

羟基红花黄素 A 对缺血性心力衰竭大鼠心肌自噬及 ERK1/2 通路的影响*

西宁市第二人民医院 崔云云* 胡成功¹ 刘书磊, 西宁 810003

摘要 目的:探讨羟基红花黄素 A(HSYA)对缺血性心力衰竭(IHF)大鼠心肌自噬及细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)通路的影响。方法:将 72 只大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组(卡托普利组)、低剂量 HSYA 组(L-HSYA)、中剂量 HSYA 组(M-HSYA)、高剂量 HSYA 组(H-HSYA),每组 12 只。采用冠脉结扎法建立缺血性心力衰竭大鼠模型。超声仪检测大鼠左心室心功能水平,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 N-末端脑钠肽前体(NT-proBNP)和超敏肌钙蛋白(hs-TnT)水平,透射电镜观察心肌细胞自噬,Western blot 法检测心肌组织自噬相关因子微管相关蛋白 1(Beclin1)、微管相关蛋白轻链 3(LC3)、泛素和 LC3 结合蛋白 p62(p62)、ERK1/2 蛋白表达。结果:与模型组比较,阳性对照组、M-HSYA 和 H-HSYA 组大鼠左室收缩末期室间隔厚度(LVSS)、左室舒张末期室间隔厚度(LVSD)、收缩末期左室后壁厚度(LVPWS)、舒张末期左室后壁厚度(LVPWD)、左室射血分数(LVEF)及 L-HSYA 组 LVSD 显著升高(均 $P < 0.05$);心电图 T 波幅度和 ST 段抬高幅度显著降低,QT 间期显著缩短(均 $P < 0.05$);大鼠血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平显著降低(均 $P < 0.05$),心肌细胞自噬小体数量减少,自噬率显著降低($P < 0.05$);心肌组织 Beclin-1、LC3I/LC3II 蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$),p62 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$)。结论:IHF 大鼠心肌损伤与自噬关系密切,HSYA 可能通过激活 ERK1/2 信号通路抑制 IHF 大鼠心肌细胞自噬。

关键词 缺血性心力衰竭;羟基红花黄素 A;自噬;细胞外调节蛋白激酶通路

中图分类号 R541.6 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20200312

Effects of hydroxysafflor yellow A on myocardial autophagy and ERK1/2 pathway in rats with ischemic heart failure CUI Yun-yun*, HU Cheng-gong¹, LIU Shu-lei. Xining Second People's Hospital, Xining 810003, China

Abstract Objective: To investigate the effect of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on myocardial autophagy and extracellular regulated protein kinase (ERK1/2) pathway in rats with ischemic heart failure (IHF). Methods: Seventy-two rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive control group (captopril group), low-dose HSYA (L-HSYA) group, medium-dose HSYA (M-HSYA) group and high-dose HSYA (H-HSYA) group, with 12 rats in each group. The rat model of IHF was established by ligation of coronary artery. The left ventricular function of rats was measured by echocardiography, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and high-sensitivity Troponin T (hs-TnT) contents, the autophagy of myocardial cells was observed by transmission electron microscopy, and Western blotting was used to detect the expression of autophagy related factor microtubule associated protein 1 (Beclin 1), microtubule associated protein light chain 3 (LC3), ubiquitin and LC3 binding protein p62 (p62) and ERK1/2 in myocardium. Results: Compared with model group, the left ventricular interventricular septal thickness during systole (LVSS), left ventricular interventricular septal thickness during diastole (LVSD), left ventricular posterior wall thickness at end-systole (LVPWS), left ventricular posterior wall depth (LVPWD) and left ventricular fraction (LVEF) in positive control group, M-HSYA and H-HSYA groups and LVSD in L-HSYA group increased significantly (all $P < 0.05$); the T wave amplitude and ST segment elevation amplitude of ECG were significantly decreased, and the QT interval was significantly shortened (all $P < 0.05$); the contents of NT-proBNP and hs-TnT in serum of rats decreased significantly (all $P < 0.05$), the number of autophagic bodies in cardiomyocytes decreased, and the autophagy rate decreased significantly (all $P < 0.05$), the expression of Beclin-1, LC3I and LC3 II in myocardial tissues was significantly decreased, and the expression of p62 and p-ERK1/2 significantly increased (all $P < 0.05$). Conclusion: Myocardial injury is closely related to autophagy in IHF rats. HSYA may reduce the autophagy of myocardial cells in IHF rats by activating ERK1/2 signaling pathway.

