

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.19.002

文章编号: 1005-8982 (2019) 19-0008-09

芪蛭三七汤对心肌梗死大鼠心室重构 及内质网应激凋亡的影响*

苏学旭¹, 仲秀艳²

(贵州中医药大学第一附属医院 1. 心病内科, 2. 脑病内科, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 目的 探讨芪蛭三七汤对心肌梗死(MI)大鼠心室重构及心肌细胞内质网应激凋亡的影响。**方法** 采用冠状动脉结扎法复制大鼠心肌梗死模型,分为空白对照组($n=15$)、假手术组($n=14$)、MI组($n=11$)及芪蛭三七汤干预模型组(QZ组)($n=13$)。空白对照组、假手术组和MI组大鼠均灌胃给予无菌生理盐水, QZ组大鼠灌胃给予22.68 g/kg 芪蛭三七汤溶液,连续给药4周。采用超声心动图评价大鼠心功能, Western blotting检测大鼠心肌细胞凋亡相关蛋白以及蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)-真核细胞翻译起始因子2 α (eIF2 α)通路相关蛋白的表达。**结果** ①心功能比较:与空白对照组和假手术组大鼠比较,MI组大鼠左室射血分数(LVEF)和短轴缩短率(FS)降低,而左室舒张末径(LVEDd)、左室收缩末径(LVESd)增加($P<0.05$)。QZ组大鼠LVEF和FS高于MI组大鼠,LVEDd和LVESd低于MI组大鼠($P<0.05$)。与空白对照组和假手术组大鼠比较,MI组大鼠左室压上升最大速率(+dp/dt_{max})和左室压下降最大速率(-dp/dt_{max})绝对值降低($P<0.05$)。QZ组大鼠+dp/dt_{max}和-dp/dt_{max}绝对值高于MI组大鼠($P<0.05$)。空白对照组和假手术组大鼠无梗死区域。QZ组大鼠梗死范围低于MI组大鼠($P<0.05$)。②心肌细胞凋亡指标:MI组大鼠非梗死区心肌凋亡指数(AI)高于空白对照组和假手术组大鼠($P<0.05$)。QZ组大鼠非梗死区心肌AI低于MI组大鼠($P<0.05$)。与空白对照组和假手术组比较,MI组大鼠心肌组织促凋亡蛋白Caspase-3、Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达量升高,而抗凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)表达量降低($P<0.05$)。与MI组大鼠比较,QZ组大鼠心肌组织Caspase-3、Bax蛋白表达量降低,Bcl-2蛋白表达量升高($P<0.05$)。③PERK-eIF2 α 信号通路:与空白对照组和假手术组比较,MI组大鼠心肌组织葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、p-PERK、p-eIF2 α 及活化转录因子4(ATF4)蛋白表达量升高($P<0.05$)。而与MI组大鼠比较,QZ组大鼠心肌组织GRP78、p-PERK、p-eIF2 α 及ATF4蛋白表达量降低($P<0.05$)。**结论** 芪蛭三七汤可减轻大鼠心肌梗死后心室重构,其机制可能与抑制PERK-eIF2 α 信号通路的激活诱导的内质网应激凋亡有关。

关键词: 心肌梗死/心肌梗塞; 芪蛭三七汤; 心室重构; 内质网应激; PERK-eIF2 α 信号通路

中图分类号: R541

文献标识码: A

Effect of qizhi-sanqi decoction on ventricular remodeling and endoplasmic reticulum stress-related apoptosis in rats with myocardial infarction*

Xue-xu Su¹, Xiu-yan Zhong²

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550001, China)

Abstract: Objective To discuss the effect of qizhi-sanqi (QZ) decoction on ventricular remodeling and endoplasmic reticulum stress (ERS)-related apoptosis in rats with myocardial infarction (MI). **Methods** Four weeks

收稿日期: 2019-04-02

* 基金项目: 贵州省科技厅科技计划项目(No: 黔科合中药字【2012】LKZ7038)

after left anterior descending coronary artery ligation, rats were administrated with QZ decoction or the same volume of saline and divided into control group (normal saline solution for 4 w, $n = 15$), Sham-operation group (normal saline solution for 4 w, $n = 14$), MI model group (normal saline solution for 4 w, $n = 13$) and QZ treatment group (QZ decoction for 4 w, $n = 13$). Cardiac function was assessed by ultrasoundcardiogram. The cell apoptosis related proteins and PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) - eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) pathway related proteins were detected by Western blotting. **Results** ① Changes of cardiac function: rats in MI group had lower left ventricular ejection fraction (LVEF), fractional shortening (FS), $+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$ and higher left ventricular end-diastolic dimension (LVEDd), left ventricular end-systolic dimension (LVESd) than those indexes of rats in control group and sham-operation group ($P < 0.05$). But there were higher LVEF, FS, $+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$ and lower LVEDd, LVESd of rats in QZ group than those indexes of rats in MI group ($P < 0.05$). There was no statistical difference of infarction area in rats of control group and sham-operation groups ($P > 0.05$). The infarction area of rats in QZ group was more than that in MI group ($P < 0.05$). ② Apoptosis of cardiac cells: the apoptosis index of rats in MI group was higher than in control group and sham-operation groups ($P < 0.05$). But the AI of rats in QZ group was lower than that in MI group ($P < 0.05$). There were higher Caspase-3, Bax and lower Bcl-2 in MI group than those in control group and sham-operation groups ($P < 0.05$). But Caspase-3, Bax proteins levels of rats in QZ group which had higher Bcl-2 level were lower than those in MI-CRL group ($P < 0.05$). ③ PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) - eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α) pathway: the GRP-78, p-PERK, p-eIF2 α and ATF4 levels of cardiac tissues in MI group were higher than those in control group and sham-operation groups ($P < 0.05$). But the GRP-78, p-PERK, p-eIF2 α and ATF4 levels of cardiac tissues in QZ group were higher than those in MI groups ($P < 0.05$). **Conclusions** There are significant evidences that qizhi-sanqi decoction could mitigate cardiac function in rats with myocardial infarction, which would be related with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-related apoptosis induced by PERK- eIF2 α pathway.

