

网络出版时间: 2019-5-9 10:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.008.html>

## 促红细胞生成素衍生肽对急性心肌梗死大鼠炎症和 Erk1/2 表达的影响

王世祥<sup>1</sup>, 王 斌<sup>2</sup>, 郭国锋<sup>1</sup>, 许 卫<sup>3</sup>, 陈永权<sup>1</sup>, 陈晞明<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨促红细胞生成素衍生肽(HBSP)对急性心肌梗死(AMI)大鼠心脏炎症的影响和机制。方法 将30只8周龄SD雄性大鼠随机分为3组:假手术组(sham组)、AMI组和HBSP组。采用结扎大鼠冠状动脉前降支术以构建AMI大鼠模型,HBSP组为术后予腹腔注射HBSP(90 μg/kg);sham组和AMI组予等量生理盐水腹腔注射。大鼠处死前心脏彩超检测心功能,处理各组大鼠,检测心肌组织白介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、磷酸化细胞外信号调节激酶1/2(p-Erk1/2)和细胞外调节蛋白激酶1/2(Erk1/2)蛋白表达。结果 与sham组比较,AMI组心肌组织IL-6、TNF-α、p-Erk1/2和Erk1/2蛋白表达明显升高( $P=0.001$ );而HBSP组大鼠心肌组织IL-6、TNF-α、p-Erk1/2和Erk1/2蛋白表达显著减少( $P=0.001$ )。AMI模型组心功能指标显著低于sham组,而HBSP治疗组心功能指标明显高于AMI模型组( $P=0.001$ )。结论 HBSP可减轻心肌梗死炎症和心肌损伤,抑制Erk1/2信号通路,从而保护心肌组织,改善大鼠心功能。

**关键词** 急性心肌梗死;促红细胞生成素衍生肽;Erk1/2;炎症因子;心肌受损

**中图分类号** R 453.9

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)05-0705-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.008

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是心血管疾病患者最常见的死因之一<sup>[1]</sup>。而寻找能有效减轻AMI后炎症反应且副作用少的药物是下一步研究方向。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种由肾脏和肝脏分泌的糖蛋白激素,能促进红细胞生成,也有抗炎、抗凋亡等对组织器官的保护作用<sup>[2]</sup>。然而,有研究<sup>[3]</sup>显示,一次性输注

大量EPO会过度刺激体内骨髓造血系统,增加心血管系统的高凝状态甚至血栓形成。近年有学者研究<sup>[4]</sup>合成促红细胞生成素衍生肽(helix B surface peptide, HBSP),一种EPO衍生而来的螺旋B表面肽,既保留EPO的组织保护作用,具有抗氧化、抑制炎症、减少细胞凋亡的作用,同时也可以减少其副作用。因此,该文以HBSP治疗AMI模型大鼠,探讨HBSP对AMI心肌炎症的影响和机制,为梗死后心肌保护寻找新的治疗方案。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** HBSP购自上海科肽生物科技有限公司;白介素6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;兔抗细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases1/2, Erk1/2)、兔抗磷酸化细胞外信号调节激酶1/2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase1/2, p-Erk1/2)、鼠抗GAPDH购自北京康为世纪生物科技有限公司;羊抗兔二抗和驴抗鼠二抗购自武汉博士德生物工程公司;组织裂解液购自杭州弗德生物科技有限公司;聚氰基丙烯酸正丁酯(butyleyanoacrylate, BCA)蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA)粉末购自广州斯佳生物公司;免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司;POWERLAB多导生理记录仪、心脏彩超机购自美国PHILIPS公司。

**1.2 动物** 采用8周龄SD雄性SPF级大鼠,体质量180~200 g,将30只大鼠随机分成3组:sham组(10只)、AMI组(10只)、HBSP治疗组(10只)。所有大鼠由中山大学实验动物中心提供(合格证号:44008500006902),并饲养于恒温20~26℃、恒湿40%~70%、洁净度7、低噪、无菌的南方医科大学实验动物中心。

### 1.3 方法

**1.3.1 AMI模型构建和给药** 以Olivetti方法结扎冠状动脉左前降支的手术方法以构建大鼠AMI模

2019-01-17 接收

基金项目:广东省科技厅基金项目(编号:201311079);广州市医药卫生科技项目(编号:20161A011079);广州医科大学附属第三医院博士启动项目(编号:2018B13)