Key words Ischemic heart failure; Hydroxysafflor yellow A; Autophagy; Extracellular regulated protein kinase pathway

自噬是由溶酶体介导的细胞内蛋白质和细胞器再循环的细胞机制。适度的自噬发挥保护心肌的作用,而自噬过度被激活则会加重心肌损伤^[1]。羟基

红花黄素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 为查尔酮苷类化合物,是红花药理功效的水溶性成分,具有镇痛、抗炎、抗肿瘤^[2]等活性,对冠心病、血管栓塞性疾病、高血压、糖尿病等有一定疗效^[3]。研究发现,HSYA 可通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein ki-

*基金项目:四川省科技攻关项目(No:2017JY0260)

¹ 四川大学华西医院

*通信作者:崔云云, E-mail: zwqv99@163.com

nase B, akt)/糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK3 β)信号通路,减轻大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤^[4],增强 H9c2 心肌细胞活力^[5]。本研究观察 HSYA 对缺血性心力衰竭 (ischemic heart failure, IHF) 大鼠心肌自噬和细胞外调节激酶 (extracellular regulating kinase, ERK1/2) 信号通路的影响。

材料与方法

实验动物 清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 72 只, 8 周龄, 体重 170 ~ 230 g, 购于南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心, 合格证号 SCXK(苏) 2012-0010。所有大鼠均给予标准饲料, 自由饮水, 适应性喂养 1 周。

试剂和器材 HSYA 由山东省天然药物工程技术研究中心提供, 纯度 $\geq 98\%$, 批号 20180217, 规格 10 mg/支。青霉素由齐鲁制药厂生产, 批号 H37021359, 规格 80 万单位。IE33 型超声心动仪由上海创讯医疗器械有限公司提供, 探头频率 1.0 ~ 5.0 MHz, 横向检测。超敏肌钙蛋白 T (high-sensitivity troponin T, hs-TnT) 和 N-末端脑钠肽前体 (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP) 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。自噬相关因子微管相关蛋白-1 (Beclin-1) 抗体由美国 Santa Cruz 公司提供, 批号 8G10; 微管相关蛋白轻链 3 (microtubule light chain related protein 3, LC3) I、泛素和 LC3 结合蛋白 p62 (the ubiquitin-and LC3-binding protein p62, p62) 抗体由美国 Santa Cruz 公司提供, 批号 136F3、129F5 和 10163s; p-ERK1/2 抗体购自美国 Cell Signaling Technology; GAPDH 抗体稀释度 1:1000, 美国 ProteinTech Group; 使用日本 JEM-1011 透射电子显微镜。

方法

1. 模型制备。参照文献方法^[6]制备 IHF 大鼠模型。大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (3 mL/kg), 仰卧位固定, 左侧 3 ~ 4 肋间开胸暴露心脏, 挑破心包, 轻压右胸, 将心脏挤出胸腔外, 于左心耳和肺动脉圆锥间距离左心耳 1 ~ 1.5 mm 处左冠状动脉前降支穿线, 之后迅速将心脏送回胸腔内, 轻轻挤压胸腔排除空气, 关胸, 恢复自主呼吸, 稳定 5 min 后, 结扎冠脉 (假手术组只穿线不结扎)。常规缝合关胸, 为防伤口感染, 给予肌肉注射青霉素 (24 万 U/kg, 1 次/d, 注射 3d)。用 BL-420 自动记录仪观察并记录心电图变化。心电图显示 ST 段显著抬高 0.2 mV

