

菟丝子黄酮对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响

翟宏颖, 王桂敏

(辽宁医学院附属第一医院中医科, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 菟丝子黄酮; 缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; Bcl-2 蛋白; Bax 蛋白

[摘要] **目的** 观察菟丝子黄酮对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及相关基因表达的影响。**方法** 结扎大鼠冠状动脉左前降支 30 min, 再灌注 2 h 建立心肌缺血再灌注模型。将 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组及菟丝子黄酮低、高剂量组和消心痛组。再灌注结束后检测血清肌酸激酶和乳酸脱氢酶, DNA 末端标记法计算凋亡指数, 免疫组织化学法和 Western Blotting 法检测心肌 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达, 计算 Bcl-2/Bax 值。**结果** 与假手术组比较, 缺血再灌注组心肌酶肌酸激酶、乳酸脱氢酶和凋亡指数显著增高 ($P < 0.01$), Bcl-2 和 Bax 蛋白表达增强 ($P < 0.01$); 与缺血再灌注组比较, 菟丝子黄酮低、高剂量组及消心痛组能降低血清肌酸激酶、乳酸脱氢酶含量和凋亡指数 ($P < 0.01$), 增加 Bcl-2 而减少 Bax 的表达 ($P < 0.01$)。**结论** 菟丝子黄酮能够抑制缺血再灌注损伤大鼠的心肌细胞凋亡, 与消心痛效果相近。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of Flavonoids from Cuscuta Chinensis on Myocardial Cells Apoptosis in Ischemic / Reperfused Rat Hearts

ZHAI Hong-Ying, and WANG Gui-Min

(Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Flavonoids from Cuscuta Chinensis; Ischemia-Reperfusion Injury; Apoptosis; Bcl-2 Protein; Bax Protein

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of flavonoids from Cuscuta Chinensis on myocardial cell apoptosis and the related gene expression in ischemic/reperfused myocardial infarction. **Methods** The left anterior descended coronary artery was ligated for 30 min and reperfused for 2 h to make ischemia-reperfusion injury model. 50 SD rats were randomly divided into the sham operation group, ischemia-reperfusion group, the low and high dose groups of flavonoids from Cuscuta Chinensis and isosorbide dinitrate group. Creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) were assayed. The apoptotic index (AI) was analyzed by TUNEL staining. The protein expression of Bcl-2 and Bax were measured by immunohistochemistry and Western Blotting in each group, the ratios of Bcl-2 and Bax were calculated. **Results** Compared with the sham operation group, the ischemia-reperfusion group of enzymes CK and LDH, AI, and Bcl-2 and Bax protein expression were significantly higher ($P < 0.01$); The enzyme CK and LDH, and AI in the low and high dose group of flavonoids from Cuscuta Chinensis were decreased compared with those of the ischemia-reperfusion group ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 was increased and the expression of Bax was decreased ($P < 0.01$). The isosorbide dinitrate group showed no significant difference when compared with the high dose group of flavonoids from Cuscuta Chinensis ($P > 0.05$). **Conclusion** The pretreatment of flavonoids from Cuscuta Chinensis could dose-dependently decrease enzymes CK, LDH levels, increase the expression of Bcl-2 protein and Bcl-2/Bax, reduce the expression of Bax protein, and inhibit the apoptosis of myocardial cell. The therapeutic effects was similar to isosorbide dinitrate.

菟丝子为旋花科一年生寄生性蔓草菟丝子 (Cuscuta Chinensis Lam) 的成熟种子, 具有补肝肾、

[收稿日期] 2010-10-27

[作者简介] 翟宏颖, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合治疗心脑血管病, E-mail 为 hongying28@126.com。通讯作者王桂敏, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合治疗心脑血管病, E-mail 为 wangguimin126@163.com。