作者单位:<sup>1</sup>广州医科大学附属第三医院心内科,广州 510000

<sup>2</sup>菏泽市中医医院放射科,菏泽 274000

<sup>3</sup>花都区人民医院心内科,广州 510000

作者简介:王世祥,男,博士,责任作者, E-mail: 630311325@qq.com

型,观察多导生理记录仪上的标准导联 II,若见 ST 段弓背样抬高和(或) T 波抬高或降低,大鼠周围肌肉组织出现颜色苍白或变暗,则提示建模成功。sham 组大鼠在左前降支留置松结。HBSP 组在结扎左前降支术后立即予 HBSP 工作液(90 μg/kg)<sup>[5]</sup>腹腔注射,sham 组和 AMI 组予等量生理盐水腹腔注射。术后 24 h 动物实验大鼠全部存活,处死进行后续处理。实验符合动物伦理管理委员会要求。

**1.3.2 大鼠心肌组织 IL-6、TNF-α 测定** 建模 24 h 后,取结扎线以下左心室心肌,将心肌组织研磨,组织裂解液裂解细胞,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 IL-6 和 TNF-α ELISA 试剂盒检测心肌组织 IL-6 和 TNF-α 含量。

**1.3.3 Western blot 法检测 p-Erk1/2、Erk1/2 蛋白的表达** 建模 24 h 后,取结扎线以下左心室心肌,将心肌组织研磨,提取心肌组织蛋白,制成蛋白样品,上样后置于电泳缓冲液中电泳,分离目的蛋白,电转 120 min,5% BSA 封闭 1 h 后,p-Erk1/2(1:1 000)、Erk1/2(1:1 000)和 GAPDH(1:4 000)一抗 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后,羊抗兔二抗(1:15 000)或驴抗鼠二抗(1:15 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 显色,曝光扫描,分析光密度。

**1.3.4 免疫组化检测 Erk1/2 蛋白的表达** 石蜡包埋、切片(4 μm),经二甲苯、不同浓度酒精脱蜡,蒸馏水浸泡,微波抗原修复,室温冷却后,过氧化氢、3% BSA 封闭,滴加 Erk1/2 兔抗多克隆抗体(1:200)孵育过夜,滴加二抗免疫组化试剂,DAB 显色,蒸馏水终止显色,苏木精染核 5 min,蒸馏水冲洗,脱水透明,中性树脂封片,镜下随机取 6 个视野(×200)拍照,采用 IPP 6.0 软件统计阳性细胞。

**1.3.5 超声心动图检查** 24 h 后,所有大鼠行超声心动图检查,在处死前,予以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉、备皮,应用超声心动图机(ie33 型号;美国 PHILIPS 公司)及 7.5 MHz 高频线控探头(美国 PHILIPS 公司)行心脏彩超检测,检测左室后壁收缩期厚度(left ventricular posterior wall systolic thickness, LVPWS)、收缩期室间隔厚度(systolic septal thickness, JVSs)、左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPWd)、室间隔厚度(interventricular septal thickness, JVSd)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)指标。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,三组均数间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HBSP 减少 AMI 大鼠心肌组织中 IL-6、TNF-α 的表达** 与 sham 组比较,AMI 组大鼠心肌组织 IL-6 和 TNF-α 蛋白表达显著增加;而 HBSP 组大鼠心肌组织 IL-6 和 TNF-α 蛋白表达均较 AMI 组明显降低( $P = 0.000$ ),表明 HBSP 可缓解急性心肌梗死的心肌的炎症。见图 1。

