

红景天苷抑制内质网应激和细胞凋亡减轻心脏缺血再灌注损伤

曹旭东,张帆,黄明月,陈军,陈国安,陈小林

摘要 目的 观察红景天苷(Sal)在大鼠离体心脏缺血再灌注(IR)中的作用并探讨其对内质网应激(ERS)和细胞凋亡的调控机制。方法 制备大鼠离体心脏缺血再灌注模型,缺血45 min,再灌注2 h,随机分为4组($n=10$):对照(Control)组、Sal处理(Sal)组、缺血再灌注(IR)组及Sal处理缺血再灌注(IR+Sal)组。氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测心肌梗死面积,ELISA法检测灌注液中乳酸脱氢酶(LDH)活性,测量左室内收缩峰压(LVSP)和舒张末压(LVEDP),Western blot检测B淋巴细胞瘤2基因(Bcl-2)及蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、转录因子C/EBP同源蛋白(CHOP)和转录活化因子6(ATF6)的表达,TUNEL染色观察细胞凋亡。结果 Sal组和Control组各指标之间比较差异均无统计学意义;与Control组比较,IR组心肌梗死面积和灌注液中LDH活性增加,LVSP降低,LVEDP增加,Bax表达增加,Bcl-2表达减少,TUNEL阳性细胞数增加,ERS相关蛋白PERK、CHOP和ATF6的表达增加;与IR组比较,IR+Sal组心肌梗死面积和灌注液中LDH活性减小,LVSP增加,LVEDP降低,Bax表达减少,Bcl-2表达增加,TUNEL阳性细胞数减少,ERS相关蛋白PERK、CHOP和ATF6的表达降低。结论 Sal通过抑制ERS和细胞凋亡改善大鼠离体心脏IR损伤。

关键词 红景天苷;内质网应激;凋亡;心脏缺血再灌注损伤
中图分类号 R 542

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)05-0690-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.004

急性心肌梗死是全世界范围内危害人类健康的主要因素^[1-2]。再灌注能降低心肌梗死患者病死率,但缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤的存在,使患者仍有发展为心力衰竭的风险^[3]。研究^[4-5]表明,IR损伤的机制包括氧自由基、钙超载、细胞凋亡、坏死、自噬及内皮细胞功能障碍等。红景天苷(salidroside, Sal)是从红景天中提取的生物活性成分^[6]。Sal具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗衰老

及神经和心血管保护作用^[6-7]。内质网在蛋白质、脂质合成和钙调控中发挥作用。当内质网稳态被破坏时,会出现错误折叠和未折叠蛋白质堆积,触发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[8]。ERS与多种心血管疾病有关,如心肌肥大、缺血性心脏病和心力衰竭^[9-11]。因此,为了更好地探讨心肌IR损伤的机制并寻找潜在的保护药物,该研究采用大鼠离体心脏IR模型,观察Sal在IR损伤中的作用以及对细胞凋亡和ERS的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48只8周龄SPF级雄性SD大鼠购买于南方科技大学实验动物中心,体质量280 g左右。在标准环境下饲养,所有操作均严格遵循实验动物使用规范和要求。

1.2 主要试剂 Sal(根据相关文献^[12]确定其药物浓度)、氯化三苯基四氮唑(TTC)购买于美国Sigma公司;RIPA购买于上海碧云天生物技术有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒购买于南京建成科技有限公司;TUNEL染色试剂盒购买于瑞士Roche公司;B淋巴细胞瘤2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)及蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X, Bax)、转录因子C/EBP同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)和转录活化因子6(activating transcription factor 6, ATF6)和GAPDH抗体购买于美国Cell Signaling Technology公司;山羊抗鼠和山羊抗兔二抗购买于武汉proteintech公司。心脏灌注液组分和含量(mmol/L)如下:KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, NaCl 120, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 1.5, MgSO₄ 1.2, Glucose 11。先用95% O₂/5% CO₂的混合气向灌注液中通气30 min再开始实验,灌注液pH值7.35~7.45,温度37℃。

1.3 离体心脏模型和实验分组 大鼠腹腔注射水合氯醛(10%, 0.3 ml/100 g)和肝素(500 U/kg),麻醉后开胸,游离心脏后放入预冷的灌注液中,并将心脏转移至Langendorff灌流管口,用手术线固定。灌

2022-03-07 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:32070625)

作者单位:南方科技大学医院心脏介入科,深圳 518055

作者简介:曹旭东,男,硕士研究生,主治医师;