Keywords: myocardial infarction; qizhi-sanqi decoction; ventricular remodeling; endoplasmic reticulum stress; perk- eIF2 α pathway

心血管疾病是威胁我国国民生命健康的最主要的公共卫生安全问题, 尤其是冠状动脉粥样硬化性心脏病 (以下简称冠心病) 的发病率逐年上升, 大大增加社会医疗负担。心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 属于冠心病的危急重症之一, 在血流动力学、神经体液等因素综合影响下, MI 患者的心脏易发生结构重构、功能重构和电重构^[1]。其最初表现为左心室几何形状及结构改变, 并伴有心肌细胞肥大、心肌代偿性肥厚, 最终发生心力衰竭^[2]。因此心室重构是 MI 进展式演变的主要病理机制之一, 是患者致死和致残的主要原因^[3]。如何改善 MI 后心室重构、降低心力衰竭的发生率是 MI 二级预防亟待解决的重大难题。心肌缺血可触发内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS), 适当的 ERS 可反馈性保护心肌缺血损伤, 但是若心肌细胞长期存在严重的 ERS, 则可能会诱发细胞凋亡^[4]。近年来, 许多自拟方逐渐用于治疗心力衰竭, 并取得良好的临床疗效^[5]。但是由于作用机制不明确, 限制了中药制剂在临床上的应用。芪蛭三七汤是由贵阳中医学院第一附属医院多个科室成员基于多年临床经验总结共同研制完成, 主要成分包括黄芪、

桂枝、水蛭、三七和冰片。芪蛭三七汤已应用于临床, 前期已有研究证实其疗效显著且安全可靠^[6]。笔者通过对该经验方的不断完善, 固定药物剂量、精确工艺流程, 拟通过本研究在动物和细胞水平阐述芪蛭三七汤改善 MI 大鼠心室重构的分子机制, 为现代医学治疗 MI 的研究提供新的思路。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂与仪器

芪蛭三七汤由本院药剂科根据中医理论自行配制。配方为: 黄芪 30 g, 水蛭 10 g, 三七 10 g, 桂枝 10 g, 冰片 0.1 g。水煎内服, 浓缩至相当于原生药材 0.63 g/ml。

羟脯氨酸检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 抗体、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 抗体、p-PERK 抗体、真核细胞翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α) 抗体、p-eIF2 α 抗体及活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF 4)

抗体(美国 Abcam 公司), B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体及 Caspase-3 抗体(美国 R & D Systems 公司), RIPA 加强型细胞裂解液(美国 Solarbio 公司), 3% 戊巴比妥钠由本院药剂科提供, PCR 引物由苏州 Genewiz 生物科技有限公司合成并提供, BCA 定量试剂盒、TUNEL 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), cDNA 合成试剂盒、荧光定量聚合酶链反应试剂盒及 Taq DNA 聚合酶(美国 Omega 公司), 实验用水为超纯水, 其余所用试剂均为分析纯。

小动物呼吸机(DW2000, 上海嘉鹏科技有限公司), 石蜡切片机(HM 340E, 美国 Thermo 公司), PowerLab 数据分析处理系统(澳大利亚 AD instruments 公司), 实时定量 PCR 仪和 iMake 全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), CX41 光学倒置显微镜、荧光共聚焦显微镜及 JEM-1400 型透射电子显微镜(日本 Olympus 公司), Fluor Chem FC3 凝胶成像数码分析系统(美国 Protein Simple 公司)。

1.2 模型的复制、分组及干预方式

70 只健康雄性 SD 大鼠, 体重 220 ~ 250 g, 无特定病原体(SPF)级, 购自上海睿太莫斯生物科技有限公司, 许可证号: SCXK(沪)2016-0001, 饲以无菌颗粒饲料, 自由饮水; 动物房温度稳定在(25 ± 1)°C, 相对湿度为 40% ~ 70%, 12 h 昼/夜交替照明。所有操作均符合动物伦理学要求。

采用冠状动脉结扎法复制 MI 大鼠模型^[7]。复制模型前, 大鼠禁食 12 h, 腹腔注射 3% 戊巴比妥 40 ml/kg, 将大鼠置于自制的实验平台上, 固定四肢。纵向剖开气管, 插入小动物呼吸机, 频率维持 70 次/min, 潮气量为 1.5 ~ 2.0 ml/100 g。术前描述 II 导联心电图。在胸骨左缘 3 ~ 4 肋骨间开胸, 充分暴露心脏。揭开心包膜和脂肪垫, 暴露左心耳后, 对两组 MI 模型大鼠, 采用 7 号缝合线在肺动脉圆锥和左心耳之间左冠状动脉前降支处进行结扎, 造成心肌缺血; 而对假手术组大鼠, 并未对冠状动脉进行结扎, 直接缝合关胸。采用心电图监测 S-T 段出现弓背样抬高(>0.2 mV)或 T 波高耸, 肉眼见结扎周围心肌组织呈暗红色或灰白色, 则显示进行性心肌梗死模型复制成功。成功后大鼠自由活动 and 进食。

