

· 博士之窗 ·

红花注射液对大鼠心脏能荷值及抗凋亡基因 bcl-2 的影响

张素清 姜良铎

摘要 目的 探讨红花注射液的心脏保护作用及其对心肌组织能荷值、抗细胞凋亡基因 bcl-2 的影响。**方法** 采用大鼠 Langendorff 离体心脏灌注模型,在改良的 Euro-Collins 心脏保存液(mEC 液)中添加红花注射液与单纯 mEC 液作对照,观察其对保存心脏的心功能、能荷值及 bcl-2 表达的影响。**结果** 与对照组比较红花注射液可改善大鼠心脏的收缩和舒张功能,增加冠脉流量,增强 bcl-2 的蛋白表达。**结论** 红花注射液具有很好的心脏保护作用。

关键词 红花注射液;心脏保存;心脏保存液

Effect of Safflower Injection on Cardiac Energy Charge and Anti-apoptosis Gene bcl-2 in Rats' Heart ZHANG Su-qing, JIANG Liang-duo *Beijing University of CM, Beijing (100029)*

Objective To study the effect of safflower injection (SI) in protecting heart, and on energy charge and anti-apoptosis gene bcl-2 in cardiac tissue. **Methods** Rats' Langendorff isolated heart infused model was used in the experiment to study the effect of SI by measuring the cardiac function, energy charge and bcl-2 expression of the cultured heart in the modified Euro-Collins (mEC) heart preserving liquid with or without addition of SI. **Results** As compared with the control, SI showed the effects of improving functions of cardiac contraction and dilation, increasing coronary blood flow, and strengthening the bcl-2 protein expression. **Conclusion** SI has excellent effect in protecting heart.

Key words safflower injection; heart preservation; heart preserving liquid

能荷是指在总的腺苷酸代谢系统中所负荷的高能磷酸根的程度,表示组织细胞中 3 种腺苷酸[三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、腺苷酸(AMP)]之间的平衡状态。心肌组织能荷值(EC)反映了心脏的能量代谢状态,稍有下降即表示细胞能量代谢状态遭到严重破坏。多数学者认为能荷值 <0.3 可作为心肌细胞死亡的标志,能荷值 <0.6 时,为可逆性损伤^[1]。近年研究发现细胞凋亡是心肌缺血再灌注中心肌细胞死亡的机制之一。Trieb 等^[2]认为凋亡可能与器官保存引起的细胞损伤有关。bcl-2 是细胞凋亡抑制基因,其表达增多可抑制细胞的凋亡。

近年来,红花用于预防心肌缺血及缺血再灌注损伤的机制报道很多。但在心脏保存研究中,有关红花注射液对心肌组织能荷值及心肌细胞凋亡影响的研究,文献检索未见报道。本研究旨在探讨红花注射液

对保存的大鼠心脏心肌组织能荷值及抑制细胞凋亡基因 bcl-2 蛋白表达的影响。

材料与方 法

1 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 250~300g,由中国医学科学院动物所提供。

2 药品与试剂 红花注射液:石家庄神威药业集团提供,每 5ml 相当于红花 2.5g,批号:20011107。KH 液 (mmol/L): NaCl 118; KCl 4.7; KH_2PO_4 0.93; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2; CaCl_2 1.5; NaHCO_3 25; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11。pH: 7.4 ± 0.5 。实验当天配制。mEC 液 (mmol/L): K_2HPO_4 118; KCl 14; KH_2PO_4 15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5; CaCl_2 0.025; NaHCO_3 10; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 139, pH: 7.4 ± 0.5 。预先配制 2 倍浓度的储液,4℃ 存放。实验当天加入葡萄糖,配至标准浓度,冷藏备用。

3 仪器 四导生理记录仪(RM-6000,日本光电);超级恒温水浴泵(501 型,上海市上海县第二五金厂);压力换能器(TP-200T,日本光电);数字酸度计

作者单位:北京中医药大学(北京 100029)