益精明目、固精缩尿、止泻安胎的功效,其有效成分主要包括黄酮类、多糖类、生物碱类物质。其中,黄酮类为菟丝子的主要有效成分,包括山奈酚、槲皮素、金丝桃苷、紫云英苷等^[1]。经研究发现菟丝子黄酮是一种有效的植物雌激素,对心血管具有一定活性。能够减慢心律、降低血压、增加冠状动脉流量、降低心肌耗氧量和改善微循环等^[2,3]。本实验采用在体大鼠心肌缺血再灌注模型,观察该药对心肌缺血再灌注心肌细胞凋亡的保护作用,阐明其抗凋亡的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

菟丝子黄酮由沈阳药科大学植物化学教研室提供,纯度为98%;肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)购自南京建成生物工程研究所,由辽宁医学院附属第一医院检验科检测;细胞凋亡试剂盒购自南京凯基;兔抗鼠 Bcl-2、Bax 抗体购自武汉博士德生物工程。BSM-7105 床边监护仪购自上海光电医用电子仪器有限公司;DH150 动物人工呼吸机购自浙江大学医学仪器厂;TGL-16G 低温冷冻离心机为日本日立公司产品;CIAS-1000 型图像分析仪为北京大恒图像视觉有限公司产品。

1.2 动物分组与模型制备

健康雄性 SD 大鼠 50 只,体重 250~300 g,由辽宁医学院实验动物中心提供。随机分为假手术组、缺血再灌注组、菟丝子黄酮低剂量组 [50 mg/(kg·d)]、菟丝子黄酮高剂量组 [100 mg/(kg·d)] 及消心痛组 [4.0 mg/(kg·d)],每组 10 只。菟丝子黄酮低、高剂量组及消心痛组在术前 7 天灌胃,另两组灌服等剂量的生理盐水。于末次给药 2 h 后,行冠状动脉结扎术制作缺血再灌注模型。将上述 SD 大鼠称重后用 20% 乌拉坦腹腔麻醉 (1 g/kg),固定四肢及头部。将针型电极插入大鼠四肢皮下,记录正常 II 导联心电图。气管插管,采用人工呼吸机正压呼吸。逐层分离皮下组织、肌肉,沿胸骨左缘第 3、4 肋间开胸,剪开心包,暴露心脏。假手术组冠状动脉左前降支只穿线不结扎,其余四组结扎冠状动脉左前降支,在肺动脉圆锥和左心耳连线中点下方约 2 mm 处用 5/0 缝合线带针穿过冠状动脉左前降支深部,在肺动脉圆锥旁出针,立即将一根直径为 1.5 mm 的凹槽硅胶管置于结扎线与血管之间,拉紧结扎线,使硅胶管压迫冠状动脉左前降支而致闭塞。缺血 30 min 后,松解结扎线,再灌注 2 h。依心电图上 ST 段抬

高 ≥ 0.3 mV 和(或) T 波高耸及局部心肌出现紫绀作为心肌缺血标志,心电图 ST 段降低和(或) T 波恢复及心肌缺血区转红为再灌注成功标志^[4]。再灌注结束后,从腹主动脉采血 2 mL,离心 (0~4℃, 3 000 r/min) 15 min,取上层血浆冻存备用。

1.3 心肌酶含量的测定

各组模型建立成功后,采集血清用全自动生化分析仪测定心肌酶 CK 和 LDH 含量。

1.4 凋亡细胞原位标记与凋亡指数计算

按 TUNEL 试剂盒提供的方法检测凋亡细胞。正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡心肌细胞核呈深浅不一的棕褐色。用单盲法进行观察、计数,每张切片随机选取 10 个视野,每个视野至少计数 200 个细胞核。计数凋亡细胞数和细胞总数,然后计算凋亡指数 (AI) (AI = 凋亡细胞数/细胞总数 $\times$ 100%)。

1.5 免疫组织化学法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

对心脏标本用 4% 多聚甲醛固定并做病理切片,进行免疫组织化学染色。阳性细胞胞质着色呈棕黄色,切片于 400 倍光学显微镜下观察,每张切片随机选取阳性细胞分布均匀的 10 个视野,用 CIAS-1000 型图像分析仪测量每组光密度平均值 (OD 值)。

