

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.13.009

哈巴俄昔对急性心肌梗死模型小鼠心肌结构及 Keap1/Nrf2 通路的影响

刘婷婷¹, 宋巧凤^{1△}, 王希柱¹, 闫玉敏¹, 刘小雪¹, 鲁程菲²

(1. 河北省唐山市人民医院, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学基础医学院, 河北 唐山 063000)

摘要:目的 探讨哈巴俄昔对急性心肌梗死(AMI)模型小鼠心肌结构及 kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Keap1)/核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2) 通路的影响。方法 取 C57BL/6J 小鼠 12 只作为空白组(A 组);另取 48 只小鼠结扎左冠状动脉,建立 AMI 模型,将建模成功的 40 只小鼠随机分为模型组(B 组),阳性对照组(C 组,氯吡格雷 30 mg/kg),哈巴俄昔低剂量组(D₁ 组,20 mg/kg)和高剂量组(D₂ 组,40 mg/kg),各 10 只。C 组、D₁ 组、D₂ 组小鼠灌胃相应药物,A 组、B 组小鼠灌胃等量生理盐水,均连续给药 4 周。试验结束后,检测小鼠超声心动指标[左心室舒张末期腔内径(LVEDd)、左心室收缩末期腔内径(LVEDs)、短轴缩短分数(FS)、射血分数(EF)],采用 2,3,5-三苯基四氮化四氮唑(TTC)染色法检测心肌梗死面积,采用反转录-聚合酶链式(RT-PCR)法及蛋白质免疫印迹(Western blot)法测定心肌 Keap1 和 Nrf2 基因及蛋白表达的水平。结果 与 A 组比较,B 组小鼠的 FS、EF 及心肌 Keap1、Nrf2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,LVEDd、LVEDs、心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著升高($P < 0.05$);与 B 组比较,C 组、D₁ 组、D₂ 组小鼠的 FS、EF 及心肌 Keap1、Nrf2 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,LVEDd、LVEDs、心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著降低($P < 0.05$);与 C 组比较,D₁ 组小鼠的 FS、EF 及心肌 Keap1、Nrf2 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,LVEDd、LVEDs、心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著升高($P < 0.05$),D₂ 组上述指标的差异均无统计学意义($P > 0.05$);与 D₁ 组比较,D₂ 组小鼠的 FS、EF 及心肌 Keap1、Nrf2 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,LVEDd、LVEDs、心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著降低($P < 0.05$)。结果 哈巴俄昔能改善 AMI 模型小鼠的心功能,减少心肌梗死面积,其作用机制可能与哈巴俄昔能促进小鼠心肌梗死区域 Keap1 和 Nrf2 mRNA 及蛋白表达,进而激活 Keap1/Nrf2 通路有关。

关键词:哈巴俄昔;急性心肌梗死;心肌结构;Keap1/Nrf2 通路;作用机制;小鼠

中图分类号:R965;R972

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)13-0032-05

Effect of Harpagoside on Myocardial Structure and Keap1/Nrf2 Pathway in Model Mice with Acute Myocardial Infarction

LIU Tingting¹, SONG Qiaofeng¹, WANG Xizhu¹, YAN Yumin¹, LIU Xiaoxue¹, LU Chengfei²

(1. Tangshan People's Hospital, Tangshan, Hebei, China 063000; 2. College of Basic Medicine, North China University of Technology, Tangshan, Hebei, China 063000)