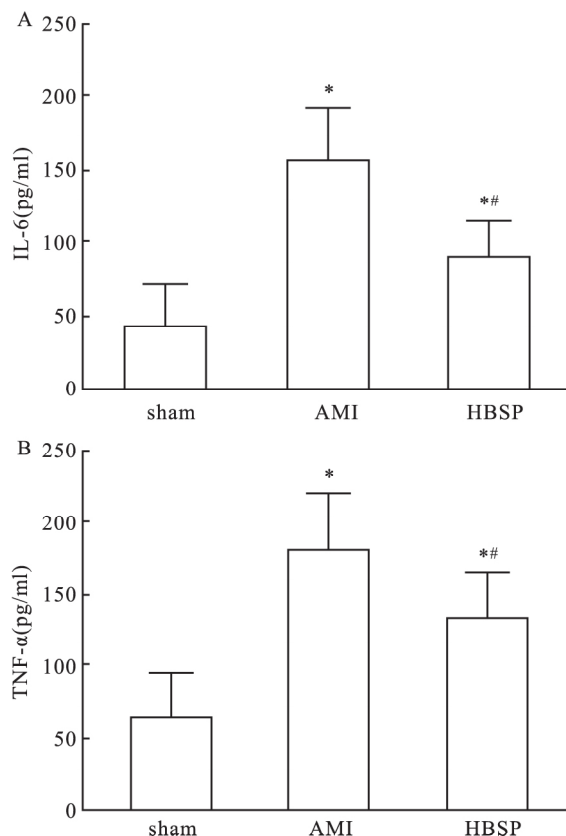


图 1 各组大鼠心肌组织炎症因子的表达情况

A: IL-6 的表达情况; B: TNF-α 的表达情况; 与 sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AMI 组比较: \*\*  $P < 0.05$

## 2.2 HBSP 抑制 AMI 大鼠心肌组织 Erk1/2 通路

**2.2.1 Western blot 检测各组大鼠心肌组织 p-Erk1/2 和 Erk1/2 蛋白表达的变化** Western blot 检测结果显示,与 sham 组比较,AMI 组心肌组织 p-Erk1/2 和 Erk1/2 蛋白表达,以及 p-Erk1/2 与 Erk1/2 比值显著增加;而 HBSP 组心肌组织 p-Erk1/2 和 Erk1/2 蛋白表达,以及 p-Erk1/2 与 Erk1/2 比值则明显低于 AMI 组( $P = 0.001$ )。见图 2。

**2.2.2 TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡结果** Sham 组极少阳性表达细胞;AMI 组可见大量棕黄色细胞;HBSP 组可见部分棕黄色细胞。见图 3。

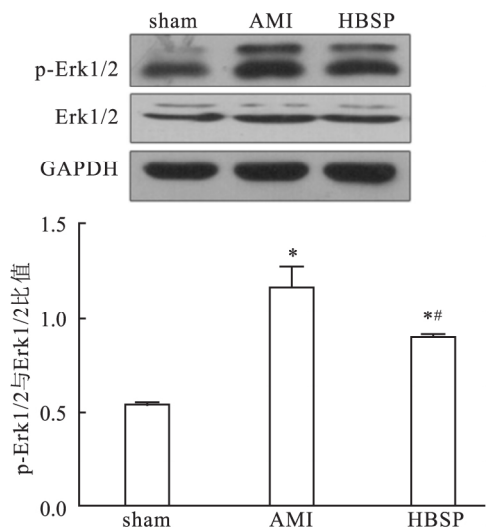


图2 各组大鼠心肌组织 p-Erk1/2 和 Erk1/2 的表达情况  
与 sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AMI 组比较: #  $P < 0.05$

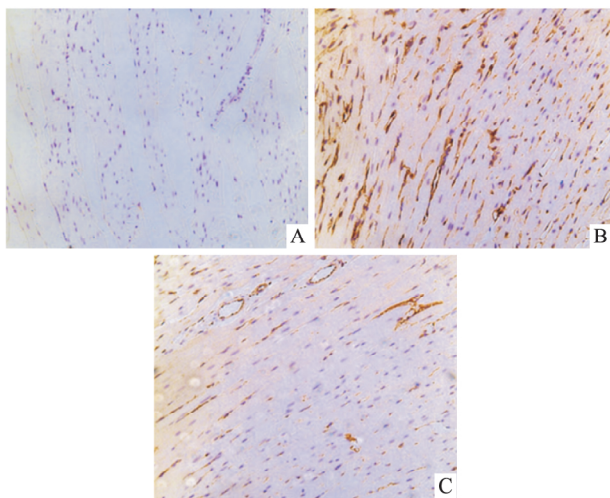


图3 各组大鼠心肌组织 TUNEL 染色情况  $\times 200$   
A: sham 组; B: AMI 组; C: HBSP 组

2.2.3 免疫组化检测各组大鼠心肌组织 Erk1/2 蛋白表达情况 免疫组化结果显示与 sham 组比较, AMI 组心肌组织中 Erk1/2 蛋白表达显著增加; 而 HBSP 组心肌组织中 Erk1/2 蛋白表达明显低于 AMI

