

3S,3'S 构型虾青素改善小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用研究

胡文力, 曲雪峰, 楼敏涵, 翟兵中, 陈建国, 梅 松, 吴 洁, 王 茵*

(杭州医学院 食品科学与工程学院, 杭州 310013)

摘 要: 目的 探讨 3S,3'S 构型虾青素(3S,3'S-astaxanthin, 3S,3'S-AST)对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法** 取 SPF 级 ICR 雄性小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为假手术组(Sham)、心肌缺血再灌注组(reperfusion injury, I/R)、心肌缺血再灌注给予虾青素组(I/R+AST)、虾青素组(AST)。小鼠心脏经冠状动脉左前降支结扎 30 min 后, 再灌注 7 d。qRT-PCR 检测心肌重构相关因子 TGF- β 1、Col I (Collegen I) 和 Col III (Collegen III)的 mRNA 表达水平, 蛋白质印迹法(western-blot)检测心肌重构、凋亡、NKA/Src/Erk1/2/ROS 信号扩增环路相关蛋白 Col I、Col III、Bcl-2、Bax、p-Src/c-Src 和 p-Erk1/2/Erk1/2 的表达水平, 通过试剂盒检测小鼠血清中心肌损伤及氧化应激标志物乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)和肌酸激酶同工酶(creatinine kinase, CK-MB)酶活性, 通过 ELISA 试剂盒检测心肌组织中炎症因子 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的水平。**结果** 心肌缺血再灌注小鼠中, 心脏组织胶原含量和心肌细胞凋亡损伤明显增加, 发生心脏重构。而经口给予 3S,3'S-AST 能显著减低 TGF- β 1、Col I 和 Col III mRNA 水平($P < 0.05$, $P < 0.001$), 降低 Col I、Col III、Bax 蛋白表达并促进 Bcl-2 表达增高($P < 0.05$, $P < 0.001$), 抑制 Src 和 Erk1/2 活化($P < 0.05$), 减少心肌纤维化和心肌细胞凋亡。**结论** 3S,3'S-AST 通过抑制 NKA/Src/Erk1/2/ROS 扩增环路, 产生抗氧化及抗炎作用, 从而减轻细胞氧化应激损伤导致的细胞凋亡和心肌纤维化, 改善 I/R 心肌重构。

关键词: 3S,3'S 构型虾青素; 心肌缺血再灌注损伤; 心肌重构; 氧化应激; 凋亡; 炎症

Effect of 3S,3'S-astaxanthin on myocardial ischemia-reperfusion injury in mice

HU Wen-Li, QU Xue-Feng, LOU Min-Han, ZHAI Bing-Zhong, CHEN Jian-Guo,
MEI Song, WU Jie, WANG Yin*

(School of Food Science and Engineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the protective effect of 3S,3'S-astaxanthin on myocardial ischemia-reperfusion injury and its mechanism. **Methods** Forty SPF ICR male mice were randomly divided into 4 groups (10 in each group): Sham group (Sham), I/R group (I/R), I/R group with astaxanthin (I/R+AST) and

基金项目: 国家自然科学基金项目(82003445)、浙江省自然科学基金项目(LQ18H260003)、浙江省营养学医学支撑学科建设项目(16-zc03)

Fund: Supported by National Natural Science Foundation of China (82003445), Zhejiang Natural Science Foundation (LQ18H260003), and the Construction of Nutritional Medicine Supporting Discipline in Zhejiang Province (16-zc03)

*通信作者: 王茵, 研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: wy3333@163.com

*Corresponding author: WANG Yin, Professor, Hangzhou Medical College, No. 182, Tianmushan Road, Xihu District, Hangzhou 310013, China. E-mail: wy3333@163.com

astaxanthin group (AST). The mouse heart was ligated by left anterior descending coronary artery 30 min, then gave reperfusion for 7 days. The mRNA expression levels of TGF- β 1, Col I (Collegen I) and Col III (Collegen III) were detected by qRT-PCR, the levels of myocardial remodeling, apoptosis, NKA/Src/Erk1/2/ROS signal amplification loop-related proteins Col I, Col III, Bcl-2, Bax, p-Src/c-Src and p-Erk1/2/Erk1/2 were detected by western-blot, the markers of oxidative stress lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-PX) and creatinine kinase (CK-MB) were detected by corresponding kit, and the levels of inflammatory cytokines in myocardium IL-6, IL-1 β and TNF- α were detected by ELISA kit. **Results** In myocardial ischemia reperfusion mice, the collagen content and apoptosis of myocardial cells were significantly increased, and cardiac remodeling occurred. Oral administration of AST could significantly reduce the TGF- β 1, Col I, and Col III mRNA expression ($P<0.05$, $P<0.001$), reduce the Col I, Col III, and Bax proteins expression and promote Bcl-2 protein expression ($P<0.05$, $P<0.001$), inhibit Src and Erk1/2 activation ($P<0.05$), reduce myocardial fibrosis and myocardial cell apoptosis. **Conclusion** 3S,3'S-AST can inhibit the NKA/Src/Erk1/2/ROS amplification circuit, exert anti-oxidative and anti-inflammatory effects, reduce cell apoptosis and myocardial fibrosis induced by oxidative stress injury, and improve I/R myocardial remodeling.