以上表示造模成功。

2. 分组和给药。造模成功的大鼠随机分为模型组、阳性对照组、低浓度羟基红花黄素 A 组 (L-HSYA)、中浓度羟基红花黄素 A 组 (M-HSYA)、高浓度羟基红花黄素 A 组 (H-HSYA)。阳性对照组给予卡托普利 50 mg/(kg · d)^[6]。L-HSYA、M-HSYA 和 H-HSYA 组分别给予 10、20、40 mg/(kg · d) HSYA。假手术组和模型组给予等量生理盐水, 连续给药 5 周。所有大鼠均尾部静脉给药, 给药结束后观察各组大鼠心电图变化。

3. 超声检测。5 周后麻醉大鼠, 应用高频线控探头和超声心动仪作心脏检查。检测指标: 左室收缩末期室间隔厚度 (left ventricular interventricular septal thickness during systole, LVs)、左室舒张末期室间隔厚度 (left ventricular interventricular septal thickness during diastole, LVSD)、左心室射血分数 (left ventricular fraction, LVEF)、收缩末期左心室后壁厚度 (left ventricular posterior wall thickness at end-systole, LVPWs)、舒张末期左心室后壁厚度 (left ventricular posterior wall depth, LVPWd)。

4. 大鼠血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平测定。血液动力学测定后, 经腹主动脉采血 2 mL 于真空促凝管, 静置 10 min 后, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清 -20℃ 保存备用。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平, 分别按照试剂盒说明书步骤进行测定。

5. 透射电镜观察大鼠心肌组织自噬小体。所有大鼠经麻醉后切开胸骨, 取心尖部心肌组织, 迅速置于液氮保存。参照文献方法^[7], 使用预冷的生理盐水溶液灌注剩余部分心肌组织 3 min, 2% 戊二醛固定 2 h, 清洗后用锇酸固定 2 h, 经丙酮脱水、丙酮与包埋剂浸透、包埋剂环氧树脂 618 包埋, 超薄切片。用醋酸铀、柠檬酸铅双染色 20 min, 在电镜下观察线粒体的损伤以及自噬小体的形成。

6. Western blot 法检测心肌组织 Beclin-1、LC3 I、LC3 II、p62 和 p-ERK1/2 蛋白表达。大鼠心肌组织剪碎, 加入预冷的蛋白裂解液置于冰上充分裂解, 4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 -80℃ 保存备用。二喹啉甲酸法 (BCA) 测定蛋白浓度, 取 30 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后采用半干法将蛋白转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2h 后, 分别加入一抗 Beclin-1、LC3 I、LC3 II、p62 和 p-ERK1/2, 4℃ 孵育过夜。冲洗后加入二抗 (稀释度 1:1000), 室温孵育 2h。冲洗后

电化学发光(ECL)显色,凝胶成像系统扫描,Image J 软件分析蛋白相对表达水平。

统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计学软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

心脏超声 与假手术组比较,模型组大鼠 LVSs、LVSD、LVEF、LVPWs 和 LVPWd 显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,L-HSYA 组 LVSD、M-HSYA、H-HSYA 组及阳性对照组大鼠 LVSs、LVSD、LVPWs、

LVPWd 和 LVEF 显著升高(均 $P < 0.05$);L-HSYA 组大鼠 LVSs、LVPWs、LVPWd 和 LVEF 虽有升高,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

心电图 与假手术组比较,模型组大鼠心电图 T 波幅度和 ST 段抬高幅度显著升高,QT 间期显著延长(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组、M-HSYA 和 H-HSYA 组大鼠心电图 T 波幅度和 ST 段抬高幅度显著降低(均 $P < 0.05$),QT 间期显著缩短($P < 0.05$);L-HSYA 组 T 波幅度和 ST 段抬高幅度降低,QT 间期缩短,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1、表 2。

