

人参皂苷 Rb1 激活蛋白酪氨酸激酶 2/信号传导及转录激活蛋白 3 通路减轻川崎病小鼠心肌损伤

齐双辉¹ 张敬莹² 肖锋² 魏兵¹ 马俊¹ 刘宁¹

¹ 北部战区总医院新生儿科, 沈阳 110015; ² 沈阳药科大学中药学院中药分析教研室, 沈阳 110016

通信作者: 魏兵, Email: weib71@sina.com

【摘要】 目的 探讨人参皂苷 Rb1 对川崎病小鼠心肌损伤的治疗作用及其信号通路。**方法** 将 5~6 周龄 BALB/C 小鼠随机分为对照组、模型组、阿司匹林组、人参皂苷 Rb1 低剂量组 (50 mg/kg) 和高剂量组 (100 mg/kg), 每组 12 只。除对照组外, 其他各组均间断性腹腔注射 10% 牛血清白蛋白生理盐水溶液, 以诱发川崎病心肌损伤病理模型, 共计 6 d, 每天 2 次; 阿司匹林组、Rb1 低剂量组和高剂量组分别在造模后给予相应药物灌胃 20 d。苏木精-伊红染色观察心肌组织病理变化; ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1 β 和白细胞介素-6 等炎症因子及心肌肌钙蛋白 I 水平变化; 酶偶联法检测肌酸激酶、肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶、 α -羟丁酸脱氢酶和谷草转氨酶活力; Western blot 法检测蛋白酪氨酸激酶/信号传导及转录激活蛋白 (janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAKs/STATs) 信号通路相关蛋白的表达水平。**结果** Rb1 高剂量显著改善了模型组的心肌纤维断裂和撕裂, 以及细胞炎性浸润和坏死等症状。ELISA 结果显示, 和模型组相比, Rb1 高剂量可以显著抑制肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 及-1 β 的高表达, 均恢复到对照组水平, 且低、高剂量组之间有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。Rb1 高剂量组的肌酸激酶、肌酸激酶同工酶-MB、乳酸脱氢酶、 α -羟丁酸脱氢酶和谷草转氨酶五种酶均恢复到对照组水平, 而且低、高剂量组之间有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。同时, 和模型组相比, Rb1 高剂量组显著下调了肌钙蛋白 I 的表达水平 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 和模型组相比, Rb1 高剂量显著上调了 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 B 淋巴细胞瘤蛋白-2/ β -肌动蛋白 (B-cell lymphoma-2/ β -actin, Bcl-2/ β -actin) 的相对表达水平, 同时显著下调了裂解半胱天冬氨酸蛋白酶-3/ β -肌动蛋白 (Cleaved caspase-3/ β -actin) 的表达水平, 而且低、高两个剂量组之间有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rb1 可有效减轻川崎病小鼠的心肌损伤, Rb1 高剂量组均恢复到对照组水平, 且疗效与 Rb1 使用剂量有关。作用机制可能是人参皂苷 Rb1 激活 JAK2/STAT3/Bcl-2 信号通路, 下调促凋亡相蛋白 Cleaved caspase-3 表达, 抑制心肌细胞凋亡和炎症。

【关键词】 人参皂苷 Rb1; 川崎病; 心肌损伤; 抗炎; 信号通路

基金项目: 2018 年辽宁省科技计划项目 (2018225070)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2021.03.010

Ginsenoside Rb1 activates janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 pathway to reduce myocardial injury in mice with Kawasaki disease

Qi Shuanghui¹, Zhang Jingying², Xiao Feng², Wei Bing¹, Ma Jun¹, Liu Ning¹

¹ Department of Neonatology, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110015, China;

² Department of Traditional Chinese Medicine Analysis, College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Corresponding author: Wei Bing, Email: weib71@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effect and signaling pathway of ginsenoside Rb1 on myocardial injury in mice with Kawasaki disease. **Methods** BALB/C mice aged 5-6 weeks were randomly divided into control group, model group, aspirin group, ginsenoside Rb1 low dose group (50 mg/kg) and high dose group (100 mg/kg), with 12 mice in each group. Except the control group, other groups were treated with intermittent intraperitoneal injection of 10% bovine serum albumin saline solution to induce Kawasaki disease myocardial injury pathological model with a total of 6 days (twice a day); aspirin group, Rb1 low and high-dose group were given corresponding drugs by gavage for 20 days after modeling. The pathological changes of myocardial tissue were observed by hematoxylin eosin staining. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and cardiac troponin I (cTnI) in serum and myocardial tissue were detected by ELISA. The activities of creatine kinase (CK), creatine kinase

isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), α -hydroxybutyrate dehydrogenase (α -HBDH) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected by enzyme coupling method. The expression levels of janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway related proteins in myocardial tissue were detected by Western blot. **Results** High dose of Rb1 significantly improved myocardial fiber rupture and tear, inflammatory infiltration and necrosis induced by myocardial injury in model group. ELISA results showed that, compared with the model group, high-dose Rb1 could significantly inhibit the high expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-6, which were restored to the level of the control group, and there was a dose-dependent relationship between the low and high-dose groups ($P < 0.05$). The results of enzyme coupling method showed that creatine kinase, creatine kinase isoenzyme-MB, lactate dehydrogenase, α -hydroxybutyrate dehydrogenase, and aspartate aminotransferase in Rb1 high-dose group were restored to the level in control group, and there was a dose-dependent relationship between low and high-dose group ($P < 0.05$). At the same time, compared with model group, Rb1 high-dose group significantly down regulated the expression level of cardiac troponin I ($P < 0.05$). Western blot results showed that, compared with the model group, Rb1 significantly increased the relative expression levels of p-JAK2/JAK2, p-STAT3/STAT3 and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)/ β -actin, and significantly decreased the expression levels of Cleaved caspase-3/ β -actin in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 can effectively reduce the myocardial injury induced by Kawasaki disease mice. The high-dose group of Rb1 can recover to the level of the control group, and the curative effect is related to the dosage of Rb1. Ginsenoside Rb1 may activate JAK2/STAT3/Bcl-2 signaling pathway, thus down regulate the expression of Cleaved caspase-3, and inhibit cardiomyocyte apoptosis and inflammation.

【Key words】 Ginsenoside Rb1; Kawasaki disease; Myocardial injury; Anti-inflammatory; Signaling pathway

Fund program: Science and Technology Projects of Liaoning Province in 2018 (201822J070)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2021.03.010

川崎病 (Kawasaki disease, KD), 又名皮肤黏膜淋巴结综合征, 是一种多累及 5 岁以下儿童的急性发热出疹性疾病, 其最常见并发症为冠状动脉损伤和心肌损伤 (myocardial injury, MI)^[1]。既往研究较多关注 KD 患儿冠状动脉损伤, 对 MI 未给予充分重视。放射性核素检查发现, 50% ~ 70% 的 KD 急性期患儿存在 MI^[2]。临床显示 KD-MI 的病理改变主要为肌原纤维断裂及溶解, 心肌细胞的水肿、变性和坏死, 以及炎性浸润等^[3]。尽管有明确的临床报道, 但 KD 诱发 MI 的机制尚不明确^[4-5]。研究发现 MI 和炎症及免疫调节失衡有关^[6-7], 调控血清及心肌组织中的炎症因子水平, 或可有助于探讨 KD-MI 的发病进程和治疗机制。

人参皂苷 Rb1 可通过多途径调节细胞因子释放和蛋白表达, 减轻机体炎症和 MI 等^[8]。而目前 Rb1 与 KD 小鼠模型相关联的研究很少, 且没有涉及 MI 及相关作用机制^[9-10]。蛋白酪氨酸激酶/信号传导及转录激活蛋白 (janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAKs/STATs) 是调节细胞凋亡的经典通路, 具体表现为 p-JAKs 可间接磷酸化其下游 STATs 蛋白, 进而转入核内, 转录合成效应底物^[11]。作为抗凋亡基因, B 淋巴细胞瘤蛋白-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 是 p-STATs 下游主要效应因子之一。缺血预处理可以通过 JAK2/STAT3 激活 STAT3, 上调 Bcl-2 蛋

白的表达, 抑制心肌细胞凋亡和坏死^[12]。而 Caspase-3 是目前已知的凋亡最终执行因子, 其活化形式裂解半胱天冬氨酸蛋白酶-3 (Cleaved caspase-3) 被认为是细胞凋亡的 marker 蛋白^[13]。但人参皂苷 Rb1 减轻 KD-MI 细胞凋亡, 是否与激活 JAK2/STAT3/Bcl-2 信号通路调控 Cleaved Caspase 3 表达有关, 尚未见报道。

