

当归红芪超滤膜提取物抑制过氧化氢诱导的大鼠心肌细胞凋亡及相关基因表达

马燕花^{1,2}, 李应东², 赵建雄¹, 王 婷¹

(1. 兰州大学, 2 甘肃中医学院, 甘肃省兰州市 730000)

[关键词] 凋亡; 当归红芪超滤膜提取物; 心肌细胞; B淋巴细胞瘤/白血病-2 bcl2相关X蛋白; 逆转录-聚合酶链反应; 蛋白印迹

[摘要] 目的 探讨当归红芪超滤膜提取物对心肌细胞凋亡相关基因 bcl2、bax蛋白表达的影响。方法 用高浓度的过氧化氢(400 $\mu\text{mol/L}$)在 Wistar 乳鼠原代培养的心肌细胞上建立细胞凋亡模型, 用不同浓度的当归红芪超滤物(3.75、7.5、15 g/L)进行治疗。光镜下观察细胞形态; 逆转录-多聚酶链反应和蛋白印迹法检测 bcl2、bax 蛋白在心肌细胞中的表达情况。结果 与正常对照组相比, 高浓度过氧化氢损伤组 bcl2 mRNA 及蛋白表达显著降低($P < 0.05$); bax mRNA 及蛋白表达显著增加($P < 0.05$); bcl2/bax 比值显著降低($P < 0.01$), 差异具有统计学意义。与损伤组比较, 高浓度和中浓度药物治疗组 bcl2 mRNA 及其蛋白表达显著增加($P < 0.05$); bax mRNA 及其蛋白表达显著降低($P < 0.05$); bcl2/bax 比值显著增加($P < 0.01$), 差异具有统计学意义。低浓度药物治疗组则对 bcl2、bax 表达无显著改变。结论 当归红芪超滤膜提取物可通过上调 bcl2 / bax 的比值抑制心肌细胞的凋亡, 对心肌细胞具有抗凋亡的保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Ultra-Filtration Extract From the Mixture of Angelica Sinensis and Hedysarum Polybotrys Can Inhibit Cardiomycyte Apoptosis Induced by Hydroperoxide and Related Gene Expression in Rats

MA Yan-Hua^{1,2}, LI Ying-Dong², ZHAO Jian-Xiong¹, and WANG Ting¹

(1 Lanzhou University; 2 Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[KEY WORDS] Apoptosis; Ultra-filtration Extract from the Mixture of Angelica Sinensis and Hedysarum Polybotrys; Cardiomycyte; Bax; Bcl2; RT-PCR; Western-blot

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of ultra-filtration extract from the mixture of angelica sinensis and hedysarum polybotrys on the expressions of protein and mRNA of bcl2 and bax gene in the apoptotic myocardial cells. **Methods**

H_2O_2 of 400 $\mu\text{mol/L}$ was used to build an oxidative stress-induced injury model in neonatal rat cardiomycytes and then cardiomycytes of each treatment group were treated with the Ultra-filtration extract (3.75, 7.5, 15 g/L). Morphological changes of cardiomycytes were observed in microscope. The levels of bcl2 and bax expression in cardiomycytes were measured by RT-PCR and Western-blot. **Results** In cardiomycytes of model group, the expression of bcl2 and the rate of bcl2/bax were decreased, and the expression of bax was increased significantly compared with normal group ($P < 0.05$). In cardiomycytes of the high dosage group and the middle dosage group of the treatment, the bcl2 expression was increased ($P < 0.05$), the bax expression was decreased ($P < 0.05$), and the rate of bcl2/bax was increased ($P < 0.05$), compared with model group. In cardiomycytes of the little dosage group of the treatment, the expressions of bcl2 and bax and the rate of bcl2/bax were not changed significantly. **Conclusion** Ultra-filtration extract from the mixture of angelica sinensis and hedysarum polybotrys can effectively prevent and treat myocardial cells apoptosis and its mechanism may be associated with up-regulation of the rate of bcl2/bax.