Abstract: Objective To investigate the effect of harpagoside on myocardial structure and kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1)/nuclear factor E₂-related factor 2(Nrf2) pathway in model mice with acute myocardial infarction(AMI). **Methods** A total of 12 C57BL/6J mice were selected as the blank group(group A), another 48 mice were ligated left coronary artery to establish AMI model. A total of 40 model mice were successfully established and randomly divided into the model group(group B), positive control group(group C, 30 mg/kg of clopidogrel), harpagoside low-dose group(group D₁, 20 mg/kg), harpagoside high-dose group(group D₂, 40 mg/kg), 10 mice in each group. The mice in groups C, D₁ and D₂ were given the corresponding drugs by intragastric administration, while the mice in groups A and B were given the same volume of normal saline by intragastric administration. All the mice were continuously given drugs for four weeks. At the end of the experiment, the echocardiographic indexes[left ventricular end-diastolic diameter(LVEDd), left ventricular end-systolic diameter(LVEDs), short-axis fractional shortening(FS), ejection fraction(EF)] were detected, the infarct size was detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) staining, and the Keap1 and Nrf2 gene and protein expression levels were measured by the reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot. **Results** Compared with those in group A, the FS and EF levels, myocardial Keap1 and Nrf2 mRNA and protein expression levels in group B were significantly decreased, while the LVEDd, LVEDs, percentage of infarct size and heart/body ratio in group B were significantly increased($P < 0.05$). Compared with those in group B, the FS and EF levels, myocardial Keap1 and Nrf2 mRNA and protein expression levels in groups C, D₁ and D₂ were significantly increased, while the LVEDd, LVEDs, percentage of infarct size and heart/body ratio in groups C, D₁ and D₂ were significantly decreased($P < 0.05$). Compared with those in group C, the FS and EF levels, myocardial Keap1 and Nrf2 mRNA and protein expression levels in group D₁ were significantly decreased, while the LVEDd, LVEDs, percentage of infarct size and heart/body ratio in group D₁ were significantly increased($P < 0.05$). Compared with those in group C, there was no significant difference in the above indexes in group D₂($P > 0.05$). Compared with those in group D₁, the of FS and EF levels, myocardial Keap1 and Nrf2 mRNA

第一作者:刘婷婷,女,硕士,主治医师,研究方向为心血管病的基础研究与临床诊治,(电子信箱)litt67237@126.com。

△通信作者:宋巧凤,女,硕士,主任医师,研究方向为心血管病的基础研究与临床诊治,(电子信箱)songqiaofengxny@163.com。

and protein expression levels in group D₂ were significantly increased, while the LVEDd, LVEDs, percentage of infarct size and heart/body ratio in group D₂ were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Harpagoside can improve cardiac function and reduce the infarct size of AMI mice, and its mechanism may be related to harpagoside promoting the Keap1 and Nrf2 mRNA and protein expression levels in the infarct area of AMI mice, thereby activating the Keap1/Nrf2 pathway.

Key words: harpagoside; acute myocardial infarction; myocardial structure; Keap1/Nrf2 pathway; mechanism of action; mice

急性心肌梗死(AMI)是一种缺血导致心肌细胞病理性死亡的疾病^[1-2],死亡率高。AMI的病理机制包括氧化应激、炎症反应、细胞凋亡。核因子E₂相关因子2(Nrf2)为转录因子,通过调节抗氧化损伤的抗氧化蛋白的表达水平,从而发挥保护作用^[3]。Nrf2与Kelch样ECH关联蛋白1(Keap1)和Cullin 3(Cul3)共同定位在细胞质中,在生理条件下可通过泛素化促进其快速降解。当Keap1-Cul3泛素化系统被氧化应激破坏,Nrf2从细胞质转移到细胞核中,并结合到DNA启动子,即抗氧化反应元件(ARE),从而启动转录,进而起到抗氧化作用^[4-5]。哈巴俄昔为玫瑰玄参科植物玄参的主要生物活性成分,具有抗炎、抗疲劳、抗压力、抗缺氧、抗衰老等多种生物学特性^[6],还可减少过多血脂,改善血液循环,并增强免疫力^[7]。研究表明,参芪养心滴丸中的哈巴俄昔可能对心肌细胞有保护作用^[8]。本研究中探讨了哈巴俄昔对AMI模型小鼠心肌结构及Keap1/Nrf2通路的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:Vevo 770型动物超声心动图(美国赛默飞世尔科技有限公司);RT987型压力导管(加拿大Scisense公司);Leica Microsystem型组织处理器(德国ASP公司);T100型实时聚合酶链式反应(PCR)热循环仪;Trans-Blot Turbo型蛋白质印迹(Western blot)检测系统(美国Bio-Rad公司)。

