

西洋参叶总皂苷对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响

殷惠军¹ 张颖¹ 蒋跃绒¹ 罗兰² 刘颖¹ 史大卓¹ 陈可冀¹

摘要 目的 观察西洋参叶总皂苷(PQS)对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响。方法 取 Wistar 大鼠 50 只,随机分为 5 组,除假手术组 10 只大鼠开胸暴露左冠状动脉,但不作结扎外,其余 40 只大鼠结扎冠状动脉左前降支造成急性心肌梗死(AMI)模型,造模成功后,分别给 PQS 大、小剂量,即 54 mg/kg 和 27 mg/kg,开搏通和生理盐水,连续给药 7 天;采用原位末端标记凋亡的心肌细胞,免疫组织化学法测定 Bcl-2 和 Fas 的表达。结果 模型组大鼠心肌细胞凋亡指数(46.48%)明显高于假手术组(1.03%, $P<0.01$);与模型组比较,开搏通组和 PQS 大、小剂量组 3 组心肌细胞凋亡显著下降(分别为 23.53%、17.58%、25.17%,均 $P<0.01$);开搏通组和 PQS 大、小剂量组 Bcl-2 基因表达均上调,Fas 蛋白表达均下调。结论 PQS 能明显抑制急性心肌梗死后大鼠心肌细胞凋亡,下调 Fas 蛋白表达,上调 Bcl-2 蛋白表达,具有抗缺血心肌损伤的作用。

关键词 西洋参叶总皂苷;急性心肌梗死;心肌细胞凋亡;Bcl-2 蛋白;Fas 蛋白

Effect of Folium Panax Quinquefolium Saponins on Apoptosis of Cardiac Muscle Cells and Apoptosis-related Gene Expression in Rats with Acute Myocardial Infarction YIN Hui-jun, ZHANG Ying, JIANG Yue-rong, et al Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100091)

Objective To observe the effect of Folium Panax quinquefolium saponins (PQS) on apoptosis of cardiac muscle cells (CMCs) and apoptosis-related gene expression in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Fifty Wistar rats were randomly divided into 5 groups, 40 rats underwent coronary ligation of left anterior descending branch to establish AMI rats model, while to the other 10 rats in the sham-operation group, thoracotomy without coronary ligation was carried out. The AMI model rats in treated groups were treated with high-dosage PQS, low-dosage PQS, captopril respectively for 7 days, and those in the control group were treated with normal saline instead. Then, the apoptotic CMCs were labeled by TUNEL and the expression of Bcl-2 and Fas in cardiac muscle cells were determined by immunohistochemical methods. **Results** The apoptotic index of CMCs in the model rats (46.48%) was significantly higher than that in the sham-operation group (1.03%, $P<0.01$). CMCs apoptosis rate in the low-dosage PQS group, the large-dosage group and the captopril group was 23.53%, 17.58% and 25.17%, respectively, all were significantly lower than that in the sham-operation group ($P<0.01$). The expression of Bcl-2 gene was up-regulated and expression of Fas protein was down-regulated in the three treated groups. **Conclusion** PQS can inhibit CMCs apoptosis in AMI rats, down-regulate Fas protein expression and up-regulate Bcl-2 protein expression, and has antagonistic effect in myocardial ischemic injury.

Key words Folium Panax quinquefolium saponins; acute myocardial infarction; apoptosis of cardiac muscle cells; Bcl-2 protein; Fas protein

有研究证实,在急性心肌梗死(AMI)中,梗死区同

基金项目:首都医学发展科研基金资助(No. 03-III-06)

作者单位:1. 中国中医研究院西苑医院心内科(北京 100091);

2. 佳木斯大学医学院

通讯作者:殷惠军/Tel 010-62874093/E-mail: huijun_yin@yahoo.

