川陈皮素通过 Rnd3 调控核因子 κB 信号在心肌梗死中的作用机制研究Δ

余继全*,阮　鹏,葛建军#(中国科学技术大学附属第一医院心脏大血管外科,合肥　230001)

中图分类号　R932　　文献标志码　A　　文章编号　1672-2124(2022)03-0332-07
DOI　10.14009/j.issn.1672-2124.2022.03.018

摘　要　目的:探讨川陈皮素通过 Rnd3 抑制核因子 κB(NF-κB)信号调控心肌梗死的作用和相关机制。方法:(1)取普通正常小鼠 40 只,均分为假手术组、心肌梗死手术组、川陈皮素灌胃组和川陈皮素灌胃+心肌梗死手术组,应用心脏超声检测四组小鼠心功能变化,应用蛋白质印迹法检测四组小鼠心脏组织中 Rnd3 和 Cleaved-caspase3 的表达变化。(2)在新生大鼠心肌细胞水平进行 Rnd3 和 NF-κB P65 的蛋白免疫共沉淀和染色质免疫共沉淀实验,检测 Rnd3 和 P65 的结合情况。在新生大鼠心肌细胞中转染 Sh-Rnd3 和 OE-Rnd3 慢病毒,以蛋白质印迹法检测 NF-κB P65 的表达变化。(3)取心肌梗死小鼠 40 只,均分为造模组、造模+川陈皮素组、造模+NF-κB 激动剂组和造模+川陈皮素+NF-κB 激动剂组,应用心脏超声检测四组小鼠心功能变化,应用 Tunel 染色检测四组小鼠心脏组织中凋亡细胞的表达变化;以蛋白质印迹法检测四组小鼠心脏组织中 Cleaved-caspase3 的表达变化。结果:(1)心脏超声和蛋白质印迹法实验结果显示,与假手术组相比,心肌梗死手术组小鼠心脏射血分数和短轴缩短率明显降低,心脏组织中 Rnd3 和 Cleaved-caspase3 的含量显著升高;与心肌梗死手术组相比,川陈皮素灌胃+心肌梗死手术组小鼠心脏射血分数和短轴缩短率明显升高,心脏组织中 Rnd3 和 Cleaved-caspase3 的含量显著降低,上述差异均有统计学意义($P<0.05$)。(2)蛋白免疫共沉淀和染色质免疫共沉淀实验结果显示,Rnd3 可以与 NF-κB P65 结合调控新生大鼠心肌细胞的凋亡。抑制 Rnd3 表达时,NF-κB P65 表达升高;过表达 Rnd3 时,NF-κB P65 表达降低。(3)与造模组相比,造模+川陈皮素组、造模+NF-κB 激动剂组和造模+川陈皮素+NF-κB 激动剂组小鼠心脏射血分数和短轴缩短率升高,Cleaved-caspase3 表达降低,细胞凋亡减少,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:川陈皮素可通过抑制 Rnd3 的表达进而激活 NF-κB 信号通路,减少急性心肌梗死导致的心肌细胞凋亡。

关键词　川陈皮素; Rnd3; 核因子 κB; 心肌梗死

Mechanism of Nobiletin in Myocardial Infarction Based on Regulation of Nuclear Factor κB Signal by Rnd3Δ

YU Jiquan, RUAN Peng, GE Jianjun (Dept. of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To investigate the effect and related mechanism of nobiletin in myocardial infarction based on regulation of nuclear factor-κB (NF-κB) signal by Rnd3. METHODS: (1) Totally 40 normal mice were selected and divided into four groups: sham surgery group, myocardial infarction (MI) surgery group, nobiletin gavage group and nobiletin gavage +MI surgery group, changes of cardiac function were detected by cardiac ultrasound, changes of expression of Rnd3 and Cleaved-caspase3 in heart tissues of the four groups of mice were detected by Western blotting. (2) Protein immunoprecipitation and chromatin immunoprecipitation assays of Rnd3 and NF-κB P65 were performed at the level of neonatal rat cardiomyocytes to detect the binding of Rnd3 and P65. Sh-Rnd3 and OE-Rnd3 lentiviruses were transfected in neonatal rat cardiomyocytes, and changes of NF-κB P65 were detected by Western blotting. (3) Forty mice with myocardial infarction were divided into the model group, model+nobiletin group, model+NF-κB agonist group and model+nobiletin+NF-κB agonist group, changes of cardiac function in four groups were detected by cardiac ultrasound, and changes of apoptotic cell expression in heart tissues of four groups were detected by Tunel staining; changes of expression of Cleaved-caspase3 in heart tissues of four groups were detected by Western blotting. RESULTS: (1) Results of cardiac ultrasound and Western blotting test showed that the cardiac ejection fraction and short-axis shortening fraction in MI surgery group were significantly lower than those in sham surgery group, the contents of Rnd3 and Cleaved-caspase3 in heart tissues in MI surgery group were significantly higher than those in sham surgery group; compared with the MI surgery group, the cardiac ejection fraction and short-axis shortening fraction were significantly higher in the nobiletin gavage+MI surgery group, the contents of Rnd3 and Cleaved-caspase3 in heat tissues were significantly lower in the nobiletin gavage+MI surgery group, with statistically

