

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.03.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201210.1204.007.html\(2020-12-11\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201210.1204.007.html(2020-12-11))

桔梗皂苷 D 通过抑制 AT1-CARP 通路改善 AMI 大鼠心肌细胞凋亡和心脏功能的研究^{*}

孟庆雯,刘华江[△],黄 珊,杨珊珊,杨 洋
(海南医学院第一附属医院心血管内科,海口 570100)

[摘要] **目的** 探究桔梗皂苷 D 对急性心肌梗死(AMI)大鼠心肌损伤的影响及机制。**方法** 使用结扎冠状动脉前降支构建大鼠 AMI 模型后,分为 AMI 组、桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组,并设置假手术组作为对照。桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组分别按 25、50、100 mg/kg 的给药剂量灌胃给药,每天 1 次,给药 4 周;假手术组和 AMI 组给予相同体积和频次的生理盐水。给药结束后,检测各组大鼠心脏功能,苏木素-伊红(HE)染色检测心肌组织损伤,TUNEL 检测大鼠心肌细胞凋亡,Western blot 检测心肌组织凋亡相关蛋白及血管紧张素 1(AT1)-心锚重复蛋白(CARP)信号通路。**结果** 与假手术组比较,AMI 组大鼠左心室舒张末期内径(LVEDD)和左心室收缩末期内径(LVESD)升高,左心室短轴缩短率(LVFS)和左心室射血分数(LVEF)降低($P<0.05$),心肌组织损伤明显,心肌细胞凋亡增加,Bax 和裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved-caspase-3)表达水平增加,Bcl-2 表达水平降低($P<0.05$),AT1-CARP 信号通路明显激活。与 AMI 组比较,桔梗皂苷 D 低、中、高组 LVEDD 和 LVESD 降低,LVFS 和 LVEF 明显增加($P<0.05$),心肌损伤明显缓解,细胞凋亡明显减少,Bax 和 cleaved-caspase-3 表达水平下调,Bcl-2 表达水平上调($P<0.05$),AT1-CARP 信号通路被明显抑制。**结论** 桔梗皂苷 D 能够改善 AMI 大鼠心肌损伤及心肌细胞凋亡,机制为抑制 AT1-CARP 信号通路从而调控凋亡相关蛋白表达。

[关键词] 心肌梗死;桔梗皂甙;细胞凋亡;AT1-CARP 信号通路;心脏功能试验

[中图法分类号] R54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)03-0372-06

Study on Bellflower Saponin D inhibiting AT1-CARP pathway to improve AMI rat cardiomyocytes apoptosis and cardiac function^{*}

MENG Qingwen,LIU Hua Jiang[△],HUANG Shan,YANG Shanshan,YANG Yang
(Department of Cardiovascular Medicine,the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College,Haikou,Hainan 570100,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of Bellflower Saponin D on myocardial injury in acute myocardial infarction (AMI) rats. **Methods** After ligating the anterior descending coronary artery to construct a rat model of acute myocardial infarction,it was divided into the AMI group,the Bellflower Saponin D low,medium and high dose groups,and the sham group was set as control. The Bellflower Saponin D low,medium and high dose group was administered by intragastric administration at 25,50,100 mg/kg,once a day for 4 weeks,the sham group and the AMI group were given the same volume and frequency of saline. After that,the heart function of each group was detected,and HE staining was used to detect myocardial tissue damage,TUNEL was used to detect rat cardiomyocytes apoptosis,Western blot was used to detect myocardial tissue apoptosis-related proteins and angiotensin 1 (AT1)-cardiac ankyrin repeat protein (CARP) path. **Results** Compared with the sham group,left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) and left ventricular end systolic diameter (LVESD) of the AMI group significantly increased,left ventricular short axis