陈小林,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: biss7251@163.com

注液由主动脉口逆行灌注心脏,灌注压保持 10.67 kPa。将含有液体的球囊经二尖瓣插入左心室,通过 Labchart 7 软件记录左室收缩峰压(left ventricular peak systolic pressure, LVSP)和左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)。将各组心脏 LVEDP 调为 0.67 kPa,使心脏稳定 10 min。待其平衡后,随机分为 4 组($n = 12$):对照(Control)组、Sal 处理(Sal)组、缺血再灌注(IR)组和 Sal 处理缺血再灌注(IR + Sal)组。Control 组,正常灌注 150 min;Sal 组,先用含 20 mmol/L Sal 的灌注液灌注 10 min,再用正常灌注液灌注 140 min;IR 组,缺血 30 min,再灌注 120 min;IR + Sal 组,用含 20 mmol/L Sal 的灌注液灌注 1 min,缺血 30 min,再用含 20 mmol/L Sal 的灌注液灌注 9 min,最后恢复灌注液灌注 110 min。

1.4 心脏功能检测 用 Labchart 7 软件实时监测左心室内压力的变化,实验过程中记录 LVSP 和 LVEDP 变化。LVSP、LVEDP 代表心脏收缩、舒张功能。

1.5 心肌梗死面积检测 实验结束后将心脏取下放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱 2 h,沿心尖到心底部的纵轴方向将心脏连续切成 2 mm 厚的薄片,每个心脏均选择第 5 片放入盛有 2% TTC 溶液的 24 孔板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 15 min;将染色完的心肌薄片用 4% 多聚甲醛避光浸泡 2 d;数码相机拍照,死亡心肌组织呈白色,存活心肌组织呈红色,Image J 测量白色区面积和心脏总面积。心肌梗死面积分数 = (白色区面积/总面积) $\times 100\%$ 。

1.6 LDH 活性检测 按照 LDH 试剂盒说明书操作,收集缺血心脏复灌前 10 min 的灌注液,而 Control 组、Sal 组心脏收集稳定灌注 1 h 后 10 min 内的灌注液。采用分光光度计读取各组灌注液的吸光度值并计算 LDH 活性。

1.7 TUNEL 染色 再灌注结束后,将心脏浸泡在 4% 多聚甲醛中固定;采用常规脱水、石蜡包埋和切片,并根据 TUNEL 染色试剂盒说明书处理标本,全程避光;激光共聚焦显微镜下观察染色情况,每张切片随机选取 10 个高倍视野,TUNEL 阳性细胞的细胞核呈绿色,DAPI 染核使细胞核均呈蓝色;TUNEL 阳性率 = 绿色细胞核数/总细胞核数。

1.8 Western blot 法检测蛋白表达 再灌注结束后,快速将心脏冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。各组心脏称取相同质量的心肌组织,按照质量/体积比 1 : 4

加入含蛋白酶抑制剂和 RIPA 的裂解液,冰上研磨并裂解 30 min,放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心机, $6\,970\text{ r/min}$ 离心 20 min,取上清液分装,BCA 法蛋白定量;配制 SDS-PAGE 胶,每孔加 30 μg 蛋白,常规电泳和湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 120 min,将切好的条带分别与 Bcl-2 (1 : 1 000)、Bax (1 : 1 000)、CHOP (1 : 1 000)、PERK (1 : 1 000)、ATF6 (1 : 1 000)和 GAPDH (1 : 5 000)抗体孵育, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;第 2 天, $1\times\text{TBST}$ 室温洗膜 3 次,每次 10 min,用山羊抗鼠和山羊抗兔二抗(1 : 5 000)室温孵育 120 min, $1\times\text{TBST}$ 室温洗膜 3 次,每次 10 min;利用 Bio-Rad 发光仪和 ECL 显色液检测,Image J 分析软件进行灰度值分析,GAPDH 作为内参。

1.9 统计学处理 使用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,实验结果用均数 \pm 标准差表示,各组间差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组之间的比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sal 提高大鼠离体心脏 IR 后 LVSP 并降低 LVEDP 大鼠离体心脏左心室压力统计结果显示,Control 组和 Sal 组 LVSP 和 LVEDP 差异无统计学意义;与 Control 组比较,IR 组 LVSP 降低,而 LVEDP 升高($F = 194.6, P < 0.001$),差异有统计学意义;与 IR 组比较,IR + Sal 组 LVSP 升高,而 LVEDP 降低($F = 185.7, P < 0.001$),差异有统计学意义。见图 1。