Δ 基金项目:安徽省科技重大专项项目(No. 18030801132)
* 住院医师。研究方向:冠心病、瓣膜病及先天性心脏病等相关疾病的研究。E-mail:yjqyjq1111@Gmail.com
# 通信作者:主任医师,教授,博士生导师。研究方向:冠心病、瓣膜病及先天性心脏病等相关疾病的研究。E-mail:zkdgjj@ustc.edu.cn

significant differences ($P<0.05$). (2) Results of protein immunoprecipitation and chromatin immunoprecipitation assays showed that Rnd3 combined with NF-κB P65 could regulate the apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. When Rnd3 expression was inhibited, the expression of NF-κB P65 increased; when Rnd3 was overexpressed, the expression of NF-κB P65 decreased. (3) Compared with the model group, the cardiac ejection fraction and short-axis shortening fraction increased, Cleaved-caspase3 expression and cell apoptosis decreased in the model + nobiletin group, the model+NF-κB agonist group and the model + nobiletin + NF-κB agonist group, with statistically significant differences ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Nobiletin can reduce myocardial apoptosis induced by acute myocardial infarction by inhibiting Rnd3 expression and activating NF-κB signaling pathway.

KEYWORDS Nobiletin; Rnd3; Nuclear factor-κB; Myocardial infarction

心肌梗死指心肌的缺血性坏死,是在冠状动脉病变的基础上,冠状动脉的血流急剧减少或中断,冠状动脉阻塞导致血管覆盖区域缺血坏死,最终导致多达 10 亿心肌细胞的死亡[1]。因为凋亡信号与梗死心脏的修复和重构有关,因此,靶向凋亡信号有可能通过减弱梗死心脏的扩张性重构而发挥有益的作用[2]。此外,研究结果表明,凋亡信号在细胞保护和再生中发挥着巨大作用,再次激发了人们对该领域的兴趣[3]。川陈皮素是一种碳水化合物,是新陈代谢的硫化促进剂,具备一定的抗红细胞凝结的功效,因此,在抗血栓产生层面,其在防癌和抑菌方面具备抗敏和抗炎的作用,常被用于治疗癫痫病和过敏等病症[4]。有研究结果发现,川陈皮素在防止心血管疾病层面也有一定的作用,如其对心肌缺血再灌注损伤具有治疗作用[5]。Rnd3 最初被定义为 Rho 蛋白激酶 1 的抑制因子[6]。此前对 Rnd3 的研究主要集中于 Rho 激酶介导的生物学功能的抑制作用,包括肌球蛋白轻链磷酸化、肌动蛋白细胞骨架形成和凋亡等[7]。Rnd3 与室管膜细胞增殖相关[8]。然而,其在心肌梗死凋亡中的作用尚不清楚。核因子 κB (NF-κB) P65 复合物在发育和成熟的神经系统中广泛表达,并且激活细胞增殖相关基因的表达,保护细胞免受凋亡[9]。虽然 NF-κB 参与了神经元凋亡率的降低,但其在心肌梗死中的潜在分子机制和功能尚不清楚。由于 Rnd3 和 NF-κB 都与细胞凋亡过程息息相关,探索两者在心肌细胞凋亡过程中的作用对于心肌梗死的治疗具有重要指导意义。

1 材料

1.1 实验动物

8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体重约为 25 g;8 周龄雌性妊娠 SD 大鼠,体重约为 280 g。购于中国科学院上海实验动物繁殖中心,饲养于 SPF 级动物房中,饲养期间给予常规饮水、喂食。本研究通过我院动物伦理委员会审批。

1.2 仪器

311 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司);HH-2 型数显恒温水浴锅(江苏杰瑞尔电器有限公司);CJV1500-Y 标准型洁净工作台(山东新华医疗器械股份有限公司);Universal 320/320R 型低温离心机(美国 Sigma 公司);SX-300 型高压蒸汽灭菌锅(日本 Tomy Digital Biology 公司);小型垂直电泳转印系统(美国 Bio-rad 公司);Sigma Vet 小鼠心脏超声系统(上海玉研科学仪器有限公司);Axio Vert. A1 倒置光学显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.3 药品与试剂

川陈皮素(西安展迅生物科技有限公司);Protein A 琼脂糖珠(美国 Sigma 公司);Rnd3 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);Caspase3 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);GAPDH 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);P65 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);免疫球蛋白 G(IgG)抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(美国 Jackson 公司);NF-κB 激动剂(美国 Selleck 公司);抑制 Rnd3 慢病毒(Sh-Rnd3)和过表达 Rnd3 慢病毒(OE-Rnd3)及对照[汉恒生物科技(上海)有限公司];Sh-Rnd3 AAV9 病毒及对照[汉恒生物科技(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 小鼠心肌梗死模型