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81960075);海南医学院青年培育基金项目(HYPY201912)。 作者简介:孟庆雯(1987—),主治医师,硕士,主要从事冠心病、高血压、心力衰竭的诊治及机制研究。 [△] 通信作者,E-mail:1576790814@qq.com。

shortening rate (LVFS) and left ventricular ejection fraction (LVEF) significantly decreased ($P < 0.05$), myocardial tissue damage was obvious, and myocardial cell apoptosis significantly increased ($P < 0.05$), Bax and cleaved-caspase-3 expression increased significantly, Bcl-2 expression level significantly decreased ($P < 0.05$), AT1-CARP signaling pathway was significantly activated. Compared with the AMI group, LVEDD and LVESD of the Bellflower Saponin D low, medium and high groups decreased, LVFS and LVEF significantly increased ($P < 0.05$), myocardial injury was significantly alleviated, apoptosis significantly reduced, while the expression levels of Bax and cleaved-caspase-3 was down-regulated, Bcl-2 expression level was up-regulated ($P < 0.05$), AT1-CARP signaling pathway was significantly inhibited. **Conclusion** Bellflower Saponin D can improve myocardial injury and cardiomyocytes apoptosis in AMI rats. The mechanism of inhibiting apoptosis is inhibiting AT1-CARP signaling pathway and regulating the expression of apoptosis-related proteins.

[Key words] myocardial infarction; platyconin; apoptosis; AT1-CARP signaling pathway; heart function tests

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是世界范围内常见的心血管疾病, 亦是导致心源性猝死的主要原因, AMI 发病率及病死率高, 且总体呈上升趋势^[1], 对于治疗 AMI 新型药物的研究一直是研究的重点。桔梗皂苷 D 是桔梗的主要化学成分, 具有抗炎、降血脂、抗肿瘤等药理作用^[2]。已有研究表明, 桔梗皂苷 D 对乳腺癌等有治疗作用^[3-4], 但其对 AMI 的作用尚未有明确研究, 本文探讨了桔梗皂苷 D 对 AMI 的影响及机制, 旨在为 AMI 的临床治疗提供帮助, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

桔梗皂苷 D (上海展舒化学科技有限公司, 纯度大于 98%); 戊巴比妥 (江苏艾康生物医药研发有限公司); TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); ELISA 检测试剂盒 (天津安诺瑞康生物技术有限公司); 血管紧张素 1 (AT1)、心锚重复蛋白 (CARP)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)、Bax、Bcl-2、GAPDH 一抗、山羊抗体二抗 (沈阳万类生物技术有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (江苏凯基生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 AMI 造模

结扎冠状动脉前降支构建大鼠 AMI 模型, 具体步骤为: 腹腔注射 50 mg/kg 剂量的戊巴比妥溶液麻醉 SD 大鼠, 同时使用面罩通气支持呼吸, 于左侧第 3 或 4 肋间隙开胸暴露心脏, 打开心包, 结扎大鼠左冠状动脉前降支, 通过心电图 ST-T 改变检测心肌梗死。假手术组只穿线不结扎, 术毕后逐层缝合关胸。

1.2.2 动物给药及分组

假手术组大鼠作为对照, 造模成功的 AMI 大鼠分为 AMI 组、桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组, 其中桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组分别按 25、50、100 mg/kg 的给药剂量灌胃给药, 每天 1 次, 给药 4 周; 假手术组和 AMI 组给予相同体积和频次的生理盐水。

1.2.3 心脏功能检测

各组大鼠给药结束后腹腔注射戊巴比妥麻醉, 使用超声显像仪行超声心动图检查, 分别检测左心室舒张末期内径 (LVEDD)、左心室收缩末期内径 (LVESD)、左心室短轴缩短率 (LVFS) 和左心室射血分数 (LVEF), 比较各组大鼠上述指标。

1.2.4 苏木素-伊红 (HE) 染色

实验结束后解剖获取各组大鼠心肌梗死区域组织, 于组织固定液中固定 24 h, 清洗后经 70%、80%、90%、95% 的乙醇及无水乙醇梯度水化, 再浸入二甲苯溶液中 2 次, 分别于硬石蜡和软石蜡中浸泡 30 min, 并于石蜡液中冷却凝固。于切片机上制备组织切片, 然后将切片置于二甲苯中脱蜡, 依次经 100%、95%、90%、80%、75% 的乙醇水化后, 使用苏木素染色 5 min, 伊红染色 2 min, 清洗去除染色液后经 90%、95%、100% 的乙醇浸泡 1 min, 并将切片置于二甲苯中 2 次, 每次 1 min, 滴加中性树脂封片后于光学显微镜下观察心肌梗死情况, 并拍照记录。