取模型复制成功大鼠, 称重, 按照随机数字表法分组, 分组及干预方式如下: ①空白对照组($n=15$): 灌胃给予 10 ml/(kg·d) 无菌生理盐水。②假手术对

照组(假手术组)($n=14$): 灌胃给予 10 ml/(kg·d) 无菌生理盐水。③MI 模型对照组(MI 组)($n=11$): 灌胃给予 10 ml/(kg·d) 无菌生理盐水。④芪蛭三七汤干预模型组(QZ 组)($n=13$): 灌胃给予 22.68 g/(kg·d) (相当于 2 倍临床等效剂量) 芪蛭三七汤溶液。于模型复制后次日开始给药, 1 次/d, 连续给药 4 周。

1.3 超声心动图

术后 4 周, 称量大鼠体重, 大鼠吸入乙醚麻醉后, 置于自制的实验平台上, 固定四肢。采用小动物超声仪获取乳头肌水平短轴切面, 每组数据测量 3 次, 取平均值。检测左室舒张末径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDd)、左室收缩末径(left ventricular end-systolic dimension, LVESd)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室短轴缩短率(fractional shortening, FS)。

1.4 血流动力学指标

心功能检测完毕后, 分离大鼠右侧颈总动脉, 插入 PE-50 聚乙烯导管, 连接 PowerLab 数据分析处理系统, 记录平均动脉压(mean arterial pressure, MAP), 进一步插入左心室, 记录左室压上升最大速率(+dp/dt_{max})和左室压下降最大速率(-dp/dt_{max})。每组数据测量 3 次, 取平均值。

1.5 心肌梗死面积

将大鼠颈椎脱臼处死后, 迅速取出心脏, 放入预冷的生理盐水中, 灌洗心脏, 从主动脉逆行注射伊文斯兰, 分离心房和心室, 将心室置于含有 2% 琼脂糖的培养皿中固定, 切片后, 避光置于复温的、含有 2% TTC 磷酸缓冲液的棕色小瓶中孵育 30 min。此时梗死区为灰白色, 可判断梗死心肌面积(area of necrosis, AN); 砖红色为缺血非梗死区; 而缺血区面积(area at risk, AAR)为灰白色和砖红色之间的颜色区域; 正常区域为蓝色。将心脏组织置于 4% 多聚甲醛, 采用 Sigma Scan 软件计算梗死区域面积。梗死范围以 AN/AAR 表示。每组数据测量 3 次, 取平均值。

1.6 标本采集及处理

1.6.1 标本采集 取出大鼠心脏后, 取出心房和右心室, 于结扎点下横切 2 ~ 3 mm, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 5 ~ 7 d。然后生理盐水清洗固定液, 分别在 60%、75% 和 90% 的乙醇溶液中浸泡 30 min, 然后在 100% 乙醇 I 中浸泡 10 min, 后在 100% 乙醇 II 中浸泡 20 min。采用石蜡包埋, 保存备用。

1.6.2 HE 染色 取心肌组织石蜡包埋块, 组织切片

(3 ~ 4 μm), 进行 HE 染色。首先将组织切片脱蜡, 采用 100%、90%、75% 乙醇梯度脱水, 滴加苏木精染色 5 min, 冲洗 3 s, 滴加 1% 盐酸乙醇分化, 冲洗, 滴加 0.5% 伊红染色液染色 3 min, 冲洗, 采用 75%、90%、100% 乙醇脱水, 滴加松节油透明, 中性树胶封片。置于光学显微镜下观察。

1.6.3 心肌细胞凋亡实验 取石蜡包埋块, 切片 (3 ~ 4 μm)。采用 TUNEL 法, 按照试剂盒说明书进行操作。每张切片于非梗死区域随机选择 10 个高倍镜视野 ($\times 40$), 计数阳性染色细胞比例, 比 (%) 表示凋亡指数 (apoptosis index, AI)。每组数据测量 3 次, 取平均值。

1.7 Western blotting 检测蛋白表达

①蛋白提取: 取结扎线下左室后壁心肌组织约 100 mg, 加入预冷 PBS, 清洗 3 次; 将组织剪碎后, 加入 1 ml 预冷的蛋白裂解液, 冰浴 30 min, 匀浆; 离心, 取上清液; 采用 BCA 蛋白测定试剂盒说明书进行下一步操作。②蛋白变性: 加入 SDS 上样缓冲液充分混匀, 置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 10 min, 使蛋白变性, 分装, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存备用。③ Western blotting: 将 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上。将 PVDF 浸入密封液中, 室温密闭 1 h。取出 PVDF, 采用 TBST 冲洗 3 次, 分别加入 GRP-78、PERK、p-PERK、eIF2 α 、p-eIF2 α 、ATF4 抗体 (1 : 500 稀释) 或者凋亡相关蛋白抗体 Bel-2、Bax、Caspase-3、Cytochrome C (1 : 1 000 稀释), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上过夜。采用 TBST 冲洗 3 次, 加入二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 采用 TBST 冲洗 3 次; 取适量的 ECL 试剂显影 5 min, 采用凝胶成像分析系统分析凝胶光密度值。每组数据测量 3 次, 取平均值。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以

均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物存活状态

由于麻醉、操作失误、气胸以及术后 24 h 内因死亡 15 只, 术后 24 h 存活率为 72.73%。假手术大鼠死亡 1 只, MI 大鼠死亡 14 只, 因此给药前, 假手术组有 14 只大鼠, MI 组和 QZ 组各 13 只大鼠。给药期间, QZ 组、空白对照组和假手术组大鼠无死亡, 而 MI 组于术后第 10 天和 16 天各死亡 1 只。