表 1 6 组大鼠心脏超声 LVSs、LVSD、LVEF、LVPWs、LVPWd 值比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	例	LVSs(cm)	LVSD(cm)	LVEF(%)	LVPWs(cm)	LVPWd(cm)
假手术组	12	0.389 ± 0.016	0.238 ± 0.011	0.826 ± 0.046	0.413 ± 0.042	0.287 ± 0.023
模型组	12	0.331 ± 0.011 *	0.199 ± 0.006 *	0.615 ± 0.028 *	0.338 ± 0.028 *	0.235 ± 0.015 *
阳性对照组	12	0.375 ± 0.014 #	0.228 ± 0.009 #	0.817 ± 0.044 #	0.442 ± 0.037 #	0.279 ± 0.021 #
L-HSYA	12	0.342 ± 0.011	0.211 ± 0.006 #	0.625 ± 0.025	0.346 ± 0.034	0.242 ± 0.013
M-HSYA	12	0.365 ± 0.012 #	0.220 ± 0.008 #	0.713 ± 0.033 #	0.378 ± 0.036 #	0.265 ± 0.014 #
H-HSYA	12	0.379 ± 0.015 #	0.229 ± 0.009 #	0.805 ± 0.045 #	0.411 ± 0.039 #	0.281 ± 0.022 #

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

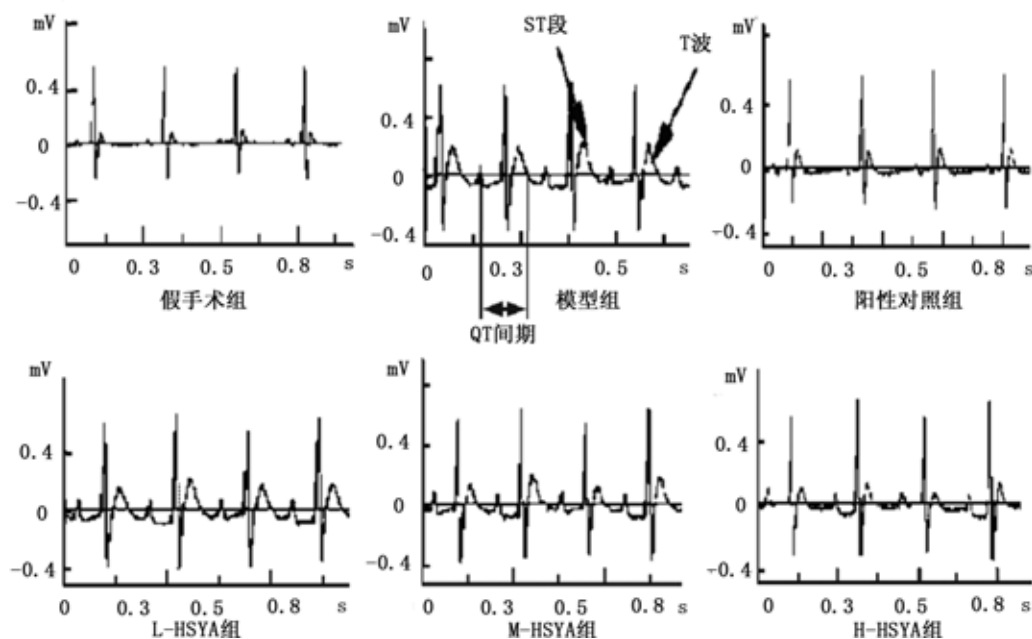


图 1 6 组大鼠心电图

表 2 HSYA 对 6 组大鼠心电图的影响

($\bar{x} \pm s$)