1.6 Western Blotting 法半定量测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

提取心肌蛋白样品,SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,分别加入 Bcl-2 和 Bax 抗体进行 Western Blotting 分析,显色液中显色,结果应用生物凝胶图像分析系统进行扫描定量,以对照组第一样品密度值为 100%,计算出各样品的相对密度值作为各蛋白的相对含量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件处理数据。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌酶肌酸激酶和乳酸脱氢酶含量

与假手术组比较,其他四组心肌酶 CK 和 LDH 含量均增高,差异有显著性 ($P < 0.01$);与缺血再灌注组比较,菟丝子黄酮低、高剂量组和消心痛组心肌酶 CK 和 LDH 含量均显著下降 ($P < 0.01$);与菟丝子黄酮低剂量组比较,菟丝子黄酮高剂量组和消心痛组心肌酶 CK 和 LDH 含量均下降 ($P < 0.05$);菟丝子黄酮高剂量组和消心痛组间差异无统计学意义。

义($P > 0.05$; 表 1, Tabel 1)。

表 1. 心肌酶肌酸激酶和乳酸脱氢酶含量 ($\bar{x} \pm s$)

Tabel 1. Content of creatine kinase and lactate dehydrogenase

分 组	CK (U/L)	LDH (U/L)
假手术组	576.0 $\pm$ 120.5	1 309.8 $\pm$ 194.8
缺血再灌注组	1 132.3 $\pm$ 177.0 ^a	2 438.0 $\pm$ 323.2 ^a
菟丝子黄酮低剂量组	935.3 $\pm$ 134.7 ^{ab}	2 051.9 $\pm$ 253.7 ^{ab}
菟丝子黄酮高剂量组	745.4 $\pm$ 106.0 ^{abc}	1 793.4 $\pm$ 176.2 ^{abc}
消心痛组	738.5 $\pm$ 100.7 ^{abc}	1 798.0 $\pm$ 198.9 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; c 为 $P < 0.05$, 与菟丝子黄酮低剂量组比较。

2.2 组织病理形态学改变

假手术组心肌结构正常, 肌纤维可见清晰的横纹, 细胞境界较清晰, 无水肿; 缺血再灌注组心肌纤维间毛细血管扩张充血, 有灶性炎细胞浸润, 细胞严重水肿, 境界不清; 菟丝子黄酮低剂量组心肌纤维轻度肿胀, 细胞水肿较严重, 细胞境界不清; 菟丝子黄酮高剂量组心肌纤维排列整齐, 横纹较清晰, 细胞界限较清晰; 消心痛组心肌纤维轻度肿胀, 部分肌纤维变性, 可见横纹, 尚可分辨细胞境界 (图 1, Figure 1)。

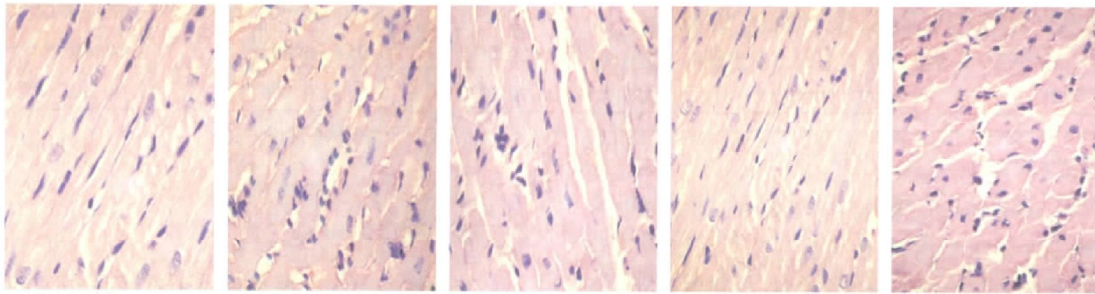


图 1. 大鼠心肌病理形态变化 (HE 染色 $\times 400$) 从左到右依次为假手术组、缺血再灌注组、菟丝子黄酮低剂量组、菟丝子黄酮高剂量组和消心痛组。