本研究综合参考 KD 建模方法及诱发 MI 相关研究^[10,14-15], 采用 BALB/C 小鼠腹腔注射 10% 牛血清白蛋白 (BSA) 生理盐水溶液, 制备 KD 诱发 MI 模型。通过给予人参皂苷 Rb1, 检测相关炎症因子、心肌酶和蛋白表达水平, 旨在探讨 Rb1 可否激活 JAK2/STAT3/Bcl-2 通路发挥抗 KD-MI 活性及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶 (creatine kinase isoenzyme, CK-MB)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、 α -羟丁酸脱氢酶 (α -hydroxybutyrate dehydrogenase, α -HBDH) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒均购于上海酶联生物科技有限公司; 心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所; JAK2、STAT3、Bcl-2、Cleaved

caspase-3 和 β -actin 等抗体均购于美国 Cell Signaling Technology 公司; 人参皂苷 Rb1 标准品(质量分数 $\geq 98\%$) 和 BSA(纯度 $> 98\%$) 购自大连美仑生物技术有限公司。

1.2 主要仪器 Mdel-680 型多功能酶标仪购于美国 Bio-Rad 公司, 7060C 全自动生化分析仪购于日本 HITACHI 公司(心肌酶测定)。

1.3 动物模型建立及给药 雄性 5 ~ 6 周龄 BALB/C 小鼠(16 ~ 25 g) 购自沈阳药科大学动物实验中心(使用许可证号: SYPU-IACUC-C2018-10-29-101, 质量合格证号: 211002300036004)。适应性喂养 7 d 后, 将小鼠随机分成 5 组($n = 12$); 对照组、KD 模型组、阿司匹林组、人参皂苷 Rb1 低剂量组(50 mg/kg) 和高剂量组(100 mg/kg)。分别于实验开始的 1、3、5、7、9 和 11 d 间断性造模(每天 2 次, 腹腔注射 10% BSA 生理盐水), 除对照组以生理盐水按 0.1 mL 生理盐水/10 g 体重进行腹腔注射外, 其余各组均以 10% BSA 生理盐水溶液, 按照 0.1 mL 溶液/10 g 体重进行腹腔注射。于第 12 天开始, 除对照组和模型组分别用相应体积的 0.5% CMC-Na(羧甲基纤维素钠) 水溶液灌胃外, 其余各组分别使用阿司匹林(前 3 d 455 mg/kg, 后 17 d 45.5 mg/kg), 人参皂苷 Rb1 低剂量和高剂量(溶于 0.5% CMC-Na 水溶液中), 按照 0.1 mL/10 g 体重灌胃, 每天 1 次。在灌胃后第 20 天取材, 检测相关指标。

1.4 样品收集 实验结束后, 每组随机选取 6 只小鼠进行眼球取血, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存以用于生化指标的检测; 然后处死上述 6 只小鼠, 取心脏, 用生理盐水等漂洗, 将心脏置于 4% 多聚甲醛中, 室温保存, 用于制作病理切片。每组其余 6 只小鼠处死开胸, 将心脏用生理盐水漂洗, 然后加入 PBS 溶液, 置于冰浴中, 细胞破碎仪超声破碎, 制成组织匀浆液, 离心, 取上清液, 即得心肌组织匀浆待测样本。

1.5 组织病理学切片观察 心脏组织被保存在含 0.1 mol/L 磷酸缓冲液的 4% 多聚甲醛中 48 h, 脱水、包埋、切片, 采用苏木精-伊红(HE) 染色, 光学显微镜下观察。

1.6 炎症因子水平测定 采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症相关因子水平, 用酶标仪测定各孔的吸光度值; 采用酶偶联法检测 CK、CK-MB、LDH、 α -HBDH 和 AST/GOT 的酶活力; 采用 ELISA 法检测心肌肌钙蛋白 I。

1.7 Western blot 检测蛋白表达 采用 Western blot 法检测 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3、Bcl-2/ β -actin 和 Cleaved caspase-3/ β -actin 等蛋白的相对表达水平。使用 Image Pro plus 6.0 软件进行 IOD 值分析, 比较各组蛋白水平差异。