2.2 大鼠 MI 后心脏结构和功能变化

2.2.1 超声心动图评价 术后 4 周, 各组大鼠 LVEDd、LVESd、LVEF、FS 水平比较, 采用单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组和假手术组大鼠比较, MI 组大鼠 LVEF 和 FS 降低 ($P < 0.05$), 而 LVEDd、LVESd 增加 ($P < 0.05$), 左室前壁变薄 ($P < 0.05$); 但是与 MI 组大鼠比较, QZ 组大鼠 LVEF 和 FS 均升高 ($P < 0.05$), 而 LVEDd 和 LVESd 均降低 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

2.2.2 血流动力学指标 术后 4 周, 各组大鼠 $+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 和 $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 比较, 采用单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组和假手术组大鼠比较, MI 组大鼠 $+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 和 $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 绝对值降低 ($P < 0.05$)。但是与 MI 组大鼠比较, QZ 组大鼠 $+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 和 $-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 绝对值升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2.3 梗死范围比较 术后 4 周, 空白对照组和假手术组大鼠无梗死区域。MI 组大鼠梗死范围为 (76.85 \pm 12.36) %, QZ 组大鼠梗死范围为 (28.13 \pm 10.06) %, QZ 组大鼠梗死范围少于 MI 组大鼠, 差异有统计学意义。

表 1 各组大鼠心功能情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LVEDd/mm	LVESd/mm	LVEF/%	FS/%
空白对照组	15	7.51 \pm 0.44	3.54 \pm 0.32	83.36 \pm 1.37	53.92 \pm 1.45
假手术组	14	7.49 \pm 0.50	3.51 \pm 0.28	84.05 \pm 1.72	54.43 \pm 1.80
MI 组	11	10.35 \pm 0.79 ^{①②}	9.06 \pm 0.65 ^{①②}	30.75 \pm 8.58 ^{①②}	15.78 \pm 8.69 ^{①②}
QZ 组	13	8.76 \pm 0.71 ^{①②③}	7.12 \pm 0.58 ^{①②③}	67.86 \pm 10.93 ^{①②③}	38.54 \pm 11.56 ^{①②③}
<i>F</i> 值		59.950	436.631	163.528	80.681
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与假手术组比较, $P < 0.05$; ③与 MI 组比较, $P < 0.05$ 。

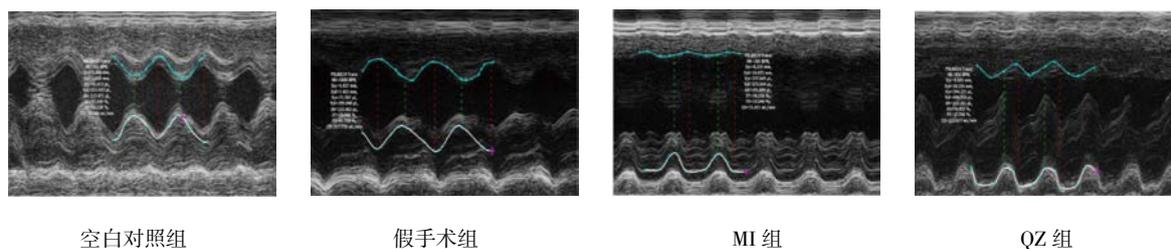


图 1 各组超声心动图

表 2 各组大鼠血流动力学指标比较 (mmHg/s, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	+dp/dt _{max}	-dp/dt _{max}
空白对照组	15	3 735.44 ± 474.58	-3 037.51 ± 379.45
假手术组	14	3 811.86 ± 512.79	-3 126.62 ± 400.53
MI 组	11	1 640.75 ± 384.80 ^{①②}	-1 258.06 ± 297.35 ^{①②}
QZ 组	13	3 023.26 ± 435.86 ^{①②③}	-2 485.13 ± 447.39 ^{①②③}
F 值		57.761	58.884
P 值		0.000	0.000

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与假手术组比较, $P < 0.05$; ③与 MI 组比较, $P < 0.05$ 。

义 ($t = 10.652$, $P = 0.000$)。

2.2.4 心肌组织形态结构变化 解剖各组大鼠心脏, 空白对照组和假手术组大鼠心脏几何形状规整, 心脏体积和心腔大小正常, 颜色呈鲜红色, 弹性和韧性良好。与空白对照组和假手术组大鼠比较, MI 组大鼠心肌组织失去原有的几何形状, 体积增大, 呈普大型; 心腔扩大, 呈暗红色; 弹性和韧性降低。另外, QZ 组大鼠心脏也出现增大情况, 颜色较假手术组偏深偏暗, 但是与 MI 组大鼠比较, 情况好转。几何形状相对规整, 弹性和韧性尚可。见图 2。

经 HE 染色后, 光镜下观察可见空白对照组和假手术组心肌细胞呈多层整齐紧密排列, 无水肿、坏死情况, 心肌纤维排列紧密, 呈束状, 横纹肌清晰可见, 无炎症细胞浸润。MI 组可见心肌纤维肿胀、排列紊乱, 甚至部分断裂、溶解、消失, 胞浆疏松, 有大量炎症细胞浸润。而 QZ 组大鼠心肌组织虽然也出现心肌纤维肿胀、炎症细胞浸润情况, 但是较 MI 组减轻。见图 2。

