

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.24.003

黄芪甲苷抑制缺血再灌注诱导的大鼠心肌细胞凋亡*

曾广伟¹ 安慧仙¹ 方东¹ 高钊¹ 贾建军² 朱舜明^{3Δ}

(1 西安国际医学中心医院内科 陕西 西安 710100; 2 甘肃省天水四零七医院内科 甘肃 天水 741000;

3 陕西省人民医院心内一科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:本研究旨在探究黄芪甲苷(Astragaloside IV, Ast-IV)在缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)大鼠模型中的保护作用,并讨论黄芪甲苷在抑制 I/R 诱导心肌细胞凋亡过程中的作用。**方法:**通过左冠状动脉前降支结扎构建 I/R 大鼠模型;将 40 只 SD 大鼠分为 4 组:假手术组(Sham 组)、模型组(I/R 组)、黄芪甲苷干预组(Ast 组)和黄芪甲苷+LY294002 干预组(Ast+LY 组)。使用试剂盒测定血清中心脏功能障碍标记物 CPK、ALT、LDH 和 tropomnin-T 的表达水平;通过 HE 染色和 TUNEL 分别检测心肌组织病理学变化和心肌细胞凋亡情况;通过超氧化物荧光探针染色检测细胞内 ROS 水平;通过 ELISA 试剂盒测定心肌组织 MDA、GSH 和 GSH-PX 含量;免疫组织化学检测 SOD2 和 HO-1 蛋白表达水平,分析心肌氧化应激状态;通过 Western blot 检测 PI3K、p-Akt、Akt、p-eNOS、eNOS、caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平变化。**结果:**Ast 组大鼠血浆 CPK、ALT、LDH 和 tropomnin-T 酶活性均明显低于 I/R 组($P<0.05$)。Ast 组大鼠心肌纤维断裂,心肌细胞坏死和炎性细胞浸润等病变程度均低于 I/R 组。Ast 组大鼠 TUNEL 阳性细胞数低于 I/R 组($P<0.05$)。相较于 I/R 组, Ast 组大鼠 Caspase3 和 Bax 表达水平均明显下调, Bcl-2 和 PI3K 蛋白表达水平上调, p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 比值均显著上调($P<0.05$)。Ast 组大鼠 DHE 荧光强度显著低于 Ast+LY 组($P<0.05$)。与 I/R 组相比, Ast 组大鼠心肌组织中 MDA 含量降低, GSH、GSH-PX、SOD2 和 HO-1 表达水平升高($P<0.05$);与 Ast 组相比, Ast+LY 组大鼠心肌组织中 MDA 含量升高, GSH、GSH-PX、SOD2 和 HO-1 表达水平降低($P<0.05$)。**结论:**黄芪甲苷通过激活 PI3K/Akt 信号通路,抑制心肌细胞氧化应激反应,从而减少 I/R 诱导大鼠心肌细胞凋亡,缓解 I/R 后大鼠心肌损伤。

关键词:缺血/再灌注;黄芪甲苷;细胞凋亡;氧化应激;心肌损伤

中图分类号:R-33;R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)24-4612-06

Astragaloside IV Attenuates Myocardial Apoptosis Induced by Ischemia-reperfusion in Rats*

ZENG Guang-wei¹, AN Hui-xian¹, FANG Dong¹, GAO Zhao¹, JIA Jian-jun², ZHU Shun-ming^{3Δ}

(1 Department of Cardiology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710100, China;

2 Department of Cardiology, Hospital 407 Tianshui of Gansu Provincial, Tianshui, Gansu, 741000, China;

3 1st Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: This study was to verify the protective effect of astragaloside IV (Ast-IV) in ischemia-reperfusion (I/R) rat model. And clarify the mechanism of astragaloside IV inhibiting I/R-induced cardiomyocyte apoptosis. **Methods:** I/R rat models were constructed by ligating the anterior descending coronary artery. 40 SD rats were randomly divided into four groups: sham group. I/R group, astragaloside IV intervention group (Ast group) and astragaloside IV+LY294002 intervention group (Ast+LY group). Serum cardiac dysfunction markers CPK, ALT, LDH and tropomnin-T levels were measured by commercial kits. HE staining and TUNEL were used to detect myocardial histopathological changes and myocardial cell apoptosis, respectively. The intracellular ROS level was detected by superoxide fluorescent probe staining. The content of MDA, GSH and GSH-PX in myocardial tissue was determined by ELISA kit. Combined with immunohistochemistry to detect SOD2 and HO-1 protein expression level, and analyze the myocardial oxidative stress state. The protein expression levels of PI3K, p-Akt, Akt, p-eNOS, eNOS, caspase-3, Bax and Bcl-2 were detected by Western blot. **Results:** The plasma CPK, ALT, LDH and tropomnin-T enzyme activities in the Ast group were significantly lower than those in the I/R group ($P<0.05$). Myocardial fiber rupture, myocardial cell necrosis and inflammatory cell infiltration in Ast group were lower than those in I/R group. The number of TUNEL positive cells in the Ast group was lower than that in the I/R group ($P<0.05$). Compared with the I/R group, the expression levels of Caspase3 and Bax protein were significantly down-regulated, the expression levels of Bcl-2 and PI3K pro-

