

疗效。

[参考文献]

- [1] 张喜奎, 李森. 土燥水竭证动物模型研制[J]. 福建中医学院学报, 2004, 14(2): 35-40.
- [2] 邓文龙, 龚世蓉, 周莉萍. 近年中医方剂药理学研究进展(上)[J]. 中国实验医学杂志, 1995, 1(1): 3-6.
- [3] 张年顺, 宋乃光. 实用中医时间医学[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1991: 4.
- [4] 梁芝萍, 丁萌. 临床用药切勿忽视时辰药理[J]. 华北国防医药, 2009, 21(5): 28-29.
- [5] 伊藤真次. 人体昼夜节律[M]. 重庆: 重庆出版社, 1983: 150.
- [6] 罗卫芳, 郭树仁, 李国卿. 择时应用大承气汤对小鼠泻下作用的时辰差异[J]. 中药药理与临床, 1995, 11(3): 7-9.
- [7] 来建国. 庆大霉素在小鼠的时辰毒性及时辰药代动力学[J]. 药理学报, 1991, 9(6): 26.

(编辑: 马力)

扶芳藤丹参合剂预处理通过 JAK/STAT 通路干预 心肌缺血再灌注损伤炎症反应的研究

王庆高¹, 卢健棋¹, 朱智德², 李成林¹, 覃裕旺¹, 潘朝铨¹, 何新兵¹, 杨春花¹

1. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023; 2. 广西中医药大学制药厂, 广西 南宁 530023

[摘要] 目的: 观察扶芳藤丹参合剂预处理通过 JAK/STAT 通路干预心肌缺血再灌注损伤中的炎症反应。方法: 选用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, 磷酸肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、NF- κ B、p-JAK2 及 p-STAT3 含量。结果: 扶芳藤丹参合剂预处理组及 IPC 组 p-JAK2, p-STAT3 均明显升高, 与 I/R 组比较, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。I/R 组心肌梗死面积、CK 及 LDH、TNF- α , NF- κ B 明显增高, 扶芳藤丹参合剂预处理组及 IPC 组, 与 I/R 组相比, 心肌梗死面积、CK 及 LDH、TNF- α , NF- κ B 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、TNF- α , NF- κ B 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 通路而抑制炎症反应, 从而减少心肌缺血再灌注损伤。

[关键词] 心肌缺血再灌注; 扶芳藤丹参合剂; JAK/STAT 通路; 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]** 0256-7415 (2013) 12-0167-04

研究表明, 炎症反应在心肌缺血再灌注损伤中发挥了重要作用^[1], 抑制炎症反应在防治缺血再灌注损伤中具有重要意义。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, 尤其显示出是预处理的中心环节^[2-3]。在预处理中, 对 JAK/STAT 与炎症反应的关系研究不多。本研究观察扶芳藤丹参合剂预处理通过 JAK/STAT 通

[收稿日期] 2013-07-01

[基金项目] 广西自然科学基金项目 (编号: 桂科自 0991162)

[作者简介] 王庆高 (1971-), 男, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 心血管疾病中西医结合防治。

路干预心肌缺血再灌注损伤中的炎症反应作用,以为中医药防治心肌缺血再灌注损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用清洁级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 220~250g,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。

1.1.2 药物 扶芳藤丹参合剂(由扶芳藤 15g,青蒿、赤芍各 10g,丹参 20g,檀香、川芎、当归、黄连、红花各 6g,生地黄 12g 等组成)。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 2g/mL。

1.1.3 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),兔抗 NF- κ B 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);JAK 特异性阻断剂 AG490(Sigma 公司);ELISA 试剂盒(购自武汉博士德公司);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)。

1.2 方法

1.2.1 冠状动脉粥样硬化(AS)模型的建立 参照《药理实验方法学》^[4]建立模型。选用 Wistar 大鼠,按 70 万 IU/kg 的总剂量腹腔注射维生素 D₃,分 3 天给完,之后每天喂高脂饲料 15g(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),喂养 21 天。