KEY WORDS: 3S,3'S-astaxanthin; myocardial ischemia-reperfusion injury; myocardial remodeling; oxidative stress; apoptosis; inflammation

0 引言

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是动脉粥样硬化性冠心病的常见死亡原因^[1-2], 是由于心外膜冠状动脉突然闭塞, 结果导致闭塞部位远端心肌出现局部缺血, 目前主要以恢复冠状动脉血液灌注和供氧为标准治疗方法^[3-5]。然而, 虽然再灌注对于恢复心肌组织氧气和营养供应以支持细胞代谢并去除细胞代谢副产物至关重要, 但该治疗方法会造成缺血部位发生氧化应激和心室重构等继发性损伤, 即心肌缺血再灌注(myocardial ischemia-reperfusion injury, I/R)损伤^[6]。这种损伤非常复杂, 由多种机制共同作用, 主要表现为活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多、炎性反应、脂质过氧化、钙超载、心肌细胞凋亡、心肌纤维化和心肌梗大等^[7-13]。已有多项研究表明, ROS 过度积累诱发氧化应激是关键的致病因素之一^[14-15]。过量的 ROS 会导致遗传物质及相关蛋白发生损伤变性, 进而导致心肌细胞死亡^[16]。促炎转录因子, 即核转录因子(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)对氧化应激敏感, 因而在高氧应激状态下, NF- κ B 会被激活, 从而刺激炎性基因表达, 最终导致炎症反应发生, 而炎症反应升高会加剧缺血再灌注导致的心肌损伤^[17]。因此, 降低机体氧化应激反应水平, 可以有效缓解炎症反应的发生发展, 从而改善心肌损伤。细胞凋亡是一种程序性死亡, 对维持机体稳态具有重要意义, 在正常机体内也会发生, 但某些病理状况也会触发细胞凋亡, 从而导致细胞异常死亡^[18]。心脏发生氧化应激和炎症反应升高都会造成心肌细胞的损伤, 最终导致心肌细胞凋亡或死亡。而大量心肌细胞死亡会造成心脏收缩舒张功能受损, 心脏会代偿性的增大, 从而导致心肌纤维化和心肌重构。因

此, 发现具有改善氧化应激功能的生物活性物质, 或许对改善心肌缺血再灌注损伤以及心肌重构具有重要意义^[9]。

虾青素(astaxanthin, AST)是一种天然类胡萝卜素, 以其抗氧化、抗炎、抗凋亡和抗肿瘤能力而闻名。雨生红球藻是最好的天然 AST 资源, 主要含有 3S,3'S 构型 AST(3S,3'S-AST)。3S,3'S-AST 分子被认为是消除自由基的最强生物抗氧化剂^[19]。AST 具有 α -羟基酮结构, 通过捕获单线态氧并与自由基反应, 具有较强的抗氧化活性^[20]。AST 的抗氧化活性分别比维生素 E 和 β -胡萝卜素高 500 倍和 10 倍^[19,21]。近年来, 有报道称 AST 具有预防心血管疾病的作用。在异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠中, AST 治疗通过改善抗氧化酶活性降低了心脏重量、炎症细胞浸润和心肌纤维化^[22]。此外, AST 还能减弱心肌梗死(myocardial infarction, MI)诱导的心功能障碍和纤维化^[23]。然而, 3S,3'S-AST 对心肌缺血再灌注损伤的保护作用尚未被研究, 其可能的机制也尚未完全了解。

在 I/R 损伤期间, 心脏 Na/K-ATP 酶(Na⁺/K⁺ ATPase, NKA)的功能发生改变, 阐明其机制对于开发新的治疗干预方法具有重要意义^[24]。NKA 是一种跨膜酶, 负责跨细胞膜运输 Na⁺和 K⁺离子, 建立并维持跨细胞膜的离子浓度梯度^[25]。除了钠泵功能外, NKA 还被发现是一种信号转导蛋白。NKA/Src/Erk1/2 信号通路被发现作为活性氧信号的前馈放大器, 可加重动脉粥样硬化、血脂异常、肥胖和糖尿病^[26-27]。XIE 等^[28]研究表明, ROS 可以激活 NKA/Src/Erk1/2 信号通路, 进而触发 ROS 的产生。最近研究表明, NKA/Src/ROS 信号通路是保护心脏免受 I/R 损伤的潜在靶点^[29]。因此, 本研究探讨了 3S,3'S-AST 是否能通过抑制 NKA/Src/Erk1/2 信号通路的激活, 在减轻氧化应激

和炎症反应、减少细胞凋亡和心肌纤维化等方面发挥作用,从而对小鼠 I/R 损伤及其心肌重构起到保护作用,为雨生红球藻源 3S,3'S-AST 应用于保护心肌缺血再灌注损伤提供理论支持,拓宽 3S,3'S-AST 相关产品的应用市场。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型构建与饲养

实验用 ICR 小鼠由浙江省实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2019-0002, SPF 级,8 周龄,雄性,体重 25~30 g。将小鼠随机分成 4 组,每组 10 只。分组为:假手术组(Sham)、心肌缺血再灌注组(I/R)、心肌缺血再灌注给予虾青素组(I/R+AST)、虾青素组(AST),如先前文献^[30-31]所述建立心肌缺血再灌注模型。本实验项目被浙江省医学科学院实验动物福利伦理委员会审查批准,编号为 2017-043。