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2018SF-085);唐都医院创新发展基金资助项目(2017JCYJ007)

作者简介:曾广伟(1981-),男,硕士研究生,副主任医师,主要研究方向:冠心病和结构性心脏病基础和临床研究,

E-mail: zengguangwei1026@163.com, 电话: 13629266606

Δ 通讯作者:朱舜明(1981-),男,博士研究生,副主任医师,主要研究方向:冠心病基础和临床研究,

E-mail: shen_jie_8008@163.com, 电话: 18829001234

(收稿日期:2020-05-23 接受日期:2020-06-19)

tein were significantly up-regulated, and the ratios of p-Akt/Akt and p-eNOS/eNOS were significantly increased ($P<0.05$). The fluorescence intensity of DHE in Ast group was significantly lower than that in Ast+LY group ($P<0.05$). Compared with the I/R group, the MDA content of Ast group was decreased, and the expression levels of GSH, GSH-PX, SOD2 and HO-1 were increased ($P<0.05$). Compared with the Ast group, the MDA content was increased, and the expression levels of GSH, GSH-PX, SOD2 and HO-1 were decreased in Ast+LY group ($P<0.05$). **Conclusion:** Astragaloside IV inhibits oxidative stress response of cardiomyocytes by activating PI3K/Akt signaling pathway, thereby reducing I/R-induced cardiomyocyte apoptosis and alleviating myocardial injury in rats.

Key words: Ischemia/Reperfusion; Astragaloside IV; Apoptosis; Oxidative stress; Myocardial injury

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)24-4612-06

前言

心肌缺血/再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤是临床上常见心血管疾病之一,会导致严重的心肌组织损伤和心脏功能障碍^[1]。I/R发病机制较为复杂,包括氧自由基损伤、炎症反应、能量代谢紊乱和微血管通透性升高等^[2,3]。

磷脂酰肌醇三激酶/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(phosphoinositide 3-kinases/serine/threonine protein kinase, PI3K-Akt)信号传导是一个内源性负反馈调节通路,主要对促炎反应和细胞凋亡过程发挥限制作用^[4,5]。Akt信号级联放大因子受PI3K调控激活,进一步调节eNOS、TNF- α 和Bcl-2等多个效应因子,以抑制细胞凋亡^[6]。激活PI3K/Akt信号通路已被证实可以有效缓解心脏功能损伤^[7,8]。

黄芪甲苷(Astragaloside IV, Ast-IV)是黄芪(Astragali Radix)毛状根的主要活性成分,也被视为黄芪质量控制生物标志物^[9],具有抗炎、抗纤维化、抗氧化应激、免疫调节和改善脂质代谢等多种药理活性^[10,11]。动物模型研究结果显示,黄芪甲苷能显著改善SD大鼠脑I/R损伤^[12],并通过调控细胞自噬水平减轻小鼠心肌I/R损伤^[13]。但黄芪甲苷与PI3K/Akt信号通路在心肌I/R过程中的作用机制仍有待研究。

本文旨在研究黄芪甲苷对I/R诱导心肌细胞凋亡的影响,并探究PI3K/Akt途径在黄芪甲苷发挥心肌保护作用中的机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

黄芪甲苷购于上海源叶生物科技有限公司;LY294002购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司;MDA、GSH和GSH-PX测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;DHE-ROS活性氧检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司;TUNEL试剂盒购于Boster公司;苏木精伊红染色试剂盒购于北京索莱宝公司;CPK、ALT、LDH和tropomnin-T测定试剂盒购于青岛海德诚生物工程有限公司;超敏ECL化学发光试剂盒购于Millipore;Caspase-3、Bax和Bcl-2抗体购于cell signaling technology公司;PI3K、p-Akt、Akt、p-eNOS和eNOS抗体购于Abcam公司;水合氯醛购自上海泰瑞生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物饲养及分组 10~12周龄健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(220~280 g)购于第三军医大学。所有实验大鼠在12 h/12 h明暗循环条件下适应培养2周,饲养温度25~28℃,湿度50%~60%,保证自由进食和饮水。选取40

只SD大鼠共分为4组:假手术组(sham组):大鼠心脏左冠状动脉前降支只穿线,不进行结扎,直接缝合;心脏缺血/再灌注模型组(I/R组):手术心肌缺血30 min,再灌注2 h再缝合;黄芪甲苷干预组(Ast组):手术结扎20 min后,腹腔注射黄芪甲苷(10 mg/kg);结扎30 min后,再灌注2 h再缝合;黄芪甲苷+LY294002干预组(Ast+LY组):术前10 min腹腔注射LY294002(0.3 mg/kg),手术结扎20 min后,腹腔注射黄芪甲苷(10 mg/kg),结扎30 min后再缝合。