2.2.5 心肌组织超微结构变化 经透射电镜观察左室梗死周边区心肌超微结构发现, 与空白对照组和假手术组比较, MI 组和 QZ 组 MI 周边区有明显的肌节长短不齐、肌丝断裂溶解, 线粒体的肿胀、空泡化, 线粒体嵴减少改变。而 QZ 组未见肌丝断裂, 线粒体略肿胀, 但结构基本正常, 线粒体嵴可见, 并能见到线粒体堆积和代偿性增多现象。见图 3。

2.3 大鼠心肌细胞凋亡情况

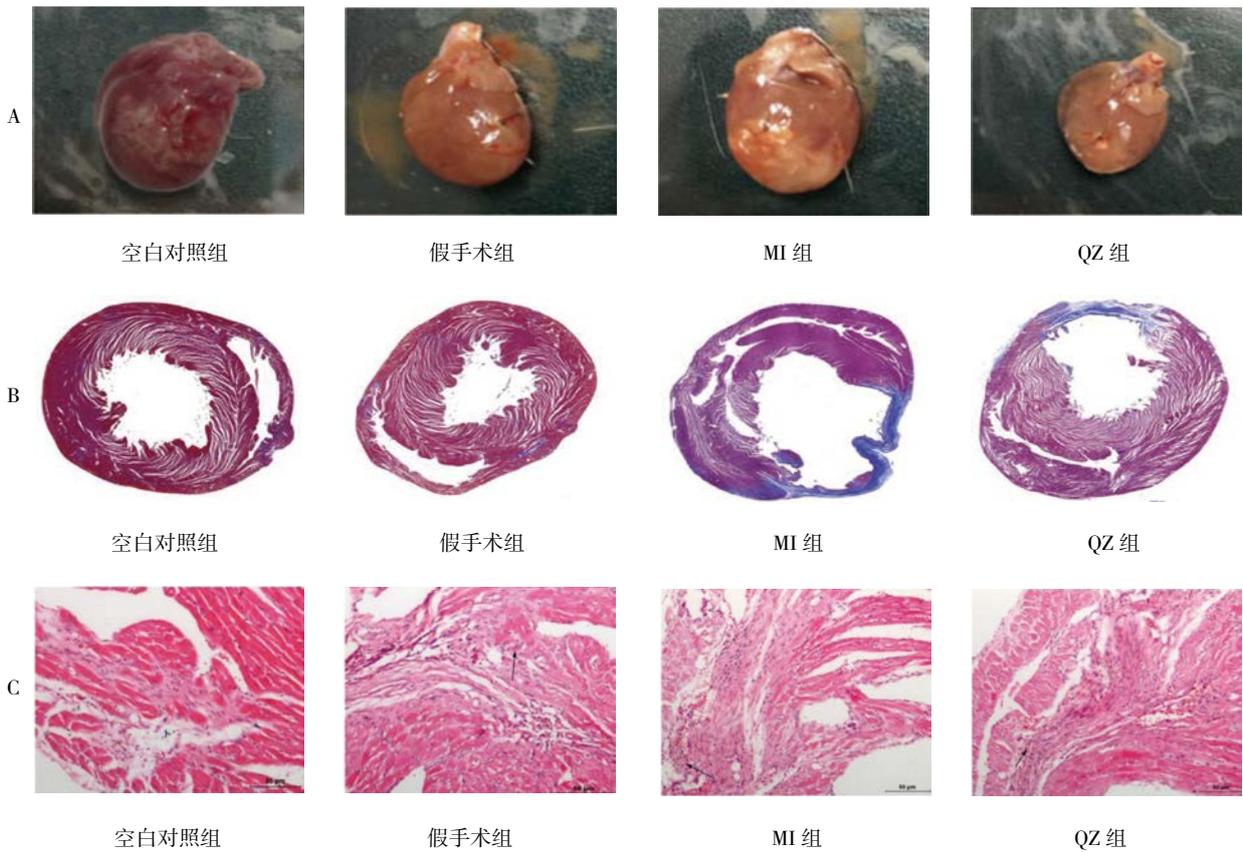
2.3.1 各组大鼠非梗死区心肌 AI 情况 各组大鼠非梗死区心肌 AI 比较, 采用单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组和假手术组比较, MI 组大鼠非梗死区心肌 AI 较高 ($P < 0.05$)。QZ 组大鼠非梗死区心肌 AI 低于 MI 组大鼠 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.3.2 各组大鼠 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达情况 各组大鼠 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达量比较, 采用单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。空白对照组和假手术组大鼠心肌组织 Bcl-2、Caspase-3、Bax 蛋白表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与空白对照组和假手术组比较, MI 组大鼠心肌组织 Caspase-3、Bax 蛋白表达量升高, 而 Bcl-2 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$)。与 MI 组大鼠比较, QZ 组大鼠心肌组织 Caspase-3、Bax 蛋白表达量降低, Bcl-2 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 4。

2.4 大鼠心肌组织内质网应激 PERK-eIF2 α 信号通路相关蛋白表达情况

2.4.1 各组大鼠心肌组织 GRP78 蛋白表达情况 各组大鼠 GRP78 蛋白表达量比较, 采用单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组和假手术组比较, MI 组大鼠心肌组织 GRP78 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$)。与 MI 组大鼠比较, QZ 组大鼠心肌组织 GRP78 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 5。

2.4.2 各组大鼠心肌组织 PERK、eIF2 α 蛋白表达及磷酸化水平 各组大鼠心肌组织 PERK 和 eIF2 α 蛋白表达量基本一致, 采用单因素方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 p-PERK 和 p-eIF2 α 蛋白表达量差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组和假手术组比较, MI 组大鼠心肌组织 p-PERK 和 p-eIF2 α 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$)。与 MI 组大鼠比较, QZ 组大鼠心肌组织 p-PERK 和 p-eIF2 α 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 5。