1.2.5 TUNEL 检测大鼠心肌细胞凋亡

取心肌组织石蜡切片用二甲苯及各梯度乙醇脱蜡至水, 然后使用无菌蒸馏水水化 5 min 后, 用 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 进行热修复, 分别经过 3% H_2O_2 甲醇液、0.1% TritonX-100、20% 牛血清、TUNEL 反应混合液、POD 转化剂孵育及磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗后, DAB 溶液显色, 并在显微镜下观察, 终止后用迈耶苏木精染核, PBS 冲洗后, 甘油封

片剂封片,显微镜下观察并拍摄图像。

1.2.6 Western blot

给药结束后,取各组大鼠心肌梗死区域组织于液氮保存,然后取大鼠心肌组织 50 mg,加入 250 μ L RI-PA 蛋白裂解液和 2.5 μ L 的 PMSF 蛋白酶抑制剂,研磨均匀后 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,加入上样缓冲液后沸水浴使蛋白变性,经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜,用 5%的脱脂牛奶对聚偏氟乙烯(PVDF)膜封闭 2 h,然后以 1:1 000 比例稀释后的 AT1、CARP、cleaved-caspase-3、caspase-3、Bax、Bcl-2、GAPDH 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜后二抗室温孵育 1.5 h,再用 TBST 洗膜后按照 ECL 试剂盒说明书配置发光液,并将 PVDF 膜浸入发光液中反应 30 s,曝光并拍照,用 Image J 软件对曝光结果进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AMI 模型鉴定

心电图检测结果显示,与假手术组比较,AMI 组

心电图 ST 段明显抬高,提示 AMI 大鼠造模成功,见图 1。



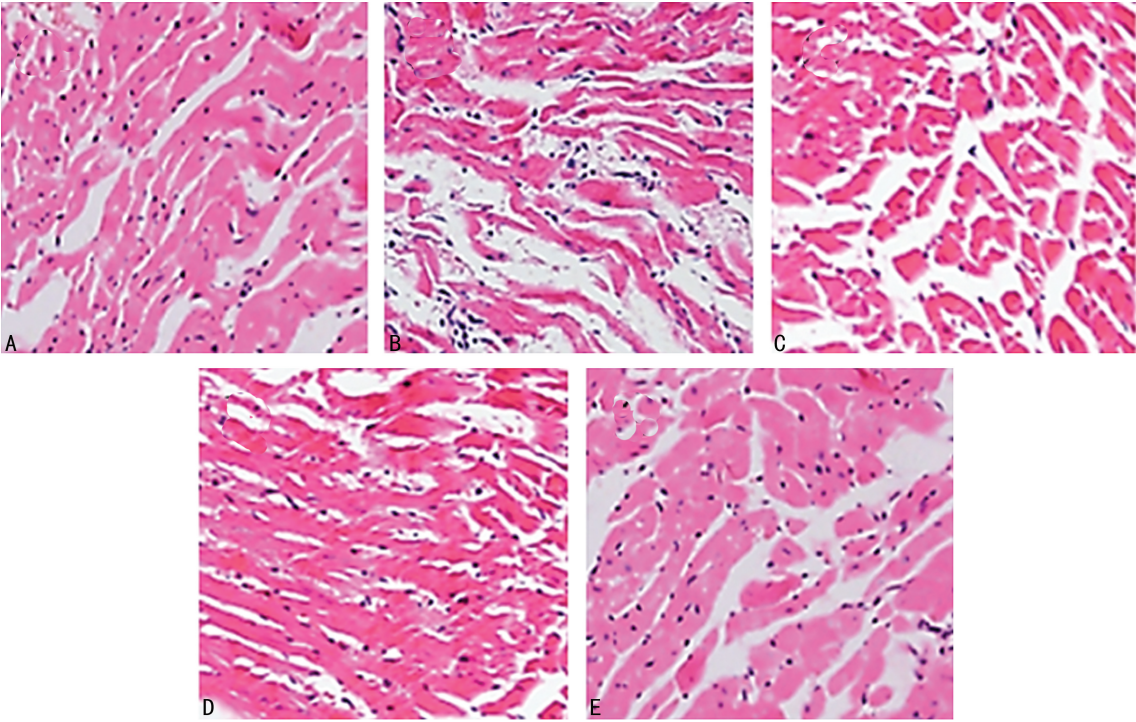
图 1 心电图检测 AMI 模型

2.2 桔梗皂苷 D 对 AMI 大鼠心脏功能的影响

与假手术组比较,AMI 组大鼠 LVEDD 和 LVESD 均明显升高,LVFS 和 LVEF 明显降低($P < 0.05$)。与 AMI 组比较,桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组 LVEDD 和 LVESD 明显降低,LVFS 和 LVEF 明显升高($P < 0.05$),且呈剂量依赖性,见表 1。

