

## • 论著 •

## 丹参酮ⅡA 对急性心肌缺血大鼠 S100A1 蛋白表达的影响

吴茂林<sup>1</sup>, 翟昌林<sup>2</sup>, 张亚梅<sup>1</sup>, 吴飞飞<sup>1</sup>, 张英志<sup>1</sup>

(1. 浙江萧山医院心内科, 浙江 杭州 311200; 2. 嘉兴市第一医院心内科, 浙江 嘉兴 314000)

**【摘要】目的** 探讨丹参酮ⅡA 对大鼠急性心肌缺血损伤后 S100A1 蛋白表达的影响。**方法** 选择 Wistar 大鼠 60 只, 按随机数字表法分为假手术组、急性心肌缺血模型组、丹参酮ⅡA 预处理组。采用左冠状动脉(冠脉)前降支根部穿线结扎的方法建立大鼠急性心肌缺血模型; 假手术组仅开胸于大鼠左冠脉前降支根部穿线但不结扎; 丹参酮ⅡA 预处理组于术前 3 d 腹腔注射丹参酮ⅡA 注射液(剂量为 1.5 mg/kg), 假手术组和急性心肌缺血模型组以等体积生理盐水腹腔注射。采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡情况; 检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)及 S100A1 蛋白水平; 采用免疫组化染色和蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测心肌组织 S100A1 蛋白的表达水平。**结果** 与假手术组比较, 心肌缺血模型组和丹参酮ⅡA 预处理组心肌细胞凋亡率及 MDA、CK、LDH、S100A1 表达水平均明显升高, SOD 活性明显降低; 与心肌缺血模型组比较, 丹参酮ⅡA 预处理组心肌细胞凋亡率及 MDA、CK、LDH、S100A1 蛋白表达水平均明显降低〔细胞凋亡率: (32.1±4.2)% 比 (72.4±5.4)%, MDA (μmol/L): 9.1±2.2 比 17.3±5.2, CK (U/L): 83.3±12.2 比 107.5±12.4, LDH (μmol·s⁻¹·L⁻¹): 84.0±16.4 比 114.4±16.0, S100A1 蛋白 (μg/L): 37.6±6.0 比 78.4±8.6,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 〕, SOD 活性明显升高 (kU/L: 72.8±10.2 比 49.6±8.8,  $P < 0.01$ )。TUNEL 染色结果显示, 心肌缺血模型组和丹参酮ⅡA 预处理组心肌细胞部分染色呈阳性(棕黄色), 呈现形态不规则、与周围组织脱离和核固缩等特征, 假手术组大部分细胞染色呈阴性。免疫组化结果显示, 心肌缺血模型组和丹参酮ⅡA 预处理组 S100A1 蛋白染色较深, 丹参酮ⅡA 预处理组阳性蛋白染色较浅。Western Blot 结果显示, 心肌缺血模型组 S100A1 蛋白表达是假手术组的 2.8 倍, 丹参酮ⅡA 预处理组较心肌缺血模型组明显降低(均  $P < 0.05$ ), 是假手术组的 1.5 倍。**结论** 丹参酮ⅡA 可能是通过抑制 S100A1 蛋白的表达对急性心肌缺血损伤起到保护作用, 提示丹参酮ⅡA 具有治疗心肌缺血的潜能。

**【关键词】** 丹参酮ⅡA; 心肌缺血, 急性; S100A1; 细胞凋亡

**Effect of tanshinone Ⅱ A on expression of protein S100A1 in acute myocardial ischemia rats** Wu Maolin\*, Zhai Changlin, Zhang Yamei, Wu Feifei, Zhang Yingzhi. \*Department of Cardiology, the Xiaoshan Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 311200, Zhejiang, China