com.cn 万方数据

时存在细胞凋亡和坏死,而梗死早期以细胞凋亡为主,故在 AMI 早期设法阻断凋亡信号转导途径,减少细胞凋亡及迟发性细胞坏死可能是减少缺血区细胞死亡的一条有效途径^[1-3]。以往有研究表明,西洋参叶总皂苷(PQS)能明显缩小心肌梗死面积,降低血清磷酸肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)活性,并明显降低血

清游离脂肪酸(FFA)及脂质过氧化物(LPO)含量 ,提高超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性 ,亦能明显增加心肌血流量 ,降低冠脉阻力等^[4-6]。然而 ,PQS 对缺血后心肌细胞凋亡有无影响 ,未见文献报道。我们通过 AMI 大鼠模型 ,观察了 PQS 对大鼠心肌梗死后心肌细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响 ,现报告如下。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 选用健康雄性 Wistar 大鼠 ,体重 180~220g ,由中国科学院动物研究所提供 ,合格证号 :京动许字 2000-013-058。

1.2 药物 PQS 商品名为心悦胶囊 ,每粒 0.3g ,含人参皂苷 Re 50mg ,由吉林集安制药有限公司提供。开搏通 ,每片 12.5mg ,中美上海施贵宝制药有限公司生产。原位末端标记检测细胞凋亡试剂盒 ,德国 ROCHE-B.M 公司提供。Bcl-2 及 Fas 基因表达试剂盒 ,美国 Santa Cruz 公司提供。

2 方法

2.1 动物模型制作 大鼠乙醚麻醉后经左侧第 4 肋间剪开皮肤 ,钝性分离肌肉组织 ,打开胸腔 ,剪开心包膜 ,挤压出心脏 ,在左心耳与肺动脉圆锥之间穿线 ,结扎左冠状动脉前降支(于分支起点处约 1~2mm)造成 AMI 模型 ,然后迅速将心脏放回胸腔 ,随即缝合胸腔及皮肤。假手术组(10 只)除不结扎冠状动脉外 ,其余操作与 AMI 模型组动物相同。术后给予青霉素 4 万 U ,并记录标准肢导联 II 导(纸速 50mm/s)心电图 ,ST 段弓背抬高示 AMI 形成。

2.2 分组与给药 造模后的 40 只大鼠随机均分为 4 组 ,即模型组、开搏通组和 PQS 大、小剂量组 ,每组 10 只 ;开搏通组于造模 48h 后开始每天给予开搏通 5.0 mg/kg ,每天 1 次灌胃 ,连续 7 天 ;PQS 大、小剂量组于造模 48h 后开始每天给予 PQS 溶液(含西洋参叶总皂苷分别为 54 mg/kg、27 mg/kg) ,每天 1 次灌胃 ,连续 7 天 ;假手术组和模型组每天给予等量生理盐水 ,每天 1 次灌胃 ,连续 7 天。至第 7 天时开搏通组、PQS 大、小剂量组各死亡 2 只 ,模型组死亡 3 只。

2.3 凋亡及凋亡相关基因检测 按文献^[7]方法。取材 给药结束后次日处死动物 ,分别取出心脏 ,切取部分心尖组织 ,置于 4% 多聚甲醛液中固定 48h 后乙醇逐级脱水 ,二甲苯透明 ,石蜡包埋 ,供光镜观察及细胞凋亡检测。心肌细胞凋亡测定按照德国 ROCHE-B.M 原位末端标记检测细胞凋亡试剂盒说明书进行 ,

采用 TUNEL 标记法。凋亡指数 :凋亡细胞定量计数单位以凋亡指数表示 ,即 400 倍视野下分别随机选择 10 个区域 ,每个区域计数 100 个细胞 ,其公式为 :凋亡指数(AI)= 凋亡细胞数/总观察细胞数 × 100 %。

Bcl-2 及 Fas 基因蛋白表达的免疫组化检测按美国 Santa Cruz 公司试剂盒说明书进行。Bcl-2 及 Fas 蛋白表达强度依照阳性产物着色深浅及阳性细胞数的多少分为 4 级 : - "为阳性细胞 < 25 % 或背景同空白对照 ; + "为 25 % ~ 50 % 细胞明显阳性 ; ++ "为 50 % ~ 75 % 细胞明显阳性 ; +++ "为 > 75 % 细胞明显阳性。