1.2 样品及试剂

3S,3'S-AST(SML0982, 纯度 99.9%, 美国 Sigma Aldrich 公司);蛋白定量试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);抗体 GAPDH(中国康城生物公司);Bcl-2、Col III、TGF- β 1(美国 Abcam 公司);Bax(美国 Cell Signaling 公司);Col I(美国 proteintech 公司);二抗(羊抗鼠)Alexa Fluor 700、二抗(羊抗兔)Alexa Fluor 800(美国 Sigma 公司);ELISA 试剂盒:IL-6、IL-1 β 、TNF- α (深圳欣博盛生物科技有限公司);LDH(A020-1)、MDA(A003-1)、GSH-PX(A005)、CK-MB(A032-1-1)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器设备

NU-C200R-E 低温离心机(美国 NUAIRE 公司);5119670DP 酶标仪、NanoDrop 2000 超微量核酸蛋白测定仪、A37834 MiniAmp PCR 仪、QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR 系统(美国 Thermo Fisher 公司);PowerPacTM HC 043BR71015 蛋白电泳转印系统(美国 BIO-RAD 公司);Licor Odyssey CLX-0657 双色红外激光成像系统(美国 LI-COR 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 乳酸脱氢酶测定

心肌缺血再灌注模型小鼠连续灌胃饲养 7 d 后,进行眼球取血。全血室温下静置半小时后,3000 r/min 离心 15 min,取血清储存于-80 °C 冰箱中。用 2,4-二硝基苯肼比色法,于 440 nm 处,收集各孔吸光度值,根据以下公式计算血清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的活性。

血清 LDH 活性(U/L)=[(OD_{测定}-OD_{对照})/(OD_{标准}-OD_{空白})]*标准品浓度*1000

注:根据试剂盒说明书,标准品浓度为 2 mmol/L。

1.4.2 丙二醛测定

心肌缺血再灌注模型小鼠连续灌胃饲养 7 d 后,进行

眼球取血。全血室温下静置半小时后,3000 r/min 离心 15 min,取血清储存于-80 °C 冰箱中。用硫代巴比妥酸法,于 532 nm 处,收集各孔吸光度值,根据以下公式计算血清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的活性。

血清中 MDA 含量(nmol/mL)=[(OD_{测定}-OD_{对照})/(OD_{标准}-OD_{空白})]*标准品浓度*样本测试前稀释倍数

注:根据试剂盒说明书,标准品浓度为 10 nmol/L。样本测试前稀释倍数为 1。

1.4.3 谷胱甘肽过氧化物酶测定

心肌缺血再灌注模型小鼠连续灌胃饲养 7 d 后,进行眼球取血。全血室温下静置半小时后,3000 r/min 离心 15 min,取血清储存于-80 °C 冰箱中。用二硫代二硝基苯甲酸直接法(dithio dinitrobenzoic acid, DTNB),于 412 nm 处,收集各孔吸光度值,根据以下公式计算血清中谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)的活性。

血清 GSH-PX 活力=[(OD_{非酶管}-OD_{酶管})/(OD_{标准管}-OD_{空白管})]*标准品浓度*稀释倍数*样本测试前稀释倍数

注:根据试剂盒说明书,标准品浓度为 20 μ mol/L,稀释倍数为 6。样本测试前稀释倍数为 5。

1.4.4 肌酸激酶同工酶测定

心肌缺血再灌注模型小鼠连续灌胃饲养 7 d 后,进行眼球取血。全血室温下静置半小时后,3000 r/min 离心 15 min,取血清储存于-80 °C 冰箱中。用酶联免疫法,于 450 nm 处,收集各孔吸光度值,根据所测标准曲线回归方程计算各血清样本中肌酸激酶同工酶(creatinine kinase, CK-MB)浓度。

1.4.5 蛋白质印迹法分析

剪取适量心脏组织置于 1.5 mL EP 管中,用研磨棒按 0.1 g/100 μ L 的比例加入混合裂解液(体积比为:RIPA:10%SDS:磷酸酶抑制剂:蛋白酶抑制剂=60:40:1:1)并在冰上充分碾磨,重复振荡涡旋 3 次,于冰上静置 15 min 后,用低温高速离心机 13500 r/min,30 min 离心。取上清用 BCA 法测定蛋白浓度,利用 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)和 RIPA 裂解液处理蛋白样并加热解旋。以 130 V 电泳 1 h,以 300 mA 转膜 70 min。蛋白条带用牛奶封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜。荧光二抗,室温避光孵育 1 h,使用红外荧光扫描系统 Odyssey 扫描检测。

1.4.6 逆转录定量 PCR 处理

取适量心脏组织于 1.5 mL EP 管中,用 Trizol 法提取心肌组织中总 RNA,使用 NanoDrop 2000 超微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 浓度,用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR 系统对 cDNA 进行扩增和检测,PCR 条件为 95 °C 5 min,之后 95 °C 15 s、60 °C 30 s、72 °C 45 s 经历 40 个循环。2^{- $\Delta\Delta$ CT} 计算基因的相对表达水平,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,根据 GenBank 提供的基因序列使用 Gene Runner 设计引物,引物序列见表 1。

1.4.7 ELISA 处理

剪取适量心脏组织置于 1.5 mL EP 管中, 用研磨棒按组织: 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)=1:9(*V/V*)的比例加入 PBS, 并在冰上充分碾磨, 重复振荡涡旋 3 次, 用低温高速离心机 3000 r/min, 15 min 离心, 取上清。根据小鼠 IL-6、IL-1 β 、TNF- α ELISA 试剂盒操作说明按步骤检测上清液。在 450 nm 处测各孔吸光值, 根据标准曲线计算得出 IL-1、IL-6、TNF- α 含量。