Figure 1. Pathological change of myocardium in rat

2.3 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

假手术组心肌偶见细胞凋亡发生, 缺血再灌注组凋亡心肌细胞呈弥漫分布, 菟丝子黄酮低剂量组凋亡心肌细胞开始减少, 菟丝子黄酮高剂量组和消心痛组进一步减少呈散在分布。缺血再灌注组心肌细胞凋亡指数明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 菟丝

子黄酮低、高剂量组和消心痛组心肌细胞凋亡指数明显低于缺血再灌注组 ($P < 0.01$); 菟丝子黄酮高剂量组和消心痛组心肌细胞凋亡指数均低于菟丝子黄酮低剂量组 ($P < 0.01$), 但前两组间差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 2 及图 2, Table 2 and Figure 2)。

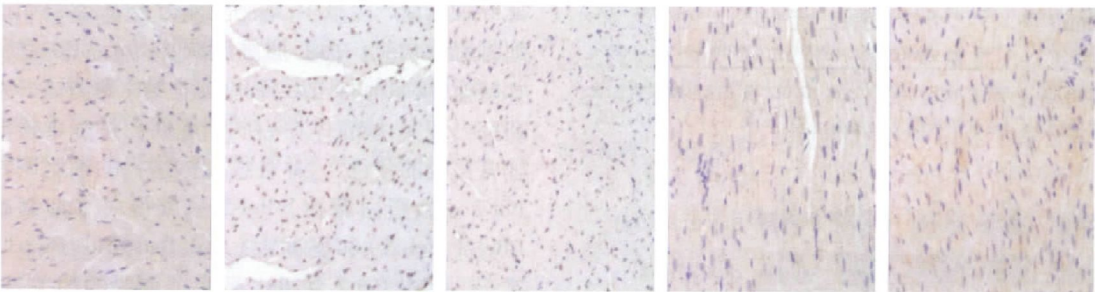


图 2. 各组心肌细胞凋亡情况 (TUNEL $\times 400$) 从左到右依次为假手术组、缺血再灌注组、菟丝子黄酮低剂量组、菟丝子黄酮高剂量组和消心痛组。

Figure 2. Myocardial cells apoptosis in different group

2.4 免疫组织化学法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

假手术组心肌细胞浆中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量都较少。缺血再灌注组心肌 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达量较假手术组均明显增加 ($P < 0.01$), 菟丝子黄酮低、高剂量组和消心痛组中 Bax 蛋白表达较缺血再灌注组下降 ($P < 0.01$), 但 Bcl-2 蛋白的表达较缺

血再灌注组升高 ($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 值显著高于缺血再灌注组 ($P < 0.01$)。菟丝子黄酮高剂量组和消心痛组 Bax 蛋白表达较低剂量组下降 ($P < 0.01$), 但 Bcl-2 蛋白的表达较低剂量组升高 ($P < 0.01$; 表 2, Table 2)。

表 2. 各组凋亡细胞指数和 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The apoptotic index and the protein expression of Bcl-2 and Bax in different group

分 组	AI	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
假手术组	0.42 ± 0.11	0.049 ± 0.007	0.045 ± 0.004	1.43 ± 0.29
缺血再灌注组	16.37 ± 1.64 ^a	0.064 ± 0.115 ^a	0.087 ± 0.007 ^a	0.56 ± 0.10 ^a
菟丝子黄酮低剂量组	11.64 ± 2.07 ^{ab}	0.077 ± 0.007 ^{ab}	0.074 ± 0.008 ^{ab}	1.05 ± 0.12 ^{ab}
菟丝子黄酮高剂量组	7.00 ± 1.41 ^{abc}	0.110 ± 0.010 ^{abc}	0.054 ± 0.005 ^{abc}	2.04 ± 0.26 ^{abc}
消心痛组	6.89 ± 1.18 ^{abc}	0.108 ± 0.010 ^{abc}	0.053 ± 0.006 ^{abc}	2.06 ± 0.34 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; c 为 $P < 0.01$, 与菟丝子黄酮低剂量组比较。