2.2 Sal 减轻大鼠离体心脏心肌梗死面积和灌注液中 LDH 活性 TTC 染色和 LDH 试剂盒检测结果显示,Control 组与 Sal 组心肌梗死面积分数和 LDH 活性无明显差异($P > 0.05$);与 Control 组比较,IR 组心肌梗死面积分数和 LDH 活性升高,差异有统计学意义($F = 120, P < 0.001$);与 IR 组比较,IR + Sal 组心肌梗死面积分数和 LDH 活性降低,差异有统计学意义($F = 444.5, P < 0.001$)。见图 2。

2.3 Sal 抑制大鼠离体心脏心肌细胞凋亡蛋白的表达 Western blot 结果显示,与 Control 组比较,Sal 组心肌细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Bax 表达差异无统计学意义;与 Control 组比较,IR 组心肌细胞 Bcl-2 表达降低,Bax 表达增加($P < 0.001$);而与 IR 组比较,IR + Sal 组心肌细胞 Bcl-2 表达增加,Bax 表达降低($F = 212.2, P < 0.001$)。见图 3。

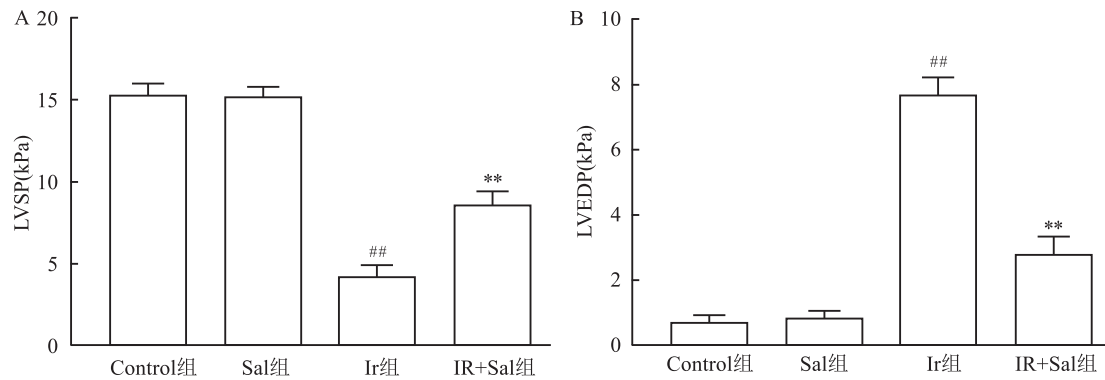


图1 各组大鼠心脏功能的比较

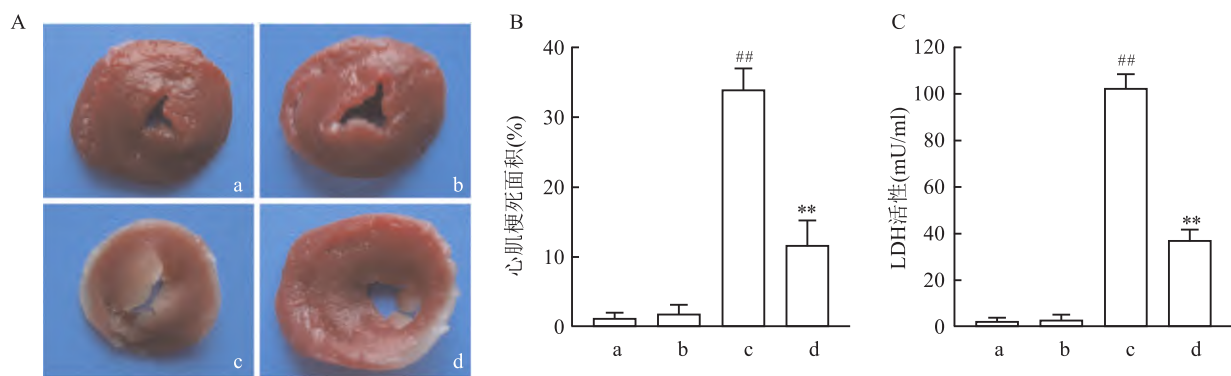
A: LVSP 统计图; B: LVEDP 统计图; 与 Control 组比较: ## $P < 0.01$; 与 IR 组比较: ** $P < 0.01$ 

