

山楂酸对大鼠心肌缺血再灌注损伤 HMGB1、IL-1 β 、IL-6 表达及 GSH-Px 活性的影响*

张倩,王勇[△]

恩施土家族苗族自治州中心医院/武汉大学恩施临床学院,湖北恩施 445000

摘要 目的:观察山楂酸(maslinic acid,MA)对大鼠心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion,I/R)损伤高迁移率族蛋白1(high mobility group protein 1, HMGB1)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6水平及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性的影响。方法:将48只SD大鼠随机分成4组,即假手术组(Sham)、模型组(I/R)、MA低剂量组(10 mg/kg, MA-Low)、MA高剂量组(30 mg/kg, MA-High),每组12只。MA组造模前连续1周灌胃给药,通过结扎大鼠左冠状动脉前降支(left anterior descending, LAD)30 min再灌注2 h建立大鼠心肌I/R模型。取大鼠心肌缺血组织, TTC染色法测定心肌梗死面积,匀浆后采用比色法测定GSH-Px活性, ELISA检测IL-1 β 的含量, Western Blot和免疫荧光分别检测缺血心肌组织中HMGB1及IL-6蛋白的表达情况。结果:与I/R组比较, MA-Low组及MA-High组心肌梗死面积减小, HMGB1、IL-1 β 、IL-6蛋白水平降低, GSH-Px活性升高, 其中MA-High组差异更显著($P < 0.05$)。结论:MA对缺血再灌注心肌具有保护作用,其机制可能是通过抑制HMGB1及炎症因子IL-1 β 、IL-6的表达,增强GSH-Px活性来实现的。

关键词 心肌缺血再灌注损伤;山楂酸;高迁移率族蛋白1;白细胞介素;谷胱甘肽过氧化物酶;大鼠
[中图分类号] R256.21 [文献标识码] A [文章编号] 2096-9600(2024)12-0007-04

Effects of Maslinic Acid on the Levels of HMGB1, IL-1 β , IL-6 and GSH-Px Activity in Rats with Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

ZHANG Qian, WANG Yong[△]

The Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture/Enshi Clinical College of Wuhan University, Enshi 445000, China

Abstract Objective: To observe the effects of maslinic acid (MA) on the levels of HMGB1, IL-1 β , IL-6 and GSH-Px activity in myocardial ischemia/reperfusion (I/R) rats. Methods: A total of 48 SD rats were randomized into four groups: sham operation group (Sham), the model group (I/R), low dose (10 mg/kg, MA-Low) group of MA, and high dose (30 mg/kg, MA-High) group of MA, with 12 in each group. MA group accepted intragastric administration of medicine for one week before modeling, rat models with myocardial I/R injury were established by left anterior descending (LAD) ligation for 30 min and then reperfusion for two hours. TTC staining was used to measure the area of myocardial infarction after taking myocardial ischemic tissue, the activity of GSH-Px was determined by colorimetric method after homogenizing the tissue, the contents of IL-1 β were detected by ELISA, the expressions of HMGB1 and IL-6 protein in the ischemic myocardial tissue were measured by Western Blot and immunofluorescence respectively. Results: Compared to I/R group, the area of myocardial infarction was reduced in MA-Low group and MA-high group, the levels of HMGB1, IL-1 β and IL-6 protein lowered, the activity of GSH-Px was increased, among them, the difference was significant in MA-High group ($P < 0.05$). Conclusion: MA has the protective effects on I/R myocardium, and its mechanism may be realized by inhibiting the expressions of HMGB1, IL-1 β and IL-6, and enhancing the activity of GSH-Px.

Keywords myocardial; ischemia-reperfusion injury; maslinic acid; HMGB1; interleukin; glutathione peroxidase; rats

据《中国心血管健康与疾病报告2019概要》数据显示,目前我国冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)患者人数高达1100万,无论是对于农村还是城镇居民,由急性心肌梗死导致的死亡率仍呈逐年上升趋势,其不仅严重危害着国民的健康,也给社会医疗体系带来

了沉重的负担^[1]。早期血运重建是CHD首选治疗策略,然而血运重建所致的心肌缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion, I/R)可导致心脏结构、功能和电生理等发生进一步损伤^[2]。高迁移率族蛋白1(high mobility group protein 1, HMGB1)是新近发现的晚期炎症介质, HMGB1与其受体结