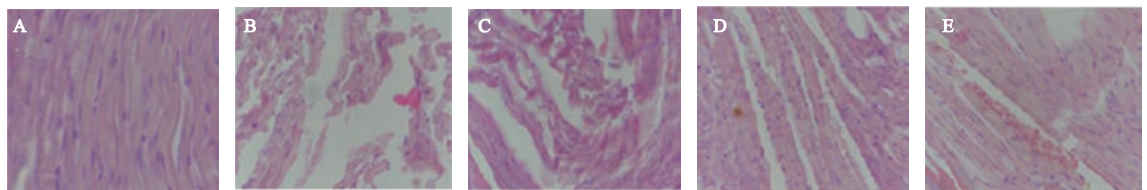
1.8 统计学分析 采用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料采用均数 \pm 标准差($Mean \pm SD$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One way ANOVA), 再采用 Bonferroni t 检验分析组间差别, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rb1 对 KD 小鼠心肌组织病理形态的影响 通过 HE 染色观察, 对照组的心肌纤维排列整齐, 细胞排列有序紧密, 细胞核呈卵圆形, 胞浆鲜红; 模型组可见肌原纤维断裂和溶解, 间质纤维化和组织坏死, 细胞排列紊乱, 出现水肿和坏死等, 细胞核大小不一, 有炎性浸润等; 阿司匹林组的心肌撕裂得到部分缓解; Rb1 低剂量组的肌原纤维断裂和细胞损伤得到部分抑制; 而 Rb1 高剂量组, 心肌细胞排列有序、紧密; 心肌纤维断裂和撕裂得到了显著缓解。见图 1。

2.2 人参皂苷 Rb1 对各组小鼠血清及心肌组织中相关炎症因子的影响 与对照组相比, 模型组、Rb1 低剂量组小鼠血清及心肌组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著增加($P < 0.05$); 和模型组相比, Rb1 高剂量组中上述三种炎症因子均显著下降($P < 0.05$), 而且 Rb1 低、高两个剂量组之间差异显著($P < 0.05$), 提示存在剂量依赖性。见表 1。

2.3 人参皂苷 Rb1 对各组小鼠血清中 CK、CK-MB、LDH、 α -HBDH 和 AST 等酶活力的影响 与对照组相比, 模型组、Rb1 低剂量组小鼠心肌组织中 CK、CK-MB、LDH、 α -HBDH 和 AST 酶活



A: 对照组; B: 模型组; C: 阿司匹林组; D: Rb1 低剂量组; E: Rb1 高剂量组。

图 1 人参皂苷 Rb1 对川崎病小鼠心肌组织形态的影响(HE 染色, $\times 400$)

表 1 各组小鼠血清及心肌组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平变化比较 (Mean ± SD, pg/mL, n = 6)

组别	TNF-α		IL-1β		IL-6	
	血清	心肌	血清	心肌	血清	心肌
对照组	83.426 ± 0.655	90.612 ± 1.753	76.586 ± 1.564	87.261 ± 1.403	69.477 ± 3.009	73.167 ± 2.105
模型组	94.082 ± 1.544 ^a	98.451 ± 1.533 ^a	83.826 ± 2.591 ^a	100.105 ± 1.375 ^a	96.927 ± 3.018 ^a	88.538 ± 3.160 ^a
阿司匹林组	78.038 ± 2.016 ^b	92.781 ± 0.353 ^b	75.820 ± 1.017 ^b	93.740 ± 1.837 ^b	73.178 ± 1.125 ^b	80.622 ± 1.597 ^b
Rb1 低剂量组	93.135 ± 3.327 ^{ac}	94.168 ± 3.948 ^{abc}	85.709 ± 2.027 ^{ac}	96.540 ± 1.602 ^{ab}	90.271 ± 1.936 ^{abc}	91.803 ± 2.731 ^{ac}
Rb1 高剂量组	86.457 ± 1.602 ^{bcd}	91.064 ± 0.528 ^b	79.845 ± 3.788 ^{bd}	86.725 ± 1.089 ^{bd}	71.654 ± 4.836 ^{bd}	77.863 ± 3.474 ^{bd}
F 值	98.006	61.217	32.053	106.652	79.731	83.416
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:TNF-α:肿瘤坏死因子-α;IL-1β:白细胞介素-1β;IL-6:白细胞介素-6;与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与阿司匹林组比较,^c*P* < 0.05;与 Rb1 低剂量组比较,^d*P* < 0.05。

表 2 各组小鼠血清中 CK、CK-MB、LDH、α-HBDH、AST 酶活力及 cTnI 水平的差异 (Mean ± SD, n = 6)

