

扶芳藤丹参合剂预处理对AS大鼠心肌缺血再灌注损伤中JAK/STAT通路的影响

王庆高 卢健棋 潘朝铤 何新兵 杨清华 张振千 张以昆 余丹 邢俊娥
广西中医药大学第一附属医院 530023 南宁市东葛路89-9号
李成林 覃裕旺 刘靖 肖健 方显明 广西中医药大学 530001
朱智德 广西中医药大学制药厂 530023
杨春花 罗锦伟 广西中医药大学2012级硕士研究生 530001

摘要 目的:观察扶芳藤丹参合剂对动脉粥样硬化(AS)大鼠心肌缺血再灌注损伤中JAK/STAT通路的影响。方法:选用Wistar大鼠建立冠状动脉粥样硬化模型,造模成功后随机分为假手术组、缺血再灌注(I/R)组、缺血预处理(IPC)组、缺血预处理(IPC)+AG490组、扶芳藤丹参合剂预处理组、扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组。缺血再灌注后观察各组心肌梗死面积、CK、LDH、p-JAK2及p-STAT3含量。结果:扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理p-JAK2、p-STAT3均明显升高,与I/R组比较有显著性差异($P<0.01$)。I/R组心肌梗死面积、CK及LDH明显增高,经扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理后,心肌梗死面积、CK及LDH明显降低($P<0.01$)。IPC+AG490组、扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组p-JAK2、p-STAT3与I/R组比较升高不明显($P>0.05$),而心肌梗死面积、CK及LDH均较IPC组、扶芳藤丹参合剂预处理组升高($P<0.01$)。结论:扶芳藤丹参合剂预处理能够通过激活JAK/STAT通路,从而减少心肌缺血再灌注损伤。

关键词 扶芳藤丹参合剂;心肌缺血再灌注;JAK/STAT;预处理;细胞信号转导

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1003-0719(2013)04-0058-03

研究表明,Janus激酶信号转导子与转录激活子(JAK/STAT)信号转导通路参与心肌I/R损伤过程,尤其显示出是预处理的中心环节^[1-2]。本研究观察扶芳藤丹参合剂对动脉粥样硬化(AS)大鼠心肌缺血再灌注损伤中JAK/STAT通路的影响,从信号转导通路进一步探讨扶芳藤丹参合剂的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 选用清洁级Wistar大鼠,雌雄各半,体重220~250 g,由广西医科大学医学实验动物中心提供,合格证号SCXK桂2003-0003。

1.2 药物 扶芳藤丹参合剂(扶芳藤15 g,青蒿10 g,黄连6 g,丹参

20 g,檀香6 g,赤芍10 g,川芎6 g,当归6 g,红花6 g,生地黄12 g),由广西中医药大学第一附属医院药房提供,经干燥、称重、浸泡、煎煮3次,浓缩至含生药2 g/ml。

1.3 试剂及仪器 抗人磷酸化JAK2(p-JAK2)抗体(Cell signaling公司);抗人磷酸化STAT3(p-STAT3)抗体(Cell signaling公司);JAK特异性阻断剂AG490(下简称AG490, Sigma公司) 组织细胞裂解液(北京博奥森生物技术有限公司);凝胶成像分析系统(BIORAD公司);紫外分光光度计(日立公司);低温高速离心机(Sigma公司);垂直电泳装置(美国GE公司) 转膜装置(Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 冠状动脉粥样硬化(AS)模型的建立 参照《药理实验方法学》^[3]进行。选用Wistar大鼠,按70万IU/kg的总剂量腹腔注射维生素D₃,分3 d给完,之后每天喂高脂饲料(在大鼠标准饲料的配方中添加1%胆固醇、0.35%胆酸、5%猪油、0.61%丙基硫氧嘧啶)15 g,饲养21 d。

2.2 心肌缺血再灌注(I/R)的方法 参照《药理实验方法学》^[3]进行。大鼠注射麻醉后,背位固定,联接多道生理记录仪,记录标准导联心电图。气管切开,连接动物呼吸机(潮气量21 ml,频率50次/分)。沿胸骨左缘3~4肋间打开胸腔,暴

基金项目:广西自然科学基金(桂科自0991162)

露心脏,剪开心包膜做简易心包吊床,用止血钳轻轻提起左心耳,于心耳下左冠状动脉前降支上1/3处穿线,在线两端各穿1结扎环,拉紧结扎环以阻断冠脉血流。以心电图出现弓背样抬高为结扎成功。结扎冠脉不同的时间后可造成心肌细胞不同程度的缺血损害。