试剂:哈巴俄昔(荣成百合生物技术有限公司,批号为h2154889);氯吡格雷(江西宇能制药有限公司,批号为20180489);2,3,5-三苯基四氯化四氮唑(TTC)染色试剂盒(美国Sigma公司,批号为WS8475);TRIzol(日本Takara Biotechnology公司,批号为WE58747);互补DNA反转录试剂盒(美国Invitrogen公司,批号为VF4158);SYBR Green 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂盒(批号为487433),BCA蛋白质检测试剂盒(批号为DE74589),均购自上海碧云天生物技术有限公司;聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,批号为547896),硝酸纤维素膜(批号为547896),均购自美国Bio-Rad公司;Keap1一抗(规格为1:1 000,批号为85458),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(规格为1:1 000,批号为5441896),均购自美国Cell Signaling Technology公司;Nrf2一抗(规格为1:200,批号为84745),与辣根过氧

化物酶(HRP)偶联的二抗(规格为1:500,批号为65896),均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;Super Signal 电化学发光(ECL)试剂盒(美国赛默飞世尔科技有限公司,批号为41597)。

动物:C57BL/6J小鼠60只,购自徐州医科大学动物中心,动物生产许可证号为SCXK(苏)2018-0012,动物使用许可证号为SYXK(苏)2019-0013,7~8周龄,体质量为20~25 g,明/暗(12 h/12 h)交替饲养,室温为(23±2)℃,相对湿度为(50±5)%。

1.2 实验方法

模型建立:取48只小鼠,腹腔注射戊巴比妥钠,麻醉后左胸四肋间开胸,暴露心脏,5-0无创丝线结扎左冠状动脉(在右心室流出道和左心耳之间下约2 mm处),前降支供血区迅速变苍白,ST段显著抬高,或2个以上导联J点抬高大于0.2 mV,则AMI模型建立成功。随后置心脏于胸腔,缝合胸壁。结果8只小鼠死亡,建模成功率为83.33%(40/48)。

分组与给药:将52只小鼠随机分为5组,即空白组(A组,12只),模型组(B组),阳性对照组(C组,氯吡格雷30 mg/kg)^[9],哈巴俄昔低剂量组(D₁组,20 mg/kg)和高剂量组(D₂组,40 mg/kg)^[10],后4组各10只。C组、D₁组、D₂组小鼠灌胃相应药物,A组、B组小鼠灌胃等量生理盐水,每天1次。所有小鼠均连续给药4周。

超声心动指标测定:给药结束后,麻醉小鼠,并通过Vevo 770型动物超声心动图评估心脏的几何形状和功能。在舒张期和收缩期,从3个连续的周期确定左室的前壁和后壁尺寸。缩短分数为从左心室舒张末期到收缩末期直径的持续时间的比率。RT987型压力导管通过右颈总动脉进入升主动脉,测量左心室舒张末期内径(LVEDd)、短轴缩短分数(FS)、左心室收缩末期内径(LVEDs)、射血分数(EF)。

心肌病理学观察:切下心脏组织,于室温下固定在10%甲醛缓冲液中,石蜡包埋,切成3 μm的切片后,用苏木精-伊红(HE)染色,并于徕卡QW09型光学显微镜下观察。取出心脏,使用TTC染色试剂盒测定心肌梗死面积。将所有心脏在中位区域横向切开,以更大程度暴露左心室,将心脏顶点区域放入装有经Krebs-Henseleit稀释的1% TTC的Falcon管中(组分为氯化钠120 mmol/L,氯化钾5.4 mmol/L,氯化镁1.2 mmol/L,碳酸氢钠27 mmol/L,氯化钙1.25 mmol/L,葡萄糖