根据参考文献[1]对小鼠进行心肌梗死造模。以 3%戊巴比妥钠 80 mg/kg 腹腔注射麻醉,用小鼠剃毛器剃除小鼠胸部及腋下毛发(充分暴露手术区),以碘酒和 75%乙醇进行手术区消毒。麻醉后,打开外置光源、显微镜开关,打开呼吸机,设置好各参数(呼吸频率为 110 次/min),将气管插管沿声门插入气管,取下小鼠接上呼吸机。小鼠采用右侧卧位,用眼科剪在左前肢腋下,用显微剪于三、四肋间打开胸腔充分暴露心脏,用显微直镊轻轻夹起少量心包并于左心耳下撕开少许心包,充分暴露左冠状动脉前降支或所在区域。于显微镜下找到左冠状动脉前降支走向或可能所在位置,持针器持取 7-0 带针缝合线,于左心耳下缘 2 mm 处进针,缝线穿过左冠状动脉前降支,以完全阻断左冠状动脉前降支血流。结扎完成后,以 6-0 缝线完全缝合胸腔开口,关闭胸腔,由内向外逐层缝合各层肌肉和皮肤。待小鼠自然苏醒后,将小鼠从呼吸机上取下并取下气管插管,正常饲养。4 周后进行心脏超声检测。

2.2 动物分组及处理

2.2.1 普通正常小鼠实验:取普通正常小鼠 40 只,随机分为四组,每组 10 只。假手术组为普通正常小鼠打开胸腔后立即缝合不进行结扎左冠状动脉前降支;心肌梗死手术组为普通正常小鼠打开胸腔后结扎左冠状动脉前降支然后进行缝合;川陈皮素灌胃组为普通正常小鼠灌胃 20 mg/kg 川陈皮素[2];川陈皮素灌胃+心肌梗死手术组为普通正常小鼠先灌胃 20 mg/kg 川陈皮素,3 周后对小鼠进行心肌梗死手术。4 周后处死上述小鼠结束实验。

2.2.2 心肌梗死小鼠实验:取模型小鼠(心肌梗死手术)40 只,并随机分为四组,每组 10 只。造模组为普通小鼠进行

心肌梗死手术；造模+川陈皮素组为模型小鼠灌胃川陈皮素 20 mg/kg；造模+NF-κB 激动剂组为模型小鼠心肌层注射 NF-κB 激动剂 100 nmol/L；造模+川陈皮素+NF-κB 激动剂组：模型小鼠灌胃 20 mg/kg 川陈皮素和心肌层注射 NF-κB 激动剂 100 nmol/L。4 周后处死以上小鼠结束实验。

2.3 小鼠心肌层注射

将小鼠放在手术台上固定好，使用 4%水合氯醛麻醉后，退去小鼠颈部和左胸口的毛发，并用 75%酒精消毒，使用手术剪在小鼠左胸口横向剪开一约 1 cm 长的开口，暴露出心脏。使用微量注射器按三点注射的方式注射 NF-κB 激动剂 100 nmol/L 进左心室室壁，对照组小鼠注射等量 PBS。注射结束后立刻缝合肌肉和皮肤，并对伤口进行消毒。待小鼠完全苏醒后将其放回鼠笼继续饲养。

2.4 大鼠心肌细胞实验

2.4.1 分离新生大鼠心肌细胞（NRCM）：取 SD 大鼠新生小鼠心脏，将残存血液挤净后放入缓冲液中，用剪刀将心脏组织剪成匀浆状，按照 1 只心脏加入胰酶和胶原酶各 500 μL 依次消化，加入等量的马血清进行终止，将得到的细胞悬液依次通过一次性过滤网筛选，去除杂质，采用差速贴壁法得到纯的心肌细胞，弃除未贴壁的成纤维细胞。按照所需细胞密度进行铺板实验。

2.4.2 蛋白免疫共沉淀：收集细胞入 1.5 mL EP 管中，4 ℃，14 000 r/min 离心 15 min 并用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，每 1 mL 总蛋白中加入 Protein A 琼脂糖珠（50%）100 μL，4 ℃摇晃 10 min，以去除非特异性杂蛋白，降低背景。4 ℃，14 000 r/min 离心 15 min，将上清转移到一个新的离心管中，去除 Protein A 珠子。Bradford 法做蛋白标准曲线，测定蛋白浓度。用 PBS 将总蛋白稀释到约 1 μg/μL。加入一定体积的兔抗到 500 μL 总蛋白中，4 ℃缓慢摇动抗原抗体混合物过夜。加入 Protein A 琼脂糖珠 100 μL 来捕捉抗原抗体复合物，4 ℃缓慢摇动抗原抗体混合物过夜。14 000 r/min 瞬时离心 5 s，收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，去上清液，用预冷的 RIPA buffer 洗 3 遍，每遍 800 μL。用 60 μL 2×上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起，轻轻混匀，上样前样品煮 5 min 后进行蛋白质印迹法实验。