2.3 桔梗皂苷 D 改善 AMI 大鼠心肌损伤

假手术组心肌细胞排列整齐,细胞核形态正常,无明显病变;AMI 组大鼠心肌细胞排列紊乱,细胞核萎缩,炎性细胞大量浸润,病变明显;桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组大鼠心肌细胞病变得明显改善,心肌细胞排列较整齐,炎性细胞浸润减少,治疗效果呈剂量依赖性,见图 2。



A:假手术组;B:AMI 组;C:桔梗皂苷 D 低剂量组;D:桔梗皂苷 D 中剂量组;E:桔梗皂苷 D 高剂量组。

图 2 各组大鼠心肌组织病理变化(HE 染色, $\times 100$)

2.4 桔梗皂苷 D 调控 AMI 大鼠心肌细胞凋亡

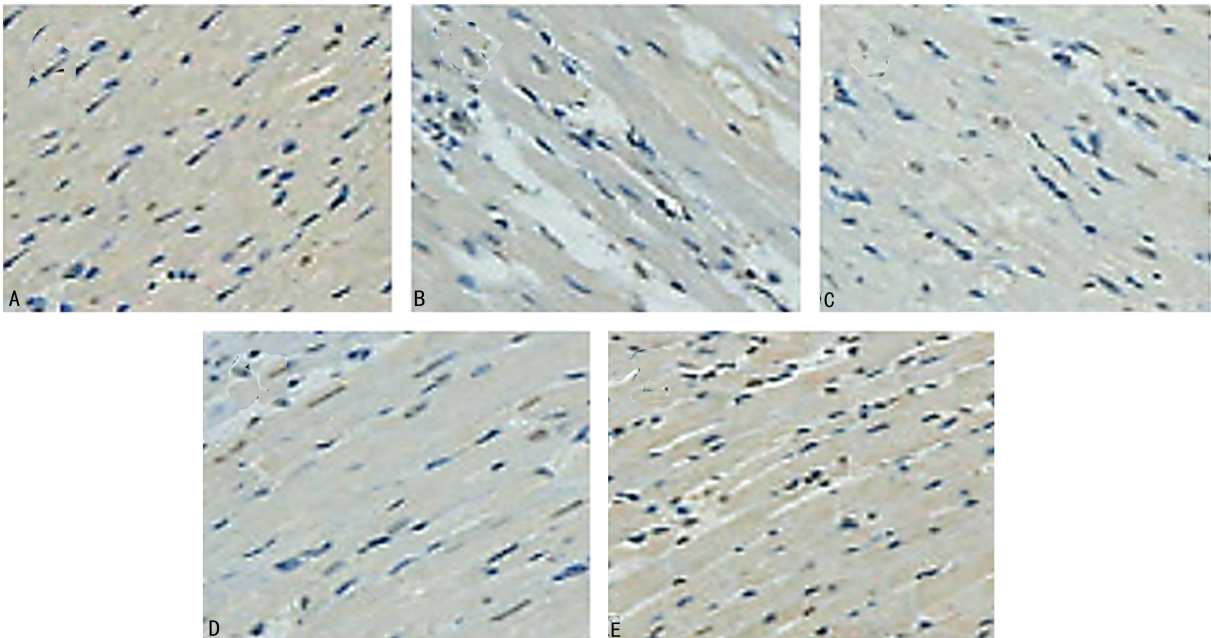
皂苷 D 低、中、高剂量组心肌组织凋亡明显减少($P<0.05$),见图 3、4。

TUNEL 结果显示,与假手术组比较,AMI 组心肌组织凋亡明显增加($P<0.05$);与 AMI 组比较,桔梗

表 1 桔梗皂苷 D 对 AMI 大鼠心脏功能的影响($n=15,\bar{x}\pm s$)