组 ( $P = 0.001$ )。见图 4。

2.3 HBSP 对 AMI 大鼠心功能的影响 AMI 组心功能指标显著低于 sham 组, 而 HBSP 治疗组心功能指标明显高于 AMI 模型组 ( $P = 0.001$ )。见图 5、表 1。手术建模后 24 h, 行心脏超声检查, sham 组与 AMI 组大鼠比较, AMI 组 LVPWs、IVSs、LVPWd、IVSd 显著升高、LVEF 降低 ( $P < 0.05$ )。表明 AMI 组大鼠发生心肌重构, 心肌肥厚。建模 24 h 后, 在相同条件下, HBSP 组与 AMI 组 LVPWs、IVSs、LVPWd、IVSd 显著降低, LVEF 显著升高 ( $P < 0.05$ )。表明 HBSP 能够减少心肌损伤, 保护心功能。

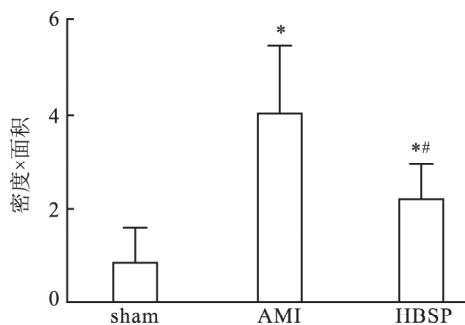


图4 各组大鼠心肌组织 Erk1/2 的表达情况  
与 sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AMI 组比较: #  $P < 0.05$

表1 处死前各组超声心动图各指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	Sham (n = 10)	AMI (n = 10)	HBSP (n = 10)	F 值
LVPWs (cm)	0.30 ± 0.01	0.42 ± 0.02*	0.35 ± 0.02* #	160.120
IVSs (cm)	0.32 ± 0.01	0.40 ± 0.02*	0.39 ± 0.02*	54.127
LVPWd (cm)	0.20 ± 0.01	0.29 ± 0.01*	0.23 ± 0.02* #	83.132
IVSd (cm)	0.20 ± 0.01	0.27 ± 0.01*	0.21 ± 0.02#	67.327
LVEF	0.81 ± 0.02	0.60 ± 0.02*	0.71 ± 0.01* #	443.199

与 sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 AMI 组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

HBSP 是 EPO 衍生而来的表面肽<sup>[6]</sup>, 具有抗炎、抗凋亡、抗氧化等作用。近几年, 越来越多学者通过基础实验和动物实验证明 HBSP 对细胞、组织器官

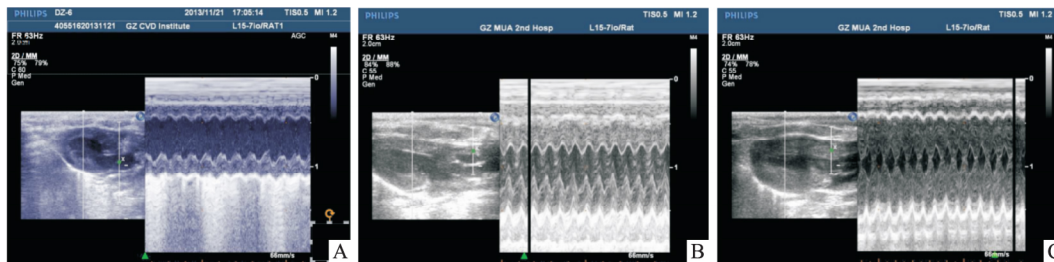


图5 三组大鼠心脏彩超情况  
A: sham 组; B: AMI 组; C: HBSP 组

(如心脏、肾脏、神经等)有重要的保护作用<sup>[5]</sup>,本研究证明了 HBSP 可以减轻炎症反应和下调 Erk1/2 的表达。通过抑制 Erk1/2 信号通路,减少 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达,同时抑制 STAT3 和 Bcl-2 的表达,从而减轻心肌梗死中心肌组织的炎症、凋亡和心肌受损。这为寻找保护心肌提供新的药物选择。