2.4.3 细胞转染慢病毒：慢病毒转染前 24 h，将贴壁细胞以 1×10^5/孔铺到 24 孔板中。使细胞在慢病毒转染时的数量为 2×10^5/孔左右。第 2 日，用含有 6 μg/mL polybrene 的新鲜培养基 2 mL 替换原培养基，加入适量病毒悬液。37 ℃孵育。4 h 后加入新鲜培养基 2 mL 以稀释 polybrene，继续培养 72 h，72 h 后结束实验。

2.4.4 染色质免疫共沉淀：首先使用 3%的甲醛交联细胞 10 min，然后加入 Glycine 1.5 mmol/L 终止交联反应。依次使用细胞裂解液和核裂解液各 1 mL 裂解细胞膜和细胞核，使用 200 Hz 的超声将细胞核中的 DNA 片段剪切到 250 bp 左右。将超声后的 DNA 片段离心后取上清液，与 5 μg 抗体孵育过夜，对应种属的 IgG 作为阴性对照。提取 DNA 进行荧光定量 PCR 检测。

2.5 蛋白质印迹法实验

配制 10%的 SDS-PAGE 浓缩胶和分离胶。加入 1 mL 蛋白裂解液入含有组织块的 EP 管中以裂解组织提取蛋白，采用 BCA 法测定定量蛋白浓度，浓缩胶中每孔加入蛋白样品 20 ng/μL，浓缩胶用 80 V 电压进行电泳，待样品进入分离胶后，改用 120 V 进行电泳。跑胶完成以后，将胶上无样品的多余部分切除，润湿滤纸和海绵，提前 10 min 用转膜 Buffer 润洗 PVDF 膜。分离的多肽转移至 PVDF 膜上，转膜结束后用 5%的脱脂牛奶室温（25 ℃）封闭 2 h。一抗孵育过夜，Caspase3（1∶1 000），Rnd3（1∶1 000），GAPDH（1∶1 000）。次日，用 TBST 洗膜 3 次，1 次 10 min。室温下用二抗孵育 2 h。用 TBST 洗膜 3 次，1 次 10 min。用 ECL 显影液进行显影曝光。

2.6 Tunel 染色

将冰冻切片从-80 ℃冰箱中取出并在室温复温 5 min，用 PBS 轻柔漂洗 3 次，1 次 5 min。用 4%多聚甲醛室温固定 15 min，用 Proteinase K 工作液在 37 ℃中处理组织 15 min，用 PBS 轻柔漂洗 3 次，1 次 5 min，每块组织覆盖 50 μL TdT+450 μL 荧光素标记的 dUTP 混合液，于 37 ℃湿暗盒中反应 30 min，用 PBS 轻柔漂洗 3 次，1 次 5 min。用 DAPI 避光处理 15 min，用 PBS 轻柔漂洗 3 次，1 次 5 min。使用荧光显微镜进行拍摄统计。

2.7 统计学方法

所有数据采用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 t 检验，四组间差异使用单因素方差分析；显著性检验水准 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