组别	QT 间期(ms)	T 波幅度(mV)	ST 段抬高幅度(mV)
假手术组	147.24 ± 1312.15	0.18 ± 0.06	0.05 ± 0.05
模型组	218.17 ± 20.58 *	0.37 ± 0.10 *	0.25 ± 0.12 *
阳性对照组	165.31 ± 13.56 #	0.20 ± 0.07 #	0.10 ± 0.04 #
L-HSYA	192.57 ± 18.16	0.33 ± 0.08	0.19 ± 0.07
M-HSYA	181.28 ± 15.27 #	0.27 ± 0.06 #	0.15 ± 0.06 #
H-HSYA	170.16 ± 14.38 #	0.23 ± 0.07 #	0.12 ± 0.05 #

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平 与假手术组比较,模型组大鼠血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平显著升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组、M-HSYA 和 H-HSYA 组大鼠血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平显著降低(均 $P < 0.05$),L-HSYA 组大鼠血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平降低,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图 2。

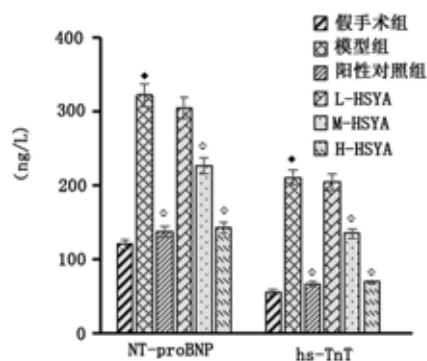


图2 6组大鼠血清 NT-proBNP 和 hs-TnT 水平比较

心肌细胞自噬检测 与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞自噬小体数量增加,自噬率显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组、M-HSYA 和 H-HSYA 组大鼠心肌细胞自噬小体数量减少,自噬率显著降低(均 $P < 0.05$),L-HSYA 组大鼠心肌细胞自噬率降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3、4。

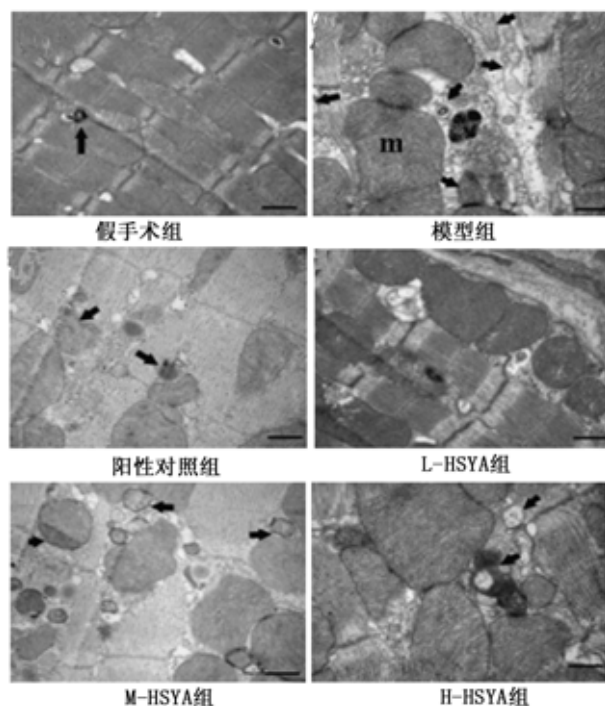
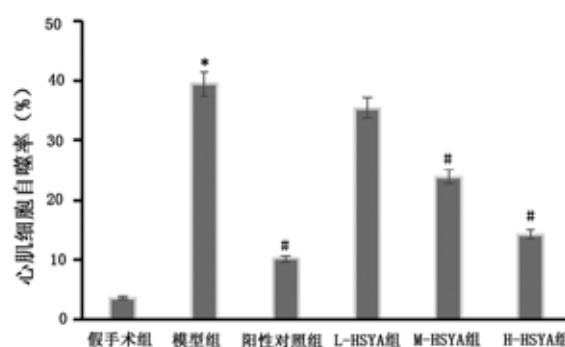


图3 透射电子显微镜下6组大鼠心肌细胞超微结构($\times 12000$)