2.3 分组及给药 取Wistar大鼠65只进行造模,于造模结束后第2日随机处死5只,分离大鼠主动脉弓,置于10%中性福尔马林中固定,作HE染色,以主动脉内皮细胞有局部脱落现象,符合动脉粥样硬化早期病理学变化特征判断AS造模成功^[4]。将其余造模大鼠随机分为6个组,每组10只。假手术组:AS造模结束后第2日开胸,冠脉穿线不结扎。缺血再灌注(I/R)组:AS造模结束后第2日开胸,结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min。缺血预处理(IPC)组:AS造模结束后第2日开胸,结扎冠脉5 min,再灌注10 min,共反复4次,然后结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min。缺血预处理(IPC)+AG490组:AS造模结束后第2日开胸前1 h先皮下注射JAK抑制

剂AG490,参照文献[5],剂量为8 mg/kg,然后结扎冠脉5 min,再灌注10 min,共反复4次,最后结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min。扶芳藤丹参合剂预处理组:AS造模结束后第2日开胸前1 h先灌胃给予扶芳藤丹参合剂,灌胃量换算按《药理实验方法学》^[3]计算,每100 g大鼠每日药量为2 mg。然后结扎冠脉60 min后恢复冠脉血流120 min。扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组:AS造模结束后第2日开胸前1 h先皮下给予AG490,剂量为8 mg/kg,然后灌胃给予扶芳藤丹参合剂,其余处理同扶芳藤丹参合剂预处理组。

2.4 TTC法测定心肌梗死面积 再灌注结束后迅速取出心脏,用吸水纸吸去水分。将全心室置-20℃冻存10 min后,从心尖至心底横切成1.0~2.0 mm的心室组织切片,置于1%TTC磷酸缓冲液(pH7.4),37℃孵育20 min,于10%的甲醛溶液中固定24 h,随后将坏死区(灰白色)和非坏死区(砖红色)分离,滤纸吸干,分别称重,梗死面积以坏死心肌重量与缺血区心肌重量之比表

示。

2.5 CK、LDH检测 缺血再灌注后取股动脉血,然后用低速自动平衡离心机离心20 min,转速3 000 r/min,取上清液用全自动生化自动仪测定CK、LDH含量。

2.6 p-JAK2、p-STAT3蛋白测定 采用蛋白免疫印迹(Western blotting)检测心肌组织p-JAK2、p-STAT3蛋白表达。取心肌组织,采用细胞裂解液提取总蛋白,经电泳、转膜、封闭、一抗二抗孵育后,曝光显影。用Scion Corporation分析软件对p-JAK2、p-STAT3进行灰度值半定量分析。以β-actin为内参,p-JAK2、p-STAT3与β-actin的比值代表条带强度的相对值,相应蛋白表达值为条带的灰度值除以β-actin内参校正。

2.7 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,用四川大学华西医学院PEMS 3.1统计软件进行统计分析。

3 结果

3.1 大鼠心肌梗死面积及CK、LDH比较 见表1。

表1 各组大鼠心肌梗死面积及CK、LDH的比较

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

组别	n	CK(U/L)	LDH(U/L)	心肌梗死面积(%)
假手术组	10	94.37±11.56 ^①	203.10±28.98 ^①	0
I/R组	10	291.92±26.45	768.51±59.01	50.11±3.73
IPC组	10	130.86±17.69 ^①	300.64±82.46 ^①	33.62±2.61 ^①
IPC+AG490组	10	287.03±24.07 ^{③④}	741.39±37.42 ^{③④}	47.35±3.94 ^{③④}
扶芳藤丹参合剂预处理组	10	127.08±14.27 ^{①②}	288.57±51.83 ^{①②}	32.86±3.27 ^{①②}
扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组	10	274.95±18.38 ^{③④}	719.04±41.73 ^{③④}	47.01±4.08 ^{③④}

注:与I/R组比较^①P<0.01;与IPC组比较^②P>0.05^③P<0.01;与扶芳藤丹参合剂预处理组比较^④P<0.01

假手术组大鼠心肌未出现梗死,I/R组大鼠出现心肌大面积梗死(50.11%±3.73%),扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理均能显著减少心肌梗死面积,与I/R组比较有显著性差异(P<0.01)。I/R组CK、LDH的水平较假手术组明显增高

(P<0.01),扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理后,与I/R组相比,CK、LDH明显降低(P<0.01)。IPC+AG490组、扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组心肌梗死面积、CK及LDH均较IPC组、扶芳藤丹参合剂预处理组显著升高(P<0.01)。

3.2 大鼠p-JAK2、p-STAT3比较 见表2。

I/R组p-JAK2、p-STAT3升高较假手术组明显(P<0.01);扶芳藤丹参合剂预处理及缺血预处理后,与I/R组、IPC+AG490组、扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组相比,