[收稿日期] 2009-02-12 [修回日期] 2009-05-10

[基金项目] 十一五国家科技支撑计划项目(2006BA106A20-04); 国家科技支撑计划(2007BA137B01)

[作者简介] 马燕花, 博士研究生, 讲师, 主治医师, 主要研究方向为中西医结合内科心血管病, Email为 617747928@qq.com。李应东, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 省级重点学科带头人, 甘肃省中西医结合学会常务理事, 研究方向为中西医结合心血管, Email为 lydj12@163.com。赵建雄, 教授, 博士研究生导师, 中西医结合研究所所长, 中国中西医结合学会理事, 甘肃省中西医结合学会会长, 研究方向为中西医结合内科临床, Email为 tsd_gaodiyd@163.com。

当归、红芪为我国常用传统中药, 化学成分复杂, 应用广泛。现代药理学研究, 当归、红芪都有显著的抗氧化、清除自由基、抗肿瘤等作用^[1-4]。两药按 1: 5 配伍组成著名的当归补血汤, 为中医补血生脉的基本方。当归红芪超滤膜提取物合剂来自于经典名方当归补血汤。由于传统中医的水煎剂提取方法所含杂质、非药用性成分或药用性较差的成分较多, 使中药药效低下。膜分离技术被公认为现代分

离技术领域中最先进的技术之一,已广泛应用于医药领域。超滤是膜分离科学的重要分支,由于操作过程中不添加任何化学药剂、超滤设备简单,滤膜可以反复多次使用,因此在中药提取分离中具有独特的作用和较大的开发潜力,正成为一种新型的中药精制、纯化方法。本文利用超滤膜技术提取当归红芪合剂,较好地去除了药液中的大分子蛋白质、色素、树脂、鞣质等成分^[5],起到了滤过除菌的作用,还能较好地去除热原,稳定药液性质,显著提高了药效。本文运用 10 万分子量超滤物干预 3% 过氧化氢致 Wistar 乳鼠心肌细胞凋亡模型,探讨当归红芪超滤膜提取物对心肌细胞凋亡的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 1~2 d 龄乳鼠由甘肃中医学院科研实验动物中心提供,SPF 级,动物质量合格证编号为 SCXK(甘)2004-0006-00000012。

1.2 药品和试剂

主要试剂:DF 培养液(美国 Sigma 公司)。新生牛血清(NBCS)(杭州四季青生物材料工程研究所)。胰蛋白酶消化液(上海生物工程有限公司)。Ⅰ型胶原酶、5-溴脱氧尿嘧啶(5-Br)(美国 Sigma 公司)。RT-PCR 试剂盒(Fementas 公司);Trizol(Invitrogen),PVDF 膜(加拿大 BBI 公司);ECL 发光试剂盒(碧云天公司);引物由大连宝生物合成;兔抗鼠 bcl-2、bax、 β -actin 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)。④主要仪器设备:CO₂ 培养箱 BB16UV 型(德国 Heraeus 公司)超净工作台 VS-1300L 型(苏净集团);倒置相差光学显微镜 IX71 型(日本 Olympus 公司);PE2400 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司);AlphaImager2200 型凝胶成像分析系统(美国 Alpha 公司)。④中药当归、红芪超滤膜提取物(甘肃中医学院科研实验中心与甘肃省膜科学研究院联合制备)。

1.3 Wistar 大鼠乳鼠心肌细胞原代培养

参照文献[6]的方法,略有改进。无菌操作下

取出生 1~3 d 的 Wistar 乳鼠心脏心尖部,立即在 PBS 液中洗去残血,用 0.08% 胰蛋白酶和胶原酶进行消化分离,收集细胞沉淀,用含 15% 小牛血清的 DF 培养液制成细胞悬液,37℃ CO₂ 培养箱中差速贴壁 1.5 h 去成纤维细胞,后用含 5-Br 的 DF 培养液将细胞密度调至 5×10^8 /L,接种于 24 孔培养板中。24 h 换液一次,培养 48 h 后可见细胞融合并出现整体搏动,于培养 72 h 后进行实验。