1.2.2 I/R大鼠动物模型构建 用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射对大鼠麻醉,仰卧固定于手术台,接入BL-420生物系统,气管插管,通过呼吸机辅助呼吸。从胸骨左缘第二、三肋骨切开,剪破心包膜,用5-0丝线结扎左冠状动脉前降支(LAD),收紧丝线,形成心肌缺血,缺血部位有明显从红色到白色的变化,且ECG监测显示ST段明显抬高,即为造模成功。结扎30 min后,松开丝线,纱布清除胸腔内淤血再缝合。术后大鼠单只放置,2 h后准备取组织标本。

1.2.3 心脏功能标记酶生化分析 造模完成后,经腹主动脉取血,4℃3000 r/min离心20 min收集上清。按照试剂盒操作说明,测定心脏功能障碍标记物CPK、ALT、LDH和tropomnin-T水平。

1.2.4 HE染色 在灌注2 h后,脱颈法处死大鼠。取出心脏,并用生理盐水将血液洗净。一部分心脏组织用4%低聚甲醛固定,石蜡包埋,再经梯度乙醇脱水,制备成4 μ m组织切片。其余部分用于氧化应激检测、细胞凋亡检测以及信号通路检测。切片脱水后,苏木精染色5 min,1%盐酸处理10 min,温水浸泡5 min,伊红染色2 min。再经蒸馏水清洗,脱水,透明封片,过夜干燥后,在光学显微镜(XSP-36,深圳宝时达光学仪器有限公司)下记录观察。

1.2.5 TUNEL染色 按1.2.4方法制备组织切片后,60℃烘干30 min,脱蜡、水合后,滴加蛋白酶K工作液,37℃孵育10 min, PBS清洗3次。加入1% Triton-100,室温反应15 min;再滴加3% H₂O₂-甲醇溶液15 min, PBS清洗3次。加入100 μ L TdT酶反应液,37℃避光孵育1 h, PBS清洗3次。滴加50 μ L链霉抗生物素蛋白-荧光素反应液,37℃避光孵育1 h;加入50 μ L抗荧光猝灭溶液反应30 min后封片。通过荧光显微镜观察心肌细胞凋亡情况。每个处理组随机选取3个不重叠视野,计算TUNEL阳性细胞数。凋亡指数=TUNEL阳性细胞核(绿色荧光)/细胞核总数(蓝色荧光)。

1.2.6 DHE染色 按1.2.4方法制备大鼠心脏组织切片,60℃烘干30 min,脱蜡,水合后,按照试剂盒操作说明,滴加1 mL

50 $\mu\text{mol/L}$ DHE 反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用 PBS 清洗 3 次, 将切片置于激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.2.7 免疫组织化学检测 按 1.2.4 方法制备组织切片, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 30 min, 经二甲苯脱蜡并在梯度乙醇中脱水。用正常绵羊血清 (Bio-technology Co.) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。切片与抗 SOD2 和 HO-1 一抗 (1:200, Abbkine) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 3 min。再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (1:1000, Abbkine), 室温下孵育 30 min。用 DAB (苏州工业园区雅科化学试剂有限公司) 染色 3 min, 蒸馏水清洗 3 min。再用苏木精复染、脱水和封片。将切片置于光学显微镜下观察和采集图像。

1.2.8 Western blot 分析 分离获取大鼠左心室组织, 称取约 0.3 g 剪碎后, 加入 1 mL 组织裂解液 (Bestbio)。研磨至形成匀浆。4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 20 min 提取总蛋白, 通过 BCA Kit (Yasen Biological Technology Co.) 测定每个样品的蛋白质浓度。样品经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离分离后, 然后将凝胶上的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 与 5% 脱脂奶粉封闭过夜。TBST 清洗, 再分别与 Caspase-3、Bax、Bcl-2、PI3K、p-Akt、Akt、p-eNOS、eNOS 和

GAPDH 孵育过夜。TBST 清洗后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IgG 山羊抗兔二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 清洗。使用 E-CL 化学发光试剂盒进行蛋白条带显影, 在 UVP 凝胶成像仪中观察记录, 用 Image J 进行蛋白条带灰度值分析。以目标条带和内参条带灰度值之比作为蛋白质的相对表达。每个实验重复 3 次。

1.3 统计分析

使用 SPSS 22.0 进行数据统计分析, 数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差, 两组比较采用非配对 t 检验, 多组比较采用单因素方差 (ANOVA) 分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ast 显著改善 I/R 后大鼠心脏功能

