

论著·基础研究

黄芪注射液对 SD 大鼠心肌缺血再灌注损伤中 *Smad3*、*Smad7* 表达的影响

马速佳¹,周志强^{1△},李祥波¹,刘优优²

(1. 郑州大学第二附属医院血管外科,河南郑州 450014;2. 郑州大学医学院,河南郑州 450001)

摘要:目的 探讨黄芪注射液对 SD 大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)中 *Smad3*、*Smad7* 表达的影响和机制。方法 采用结扎左冠状动脉的方法制备心肌缺血再灌注损伤动物模型。32 只健康成年 SD 大鼠,体质量(230±20)g,平均分为假手术组、缺血再灌注组、辛伐他汀组和黄芪预处理组。通过免疫组织化学和 RT-PCR,分别测定 *Smad3* 蛋白、*Smad7* 蛋白及 *Smad3* mRNA、*Smad7* mRNA 的表达。计算各组中心肌细胞的凋亡率。结果 与假手术组相比,缺血再灌注组心肌细胞的凋亡率明显增加($P=0.000$),并且 *Smad3* 蛋白和 *Smad3* mRNA 表达增加($P=0.000$),*Smad7* 蛋白和 *Smad7* mRNA 表达减少($P=0.000$);与缺血再灌注组相比,黄芪注射液组($P=0.000$)和辛伐他汀组($P=0.000$)可明显降低心肌细胞的凋亡率;*Smad3* 蛋白和 *Smad3* mRNA 表达减少($P=0.000$);而 *Smad7* 蛋白和 *Smad7* mRNA 表达增加($P=0.000$)。结论 黄芪注射液可以上调 SD 大鼠缺血再灌注损伤时心肌细胞 *Smad7* 蛋白和 *Smad7* mRNA 表达,下调 *Smad3* 蛋白和 *Smad3* mRNA 表达。

关键词:黄芪注射液;心肌缺血;心肌再灌注损伤;*Smad3* 蛋白;*Smad7* 蛋白

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)13-1597-03

Effect of astragalus injection on *Smad3* expression and *Smad7* expression caused by myocardial ischemia reperfusion injury in SD rats

Ma Sujia¹, Zhou Zhiqiang^{1△}, Li Xiangbo¹, Liu Youyou²

(1. Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China; 2. The Medicine School of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of astragalus injection on *Smad3* and *Smad7* expression caused by myocardial ischemia reperfusion injury(MIRI) in SD Rats. Methods The MIRI model was established by ligating the left anterior descending coronary artery. Thirty two SD rats were randomly and equally divided into four groups named by sham, model, simvastatin and astragalus pretreatment after one week's adaptive feeding. The protein and mRNA expressions of *Smad3* and *Smad7* were respectively detected by immunohistochemical staining and RT-PCR in cardiomyocyte, in order to analysis the relationship between *Smad3*'s and *Smad7*'s protein and mRNA expressions and calculate each group's myocardial cell apoptosis rate. Results Compared with the Sham group, ischemia reperfusion myocardial cells apoptosis rate increased significantly($P=0.000$), the protein and mRNA expression of *Smad3* increased($P=0.000$) but the *Smad7* decreased($P=0.000$). Compared with the ischemia reperfusion, astragalus injection group and simvastatin group can significantly reduce the apoptosis of myocardial cells($P=0.000$), The protein and mRNA expression of *Smad3* decreased($P=0.000$) but the *Smad7* increased($P=0.000$). Conclusion Astragalus injection can affect the apoptosis of myocardial cells in ischemia reperfusion injury of the SD rat myocardial cells, which is realized by up-regulating *Smad7* protein and *Smad7*mRNA expression, down-regulating *Smad3* protein and *Smad3*mRNA expression.

