

本文引用:刘蓉芳,毛以林,谭雄,张辉,毛湘屏,杨柳,陈志成.心康冲剂改善慢性心衰模型大鼠心肌凋亡及调控 Caspase-3/9 的表达[J].湖南中医药大学学报,2019,39(8):948-951.

心康冲剂改善慢性心衰模型大鼠心肌凋亡及 调控 Caspase-3/9 的表达

刘蓉芳^{1,2}, 毛以林^{2*}, 谭雄², 张辉², 毛湘屏², 杨柳², 陈志成²

(1.江门市五邑中医院,广东 江门 529000;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南 长沙 410005)

〔摘要〕目的 探讨心康冲剂对心衰大鼠 Caspase-3、Caspase-9 表达的调控作用。方法 58 只 SD 大鼠分为正常组 10 只,模型组、心康组及对照组各 16 只,造模完后,心康组给予心康冲剂溶液 0.5 g/kg 灌服,对照组予芪蒯强心胶囊溶液 0.06 g/kg 灌服。采用心脏彩超检测心功能;心脏切片行 TUNNEL 染色法观察心肌细胞凋亡;心肌组织采用 Real-time PCR 法及免疫组化法检测 Caspase-3、Caspase-9 基因及蛋白质表达。结果 与正常组比,模型组大鼠 Caspase-3 及 Caspase-9 的 mRNA 与蛋白表达显著增加($P<0.01$),TUNNEL 染色观察细胞凋亡明显增多;与模型组比较,心康组大鼠心肌凋亡减轻, Caspase-9 mRNA、Caspase-3 mRNA 及蛋白明显下降($P<0.01$);与对照组相比,心康组心肌细胞凋亡相对降低,Caspase-3 蛋白表达下降($P<0.05$)。结论 心康冲剂可调控下调 Caspase-3、Caspase-9 表达抗心衰。

〔关键词〕 心肌凋亡;Caspase-3;Caspase-9;慢性心衰;心康冲剂

〔中图分类号〕 R285.5;R541.6

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.08.004

Xinkang Granule Improves Myocardial Apoptosis and the Expression of Caspase-3/9 in Rats with Chronic Heart Failure

LIU Rongfang¹, MAO Yilin^{2*}, TAN Xiong², ZHANG Hui², MAO Xiangping², YANG Liu², CHEN Zhicheng²

(1. Wuyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangmen, Guangdong 529000, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the regulatory effects of Xinkang Granule (XKG) on the rats with chronic heart failure (CHF) for the expression of Caspase-3 and Caspase-9. **Methods** A total of 58 SD rats were randomly divided into a normal group ($n=10$), a model group, a XKG group, and a control group, with 16 rats in each group. After the success of the modeling, the XKG group was given XKG solution at 0.5 g/kg, and the control group was given Qili Qiangxin Capsule (QLQXC) solution at 0.06 g/kg. Cardiac function was measured by echocardiography; Heart slices were stained by TUNNEL to observe myocardial apoptosis. The expression of gene and protein of Caspase-3, Caspase-9 were detected by Real-time PCR and immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the gene and protein of Caspase-3, Caspase-9 in the model group significantly increased ($P<0.01$). TUNNEL observed significant increase of apoptosis. Compared with the model group, the rats in XKG group showed alleviated myocardial apoptosis, and the Caspase-3, Caspase-9 mRNA and protein expression were significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the control group, the myocardial apoptosis in the

〔收稿日期〕 2017-09-10

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金(2016JJ4068);湖南省中医药科研计划(201610);国家重点实验室中医诊断学开放基金(2015ZYZD11);2016年研究生创新科研课题(2016CX08)。

〔作者简介〕 刘蓉芳,女,博士,研究方向:中医内科心血管。

〔通讯作者〕 * 毛以林,男,主任医师,博士研究生导师,E-mail:maoyilin8518@126.com。

XKG group was relatively decreased, and Caspase-3 decreased ($P<0.05$). **Conclusion** XKG has the function of anti-heart failure by regulating and controlling the expression of Caspase-3 and Caspase-9.