通讯作者:张素清,博士,现在中国科学院生物物理研究所(北京 100101),Tel:010-64888504,E-mail:zhangsqing@sina.com.cn

(PHS-3C 型, 梵隆仪器有限公司)。高效液相色谱仪, Waters486, 美国 Waters 公司产品。

4 方法 将动物随机分为 2 组, 每组 16 只, 对照组使用 mEC 液(mEC 组); 实验组使用添加红花的 mEC 液(红花组), 浓度为红花 5g/L。大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦(5ml/kg), 麻醉后, 股静脉注射 0.1% 肝素(0.6ml/kg), 2~3min 后, 迅速打开胸腔, 剪取心脏, 放入 4℃ KH 液中停搏, 修剪心脏并安装主动脉插管, 进行 Langendorff 装置灌注。从打开胸腔到灌注时的时间在 1.5min 以内, 灌注压为 60mmHg, 灌注液为 37℃ 恒温 KH 液, 充以 95% O₂ 和 5% CO₂。安装心室内球, 调整充液量, 使左心室舒张末压为 10mmHg。稳定 5min 后开始计时, 20min 后测定冠脉流量(CF), 记录心功能指标。测量结束后, 以 15ml 4℃ 冷保存液(mEC 液或添加红花注射液的 mEC 液)恒压灌注停搏, 灌注压为 60mmHg, 灌注 5min 后取下心脏, 放入 20ml 同种保存液中, 4℃ 保存 20h, 再次进行 Langendorff 装置灌注, 条件同前。于再灌注 40min 记录心功能指标, 并测定冠脉流量(CF)。再灌注结束后, 随机抽取 8 个心脏样本, 将心肌肌分成两部分, 一部分取样品 >0.1g, 立即匀浆, 放入 4℃ 冰箱中待测。剩余部分放入 20% 的甲醛溶液中固定, 待测。

5 观察指标

5.1 心功能参数 左心室最大收压(LVPSP)、室内压最大变化率(± dp/dtmax), 心率(HR)。

5.2 CF 于再灌注前后收集 2min 的流量, 取平均值。

5.3 心肌含水量 再灌注结束后立即取下心脏, 随机抽取 8 个心脏样本, 用滤纸拭干, 称取湿重, -10℃ 冷冻保存, 实验结束后, 置烘烤箱中 80℃ 恒温烘烤至心脏重量不再变化时称取干重, 按下列公式计算心肌含水量: 心肌含水量(%) = (1 - 心肌干重/心肌湿重) × 100%。

5.4 心肌组织 EC 取样品 >0.1g, 用生理盐水制成 10% 匀浆, 取 1ml 匀浆加入 1ml 3% 高氯酸, 3 000r/min 离心 10min, 取上清液 1ml 加入 20% KOH 80μl。采用高效液相色谱法检测心肌组织 EC。色谱条件: 紫外线检测波长 254nm, 流动相: 0.05mol/L 磷

酸盐缓冲液(pH = 6.0), 加入 1% 甲醇, pH: 7.0。流量: 0.8ml/min。

$$EC = (ATP + 0.5ADP) / (ATP + ADP + AMP)$$

5.5 bcl-2 心肌组织石蜡切片。试剂盒由武汉博士德生物技术有限公司提供。染色方法参见试剂盒说明。计数方法: 光镜下观察, bcl-2 蛋白阳性表达的细胞浆呈棕黄色染色。采用半定量计数法。即在每张玻片上, 分别随机选择 10 个区域, 每个区域计数 100 个细胞, 统计出阳性表达的细胞数, 然后加在一起, 即为每千个心肌细胞中 bcl-2 蛋白阳性表达的细胞数⁽³⁾。

5.6 病理学检测 心肌组织石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察心肌细胞水肿、坏死等情况。