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

1.2.3 分组及给药 取 Wistar 大鼠 65 只进行造模,于造模结束后第 2 天随机处死 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 AS 早期病理学变化特征判断 AS 造模成功^[5]。将其余造模大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。假手术组:AS 造模结束后第 2 天开胸,冠脉穿线不结扎。缺血再灌注(I/R)组:AS 造模结束后第 2 天开胸,结扎冠脉 60min 后恢复冠脉血流 120min。缺血预处理(IPC)组:AS 造模结束后第 2 天开胸,结扎冠脉 5min,再灌注 10min,共反复 4 次;然后结扎冠脉 60min 后恢复冠脉血流 120min。IPC + AG490 组:AS 造模结束后第 2 天开胸前 1h 先皮下注射 JAK 抑制剂 AG490,剂量参照文献^[6],8mg/kg,然后结扎冠脉 5min,再灌注 10min,共反复 4 次;最后结扎冠脉 60min 后恢复冠脉血流 120min。扶芳藤丹参合剂预处理组:AS 造模结束后第 2 天开胸前 1h 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》^[4]计算,每 100g 大鼠每天药量为 2mg。然后结扎冠脉 60min 后恢复冠脉血流 120min。扶芳藤丹参合剂预处理 + AG490 组:AS 造模结束后第 2 天开胸前 1h 先皮下给予 AG490,8mg/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。

1.2.4 TTC 法测定心肌梗死面积 再灌注结束后迅速取出心脏,用吸水纸吸去水份。将全心室置 -20℃冻存 10min 后,从心尖至心底横切成 1.0~2.0mm 的心室组织切片,置于 1%TTC 磷酸缓冲液(pH7.4),37℃孵育 20min,于 10%的甲醛溶液中固定 24h,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。

1.2.5 磷酸肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(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 20min,转速 3000r/min,取上清液用全自动生化仪测定 CK、LDH 含量。

1.2.6 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量测定 术后取股动脉血,高速离心 2000r/min,取血清,TNF- α 含量测定用酶联免疫分析法(ELISA 法)进行,严格按试剂说明书进行操作。

1.2.7 NF- κ B 蛋白测定 采用蛋白免疫印迹(Western blotting)检测心肌组织 NF- κ B 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 NF- κ B 进行灰度值半定量

分析。以 β -actin 为内参, NF- κ B/ β -actin 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 内参照校正。

1.2.8 p-JAK2、p-STAT3 蛋白测定 采用 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 内参照校正。

1.2.9 统计学方法 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 PEMS3.1 统计软件进行统计。

2 结果

2.1 各组大鼠 CK、LDH 及心肌梗死面积比较 见表 1。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, 扶芳藤丹参合剂预处理组及 IPC 组心肌梗死面积均减少, 与 I/R 组比较, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。I/R 组 CK、LDH 的水平增高, 扶芳藤丹参合剂预处理组及 IPC 组分别与 I/R 组比较, CK、LDH 均降低 ($P < 0.01$)。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升高 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠 CK、LDH 及心肌梗死面积比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	CK(U/L)	LDH(U/L)	心肌梗死面积(%)
假手术组	10	94.37±11.56	203.10±28.98	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 ^{②③}	741.39±37.42 ^{②③}	47.35±3.94 ^{②③}
扶芳藤丹参合剂预处理组	10	127.08±14.27 ^①	288.57±51.83 ^①	32.86±3.27 ^①
扶芳藤丹参合剂预处理 + AG490 组	10	274.95±18.38 ^{②③}	719.04±41.73 ^{②③}	47.01±4.08 ^{②③}

与 I/R 组比较, ① $P < 0.01$; 与 IPC 组比较, ② $P < 0.01$; 与扶芳藤丹参合剂预处理组比较, ③ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠 TNF- α 、NF- κ B 比较 见表 2。与假手术组比较, I/R 组血清 TNF- α 含量和心肌组织 NF- κ B 含量均显著升高; 扶芳藤丹参合剂预处理组及 IPC 组分别与 I/R 组比较, TNF- α 、NF- κ B 均降低 ($P < 0.01$)。IPC + AG490 组、扶芳藤丹参合剂

预处理 + AG490 组心肌 TNF- α 、NF- κ B 均较 IPC 组、扶芳藤丹参合剂预处理组升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠 TNF- α 、NF- κ B 比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	TNF- α (pg/mL)	NF- κ B(%)
假手术组	10	37.57±8.61	0.216±0.018
I/R 组	10	105.22±11.53	0.973±0.075
IPC 组	10	55.13±10.92 ^①	0.421±0.054 ^①
IPC + AG490 组	10	101.74±12.08 ^{②③}	0.950±0.108 ^{②③}
扶芳藤丹参合剂预处理组	10	50.34±9.22 ^①	0.455±0.103 ^①
扶芳藤丹参合剂预处理 + AG490 组	10	96.51±10.40 ^{②③}	0.958±0.081 ^{②③}