Key words: astragalus injection; myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; *Smad3* protein; *Smad7* protein

心血管疾病在当今世界,严重威胁着人类的健康,其发病率和病死率均超过恶性肿瘤而跃居各病之首。全国每年死于心血管疾病 300 万人,且发病年龄呈现日益年轻化的趋势^[1]。目前,心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)已成为影响缺血再灌注心肌从再灌注策略中获得最佳治疗效果的重要因素^[2]。相关临床试验表明心肌细胞的凋亡是 MIRI 的一种重要表现^[3-4]。目前,对疾病的探讨已深入分子学水平。因此,在分子学水平上积极探索 IRI 的发病机制,具有重大意义。中国医学认为:黄芪有益气固表、敛汗固脱、托疮生肌、利水消肿之功效^[5]。现代药理学研究表明:黄芪具有强心作用,使心脏收缩振幅增大,输出量增加,对中毒或疲劳衰竭心脏的作用更为明显^[6]。但具体的机制尚不清楚。本

实验旨在观察黄芪注射液对 MIRI 时 *Smad3*、*Smad7* 表达的影响,从分子学水平探讨对心肌的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂 黄芪注射液[正大青春宝药业有限公司,国药准字 Z33020179(10 mL),黄芪(每 10 mL 相当于黄芪 20 g)。批号:1205172],辛伐他汀片(湖北舒邦药业有限公司,批号:20120903,规格 20 mg)。凯基 Annexin V-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, KGA-101_TY7454, *Smad3*、*Smad7* 兔抗大鼠多克隆抗体购自美国 Sauita 公司, RT-PCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。引物由北京博大泰克公司合成。 *Smad3* 正向引物:5'-ATG TCA

作者简介:马速佳(1985—),在读硕士,主要从事血管外科疾病的临床与基础研究。 △ 通讯作者, Tel:13937104760; E-mail: qiang6364@sohu.com。

TCT ACT GCC GCT TGT-3', 反向引物: 5'-GTC GCT AGT TTC TCC ATC TTC AC-3'。扩增片段为 327 bp。Smad7 正向引物: 5'-TGG TGC GTG GTG GCA TAC TGG-3', 反向引物: 5'-GAC TCT TGT TGT CCG AAT TGA GCT-3', 扩增片段为 142 bp。β-actin 作为内参照, 正向引物: 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC-3', 反向引物: 5'-GGA AGG TGG ACA GTG AG-3', 扩增片段为 568 bp。

1.1.2 实验动物及分组 健康雄性 SPF 级成年 SD 大鼠 32 只, 体质量(230±20)g, 适应性喂养 1 周后, 分为假手术组(生理盐水 2 mL 每天 2 次, 共 6 d, 腹腔注射), 缺血再灌注组(生理盐水 2 mL 每天 2 次, 共 6 d, 腹腔注射), 辛伐他汀组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 黄芪注射液组(生药每支 2 mL, 4 g, 每天 2 次, 共 6 d, 腹腔注射)。分组后分别按要求给予药物干预, 共 7 d, 第 8 天分别按各组要求对动物进行处理。

1.1.3 主要仪器 DW-2000 型动物人工呼吸机(上海嘉鹏科技有限公司), PCR 扩增仪(Eppendorf 公司)。D-140 图像记录分析系统(郑州卓鑫电泳仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 建立动物模型 采用结扎大鼠心脏左冠状动脉前降支的方法^[7]制作 MIRI 模型。假手术组不予结扎, 所有实验组结扎 40 min 后松开结扎线, 再灌注 120 min。

1.2.2 凋亡心肌细胞的检测 取再灌注 120 min 后左冠状动脉前降支所支配区域的心肌组织 4 mm³, 制备单细胞悬液(机械法), 收集上清液。加入 2 mL 冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。重置细胞于 500 μL Binding Buffer, 分别加入 10 μL Annexin V-EGFP 和 10 μL 碘化并啶(PI), 混匀。在室温暗处反应 15 min, 上流式细胞仪, 检测自动计算凋亡心肌细胞占总细胞的百分比。