1.4 氧化损伤模型的建立和实验分组

实验开始前,所有细胞更换无血清培养液培养 24 h,按随机原则分为 5 组:(1)正常对照组:不加任何处理因素;(2)过氧化氢(H₂O₂)组:给予终浓度为 400 μ mol/L 的 H₂O₂ 孵育 6 h 更换为无血清 DF;(3)过氧化氢+当归红芪超滤提取物不同浓度处理组(超滤物组):在培养基中先加入终浓度为 400 μ mol/L 的 H₂O₂ 孵育 6 h 后更换为浓度分别为 3.75、7.5、15 g/L 的超滤物,各组继续在 37℃,5% CO₂,95% O₂ 的培养箱中培养 24 h 后终止培养。

1.5 细胞形态学观察

倒置显微镜下观察各组心肌细胞的波动频率及细胞质、细胞核的变化。

1.6 逆转录-多聚酶链反应检测 bcl-2/bax mRNA

各实验组处理结束后弃上清液,按 Trizol 试剂盒抽提纯化操作方法提取心肌细胞总 RNA。提取的 RNA 通过紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 吸光度值,计算 RNA 纯度和浓度。PCR 反应体系总体积为 50 μ L:DEPC 水 24 μ L,10 \times Taq buffer 5 μ L,2 mmol/L dNTP mix 5 μ L,Primeriv 1 μ L,Primer ① 1 μ L,Taq DNA polymerase 1 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L,Template DNA 10 μ L。 β -actin 为内参照。应用 Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。反应条件:94℃预变性 4 min,之后进行如下循环:94℃变性 45 s \rightarrow 退火 45 s \rightarrow 72℃延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72℃终延伸 10 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,利用凝胶成像仪拍照,测定电泳条带光密度值,计算 bcl-2、bax 与 β -actin 光密度比值为相对定量。

表 1 bcl-2、bax、 β -actin 基因逆转录-多聚酶链反应引物序列

目标基因	上游引物序列(5' \rightarrow 3')	下游引物序列(5' \rightarrow 3')	退火温度	片段长度(bp)
bcl-2	5'-ccccggcatcttctctcc-3'	5'-gggtgacatctccctgacg-3'	56℃	362
bax	5'-ggatgcgtccaccaaga-3'	5'-acggaggaagtcacagtg-3'	50℃	280
β -actin	5'-tgaacctaaaggccaacglaa-3'	5'-tcctgctgaagggtgacagtgag-3'	56℃	735

1.7 蛋白印迹法检测 bcl-2、bax 蛋白的表达

用预冷的 PBS 漂洗心肌细胞, 单去污剂裂解液提取细胞蛋白质(冰上操作), 考马斯亮蓝测定蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白量经 SDS PAGE 电泳后转至 PVDF 膜, 丽春红染色观察蛋白质转移情况。bcl-2 分子量约为 26 kDa, bax 分子量约为 21 kDa。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后分别与 bcl-2、bax 抗体 4℃ 孵育过夜。 β -actin 作为内标, 加辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 37℃ 孵育 2 h 加 ECL 发光试剂孵育 1 min, 在暗室将膜在感光胶片上曝光并用相纸显影洗像。结果用 AlphaImager2200 图像分析系统进行灰度扫描, 分别计算 bcl-2、bax 与 β -actin 吸光度比值代表其相对表达量。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.0 统计软件分析, 多组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 形态学观察