[**Keywords**] myocardial fibrosis; Caspase-3; Caspase-9; chronic heart failure; Xinkang Granule

多种病理因素(如肾上腺素、血管紧张素Ⅱ、氧化应激、致炎细胞因子、缺血、压力或容量负荷过重、缺氧等)均可使慢性心力衰竭(CHF)诱导出现心肌细胞凋亡^[1-2]。心肌凋亡是心衰心脏重构(cardiac remodeling, CR)表现形式之一。由半胱氨酸天冬氨酸酶(Caspases)家族蛋白介导的心肌凋亡途径是内源性凋亡途径,Caspase-3是细胞凋亡的标志^[3],处于凋亡级联上游,传递信号给下游的Caspase-9从而启动凋亡程序,Caspase-3/-9是经典凋亡通路中的两个关键蛋白。

ARB、ACEI类药物是临床抗心肌重构药物,由于其相对适应症、禁忌症导致药物使用有一定局限性,因而探讨安全有效的抗心肌凋亡中药显得尤为迫切。心康冲剂具有健脾渗湿、温阳化气逐水饮的功效,前期研究显示其具有抗慢性心力衰竭^[4],并能改善心肌重构^[5-6]。本研究观察心康冲剂调控慢性心力衰竭大鼠Caspase-3、Caspase-9表达,探讨其对慢性心力衰竭大鼠抗心肌凋亡的作用,为治疗心衰提供了新的途径。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

58只SPF级SD大鼠,雌雄各半,5周龄,体重(160±20)g,购于湖南斯克达实验动物有限公司(实验动物合格证号:43004700025096)。

1.2 药品及仪器

盐酸阿霉素(深圳万乐药业),末端脱氧核苷酸转移酶(TdT,上海江莱生物);actin(1:4 000,Mouse,美国proteintech),二抗HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(美国proteintech),HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(美国proteintech),Caspase-3(1:1 000,Rabbit,美国CST),Caspase-9(1:200,Rabbit,美国proteintech),TUNEL试剂盒(武汉博士德生物公司),免疫组化二抗试剂盒PV-9000(北京中杉金桥生物公司),引物(上海生工合成),心康冲剂(湖南省中医院中药制剂室制备)。动物用彩色多普勒超声仪(徐州市大为电子设备有限公司),生物信号采集系统(成都泰盟软件有限公司),LEICA DM LB2型双目显微镜(德国LEICA),Motic B5显微摄像图像分析系统(麦克奥迪实业集团),BX43型双目生物摄像显微镜(日本

Olympus)。

2 方法

2.1 动物分组及造模

取大鼠10只为正常组,余下大鼠48只按1.5 mg/kg剂量腹腔注射阿霉素,每周2次,共注射7周,以左心室短轴缩短率<30%^[7]为心衰造模成功,造模方法参考文献[8];再按随机数字表法分为阿霉素对照组(模型组)16只,心康冲剂1倍等效剂量组16只(心康组),芪苈强心胶囊组(对照组)16只。

2.2 药物制备及干预

心康冲剂溶液配制:白参10g,薏苡仁30g,大腹皮10g,黄芪30g,桔梗5g,升麻5g,柴胡5g,桂枝10g,茯苓15g,生姜皮10g,陈皮10g,炒白术10g,制附片10g,砂仁6g。经湖南省中医院药剂科制成干燥颗粒后,按成人等效剂量0.5g/kg配制成浓度为0.6g/mL的溶液;对照组给予芪苈强心胶囊溶液,按成人等效剂量(0.06g/kg),配制为浓度0.073g/mL。大鼠灌胃剂量按人和动物体表面积折算^[9],正常组、模型组予等体积生理盐水灌服,每日1次,连续8周。

2.3 指标及检测方法

2.3.1 心脏超声检测心功能 10%水合氯醛溶液按3mL/kg麻醉大鼠后前胸脱毛,超声诊断仪取大鼠左心室长轴切面后进行M超声检测,测量左心室短轴缩短率(LVFS)、左室舒张期内径(LVIDd)、左室射血分数(LVEF),所有数据均测量3次并取其平均值记录。