A: 各组大鼠心脏形态比较; B: 整个心脏组织横切面 (HE 染色); C: 心肌组织局部切片 (HE × 200)。

图 2 各组大鼠心肌组织的形态结构

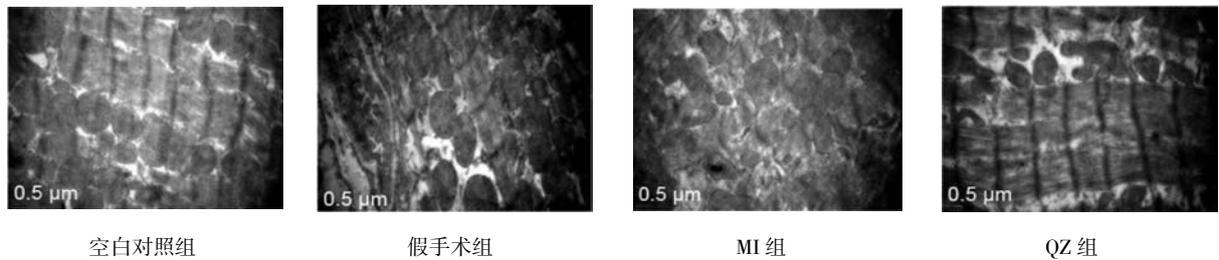
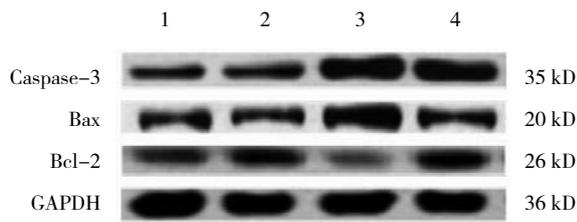


图 3 各组大鼠心肌组织的超微结构 (× 20 000)

表 3 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AI/%	Caspase-3	Bcl-2	Bax
空白对照组	15	7.84 ± 3.19	0.65 ± 0.15	1.28 ± 0.17	0.52 ± 0.12
假手术组	14	9.55 ± 4.32	0.67 ± 0.12	1.21 ± 0.18	0.49 ± 0.11
MI 组	11	49.35 ± 14.67 ^{①②}	1.36 ± 0.34 ^{①②}	1.10 ± 0.28 ^{①②}	0.72 ± 0.23 ^{①②}
QZ 组	13	23.96 ± 11.78 ^{①②③}	0.89 ± 0.28 ^{①②③}	1.26 ± 0.12 ^{①②③}	0.56 ± 0.09 ^{①②③}
F 值		56.041	26.691	7.593	80.681
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与假手术组比较, $P < 0.05$; ③与 MI 组比较, $P < 0.05$ 。

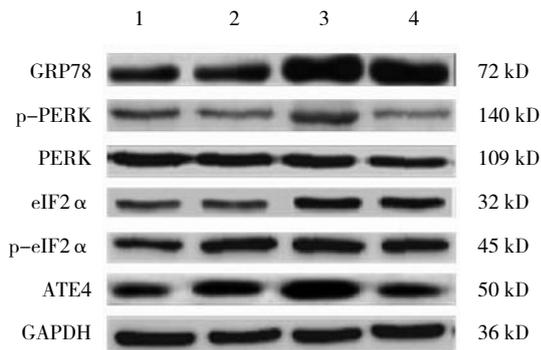


1: 空白对照组; 2: 假手术组; 3: MI 组; 4: QZ 组。

图 4 各组心肌细胞凋亡情况

表 4 各组大鼠 GRP78、p-PERK、PERK、p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4 蛋白表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GRP78	p-PERK	PERK	p-eIF2 α	eIF2 α	ATF4
空白对照组	15	0.75 \pm 0.09	0.36 \pm 0.09	1.26 \pm 0.17	0.28 \pm 0.07	0.77 \pm 0.12	0.52 \pm 0.09
假手术组	14	0.74 \pm 0.12	0.37 \pm 0.10	1.28 \pm 0.20	0.27 \pm 0.04	0.72 \pm 0.10	0.50 \pm 0.12
MI 组	11	1.51 \pm 0.28 ^{①②}	0.56 \pm 0.15 ^{①②}	1.24 \pm 0.18	0.47 \pm 0.06 ^{①②}	0.77 \pm 0.15	1.05 \pm 0.16 ^{①②}
QZ 组	13	1.13 \pm 0.21 ^{①②③}	0.44 \pm 0.10 ^{①②③}	1.21 \pm 0.18	0.35 \pm 0.05 ^{①②}	0.76 \pm 0.06	0.63 \pm 0.15 ^{①②③}
F 值		50.249	8.582	0.361	32.357	0.633	46.110
P 值		0.000	0.000	0.783	0.000	0.596	0.000

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与假手术组比较, $P < 0.05$; ③与 MI 组比较, $P < 0.05$ 。

1: 空白对照组; 2: 假手术组; 3: MI 组; 4: QZ 组。

图 5 各组内质网应激 PERK-eIF2 α 信号通路相关蛋白的表达水平

3 讨论

心室重构是 MI 发展为心力衰竭的基本病理过程。MI 患者心脏因血流动力学改变、神经体液因素影响等, 易发生结构和功能重构。临床多表现为梗死区形成胶原瘢痕伴膨胀, 肺梗死区域出现心肌肥厚、心室扩张以及心功能损伤等, 是患者致死和致残的主要原因^[8]。在我国, MI 后心室重构的发生率约为 30% ~ 50%^[9], 进入本世纪以来, 随着再灌注治疗的大力推广和普及, 大大降低 MI 患者的病死率, 但是促使更多的 MI 患者进入心肌梗死后心室重构的阶段。因此, 如何减缓或逆转 MI 后心室重构, 降低心力衰竭的