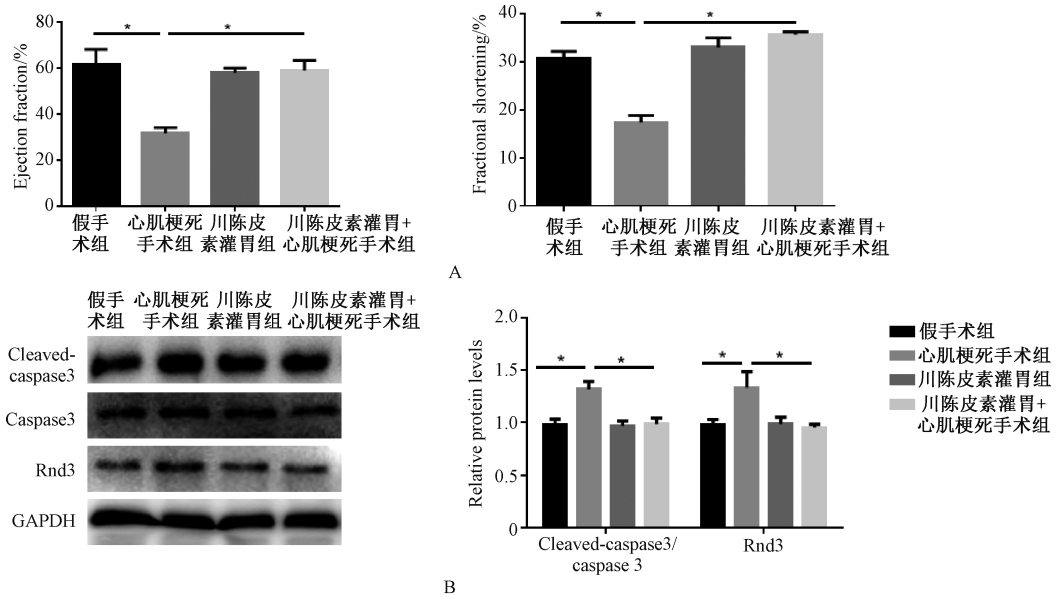
3 结果

3.1 川陈皮素抑制心肌梗死小鼠心脏组织中 Rnd3 和凋亡蛋白的表达

心脏超声结果显示，与假手术组相比，心肌梗死手术组小鼠心脏射血分数和短轴缩短率明显降低；与心肌梗死手术组相比，川陈皮素灌胃+心肌梗死手术组小鼠心脏射血分数和短轴缩短率明显升高，上述差异均有统计学意义（$P<0.05$），见图 1（A）。蛋白质印迹法实验结果显示，与假手术组相比，心肌梗死手术组小鼠心脏组织中 Rnd3 和 Cleaved-caspase3 的含量显著升高；与心肌梗死手术组相比，川陈皮素灌胃+心肌梗死手术组小鼠心脏组织中 Rnd3 和 Cleaved-caspase3 的含量显著降低，上述差异均有统计学意义（$P<0.05$），见图 1（B）。

3.2 Rnd3 通过结合 NF-κB P65 调控心肌梗死

应用蛋白免疫共沉淀实验检测 Rnd3 和 P65 的结合情况，结果显示，与 IgG 组相比，Rnd3 蛋白和 P65 蛋白存在结合，见图 2（A）；应用染色质免疫共沉淀实验检测 Rnd3 和 P65 的结合情况，结果显示，与 IgG 组相比，Rnd3 mRNA 和 P65 mRNA 存在结合，见图 2（B）；应用蛋白质印迹法实验检测 NRCM 细胞中转染 Sh-Rnd3，P65 蛋白表达升高，见图 2（C）；应用蛋白质印迹法实验检测 NRCM 细胞中转染 OE-Rnd3，P65 蛋白表达降低，见图 2（D）。

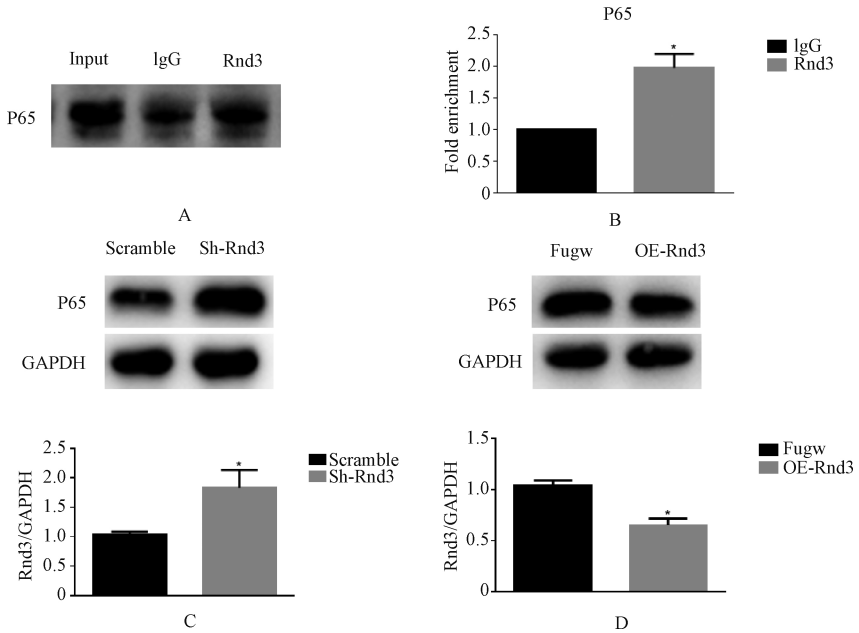


A. 川陈皮素对小鼠心脏射血分数和短轴缩短率的影响;B. 川陈皮素对小鼠心脏组织凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 和 Rnd3 表达的影响;“*”表示 $P<0.05$

A. effect of nobiletin on cardiac ejection fraction and short-axis shortening fraction in mice; B. effect of nobiletin on expression of apoptosis proteins Cleaved-caspase3 and Rnd3 in heart tissues in mice; “*” indicates $P<0.05$

图 1　小鼠心脏超声和蛋白质印迹法实验结果

Fig 1　Results of cardiac ultrasound and Western blotting test on mice



A. Rnd3 与 NF-κB P65 蛋白的结合情况;B. Rnd3 与 P65 mRNA 的启动子区域的结合情况;C. 转染 Sh-Rnd3,P65 蛋白表达情况;D. 转染 OE-Rnd3,P65 蛋白表达情况;“*”表示 $P<0.05$