合后可刺激白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、IL-6等炎症因子的释放,后者又可使活化的单核-巨噬细胞释放核HMGB1,从而形成正反馈造成炎症的级联放大效应,参与I/R的发生发展^[3]。此外,谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)在心肌I/R时合成减少,而外源性补充GSH-Px可有效减轻氧自由基对再灌注心肌的损伤^[4]。近年来中医药治疗心肌I/R已得到了广泛的关注,山楂酸(maslinic acid, MA)作为一种五环三萜酸,可有效减少高糖及缺氧介导的心肌细胞损伤,表现出抗炎及抗氧化作用^[5-6]。但目前针对MA防治心肌I/R的研究知之甚少。因此,本研究拟探究MA对心肌I/R中HMGB1、IL- 1β 、IL-6表达及GSH-Px活性的影响,并分析其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠,体质量约(230±30)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。实验动物合格证号:11401300011928,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0011。饲养环境:自由进食水,12 h明暗交替,温度(25±2)℃,湿度(40±10)%。实验方案经医院医学实验动物伦理委员会审议批准(202104A)。

1.2 试剂及仪器 MA[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,货号:PHL83209];IL- 1β ELISA试剂盒(Sigma公司,货号:RAB0274);HMGB1抗体(Sigma公司,货号:SAB2108675);IL-6抗体(Sigma公司,货号:SAB5700181);免疫荧光试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,货号:YT102);TTC试剂(Sigma公司,货号:17779);GSH-Px试剂盒(Sigma公司,货号:G6137);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海谷歌生物有限公司,货号:P0010S-01)。JA2003型电子天平(上海良品仪器厂);BX63型光学显微镜(日本Olympus公司);EG1150型石蜡包埋机(德国Leica公司);RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);Qwin型多功能图像分析系统(德国Leica公司);CP70ME型低温高速离心机(日本Hitachi公司)。

1.3 分组及处理 将雄性SD大鼠48只随机分为4组:假手术组(Sham组)、模型组(I/R组)、MA低剂量组(10 mg/kg, MA-Low组)、MA高剂量组(30 mg/kg, MA-High组),每组12只。MA组持续MA溶液灌胃1周,Sham组及I/R组给予等量0.9%NaCl灌胃后建立大鼠心肌I/R模型,收集标本待检。

1.4 模型制备 大鼠称体质量,3%戊巴比妥钠按照40 mg/kg的剂量进行腹腔麻醉后行气管插

管,插管成功后,沿胸部中线稍偏左侧,第三、四肋间水平开胸,充分暴露心脏,轻轻上挑左心耳,找到动脉圆锥部,在前室间沟处可见左冠状动脉前降支(left anterior descending, LAD)走形,于左心耳下缘、LAD根部,将LAD和乳胶管一起结扎,致心肌缺血,此时记录到大鼠心电图ST-T抬高,缺血30 min后,在乳胶管凹槽处剪断结扎线,取出乳胶管,此时记录到大鼠心电图ST-T降低,提示再灌注成功,2 h后打开大鼠腹腔于下腔静脉处取血,同时取出心脏^[7]。

1.5 观察指标

1.5.1 TTC染色检测心肌梗死面积 大鼠在心肌再灌注结束后,打开腹腔,充分暴露下腔静脉,在肾脏水平,针尖朝大鼠头部,刺入下腔静脉,推注1 mL TTC液。10 min后取出心脏,用0.9%NaCl清洗心肌后置于-80℃快速冰冻20 min。自心尖部向上将左心室均匀切成5片,用0.9%NaCl清洗后放入多聚甲醛中固定。梗死区最终显示白色,根据白色梗死区面积大小评估大鼠心肌梗死情况。

1.5.2 GSH-Px活性测定 摘取大鼠心脏后,置于4℃的0.9%NaCl中,剪取左室前壁缺血处心肌组织,称质量后放入匀浆器中制成10%的匀浆,经离心后取上清,全部分离过程在4℃以下进行,按照试剂盒说明书测定GSH-Px活性。

1.5.3 ELISA法测定IL- 1β 含量 标本处理同GSH-Px活性测定,左室前壁缺血处心肌组织匀浆后,离心半径10 cm,3500 r/min离心10 min,离心获得的上清液在-20℃条件下保存。按照ELISA试剂盒说明检测IL- 1β 的含量。