**Corresponding author:** Zhai Changlin, Department of Cardiology, the First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, Zhejiang, China; Email: yesterdaygun@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effect of tanshinone Ⅱ A on the expression of S100A1 protein after acute myocardial ischemia injury in rats. **Methods** Sixty Wistar rats were randomly divided into sham operation group, acute myocardial ischemia model group and tanshinone Ⅱ A pretreatment group by random number table. The acute myocardial ischemia model was established by thoracotomy and penetration of a thread and occlusion around the root part of the left anterior descending coronary artery, while the sham operation group was established only by thoracotomy and penetration of a thread around the root part of that artery but without occlusion; 3 days before the operation, in the tanshinone Ⅱ A pretreatment group, intraperitoneal injection of tanshinone Ⅱ A solution (at a dose of 1.5 mg/kg) was applied, while in the sham and acute myocardial ischemia groups, intraperitoneal injection of an equal volume of saline was given. Myocardial cell apoptosis was detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), the levels of serum superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and S100A1 protein were examined and the level of expression of S100A1 protein in myocardial tissue was assayed by immunohistochemical staining and Western Blot. **Results** Compared with the sham operation group, the myocardial cell apoptosis rate, the contents of MDA, CK, LDH, S100A1 and the level of S100A1 expression in myocardial ischemia group and tanshinone Ⅱ A pretreated group were significantly increased, while SOD activity was decreased obviously; compared with the myocardial ischemia model group, the myocardial cell apoptosis rate, the contents of MDA, CK, LDH, S100A1 and the level of S100A1 protein expression were significantly reduced [apoptosis rate: (32.1±4.2)% vs. (72.4±5.4)%, MDA (μmol/L): 9.1±2.2 vs. 17.3±5.2, CK (U/L): 83.3±12.2 vs. 107.5±12.4, LDH (μmol·s⁻¹·L⁻¹): 84.0±16.4 vs. 114.4±16.0, S100A1 (μg/L): 37.6±6.0 vs. 78.4±8.6,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ], while the activity of SOD was increased markedly in tanshinone Ⅱ A pretreated group (kU/L: 72.8±10.2 vs. 49.6±8.8,  $P < 0.01$ ). TUNEL staining showed that in the myocardial ischemia model group and tanshinone Ⅱ A pretreated group, the myocardial cells represented positive staining (brown-yellow in color), irregular in shape with nuclear pyknosis, cell detachment from the surrounding tissue and other characteristics. And in sham operation group,

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.05.008

通信作者:翟昌林, Email: yesterdaygun@126.com

the staining of majority of cells was negative. The results of immunohistochemistry showed that S100A1 protein staining was relatively deep in the myocardial ischemia model group and tanshinone II A pretreated group, and in the latter group, the color of S100A1 protein positive staining was not as deep as that in the former group. Western Blot showed that the S100A1 protein expression in myocardial ischemia model group was 2.8 folds of that of the sham operation group, while the S100A1 protein expression in tanshinone II A pretreated group was significantly decreased compared with that of myocardial ischemia model group (both  $P < 0.05$ ), which was 1.5 folds of that of the sham operation group. **Conclusion** Tanshinone II A may play a role in inhibiting the expression of S100A1 protein to protect against acute myocardial ischemia injury, suggesting that this agent have a potential effect for treatment of myocardial ischemia.

**【Key words】** Tanshinone II A; Acute myocardial ischemia; S100A1; Apoptosis

S100A1蛋白为钙结合蛋白,在心肌组织中特异性地高表达<sup>[1]</sup>。研究发现,S100A1蛋白的表达异常与心脏疾病密切相关。在急性心肌缺血患者的早期阶段,S100A1蛋白的表达明显升高,提示它可作为缺血性冠心病患者的早期诊断标志物<sup>[2]</sup>。此外,S100A1蛋白可以增强心力衰竭(心衰)大鼠的心肌收缩能力,对治疗心衰起到重要的作用<sup>[3]</sup>。研究表明,中药对缺血/再灌注(I/R)损伤大鼠有保护作用<sup>[4]</sup>。丹参是常用的活血化瘀中药,研究发现丹参的主要成分丹参素对大鼠急性心肌缺血性疾病具有保护作用<sup>[4-5]</sup>。本研究旨在探讨丹参酮II A对急性心肌缺血大鼠S100A1蛋白的影响,从而阐明丹参酮II A保护心肌的分子机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料与药品:**丹参酮II A注射液购自雅安三九药业有限公司,批号:121011,每支2mL。超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)检测试盒购自南京碧波生物科技有限公司,人乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司,人肌酸激酶(CK)检测试剂盒购自上海欣然实业有限公司。S100A1蛋白酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司。原位末端缺刻标记法(TUNEL)试剂盒购自美国Promega公司,S100A1和三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体购自英国Abcam公司。