结果如图 1 所示, 与 Sham 组相比, I/R 组大鼠血浆中 CPK、ALT、LDH 和 tropomnin-T 酶活性均有不同程度升高 (P<0.05); Ast 组大鼠血浆 CPK、ALT、LDH 和 tropomnin-T 酶活性则明显低于 I/R 组 (P<0.05); 与 Ast 组相比, Ast+LY 组大鼠血浆 CPK、ALT、LDH 和 tropomnin-T 酶活性均显著上调 (P<0.05)。这表明 Ast 干预能使 I/R 大鼠心脏功能指标恢复正常。

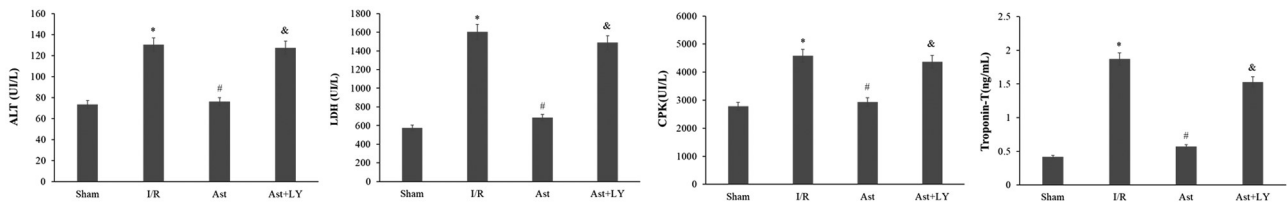


图 1 Ast 显著减轻 I/R 诱导心脏功能损伤

注: 与 Sham 组比较, *P<0.05; 与 I/R 组比较, #P<0.05; 与 Ast 组比较, &P<0.05。

Fig.1 Ast significantly attenuates I/R induces cardiac dysfunction

Note: Compared with Sham group, *P<0.05; Compared with I/R group, #P<0.05; Compared with Ast group, &P<0.05.

2.2 Ast 显著减轻 I/R 诱导心肌组织病理学变化

HE 染色结果如图 2 所示, Sham 组大鼠心肌细胞排列较为规则, 心肌纤维没有出现坏死; 与 Sham 组相比, I/R 组大鼠存在明显心肌纤维断裂情况, 并伴随炎性细胞浸润, 细胞质空泡化, 以及细胞外间隙增大; Ast 组大鼠心脏组织切片中心肌细胞排列相对整齐, 形态正常, 细胞核居中, 心肌纤维断裂, 心肌细胞坏死和炎性细胞浸润等病变程度均低于 I/R 组; 与 Ast 组相比, Ast+LY 组心肌细胞排列较紊乱, 心肌梗塞面积增加, 脂褐素沉积更多。

2.3 Ast 抑制 I/R 诱导心肌细胞凋亡

心肌组织 TUNEL 检测结果如图 3A 所示, I/R 组大鼠细胞

凋亡率高于假手术组 (P<0.05), Ast 组大鼠细胞凋亡率则明显低于 I/R 组 (P<0.05), Ast+LY 组大鼠细胞凋亡率显著高于 Ast 组 (P<0.05)。这表明抑制剂 LY294002 逆转了 Ast 对 I/R 大鼠心肌细胞的保护作用。

大鼠心肌组织中 caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平结果如图 3B 所示, 与假手术组相比, I/R 组大鼠心肌组织 Caspase3 和 Bax 表达水平明显升高, Bcl-2 蛋白表达明显减少 (P<0.05)。Ast 组大鼠心肌组织 Caspase3 和 Bax 表达水平均明显低于 I/R 组, Bcl-2 蛋白水平显著高于 I/R 组 (P<0.05); 而相较于 Ast 组, Ast+LY 组大鼠心肌组织 Caspase3 和 Bax 蛋白水平显著上调, Bcl-2 表达水平明显下调 (P<0.05)。