图2 大鼠心肌梗死面积和 LDH 活性的比较

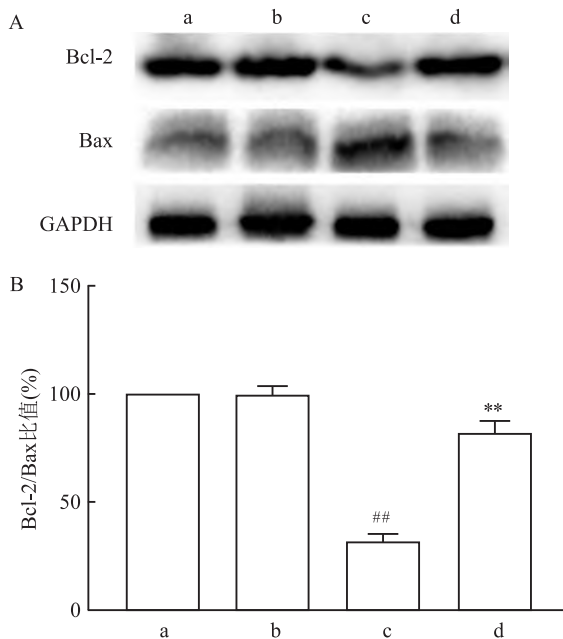
A: 心肌梗死面积图; B: 心肌梗死面积统计图; C: LDH 活性统计图; a: Control 组; b: Sal 组; c: IR 组; d: IR + Sal 组; 与 Control 组比较: ## $P < 0.01$; 与 IR 组比较: ** $P < 0.01$ 

图3 大鼠心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的比较

A: Western blot 检测结果图; B: Bcl-2/Bax 统计图; a: Control 组; b: Sal 组; c: IR 组; d: IR + Sal 组; 与 Control 组比较: ## $P < 0.01$; 与 IR 组比较: ** $P < 0.01$

2.4 Sal 抑制大鼠离体心脏心肌细胞凋亡率

TUNEL 染色结果显示,与 Control 组比较,Sal 组心肌细胞 TUNEL 染色阳性细胞率差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 Control 组比较,IR 组心肌细胞 TUNEL 染色阳性细胞率增加 ($P < 0.001$);而与 IR 组比较,IR + Sal 组心肌细胞 TUNEL 染色阳性细胞率降低 ($F = 109.1, P < 0.001$)。见图 4。

2.5 Sal 抑制大鼠离体心脏心肌细胞 ERS 蛋白表达

如图 5 所示,Western blot 结果显示,与 Control 组比较,Sal 组 ERS 蛋白 PERK、ATF6 和 CHOP 的表达差异无统计学意义;与 Control 组比较,IR 组 PERK、ATF6 和 CHOP 的表达增加 ($F = 190, P < 0.001$);而与 IR 组比较,IR + Sal 组 PERK、ATF6 和 CHOP 的表达降低 ($F = 88.7, P < 0.001$)。