6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验。

结 果

1 红花注射液对保存心脏心功能及 CF 的影响 见表 1。大鼠心脏保存 20h, 再灌注 40min 后, 红花组心脏收缩、舒张功能及冠脉流量恢复率明显高于 mEC 组(*P* < 0.01); 两组心率比较差异无显著性。

2 保存后红花注射液对心肌含水量、心肌组织 EC、bcl-2 蛋白表达的影响 见表 2。心肌含水量: 保存后红花组低于 mEC 组, 但无统计学意义。心肌组织抗细胞凋亡基因 bcl-2 蛋白表达的阳性细胞千分率: 红花组明显高于 mEC 组, 差异有显著性(*P* < 0.05)。两组 EC 比较, 差异无显著性(*P* > 0.05)。

表 2 保存后两组心肌含水量、EC 及 bcl-2 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌含水量(%)	EC	bcl-2 阳性细胞千分率(%)
mEC	8	85.29 ± 0.81	0.50 ± 0.04	29.01 ± 9.84
红花	8	84.48 ± 2.75	0.53 ± 0.04	43.68 ± 9.86*

注: 与 mEC 组比较, * *P* < 0.05

3 保存后红花注射液对大鼠心脏病理学改变的影响 保存后 mEC 组大鼠心脏心肌细胞溶解成空泡状, 可见多处灶性溶解坏死灶。局部炎性细胞浸润、嗜酸性变。心肌细胞纤维断裂(图 A)。红花组大鼠心脏心肌细胞排列、结构基本正常, 横纹清晰, 偶见心肌纤维溶解坏死(图 B)。

表 1 心脏保存后两组心功能及 CF 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVPSP (mmHg)	+ dp/dtmax (mmHg/s)	- dp/dtmax (mmHg/s)	HR (次/min)	CF (ml/min)
mEC	16	19.90 ± 9.08	14.75 ± 6.04	12.89 ± 4.99	46.94 ± 16.70	24.60 ± 8.16
红花	16	44.42 ± 13.16*	42.22 ± 16.38*	41.16 ± 15.41*	50.22 ± 10.09	55.84 ± 12.65*

注: 与 mEC 组比较, * *P* < 0.01

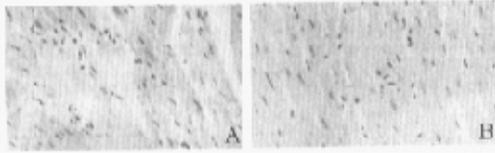


图 1 保存后红花注射液对大鼠心脏病理学改变的影响

A: mEC 组大鼠心脏, 心肌细胞溶解成空泡状, 可见多处灶性溶解坏死灶, 局部炎性细胞浸润, 嗜酸性变。心肌细胞断裂; B: 红花组大鼠心脏, 心肌细胞排列, 结构基本正常, 横纹清晰, 偶见心肌纤维溶解坏死($\times 400$)

讨 论

红花养血活血, 心主血脉, 养血即养心。本实验将红花注射液(5g/L)加入到 mEC 液中, 4°C 保存大鼠心脏 20h 后, 红花注射液可改善大鼠心脏的收缩和舒张功能, 增加其冠脉流量, 增强保存心脏的 bcl-2 的蛋白表达, 而对保存心脏的能荷值无明显改善。

心功能是评价心脏保存效果的主要指标。同种原位心脏移植后, 如供心能胜任受者的循环功能, 则证明保存有效。冠脉流量充足心肌细胞可获得足够的营养物质和氧, 心肌代谢产物也可被及时清除。冠脉流量的多少还可反映冠脉的收缩情况。本实验中, 红花可改善保存心脏的收缩、舒张功能, 增加再灌注后心脏的冠脉流量, 说明红花注射液能够改善低温保存下的心脏保存效果。