AMI 是冠状动脉急性、持续性缺血低氧导致心肌细胞受损、坏死、凋亡、炎症的过程,该过程伴有心肌酶活性的增高、心电图进行性改变及心功能的改变。其中,心脏彩超是评价心功能的重要辅助检查。本文通过心脏彩超检查心功能。结果发现,HBSP 可减少心肌受损。Erk1/2 是丝裂原活化蛋白激酶的一个亚族。Erk1/2 信号转导通路参与细胞生长、分化、凋亡、炎症反应等密切相关<sup>[7]</sup>。既往文献<sup>[8-9]</sup>报道 p-Erk1/2 信号通路可调控细胞增殖、凋亡、炎症活动。p-Erk1/2 从细胞质进入细胞核作用于核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、转录激活因子等转录因子,后者进一步调节靶基因的转录,其中 NF- $\kappa$ B 可调节各种炎症因子及炎症介质,NF- $\kappa$ B 的激活可引起炎症级联反应,进而调节多种促炎症的细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6;同时 TNF- $\alpha$  亦可激活 Erk1/2 从而放大炎症反应<sup>[10-12]</sup>。有研究<sup>[13-15]</sup>显示,Erk1/2 可通过 NF- $\kappa$ B 促进炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  的转录,后者可激活 Erk1/2 从而形成恶性循环,进一步加强炎症放大级联反应。对于心血管方面,活化的 Erk1/2 信号通路在冠心病致心肌炎症反应及心功能损伤过程中发挥了重要作用,并提出抑制 ERK1/2 信号转导通路可能成为冠心病致心肌炎症反应防治的潜在新靶点<sup>[16]</sup>。本研究通过体内动物实验显示,HBSP 降低心肌组织炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量,减少 AMI 大鼠心肌组织 p-Erk1/2 和 Erk1/2 的表达。此结果提示,HBSP 可通过抑制 Erk1/2 的表达减少炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 以及心肌损伤标志物的释放。

### 参考文献

- [1] Mamata Pochhi, Muddeshwar M G. Serum enzymes markers in myocardial infarction: A study of rural area [J]. *Asian J Med Sci*, 2017, 8(2): 34-7.
- [2] Uden J, Sjolund C, Lansberg J K, et al. Post-ischemic continuous infusion of erythropoietin enhances recovery of lost memory function after global cerebral ischemia in the rat [J]. *BMC Neurosci*, 2013, 14: 27.
- [3] Ferrario M, Arbustini E, Massa M, et al. High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: a pilot, randomised, placebo-controlled study [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 147(1): 124-31.
- [4] Yang C, Zhao T, Lin M, et al. Helix B surface peptide administered after insult of ischemia reperfusion improved renal function, structure and apoptosis through beta common receptor/erythropoietin receptor and PI3K/Akt pathway in a murine model [J]. *Exp Biol Med*, 2013, 238(1): 111-9.
- [5] 游伟,刘映峰,缪绯,等.促红细胞生成素衍生肽对小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用及机制研究[J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(10): 996-9.
- [6] Zhang C, Yang C, Zhu T. From erythropoietin to its peptide derivatives: smaller but stronger [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2017, 18(12): 1191-4.
- [7] 游伟,刘映峰,缪绯,等.促红细胞生成素衍生肽的组织保护作用研究进展[J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(11): 1122-4.
- [8] Lu X, Bijli K M, Ramirez A, et al. Hypoxia downregulates PPAR $\gamma$  via an ERK1/2-NF- $\kappa$ B-Nox4-dependent mechanism in human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 63: 151-60.
- [9] Li L, Li D H, Qu N, et al. The role of ERK1/2 signaling pathway in coronary microembolization-induced rat myocardial inflammation and injury [J]. *Cardiology*, 2011, 117(3): 207-15.
- [10] Martin P. Long-term extracellular signal-related kinase activation following cadmium intoxication is negatively regulated by a protein kinase C-dependent pathway affecting cadmium transport [J]. *FEBS J*, 2009, 276(6): 1667-79.
- [11] Armstrong S C. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cardiovascular Res*, 2004, 61(3): 427-36.
- [12] Weifeng L, Huimin H, Yanmin Z, et al. Anti-inflammatory effect of tetrahydrocoptisine from *Corydalis impatiens* is a function of possible inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-6 and NO production in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715(1-3): 62-71.
- [13] Oh W J, Jung U, Eom H S, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by *Buddleja officinalis* extract in BV-2 microglial cells via negative regulation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling [J]. *Molecules*, 2013, 18(8): 9195-206.
- [14] Abarikwu S O. Kolaviron, a natural flavonoid from the seeds of *Garcinia kola*, reduces LPS-induced inflammation in macrophages by combined inhibition of IL-6 secretion, and inflammatory transcription factors, ERK1/2, NF- $\kappa$ B, p38, Akt, p-c-JUN and JNK [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(7): 2373-81.
- [15] Wei N, Zhang C, He H, et al. Protective effect of saponins extract from *Panax japonicus* on myocardial infarction: involvement of NF- $\kappa$ B, Sirt1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways and inhibition of inflammation [M]. *J Pham Pharmacol*, 2014, 66(11): 1641-51.
- [16] 王菁,徐美林,畅昶,等. ERK1/2 信号转导通路参与冠心病致心肌炎症的机制 [J]. *天津医药*, 2016, 44(8): 938-42.