**1.2 急性心肌缺血大鼠模型的建立:**以戊巴比妥麻醉大鼠,剪开气管插管,连接微型小动物呼吸机和体表心电图。控制呼吸频率为80次/min,通气量12mL。开胸暴露心脏,于左冠状动脉(冠脉)前降支根部穿线结扎,以心电图出现R波高尖、ST段抬高或Q波加深、心肌颜色由红色变为白色则表示心肌急性缺血模型制备成功。缺血4h后进行各项指标检测。假手术组仅开胸,于大鼠左冠脉前降支根部穿线但不结扎<sup>[6-7]</sup>。

本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.3 实验分组:**选择Wistar大鼠60只,雌雄各半,体质量200~220g,由浙江大学实验动物中心提供,动物格合证号:SCXK(浙)2011-079。按随机数字表法分为3组,每组20只。丹参酮II A预处理组大鼠于术前连续腹腔注射丹参酮II A注射液1.5mg/kg,每日1次,连用3d,于末次给药后进行心肌缺血处理;心肌缺血模型组和假手术组用等体积生理盐水代替丹参酮II A注射液腹腔注射后进行手术。

## 1.4 检测指标及方法

**1.4.1 TUNEL法检测心肌细胞凋亡:**各组大鼠麻醉处死后立即取心尖部的心肌组织,放入4%多聚甲醛水溶液中固定,常规脱水,石蜡包埋后进行切片处理。严格按照TUNEL试剂盒说明书要求进行心肌细胞凋亡检测。心肌细胞凋亡率=(凋亡心肌细胞核数/心肌细胞核总数)×100%。

**1.4.2 生化指标测定:**各组大鼠麻醉处死后取血,离心分离血清,严格按照试剂盒说明书要求检测血清SOD、MDA、LDH、CK和S100A1蛋白水平。

**1.4.3 免疫组化染色检测心肌组织S100A1蛋白表达水平:**麻醉处死大鼠后在心脏的2个不同部位取心肌组织,切片,采用免疫组化〔过氧化物酶标记的链霉素卵白素复合物(SP)〕法检测各组心肌中S100A1的表达,操作严格按照试剂盒说明书步骤进行。采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为对照。以细胞质和细胞核着色棕黄色为阳性。

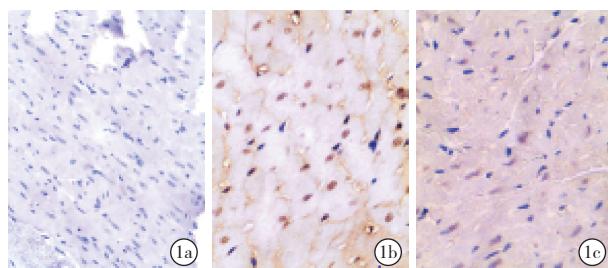
**1.4.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测心肌组织中S100A1蛋白的表达:**麻醉处死大鼠后迅速取心肌组织,用蛋白裂解缓冲液裂解心肌组织,离心分离得到总蛋白。然后在15%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶上进行蛋白分离;GAPDH作为内源性对照。以鼠抗S100A1抗体和兔抗GAPDH抗体(1:1000稀释)作为一抗,室温孵育2h;最后分别用羊抗鼠或羊抗兔的带有辣根过氧化物酶的二抗进行蛋白检测。得