1.5 统计学分析

数据用平均值 $\pm$ SD 表示。用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)比较组间数据。组内比较用 Student's *t* 检验, *P*<0.05 认为有显著差异。Western 免疫条带的灰度通过 Odyssey 4.0 软件分析。

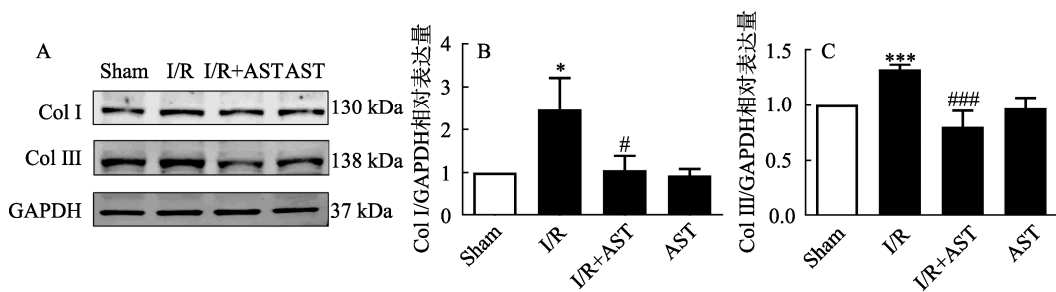
2 结果与分析

2.1 3S,3'S-AST 对心肌重构的影响

心肌重构的主要表现之一是心肌纤维化。利用蛋白质印迹法、逆转录定量 PCR 检测小鼠心脏组织中 Col I、Col III、TGF- β 1 心肌重构相关因子在蛋白和 mRNA 水平的表达情况。如图 1~2, 在蛋白及 mRNA 水平上, I/R 组与 Sham 组相比, I/R 组中的 Col I、Col III、TGF- β 1 的表达明显升高 (*P*<0.05 和 *P*<0.001); 但相较于 I/R 组, I/R+AST 组中 Col I、Col III、TGF- β 1 的表达又显著降低 (*P*<0.05 和 *P*<0.001)。这说明, 虾青素能够有效缓解 I/R 小鼠心肌重构相关蛋白的表达, 降低纤维化蛋白水平。因此, 3S,3'S-AST 对 I/R 小鼠的心肌重构具有保护作用。

表 1 逆转录定量 PCR 引物
Table 1 Primers of qRT-PCR

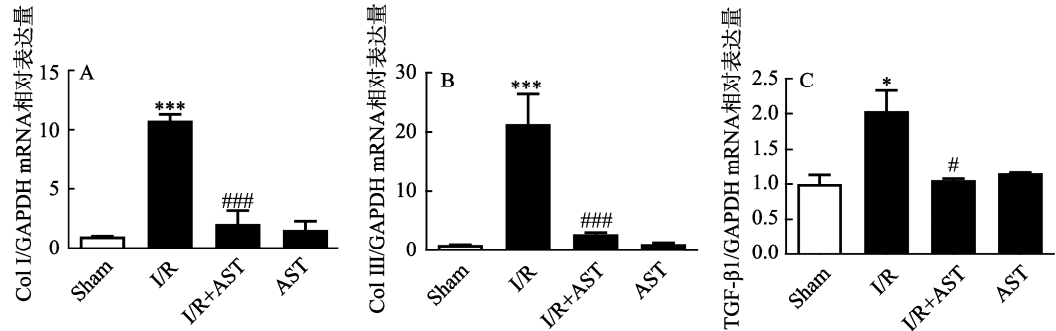
名称	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
TGF- β 1	GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTCA	TTGGTTCAGCCACTGCCGTA
Collegen I	CAATGGCACGGCTGTGTGCG	CACCTCGCCCTCCCGTCTTTGG
Collegen III	TGGCAGCAGCAGTCCAACGTA	AAGGACAGATCCTGAGTCACAGACA
GAPDH	AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA



注: A 图: Col I、Col III 及内参蛋白 GAPDH 的蛋白条带图; B 图: Col I/GAPDH 相对表达量统计图; C 图: Col III/GAPDH 相对表达量统计图。*与对照组(sham)相较具有统计学意义(*P*<0.05), ***与对照组相较具有统计学意义(*P*<0.001)。#与模型组(I/R)相较具有统计学意义(*P*<0.05), ###与模型组相较具有统计学意义(*P*<0.001)。

图 1 3S,3'S-AST 对心肌重构蛋白 Col I、Col III 的影响(*n*=4)

Fig.1 Effect of 3S,3'S-AST on myocardial remodeling related protein Col I and Col III (*n*=4)



注: A 图: Col I/GAPDH mRNA 相对表达量统计图; B 图: Col III/GAPDH mRNA 相对表达量统计图; C 图: TGF- β 1/GAPDH mRNA 相对表达量统计图。*与对照组(sham)相较具有统计学意义(*P*<0.05), ***与对照组相较具有统计学意义(*P*<0.001)。#与模型组(I/R)相较具有统计学意义(*P*<0.05), ###与模型组相较具有统计学意义(*P*<0.001)。

图 2 3S,3'S-AST 对心肌重构蛋白 mRNA 水平表达的影响 (*n*=4)

Fig.2 Effect of 3S,3'S-AST on mRNA level expression of myocardial remodeling protein(*n*=4)