1.5.4 HMGB1蛋白测定 蛋白免疫印迹Western Blot, WB检测大鼠心肌组织中HMGB1蛋白含量。建模成功后收集各组大鼠左室前壁心肌,匀浆后BCA法测定浓度备用。按照相关说明配置10%的分离胶及5%浓缩胶,先后注入厚1 mm清洗干净、干燥的玻璃板中。每组取30 μ g总蛋白依次缓缓注入上样孔中,之后在紧邻上样孔旁的一个孔中加入2 μ L的maker,上样完成后在电泳仪中电泳;电泳结束后切下目的蛋白条带胶块并转膜(PVDF膜);转膜结束,用TBST液洗膜3次后用10%的封闭液孵育PVDF膜1.5 h;封闭结束后,再次TBST液洗膜3次后HMGB1一抗孵育PVDF膜过夜;第二天, TBST液洗膜3次后加入配置好的二抗孵育液,配制ECL工作液,化学发光仪中曝光显影并分析。

1.5.5 免疫荧光检测IL-6的表达 石蜡包埋左心室组织后行病理切片,切片经过不同浓度二甲苯,无水乙醇及酒精脱蜡后行抗原修复。血清封

闭切片后加入 IL-6 一抗,并于 4 °C 湿盒中孵育过夜。第二天, TBST 冲洗切片 3 次后加荧光二抗 37 °C 孵育 60 min,然后滴加 DAPI 染核,避光孵育 5 min 后在荧光显微镜下观察采集图像。每张切片随机选择 5 个视野, Image J 1.52v 软件计算平均荧光强度。IL-6 的表达与平均荧光强度成正比。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心肌梗死面积 心肌梗死面积占比分析中, I/R 组 > MA-Low 组 > MA-High 组, 各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 大鼠 HMGB1、IL-1 β 表达及 GSH-Px 活性 与

Sham 组相比, I/R 组、MA-Low 组、MA-High 组中 HMGB1、IL-1 β 的表达升高, 而 GSH-Px 活性降低 ($P < 0.05$); 与 I/R 组比较, MA 预处理可降低 HMGB1、IL-1 β 表达, 同时升高 GSH-Px 活性, MA-High 组与 MA-Low 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。HMGB1 表达 WB 条带图见图 1。

2.3 大鼠 IL-6 表达 IL-6 在荧光显微镜下显红色荧光, 与 Sham 组相比, IL-6 在 I/R 组中表达升高, 而 MA-Low 组与 MA-High 组中, IL-6 表达降低, 其中 MA-High 组降低更显著 ($P < 0.05$); 与 Sham 组相比, I/R 组、MA-Low 组与 MA-High 组平均荧光强度值升高 ($P < 0.05$); 与 I/R 组比较, MA-Low 组与 MA-High 组平均荧光强度值下降 ($P < 0.05$), 且 MA-High 组低于 MA-Low 组。见表 1, 免疫荧光图见图 2。

表 1 各组大鼠心肌梗死面积, HMGB1、IL-1 β 表达, GSH-Px 活性及平均荧光强度比较

组别	鼠数	梗死面积占比 (%)	HMGB1	IL-1 β (pg/mL)	GSH-Px 活性 (U/mgprot)	平均荧光强度
Sham 组	12	-	0.218 ± 0.023	98.38 ± 12.96	1593.15 ± 206.46	15.17 ± 6.69
I/R 组	12	45.29 ± 6.53	0.616 ± 0.047*	514.67 ± 42.16*	954.83 ± 100.65*	214.24 ± 11.48*
MA-Low 组	12	35.18 ± 4.84 [#]	0.521 ± 0.036 ^{#Δ}	403.11 ± 35.28 ^{#Δ}	1153.27 ± 153.18 ^{#Δ}	176.48 ± 8.18 ^{#Δ}
MA-High 组	12	28.52 ± 3.72 [#]	0.362 ± 0.029 [#]	324.63 ± 26.19 [#]	1371.12 ± 166.93 [#]	85.26 ± 4.26 [#]

注: *表示与 Sham 组比较, $P < 0.05$; #表示与 I/R 组比较, $P < 0.05$; Δ表示与 MA-High 组比较, $P < 0.05$; -表示无数值

