聪,廖菁,李鑫.加味丹参饮抑制 p38MAPK 表达保护缺氧/复氧大鼠心肌细胞损伤的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2016,36(2):35-39.
[6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
[7] Chang SH, Minai-Tehrani A, Shin JY, et al. Beclin-1-induced autophagy abrogates radioresistance of lung cancer cells by suppressing osteopontin[J]. J Radiat Res, 2012, 53(3): 422-432.
[8] Eguchi M, Kim YH, Kang KW, et al. Ischemia-reperfusion injury leads to distinct temporal cardiac remodeling in normal versus diabetic mice [J]. PLoS One, 2012, 7: 30 450-30 452.
[9] Hanada T, Noda NN, Satomi Y, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy[J]. J Biol Chem, 2007, 282(52): 37 298-37 302.
[10] 雷萌,刘颖.自噬在心肌缺血再灌注损伤中的作用及药物干预研究进展[J].医学综述,2013,19(23):4 258-4 261.
[11] Noh HS, Shin IW, Ha JH, et al. Propofol protects the autophagic cell death induced by the ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Mol Cell, 2010, 30(5): 455-460.
[12] 黄莉,王大伟,严夏,等.黄芪甲苷对缺血再灌注诱导的大鼠心肌损伤及细胞自噬的调节作用[J].中西医结合心脑血管病杂志.2015,13(6):752-754.
[13] 孙瑶,张婵,简洁.九龙藤总黄酮调控自噬对抗心肌缺血/再灌注损伤的实验研究[J].中国药理学通报.2015,31(2):232-236.
[14] 李丽静,刘佳,李玉梅,等.参附汤血中移行成分对缺氧复氧心肌细胞凋亡和自噬的影响[J].中医药临床杂志.2012,24(8):773-774.

(本文编辑 杨 瑛)