2.5 Western Blotting 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

与假手术组相比, 缺血再灌注组心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达均增加 ($P < 0.01$); 与缺血再灌注组相比, 菟丝子黄酮低、高剂量组和消心痛组心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 蛋白表达减少, 差异有显著性 ($P < 0.01$; 表 3 及图 3, Table 3 and Figure 3)。

表 3. Western Blotting 法检测各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

Table 3. The protein expression of Bcl-2 and Bax in different group by Western Blotting

分 组	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
假手术组	0.60 ± 0.05	0.52 ± 0.05	1.16 ± 0.14
缺血再灌注组	0.94 ± 0.07 ^a	1.32 ± 0.05 ^a	0.71 ± 0.07 ^a
菟丝子黄酮低剂量组	1.06 ± 0.05 ^{ab}	1.19 ± 0.05 ^{ab}	0.90 ± 0.05 ^{ab}
菟丝子黄酮高剂量组	1.30 ± 0.05 ^{abc}	0.93 ± 0.04 ^{abc}	1.40 ± 0.08 ^{abc}
消心痛组	1.26 ± 0.03 ^{abc}	0.95 ± 0.04 ^{abc}	1.32 ± 0.07 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组比较; c 为 $P < 0.01$, 与菟丝子黄酮低剂量组比较。

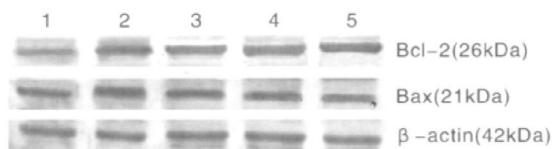


图 3. Western Blotting 法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

1 为假手术组, 2 为缺血再灌注组, 3 为菟丝子黄酮低剂量组, 4 为菟丝子黄酮高剂量组, 5 为消心痛组。

Figure 3. The Western Blotting of Bcl-2 and Bax

3 讨 论

缺血性心脏病主要是指由于冠状动脉粥样硬化导致心肌缺血、缺氧而引起的心脏病。我国传统中药对心肌缺血保护作用的研究日益受到重视, 尤其是各种植物的黄酮类化合物, 具有保护心脑血管、利胆保肝等多种生物活性。当心肌缺血再灌注损伤时, 由于自由基堆积和 Ca^{2+} 超载, 损伤了细胞膜和线粒体, 造成心肌细胞释放各种酶入血, 引起一系列血清酶 (如 CK 及 LDH) 活性变化, 可作为观察心肌缺血再灌注损伤程度及药物疗效和预后的指标^[5]。本实验表明, 菟丝子黄酮能降低血清 CK 及 LDH 活性。在心肌缺血再灌注损伤中, 会出现线粒体调控失常^[6], 其主要体现在结构、功能和数量的改变, 由此导致能量产生减少, 细胞收缩力丧失, 最终引起心肌细胞死亡^[7]。而心肌细胞凋亡是心肌在遭受诸如缺血、缺氧等打击后, 细胞死亡的一种方式。众多研究已证实, 线粒体在心肌细胞凋亡过程中扮演着非常重要的角色^[8], 并且线粒体途径的细胞凋亡受 Bcl-2 家族蛋白调控。Bcl-2 家族蛋白有抑制凋亡 (Bcl-2、Bcl-x1) 和促凋亡 (Bax、Bad、Bid、Binp3) 两类^[9]。其中 Bcl-2 和 Bax 是两个重要的相关基因, Bcl-2 表达可提高细胞对各种致命因素的抵抗力, 延长细胞寿命, 因而 Bcl-2 能抑制许多因素引起的细胞凋亡^[10-12]。Bax 过度表达可促使细胞凋亡^[13], 其可能机制除 Bax 本身具有促进细胞凋亡作用外, 还有通过 Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体, 抑制 Bcl-2 的作用; 以及 Bcl-2/Bax 形成同源二聚体, 抑制线粒体