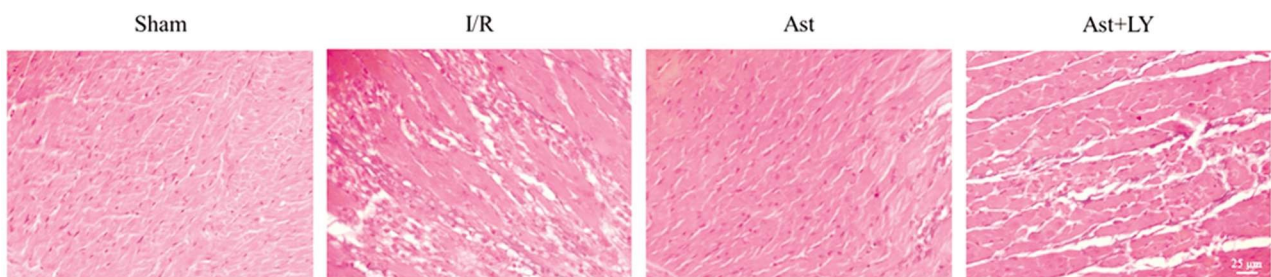


图 2 Ast 显著减轻 I/R 诱导心肌组织损伤

Fig.2 Ast significantly reduced I/R induced myocardial injury

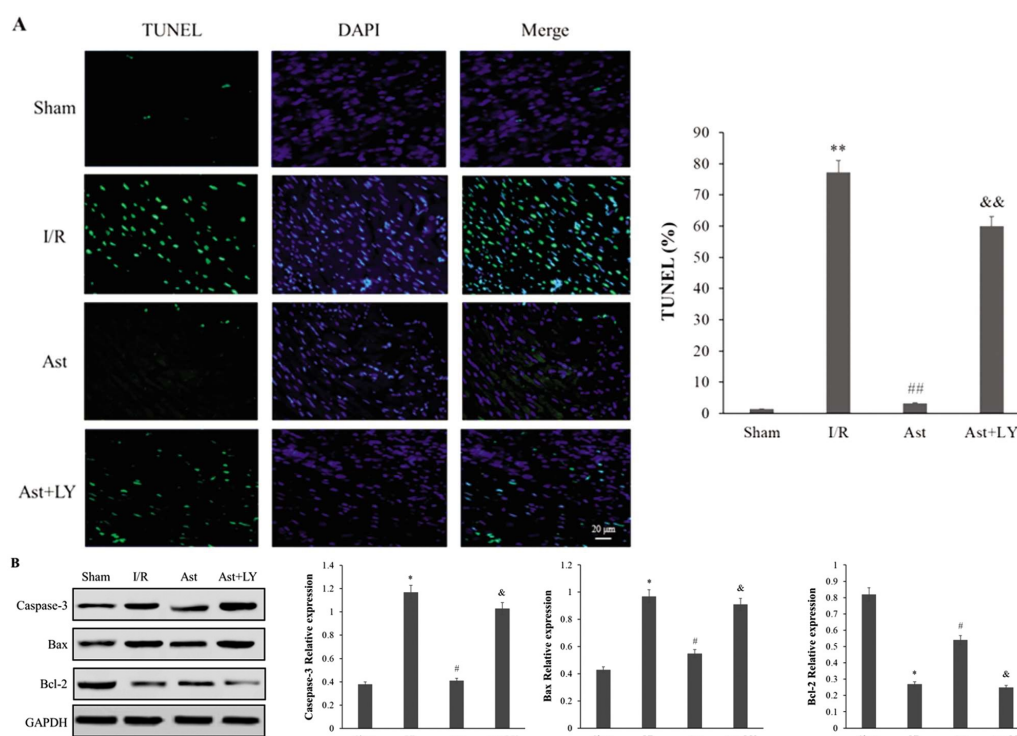


图3 Ast显著抑制I/R后心肌细胞凋亡

注:A:大鼠心肌组织 TUNEL 检测结果,TUNEL 染色阳性(绿色)表示凋亡细胞核,DAPI 复染(蓝色)表示总细胞核;B:大鼠心肌组织中 caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平 Western blot 检测结果;与 Sham 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 I/R 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$;与 Ast 组比较,& $P<0.05$,&& $P<0.01$ 。

Fig.3 Ast significantly inhibited cardiomyocyte apoptosis after I/R

Note: A: Result of TUNEL detection of rat myocardial tissue, TUNEL staining positive (green) indicates apoptotic nuclei. DAPI staining (blue) indicates total nucleus; B: Western blot results of caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expression in rat myocardium; Compared with Sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with I/R group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; Compared with Ast group, & $P<0.05$, && $P<0.01$.

2.4 Ast 明显抑制 I/R 后氧化应激水平并增强心肌细胞抗氧化能力

大鼠心肌细胞 ROS 积累水平检测结果如图 4A 和图 4B 所示,Ast 组大鼠心肌细胞 DHE 荧光强度与 I/R 组相比显著降低,而 Ast+LY 组大鼠心肌细胞 DHE 荧光强度相较于 Ast 组显著升高($P<0.05$)。

大鼠心肌组织 MDA、GSH 和 GSH-PX 水平检测结果如图 4C 所示,Ast 组大鼠心肌组织 MDA 水平与 I/R 组相比显著降低,而 GSH 和 GSH-PX 水平均显著升高($P<0.05$);与 Ast 组比较,Ast+LY 组大鼠心肌组织 MDA 水平显著升高,而 GSH 和 GSH-PX 水平均显著降低($P<0.05$)。

大鼠心肌组织免疫组化分析结果如图 4D 所示,与 I/R 组相比,Ast 组大鼠心肌组织 SOD2 和 HO-1 蛋白表达水平上调;与 Ast 组比较,Ast+LY 组大鼠心肌组织 SOD2 和 HO-1 表达水平均显著降低($P<0.05$)。以上结果表明,Ast 明显抑制 I/R 后氧化应激水平并增强心肌细胞抗氧化能力。