2.2 3S,3'S-AST 对心肌损伤标志物的影响

LDH 和 CK-MB 是重要的心肌损伤指标, 心肌损伤小鼠的心脏组织中 LDH 和 CK-MB 水平升高。利用试剂盒检测小鼠心脏组织中 LDH 和 CK-MB 表达水平。如图 3, 与 Sham 组相比, I/R 组中 LDH 和 CK-MB 明显升高 ($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。但与 I/R 组相比, I/R+AST 组中 LDH 和 CK-MB 水平明显下降 ($P<0.01$)。结果表明, 虾青素能够降低 MI/R 小鼠心脏中心肌损伤标志物的水平。

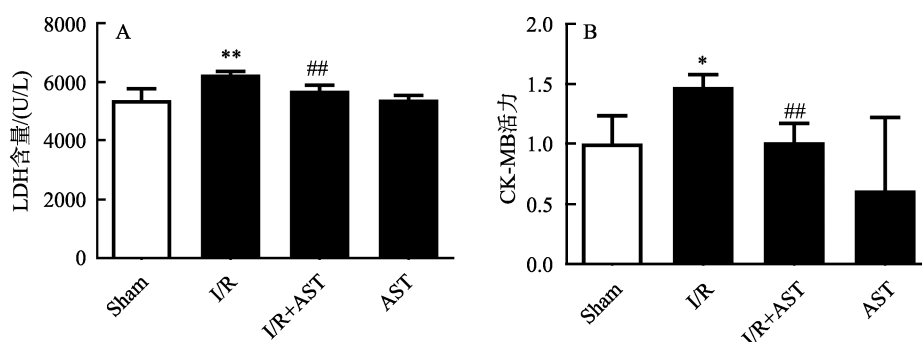
2.3 3S,3'S-AST 对氧化应激的影响

检测小鼠血清中 MDA 和 GSH-PX 与氧化相关酶的水平, 分析 3S,3'S-AST 对 I/R 损伤的抗氧化作用。MDA 是脂质过氧化的重要产物之一, 能够放大活性氧的作用, 加剧细胞损伤。GSH-PX 是重要的过氧化氢酶, 能够催化过氧化氢分解反应, 起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。

如图 4 所示, 与 Sham 组相比, I/R 组小鼠 MDA 水平明显升高, 且 GSH-PX 水平明显降低 ($P<0.05$)。而与 I/R 组相比, I/R+AST 组中 3S,3'S-AST 使 MDA 水平降低, GSH-PX 的水平提高 ($P<0.05$)。以上结果表明, 3S,3'S-AST 对 I/R 损伤具有明显的抗氧化作用, 其可能通过减轻氧化应激从而减少 I/R 损伤。

2.4 3S,3'S-AST 对炎症反应的影响

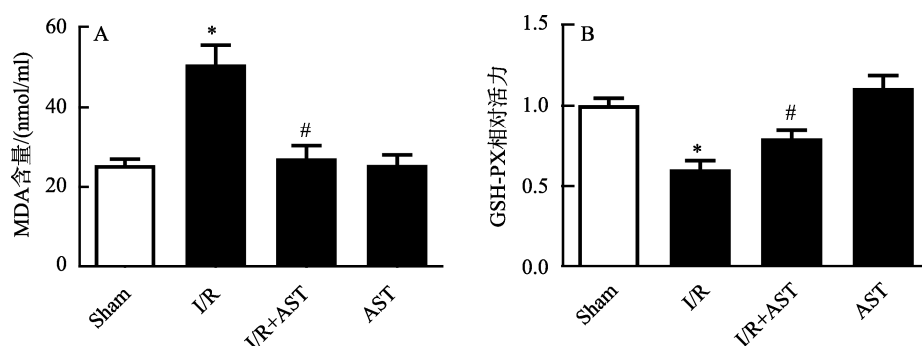
氧化应激会引发炎症反应, 利用 ELISA 试剂盒检测小鼠心脏组织中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平, 分析 3S,3'S-AST 对 I/R 损伤的抗炎作用。如图 5 所示, 与 Sham 组相比, I/R 组小鼠心脏组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显升高 ($P<0.05$), 而与 I/R 组相比, I/R+AST 组中虾青素使 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。这些结果表明, 虾青素能有效抑制心肌缺血再灌注损伤小鼠心脏的炎症反应。



注: A 图: 血清中 LDH 含量统计图; B 图: 血清中 CK-MB 活力统计图; *与对照组(sham)相较具有统计学意义 ($P<0.05$), **与对照组相较具有统计学意义 ($P<0.01$)。##与模型组(I/R)相较具有统计学意义 ($P<0.01$)。

图 3 3S,3'S-AST 对心肌损伤标志物的影响 ($n=4$)

Fig.3 Effect of 3S,3'S-AST on myocardial injury markers ($n=4$)



注: A 图: 血清中 MDA 含量统计图; B 图: 血清中 GSH-PX 相对活力统计图; *与对照组(sham)相较具有统计学意义 ($P<0.05$)。#与模型组(I/R)相较具有统计学意义 ($P<0.05$)。

图 4 3S,3'S-AST 对氧化应激的影响 ($n=4$)

Fig.4 Effect of 3S,3'S-AST on oxidative stress ($n=4$)

2.5 3S,3'S-AST 对心肌细胞凋亡的影响

利用 WB 检测小鼠心脏组织中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达情况。如图 6 所示, 与 Sham 组相比, I/R 组小鼠 Bcl-2 水平下降, Bax 水平上升($P < 0.05$); 但相较于 I/R 组, I/R+AST 组中 Bcl-2 水平升高, Bax 水平降低($P < 0.05$)。结果表明, 3S,3'S-AST 可以减轻 I/R 小鼠心肌细胞凋亡。