1.2.3 免疫组织化学法检测 SD 大鼠心肌细胞 Smad3 与 Smad7 蛋白表达 在取检测凋亡的心肌细胞的同一部位组织的同时, 另取心肌组织约 4 mm³, 迅速用 10% 的中性福尔马林溶液固定, 以 5 μm 厚度制作石蜡切片, 常规脱蜡水化。采用免疫组织化学 SP 法进行染色, 具体步骤按 SP 试剂盒说明书操作。在光镜下观察, 以心肌细胞核出现棕黄色颗粒为阳性。在高倍镜下观察, 每张切片任意选取 5 个视野(×400), 分析并计数阳性表达细胞占整个视野的百分比, 并取平均值来表示被测蛋白的表达量。

1.2.4 SD 大鼠心肌细胞 Smad3 与 Smad7 mRNA 表达的检测 取相同部位的大鼠心肌组织 50 mg, 匀浆后用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 反转录过程按照试剂盒说明书操作。用 BECKMAN640 紫外分光光度计检测 RNA 水平, A(A260/280) 值 1.6~2.0 为合格, 然后进行反转录。取 5 μL 扩增产物与缓冲液混合后加入琼脂糖凝胶的加样孔中, 进行电泳。在紫外线投射仪下观察电泳条带, 用 D-140 图像记录分析系统进行分析, 以 Smad3 或 Smad7 的 DNA 条带与对应 β-actin 条带的灰度比值表示该因子 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行分析, 4 组 SD 大鼠心肌细胞的凋亡情况, Smad3 蛋白、Smad7 蛋白及 Smad3 mRNA、Smad7 mRNA 的表达的比较分别采用单因素方差分析, LSD-t 检验, 检验水准 α=0.05, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 用 Annexin-EGFP 试剂盒检测的 4 组心肌细胞的凋亡

情况 见表 1。

表 1 各组 SD 大鼠心肌细胞的凋亡情况(̄x±s, n=8)

组别	剂量(g/kg)	凋亡率(%)
假手术组	—	6.460±0.145 0
缺血再灌注组	—	15.356±0.292 1 ^a
辛伐他汀组	0.02	13.003±0.312 2 ^b
黄芪注射液组	16.00(相当于生药量)	12.978±0.327 2 ^b

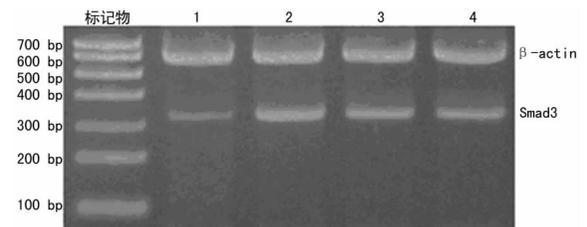
^a: P<0.05, 与假手术组比较; ^b: P<0.05, 与缺血再灌注组比较。
—: 此项无数据。

2.2 SD 大鼠心肌组织中 Smad3、Smad7 蛋白的表达 SD 大鼠心肌组织中 Smad3、Smad7 蛋白的表达情况见表 2。在假手术组心肌细胞中表达有大量的 Smad7 蛋白, 少量的 Smad3 蛋白。与假手术组相比, 可以发现缺血再灌注组 Smad3 蛋白表达量明显增加(P<0.05), Smad7 蛋白的表达则明显降低(P<0.05); 与缺血再灌注组相比, 辛伐他汀组(P<0.05)和黄芪注射液组(P<0.05)Smad3 蛋白表达均明显降低, 但两组 Smad7 蛋白表达明显增加(P<0.05), 而辛伐他汀组和黄芪注射液组比较差异无统计学意义(P>0.05)。