培养 72 h 的正常心肌细胞伸出伪足互相融合成片, 细胞核折光性好, 搏动具有整体性、协调性和规律性, 频率为 110 ± 12.3 次/分。高浓度 H_2O_2 损伤组细胞皱缩, 体积变小, 变圆, 伪足消失, 细胞核暗淡, 基本失去搏动。高浓度和中浓度药物治疗组, 部分心肌细胞受损, 仍可见到细胞伸出的伪足, 搏动频率 68 ± 7.4 次/分较正常组弱, 但明显强于氧化损伤组, 搏动的协调一致性较正常组稍差。低浓度药物治疗组则对心肌细胞损伤无明显抑制作用(图 1)。

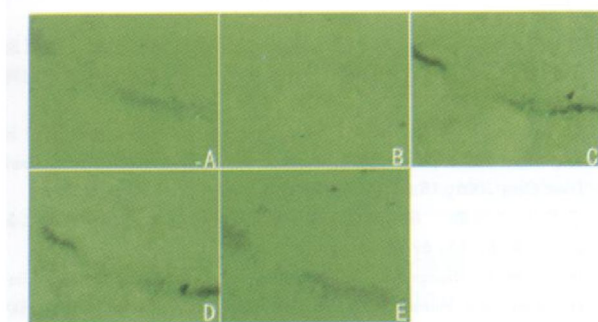


图 1 各实验组心肌细胞形态学观察 (20 \times) A 为正常组, B 为损伤组, C 为高剂量组, D 为中剂量组, E 为低剂量组。

2.2 bcl-2、bax mRNA 及其比值的变化

与正常对照组相比, 模型组 bcl-2 mRNA 表达量降低, bax mRNA 表达量增加, bcl-2/bax mRNA 的比值降低, 差异有统计学意义; 与模型组比较, 药物高

剂量组、中剂量组 bcl-2 mRNA 表达量升高, bax mRNA 表达量降低, bcl-2/bax mRNA 的比值升高, 差异有统计学意义(表 2 图 2)。

表 2 各组乳鼠心肌细胞 bcl-2、bax mRNA 及其比值 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	药物浓度 (g/L)	bcl-2/ β -actin	bax/ β -actin	bcl-2/bax
正常对照组	0	0.71 \pm 0.05	0.58 \pm 0.03	1.22 \pm 0.12
H_2O_2 损伤组	0	0.53 \pm 0.04 ^a	0.97 \pm 0.06 ^a	0.55 \pm 0.07 ^a
药物高剂量组	15.00	0.63 \pm 0.02 ^c	0.62 \pm 0.02 ^c	1.02 \pm 0.10 ^c
药物中剂量组	7.50	0.60 \pm 0.04 ^b	0.84 \pm 0.06 ^c	0.71 \pm 0.07 ^c
药物低剂量组	3.75	0.52 \pm 0.02	0.92 \pm 0.05	0.57 \pm 0.04

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ c 为 $P < 0.01$ 与模型组比较。

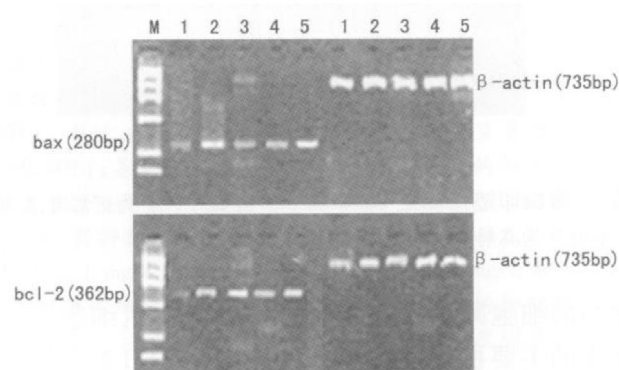


图 2 bcl-2、bax mRNA 的表达 1 为正常对照组, 2 为模型组, 3 为药物高剂量组, 4 为药物中剂量组, 5 为药物低剂量组。

2.3 药物对过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡相关蛋白表达的影响

400 μ mol/L H_2O_2 处理心肌细胞 6 h 后, 与正常对照组比较, 细胞中 bcl-2 蛋白的表达明显减弱 ($P < 0.01$), bax 蛋白的表达明显增强 ($P < 0.01$), bcl-2/bax 的蛋白比值降低 ($P < 0.01$)。而经当归红芪超滤膜提取物处理后, 高剂量组和中剂量组细胞中 bcl-2 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$), bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), bcl-2/bax 比值显著升高 ($P < 0.01$), 差异具有统计学意义。低剂量组则对 bcl-2、bax 蛋白表达无显著改变 ($P > 0.05$, 表 3 图 3)。