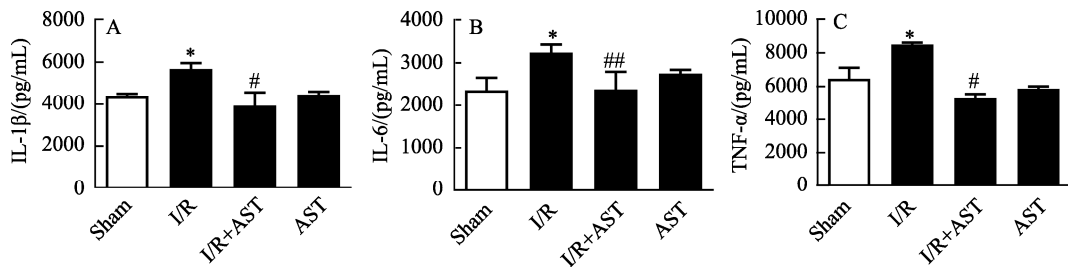
2.6 3S,3'S-AST 对 NKA/Src/Erk1/2/ROS 信号扩增环路的影响

I/R 损伤会导致心脏中 Na/K-ATP 酶(NKA)功能发生改变, 激活 NKA/Src/Erk1/2 受体复合物会导致 ROS 水平升高, 而 ROS 水平升高也能反向激活 NKA/Src/Erk1/2。QU 等^[32]已在 H9c2 细胞中发现, 3S,3'S-AST 能显著抑制因 H_2O_2 处理引起的 ROS 升高和 Src、Erk1/2 磷酸化水平上调, 但不改变 NKA 的蛋白表达水平, 从而对心肌细胞氧化应激损伤具有改善作用。因此, 本研究通过检测 I/R 小鼠心脏组织 Src 和 Erk1/2 蛋白磷酸化水平, 验证 3S,3'S-AST 能否通过调控 NKA/Src/Erk1/2/ROS 信号扩增环路, 从而起到改善心肌重构的作用。如图 7 所示, 与 Sham 组相比, I/R 组小鼠心脏组织中 p-Src/c-Src 和 p-Erk1/2/Erk1/2 蛋白比例明显上升($P < 0.05$); 但相较于

I/R 组, I/R+AST 组中 3S,3'S-AST 明显减少 p-Src/c-Src 和 p-Erk1/2/Erk1/2 蛋白比例上调($P < 0.05$), 结果与 Sham 组和 AST 组接近。上述结果表明, 3S,3'S-AST 可能通过抑制 Src 和 Erk1/2 激活, 下调 Src 和 Erk1/2 的磷酸化水平, 从而减少了 ROS 产生。

3 结论与讨论

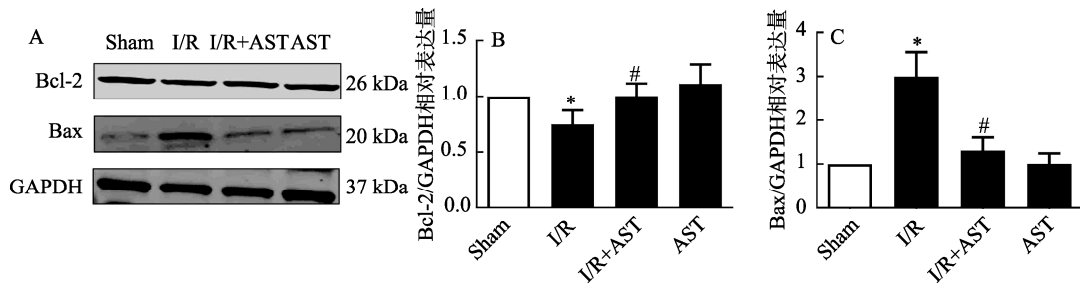
恢复血流已被证实是抢救心肌缺血的有效途径。然而, 心肌再灌注会引起心肌细胞 ROS 产生增加。一些治疗药物虽然已经可以防止 I/R 引起的氧化应激损伤, 但其对 I/R 损伤的治疗效果仍不令人满意^[33]。正常生理状态下机体也存在一定水平的氧化应激, 比如衰老的过程。氧化应激参与细胞稳态、有丝分裂、分化、死亡和信号传递等过程^[34], 但过高的氧化应激水平通常会对细胞产生毒性作用, 造成 DNA、线粒体、细胞膜损伤等, 最终导致机体功能障碍^[35]。氧化应激参与多种疾病的发生发展, 是心肌缺血再灌注损伤的重要病理基础, 心肌缺血再灌注(I/R)损伤常伴发于冠心病, 是心力衰竭的主要原因之一^[36-37]。因此, 寻找合适的生物活性物质减少氧化应激水平是应对心肌缺血再灌注损伤的一种有效策略。



注: A 图: 心脏中 IL-1 β 含量统计图; B 图: 心脏中 IL-6 含量统计图; C 图: 心脏中 TNF- α 含量统计图。*与对照组(sham)相较具有统计学意义($P < 0.05$)。#与模型组(I/R)相较具有统计学意义($P < 0.05$)。##与模型组相较具有统计学意义($P < 0.01$)。

图 5 3S,3'S-AST 对炎症反应的影响($n=4$)