表2 各组大鼠 p-JAK2 p-STAT3 比较 (% $\bar{x}\pm s$)

组别	n	p-JAK2	p-STAT3
假手术组	10	0.32±0.04 ^①	0.17±0.01 ^①
I/R组	10	15.63±2.08	11.05±0.62
IPC组	10	25.98±3.41 ^①	20.44±1.78 ^①
IPC+AG490组	10	14.05±1.26 ^{②④⑤}	12.08±1.52 ^{②④⑤}
扶芳藤丹参合剂预处理组	10	27.30±4.62 ^{①③}	21.14±1.85 ^{①③}
扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组	10	16.64±2.77 ^{②④⑤}	11.89±0.96 ^{②④⑤}

注:与I/R组比较 ①P<0.01 ②P>0.05;与IPC组比较 ③P>0.05 ④P<0.01;与扶芳藤丹参合剂预处理组比较 ⑤P<0.01

p-JAK2 p-STAT3显著升高(P<0.01)。IPC+AG490组、扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组 p-JAK2 p-STAT3与I/R组比较升高不明显(P>0.05)。

4 讨论

Janus激酶信号转导子与转录激活子(JAK/STAT)信号转导通路广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节、炎症、肿瘤等多种生理、病理过程。JAK有4个成员, STAT主要有7个成员,其中JAK2, STAT3与IPC关系密切。Hattori等^[6] IPC前用JAK抑制剂AG490处理,能显著抑制JAK2和STAT3的活化及IPC诱导的Bcl-2上调和Bax下调,取消IPC诱发的保护作用。提示IPC通过JAK2和STAT3的活化而减轻缺血再灌注损伤。

虽然IPC是一种强有力的心肌保护因素,但由于它是一种损伤性的过程,限制了它的临床应用。中药因其副作用小,作用靶点多而有望成为代替缺血预处理的理想药物。扶芳藤丹参合剂是在丹参饮(《时方歌括》)基础上加川芎、赤芍、当归、黄芪、扶芳藤、青蒿、黄连等药化裁而成,能行气活血、化痰解毒。笔者前期临床与实验研究已表明加味丹参饮对冠心病患者有较好的降脂作用,对家兔食饵性动脉粥样硬化具有显著的防治作用,并具有模拟缺血预处理样的心肌保

护作用^[7-9]。本实验采用AS大鼠进行I/R观察,当心肌缺血再灌注时,JAK2和STAT3轻度升高,心肌梗死面积、CK及LDH均较假手术组显著增加,IPC和扶芳藤丹参合剂预处理后JAK2和STAT3均明显升高,心肌梗死面积、CK及LDH明显降低,与I/R组比较均具有显著性意义(P<0.01);应用JAK抑制剂后,IPC+AG490组及扶芳藤丹参合剂预处理+AG490组JAK2和STAT3与I/R组比较升高不明显,心肌梗死面积、CK及LDH均较IPC组和扶芳藤丹参合剂预处理组升高。说明JAK抑制剂AG490能够抑制JAK/STAT激活,从而抑制IPC和扶芳藤丹参合剂预处理防治缺血再灌注损伤的作用。提示扶芳藤丹参合剂预处理能够通过激活JAK/STAT通路而减少心肌缺血再灌注损伤。

参考文献

[1] Smith R M, Suleman N, Lacerda L, et al. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning[J]. Cardiovasc Res, 2004 (63): 611-616.
 [2] Yamaura G, Turoczi T, Yamamoto F, et al. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003 (5): 476-482.
 [3] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法

学[M].4版.北京:人民卫生出版社, 2010:1025, 886, 1698.

[4] 王松柏, 姚咏明, 陈劲松, 等. 严重腹腔感染大鼠通路活化与多器官功能损害的关系 [J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(1): 42.
 [5] 张桂清, 曾秋棠, 曹林生, 等. 氯沙坦对兔实验性动脉粥样硬化血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(3): 309.
 [6] Hattori R, Mulik N, Otani H, et al. Role of STAT3 in ischemic preconditioning [J]. J Mol Cardiol, 2001, 33(11): 1929.
 [7] 黄政德, 张玉生, 葛金文. 加味丹参饮对家兔动脉粥样硬化形成影响的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2002, 22(4): 4, 20.
 [8] 黄政德, 葛金文, 张玉生. 加味丹参饮对家兔缺血再灌注损伤心肌延迟保护作用的研究 [J]. 湖南中医杂志, 2003, 19(6): 52-53.
 [9] 王庆高, 黄政德, 肖健, 等. 加味丹参饮预处理对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的延迟保护作用及对PKC影响的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病, 2007, 5(10): 953.

(2013-06-15 收稿/编辑 陈明伟)