2.3.2 TUNEL染色法检测细胞凋亡 投入10%多聚甲醛溶液固定的大鼠心脏,先后经石蜡包埋、切片、透明、脱水、PBS漂洗后,50μL TdT+450μL荧光素标记后反应10min。再加50μL TUNEL反应混合液,PBS漂洗、DAPI染色,封片,观察细胞凋亡情况。

2.3.3 Real-time PCR法检测心肌Caspase-3 mRNA、Caspase-9 mRNA表达 Trizol法提取大鼠心脏组织总RNA,再行RNA的琼脂糖凝胶电泳。取大鼠左心室心尖部分2μg,逆转录cDNA,42℃孵育15min,85℃孵育5min离心,冰上冷却,行定量PCR反应。每个样本每个指标3个孔,每孔10μL。定量PCR扩增条件:95℃10min,95℃15s,60℃60s,40个循环。以2^{-ΔΔCt}反映各样品相对于对照组

样品目的基因的表达式。 $-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{对照组}} - \Delta Ct_{\text{样品}}$, $\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{目的}} - \Delta Ct_{\text{内参}}$ 。每个样本重复 3 次,然后进行统计分析。

在 NCBI 上搜索获得 Caspase-3、Caspase-9 基因序列, primer5 设计引物,上海生工合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

引物名称		序列	产物长度/bp
Actin	F	CATCTGCGTCTGGACCTGG	116
	R	TAATGTCACGCACGATTTC	
rat Caspase-3	F	TTAGAACTGAATCCACGAG	164
	R	TTCCAATAATAAACACGACT	
rat Caspase-9	F	CATACACCCTGGACTCGGAT	181
	R	ATTTCTCTAGCAGTCAGTCGTT	

2.3.4 免疫组化法检测心肌 Caspase-3、Caspase-9 含量 心肌标本均经 4%多聚甲醛液固定、包埋、切片、脱蜡、乙醇脱水后,3%双氧水阻断内源性过氧化物酶;微波修复抗原 2 次,冷至室温,PBS 洗,加 1:100 一抗 Caspase-3、Caspase-9 每片 50 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加二抗,滴加二甲基联苯胺(DAB)显色液,苏木精复染、脱水、透明、封片。采用 MOTIC 图像分析系统在 $\times 400$ 倍光学显微镜下对 Caspase-3、Caspase-9 阳性结果进行半定量分析;分析每个视野下各细胞光密度值,最后取该切片总的平均密度值。

平均光密度值=积分光密度值/所选定视野总面积

2.4 统计学方法

所有数据应用 SPSS 20.0 统计软件进行处理。全部计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,先检验正态性,如满足正态性,采用单因素方差分析;两两比较,方差齐采用方差分析-LSD 检验,方差不齐用 Games-Howell 检验;不满足正态性时选择秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠心脏超声结果比较

与正常组比较,模型组心脏扩大而收缩力下降,表现为 LVIDd 增大,而 LVFS、LVEF 下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,对照组及心康组心腔变小而收缩力增强,LVIDd 缩小,LVEF、LVFS 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与对照组比较,心康组 LVEF 升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.2 TUNNEL 法观察细胞凋亡

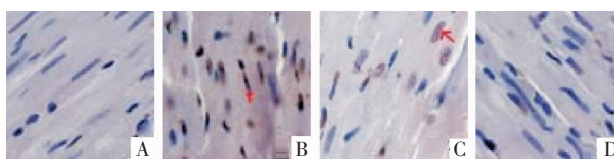
400 $\times$ 光镜下观察:正常组细胞核排列规整、呈蓝色长梭形。造模后,模型组棕褐色坏死颗粒物质

表 2 各组大鼠心脏彩超结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVIDd/mm	LVEF/%	LVFS/%
正常组	10	4.02 $\pm$ 0.81	90.17 $\pm$ 2.20	55.85 $\pm$ 10.08
模型组	11	6.56 $\pm$ 1.31**	31.04 $\pm$ 4.13**	27.32 $\pm$ 2.32**
对照组	11	4.83 $\pm$ 0.97 $\Delta\Delta$	52.76 $\pm$ 6.86 $\Delta\Delta$	49.13 $\pm$ 8.42 $\Delta\Delta$
心康组	13	4.43 $\pm$ 1.00 $\Delta\Delta$	61.09 $\pm$ 5.61 $\Delta\Delta\Delta$	44.80 $\pm$ 5.21 $\Delta\Delta$
F 值		16.85	91.37	54.24
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