到的蛋白条带利用 Labwork 4.0 图像分析软件进行分析。

**1.5 统计学分析:** 使用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 计量数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 并进行正态性及方差齐性检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 心肌细胞凋亡:** 心肌缺血模型组和丹参酮 II A 预处理组部分心肌细胞染色呈阳性(棕黄色), 呈现形态不规则、与周围组织脱离和核固缩等特征。假手术组大部分心肌细胞染色呈阴性(图 1)。丹参酮 II A 预处理组细胞凋亡率明显低于心肌缺血模型组, 但两组均明显高于假手术组( $P < 0.05$ ; 表 1)。



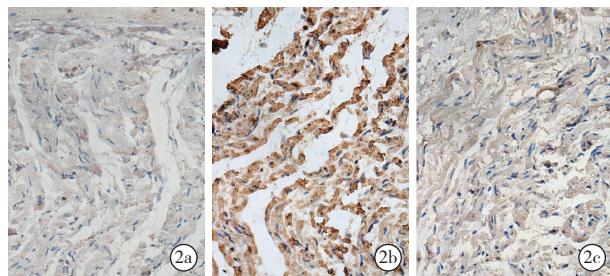
①:假手术组; ②:心肌缺血模型组; ③:丹参酮 II A 预处理组

图 1 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 (TUNEL 低倍放大)

**2.2 各组大鼠血清生化指标的比较(表 1):** 与假手术组比较, 心肌缺血模型组和丹参酮 II A 预处理组血清 SOD 活性均明显降低, MDA、CK、LDH、S100A1 含量均明显升高; 丹参酮 II A 预处理组血清 SOD 活性明显高于心肌缺血模型组, MDA、LDH、CK 和 S100A1 蛋白含量明显低于心肌缺血模型组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

## 2.3 各组大鼠心肌组织 S100A1 的蛋白表达比较

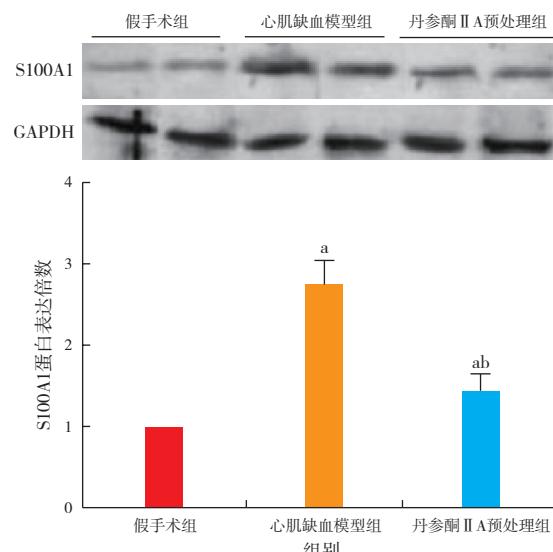
**2.3.1 免疫组化染色(表 1;图 2):** 与假手术组比较, 心肌缺血模型组和丹参酮 II A 预处理组 S100A1 蛋白染色较深, S100A1 表达水平升高。丹参酮 II A 预处理组阳性蛋白少于心肌缺血模型组, 表明 S100A1 表达水平低于心肌缺血模型组。



①:假手术组; ②:心肌缺血模型组; ③:丹参酮 II A 预处理组

图 2 各组大鼠心肌组织 S100A1 的蛋白表达水平 (免疫组化 低倍放大)

**2.3.2 Western Blot (图 3):** 心肌缺血模型组 S100A1 蛋白表达水平较假手术组明显升高( $P < 0.05$ ), 为假手术组的 2.8 倍。丹参酮 II A 预处理组 S100A1 蛋白表达水平较心肌缺血模型组明显降低( $P < 0.05$ ), 是假手术组的 1.5 倍。



注:与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与心肌缺血模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 Western Blot 检测各组大鼠心肌组织 S100A1 蛋白表达水平

## 3 讨 论

缺血性心脏病最常见的原因是由于冠脉狭窄或梗阻引起的动脉粥样硬化<sup>[8]</sup>, 包括冠心病和心绞痛等, 是威胁人类健康的疾病之一。因此, 寻找有效治疗