2.5 Ast 激活 I/R 后 PI3K / Akt 信号通路

PI3K/Akt 信号通路关键蛋白因子 Western blot 检测结果如图 5 所示,与 I/R 组相比,Ast 组大鼠 PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 表达水平均明显上调($P<0.05$);与 Ast 组比较,Ast+LY 组大鼠 PI3K、p-Akt/Akt 和 p-eNOS/eNOS 表达水平均明显下调($P<0.05$)。该结果表明,LY294002 干预可显著抑制 Ast 对 I/R 后大鼠 PI3K、Akt 和 eNOS 蛋白表达和磷酸化水平

影响。

3 讨论

黄芪甲苷作为一种从传统中药提取的高活性天然化合物,现代医学研究已揭示了其抗氧化、抗病毒、免疫调节,以及改善心肺功能等药理活性,有 " 超级黄芪多糖 " 之称^[14]。但关于黄芪甲苷在动物模型中保护心肌细胞免受 I/R 诱导损伤的作用机制仍知之甚少。

胞内自由基过度累积和抗氧化酶蛋白水平降低诱导的氧化应激是导致 I/R 损伤的主要原因^[15]。线粒体作为心肌细胞中最活跃和最重要的细胞器,消耗着近 90% 的 O_2 供应^[16]。过量的 ROS 通过促进脂质过氧化、蛋白质氧化和 DNA 损伤,导致线粒体功能障碍,以及 caspase-3 蛋白活化,进而诱导细胞凋亡^[17]。本研究实验结果显示,I/R 后大鼠心肌细胞氧化应激标志物 --MDA 蛋白水平明显上调;而 Ast 预处理显著上调抗氧化蛋白 SOD2 和 HO-1 表达水平,并下调 MDA 水平。DHE 染色检测结果也显示,Ast 预处理可显著降低 I/R 诱导的 ROS 水平升高。这表明 Ast 通过抑制氧化应激水平缓解 I/R 诱导心肌细胞损伤。

Caspase 和 Bcl-2 家族蛋白因子在细胞凋亡信号调控过程中发挥着重要作用^[18],I/R 诱导细胞凋亡已被证实与 Bax 蛋白水平升高和 Bcl-2 蛋白表达水平降低有关^[19,20]。杨等^[21]报道,Ast 通过上调 Bcl-2,抑制 Caspase-3 和 Beclin-1 蛋白表达,缓解缺氧 / 复氧诱导的心肌细胞 H9c2 损伤。本研究通过 Western blot

检测到 Ast 干预可显著下调 I/R 大鼠心肌细胞 caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平,上调 Bcl-2 蛋白表达。TUNEL 细胞凋亡检