明显增多;与模型组相比,心康组棕褐色坏死颗粒物质则明显减少;与对照组相比,心康组心肌细胞凋亡相对较少。见图 1。



注:A.正常组;B.模型组;C.心康组;D.为对照组

图 1 各组大鼠心肌切片光镜图(TUNNEL 染色, $\times 400$)

3.3 Caspase-3 mRNA、Caspase-9 mRNA 比较

模型组与正常组比,Caspase-3、Caspase-9 基因表达显著增加 ($P < 0.01$),表明凋亡基因增多;心康冲剂干预后,心康组 Caspase-3、Caspase-9 基因表达显著下降 ($P < 0.01$);与对照组比,心康组 Caspase-3、Caspase-9 基因表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠 Caspase-3 mRNA、Caspase-9 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase-3 mRNA	Caspase-9 mRNA
正常组	10	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.55
模型组	11	1.49 $\pm$ 0.13**	2.79 $\pm$ 0.20**
对照组	11	1.18 $\pm$ 0.31 $\Delta\Delta$	1.32 $\pm$ 0.31 $\Delta\Delta$
心康组	13	1.19 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$	1.32 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta$
F 值		8.608	112.4
P 值		0.000	0.000

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

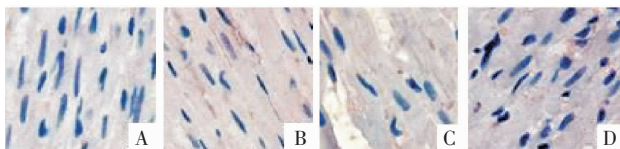
3.4 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达比较

与正常组比,模型组凋亡蛋白表达增多,Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$);经心康冲剂、芪苈强心胶囊干预后,心康组及对照组 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$);与对照组比,心康组 caspase-3 表达显著下降 ($P < 0.05$)。见表 4、图 2-3。

表4 各组大鼠 Caspase-3、Caspase-9 蛋白质表达比较($\bar{x} \pm s$)

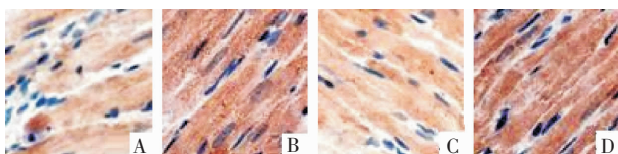
组别	n	Caspase-3	Caspase-9
正常组	10	0.18±0.02	0.29±0.04
模型组	11	0.48±0.04**	1.0±0.13**
对照组	11	0.32±0.08 ^{△△}	0.53±0.25 ^{△△}
心康组	13	0.29±0.03 ^{△△#}	0.44±0.23 ^{△△}
F 值		16.218	5.285
P 值		0.000	0.007

注:与正常组比较 ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta \Delta P < 0.01$;与对照组比较, # $P < 0.05$



注:A.正常组;B.模型组;C.心康组;D.对照组

图2 各组大鼠心肌切片 Caspase-3 表达(免疫组化,×400)



注:A.正常组;B.模型组;C.心康组;D.对照组

图3 各组大鼠心肌切片 Caspase-9 表达(免疫组化,×400)

4 讨论

中医学将慢性心力衰竭类归于“水肿”“喘证”“心悸”等范畴。中医药治疗慢性心力衰竭疗效肯定,研究证明,芪苈强心胶囊有抗大鼠心肌细胞凋亡作用^[10-11]。心康冲剂以真武汤、升陷汤及参苓白术散为基础方,具有健脾渗湿、温阳化气逐水饮功效,能有效治疗慢性心衰水肿、喘证、心悸等水湿内停之证^[4]。