与 I/R 组比较, ① $P < 0.01$; 与 IPC 组比较, ② $P < 0.01$; 与扶芳藤丹参合剂预处理组比较, ③ $P < 0.01$

2.3 各组大鼠 p-JAK2、p-STAT3 比较 见表 3。假手术组 p-JAK2、p-STAT3 升高不明显; 扶芳藤丹参合剂预处理组及 IPC 组分别与 I/R 组比较, p-JAK2、p-STAT3 均升高 ($P < 0.01$); IPC + AG490 组、扶芳藤丹参合剂预处理组 + AG490 组与 IPC 组、扶芳藤丹参合剂预处理组比较, p-JAK2、p-STAT3 均下降 ($P < 0.01$)。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 ($P > 0.05$)。

表 3 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	0.17±0.01	
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	4.05±1.26 ^{②③}	12.08±1.52 ^{②③}	
扶芳藤丹参合剂预处理组	10	27.30±4.62 ^①	21.14±1.85 ^①	
扶芳藤丹参合剂预处理 + AG490 组	10	6.64±2.77 ^{②③}	11.89±0.96 ^{②③}	

与 I/R 组比较, ① $P < 0.01$; 与 IPC 组比较, ② $P < 0.01$; 与扶芳藤丹参合剂预处理组比较, ③ $P < 0.01$

3 讨论

炎症反应在心肌缺血阶段即被激活, 再灌注时显著加剧。其中, TNF- α 、NF- κ B 直接或间接参与缺血再灌注损伤炎症过程, 刺激其他细胞因子及炎症介质的产生。TNF- α 是一种促炎细胞因子, 在缺血和再灌注期间, TNF- α 促进 IL-6 的产生, 促进炎症反应。NF- κ B 的活化和其致炎症调节物级联反应促进心脏的炎症反应。

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 R 等^[7]在 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机制, 但由于它是一种损伤性的过程从而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 IPC 的理想药物。扶芳藤丹参合剂在丹参饮(《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, 功用行气活血、化瘀解毒。笔者前期临床与实验研究已表明扶芳藤丹参饮对冠心病患者有较好降脂作用, 对家兔食饵性 AS 具有显著的防治作用, 并具有模拟 IPC 样的心肌保护作用^[8-10]。本实验采用大鼠进行 I/R 观察, I/R 时, JAK2 和 STAT3 轻度升高, 心肌梗死面积、CK、LDH、TNF- α 及 NF- κ B 含量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、LDH、TNF- α 及 NF- κ B 均较 I/R 组明显降低; 应用 JAK 抑制剂后, IPC + AG490 组及扶芳藤丹参饮预处理 + AG490 组心肌梗死面积、CK、LDH 及 TNF- α 、NF- κ B 均较 IPC 组和扶芳藤丹参合剂预处理组升高。说明活化的 JAK/STAT 能够通过抑制炎症反应防治缺血再灌注损伤的作用。扶芳藤丹参合剂预处理能够通过激活 JAK/STAT 通路而抑制炎症反应, 从而减少心肌缺血再灌注损伤。

[参考文献]

[1] 臧益民, 樊荣. 加强多学科协作, 争取心血管病研究取

得新进展[J]. 心脏杂志, 2006, 18(5): 483-488.

- [2] Smith RM, Suleman N, Lacerda L, et al. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning[J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(4): 611-616.
- [3] 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, 285(2): H476-482.
- [4] 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.
- [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): 309-313.
- [6] 王松柏, 姚咏明, 陈劲松, 等. 严重腹腔感染大鼠 JAK/STAT 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): 42-44.
- [7] Hattori R, Mulik N, Otani H, et al. Role of STAT3 in ischemic preconditioning[J]. J Mol Cardiol, 2001, 33(11): 1929-1936.
- [8] 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): 4-6, 20.
- [9] 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.
- [10] 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蛋白激酶 C 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病, 2007, 5(10): 953-955.

(编辑: 马力)

欢迎订阅 2014 年《新中医》

无论国内还是国外, 有中医的地方就有《新中医》, 《新中医》摇中医之旗, 宣中医之术, 传中医之道, 解中医之惑; 《新中医》去伪存真, 去粗取精, 造就高手, 培养名医。《新中医》坚持面向临床的办刊方针, 及时展现当代中医的新观点、新思路、新成果、新技术、新方法、新经验, 全心全意为广大读者服务。请新老读者到当地邮局订阅 2014 年《新中医》。《新中医》为广州中医药大学与中华中医药学会共同主办, 每月 1 期, 每期 160 页。刊号: ISSN0256-7415, CN44-1231/R。邮发代号: 国内 46-38, 国外 M186。定价: 每期 18 元, 全年 12 期共 216 元, 地址: (510405) 广州市机场路 12 号。联系电话: 020-36585482。