心脏保护的宗旨就是完全避免缺血性或再灌注性损伤^[4]。Gottfried 等^[5]于 1994 年研究证实缺血再灌注过程中, 再灌注能使兔心肌细胞凋亡。Fliess H 等^[6]于 1996 年证实大鼠心肌缺血、再灌注均可出现细胞凋亡, 再灌注加速凋亡的发生。Kajstura 等^[7]证实大鼠心肌持续缺血出现早期凋亡。凋亡细胞数量是心肌功能恢复的重要因素。bcl-2 为抗细胞凋亡基因, 检测 bcl-2 的阳性表达, 可间接反映组织细胞的凋亡情况。有研究表明, 红花注射液明显增强大鼠缺血再灌注心肌组织 bcl-2 蛋白表达光密度值, 降低 Fax 蛋白表达光密度值^[8], 本研究也显示红花注射液可明显增加 bcl-2 的蛋白表达。表明红花注射液可对抗大鼠离体心脏心肌细胞的凋亡。

从器官冷冻保存领域来说, 离体心脏的保存远较离体肝脏及肾脏的保存复杂。其中一个因素是因为缺血后再灌注时需要更多的能量支持, 以便使心肌立即进行搏动。而冷冻保存过程中心肌组织的能量耗竭是造成损伤的一大因素。文献报道, 心肌 ATP 下降至缺血前 50% 以下, 供心功能不能恢复^[9]。本组实验心肌

组织能荷值两组差异无显著性 ($P > 0.05$), 说明红花对低温保存下心脏的能量消耗无改善。因此, 红花的心脏保护作用不是通过降低能量消耗来实现的。

综上所述, 红花注射液可提高心脏的保存效果, 而红花注射液上调 bcl-2 阳性细胞表达, 对抗心肌细胞凋亡可能是其心脏保护机制之一。另外, 红花具有活血化瘀之功, 现代药理学研究显示, 红花可改善心肌供血、降低心肌耗氧量, 这些都有利于心脏的保存。

参 考 文 献

- 1 Neumar RW, Lathers CM, Tumer N, et al. Myocardial high energy phosphate metabolism during ventricular fibrillation with total circulatory arrest. Resuscitation 1990;19(3):199-205.
- 2 Trieb K, Eberl T, Steger M, et al. Apoptosis is involved in endothelial cell damage during preservation and influenced by organ storage solutions. Transpl Proc 1997;29(6):416-421.
- 3 马中富, 马虹, 叶任高, 等. 实验性心肌梗塞心肌细胞凋亡的研究. 中国急救医学 1999;19(10):577-580.
Ma ZF, Ma H, Ye RG, et al. Study of myocyte apoptosis in sudden death with acute myocardial infarction. Chin J Crit Med 1999;19(10):577-580.
- 4 宋剑非. 心脏移植供心的保护. 华夏医学 2002;15(2):261-263.
Song JF. Preservation of donor heart for heart transplantation. Acta Medicinæ Sinica 2002;15(2):261-263.
- 5 Cottlief RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in ischemic and reperfusion rabbit cardiomyocytes. J Clin Invest 1994;94(4):1621-1628.
- 6 Fliess H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. Circ Res 1996;79(5):949-956.
- 7 Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptosis and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. Lab Invest 1996;74(1):86-107.
- 8 明节银, 蒋建刚, 刘复兴, 等. 红花注射液对大鼠缺血再灌注心肌组织 bcl-2 和 Bax 基因表达的影响. 咸宁医学院学报 2002;16(2):81-84.
Ming JY, Jiang JG, Liu FX, et al. Effects of Carthamus Tinctorius L. injection on expression of bcl-2 and Bax genes in rat hearts with myocardial ischemia-reperfusion. J Xianning Med Coll 2002;16(2):81-84.
- 9 Wicomb WN, Hill DJ, Avery JG, et al. Donor heart preservation-limitation of cardioplegia and warm ischemia. Transplant 1992;53(4):947-949.

(收稿:2003-08-09 修回:2003-10-08)