表 2 各组 SD 大鼠心肌细胞 Smad3 及 Smad7 蛋白的表达情况

分组	剂量(g/kg)	Smad3(%)	Smad7(%)
假手术组	—	15.791±1.626	42.516±5.742
缺血再灌注组	—	80.356±6.769	8.219±0.523 ^a
辛伐他汀组	0.02	10.398±1.459	14.722±0.906 ^b
黄芪注射液组	16.00 (相当于生药量)	9.224±0.603	13.754±0.716 ^b

^a: P<0.05, 与假手术组比较; ^b: P<0.05, 与缺血再灌注组比较。
—: 此项无数据。



1: 假手术组; 2: 缺血再灌注组; 3: 辛伐他汀组; 4: 黄芪注射液组。

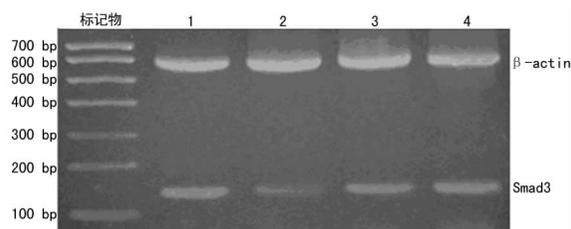
图 1 Smad3 mRNA 的表达

表 3 各组 SD 大鼠心肌细胞 Smad3、Smad7 mRNA 的表达比较

分组	n	剂量(g/kg)	Smad3mRNA	Smad7mRNA
假手术组	8	—	0.101±0.009	0.466±0.032
缺血再灌注组	8	—	0.735±0.036 ^a	0.121±0.010 ^a
辛伐他汀组	8	0.02	0.407±0.034 ^b	0.276±0.012 ^b
黄芪注射液组	8	16.00 (相当于生药量)	0.417±0.024 ^b	0.291±0.008 ^b

^a: P<0.05, 与假手术组比较; ^b: P<0.05, 与缺血再灌注组比较。
—: 此项无数据。

2.3 SD 大鼠心肌组织中 *Smad3*、*Smad7* mRNA 的表达情况 见表 3, 图 1、2。



1:假手术组;2:缺血再灌注组;3:辛伐他丁组;4:黄芪注射液组。

图 2 *Smad7* mRNA 的表达

3 讨 论

组织缺血再灌注损伤是指缺血再灌注后,由于中性粒细胞活化,活性氧产生等因素所导致的炎症产生、细胞凋亡、以及结构损伤的病理过程^[7-8]。近年来的临床和实验表明,心肌细胞的凋亡是引起 MIRI 重要的发病机制^[9]。在心肌细胞的缺血再灌注过程中可以产生大量的氧自由基,进而可能通过下列途径,损伤正常的心肌细胞^[10]:作用于心肌细胞的细胞膜,从而引发脂质过氧化,影响细胞信号转导系统的功能;直接作用于心肌细胞的 DNA,诱发其凋亡;作用于核基因转录,改变心肌细胞的表型特征诱发凋亡;攻击心肌细胞里面的蛋白质,使具有酶活性的蛋白质活性丧失或减弱^[11]。从传统医学角度讲,由于冠状动脉的供血不足引起心肌细胞缺血、缺氧导致心肌失养,造成不同程度的心气亏虚。而再灌注之后,因心气亏虚、运血无力,使得血行淤阻,血流不畅。因此,气虚血淤是心肌缺血再灌注过程中重要的病理变化。

近些年来,国内外学者研究发现 Smad 有如下 3 类^[12]:受体特异型 Smads,也就是由 I 型受体所激活的 Smad 蛋白包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8;共同介质型 Smads,包括:Smad4;抑制型 Smads,包括:Smad6、Smad7。Smad 是转化生长因子-β(TGF-β)胞内信号转导通路中的重要组成部分,它可以将 TGF-β 信号直接由细胞膜通过 TβR I、TβR II 受体结合形成的复合物,使其自身被磷酸化,并通过诱导结合形成的复合物转运至细胞核内。TGF 超家族中包括 TGF-β 家族和 BMP 家族,二者均是 Smad 蛋白经典的激活因子。TGF-β 在心肌细胞中的主要作用通过活化 Smad3 蛋白,来诱导细胞的凋亡^[13]。苏丽婷等^[14]研究发现 Smad7 蛋白有抑制 TGF-β 信号转导的作用,Smad7 属于抑制型 Smad,可以通过干扰 Smad 磷酸化^[15],影响 TGF-β 超家族信号通路的传导。Smad7 属此通路的负反馈环路。即 Smad3 与 Smad7 之间存在相互拮抗的作用,共同调节着心肌细胞的凋亡。