注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

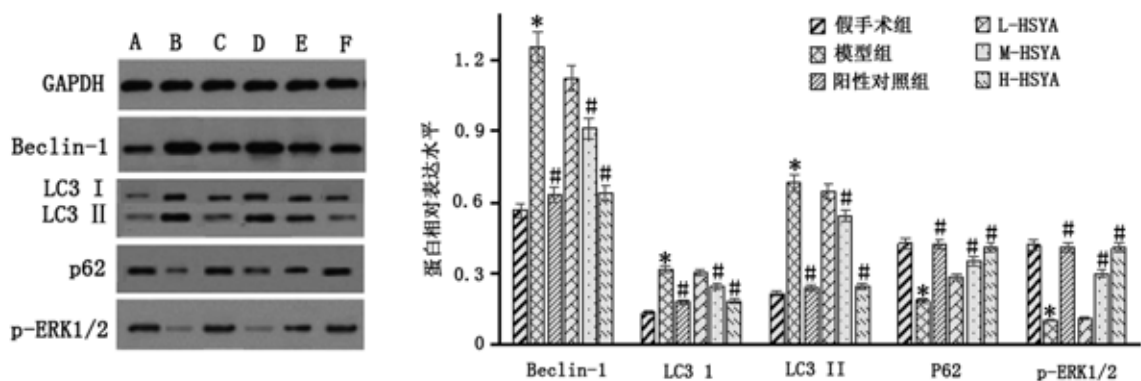
图4 6组大鼠心肌细胞自噬率

心肌组织自噬相关蛋白和 p-ERK1/2 蛋白表达与假手术组比较,模型组大鼠心肌组织 Beclin-1、LC3 I、LC3 II 蛋白表达显著升高,p62、p-ERK1/2 蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组、M-HSYA 组和 H-HSYA 组大鼠心肌组织 Beclin-1、LC3 I、LC3 II 蛋白表达显著降低,p62 和 p-ERK1/2 蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$);L-HSYA 组大鼠心肌组织 Beclin-1、LC3 I、LC3 II 蛋白表达降低,p62 和 p-ERK1/2 蛋白表达升高,但差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),见图 5。

讨论

研究发现,HSYA 能显著改善心肌梗死大鼠心功能,减少心肌梗死面积^[8]。史晓静等^[9]发现 HSYA 可减轻心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌炎症反应,减少心肌细胞凋亡,改善心功能。本研究中,与模型组比较,HSYA 组大鼠 LVSs、LVSD、LVPWs、LVPWd 和 LVEF 显著升高,心电图 T 波幅度和 ST 段抬高幅度均显著降低,QT 间期显著缩短,提示 HSYA 可改善 IHF 大鼠心功能。当机体心肌受到损伤时,血浆 hs-TnT 和 NT-proBNP 水平会迅速升高,可反映心肌受损的程度^[10,11]。本研究中 HSYA 可降低 IHF 大鼠血清 hs-TnT 和 NT-proBNP 水平,进一步说明 HSYA 可以改善 IHF 大鼠心功能。

Beclin-1 和 LC3 是 2 种与心肌细胞自噬相关的蛋白。Beclin-1 是参与细胞自噬的特异性基因,心肌细胞出现自噬现象时,其表达明显增加,并可引发细胞进一步损伤,甚至导致细胞死亡^[12]。LC3 可靶向定位于自噬体膜,直至与溶酶体融合,是目前公认的自噬体标记物,一定程度上可反映自噬小体数量^[13]。p62 是反映自噬活性的标记蛋白之一,其含量可间接反映自噬小体清除水平,自噬活性减弱或自噬功能缺陷时,p62 蛋白水平升高^[14]。本研究中



注: A、B、C、D、E、F 分别表示假手术组、模型组、阳性对照组、L-HSYA 组、M-HSYA 组、H-HSYA 组。

与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

图 5 6 组大鼠心肌组织自噬相关蛋白和 p-ERK1/2 蛋白表达

模型组大鼠心肌组织 Beclin-1 蛋白表达较假手术组显著提高, p62 蛋白表达显著降低, 与相关研究报道结论一致^[15], 提示自噬在 IHF 中起重要作用。经 HSYA 干预后, IHF 大鼠心肌组织 Beclin-1、LC3 I、LC3 II 蛋白表达显著降低, p62 蛋白表达显著提高, 提示 HSYA 可减轻心力衰竭心肌细胞自噬。