表 1 各组心肌组织细胞凋亡率、SOD 和血清 MDA、CK、LDH、S100A1 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	细胞凋亡率 (%)	SOD (kU/L)	MDA ( $\mu$ mol/L)	CK (U/L)	LDH ( $\mu$ mol·s <sup>-1</sup> ·L <sup>-1</sup> )	S100A1 蛋白 ( $\mu$ g/L)
假手术组	20	$0.5 \pm 0.0$	$92.1 \pm 8.7$	$2.7 \pm 0.4$	$68.4 \pm 7.1$	$68.4 \pm 9.0$	$25.4 \pm 2.3$
心肌缺血模型组	20	$72.4 \pm 5.4^a$	$49.6 \pm 8.8^b$	$17.3 \pm 5.2^b$	$107.5 \pm 12.4^b$	$114.4 \pm 16.0^b$	$78.4 \pm 8.6^b$
丹参酮 II A 预处理组	20	$32.1 \pm 4.2^{ac}$	$72.8 \pm 10.2^{bd}$	$9.1 \pm 2.2^{bd}$	$83.3 \pm 12.2^{ac}$	$84.0 \pm 16.4^{ad}$	$37.6 \pm 6.0^{bd}$

注:与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与心肌缺血模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$

心肌缺血的天然药物至关重要<sup>[9-11]</sup>。丹参酮ⅡA 具有活血化瘀、凉血安神的功效。本研究结果显示,丹参酮ⅡA 预处理后心肌细胞凋亡率低于心肌缺血模型组和假手术组,提示丹参酮ⅡA 注射液对急性缺血心肌细胞具有保护作用。

研究发现,心肌缺血可使血清 MDA、SOD、CK 和 LDH 的含量发生改变。CK 和 LDH 是心肌组织损伤的诊断标志物,在急性心肌缺血发生时,心肌损伤,细胞膜遭到破坏,通透性增加,导致细胞内活性酶 LDH 和 CK 释放到血液中<sup>[12]</sup>。研究证实,氧自由基的生成是急性心肌缺血的主要特征,是细胞代谢产生的副产物<sup>[13]</sup>。氧自由基通过引起脂质过氧化而破坏细胞膜,从而导致细胞凋亡<sup>[14]</sup>。SOD 是抗氧化损伤的重要蛋白酶,心肌细胞损伤引起 SOD 表达减少<sup>[15]</sup>。MDA 是脂质过氧化的主要产物,其水平代表脂质过氧化的严重程度<sup>[16]</sup>。中药可清除氧自由基,降低血清中 MDA 含量<sup>[17]</sup>。在右旋糖酐铁过量引起的心脏损伤模型中,丹参可以通过降低离子分布及脂质过氧化程度而对心肌起到保护作用<sup>[18]</sup>。丹参的主要活性部位丹酚酸 B 可通过降低缺血清中 MDA、CK 和 LDH 水平,提高 SOD 的活性从而对缺血心肌具有较好的保护作用<sup>[19]</sup>。本研究结果也显示,急性心肌缺血模型组大鼠心肌 MDA、CK 和 LDH 水平升高, SOD 活性降低;而丹参酮ⅡA 预处理组 MDA、CK 和 LDH 水平降低, SOD 活性增加。我们推测丹参酮ⅡA 注射液可能是通过清除氧自由基,降低脂质的氧化水平,从而对缺血心肌起到保护作用。

S100A1 是急性心肌缺血的早期诊断分子,并且心肌缺血时间越长,血清中 S100A1 的表达水平也随之升高<sup>[20]</sup>。在肿瘤和糖尿病中,抑制 S100A1 表达后对这些疾病的治疗发挥着重要作用<sup>[21]</sup>。这些研究提示 S100A1 在疾病中的重要作用。因此本研究除了研究血清中心肌损伤相关的生化指标外,还检测了 S100A1 蛋白表达水平。结果显示,急性心肌缺血模型组大鼠心肌组织中 S100A1 蛋白水平增加,而丹参酮ⅡA 预处理组心肌组织 S100A1 蛋白水平降低,提示丹参酮ⅡA 注射液可能是通过降低 S100A1 蛋白水平而对缺血心肌起到保护作用。