本研究采用结扎左冠状动脉前降支的方法制备 SD 大鼠心肌缺血再灌注模型,模拟急性冠脉综合征后的溶栓过程,用黄芪注射液预处理,来探讨黄芪注射液对 MIRI 的保护作用,并且与辛伐他丁的抗再灌注损伤效果相比较。结果显示:MIRI 后 Smad3 蛋白及 *Smad3* mRNA 的表达明显升高,同时细胞的凋亡也增加,但是 Smad7 蛋白及 mRNA 表达是降低的。黄芪注射液组和辛伐他丁组 Smad3 蛋白及 *Smad3* mRNA 的表达明显下降,心肌细胞的凋亡减少。Smad7 蛋白及 *Smad7* mRNA 的表达量是显著升高的,与缺血再灌注组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。综上所述:Smad3 蛋白、Smad7 蛋白参与了 MIRI 过程中的凋亡信号的转导。并且,二者之间存在相互影响。黄芪注射液可以抑制 Smad3 蛋白及 *Smad3* mRNA

NA 的表达,促进 Smad7 蛋白和 *Smad7* mRNA 的表达,来影响 MIRI 的心肌细胞的凋亡,这种影响可能对于慢性缺血性心肌病的治疗以及心脏外科,血管外科手术中减少损伤,维持正常的心脏功能有着深远的意义,为临床治疗开辟了新思路。

参考文献:

- [1] 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告 2010 [M]. 北京:中国大百科全书出版社,2011:14-15.
- [2] van Domburg RT, Sonnenschein K, Nieuwlaar R, et al. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol,2005,46(1):15-20.
- [3] McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, et al. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2004,286(5):H1923-H1935.
- [4] Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, et al. To be, or not to be; NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis[J]. Oncogene,2003,22(56):8961-8982.
- [5] 高学敏. 中药学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社,2007:502-503.
- [6] 阮长武,张代富,汪姗姗,等. 黄芪对缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响[J]. 同济大学学报:医学版,2003,24(3):182-184.
- [7] 齐志敏,王倩,张莹. 大鼠心肌缺血再灌注损伤实验模型研究[J]. 中国临床康复,2004,8(30):6620-6621.
- [8] Han JY, Fan JY, Horie Y, et al. Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion[J]. Pharmacol Ther,2008,117(2):280-295.
- [9] Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium[J]. Curr Probl Cardiol,2006,31(3):181-264.
- [10] 贺运河,陈镜合. 中药抗心肌缺血-再灌注损伤作用的机制研究现状[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2004,2(3):165-167.
- [11] Wan GW, Liu QN, Zhao XJ. Protective effects of Huangqi against ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Journal of Xian Jiao tong University (Medical Sciences),2009,30(6):713-715.
- [12] Zhang L, Wang LF, Zhang RY, et al. Effect of Smad7 expression on cardiac fibrosis in postinfarcted rats[J]. Chin Heart J,2008,20(5):552-555.
- [13] Schneiders D, Heger J, Best P, et al. SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res,2005,67(1):87-96.
- [14] 苏丽婷,夏时海. Smad 蛋白在转化生长因子-β 信号转导通路中的作用与机制[J]. 医学分子生物学杂志,2008,5(4):352-355,360.
- [15] Yang G, Yang X. Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis[J]. Int J Biol Sci,2010,6(1):1-8.