2.4.3 各组大鼠心肌组织 ATF4 蛋白表达情况

各组大鼠 ATF4 蛋白表达量比较, 采用单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组和假手术组比较, MI 组大鼠心肌组织 ATF4 蛋白表达量较高 ($P < 0.05$)。与 MI 组大鼠比较, QZ 组大鼠心肌组织 ATF4 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 5。

发生率, 一直是心血管领域亟待解决的难题。

MI 后心室重构在细胞水平的病理变化包括心肌细胞病理性肥大、心肌细胞凋亡或坏死、细胞外基质大量沉积等^[10]。本项研究中, 笔者通过结扎大鼠左冠状动脉前降支造成心肌缺血性坏死, 通过显微镜下组织形态观察, MI 模型组大鼠心肌组织失去原有的几何形状, 体积增大, 呈普大型; 心腔扩大, 呈暗红色; 弹性和韧性降低; 心功能下降。经 HE 染色后, MI 组大鼠心肌纤维肿胀、排列紊乱, 甚至部分断裂、溶解、消失, 胞浆疏松, 有大量炎症细胞浸润。除此以外, 经伊文思蓝和 TTC 双染法证实 MI 大鼠心肌组织出现大面积梗死, 且持续心肌缺血导致心肌细胞坏死和凋亡, 心肌结构和心室构型同时发生相应变化, 损伤心肌收缩-舒张功能, 造成血流动力学障碍。主要表现为 $+dp/dt_{max}$ 降低, $-dp/dt_{max}$ 升高, 室壁顺应性下降。从而从组织、细胞、分子水平多方面证实 MI 模型大鼠复制成功。而上述 MI 组大鼠心脏结构和功能发生的一系列变化经芪蛭三七汤干预 4 周后均有所改善。

近几年本院在 MI 的病因病机、治则治法及复方组成研制等方面均取得突破性进展。其中芪蛭三七汤是本科室基于多年临床经验、结合中西医理论总结的经验方, 且已用于临床, 并得到患者的普遍认可。该汤药是由黄芪、桂枝、水蛭、三七、冰片组成。该方以黄芪和三七为君药, 可益气以助血行, 贯心脉而养

五脏^[11]。桂枝、水蛭为臣药,既能够益气养阴,又可解毒化痰,水蛭破瘀通络臣,桂枝温阳通脉,冰片开通心窍,引药入络为佐使,诸药合参,共收益气活血、破瘀通络之功效,体现了以补为通,以通为补,通补兼施的特点。因此,在本项研究中,芪蛭三七汤可改善 MI 大鼠模型的心脏功能,但是其具体的作用成分和作用机制尚不明确。近几年笔者通过对该方剂的不断完善,固定药物剂量、精准生产流程,最终获得本实验所用的芪蛭三七汤剂,笔者拟通过动物、细胞、分子水平探讨中药复方制剂芪蛭三七汤用于心肌梗死后心室重构的干预作用以及作用机制,为现代医学阐释 MI 后心室重构发生机制的研究以及药物研发提供新的思路。

内质网是真核细胞储存钙离子、折叠修饰蛋白或脂质类物质的重要场所^[12]。心肌梗死患者因心肌细胞发生缺血、缺氧性坏死,易导致内质网腔内未折叠蛋白及错误折叠蛋白大量聚集以及钙离子失衡,从而启动细胞凋亡途径^[13]。在本研究中,经 TUNEL 法显示,空白对照组和假手术组大鼠非梗死区心肌 AI 基本一致,MI 组大鼠非梗死区心肌 AI 较空白对照组和假手术组有所升高,而经芪蛭三七汤干预后,大鼠非梗死区心肌 AI 低于 MI 组大鼠。笔者又进一步采用 Western blotting 法检测各组大鼠心肌组织凋亡蛋白和促凋亡蛋白的表达,结果显示,芪蛭三七汤可有效抑制 MI 大鼠周边梗死区域细胞凋亡指数,同时降低心肌组织中促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达,提高抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量,可见芪蛭三七汤干预 MI 后心室重构的机制与抑制心肌细胞凋亡有关。

未折叠蛋白反应是内质网应激介导的一系列自我保护级联反应,对修复细胞损伤、清理坏死细胞、维持机体内环境的稳定性十分重要^[14]。静息状态下,内质网腔内未折叠蛋白通过与分子伴侣 GRP78 蛋白相结合而长期处于未激活状态。GRP78 蛋白属于热休克蛋白 70 家族成员之一,与蛋白的转运、折叠、降解密切相关,其基因启动子上含有特异性的内质网应激反应原件,正常情况下,可与 PERK、ATF6、IRE1 3 种跨膜蛋白相结合^[15]。若内质网腔内蛋白折叠失败而大量滞留,GRP78 与这 3 种跨膜蛋白相解离,使其激活并触发未折叠蛋白反应。因此 GRP78 激活通常被认为是内质网应激反应发生的标志^[16]。在本项研究中,空白对照组和假手术组大鼠心肌组织内质网分子伴侣 GRP78 蛋白表达量基本一致,MI 组大鼠心肌组织