组别	CK (pg/mL)	CK-MB (pg/mL)	LDH (pg/mL)	α-HBDH (pg/mL)	AST (pg/mL)	cTnI (ng/mL)
对照组	84.427 ± 1.350	15.697 ± 1.177	0.835 ± 0.067	36.312 ± 1.006	84.690 ± 1.721	0
模型组	99.286 ± 1.644 ^a	25.819 ± 1.636 ^a	1.549 ± 0.038 ^a	45.097 ± 1.840 ^a	101.720 ± 2.088 ^a	1.73 ± 0.02 ^a
阿司匹林组	89.031 ± 2.166 ^b	20.058 ± 1.093 ^b	1.102 ± 0.519 ^b	38.907 ± 2.004 ^b	85.276 ± 1.230 ^b	0.81 ± 0.03 ^b
Rb1 低剂量组	95.652 ± 1.672 ^{ac}	22.138 ± 0.145 ^{ab}	1.286 ± 0.027 ^{ab}	40.598 ± 1.654 ^{ab}	94.296 ± 2.759 ^{abc}	1.20 ± 0.09 ^{abc}
Rb1 高剂量组	86.120 ± 3.084 ^{bd}	18.624 ± 0.858 ^{bd}	0.976 ± 0.713 ^{bd}	34.373 ± 1.0907 ^{bcd}	88.653 ± 1.381 ^{bd}	0.30 ± 0.01 ^{bcd}
F 值	63.684	53.308	28.817	115.792	87.413	82.325
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:CK:肌酸激酶;CK-MB:肌酸激酶同工酶;LDH:乳酸脱氢酶;α-HBDH:α-羟丁酸脱氢酶;AST:谷草转氨酶;cTnI:心肌肌钙蛋白 I;与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与阿司匹林组比较,^c*P* < 0.05;与 Rb1 低剂量组比较,^d*P* < 0.05。

表 3 各组小鼠心肌组织中 JAK2、STAT3、Bcl-2 和 Cleaved caspase-3 相对蛋白表达比较 (Mean ± SD, n = 6)

组别	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3	Bcl-2/β-actin	Cleaved Caspase-3/β-actin
对照组	1.000 ± 0.056	1.000 ± 0.012	1.000 ± 0.063	1.000 ± 0.035
模型组	0.445 ± 0.028 ^a	0.608 ± 0.053 ^a	0.673 ± 0.049 ^a	1.811 ± 0.010 ^a
阿司匹林组	0.846 ± 0.020 ^b	1.371 ± 0.065 ^b	1.137 ± 0.184 ^b	1.280 ± 0.131 ^b
Rb1 低剂量组	0.902 ± 0.017 ^c	1.206 ± 0.128 ^c	1.138 ± 0.195 ^c	1.392 ± 0.036 ^c
Rb1 高剂量组	1.560 ± 0.013 ^{abc}	1.742 ± 0.050 ^{abc}	1.860 ± 0.023 ^{abc}	1.091 ± 0.064 ^{bc}
F 值	36.740	91.031	113.822	40.505
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:JAK2:蛋白酪氨酸激酶 2; STAT3:信号传导及转录激活蛋白 3; Bcl-2:B 淋巴细胞瘤蛋白-2; β-actin:β-肌动蛋白;Cleaved Caspase-3:裂解半胱天冬氨酸蛋白酶-3;与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与阿司匹林组比较,^c*P* < 0.05;与 Rb1 低剂量组比较,^d*P* < 0.05。

力水平均显著增加 (*P* < 0.05);和模型组相比,Rb1 高剂量组中上述五种酶活力水平均显著下降 (*P* < 0.05);Rb1 低、高两个剂量组之间差异显著 (*P* < 0.05),提示存在剂量依赖性;而且阿司匹林组和 Rb1 高剂量组的五种酶活力均恢复到对照组水平。见表 2。

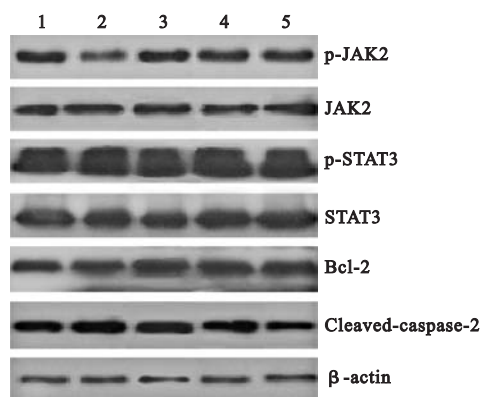
2.4 人参皂苷 Rb1 对各组小鼠血清中 cTnI 水平的影响 与对照组相比,模型组、Rb1 低和高剂量组小鼠血清中 cTnI 水平均显著增加 (*P* < 0.05);与模型组相比,Rb1 高剂量组的 cTnI 水平均显著下降 (*P* < 0.05);与 Rb1 低剂量组及阿司匹林组相比,Rb1 高剂量组中的 cTnI 水平均显著下降 (*P* < 0.05)。见表 2。