3 统计学方法 采用单因素方差分析或等级资料秩和检验。

结 果

1 PQS 对急性缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响 见表 1。与假手术组比较 ,模型组、开搏通组、PQS 大、小剂量组心肌细胞凋亡指数均明显升高($P < 0.01$) ,与模型组比较 ,开搏通和 PQS 大、小剂量 3 组大鼠心肌细胞凋亡显著下降($P < 0.01$) ,且 PQS 大剂量效果优于开搏通 ,但差异无显著性 ;PQS 小剂量效果与开搏通相近。结果提示开搏通和 PQS 均能明显抑制大鼠缺血后心肌细胞凋亡。

表 1 各组大鼠心肌细胞凋亡指数比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡指数
假手术	10	1.03 ± 0.35
模型	7	46.48 ± 4.85 *
开搏通	8	23.53 ± 4.32 *△
PQS 大剂量	8	17.58 ± 4.38 *△
小剂量	8	25.17 ± 6.32 *△

注 :与假手术组比较 ,* $P < 0.01$;与模型组比较 ,△ $P < 0.01$

2 PQS 对急性缺血大鼠心肌组织 Bcl-2 基因表达的影响 见表 2。Bcl-2 阳性细胞数 :模型组和假手术组两组比较差异有显著性($P < 0.01$) ;3 用药组与模型组比较差异均有显著性($P < 0.01$)。说明开搏通和 PQS 均能明显上调缺血后心肌组织 Bcl-2 基因表达。

表 2 各组大鼠心肌组织 Bcl-2 基因表达情况 (只)

组别	n	着色强度(免疫反应强度)			
		-	+	++	+++
假手术	10	6	4	0	0
模型 *	7	1	5	1	0
开搏通△	8	0	3	4	1
PQS 大剂量△	8	0	4	3	1
小剂量△	8	0	2	5	1

注 :与假手术组比较 ,* $P < 0.01$;与模型组比较 ,△ $P < 0.01$

3 PQS 对急性缺血大鼠心肌组织 Fas 基因表达的影响 见表 3。Fas 阳性细胞数 :模型组和假手术组

比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。3 用药组与模型组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$)。说明开搏通和 PQS 均能明显下调大鼠缺血后心肌组织 Bcl-2 基因表达。

表 3 各组大鼠心肌组织 Fas 基因表达情况 (只)

组别	n	着色强度(免疫反应强度)			
		-	+	++	+++
假手术	10	9	1	0	0
模型*	7	0	1	2	4
开搏通 [△]	8	0	3	3	2
PQS 大剂量 [△]	8	0	2	5	1
小剂量 [△]	8	0	4	3	1

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$

讨 论

根据心肌缺血发生的快慢、缺血程度的轻重、缺血时间的久暂和缺血后血流的恢复等情况,缺血心肌在形态、功能和代谢等诸多方面可呈现不同形式的损伤。缺血的发生是多种原因共同作用的结果,例如,酸中毒、钙超载、能量匮乏和自由基损伤等均参与心肌缺血损伤的发生过程。尽管如此,引起这些损伤的始动环节仍在于缺血,因此,从治疗角度来看,尽快有效地恢复对缺血心肌的有效灌流是防治心肌缺血损伤的根本措施。但是在血流没有恢复之前,如何保存、延长缺血心肌细胞活力,阻止可逆性损伤向不可逆损伤演变,这是防治心肌缺血损伤的关键^[7,8]。有研究证实 AMI 中,梗死区同时存在细胞凋亡和坏死,而梗死早期以细胞凋亡为主,故在 AMI 早期设法阻断凋亡信号转导途径,减少细胞凋亡及迟发性细胞坏死可能是减少缺血区细胞死亡的一条有效途径^[9]。