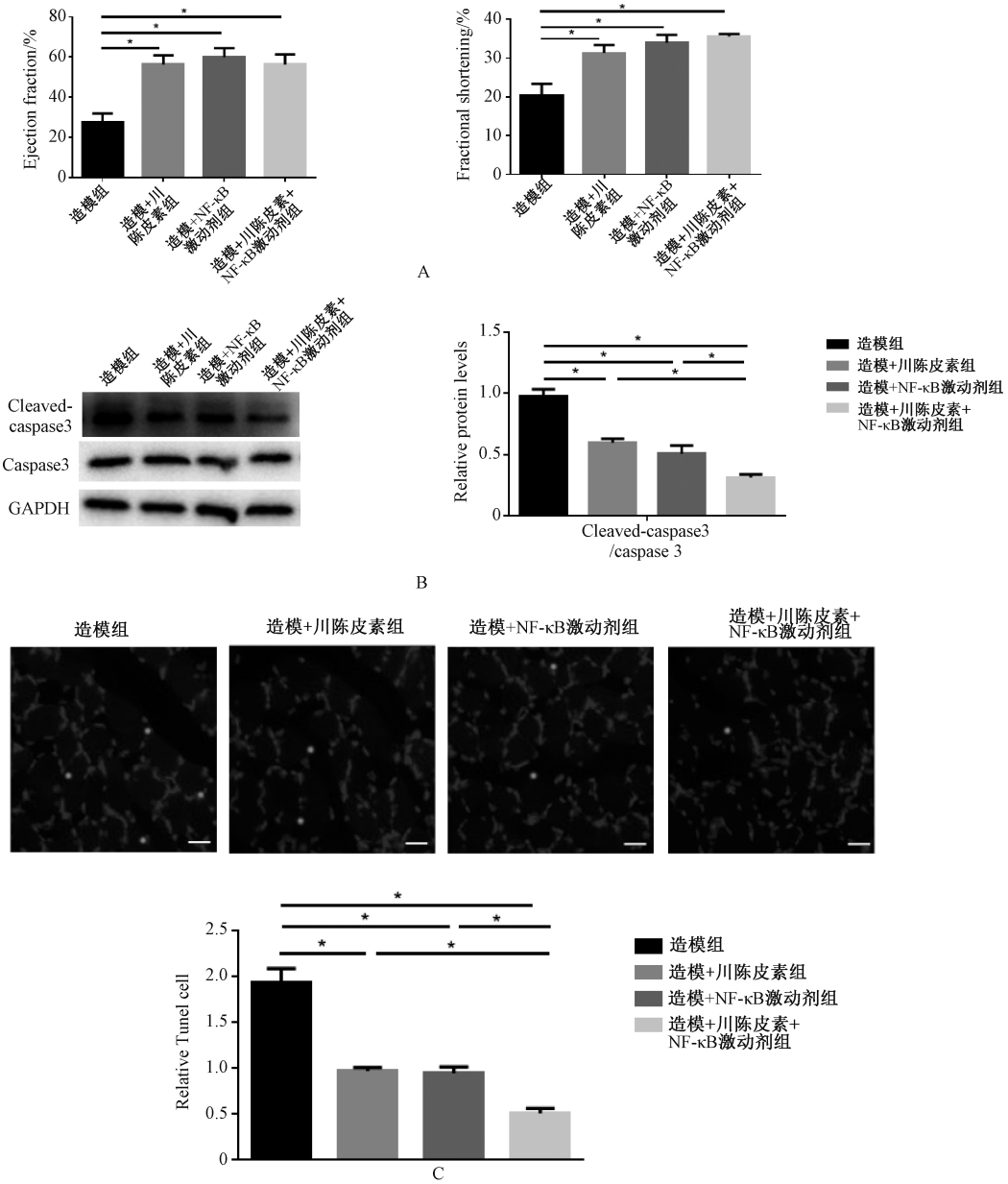
A. binding of Rnd3 to NF-κB P65 protein; B. binding of Rnd3 to P65 mRNA promoter region; C. transfection of Sh-Rnd3, expression of P65 protein; D. transfection of OE-Rnd3, expression of P65 protein; “*” indicates $P<0.05$

图 2　NRCM 细胞蛋白免疫共沉淀实验、染色质免疫共沉淀实验和细胞转染慢病毒实验结果

Fig 2　Results of protein immunoprecipitation assay, chromatin immunoprecipitation assays and cell transfection with lentivirus of NRCM

3.3　川陈皮素激活 NF-κB 信号通路保护心肌梗死导致的细胞凋亡

心脏超声结果显示,与造模组相比,造模+川陈皮素组、造模+NF-κB 激动剂组和造模+川陈皮素+NF-κB 激动剂组小鼠心脏射血分数和短轴缩短率升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),但川陈皮素、NF-κB 激动剂同时给药不存在叠