2.5 人参皂苷 Rb1 对各组小鼠心肌组织中凋亡相关蛋白水平的影响 与对照组相比,模型组的

p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 Bcl-2/β-actin 表达水平均显著下降 (*P* < 0.05),Cleaved caspase-3/β-actin 表达水平显著上升 (*P* < 0.05)。与模型组相比,Rb1 高剂量组的上述 p-JAK2/JAK2 等三个蛋白的相对表达水平均显著上升 (*P* < 0.05),而 Cleaved caspase-3/β-actin 表达水平显著下降 (*P* < 0.05),且 Rb1 低、高剂量组之间差异显著 (*P* < 0.05),提示存在剂量依赖性。见表 3,图 2。

3 讨论

关于 KD 的建模方法有较多参考,但是对 KD 状态下诱发 MI,以往研究缺乏明确的结论和实验依据,所以鲜见 KD 诱发 MI 的相关报道。目前仅 3 篇文献^[15-17]采用大鼠腹腔注射干酪乳杆菌细胞壁成分,模拟 KD 诱发 MI 的临床表现。而本文的前期研究采用小鼠腹腔注射 10% BSA 生理盐水溶液,成功制备 KD 冠状动脉损伤模型的同



1:对照组;2:模型组;3:阿司匹林组;4:Rb1 低剂量组;5:Rb1 高剂量组。

图 2 Western blot 法检测各组小鼠心肌细胞的凋亡相关蛋白相对表达变化电泳图

时,发现部分小鼠被诱发了 MI^[10]。综合参考,本实验采用腹腔注射 10% BSA 生理盐水溶液,免疫诱导小鼠 KD-MI。模型组结果可见 MI 的典型病理症状,同时心肌组织和血清中炎症因子含量显著上升,心肌酶及 cTnI 的高表达,均表明心肌细胞凋亡和炎性反应明显增加,证明造模成功。本研究首次采用腹腔注射 10% BSA 建立小鼠 KD-MI 模型,为建模方法提供新的参考。

TNF- α 通过破坏心肌胶原和增加变性心肌胶原纤维数量,诱导细胞外基质发生变化,促进心肌细胞凋亡,参与 MI 炎症反应^[18-19]。IL-6 参与炎症细胞的活化和募集,通过心肌一氧化氮合酶发挥负向肌力作用^[20]。而在缺血再灌注造成的 MI 中,IL-1 β 蛋白的表达显著增加^[20]。有研究报道, KD 患儿体内单核/巨噬细胞激活,产生大量的炎症因子,引起心肌细胞凋亡增加,导致 MI 障碍^[21]。实验结果显示,模型组的 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 维持在高水平,提示这三种炎症因子参与了 KD 心肌炎性损伤过程。而 Rb1 高剂量可以显著抑制 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 的高表达。本研究结果与 KD-MI 患儿临床炎症因子的变化趋势一致^[22],说明人参皂苷 Rb1 有良好的抗心肌炎症作用。

心肌酶主要存在于心肌细胞内,血清中 CK-MB 等心肌酶的高表达,意味着 MI 程度加深^[23]。cTnI 作为心肌肌钙蛋白的一种存在形式,仅来源于心肌。血清中 cTnI 的微小含量变化,即可判断心肌受损^[24]。在 KD 患儿合并 MI 的初步诊断、治疗和预后,cTnI 扮演着“金标准”的角色。酶含量结果显示,Rb1 高剂量组的 CK、CK-MB、LDH、 α -HBDH 和 AST 等五种酶均恢复到对照组水平,而且低、高剂量组之间有剂量依赖性 ($P <$

0.05)。同时,本研究首次检测小鼠 KD-MI 模型的 cTnI 含量,结果显示 Rb1 高剂量组显著下调了 cTnI 的高表达水平。可见人参皂苷 Rb1 具有显著的修复受损心肌细胞的生物学活性。

