

·博士之窗·

温心胶囊对大鼠实验性缺血心肌细胞凋亡 及 Bcl-2、Fas 蛋白表达的影响*

张 腾¹ 曹洪欣² 盛小禹¹ 卢大儒¹ 沈自尹³

摘要 目的 探讨临床有效中药复方温心胶囊防治冠心病心肌缺血的分子作用机制。方法 采用盐酸异丙肾上腺素连续多点皮下注射制备大鼠心肌缺血模型。运用透射电镜技术及 TUNEL 法 观察温心胶囊对缺血损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响 并运用免疫组化的方法观察其对细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Fas 蛋白表达的影响。结果 异丙肾上腺素所致心肌缺血损伤可明显诱导大鼠心肌细胞发生凋亡 显著引发 Fas 基因蛋白表达增强 并轻度引发 Bcl-2 基因蛋白表达增强 温心胶囊可显著下调 Fas 基因的蛋白表达 上调 Bcl-2 基因的蛋白表达 明显抑制并阻断心肌细胞发生凋亡。结论 通过调节缺血心肌 Bcl-2、Fas 基因的蛋白表达从而抑制并阻断细胞凋亡的发生 可能是中药复方温心胶囊防治冠心病心肌缺血损伤的分子作用机制之一。

关键词 温心胶囊 细胞凋亡 Bcl-2 Fas

Effect of Wenxin Capsule on Myocyte Apoptosis and Expression of Bcl-2 ,Fas Gene Protein in Rats of Experimental Myocardial Ischemia ZHANG Teng ,CAO Hong-xin ,SHENG Xiao-yu ,et al *Institute of Genetics ,Fudan University ,Shanghai (200433)*

Objective :To explore the molecular mechanism of Wenxin Capsule (WXC ,an effective Chinese composite drug) in preventing and treating myocardial ischemia of coronary heart disease. **Methods :**Rat model of myocardial ischemia was established by subcutaneous multi-point injecting isoproterenol. Effect of WXC on cell apoptosis was observed by transmission electron microscopy and TUNEL method ,and its effect on apoptotic related gene Bcl-2 and Fas gene protein expression was observed by immunohistochemical method. **Results :**Isoproterenol induced myocardial ischemic injury could cause evident cardiac cell apoptosis ,obvious enhance Fas gene protein expression and mild enhance Bcl-2 gene protein expression. WXC could significantly down-regulate Fas ,up-regulate Bcl-2 gene protein expression ,significantly inhibit and block the myocardial cell apoptosis. **Conclusion :**To inhibit and block the event of cell apoptosis through regulating Bcl-2 and Fas gene protein expression in ischemic myocardium might be one of the mechanisms of WXC in preventing and treating myocardial ischemic injury of coronary heart disease

Key words Wenxin Capsule ,cell apoptosis ,Bcl-2 ,Fas

细胞凋亡 (apoptosis) 是近年来分子生物学领域研究的热点之一。大量的动物实验研究及心肌梗塞死亡病例心脏标本的研究揭示^[1-3]细胞凋亡在心肌缺血损伤的病理演变过程中占有重要的地位。甚至有研究证明 在急性心肌缺血早期 凋

亡是心肌细胞死亡的主要形式 并伴随着心肌损伤病理演变的全过程 细胞凋亡不仅决定着心肌梗塞范围的大小 梗塞后心室重构 而且很可能是缺血性心脏病演变为心力衰竭的细胞学机制^[4,5]。因此 干预心肌细胞凋亡的发生在心肌缺血损伤的防治研究中具有重要的临床和病理学意义。

* 国家自然科学基金资助 (No.30100238) 黑龙江省政府重大课题资助项目
1. 复旦大学遗传学研究所 (上海 200433) 2. 黑龙江中医药大学 3. 复旦大学华山医院

通讯作者 张 腾 博士 Tel 021-66643298 E-mail zhangteng501@mail.china.com

材料与方法

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大白鼠 体重 (250±30)g 由黑龙江省药检所实验动物中心提供。

1.2 药物 温心胶囊悬液 黑卫药临床科研用药 主要成分有人参、桂枝、薤白、半夏、瓜蒌、柴胡、黄芪、赤芍 组方比例为 1:1.5:1.5:1.5:1.5:1.5:3:2) 具有益气温阳、活血化瘀之功效 实验按处方比例称取中药材 并按胶囊制备工艺以 75% 的乙醇提取回收两次 调整浓度为 1:2 相当于每毫升悬液含生药量 2g。复方丹参悬液 复方丹参片 0.5g/片 广州市香雪制药股份有限公司生产 批号 99022 实验前研末以生理盐水调成 0.2g/2.5ml 浓度悬液备用。盐酸异丙肾上腺素注射液 上海禾丰制药有限公司生产 批号 96102。

1.3 试剂 Bcl-2 SC-492-G 免疫组化 S-P 药盒 美国 Santa Cruz 公司产品 Fas SC-716-G 免疫组化 S-P 药盒 美国 Santa Cruz 公司产品 蛋白酶 K 美国 Sigma 公司 DAB 药盒 北京中山生物技术有限公司 TUNEL 药盒 德国 ROCHE-B·M 公司 Cat.No. 1684817。