11 mmol/L, 磷酸二氢钠 2.0 mmol/L, pH 7.4), 在 37 ℃ 水浴中放置 15 min, 染色后, 以高分辨率扫描该区域, 用 ImageJ 1.8.0 软件进行分析。

小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 基因表达水平测定: 采用 Western blot 法测定。总 RNA 分别通过 TRIzol 和互补 DNA 反转录试剂盒提取并反转录, 用 SYBR Green RT-PCR 试剂盒和实时 PCR 热循环仪进行实时 PCR 反应。采用比较阈值循环法计算标准化为 GAPDH 靶基因的 mRNA 表达。反应体系含有 0.5 μL QigitiTectRT Mix 和 ddH₂O, 10 μL 2 × QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0.5 μL/L 的 1.0 μL 引物, 2 μg 模板 RNA。引物由上海生工科技有限公司合成, 序列为, Keap1 5'-CGGCC-TACGTGAACAATCTC-3' (正向), 5'-TTAGGGCTCAG-GTTTGTCCAG-3' (反向); Nrf2 5'-CTCCGGCGAATT-GGAGATGAA-3' (正向), 5'-CAGTTGAAGTTGC-CATCAGC-3' (反向); β-actin 5'-GAGCAGGAA-GACGCTAGTGC-3' (正向), 5'-GGTACGAACTGTG-GCGACTC-3' (反向)。反应条件为, 96 ℃ (60 s), 57 ℃ (72 s), 78 ℃ (42 s), 72 ℃ (30 s), 共 35 个循环。

小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白表达水平测定: 采用 Western blot 法测定。收获心脏后移除心房和右心室, 该蛋白质是从左心室心肌组织 (包括非梗死区域和疤痕区域) 获得的。离心后, 将样品超声处理并进行热变性, 使用 BCA 蛋白质检测试剂盒测定蛋白质浓度, 使用 6% ~ 12% SDS-PAGE 对 20 μg 的蛋白裂解物进行电泳和分离, 然后转移到硝酸纤维素膜上, 于 25 ℃ 下用 5% 脱脂奶封闭 1 h, 然后在 4 ℃ 下与下一级抗体 [Keap1 (规格为 1:1 000), Nrf2 (规格为 1:200), GAPDH (规格为 1:1 000)] 孵育过夜; 随后, 将膜与 HRP 偶联的二抗 (规格为 1:500) 于 25 ℃ 下孵育 1 h, 使用 Super Signal ECL 试剂盒在蛋白质印迹检测系统中检测抗原-抗体复合物, 结果表示为归一化的 GAPDH 水平的密度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能指标

与 A 组比较, B 组小鼠的 FS 和 EF 水平均显著降低, LVEDd 和 LVEDs 水平均显著升高 (P < 0.05); 与 B 组比较, C 组、D₁ 组、D₂ 组小鼠的 FS 和 EF 水平均显著升高, LVEDd 和 LVEDs 水平均显著降低 (P < 0.05); 与 C 组比较, D₁ 组小鼠的 FS 和 EF 水平均显著降低, LVEDd 和 LVEDs 水平均显著升高 (P < 0.05), D₂ 组小鼠上述 4 个指标差异均无统计学意义 (P > 0.05); 与 D₁ 组比较, D₂ 组小

鼠的 FS 和 EF 水平均显著升高, LVEDd 和 LVEDs 水平均显著降低 (P < 0.05)。详见表 1。

表 1 各组小鼠心功能指标比较 ($\bar{X} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of cardiac function indexes of mice in each group ($\bar{X} \pm s$)