细胞凋亡发病机制主要有死亡受体通路、线粒体通路、内质网通路3条途径。其中由多种生物、理化刺激信号触发形成凋亡体,激活 Caspase-9,从而剪切并激活下游的 Caspase-3 导致细胞凋亡,是内源性途径机制。Caspases 介导心肌细胞凋亡并参与慢性心力衰竭的发生、发展^[12-13]。Caspase-3 是凋亡级联反应最关键的凋亡蛋白酶^[14]。

本实验中,模型组心肌凋亡明显增多,LVIDd 明显升高,而 LVFS、LVEF 显著下降,同时 Caspase-3 及 Caspase-9 的核酸及蛋白表达增加,表明凋亡组织中具有 Caspase-3、Caspase-9 表达增加的特征。心康冲剂干预后,心肌凋亡减轻,LVIDd 明显下降,LVEF、LVFS 明显升高,表明心康冲剂具有缩小扩大的心脏、增强心肌收缩力、提升射血功能。与对照组比,心康冲剂组使心脏缩小、心功能提高更明显,并且下调 Caspase-3 蛋白表达更明显,而 Caspase-3

mRNA 表达无差异,表明心康冲剂调控 Caspase-3 的 mRNA 与蛋白表达呈非一致性,说明在调控 Caspase-3 的 mRNA 与蛋白表达中有其他因素参与;因此,临床实践及动物实验表明,心康冲剂具有良好的抗心衰竭及抗心肌凋亡作用,临床值得推广应用。

参考文献

- [1] CONSILI C, GATTA L, IELLAMO F, et al. Severity of left ventricular dysfunction in heart failure patients affects the degree of serum-induced cardiomyocyte apoptosis. Importance of inflammatory response and metabolism[J]. International Journal of Cardiology, 2013,167(6):2859-2866.
- [2] BOFFA G M, ZANINOTTO M, SARTOR R, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α as biochemical markers of heart failure: A head-to-head clinical comparison with B-type natriuretic peptide [J]. Journal of Cardiovascular Medicine, 2009,10(10):758-764.
- [3] KHAN M, ZHENG B, YI F, et al. Pseudolaric acid B induces Caspase dependent and Caspase-independent apoptosis in u87 glioblastoma cells[J]. Evid Based Complementary Alternative Medicine, 2012(2012):957568.
- [4] 宋亚妮,谭雄,聂孝平.心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠血浆 RAAS 的影响[J].中医药导报,2015,21(1):21-23.
- [5] 张辉.心康冲剂对慢性心力衰竭大鼠 AQP2mRNA、AVPV2mRNA 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2014,34(10):20-23.
- [6] 张辉,聂孝平,毛湘屏,等.心康冲剂对慢性心衰大鼠 AVPMRNA 表达的影响[J].中医药导报,2015,21(14):70-74.
- [7] XU K, GEORGE I, KLOTZ S, et al. Erythropoietin derivate improves left ventricular systolic performance and attenuates left ventricular remodeling in rats with myocardial infarct-induced heart failure[J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2010,56(5):506-512.
- [8] 徐建虎,张琦,杨子庆,等.阿霉素诱导大鼠慢性心衰模型的制备[J].宁夏医科大学学报,2016,3(39):348-351.
- [9] 贺石林,王键,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2006:48.
- [10] 林锐波.芪苈强心胶囊对心梗后心衰大鼠心功能及凋亡蛋白 caspase-3 表达的影响[D].汕头:汕头大学,2010.
- [11] 徐涛,郭丽峰,陈立锋.芪苈强心胶囊对慢性心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J].中药新药与临床药理,2010,21(4):366-369.
- [12] 刘蓉芳,谭雄,张辉,等.慢性心衰大鼠心肌 miRNA-1、iR-NA-133/Caspases 表达差异研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(12):1326-1330.
- [13] 陈聪,吴勇军,喻嵘,等.左归降糖益肾方含药血清对高糖培养小鼠足细胞凋亡及 Caspase-12 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2015,35(3):1-4.
- [14] LI Q, GUO Y L, LI X, et al. The interference of picroside II on the expressions of caspase-3 and PARP following cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010,26(3):342-345.

(本文编辑 杨 瑛)