A. 川陈皮素、NF-κB 激动剂对心肌梗死小鼠心脏射血分数和短轴缩短率的影响；B. 川陈皮素、NF-κB 激动剂对心肌梗死小鼠心脏组织中凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 表达的影响；C. 川陈皮素、NF-κB 激动剂对心肌梗死小鼠心脏组织中细胞凋亡的影响；“*”表示 $P<0.05$；比例尺：100 μm

A. effect of nobiletin and NF-κB on cardiac ejection fraction and short-axis shortening fraction in mice with myocardial infarction; B. effect of nobiletin and NF-κB on expression of apoptosis proteins Cleaved-caspase3 in heart tissues in mice with myocardial infarction; C. effect of nobiletin and NF-κB agonist on cell apoptosis in heart tissues in mice with myocardial infarction; “*” indicates $P<0.05$; scale: 100 μm

图 3　心肌梗死小鼠心脏超声、蛋白质印迹法实验和 Tunel 染色实验结果

Fig 3　Results of cardiac ultrasound, Western blotting test and Tunel staining test in mice with myocardial infarction

加效应，见图 3(A)。蛋白质印迹法实验结果显示，与造模组相比，造模+川陈皮素组、造模+NF-κB 激动剂组和造模+川陈皮素+NF-κB 激动剂组小鼠 Cleaved-caspase3 表达降低，差异均有统计学意义($P<0.05$)，川陈皮素、NF-κB 激动剂同时给药存在叠加效应，见图 3(B)。Tunel 染色实验结果显示，与造模组相比，造模+川陈皮素组、造模+NF-κB 激动剂组和造模+川陈皮素+NF-κB 激动剂组小鼠细胞凋亡减少，差异均有统计学意义($P<0.05$)，两者同时给药存在叠加效应，见图 3(C)。

4　讨论

心肌梗死指在冠状动脉病变的基础上，如发生冠状动脉粥样硬化，脂性斑块发生脱落，进而堵塞相应部分的冠状动脉，发生冠状动脉供血急剧减少或者中断，进而使冠状动脉供应部位的心肌发生急性和持久性的缺血，进一步会导致心肌坏死[10]。心肌梗死往往会表现为持久的胸骨后剧烈疼痛、发热、白细胞计数升高以及血清标志物水平升高，尤其是心肌坏死标志物的增加[11]。心肌梗死还可诱发一系列心律失常和休克等[12]。近年来，随着心肌梗死患病人数的急剧增长，越来越多的研究

聚焦于心肌梗死的防治手段。目前,临床上常采用抗炎、降脂、镇痛的药物和再灌注进行治疗,但适用性和治疗效果有一定局限性[13]。此外,缺血再灌注治疗会使遭受一定时间缺血的组织细胞恢复血流后引起组织损伤程度迅速加剧的现象,对患者造成二次损伤[14]。

心肌细胞凋亡是心肌梗死发生发展过程中心肌收缩单元持续丧失的主要原因,与心功能进行性降低有关,参与心肌梗死的基本病理生理过程[15]。抑制心肌缺血后心肌细胞凋亡,增加心肌细胞存活数量,有利于预防和治疗心肌缺血,还可促进心功能恢复,有利于患者的长期预后。因此,抑制心肌细胞凋亡对减少心脏重构、改善心功能具有重要的临床意义。

心肌梗死过程涉及多条信号通路的调控,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-蛋白激酶 B(Akt)信号转导通路是防止心肌缺血再灌注损伤的重要通路,缺血性预处理或活性药物刺激可以激活 PI3K/AKT 信号通路,该信号通路的激活参与调控心肌细胞增殖和凋亡,且可促进心肌梗死后的血管生成,保护心脏[16-17]。NF-κB 是生物体内一种重要的转录因子,抑制 NF-κB 可以减轻炎症反应,激活 NF-κB 可促进血管形成和迁移,且 NF-κB 的表达水平可作为预测急性心肌梗死患者病情严重程度和预后的重要指标[18-19]。

川陈皮素作为抗血栓药,在疏通血管、抑制血小板聚集方面可发挥重要作用[20]。另有文献报道,Rnd3 可通过 RhoA-ROCK1 和 ERK1/2 信号通路抑制细胞增殖和迁移、促进细胞凋亡[21]。本研究结果发现,在心肌梗死小鼠心脏组织中凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3 表达明显升高,表明心肌梗死过程中确实凋亡作用增强;且心肌细胞中 Rnd3 表达升高,但在灌胃川陈皮素治疗后,凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3 和 Rnd3 表达显著降低;同时,Tunel 染色发现,凋亡细胞数目也减少,进一步证实川陈皮素可以通过下调 Rnd3 水平抑制心肌梗死导致的心肌细胞凋亡,其对心肌梗死具有保护作用。