3 讨论

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡, 是多细胞生物生命活动过程中不可缺少的组成内容, 是保证多细胞生物个体正常发育成熟和维持正常生理过程所必需的, 细胞凋亡过程失调不仅可使生物体失去机体的稳定性, 还是人类许多疾病的重要根源。关于心肌细胞凋亡发生的机制, 目前普遍认为 bcl-2 家族

表 3 各组乳鼠心肌细胞 bcl-2、bax 蛋白表达及其比值 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

分 组	药物浓度 (g/L)	bcl-2/ β -actin	bax/ β -actin	bcl-2/bax
正常对照组	0	3.21 \pm 0.22	2.76 \pm 0.15	1.16 \pm 0.15
H ₂ O ₂ 损伤组	0	2.71 \pm 0.19 ^a	4.15 \pm 0.09 ^a	0.65 \pm 0.09 ^a
药物高剂量组	15.00	2.95 \pm 0.07 ^c	2.40 \pm 0.17 ^c	1.23 \pm 0.13 ^c
药物中剂量组	7.50	2.85 \pm 0.20 ^b	3.18 \pm 0.13 ^c	0.90 \pm 0.07 ^c
药物低剂量组	3.75	2.74 \pm 0.15	4.18 \pm 0.11	0.66 \pm 0.13

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

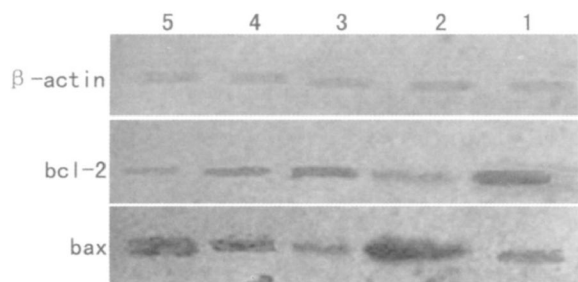


图 3 蛋白印迹法测定 bcl-2 和 bax 蛋白 1 为正常组, 2 为模型组, 3 为高剂量组, 4 为中剂量组, 5 为低剂量组。

参与的细胞凋亡的“线粒体途径”是心肌细胞凋亡发生的主要机制^[7-9]。bcl-2 和 bax 是 bcl-2 家族中最重要的成员, bcl-2 基因为抗凋亡基因, bax 基因为促抗凋亡基因。bcl-2/bax 比值直接决定了细胞在接受凋亡信号的发展方向, bcl-2 占优势则存活, bax 占优势则死亡^[10]。

大量研究表表明, 心力衰竭、缺血一再灌注损伤、心肌梗死等心脏疾病的发生、发展与细胞凋亡有着密切的关系^[11]。Brocheriou 等^[12]利用转基因技术将人的 bcl-2 基因转染入小鼠的心肌细胞中, 使之表达大量的 bcl-2 蛋白, 这些转基因鼠的心肌缺血再灌注模型与对照组相比梗死面积和凋亡细胞数均减少, 提示 bcl-2 具有抗心肌细胞凋亡的作用。Baldi 等^[13]证实, 心肌梗死晚期 (> 10 d) 在梗死区仍然有明显的心肌细胞凋亡和 bax 的高表达, 说明心肌细胞凋亡与 bax 的高表达有关。杨跃进等^[14]研究冠状动脉结扎术后 24 h 存活的雌性 SD 大鼠“抑制凋亡复合基因”bcl-2/bax 的表达。结果发现凋亡促进基因 bax 的表达在心肌梗死组明显高于假手术组, 心肌梗死组 bcl-2/bax 的比值低于假手术组。治疗组大鼠心肌细胞 bcl-2/bax 的比值高于心肌梗死组, 与假手术组相当, 说明提高 bcl-2/bax 比率能减少心肌细胞凋亡。