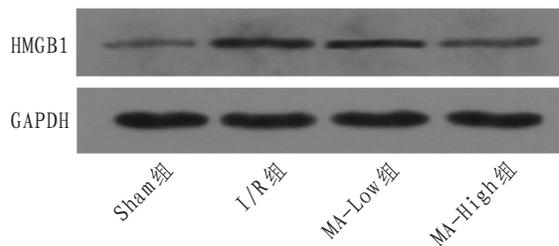
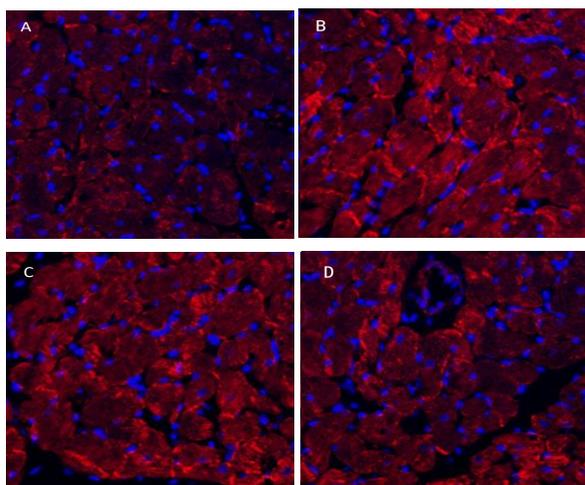


图 1 各组大鼠 HMGB1 表达 WB 条带图



注: A 为 Sham 组; B 为 I/R 组; C 为 MA-Low 组; D 为 MA-High 组
图 2 各组大鼠心肌组织中 IL-6 的表达免疫荧光图

3 讨论

CHD 再灌注治疗可以及时缩小了心肌梗死面积, 却仍留有约 30% 的心肌梗死面积未被“解救”, 同时越来越多的研究证实这 30% 的心肌梗死面积主要是由再灌注损伤所导致的^[7]。因此, 在再灌注治疗获益的基础上, 积极寻找减轻心肌 I/R 的治疗策略, 将会给 CHD 患者带来临床获益。

大量实验研究证实, IL-1 β 、IL-6 等炎症因子在心肌 I/R 的发生发展过程中起到重要作用^[8]。HMGB1 被证明为一种含量丰富的非组蛋白核蛋白, 因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率快的特性而得名, HMGB1 在胞内可促进基因转录, 稳定核小体、促进 DNA 重组、复制和折叠, 调控转录过程^[9]。当 HMGB1 释放到细胞外成为机体的一种“危险信号”, 即可在许多严重炎症性疾病中扮演至关重要的角色, 比如败血症、急性肺损伤、风湿性关节炎等^[10-12]。近年来研究发现 HMGB1 在心肌梗死及心肌缺血再灌注损伤等心血管疾病的发生和发展过程中同样起着重要的作用^[13-14]。研究发现, 稳定型心绞痛和不稳定型心绞痛患者血清 HMGB1 表达明显增高, 并且与冠状动脉狭窄程度成正相关。ZHANG 等^[15]证实, 缺血再灌注大鼠心肌 HMGB1

的表达与 IL-1 β 和 IL-6 的表达呈显著正相关,进一步表明 HMGB1 可能与其他促炎因子之间存在相互促进释放的关系。此外,研究证实 IL-6 能够刺激巨噬细胞释放 HMGB1 并呈时间和剂量依赖性,表明两者可以形成正反馈,共同促进炎症发展^[16]。以上研究结果提示 HMGB1 与其他促炎因子之间存在着一种相互促进释放的正反馈效应,可能在疾病的发生和发展过程中起着关键作用。研究表明,GSH-Px 可作为一种内源性氧自由基清除剂,具有清除氧自由基的能力^[17]。ZHAO 等^[4] 研究提示,在心肌 I/R 中,增强 GSH-Px 的表达及活性,可对缺血再灌注心肌起到明显的保护作用。