2 方法

2.1 动物分组 将实验用大鼠随机分为 5 组 每组 10 只大鼠 即正常组、模型组、温心胶囊高剂量组、温心胶囊低剂量组、复方丹参对照组(复方丹参组)。

2.2 实验用药、造模及取材 实验用药前各组动物分别以 II 导生理记录仪测心电图 继则除正常组外每天分别灌胃 生理盐水 10ml/kg 体重) 温心胶囊悬液 20g/kg 体重(含生药量) 温心胶囊悬液 10g/kg 体重(含生药量) 复方丹参悬液 0.75g/kg 体重 连续 7 天 于第 5 天、第 6 天和第 7 天灌药后 30min 除正常组外 其余各组动物分别以乌拉坦 10% 的乌拉坦 1ml/100g 体重 麻醉 皮下多点注射盐酸异丙肾上腺素 ISO 8mg/kg 体重 参照文献复制 ISO 心肌缺血损伤模型^[2] 正常组给予等容量的生理盐水。于第 3 次注射异丙肾上腺素后 24h 分别以 II 导生理记录仪记录各组动物心电图 之后各组大鼠分别处死 摘取心脏 立即用预冷的生理盐水冲洗 冲洗后分别剖取心肌组织进行各项观察指标的检测。

2.3 细胞凋亡检测 (1) TUNEL 法检测心肌细胞凋亡; 具体步骤按试剂盒说明操作 阳性判定标准 以细胞核被染成棕褐色为阳性结果。(2) 电镜形态学检测心肌细胞凋亡 细胞凋亡的主要形态学变化特征是 细胞核染色质密度高并凝聚于核膜周边 核体积缩小、畸变、核仁裂解 进行性细胞膜内陷 将细胞自行分割为外有膜包裹、内有完整细胞器的细胞凋亡小体。

2.4 免疫组织化学染色方法 以免疫组化(S-P)法检测 Bcl-2、Fas 基因蛋白表达。具体方法按试剂盒说明操作。

阳性判定标准 大部分胞浆弥漫性染成棕褐色为强阳性表达(+++) 部分胞浆染为淡棕黄色 部分胞浆不着色为弱阳性表达(+) 介于两者之间的为阳性表达(++)

2.5 统计学方法 两样本均数的比较用 *t* 检验 等级资料的两样本比较用秩和检验。

结 果

心肌细胞凋亡检测结果

1.1 电镜形态学观察 造模后模型组均可见心肌细胞及部分血管内皮细胞的凋亡改变现象 其多表现为细胞核畸变 核体积缩小 核异染色质成块聚集 核膜内陷 同时核周围细胞器完整 部分细胞可见核小体正在脱落 而复方丹参组及温心胶囊治疗组均未观察到细胞的凋亡样改变。

1.2 TUNEL 法检测各组大鼠心肌细胞凋亡情况 以细胞核被染成棕褐色为阳性表达 计数方法参照文献^[1] 即在 ×400 物镜下计算阳性细胞数和细胞总数 选择细胞总数 200 以上的视野 从中计算出阳性细胞率。结果见表 1。

表 1 造模后各组大鼠心肌细胞凋亡阳性检出情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	细胞阳性表达率 (%)
正 常	8	0.71 ± 0.42
模 型	10	41.22 ± 5.31
复方丹参	10	29.46 ± 5.08*
温心胶囊低剂量	10	24.78 ± 5.46*
温心胶囊高剂量	10	18.32 ± 5.12*△

注 与模型组比较, * $P < 0.001$ 与复方丹参组比较, △ $P < 0.01$

各组大鼠造模后心肌细胞凋亡情况提示 连续注射异丙肾上腺素造成大鼠心肌缺血损伤 可明显引起心肌细胞凋亡, 尤其以早期显著 此现象同电镜观察结果一致。温心胶囊治疗组及复方丹参组大鼠心肌细胞凋亡发生率明显减少 与模型组比较 差异有显著性 ($P < 0.001$) 其中尤以温心胶囊高剂量组更为显著 与复方丹参组比较 差异有显著性 ($P < 0.01$)

2 Fas 与 Bcl-2 基因的蛋白表达检测

2.1 温心胶囊对缺血心肌 Fas 基因蛋白表达的影响 见表 2。异丙肾上腺素所致大鼠心肌缺血损伤 可显著引发 Fas 基因蛋白表达增强。复方丹参组及温心胶囊治疗组 Fas 蛋白表达均下降 尤以温心胶囊高剂量组明显 与正常组比较 差异无显著性 ($P > 0.05$)

表2 造模大鼠心肌 Fas 基因蛋白表达情况比较

组 别	n	Fas 表达			
		-	+	++	+++
正 常	8	5	3	—	—
模 型*	10	—	1	3	6
复方丹参 [△]	10	—	3	5	2
温心胶囊低剂量 ^{△△}	10	1	4	5	—
温心胶囊高剂量 ^{△△}	10	2	6	2	—

注 :与正常组比较 ,* $P < 0.001$;与模型组比较 ,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.001$