本实验运用现代超滤膜技术提取当归、红芪合剂中 10 万分子量的有效成分来干预活性氧诱导心

肌细胞凋亡的过程, 利用 RT-PCR 技术和 Western blot 技术检测凋亡相关基因 bcl-2/bax 及其蛋白的表达。实验结果表明, 凋亡心肌细胞中 bcl-2 表达抑制, bax 表达增强, bcl-2/bax 比值显著减少, 使 bax、bax 同源二聚体增多; 而当归红芪超滤物高剂量及中剂量治疗组 bcl-2 表达增强, bax 表达减少, bcl-2/bax 比值显著增多, 有可能通过 bcl-2/bax 异源二聚体与 bax/bax 同源二聚体竞争 bax 而实现的, 因此 bcl-2/bax 的比值可能是调节心肌细胞凋亡的关键。实验结果与参考文献一致。

综上所述, 当归红芪合剂超滤膜提取物具有抗心肌细胞凋亡的作用, 其可能机制为上调 bcl-2/bax 的比值。但由于当归、红芪化学成分复杂, 本实验的超滤膜技术仅对其做了初步研究, 在今后的实验中还需对其有效成分进行系统的研究, 超滤膜技术亦有待进一步提高。

[参考文献]

- [1] 李贵荣, 吕昌银, 杨胜圆. 当归多糖清除活性氧自由基作用的研究 [J]. 南华大学学报 (理工版), 2002, 20 (6): 747-749
- [2] 罗永姣, 李双杰, 刘红英. 黄芪甲甙对小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的抗氧化作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (3): 205-208
- [3] Yamada H, Kimivana K, Kirohana H, et al. Structure characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from the roots of Angelica acutifolia [J]. Planta Medica, 1990, 56 (2): 182-186
- [4] 姚宝泰, 赵健雄, 王学习, 等. 红芪总多糖体内抗肿瘤的实验研究 [J]. 中华中医药杂志 (原中国医药学报), 2008, 23 (7): 627-629
- [5] 彭国平, 郭立玮, 徐丽华, 等. 超滤技术应用对中药成分的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2002, 18 (6): 339-341
- [6] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cell [J]. Circ Res, 1982, 50 (1): 101-116
- [7] Mattson MP, Kromer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection [J]. Trends Mol Med, 2003, 9 (5): 196-205
- [8] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 过氧化氢通过线粒体通路和死亡受体通路诱导心肌细胞凋亡 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (3): 185-188
- [9] 蒋碧梅, 肖卫民, 石永忠, 等. 热休克预处理抑制过氧化氢所致 C2C12 肌原细胞释放天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶激活物及细胞凋亡 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (2): 125-130
- [10] Yildirim E, Ozisik K, Ozisik P, et al. Apoptosis related gene bcl-2 in lung tissue after experimental traumatic brain injury in rats [J]. Heart Lung Circ, 2006, 15 (2): 124-129
- [11] 丁志山, 沃兴德. 细胞凋亡与动脉粥样硬化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6 (1): 69-72
- [12] Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury [J]. J Gene Med, 2000, 2 (5): 326-333
- [13] Baldi A, Abbate A, Bussani R, et al. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling [J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34 (2): 165-174
- [14] 杨跃进, 陈跃峰, 阮英茹, 等. 卡维地洛对大鼠急性心肌梗死后心肌细胞凋亡和 bcl-2/bax 基因表达的干预作用 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86 (13): 919-922

(此文编辑 李玲玲)