测结果显示,Ast 预处理能显著抑制 I/R 诱导心肌细胞凋亡。这表明 Ast 在 I/R 大鼠模型中具有抗凋亡作用。

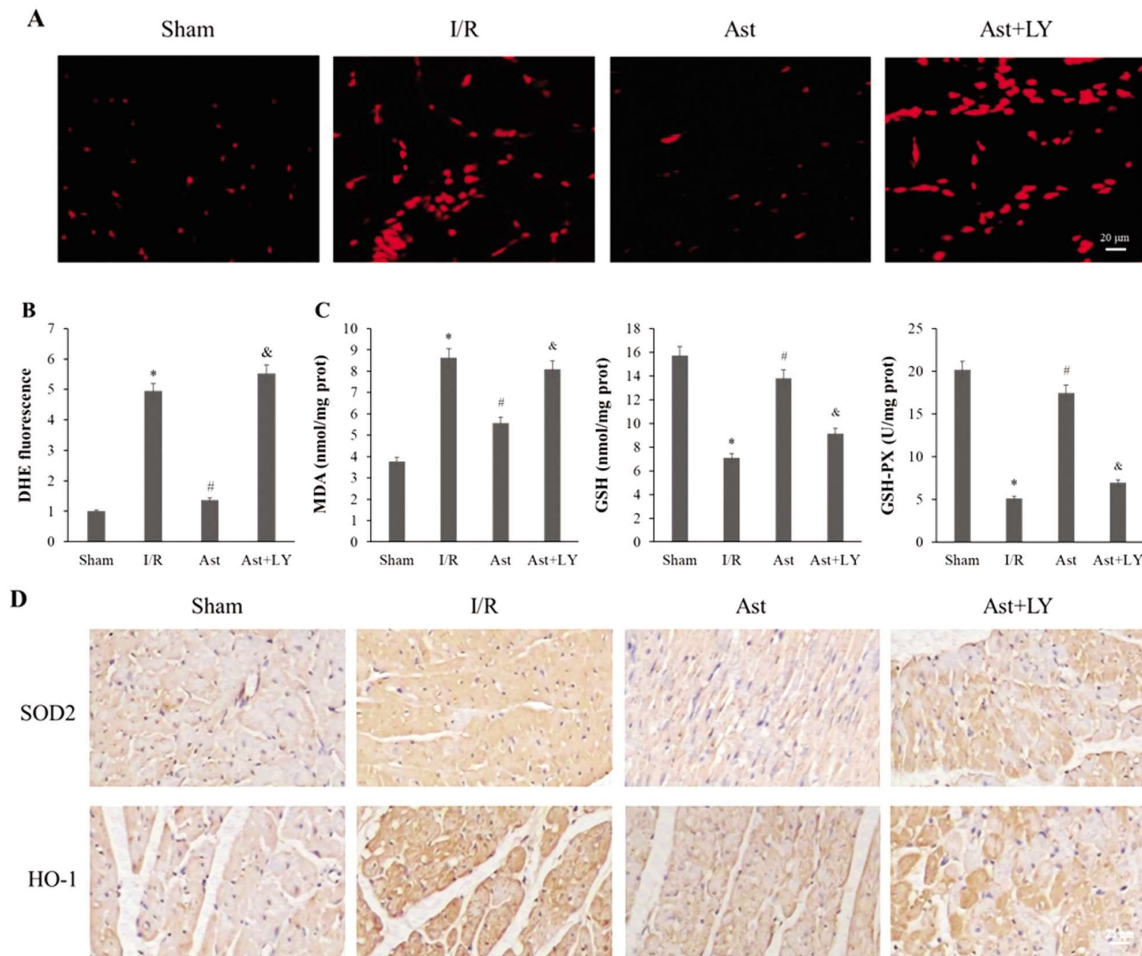


图4 Ast 显著抑制 I/R 诱导氧化应激水平升高

注:A:DHE 染色检测 ROS 水平;B:ROS 水平检测统计结果;C:心肌组织 MDA、GSH 和 GSSG 含量检测统计结果;D:大鼠心肌组织 SOD2 和 HO-1 蛋白免疫组化检测结果($\times 400$);与 Sham 组比较,* $P<0.05$;与 I/R 组比较,# $P<0.05$;与 Ast 组比较,& $P<0.05$ 。

Fig.4 Ast significantly inhibited I/R induced increased levels of oxidative stress

Note: A: ROS levels detected by DHE staining; B: Results of ROS level; C: Results of MDA, GSH and GSSG in myocardial tissue; D: The results of immunohistochemical detection of SOD2 and HO-1 proteins in rat myocardium; Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with I/R group, # $P<0.05$; Compared with Ast group, & $P<0.05$.

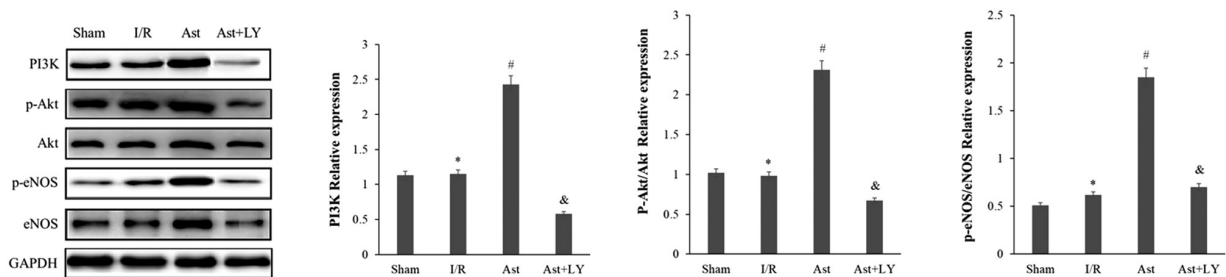


图5 Ast 显著激活 PI3K/Akt 信号通路

注:与 Sham 组比较,* $P<0.05$;与 I/R 组比较,# $P<0.05$;与 Ast 组比较,& $P<0.05$ 。

Fig.5 Ast significantly activated PI3K /Akt signaling pathways

Note: Compared with Sham group, * $P<0.05$; Compared with I/R group, # $P<0.05$; Compared with Ast group, & $P<0.05$.

PI3K/Akt 途径激活使下游效应因子 eNOS 磷酸化,增加内源性 NO 合成^[22],并进一步激活核糖体蛋白 S6 激酶和糖原合酶激酶-3 β ,一方面,促进血管修复;另一方面,线粒体 KATP 通道可能被激活,促进有氧代谢反应,以缓解 I/R 诱导损伤^[23,24]。

本研究实验结果显示,Ast 处理可显著上调 PI3K、p-Akt 和 p-eNOS 蛋白表达水平。然而,在 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 干预后,Ast 对上述蛋白因子磷酸化水平影响明显降低;Ast+LY 组大鼠心肌组织病理学变化和氧化应激水平也均明显高于 Ast

组,LY294002 逆转了 Ast 在 I/R 大鼠心肌细胞中的有益作用。这表明,PI3K/Akt 信号通路激活在 Ast 缓解 I/R 诱导心肌损伤过程中发挥着重要作用。