组别	FS (%)	EF (%)	LVEDd (mm)	LVEDs (mm)
A 组 (n = 12)	49.28 ± 7.52	79.59 ± 6.56	3.71 ± 0.35	1.98 ± 0.56
B 组 (n = 10)	27.96 ± 7.36 ^a	41.39 ± 6.45 ^a	5.53 ± 0.45 ^a	5.16 ± 0.67 ^a
C 组 (n = 10)	42.52 ± 5.25 ^b	65.41 ± 11.48 ^b	4.48 ± 0.38 ^b	2.97 ± 0.62 ^b
D ₁ 组 (n = 10)	34.48 ± 5.48 ^{bc}	49.85 ± 12.53 ^{bc}	4.95 ± 0.34 ^{bc}	3.88 ± 0.59 ^{bc}
D ₂ 组 (n = 10)	41.59 ± 6.63 ^{bd}	64.65 ± 8.96 ^{bd}	4.50 ± 0.33 ^{bd}	2.95 ± 0.61 ^{bd}

注: 与 A 组比较, ^aP < 0.05; 与 B 组比较, ^bP < 0.05; 与 C 组比较, ^cP < 0.05; 与 D₁ 组比较, ^dP < 0.05。表 2 至表 4 同。

Note: Compared with those in group A, ^aP < 0.05; compared with those in group B, ^bP < 0.05; compared with those in group C, ^cP < 0.05; compared with those in group D₁, ^dP < 0.05; as well as Tab. 2, Tab. 3 and Tab. 4.

2.2 心肌梗死面积百分比及心/体比

与 A 组比较, B 组小鼠心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著升高 (P < 0.05); 与 B 组比较, C 组、D₁ 组、D₂ 组小鼠心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著降低 (P < 0.05); 与 C 组比较, D₁ 组小鼠心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著升高 (P < 0.05), D₂ 组小鼠心肌梗死面积百分比及心/体比水平差异均无统计学意义 (P > 0.05); 与 D₁ 组比较, D₂ 组小鼠心肌梗死面积百分比及心/体比水平均显著降低 (P < 0.05)。详见表 2。

表 2 各组小鼠心肌梗死面积百分比及心/体比比较 ($\bar{X} \pm s, \%$)

Tab. 2 Percentage of infarct size and heart/body ratio of mice in each group ($\bar{X} \pm s, \%$)

组别	心肌梗死面积百分比	心/体比
A 组 (n = 12)	0.00 ± 0.00	0.52 ± 0.06
B 组 (n = 10)	36.54 ± 15.63 ^a	0.82 ± 0.04 ^a
C 组 (n = 10)	16.89 ± 6.59 ^b	0.61 ± 0.04 ^b
D ₁ 组 (n = 10)	23.45 ± 8.35 ^{bc}	0.68 ± 0.04 ^{bc}
D ₂ 组 (n = 10)	17.20 ± 7.02 ^{bd}	0.60 ± 0.03 ^{bd}

2.3 心肌病理结构

A 组小鼠心肌结构正常; B 组小鼠心肌梗死区显示心肌炎性细胞浸润 (白色星号), 间断性, 变性, 宽间距 (箭头) 和空泡 (箭头); C 组、D₂ 组小鼠心肌纤维排列较整齐, 炎性细胞浸润减少; D₁ 组小鼠仍可见明显梗死灶。详见图 1。

2.4 心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 水平

与 A 组比较, B 组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 水平均显著降低 (P < 0.05); 与 B 组比较, C 组、D₁ 组、D₂ 组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 水平均显著升高 (P < 0.05); 与 C 组比较, D₁ 组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2