组别	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVFS(%)	LVEF(%)
假手术组	5.08±0.34	3.24±0.12	52.21±5.65	80.12±4.41
AMI 组	9.54±0.54 ^a	6.11±0.76 ^a	23.43±4.32 ^a	45.56±3.23 ^a
桔梗皂苷 D 低剂量组	8.65±0.32 ^b	5.62±0.34 ^b	27.23±6.03 ^b	50.11±3.08 ^b
桔梗皂苷 D 中剂量组	8.01±0.62 ^b	5.09±0.23 ^b	34.43±3.12 ^b	57.54±4.09 ^b
桔梗皂苷 D 高剂量组	6.76±0.23 ^b	4.42±0.60 ^b	30.04±2.98 ^b	65.50±5.15 ^b

^a: $P<0.05$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,与 AMI 组比较。



A:假手术组;B:AMI 组;C:桔梗皂苷 D 低剂量组;D:桔梗皂苷 D 中剂量组;E:桔梗皂苷 D 高剂量组。

图 3 各组大鼠心肌细胞凋亡情况(TUNEL 染色,×100)

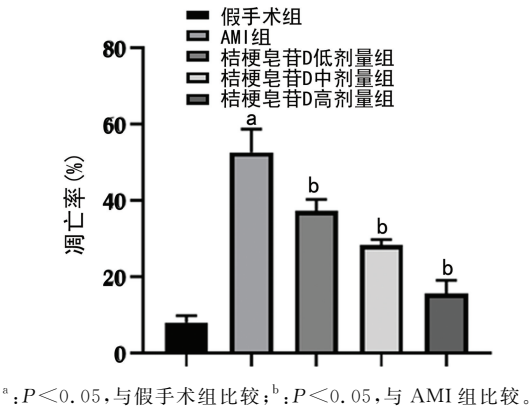
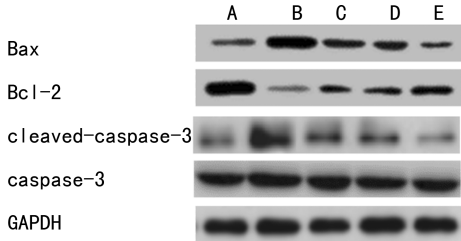


图 4 各组大鼠心肌细胞凋亡水平比较

2.5 桔梗皂苷 D 调控 AMI 大鼠心肌组织凋亡蛋白表达

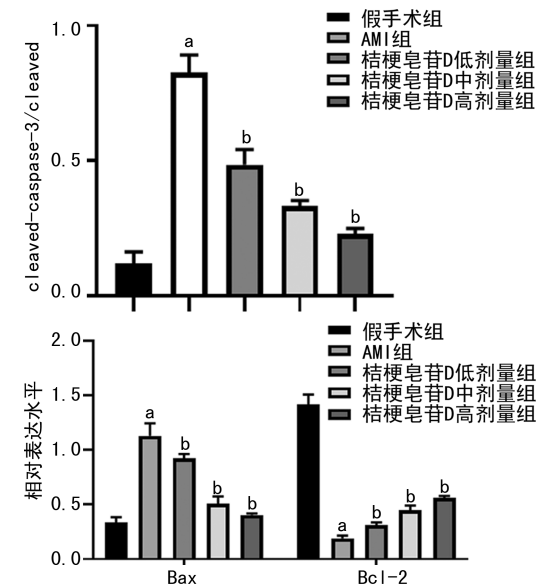
Western blot 结果显示:与假手术组比较,AMI

组心肌组织促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved-caspase-3 表达水平明显增加,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平明显降低($P<0.05$);与 AMI 组比较,桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组大鼠心肌组织 Bax 和 cleaved-caspase-3 表达水平明显下调,Bcl-2 表达水平明显上调($P<0.05$),见图 5、6。



A:假手术组;B:AMI 组;C:桔梗皂苷 D 低剂量组;D:桔梗皂苷 D 中剂量组;E:桔梗皂苷 D 高剂量组。

图 5 Western blot 检测各组心肌组织凋亡蛋白表达情况

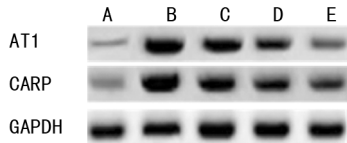


a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; b: $P < 0.05$, 与 AMI 组比较。