随着中医药研究的不断进展,发现在传统治疗的基础上结合中药预处理可进一步减轻心肌 I/R 损伤^[17-18]。MA 作为一种五环三萜酸,存在于山楂、红枣、枇杷叶和油橄榄等多种天然植物中,其在改善缺血性损伤、抗炎及抗氧化方面显示出良好的药理活性,具有很高的开发潜质^[19]。在本研究中,通过建立大鼠心肌 I/R 模型,观察了 MA 预处理对大鼠缺血再灌注心肌 HMGB1、IL-1 β 、IL-6 的表达及血清 GSH-Px 活性的影响。结果表明,MA 可以逆转缺血再灌注心肌细胞中 HMGB1、IL-1 β 及 IL-6 蛋白的高表达,增强 GSH-Px 活性,从而减小心肌梗死面积。表明人参皂苷 Rh2 减轻心肌 I/R 的机制可能与降低心肌 HMGB1 蛋白的高表达,减少炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 的分泌水平并增强 GSH-Px 活性相关。本实验初步探讨了 MA 对缺血再灌注心肌的保护作用,为 I/R 的中药治疗和 MA 在临床上的进一步应用奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9):833-854.
- [2] GUNATA M, PARLAKPINAR H. A review of myocardial ischemia/reperfusion injury: Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment[J]. Cell Biochem Funct, 2021, 39(2): 190-217.
- [3] DONG L Y, CHEN F, XU M, et al. Quercetin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via down-regulation of the HMGB1-TLR4-NF- κ B signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(5):1273-1283.
- [4] ZHAO Y, Zhang X, Luan J, et al. Shenxian-Shengmai oral liquid reduces myocardial oxidative stress and protects myocardium from ischemia-reperfusion injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 48(6):2503-2516.
- [5] 邹勇, 赵小奎, 孙玉梅, 等. 山楂酸减少高糖介导的心肌细胞损伤和凋亡及其机制[J]. 心脏杂志, 2017, 29(3):276-280.
- [6] 郭振, 樊迪, 刘方圆, 等. 山楂酸对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌纤维化的影响[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(23): 1820-1825.
- [7] 杨简, 杨俊, 丁家望, 等. 大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型的改良及实验观察[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(10):961-963.
- [8] GUO X, HU S, LIU J J, et al. Piperine protects against pyroptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the miR-383/RP105/AKT signaling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(1):244-258.
- [9] XUE J, SUAREZ J S, MINAAI M, et al. HMGB1 as a therapeutic target in disease[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(5):3406-3419.
- [10] DENG M, SCOTT M J, FAN J, et al. Location is the key to function: HMGB1 in sepsis and trauma-induced inflammation[J]. J Leukoc Biol, 2019, 106(1):161-169.
- [11] QU L, CHEN C, CHEN Y, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1) and autophagy in acute lung injury (ALI): a review[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:1828-1837.
- [12] DEMORUELLE M K, DEANE K D. Treatment strategies in early rheumatoid arthritis and prevention of rheumatoid arthritis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2012, 14(5): 472-480.
- [13] LIU F Y, FAN D, YANG Z, et al. TLR9 is essential for HMGB1-mediated post-myocardial infarction tissue repair through affecting apoptosis, cardiac healing, and angiogenesis[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7):480.
- [14] LI Y M, SUN J G, HU L H, et al. Propofol-mediated cardioprotection dependent of microRNA-451/HMGB1 against myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12):23289-23301.
- [15] ZHANG J J, PENG K, ZHANG J, et al. Dexmedetomidine preconditioning may attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury by down-regulating the HMGB1-TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathway[J]. PLoS One, 2017, 12(2):172006.
- [16] CHEN J, JIANG Z, ZHOU X, et al. Dexmedetomidine preconditioning protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced necroptosis by inhibiting HMGB1-mediated inflammation [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2019, 33(1):45-54.
- [17] HU H, ZHAI C, QIAN G, et al. Protective effects of tanshinone IIA on myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress, HMGB1 expression, and inflammatory reaction[J]. Pharm Biol, 2015, 53(12):1752-1758.
- [18] RANI N, ARYA D S. Chrysin rescues rat myocardium from ischemia-reperfusion injury via PPAR- γ /Nrf2 activation[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 883:173389.
- [19] 刘竞天, 李运曼, 龚晓健, 等. 山楂酸对体外乳大鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(9):743-747.

收稿日期: 2024-04-11

*基金项目: 湖北省技术创新专项(2016ACA153)。

作者简介: 张倩(1983—), 女, 主治医师。研究方向: 肿瘤心脏病学。

△通讯作者: 王勇(1982—), 男, 硕士学位, 副主任医师。研究方向: 肿瘤心脏病学。E-mail: wangyonges0425@163.com。