ERK1/2 信号转导通路是诱导细胞自噬的通路之一^[16]。细胞内丝裂原活化蛋白激酶信号通路是心血管疾病发病的主要机制之一, ERK1/2 是该蛋白激酶家族中的重要成员, 与细胞增殖、分化、生存和凋亡有关。本研究结果显示, 模型组 IHF 大鼠心肌组织 p-ERK1/2 蛋白表达较假手术组明显下调, 表明 ERK1/2 信号转导通路被抑制, 而经 HSYA 干预后, p-ERK1/2 蛋白表达显著上调, 提示 HSYA 可能通过激活 ERK1/2 信号转导通路发挥对 IHF 大鼠心肌保护作用。

参考文献

- Wang A, Zhang H, Liang Z, et al. U0126 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and autophagy in myocardium through MEK/ERK/EGR-1 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 5(788): 280-285.
- 王景景, 胡京红, 于雪, 等. 羟基红花黄色素 A 对体外培养人胃癌细胞增殖、凋亡及周期的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3738-3741.
- Liu YN, Zhou ZM, Chen P, et al. Evidence that hydroxysafflor yellow A protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(2): 211-216.
- 沈冰冰, 张松, 朱启仁, 等. 羟基红花黄色素 A 减轻大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4): 480-484.
- 许爱斌, 刘建国, 张健, 等. 羟基红花黄色素 A 对心肌细胞缺血/

再灌注损伤的保护作用[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2015, 7(5): 663-665.

- 徐建辉, 李睿, 李朋, 等. 射血分数降低的急性心力衰竭患者远期预后观察[J]. 内科急危重症杂志, 2018, 24(5): 410-412.
- 贺莹, 田首元, 王建刚, 等. 舒芬太尼后处理对缺血再灌注损伤的大鼠心肌自噬的影响及 PI3K-Akt 通路在其中的作用[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(4): 470-472.
- 戴艳琼, 李梓香, 左金梅, 等. 经皮冠状动脉介入术后应用复方丹参滴丸辅助治疗急性心肌梗死的疗效观察[J]. 内科急危重症杂志, 2019, 25(3): 243-245.
- 史晓静, 赵琳, 王高频, 等. 羟基红花黄色素 A 联合阿托伐他汀对抗大鼠缺血再灌注心肌炎症反应和凋亡[J]. 中成药, 2016, 38(1): 170-172.
- Beausire T, Faouzi M, Palmiere C, et al. High-sensitive cardiac troponin hs-TnT levels in sudden deaths related to atherosclerotic coronary artery disease. [J]. Forensic Sci Int, 2018, 289(5): 238-243.
- 刘利群, 耿煜, 段卉娣, 等. NT-proBNP 与心力衰竭相关性研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(7): 751-753.
- 董杰, 刘振华, 韩丽萍, 等. 精胺上调大鼠心肌缺血再灌注时 beclin-1 的表达[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(03): 399-402.
- Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions[J]. FASEB J, 2016, 30(12): 3961-3978.
- Cohenkaplan V, Ciechanover A, Livneh I, et al. p62 at the crossroad of the ubiquitin-proteasome system and autophagy[J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 83833-83834.
- Meyer G, Czompa A, Reboul C, et al. The cellular autophagy markers beclin-1 and LC3B-II are increased during reperfusion in fibrillated mouse hearts[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(39): 6912-6918.
- Shi Y, He X, Zhu G, et al. Coxsackievirus A16 elicits incomplete autophagy involving the mTOR and ERK pathways[J]. Plos One, 2015, 10(4): e0122109.

(2018-12-26 收稿 2019-03-19 修回)