细胞色素 C 的释放,促进细胞凋亡^[14]。近年来还发现,Bcl-2 和 Bax 调节细胞凋亡不仅取决于自身表达的高低,而且 Bcl-2/Bax 蛋白表达的比例也是决定细胞凋亡的关键,当比例增大时,细胞凋亡受抑制,反之则促进^[15-17]。本实验采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,在缺血再灌注组可见大量的凋亡细胞,证实了缺血再灌注损伤可诱导心肌细胞凋亡发生。菟丝子黄酮低、高剂量组的凋亡心肌细胞较缺血再灌注组明显减少,AI 显著低于缺血再灌注组($P < 0.01$)。说明菟丝子黄酮预处理有抑制缺血再灌注损伤所致心肌细胞凋亡的作用。通过免疫组织化学和 Western Blotting 检测发现,缺血再灌注使 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达明显增多,但以 Bax 的增多更为显著,使 Bcl-2/Bax 值显著降低。而菟丝子黄酮低、高剂量组的 Bcl-2 表达增加,Bax 表达下降,Bcl-2/Bax 值显著升高,心肌细胞凋亡数量明显减少。因此,菟丝子黄酮抑制心肌缺血再灌注损伤引起细胞凋亡的机制可能与下调 Bax 和上调 Bcl-2 的蛋白表达,升高 Bcl-2/Bax 比值有关。

参考文献

- [1] 潘文灏,许志超,赵余庆,等. 菟丝子的生物活性与临床应用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4 (4): 47-51.
- [2] 王晓敏,王建红,刘海云,等. 菟丝子黄酮对去势雌性大鼠血脂和血管雌激素受体的影响 [J]. 中成药, 2008, 30 (2): 255-256.
- [3] 王晓敏,王建红,伍庆华,等. 菟丝子黄酮对去势雌性大鼠血清的雌激素水平和血管平滑肌细胞凋亡的影响 [J]. 天津医药, 2005, 33 (10): 650-652.
- [4] 齐志敏,王倩,张莹. 大鼠心肌缺血再灌注损伤实验模型开胸方法的研究 [J]. 中国临床康复, 2004, 8 (30): 6 620-621.
- [5] 孙辉,彭亚飞,林伟,等. 重组人肿瘤坏死因子受体抗体融合蛋白联合缺血后适应减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (1): 49-51.
- [6] Arbustini E, Diegoli M, Fasani R, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy [J]. Am J Pathol, 1998, 153 (5): 1 501-510.
- [7] Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function [J]. Trends Cardio Med, 2002, 12 (8): 339-348.
- [8] Green DR, Reed JC. Mitochondrial and apoptosis [J]. Science, 1998, 281 (5381): 1 309-312.
- [9] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281 (5381): 1 322-326.
- [10] 刘杨,亢登峰,王英元. 大鼠脊髓损伤后 IGF-1 和 Bcl-2 表达变化的免疫组织化学研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5 (2): 134-136.
- [11] 余泽洪,邹玮,陈林祥,等. 伊贝沙坦对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡及相关基因 Bax、Bcl-2 和 P53 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (4): 415-418.
- [12] 方显明,韦斌,郎中云. 安心颗粒对心力衰竭大鼠细胞凋亡基因 Bcl-2 及 Fas 表达的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5 (8): 701-702.
- [13] Borutaite V. AMPK, MAPK and Bax in the heart: some questions answered [J]. Biochem J, 2008, 412 (2): 15-16.
- [14] 常超,信栓力,李玉玲. 粉防己碱对缺血-再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响 [J]. 中国微循环, 2009, 13 (3): 168-169.
- [15] Kumar P, Coltas IK, Kumar B, et al. Bcl-2 protects endothelial cells against gamma-radiation via a Raf-MEK-ERK-survivin signaling pathway that is independent of cytochrome crelease [J]. Cancer Res, 2007, 6 (7): 1 193-202.
- [16] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis [J]. Apoptosis, 2007, 12 (2): 887-896.
- [17] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of Bcl-2 and Bax proteins and cardiomyocyte apoptosis [J]. Jap Heart J, 2001, 42 (6): 759-770.

(此文编辑 许雪梅)