3 讨论

及时重建堵塞冠脉的血流是实现挽救缺血心肌细胞和减小心肌梗死面积的最有效方法。然而,再灌注是一把“双刃剑”,除了能提供氧气和营养物质

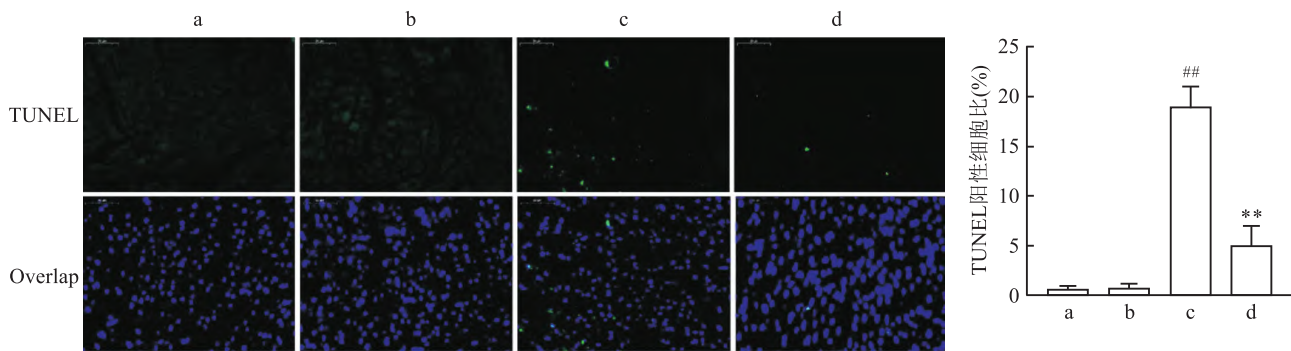


图4 大鼠心肌 TUNEL 阳性细胞率的比较 ×200

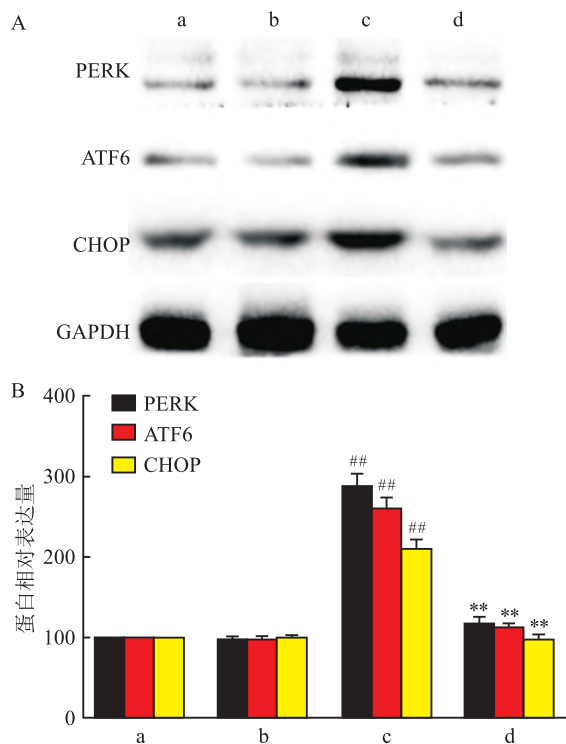
a: Control 组; b: Sal 组; c: IR 组; d: IR + Sal 组; 与 Control 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 IR 组比较: ^{**} $P < 0.01$ 

图5 大鼠心肌细胞 ERS 相关蛋白表达的比较

A: Western blot 检测结果图; B: PERK、ATF6、CHOP 相对表达量统计图; a: Control 组; b: Sal 组; c: IR 组; d: IR + Sal 组; 与 Control 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 IR 组比较: ^{**} $P < 0.01$

恢复细胞代谢并清除细胞代谢副产物外,其本身也会引起新的心肌细胞死亡,进一步加重心肌损伤^[4]。到目前为止,临床上还没有较好的预防或治疗再灌注损伤的方法和药物。

Sal 作为红景天的重要活性成分,大量研究^[6-7]证实了其在抗炎、抗氧化、清除自由基、抗衰老及神经和心血管保护中的作用。结果表明,在大鼠离体心脏 IR 模型中,Sal 能增加 LVSP,降低 LVEDP,改善心脏功能;同时,Sal 还能减小心肌梗死面积和 LDH 活性,这些结果进一步证实了 Sal 在心脏 IR 损

伤中具有保护作用。而细胞凋亡是心肌 IR 过程中一种重要的细胞死亡方式,并且已经成为了 IR 损伤的一个重要病理因素^[13]。在细胞凋亡过程中会出现抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少、凋亡蛋白 Bax 表达增加及 DNA 片段化现象^[14]。本研究结果显示,Sal 增加离体心脏 IR 损伤中 Bcl-2 表达,降低 Bax 表达和 TUNEL 染色阳性细胞数,表明 Sal 可以抑制 IR 中发生的细胞凋亡。

ERS 是由蛋白错误折叠、 Ca^{2+} 储存过量、氧化应激、缺血和脂质代谢紊乱等病理因素引起的,未折叠蛋白反应可以激活内质网整合膜蛋白 PERK 和 ATF6,进而启动 ERS^[8]。另外,ERS 蛋白 CHOP 可以抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,促进凋亡蛋白 Bax 和 Bim 的表达^[15]。本研究结果显示,Sal 降低 IR 中 ERS 蛋白 PERK、ATF6 和 CHOP 的表达,表明 Sal 能够抑制心脏 IR 触发的 ERS 损伤,提示 Sal 可能通过抑制 ERS 减轻心脏 IR 损伤。

综上所述,Sal 可以改善大鼠离体心脏功能,减小心肌梗死面积,减轻心脏 IR 损伤,而这一保护作用可能与抑制细胞凋亡和 ERS 有关。这些结果表明 Sal 是一种潜在的临床防治 IR 损伤的药物,并为 Sal 的临床应用提供了实验依据。