综上所述,Ast 通过激活 PI3K/Akt 信号通路,抑制心肌细胞凋亡,减轻大鼠 I/R 诱导损伤。这一发现可能为 Ast 介导 PI3K/Akt 激活的机制以及黄芪的心脏保护作用提供新见解。但本研究仅分析了单一剂量 Ast 干预方案,没有设置剂量梯度,也未涉及起效时间或作用持续时间方面的讨论;并且缺乏临床数据评估。这些局限性将在未来的研究中进一步完善。

参考文献(References)

- [1] 夏君彦,李冬. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(21): 3329-34
- [2] 刘云洁. 纳布啡预处理对糖尿病大鼠缺血再灌注心肌损伤的影响 [D]. 南昌大学, 2018
- [3] 孙明慧. 靶向激活 ERK1/2 信号通路防治动脉硬化性心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究[D]. 新疆医科大学, 2019
- [4] 徐厚谦, 颜春鲁, 张永花, 等. 当归补血汤通过 PI3K/Akt 通路对 Ang II 诱导肥大心肌细胞的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 135-139
- [5] Jing Y, Li S, Wang L, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via mertk-dependent activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 850
- [6] 韩雪灵. 新辅助化疗前后胃癌组织中 PI3K-AKT-mTOR 信号通路蛋白及 E-cadherin/OCT4 蛋白表达与预后的关系 [D]. 郑州大学, 2019
- [7] 何贵新, 秦伟彬, 陈雅璐, 等. 益气活血养阴类中药改善心肌缺血再灌注损伤与 PI3K/AKT 通路相关性研究 Meta 分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(5): 11-15
- [8] 武亚琳. Ang-(1-7)通过 "PI3K/Akt-SERCA- 内质网应激 - 凋亡" 通路对心肌细胞 H/R 损伤起保护作用[D]. 山西医科大学, 2019
- [9] 李媛. Ast 对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的影响 [J]. 中国药理学通报, 34(1): 108-112
- [10] 曹玉冰. Ast 的药理作用及其机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 954-960
- [11] 刘羽菲, 龙颖, 李娟, 等. 黄芪甲苷药理作用的文献计量学分析[J]. 中医药导报, 2019, 25(22): 85-90
- [12] 史楠, 张燕, 李晋峰, 等. 黄芪甲苷通过 AKT-mTOR 信号通路促进脑缺血的自噬改善脑缺血再灌注损伤 [J]. 中国临床神经科学, 2017, 25(6): 601-612
- [13] 居来提·艾买提, 阿布都沙拉木·阿布都热衣木, 兰怡. 黄芪甲苷对小鼠缺血再灌注心肌细胞自噬及炎症反应的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(17): 67-69
- [14] Li L, Hou X, Xu R, et al. Research review on the pharmacological effects of Astragaloside IV [J]. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2017, 31(1): 17-36
- [15] 马金安, 刘晓明, 邓晋峰, 等. 栀子苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注后 PI3K / Akt 信号通路的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(20): 2152-2155
- [16] 孔令恒, 陈玉龙, 孙娜, 等. 抑制 CaMKII 减轻线粒体氧化应激可改善离体心脏缺血再灌注损伤 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(2): 181-186
- [17] 刘检娣, 谢龙, 谢东明. 氧化应激相关心血管疾病与 NF- κ B 信号通路关系的研究现状[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(3): 275-282
- [18] 谭亚芳, 祁建勇, 梁玮婷, 等. 丹莪片对大鼠 H9c2 心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用及凋亡信号通路的影响 [J]. 广东医学, 2019, 40(14): 1983-1988
- [19] Li X, Luo S, Zhang J, et al. LncRNA H19 alleviated myocardial ischemia reperfusion injury via suppressing miR-877-3p/Bcl-2-mediated mitochondrial apoptosis [J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2019, 17: 297-309
- [20] 白文伟, 杨华, 刘小永, 等. 紫草素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 16: 1944-1950
- [21] 杨晶晶. Ast 对大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的作用及机制研究 [D]. 广东药科大学, 2019
- [22] 冷雪, 臧安缘, 李其芳. 人参皂苷 Rg₁ 通过 PI3K/Akt/eNOS 信号通路调控肾丙肾上腺素致急性心肌缺血大鼠心肌的抗氧化作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 145-150
- [23] Song HP, Chu ZG, Zhang DX, et al. PI3K-AKT Pathway Protects Cardiomyocytes Against Hypoxia-Induced Apoptosis by Mitochondrial Translocation of pAKT [J]. Cellular Physiology & Biochemistry, 2018, 49(2): 717-727
- [24] Barsukevich V, Basalay M, Sanchez J, et al. Distinct cardioprotective mechanisms of immediate, early and delayed ischaemic postconditioning [J]. Basic Research in Cardiology, 2015, 110(1): 452