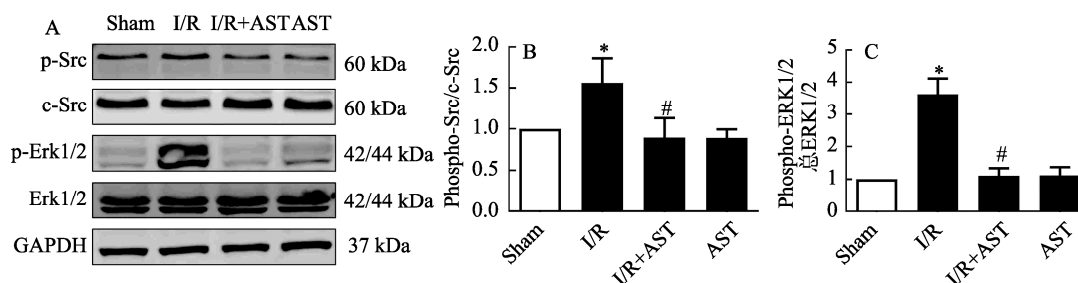
Fig.5 Effect of 3S,3'S-AST on inflammatory response ($n=4$)



注: A 图: Bax、Bcl₂ 及内参蛋白 GAPDH 表达条带图; B 图: Bcl₂/GAPDH 相对表达量统计图; C 图: Bax/GAPDH 相对表达量统计图。*与对照组(sham)相较具有统计学意义($P < 0.05$)。#与模型组(I/R)相较具有统计学意义($P < 0.05$)。

图 6 3S,3'S-AST 对心肌细胞凋亡的影响($n=4$)

Fig.6 Effect of 3S,3'S-AST on apoptosis of myocardial cells ($n=4$)



注: A 图: p-Src、c-Src、p-Erk1/2、Erk1/2 及内参蛋白表达条带图; B 图: p-Src/c-Src 蛋白表达统计图; C 图: p-Erk1/2/Erk1/2 蛋白表达统计图。*与对照组(sham)相较具有统计学意义($P<0.05$)。#与模型组(I/R)相较具有统计学意义($P<0.05$)。

图 7 3S,3'S-AST NKA/Src/Erk1/2/ROS 信号扩增环路的影响($n=4$)

Fig.7 Effect of 3S,3'S-AST on NKA/Src/Erk1/2/ROS signal amplification loop ($n=4$)

AST 以 3 种立体异构形式存在(3S,3'S、3R,3'R 和 3R,3'S)。雨生红球藻衍生的 AST 主要含有 3S,3'S 形式,合成的 AST 是 3 种立体异构体[(3S,3'S):(3R,3'R):(3R,3'S), 1:2:1 比例]的混合物^[38]。有研究^[39]称合成 AST 可以降低 I/R 兔的 MI 大小。然而,合成 AST 迄今为止尚未被批准用于人类消费,这使得雨生红球藻衍生的天然 AST 成为市场的首选并被多国批准为人类消费的膳食补充成分^[40]。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)授予雨生藻虾青素“GRAS”地位(一般公认安全),一些初步的临床前研究也支持特定剂量 AST 的抗氧化能力。

本研究发现雨生红球藻源主要成分 3S,3'S-AST 可以有效改善心肌缺血再灌注损伤引起的心肌重构,降低氧化应激水平,减少炎症因子产生,缓解心肌细胞凋亡,另外也在之前细胞研究结果的基础上^[32],阐明了 3S,3'S-AST 可能通过下调 Src 和 Erk1/2 的磷酸化水平,对 NKA/Src/Erk1/2/ROS 信号扩增环路产生影响,从而减少了 I/R 损伤。结合先前细胞研究的结果,本研究从体内体外两方面都证实了 3S,3'S-AST 有助于改善 I/R 损伤,为拓宽其应用提供了理论依据。然而,在建立任何关于使用 3S,3'S-AST 改善人类心肌缺血再灌注损伤的建议之前,进一步的人类干预研究是有必要的。同时,在这些实验结果的基础上可以进一步探索其抗氧化抗炎能力及可能的作用机制,以完善雨生红球藻源 3S,3'S-AST 应用于保护心肌缺血再灌注损伤的理论支持。

参考文献

- ZHOU H, MA Q, ZHU P, *et al.* Protective role of melatonin in cardiac ischemia-reperfusion injury: From pathogenesis to targeted therapy [J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(3): e12471.
- RUDE RE, MULLER JE, BRAUNWALD E. Efforts to limit the size of myocardial infarcts [J]. *Ann Intern Med*, 1981, 95(6): 736-761.
- HAUSENLOY D J, YELLON DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 92-100.
- JO MS, LEE J, KIM SY, *et al.* Comparison between creatine kinase MB, heart-type fatty acid-binding protein, and cardiac troponin T for detecting myocardial ischemic injury after cardiac surgery [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 488: 174-178.
- NESHER N, ZISMAN E, WOLF T, *et al.* Strict thermoregulation attenuates myocardial injury during coronary artery bypass graft surgery as reflected by reduced levels of cardiac-specific troponin I [J]. *Anesth Analg*, 2003, 96(2): 328-335.
- BROWN DI, GRIENDLING KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 531-549.
- MOHSENZADEGAN M, MIRSHAFIEY A. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease [J]. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2012, 11(3): 203-216.
- HOU H, WANG Y, LI Q, *et al.* The role of RIP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(11): 1131-1140.
- IBANEZ B, HEUSCH G, OVIZE M, *et al.* Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(14): 1454-1471.
- TURER AT, HILL A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(3): 360-368.
- DE M, BECKER C, CARVALHO MH, *et al.* Angiotensin II inhibition during myocardial ischemia-reperfusion in dogs: Effects on leukocyte infiltration, nitric oxide synthase isoenzymes activity and left ventricular ejection fraction [J]. *Int J Cardiol*, 2005, 100(3): 363-370.
- ZHANG L, CAO S, DENG S, *et al.* Ischemic postconditioning and pinacidil suppress calcium overload in anoxia-reoxygenation cardiomyocytes via down-regulation of the calcium-sensing receptor [J]. *Peer J*, 2016, 4: e2612.
- BELLANTI F, MIRABELLA L, MITAROTONDA D, *et al.* Propofol but not sevoflurane prevents mitochondrial dysfunction and oxidative stress by limiting HIF-1 α activation in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 96: 323-333.
- RAJADURAI M, STANLEY P. Preventive effect of naringin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats [J]. *Toxicology*, 2007, 230(2-3): 178-188.