参考文献

- [1] Tamis-Holland J E, Jneid H, Reynolds H R, et al. Contemporary diagnosis and management of patients with myocardial infarction in the absence of obstructive coronary artery disease: a scientific statement from the American heart association [J]. Circulation, 2019, 139(18): e891-908.
- [2] DeFilippis A P, Nasir K, Blaha M J. Myocardial infarction as a clinical end point in research [J]. Circ Res, 2019, 124(12): 1701-3.
- [3] Valiente-Alandi I, Potter S J, Salvador A M, et al. Inhibiting fibronectin attenuates fibrosis and improves cardiac function in a

- model of heart failure[J]. *Circulation*, 2018, 138(12): 1236 – 52.
- [4] 孔令恒, 刘 哲, 张建英, 等. 心肌缺血 – 再灌注 – 钙超载损伤的基础与临床研究[J]. *中国体外循环杂志*, 2015, 13(4): 253 – 6.
- [5] 徐凯生, 张 丽, 张 野. β -内啡肽在RVLM吗啡预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的变化[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(4): 557 – 62.
- [6] Magani S K J, Mupparthi S D, Gollapalli B P, et al. Salidroside—Can it be a multifunctional drug? [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21(7): 512 – 24.
- [7] Pu W L, Zhang M Y, Bai R Y, et al. Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L: A review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109552.
- [8] Sozen E, Ozer N K. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: An updated mini-review [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 456 – 61.
- [9] Wang S, Binder P, Fang Q, et al. Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(8): 1293 – 304.
- [10] Liu M Q, Chen Z, Chen L X. Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(4): 425 – 43.
- [11] Binder P, Wang S, Radu M, et al. Pak2 as a novel therapeutic target for cardioprotective endoplasmic reticulum stress response [J]. *Circ Res*, 2019, 124(5): 696 – 711.
- [12] Wang Y, Xu P, Wang Y, et al. The protection of salidroside of the heart against acute exhaustive injury and molecular mechanism in rat [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 507832.
- [13] 崔勤涛, 王俊华, 刘晓晨, 等. 大黄素激活Nr2/ARE/HO-1信号通路对心肌缺血再灌注损伤大鼠心功能保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(6): 894 – 900.
- [14] Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, et al. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart—a critical review from definition and classification of cell death [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(6): 2373 – 86.
- [15] Fu H Y, Okada K, Liao Y, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload[J]. *Circulation*, 2010, 122(4): 361 – 9.

Salidroside ameliorates cardiac ischemia reperfusion injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and apoptosis

Cao Xudong, Zhang Fan, Huang Mingyue, Chen Jun, Chen Guoan, Chen Xiaolin

(Dept of Cardiac Intervention, The Hospital of South University of Science and Technology, Shenzhen 518055)

Abstract Objective To investigate the effect of salidroside (Sal) on ischemia reperfusion (IR) in isolated rat heart and explore the underlying mechanisms on endoplasmic reticulum stress (ERS) and apoptosis. **Methods** The isolated rat hearts underwent Langendorff perfusion subjected to IR. After ischemia for 45 min and reperfusion for 2 h, the isolated rat hearts were randomly divided into four groups ($n = 10$): Control group, Sal treatment group (Sal), ischemia reperfusion group (IR) and Sal treatment with ischemia reperfusion group (IR + Sal). Myocardial infarct size was detected by TTC staining. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the coronary flow was determined by ELISA. The cardiac function was evaluated by left ventricular peak systolic pressure (LVSP) and left ventricular end diastolic pressure (LVEDP). The expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), C/EBP homologous protein (CHOP) and activating transcription factor 6 (ATF6) were detected by Western blot, and apoptosis was observed by TUNEL staining. **Results** There was no significant difference in all indexes between Sal group and Control group. Compared with Control group, the infarct size and LDH activity in the coronary flow increased in IR group. The LVSP value decreased, and the LVEDP value increased. The expression of Bax and the TUNEL-positive cells increased, while the expression of Bcl-2 decreased. Meanwhile, the expressions of ERS related proteins including PERK, CHOP and ATF6 also increased. Compared with IR group, the infarct size and LDH activity in the coronary flow increased in IR + Sal group. The LVSP value increased, and the LVEDP value decreased. The expression of Bax and the TUNEL-positive cells decreased, while the expression of Bcl-2 increased. In addition, the expressions of PERK, CHOP and ATF6 decreased. **Conclusion** Sal can improve myocardial IR injury by inhibiting ERS and apoptosis in isolated rat hearts.

Key words salidroside; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; myocardial ischemia reperfusion injury