图 6 Western blot 检测各组心肌组织凋亡蛋白表达水平

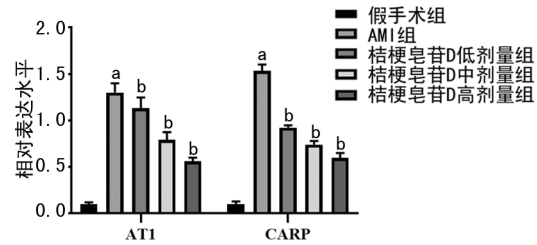
2.6 桔梗皂苷 D 抑制 AT1-CARP 信号通路

Western blot 结果显示,与假手术组比较,AMI 组心肌组织 AT1 和 CARP 表达明显增加 ($P < 0.05$)。与 AMI 组比较,桔梗皂苷 D 低、中、高剂量组 AT1 和 CARP 表达水平明显减少 ($P < 0.05$),见图 7、8。



A:假手术组;B:AMI组;C:桔梗皂苷 D 低剂量组;D:桔梗皂苷 D 中剂量组;E:桔梗皂苷 D 高剂量组。

图 7 Western blot 检测各组大鼠心肌组织 AT1-CARP 信号通路情况



a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; b: $P < 0.05$, 与 AMI 组比较。

图 8 Western blot 检测各组大鼠心肌组织 AT1-CARP 信号通路表达水平

3 讨 论

AMI是常见的心血管疾病,病死率高,且发病机制复杂。目前研究表明,AMI的发病与炎症反应、免疫、细胞凋亡等相关。桔梗皂苷 D 是中药桔梗的主要成分^[5-7]。研究表明,桔梗皂苷 D 能够调控凋亡相关

蛋白表达而治疗肺癌和乳腺癌等肿瘤^[8-10],亦有研究表明桔梗皂苷 D 亦可调控大鼠体内的免疫细胞活性^[11]。桔梗皂苷 D 是否可通过调控炎症反应、免疫、细胞凋亡等治疗 AMI 尚未有明确报道。本研究通过手术构建大鼠 AMI 模型,然后给予低、中、高剂量的桔梗皂苷 D 进行治疗,治疗后检测各组大鼠心脏功能,大鼠 LVEDD 和 LVESD 明显降低,LVFS 和 LVEF 明显增加,说明桔梗皂苷 D 能够改善 AMI 大鼠心脏功能;且 HE 染色结果显示,桔梗皂苷 D 治疗后 AMI 大鼠心脏结构损伤被明显缓解,说明桔梗皂苷 D 能够治疗 AMI 大鼠心脏损伤。

AMI 可促使心肌细胞因缺血缺氧而发生细胞凋亡,通过抑制心肌细胞凋亡可延缓心室重构并减少心肌梗死面积,既往研究报道指出心肌梗死后引发的心肌细胞凋亡是造成心力衰竭等心血管疾病发生的细胞学基础。所以,接下来本研究即探讨了桔梗皂苷 D 是否可通过缓解 AMI 大鼠心肌细胞的凋亡而缓解心肌损伤,本研究通过 TUNEL 检测心肌细胞凋亡,结果显示,桔梗皂苷 D 能够明显抑制 AMI 大鼠心肌细胞的凋亡。Bax、Bcl-2、caspase-3 均为凋亡相关蛋白,其中 Bax 和 caspase-3 具有促进细胞凋亡的作用,而 Bcl-2 具有抑制细胞凋亡的作用^[12]。且桔梗皂苷 D 治疗后促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3 表达明显下调,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显上调,说明桔梗皂苷 D 能够通过调控凋亡相关蛋白的表达而调控 AMI 大鼠心肌细胞凋亡。

心肌梗死后多种原因可诱发心肌细胞凋亡,其中,AT1 受体被激活后 p53 的表达增加,进而降低 Bcl-2 和 Bax 的比值从而发挥促进心肌细胞凋亡的作用^[13]。CARP 属于高度保守的肌肉锚定重复蛋白家族,主要在心脏中表达,且研究表明,CARP 的表达能够随 AT1 受体激活而上调,提示 AT1-CARP 通路可能为引发心肌梗死后细胞凋亡的关键通路^[14-15]。本研究表明,桔梗皂苷 D 治疗后,AMI 大鼠心肌细胞 AT1 和 CARP 表达明显抑制,即 AT1-CARP 信号通路被明显抑制,说明桔梗皂苷 D 能够通过抑制 AT1-CARP 信号通路而缓解 AMI 大鼠心肌细胞凋亡。