2.2 温心胶囊对缺血心肌 Bcl-2 基因蛋白表达的影响 见表 3。异丙肾上腺素所致大鼠心肌缺血损伤 ,在显著引发 Fas 基因蛋白表达增强的同时 ,亦引发 Bcl-2 基因蛋白表达增强 ,但镜下观察结合表 2、3 所示 ,Bcl-2 基因蛋白表达即免疫反应增强的程度轻于 Fas 基因。温心胶囊治疗组能够显著上调 Bcl-2 基因的蛋白表达 ,与模型组比较 ,差异有显著性($P < 0.05$) ;复方丹参组上调 Bcl-2 基因的蛋白表达与模型组比较差异无显著性。

表3 造模 24h 大鼠心肌 Bcl-2 基因蛋白表达情况比较

组 别	n	Bcl-2 表达			
		-	+	++	+++
正 常	8	4	4	—	—
模 型*	10	1	6	3	—
复方丹参	10	—	4	6	—
温心胶囊低剂量 [△]	10	—	3	7	—
温心胶囊高剂量 [△]	10	—	2	6	2

注 :与正常组比较 ,* $P < 0.01$;与模型组比较 ,[△] $P < 0.05$

讨 论

目前虽然对缺血或缺血后再灌注损伤的确切机制还不十分清楚 ,但已证实 ,持续性心肌缺血可以导致组织损伤和细胞死亡 ,过去认为心肌细胞在缺血损伤中的死亡全部都是坏死 ,但近年来大量的研究表明大鼠、兔以及人的心肌缺血和再灌注损伤中有大量的心肌细胞经历了凋亡过程。再灌注可以减少发生凋亡的心肌细胞数 ,但却使不可挽救的心肌细胞加速发生凋亡 ,凋亡可能是心肌梗死早期心肌细胞死亡的主要形式^[1-5]。

本实验结果显示 ,光镜下观察 ,虽未能明确心肌细胞凋亡的具体情况 ,但可观察到心肌较为明显的灶性损伤病变 ,而温心胶囊治疗组大鼠 ,心肌虽也大多有病变 ,但病灶较少、较小 ,心尖以外的内层更少 ,甚至有 1 例几乎无病变 ,有病变的其病灶也明显疏松。

透射电镜下观察 ,模型组可见心肌细胞出现凋亡形态改变现象。温心胶囊治疗组大鼠未观察到心肌细胞凋亡性改变 ,随后进行的原位末端标记法检测结果也显示出 ,温心胶囊治疗组大鼠心肌细胞凋亡发生率较模型组显著减少 ,且具有一定的量效关系。以上检测结果不仅进一步证实了心肌细胞凋亡 ,在心肌缺血损伤病理改变中起了不可忽视的作用 ,同相关资料报道一致 ,而且似可阐明 ,通过阻断或抑制心肌细胞发生凋亡可能是温心胶囊发挥显著的保护缺血损伤心肌作用的主要机制之一。

为了进一步探究并阐明温心胶囊的作用机制 ,我们对凋亡相关基因 Fas、Bcl-2 的蛋白表达进行了观察。结果显示 ,心肌缺血损伤模型组大鼠心肌不仅细胞凋亡发生率极高 ,且心肌细胞 Fas 基因的蛋白表达也明显上调 ,同时发现 ,心肌缺血损伤模型组大鼠心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达也有所增加 ,考虑这可能与心肌细胞受到缺血损伤的刺激而反应性表达增强以提高细胞的内在抵抗能力有关。Wyllie HA^[6]对人心肌梗死后存活的心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达的研究也支持这一结论。温心胶囊治疗组大鼠心肌细胞 Fas 蛋白表达显著减少 ,而 Bcl-2 蛋白表达则增加进一步表明温心胶囊对心肌缺血损伤时凋亡相关基因的蛋白表达具有显著的调节作用 ,即 :明显下调凋亡刺激基因 Fas 的蛋白表达 ,上调凋亡抑制基因 Bcl-2 的蛋白表达 ,通过调节缺血心肌 Bcl-2、Fas 基因的蛋白表达从而抑制和阻断细胞凋亡的发生 ,可能是中药复方温心胶囊防治冠心病心肌缺血损伤的分子作用机制之一。

参 考 文 献

1 姚 震 ,陈颜芳 ,冯建章 .实验性家兔缺血预适应减轻心肌细胞凋亡 .中国动脉硬化杂志 1999 7(1):20—23.

2 Fliss H , Gattinger D . Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium . Circ Res 1996 79:949—950.

3 Saraste A , Pulkki K , Kallajoki M , et al . Apoptosis in human acute myocardial infarction . Circulation 1997 95(2):320—323.

4 罗 义 ,李卓仁 ,郭南山 .心血管疾病中的细胞凋亡 .中华内科杂志 1998 37(3):207.

5 Olivetti G , Abbi R , Quaini F , et al . Apoptosis in the failing human heart . N Engl J Med 1997 336:1131—1141.

6 Wyllie AH . The genetic regulation of apoptosis . Curr Opin Genet Dev 1995 5:97—104.

(收稿 2002 - 10 - 28 修回 2003 - 03 - 12)