综上,丹参酮ⅡA 能降低心肌缺血大鼠血清 LDH、CK、MDA 和 S100A1 蛋白的水平,升高 SOD 活性,对缺血心肌具有较好的保护作用,这些可能是丹参酮ⅡA 注射液发挥对缺血心肌保护作用的机制。

## 参考文献

- 李东娅,章晓梅,唐莉. S100 蛋白与相关疾病[J]. 医学研究杂志, 2007, 36 (9): 95-97.
- 李迎国,杨喜民,唐宗椿,等. 黄芪注射液对急性重型颅脑损伤患者血清神经元特异性烯醇化酶、髓鞘碱性蛋白和 S100 蛋白 B 含量的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14 (6): 337-339.
- Remppis A, Pleger ST, Most P, et al. S100A1 gene transfer: a strategy to strengthen engineered cardiac grafts [J]. J Gene Med, 2004, 6 (4): 387-394.
- 张大武,刘剑刚,丰加涛,等. 丹参-川芎水提取物有效组分配伍对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22 (2): 109-112.
- 龙权生,金建新,黄戈平,等. 生脉合丹参注射液对新生儿缺氧缺血性心肌损害的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12 (3): 165-167.
- 刘振,刘玲玲,杨廷桐. 两种大鼠心肌梗死模型的比较研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31 (4): 19-25.
- 李金铁,钟国强,韦卓,等. 大鼠心肌梗死模型的建立及梗死后心电生理和左室功能的变化[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17 (6): 419-423,插3-插4.
- 陈孝东,曹勇军. 动脉粥样硬化的抗炎治疗进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14 (11): 1229-1230.
- 陈岩,杨关林,白雪松,等. 穴位注射骨髓间充质干细胞对急性心肌梗死模型大鼠血流动力学的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (4): 223-226.
- 杜秋明,李忠诚,王贵荣,等. 丹参酮ⅡA 磺酸钠对大鼠心肌缺血/再灌注心律失常的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (3): 183-184.
- 王全权,陈海林,黄慧敏. 复方丹参注射液佐治冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11 (5): 316.
- Li XF, Wang YP. Laser Doppler flowmetry for assessment of myocardial microperfusion in the beating rat heart [J]. Vascul Pharmacol, 2007, 46 (3): 207-214.
- Charlagorla P, Liu J, Patel M, et al. Loss of plasma membrane integrity, complement response and formation of reactive oxygen species during early myocardial ischemia/reperfusion [J]. Mol Immunol, 2013, 56 (4): 507-512.
- Lowenstein CJ. Myocardial reperfusion injury [J]. N Engl J Med, 2007, 357 (23): 2409.
- Siddiqui AH, Gulati R, Tauheed N, et al. Correlation of Waist-to-hip Ratio (WHR) and Oxidative Stress in Patients of Acute Myocardial Infarction (AMI) [J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8 (1): 4-7.
- Quan W, Yin Y, Xi M, et al. Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33 (1): 85-91.
- 陈少如,郑鸿翱,陈韩秋,等. 益母草制剂治疗心肌缺血及其机制研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14 (1): 19-22.
- Zhang JP, Zhang YY, Zhang Y, et al. Salvia miltiorrhiza (Danshen) injection ameliorates iron overload-induced cardiac damage in mice [J]. Planta Med, 2013, 79 (9): 744-752.
- 胡旭光,相湘,杨超燕,等. 丹酚酸 B 对实验性大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 广东医学, 2010, 31 (3): 334-336.
- Bi H, Yang Y, Huang J, et al. Immunohistochemical detection of S100A1 in the postmortem diagnosis of acute myocardial infarction [J]. Diagn Pathol, 2013, 8: 84.
- Wright NT, Cannon BR, Zimmer DB, et al. S100A1: Structure, Function, and Therapeutic Potential [J]. Curr Chem Biol, 2009, 3 (2): 138-145.

(收稿日期: 2014-05-03)

(本文编辑:李银平)