抑制 Rnd3/NF-κB 通路可减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤。Rnd3 为 Ras 超家族的重要成员,为 NF-κB 通路相关的负调控因子,Rnd3 蛋白可下调 p65 蛋白表达,降低 TNF-α 和 IL-6 水平,从而减轻肝脏缺血/再灌注损伤[22]。本研究结果显示,Rnd3 通过与 NF-κB P65 结合抑制心肌梗死细胞凋亡,对急性心肌梗死有保护作用。

综上所述,川陈皮素/Rnd3/NF-κB P65 通路可能为心肌梗死的机制提供新的认识。

参考文献

[1] NANDKEOLYAR S, CONTRACTOR T, BHARDWAJ R, et al. A multidisciplinary approach to electrical instability and cardiogenic shock in acute myocardial infarction[J]. JACC Case Rep, 2020, 2(13): 2053-2059.

[2] YANG J H, HUANG X W, HU F D, et al. LncRNA ANRIL knockdown relieves myocardial cell apoptosis in acute myocardial infarction by regulating IL-33/ST2[J]. Cell Cycle, 2019, 18(23): 3393-3403.

[3] LIAO Y, CHEN K H, DONG X M, et al. Berberine inhibits cardiac remodeling of heart failure after myocardial infarction by reducing myocardial cell apoptosis in rats[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 2499-2505.

[4] MILEYKOVSKAYA E, YOO S H, DOWHAN W, et al. Nobiletin: targeting the circadian network to promote bioenergetics and healthy aging[J]. Biochemistry (Mosc), 2020, 85(12): 1554-1559.

[5] OYAMA Y, BARTMAN C M, GILE J, et al. The circadian PER2 enhancer nobiletin reverses the deleterious effects of midazolam in myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(28): 3376-3383.

[6] HU J, SUN X M, SU J Y, et al. Different phosphorylation and farnesylation patterns tune Rnd3-14-3-3 interaction in distinct mechanisms[J]. Chem Sci, 2021, 12(12): 4432-4442.

[7] DONG H M, SUN Q, ZHANG Y, et al. Genetic deletion of Rnd3 suppresses apoptosis through NF-κB signaling in the brain[J]. Oncol Rep, 2021, 45(2): 595-605.

[8] CHEN X, HU J G, HUANG Y Z, et al. Copper promotes the migration of bone marrow mesenchymal stem cells via Rnd3-dependent cytoskeleton remodeling[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(1): 221-231.

[9] JIN F R, LI X, LEE H J, et al. Diclofenac inhibits phorbol ester-induced gene expression and production of MUC5AC mucin via affecting degradation of IkBα and translocation of NF-κB p65 in NCI-H292 cells[J]. Biomol Ther (Seoul), 2020, 28(5): 431-436.

[10] BADLANI J T, POORNIMA I G, THOSANI A, et al. Cardiac sarcoidosis causing ventricular tachycardia after myocardial infar-ction: a shocking diagnosis[J]. JACC Case Rep, 2020, 2(7): 1056-1061.

[11] CAI X J, TAN T N, CHAI S C, et al. "Catch me if you can": recurrent ST-segment elevation myocardial infarction due to aortic thrombus[J]. JACC Case Rep, 2020, 2(12): 1974-1978.

[12] GHORBANI M J, RAZMI N, TABEI S M B, et al. A substitution mutation in LRP8 gene is significantly associated with susceptibility to familial myocardial infarction[J]. ARYA Atheroscler, 2020, 16(6): 301-305.

[13] PAN Q, XU J, WEN C J, et al. Nanoparticles: Promising tools for the treatment and prevention of myocardial infarction[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 6719-6747.

[14] NERI M, RIEZZO I, PASCALE N, et al. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. Mediators Inflamm[J]. Mediators Inflamm, 2017: 7018393.

[15] XIAO S H, WANG Y, CAO X C, et al. Long non-coding RNA LUCAT1 inhibits myocardial oxidative stress and apoptosis after myocardial infarction via targeting microRNA-181a-5p[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4546-4555.

[16] WEI L, ZHOU Q, TIAN H, et al. Integrin beta3 promotes cardiomyocyte proliferation and attenuates hypoxia-induced apoptosis via regulating the PTEN/Akt/mTOR and ERK1/2 pathways[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(4):644-654.

[17] CHENG S, ZHANG X, FENG Q, et al. Astragaloside IV exerts angiogenesis and cardioprotection after myocardial infarction via regulating PTEN/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Life Sci, 2019, 227:82-93.

[18] MARACLE C X, AGCA R, HELDER B, et al. Noncanonical NF-κB signaling in microvessels of atherosclerotic lesions is associated with inflammation, atheromatous plaque morphology and myocardial infarction[J]. Atherosclerosis, 2018, 270:33-41.

(下转第 341 页)