综上所述,桔梗皂苷 D 能够改善 AMI 大鼠心脏功能及心肌损伤,其机制为通过抑制 AT1-CARP 信号通路而缓解 AMI 大鼠心肌细胞凋亡,但其临床应用还需进一步研究。

参考文献

[1] SHAH A H,PURI R,KALRA A. Management

- of cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: a review [J]. *Clin Cardiol*, 2019, 42(4):484-493.
- [2] 沈漫, 吴宇娟, 李医明, 等. 桔梗皂苷药理学及临床应用研究进展[J]. *上海中医药大学学报*, 2018, 32(5):92-97.
 - [3] YE Y, PEI L, DING J, et al. Effects of Platycodin D on S100A8/A9-induced inflammatory response in murine mammary carcinoma 4T1 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67(12):239-247.
 - [4] HUANG M Y, JIANG X M, XU Y L, et al. Platycodin D triggers the extracellular release of programmed death Ligand-1 in lung cancer cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 131(3):110537.
 - [5] NEWBY L K. Inflammation as a treatment target after acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(26):2562-2563.
 - [6] ZHANG Y, SHEN T, LIU B, et al. Cardiac shock wave therapy attenuates cardiomyocyte apoptosis after acute myocardial infarction in rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(5):1734-1746.
 - [7] 宋占春, 白静慧, 汪琦, 等. 瑞舒伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的拮抗作用及可能机制[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(45):3695-3700.
 - [8] ZHANG W, HOU J, YAN X, et al. Platycodon grandiflorum saponins ameliorate cisplatin-induced acute nephrotoxicity through the NF- κ B-mediated inflammation and PI3K/Akt/apoptosis signaling pathways[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9):321-342.
 - [9] KHAN M, MARYAM A, ZHANG H, et al. Killing cancer with platycodin D through multiple mechanisms[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(3):389-402.
 - [10] JEON D, KIM S W, KIM H S. Platycodin D, a bioactive component of *Platycodon grandiflorum*, induces cancer cell death associated with extreme vacuolation[J]. *Anim Cells Syst*, 2019, 23(2):118-127.
 - [11] LI W, TIAN Y H, LIU Y, et al. Platycodin D exerts anti-tumor efficacy in H22 tumor-bearing mice via improving immune function and inducing apoptosis[J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(3):417-428.
 - [12] HE F, LIU H, GUO J, et al. Inhibition of MicroRNA-124 reduces cardiomyocyte apoptosis following myocardial infarction via targeting STAT3[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(1):186-200.
 - [13] ALENTA I, PACHER P, DILSIZIAN V, et al. Novel myocardial PET/CT receptor imaging and potential therapeutic targets[J]. *Curr Cardiol Rep*, 2019, 21(7):55-62.
 - [14] CHO E, KANG H, KANG D K, et al. Myocardial-specific ablation of Jumonji and AT-rich interaction domain-containing 2 (Jarid2) leads to dilated cardiomyopathy in mice[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(13):4981-4996.
 - [15] NOMURA S, SATOH M, FUJITA T, et al. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4435-4451.
- (收稿日期:2020-04-16 修回日期:2020-09-23)
-
- (上接第 371 页)
- SOCS1, SOCS6, and PTEN [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51):84508-84519.
- [13] LIU Y, LUO F, WANG B, et al. STAT3-regulated exosomal miR-21 promotes angiogenesis and is involved in neoplastic processes of transformed human bronchial epithelial cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):125-135.
 - [14] 许瑞, 黄华萍, 韩忠, 等. miR-21 靶向 TLR-4/MyD88 信号通路介导冷空气诱导的气道免疫失调[J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(1):98-102.
 - [15] CHUNG S S, WU Y, OKOBI Q, et al. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α Increased telomerase activity through NF- κ B/STAT1/STAT3 activation, and withaferin A inhibited the signaling in colorectal cancer cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017:5958429.
- (收稿日期:2020-05-11 修回日期:2020-10-13)