- [15] ZHAO XY, LI GY, LIU Y, *et al.* Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(1): 105–113.
- [16] ZHANG S, WANG J, PAN J. Baicalin-loaded PEGylated lipid nanoparticles: characterization, pharmacokinetics, and protective effects on acute myocardial ischemia in rats [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(9): 3696–3703.
- [17] SWIRSKI FK, NAHRENDORF M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure [J]. *Science*, 2013, 339(6116): 161–166.
- [18] WANG Y, ZHANG H, CHAI F, *et al.* The effects of escitalopram on myocardial apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 during myocardial ischemia/reperfusion in a model of rats with depression [J]. *BMC Psychiatry*, 2014, 14: 349.
- [19] AMBATI RR, PHANG SM, RAVI S, *et al.* Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review [J]. *Mar Drugs*, 2014, 12(1): 128–152.
- [20] KISHIMOTO Y, YOSHIDA H, KONDO K. Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(2): 35.
- [21] ZHANG ZW, XU XC, LIU T, *et al.* Mitochondrion-permeable antioxidants to treat ROS-Burst-mediated acute diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 6859523.
- [22] ALAM MN, HOSSAIN MM, RAHMAN MM, *et al.* Astaxanthin prevented oxidative stress in heart and kidneys of isoproterenol-administered aged rats [J]. *J Diet Suppl*, 2018, 15(1): 42–54.
- [23] SHI Y, LIN P, WANG X, *et al.* Sphingomyelin phosphodiesterase 1 (SMPD1) mediates the attenuation of myocardial infarction-induced cardiac fibrosis by astaxanthin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 637–643.
- [24] BELLARD A, SOTTEJEAU Y, DUAN Q, *et al.* Modulation of cardiac Na⁺, K⁺-ATPase cell surface abundance by simulated ischemia-reperfusion and ouabain preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(1): 94–103.
- [25] LI Z, XIE Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades [J]. *Pflugers Arch*, 2009, 457(3): 635–644.
- [26] YAN Y, SHAPIRO AP, HALLER S, *et al.* Involvement of reactive oxygen species in a feed-forward mechanism of Na/K-ATPase-mediated signaling transduction [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(47): 34249–34258.
- [27] LIU J, TIAN J, HAAS M, *et al.* Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 27838–27844.
- [28] WANG Y, YE Q, LIU C, *et al.* Involvement of Na/K-ATPase in hydrogen peroxide-induced activation of the Src/ERK pathway in LLC-PK1 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 71: 415–426.
- [29] LI H, YIN A, CHENG Z, *et al.* Attenuation of Na/K-ATPase/Src/ROS amplification signal pathway with pNaktide ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118: 1142–1148.
- [30] YU SY, BO D, FANG ZF, *et al.* Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: DOI:10.1111/jcmm.13754.
- [31] 臧光耀, 李波, 耿田欣, 等. 一种快速建立小鼠心肌缺血再灌注模型的方法[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2019, 29(6): 472–475.
- ZANG GY, LI B, GENG TX, *et al.* A rapid method to establish myocardial ischemia reperfusion model in mice [J]. *J Jiangsu Univ (Med Sci Ed)*, 2019, 29(6): 472–475.
- [32] QU X, ZHANG Z, HU W, *et al.* Attenuation of the Na/KATPase/Src/ROS amplification signaling pathway by astaxanthin ameliorates myocardial cell oxidative stress injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(6): 5125–5134.
- [33] HOFFMAN JW, GILBERT TB, POSTON RS, *et al.* Myocardial reperfusion injury: Etiology, mechanisms, and therapies [J]. *J Extra Corpor Technol*, 2004, 36(4): 391–411.
- [34] TAN BL, NORHAIZAN ME, LIEW WP. Nutrients and oxidative stress: Friend or foe? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018(6): 9719584.
- [35] FILOMENI G, DEZIO D, CECCONI F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3): 377–388.
- [36] CADENAS S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76–89.
- [37] FROHLICH GM, MEIER P, WHITE SK, *et al.* Myocardial reperfusion injury: Looking beyond primary PCI [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(23): 1714–1722.
- [38] VISIOLI F, ARTARIA C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: Mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps [J]. *Food Funct*, 2017, 8(1): 39–63.
- [39] LAUVER DA, LOCKWOOD SF, LUCCHESI BR. Disodium disuccinate astaxanthin (cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/reperfusion [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314(2): 686–692.
- [40] SHAH MM, LIANG Y, CHENG JJ, *et al.* Astaxanthin-producing green microalga *haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 531.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



胡文力, 硕士, 主要研究方向为营养与食品卫生学。

E-mail: mumutif@163.com



王 茜, 研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生学。

E-mail: wy3333@163.com