Bcl-2 基因家族成员自身或与 Fas 彼此之间可形成二聚体或多聚体,通过蛋白—蛋白相互作用调节细胞的存活或凋亡。Bcl-2 抑制心肌细胞凋亡,Fas 则与 Bcl-2 相拮抗,促进心肌凋亡。Bcl-2 和 Fas 对于心肌细胞凋亡的调节起决定作用,因此有学者将 Bcl-2 和 Fas 称为心肌细胞的“死亡开关”。

动物实验观察证明,PQS 具有如下作用:(1)降低高胆固醇血症大鼠血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和 LPO 水平,升高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量,增加血清 SOD 活性。(2)明显缩小心肌梗死面积,减轻胸前多导联心电图的缺血性变化,降低血清 CK 和 LDH 活性,减轻梗死后血液高凝状态,减慢凝血酶形成速度,减少纤维蛋白的形成,显著延长缺氧小鼠存活时间,并证明心肌保护作用与降低血清游离脂肪酸、LPO 水平和改善缺血心肌代谢有关。(3)增加冠脉循环,改善心肌代谢,降低冠脉阻力,显著增加心肌血

流量,同时可显著降低心肌耗氧量和耗氧指数。临床研究表明,PQS 可降低总胆固醇、甘油三酯、LDL-C 和 LPO 水平,升高 HDL-C,抑制血小板聚集,降低血浆血栓素 A₂,升高前列腺素 I₂,降低全血黏度,提高红细胞变形能力,增强红细胞中 SOD 活性,对冠心病、血脂异常有一定防治作用。

然而,该制剂抗心肌损伤机制如何?是否影响缺血后心肌细胞凋亡及其相关基因表达?文献未见报道。本实验结果显示,大鼠急性心肌缺血后心肌细胞呈现过度凋亡,心肌组织 Fas 蛋白表达水平显著增加,而 Bcl-2 蛋白表达水平却显著降低。PQS 能明显抑制缺血心肌细胞过度凋亡,其下调了缺血心肌组织 Fas 基因表达,并上调了缺血心肌组织 Bcl-2 基因表达,这是其抗急性心肌缺血的主要作用机制之一。

参 考 文 献

- 1 胡丙杰,陈建国,徐小虎,等.早期心肌缺血心肌细胞凋亡的实验研究.中国法医学杂志 2001;16(2):65—68.
Hu BJ, Chen JG, Xu XH, et al. Experimental study on the cardiomyocyte apoptosis in the early myocardial ischemia. Chin J Forensic Med 2001;16(2):65—68.
- 2 郑勇萍,王焱林,陈 锋,等.大鼠心肌缺血预处理对细胞凋亡的影响.中华中医学杂志 2002;26(5):265—266.
Zhen YP, Wang YL, Chen F, et al. Effect of apoptosis in ischemic preconditioning rats. Chin J TCM 2002;26(5):265—266.
- 3 Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, et al. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. Circulation 1998;97(22):2259—2267.
- 4 杨世杰,陈 霞,李 红,等.西洋参叶皂甙单体 Rb3 对大鼠血流动力学及单钙通道活动的影响.中国药理学通报 1995;11(1):39—43.
Yang SJ, Chen X, Li H, et al. Influence of panax quinquefolium saponin monomer Rb3 on hemodynamics and single calcium channel activity in rats. Chin J Pharmacol Bull 1995;11(1):39—43.
- 5 睢大员,于晓风,曲绍春,等.西洋参叶 20s-原人参二醇组皂苷对犬急性心肌梗死的保护作用.中国中药杂志 2001;26(6):416—419.
Sui DY, Yu XF, Qu SC, et al. Protective effect of Panax quinquefolium 20s-proto-panaxdiol saponins on acute myocardial infarction in dogs. Chin J Chin Materia Med 2001;26(6):416—419.
- 6 刘尚裕,睢大员,于晓风,等.西洋参叶 20s-原人参二醇组皂苷对急性心肌梗死犬血流动力学和氧代谢的影响.中国药理学杂志 2001;36(1):25—29.