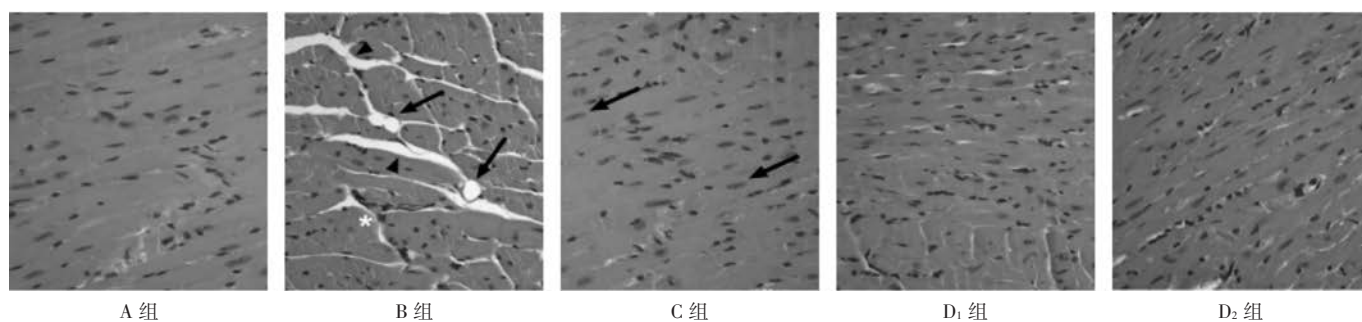


图1 各组小鼠心肌病理结构图(HE染色, ×400)

Fig. 1 Pathological structure of myocardium of mice in each group(HE staining, ×400)

mRNA 水平均显著降低($P < 0.05$), D₂组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与 D₁组比较, D₂组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 水平均显著升高($P < 0.05$)。详见表3。

表3 各组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 水平比较($\bar{X} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of Keap1 and Nrf2 mRNA levels in myocardium of mice in each group($\bar{X} \pm s$)

组别	Keap1 mRNA	Nrf2 mRNA
A组($n = 12$)	5.86 ± 0.36	5.89 ± 0.47
B组($n = 10$)	1.36 ± 0.41^a	1.94 ± 0.42^a
C组($n = 10$)	3.88 ± 0.63^b	3.21 ± 0.41^b
D ₁ 组($n = 10$)	2.69 ± 0.52^{bc}	2.65 ± 0.56^{bc}
D ₂ 组($n = 10$)	3.90 ± 0.39^{bd}	3.31 ± 0.41^{bd}

2.5 心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白水平

与 A 组比较, B 组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白水平均显著降低($P < 0.05$); 与 B 组比较, C 组、D₁组、D₂组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白水平均显著升高($P < 0.05$); 与 C 组比较, D₁组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白水平均显著降低($P < 0.05$), D₂组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白水平差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与 D₁组比较, D₂组小鼠 Keap1 和 Nrf2 蛋白水平均显著升高($P < 0.05$)。详见表4和图2。

表4 各组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白水平比较($\bar{X} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of Keap1 and Nrf2 protein levels in myocardium of mice in each group($\bar{X} \pm s$)

组别	Keap1 蛋白/GAPDH	Nrf2 蛋白/GAPDH
A组($n = 12$)	6.95 ± 0.35	6.95 ± 0.35
B组($n = 10$)	1.78 ± 0.47^a	1.86 ± 0.38^a
C组($n = 10$)	4.82 ± 0.32^b	4.46 ± 0.34^b
D ₁ 组($n = 10$)	2.67 ± 0.41^{bc}	2.52 ± 0.27^{bc}
D ₂ 组($n = 10$)	4.92 ± 0.39^{bd}	4.47 ± 0.28^{bd}

3 讨论

AMI 后不良的心肌重塑将导致左心室壁变薄、左心室扩张和收缩功能障碍。心肌重塑是充血性心力衰竭的重要原因。目前, 常用血管紧张素转换酶抑制剂和 β 受

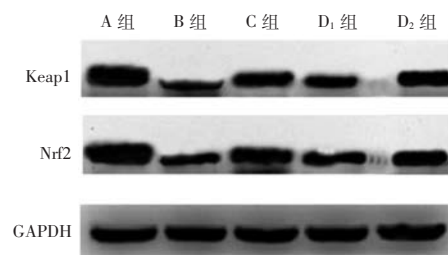


图2 各组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 蛋白表达水平电泳图

Fig. 2 Electrophoresis pattern of Keap1 and Nrf2 protein expression levels in myocardium of mice in each group