JAK2/STAT3 信号通路广泛参与组织增殖、分化、炎症及凋亡等过程^[25]。心肌缺血缺氧及再灌注等可激活 JAK2/STAT3 信号通路,介导心肌保护作用^[26]。鉴于人参皂苷 Rb1 对诸多疾病诱发 MI 的抑制作用,本研究推测其也可能通过 JAK2/STAT3 信号通路级联介导,抑制 KD 心肌细胞凋亡。本研究显示,Rb1 高剂量显著上调了 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 Bcl-2/ β -actin 的相对表达水平,同时显著下调了 Cleaved caspase-3/ β -actin 的表达水平。心肌细胞凋亡的关键环节是 Caspase 家族蛋白酶的激活。Caspase-3 是最重要的凋亡执行因子,其活化形式为 Cleaved caspase-3^[13]。作为细胞凋亡的 marker 蛋白,Cleaved caspase-3 标志着细胞凋亡进入不可逆阶段。而 Bcl-2 蛋白位于线粒体上游,是目前已知的细胞凋亡中最重要的调控基因,其高表达可下调 Cleaved caspase-3,抑制心肌细胞凋亡^[27]。因此由结果推测,Rb1 高剂量激活 JAK2/STAT3/Bcl-2 通路,下调促凋亡蛋白 Cleaved caspase-3 的表达,抑制心肌细胞凋亡和炎症造成的细胞坏死,缓解 KD-MI。

综上所述,本研究提示人参皂苷 Rb1 通过调控 JAK2/STAT3/Bcl-2 通路相关蛋白的表达,抑制心肌细胞凋亡及发挥抗炎作用,减轻 KD-MI。为阐明 KD 诱发 MI 的作用机制提供了实验数据参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 黄国英. 川崎病流行病学研究进展和思考[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(9): 641-644. DOI: 10.3969/j. issn. 1005-2224. 2006. 10. 001.
- [2] 刘琳, 丁文惠. 川崎病的心脏损害及治疗现状[J]. 中国心血管杂志, 2013, 18(4): 311-313. DOI: CNKI: SUN: XIXG. 0. 2013-04-028.
- [3] McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, et al. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Scientific Statement for Health Professionals From the American Heart Association [J]. Circulation, 2017, 135(17): e927-e999. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000484.
- [4] 牛超, 王琳琳, 贾尝, 等. 川崎病发生机制研究[J]. 中国小儿急救医学, 2020, 27(9): 645-649. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1673-4912. 2020. 09. 002.
- [5] 梁妍琰, 张晓梅, 朱华, 等. 不同年龄谱的川崎病患儿 90 例临床特征研究[J]. 中国小儿急救医学, 2017, 24(3): 235-238. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 1673-4912. 2017. 03. 017.
- [6] 张乾忠, 祝华. 儿童心肌损伤及心肌炎诊治中的几个临床热

点问题[J]. 中国小儿急救医学, 2018, 25(9): 641-646. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4912.2018.09.001.

[7] 徐标, 孙璇. 炎症在心肌损伤和修复中的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(7): 633-635. DOI: 10.13201/j.issn.1001-1439.2018.07.001.

[8] Cui YC, Pan CS, Yan L, et al. Ginsenoside Rb1 protects against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury via energy metabolism regulation mediated by RhoA signaling pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7: 44579. DOI: 10.1038/srep44579.

[9] 邹悦, 康乃馨, 王彦儿, 等. 人参皂苷 Rb1 对川崎病小鼠治疗作用的研究[J]. 中医药学报, 2017, 45(6): 40-44. DOI: CNKI:SUN:ZYXB.0.2017-06-011.

[10] 齐双辉, 肖锋, 魏兵, 等. 人参皂苷 Rb1 对川崎病小鼠冠状动脉损伤的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2020, 22(9): 1034-1040. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2003147.

[11] Wang K, Li B, Xie Y, et al. Statin rosuvastatin inhibits apoptosis of human coronary artery endothelial cells through upregulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3): 2052-2062. DOI: 10.3892/mmr.2020.11266.

[12] Tian Y, Zhang W, Xia D, et al. Postconditioning inhibits myocardial apoptosis during prolonged reperfusion via a JAK2-STAT3-Bcl-2 pathway[J]. J Biomed Sci, 2011, 18(1): 53. DOI: 10.1186/1423-0127-18-53.

[13] Kang SJ, Sanchez I, Jing N, et al. Dissociation between neurodegeneration and caspase-11-mediated activation of caspase-1 and caspase-3 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. J Neurosci, 2003, 23(13): 5455-5460. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-13-05455.2003.

[14] 何云, 魏钰书, 杨锡强. 川崎病的动物模型及其发病机制研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2007, 34(1): 64-66. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4408.2007.01.023.