GRP78 蛋白表达量高于空白对照组和假手术组;QZ 组大鼠心肌组织 GRP78 蛋白表达量较 MI 组大鼠有所降低。提示芪蛭三七汤保护心肌细胞的分子机制可能与内质网应激反应有关。静息状态下,细胞中 GRP78 与 PERK、ATF6、IRE1 3 种蛋白结合处于未激活状态,若内质网上聚集大量未折叠或错误折叠的蛋白,发生内质网应激反应,则可能引起 PERK-eIF2 α 信号通路的激活^[17]。PERK 的主要作用是抑制错误折叠蛋白的合成和翻译,发生内质网应激反应时,PERK 脱离 GRP78,促使 eIF2 α 发生磷酸化,从而抑制其蛋白功能^[18]。而磷酸化的 eIF2 α 可促使 ATF4 发生转录翻译,最终导致细胞凋亡^[19]。在本项研究中,4 组大鼠心肌组织 PERK 和 eIF2 α 蛋白表达量基本一致,但与空白对照组和假手术组比较,MI 组大鼠心肌组织 p-PERK 和 p-eIF2 α 蛋白表达量有所升高,而经芪蛭三七汤干预后,大鼠心肌组织 p-PERK 和 p-eIF2 α 蛋白表达量有所降低。说明 MI 后,大鼠心肌细胞内 PERK 含量并未增加,但是具有活性的 p-PERK 水平升高,p-PERK 可促使 eIF2 α 蛋白发生磷酸化。PERK-eIF2 α 通路进一步激活下游因子 ATF-4 促凋亡蛋白的表达,诱导细胞凋亡。由此推测在 MI 伴心室重构过程中,内质网应激尤其是 PERK-eIF2 α 信号通路的高度活化,对心肌细胞具有严重损伤作用^[20]。而芪蛭三七汤通过降低具有活性作用的 p-PERK 和 p-eIF2 α 的表达水平,抑制心肌细胞凋亡,从而发挥心肌保护作用。

综上所述,芪蛭三七汤经验方可有效改善 MI 后大鼠的心功能,减轻不利的心室重塑。而其核心机制可能与抑制 PERK-eIF2 α 信号通路诱导的内质网应激凋亡有关。

参 考 文 献:

- [1] 郝玉明,朱文玲. 心肌梗死后的心室重构[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 12(2): 2.
- [2] RABABA'HA M, GUILLORY A N, MUSTAFA R, et al. Oxidative stress and cardiac remodeling: an updated edge[J]. Curr Cardiol Rev, 2018, 14(1): 53-59.
- [3] CASTELVECCHIO S, MORONI F, MENICANTI L, et al. The matter of reverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction between fiction and reality[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2018, 19(8): 397-398.
- [4] WU Q Q, XIAO Y, YUAN Y, et al. Mechanisms contributing to cardiac remodelling[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(18): 2319-2345.
- [5] 白嘉玥,顾宁. 心肌梗死后心室重构机制及中医药干预研究进展[J]. 中国中医急症, 2018, 27(4): 730-733.

- [6] 苏学旭, 李惠平, 刘静. 体外反搏联合芪蛭三七汤对稳定型心绞痛患者心功能影响的临床观察 [J]. 贵州医药, 2013, 37(11): 985-987.
- [7] 李峰杰, 李贻奎. 心肌梗死动物模型研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(1): 5-10.
- [8] RUZZA A, CZER LSC, ARABIA F, et al. Left ventricular reconstruction for postinfarction left ventricular aneurysm: review of surgical techniques[J]. *Tex Heart Inst J*, 2017, 44(5): 326-335.
- [9] 张海燕, 李强. 心肌梗死后心室重构病理过程的研究进展 [J]. 实用老年医学, 2012, 27(3): 251-253.
- [10] HARTMANN P, SCHOBBER A, WEBER C. Chemokines and microRNAs in atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(17): 3253-3266.
- [11] TALLQUIST M D, MOLKENTIN J D. Redefining the identity of cardiac fibroblasts[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(8): 484-491.
- [12] LIU M, WANG Y, ZHU Q, et al. Protective effects of circulating microvesicles derived from ischemic preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Apoptosis*, 2018, 23(7-8): 436-448.
- [13] XUE A, LIN J, QUE C, et al. Aberrant endoplasmic reticulum stress mediates coronary artery spasm through regulating MLCK/MLC2 pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 363(2): 321-331.
- [14] 刘伟, 黄玮. 心肌梗死后内质网应激的研究及治疗进展 [J]. 心血管病学进展, 2014, 35(2): 224-226.
- [15] ZHANG C, TANG Y, LI Y, et al. Unfolded protein response plays a critical role in heart damage after myocardial ischemia/reperfusion in rats[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179042.
- [16] 丰梅, 付凌玲, 张伟华, 等. 内质网应激调控细胞自噬和凋亡 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(3): 455-462.
- [17] LEE YS, LEE D H, CHOUDRY H A, et al. Ferroptosis-induced endoplasmic reticulum stress: cross-talk between ferroptosis and apoptosis[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(7): 1073-1076.
- [18] 吕振嵘, 王晓初, 李玉珍, 等. PERK 介导的内质网应激参与血管紧张素 II 诱导心肌肥大的机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(7): 1153-1159.
- [19] 卢磊, 刘晓丹, 张培影. 内质网应激介导的细胞凋亡与心力衰竭 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2018, 20(4): 5.
- [20] LEBEAU J, SAUNDERS J M, MORAES VWR, et al. The PERK arm of the unfolded protein response regulates mitochondrial morphology during acute endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(11): 2827-2836.

(王荣兵 编辑)