体阻滞剂治疗 AMI, 但只能减慢性心力衰竭和死亡的进程, 且均不适用于血压低于 90/60 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 的患者, 以及反复咳嗽和呼吸困难的慢性呼吸系统疾病患者。哈巴俄昔结构与 L-苹果酸酯结构类似, 后者是一种三羧酸循环的小分子代谢产物, 可通过激活 Nrf2 抗氧化剂途径来提供心肌保护作用^[11], 推测哈巴俄昔有心肌保护作用。研究表明, 哈巴俄昔具有抗炎、抗血小板聚集和抗氧化活性多种药理作用, 并可减少细胞凋亡^[12]。本研究结果显示, 与 B 组比较, C 组、D₁组、D₂组小鼠的 FS 和 EF 水平均显著升高, LVEDd 和 LVEDs 水平、小鼠心肌梗死面积百分比及心/体比均显著降低($P < 0.05$), 表明哈巴俄昔能改善 AMI 小鼠的心功能, 减少心肌梗死面积。

研究表明, AMI 导致缺血而诱导细胞死亡及不可逆的组织损伤, 还可导致炎症细胞浸润及肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子 β_1 、白细胞介素 1β 等炎症因子释放, 这些炎症细胞因子可调节多种细胞类型的基因表达^[13-14], 在心肌纤维化、心肌细胞凋亡和心肌重塑的病理过程中起重要作用。组织损伤后, 多种炎症因子可触发关键蛋白的磷酸化, 导致转录因子的核易位。此外, 心肌成纤维细胞浸润会扩大纤维化区域, 导致左心室扩张和功能障碍, 从而导致不可逆损伤^[15]。本研究中, B 组小鼠心肌梗死区显示心肌炎性细胞浸润、间断性、变性、宽间距和空泡, 说明 AMI 后心肌组织中炎症因子的表达显著增加, 并导致心肌重塑。研究表明, 哈巴俄昔在体外和体内均有抗纤维化和抗炎活性。本研究中 C 组及 D₂组小鼠心

肌纤维排列较整齐,炎性细胞浸润减少,这与上述研究结果一致。

Nrf2 与 ARE DNA 序列结合,激活下游基因转录。Nrf2 的靶标编码参与谷胱甘肽合成,并清除活性氧,如谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化和修饰亚基、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶、硫氧还蛋白、过氧化物酶 1 和超氧化物歧化酶。这些抗氧化酶的转录表达可保护心肌细胞免于凋亡^[16]。此外,Nrf2 还调节涉及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸再生的酶,与药物代谢相关的酶及其他干扰炎症治疗的转录因子。Nrf2 作用的生理控制通过 Keap1-Cul3-Rbx1 E3 泛素-连接酶复合物进行,该细胞质抑制剂复合物与细胞质中的 Nrf2 结合,并促进其蛋白酶体降解。在活性氧存在的情况下,Keap1 发生构象变化,破坏 Keap1-Nrf2 的结合,导致 Nrf2 泛素化作用降低,而 Nrf2 从 Keap1 上解离出来^[17]。Nrf2 蛋白水平增加,新合成的 Nrf2 可自由转运到细胞核中。在氧化应激期间,Nrf2 的降解在心脏、大脑、肾脏、胰腺、肝脏等各种器官中均受到抑制^[18],对 Keap1 的修饰使 Nrf2 的释放和核易位,此过程可能受线粒体活性氧产生的调节。氧化应激导致 Keap1 中关键半胱氨酸残基的氧化,破坏了 Keap1 泛素化系统,证实可以通过激活 Nrf2/Keap1 信号通路来调节针对心血管疾病的保护作用^[19]。本研究中,与 B 组比较,C 组、D₁ 组、D₂ 组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 及蛋白水平均显著升高;与 C 组比较,D₁ 组小鼠心肌 Keap1 和 Nrf2 mRNA 及蛋白水平均显著降低($P < 0.05$),D₂ 组小鼠上述指标比较无显著差异($P > 0.05$)。说明哈巴俄苷能促进小鼠心肌梗死区域 Keap1 和 Nrf2 mRNA 及蛋白水平的表达,进而激活 Keap1/Nrf2 通路,达到保护心肌的作用。