[15] 石墨玲, 殷玥, 李晨, 等. 脂质运载蛋白 2 促进胶原沉积和炎症反应参与川崎病导致心肌损伤的实验研究[J]. 心脏杂志, 2019, 31(2): 131-138. DOI: 10.12125/j.chj.201806036.

[16] 王浩, 袁子焰, 殷玥, 等. 白藜芦醇激活 Sirt1/Nrf2 信号减轻川崎病诱发的心肌损伤[J]. 心脏杂志, 2019, 31(6): 633-637. DOI: 10.12125/j.chj.201905037.

[17] 熊凤梅, 孔令恒, 孙娜, 等. 白藜芦醇激活 Notch1/Hes1 信号减轻大鼠川崎病诱发心肌损伤的机制[J]. 武警医学, 2020, 31(11): 926-930. DOI: 10.14010/j.cnki.wjyx.2020.11.002.

[18] Tian M, Yuan YC, Li JY, et al. Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review[J]. Chronic Dis Transl Med, 2015, 1(1): 18-26. DOI: 10.1016/j.cdtm.2015.02.002.

[19] Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL, et al. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor- κ B and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine[J]. Circulation, 2001, 103(18): 2296-2302. DOI: 10.1161/01.cir.103.18.2296.

[20] Jong WMC, Ten Cate H, Linnenbank, et al. Reduced acute myocardial ischemia-reperfusion injury in IL-6-deficient mice employing a closed-chest model[J]. Inflamm Res, 2016, 65(6): 489-499. DOI: 10.1007/s00011-016-0931-4.

[21] Kim DS. Kawasaki disease[J]. Yonsei Med J, 2006, 47(6): 759-772. DOI: 10.3349/ymj.2006.47.6.759.

[22] 汪芸, 崔小岱, 伏瑾, 等. 川崎病心肌和冠状动脉损伤与血清 TNF- α 和 IL-6 水平的研究[J]. 北京医学, 2011, 33(5): 395-398. DOI: CNKI:SUN:BJYX.0.2011-05-018.

[23] Woo AY, Cheng CH, Waye MM. Baicalein protects rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation damage via a prooxidant mechanism[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(1): 244-253. DOI: 10.1016/j.cardiores.2004.09.027.

[24] Kiely PD, Bruckner FE, Nisbet JA, et al. Serum skeletal troponin I in inflammatory muscle disease: relation to creatine kinase, CKMB and cardiac troponin I[J]. Ann Rheum Dis, 2000, 59(9): 750-751. DOI: 10.1136/ard.59.9.750.

[25] Goodman MD, Koch SE, Fuller-Bicer GA, et al. Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(4): 1649-1656. DOI: 10.1152/ajpheart.00692.2008.

[26] Sawashita Y, Hirata N, Yoshikawa Y, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through unacylated ghrelin-induced activation of the JAK/STAT pathway[J]. Basic Res Cardiol, 2020, 115(4): 50. DOI: 10.1007/s00395-020-0809-z.

[27] 吴祖波, 彭华, 白燕, 等. GYY4137 通过 Bcl-2/Bax/Cleaved caspase-3 信号通路改善柯萨奇病毒 B3 引起的大鼠乳鼠心肌细胞凋亡[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2014, 43(4): 371-375. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2014.04.001.

(收稿日期: 2020-11-24)

(本文编辑: 林楠)

读者 · 作者 · 编者

2021 年本刊可直接用英文缩略语的常用词汇

白细胞(WBC)	呼气末正压(PEEP)	凝血酶原时间(PT)
C-反应蛋白(CRP)	活化部分凝血活酶时间(APTT)	数字减影血管造影(DSA)
磁共振成像(MRI)	活化凝血时间(ACT)	吸气峰压(PIP)
动脉血二氧化碳分压(PaCO ₂)	肌酐(Cr)	吸入氧浓度(FiO ₂)
动脉血氧饱和度(SaO ₂)	肌酸激酶同工酶(CK-MB)	纤维蛋白原(Fib)
动脉血氧分压(PaO ₂)	聚合酶链反应(PCR)	新生儿重症监护病房(NICU)
儿童重症监护病房(PICU)	酶联免疫吸附测定(ELISA)	血红蛋白(Hb)
谷丙转氨酶(ALT)	毛细血管再充盈时间(CRT)	血小板(PLT)
谷草转氨酶(AST)	脑电图(EEG)	血氧饱和度(SpO ₂)
核糖核酸(RNA)	尿素氮(BUN)	一氧化氮(NO)
红细胞(RBC)	凝血酶时间(TT)	重症监护病房(ICU)