## Helix B surface peptide attenuates acute myocardial infarction induced-inflammation *via* inhibiting the Erk1/2 pathway

Wang Shixiang<sup>1</sup>, Wang Bin<sup>2</sup>, Guo Guofeng<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Cardiology, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000;

<sup>2</sup>Dept of Radiological, Heze Municipal Hospital of TCM, Heze 274000)

**Abstract Objective** To investigate the effect and mechanism of erythropoietin derived peptide (HBSP) on cardiac inflammation in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Thirty 8 week old SD male rats were randomly divided into 3 groups (sham operation group, operation group and HBSP group). The AMI rat model was established by ligating the anterior descending coronary artery. The HBSP (90 µg/kg) was injected intraperitoneally in the AMI group, and the sham operation group and the AMI group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline. Cardiac function was detected by color Doppler echocardiography before the rats were killed. The expression of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), p-Erk 1/2 and Erk1/2 protein were detected in each group. **Results** Compared with sham group, the expression of IL-6, TNF-α, p-Erk1/2 and Erk1/2 protein in myocardial tissue of AMI group was significantly increased ( $P = 0.001$ ), while that of IL-6, TNF-α, p-Erk1/2 and Erk1/2 protein in myocardial tissue of HBSP group was significantly decreased ( $P = 0.001$ ). The cardiac function index of AMI model group was significantly lower than that of sham group, while that of HBSP treatment group was significantly higher than that of AMI model group ( $P = 0.001$ ). **Conclusion** HBSP can attenuate myocardial infarction inflammation and myocardial damage by inhibiting Erk1/2 signaling pathway, thereby protecting myocardial tissue and improving cardiac function in rats.

**Key words** acute myocardial infarction; helix B surface peptide; Erk1/2; inflammatory factor; myocardial injury

(上接第 704 页)

## Effect of LukS-PV on proliferation, apoptosis and cell cycle of breast cancer cell line MAD-MB-231

Yu Wenwei, Xu Liangfei, Wang Ziran, et al

(Dept of Laboratory Medicine, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To study the effects of S component of panton-valentine leucocidin (LukS-PV) on morphology, proliferation, cell cycle and apoptosis of triple-negative breast cancer cell line MAD-MB-231 *in vitro*. **Methods** Cells were exposed to LukS-PV at different concentrations, the cell morphology was observed under an inverted microscope. CCK-8 was used to detect the effects of LukS-PV on cell proliferation. Cell cycle was detected by flow cytometry following PI staining. Cell apoptosis was detected by flow cytometry following Annexin V/PI staining and apoptosis-related proteins were detected by Western blot. **Results** With different concentration of LukS-PV was applied to MAD-MB-231, the cells gradually became round and the suspended cells increased. LukS-PV inhibited the proliferation of breast cancer cells in a time- and concentration-dependent manner. LukS-PV could block MAD-MB-231 in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase in a concentration-dependent manner. LukS-PV could induce apoptosis of MAD-MB-231, up-regulate the expression of Bax, Cleved-caspase3 and Cleved-caspase8, and down-regulate the expression of Bcl-2. **Conclusion** LukS-PV can inhibit the proliferation of MAD-MB-231, arrest its cycle in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase, and induce its apoptosis.

**Key words** MAD-MB-231; LukS-PV; proliferation; cell cycle; apoptosis