综上所述,哈巴俄苷能改善 AMI 小鼠的心功能,减少心肌梗死面积,其机制可能与哈巴俄苷能促进小鼠心肌梗死区域 Keap1 和 Nrf2 mRNA 及蛋白水平的表达,进而激活 Keap1/Nrf2 通路有关。

参考文献

- [1] CURRY LA, BRAULT MA, LINNANDER EL, et al. Influencing organisational culture to improve hospital performance in care of patients with acute myocardial infarction: a mixed-methods intervention study[J]. *BMJ Qual Saf*, 2018, 27(3): 207-217.
- [2] CASTRO-DOMINGUEZ Y, DHARMARAJAN K, MCNAMARA RL. Predicting death after acute myocardial infarction[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2018, 28(2): 102-109.
- [3] HAN LQ, ZHOU Z, MA Y, et al. Phosphorylation of nuclear factor erythroid 2-like 2 (Nrf2) in mammary tissue of Holstein cows during the periparturient period is associated with mRNA abundance of antioxidant gene networks[J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(7): 6511-6522.
- [4] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733.
- [5] MERRY TL, MACRAE C, PHAM T, et al. Deficiency in the ROS-sensing Nuclear Factor Erythroid 2-like 2 (Nrf2) causes altered glucose and lipid homeostasis following exercise training[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 318(2): 1-31.
- [6] 封海霞. 高效液相色谱法测定玄参百贝散中哈巴俄苷含量[J]. *中国药业*, 2017, 26(20): 41-43.
- [7] 杨会, 宋珂, 李慧, 等. 四妙勇安汤活性部位配伍方薄层色谱鉴别及绿原酸和哈巴俄苷的含量测定[J]. *中国现代中药*, 2019, 21(5): 668-672.
- [8] 孙学惠, 胡北, 马宏达, 等. 高效液相色谱法同时测定参芪养心滴丸中的哈巴俄苷及肉桂酸的含量[J]. *山西医药杂志*, 2013, 42(3): 129-130.
- [9] 姚郑. 阿司匹林/氯吡格雷对心肌梗死大鼠内皮祖细胞功能的影响及其机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [10] 宋晓晨, 陈林霖, 戚进, 等. 哈巴俄苷及其代谢产物在大鼠体内的药代动力学[J]. *中国药科大学学报*, 2011, 42(3): 262-265.
- [11] 曹团武, 黄文兵, 时建伟, 等. 光谱法和分子对接研究哈巴俄苷与牛血清白蛋白的相互作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(5): 993-1000.
- [12] 田金凤, 尚远宏, 李学刚, 等. 玄参中化学成分的分离鉴定及其降糖活性研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(13): 25-29.
- [13] ONG SB, HERNÁNDEZ-RESÉNDIZ S, CRESPO-AVILAN GE, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73-87.
- [14] THACKERAY JT, HUPE HC, WANG Y, et al. Myocardial Inflammation Predicts Remodeling and Neuroinflammation After Myocardial Infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(3): 263-275.
- [15] NERI M, RIEZZO I, PASCALE N, et al. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 1-14.
- [16] RICHERT E, KLETTNER A, BURCHARD CVD, et al. CRB1rd8 mutation influences the age-related macular degeneration phenotype of Nrf2 knockout mice and favors choroidal neovascularization[J]. *Adv Med Sci*, 2020, 65(1): 71-77.
- [17] ZHAN JH, LI X, LUO D, et al. Polydatin promotes the neuronal differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo: Involvement of Nrf2 signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9): 5317-5329.
- [18] CHEN QM, MALTAGLIATI AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection[J]. *Physiol Genomics*, 2018, 50(2): 77-97.
- [19] CONG PF, LIU YN, LIU NN, et al. Cold exposure induced oxidative stress and apoptosis in the myocardium by inhibiting the Nrf2-Keap1 signaling pathway[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 36.

(收稿日期: 2020-09-23; 修回日期: 2021-01-06)