- Liu SY, Sui DY, Yu XF, et al. Effects of Panax quinquefolium 20s-protopanaxdiol saponins on the hemodynamics and cardiac oxygen metabolism in dogs with acute myocardial infarction. Chin J Pharm 2001 36(1):25—29.
- 7 成伶俐, 马中富, 马虹. 实验性急性心肌梗死中 Bax 和 Bcl-2 基因对心肌细胞凋亡的调控. 岭南心血管病杂志 2002 8(3):206—209.
- Cheng LL, Ma ZF, Ma H. Regulation of Bax and Bcl-2 gene on the cardiocyte apoptosis in acute myocardial infarction in rabbits. Lingnan J Cardiovasc Dis 2002 8(3):206—209.

- 8 朱妙章, 袁文俊, 吴博威, 等. 心血管生理学与临床. 北京: 高等教育出版社 2004:28—35.
- Zhu MZ, Yuan WJ, Wu BW, et al. Cardiovascular physiology and clinics. Beijing: Higher Education Press, 2004:28—35.
- 9 Ma XL, Gao F, Lopez B, et al. Peroxynitrite, a two-edged sword in post-ischemic myocardial injury-dichotomy of action in crystalloid-versus blood-perfused hearts. J Pharmacol Exp Ther 2000 293(3):912—920.

(收稿 2004-10-15 修回 2004-12-20)

血塞通软胶囊辅助治疗髌骨软骨病 38 例

王健 张佐伦 张伟 孙水

髌骨软骨病又称髌骨软化症,是以膝前疼痛为主要表现的常见疾病。2001 年 1 月—2003 年 11 月,我们在应用关节镜下软骨面修整、髌骨钻孔减压(简称手术)治疗的基础上配合血塞通软胶囊治疗髌骨软骨病 38 例,并与单纯手术治疗的 30 例作对照,现报道如下。

临床资料 68 例患者均符合髌骨软化症诊断标准(王亦璁主编. 膝关节外科的基础与临床. 北京:人民卫生出版社, 1999:310—312)并且均经过关节镜证实。排除关节镜下证实为髌下脂肪垫炎、内侧滑膜皱襞综合征引起的膝前痛患者。按入院前后顺序随机分为两组,治疗组 38 例,男 15 例,女 23 例;年龄 23~58 岁,平均 43 岁,病程 0.5~6 年,平均 1.5 年,髌骨软骨损伤程度[按 Ogilvie-Harris, Ogilvie-Harris DJ, Jackson KW. The arthroscopic treatment of chondromalacia patellae. J Bone Joint Surg (Br) 1984(66-B):660—665]:Ⅱ级(软骨破裂、破碎、纤维化,外观呈蟹肉状)30 例,Ⅲ级(软骨下硬化的骨质外露或伴有股骨髌面关节软骨的退变)8 例。对照组 30 例,男 12 例,女 18 例,年龄 21~54 岁,平均 42 岁,病程 5 个月~7 年,平均 1.7 年,软骨损伤程度:Ⅱ级 24 例,Ⅲ级 6 例。两组患者资料比较差异无显著性($P>0.05$),具有可比性。

方 法

1 **治疗方法** 两组患者均经硬膜外麻醉行关节镜下射频修整损伤的软骨面,髌骨周围钻孔减压,术后常规用抗生素治疗 5~7 天。治疗组术后第 2 天开始服用血塞通软胶囊(每粒含三七总皂苷 60mg,由昆明圣火制药有限公司生产)2 粒,每天 3 次,1 个月为 1 个疗程,用 2~5 个疗程,可连续或间断使用。对照组术后除常规用抗生素外,不再使用任何药物。两组术后第 1、3 个月各复诊 1 次,以后每 3 个月复诊 1 次,评价疗效并指导用药。随访情况:治疗组随访 0.5~3 年,平均 1.9 年,对照组随访 0.6~3 年,平均 1.9 年。

2 **观察指标** (1)临床症状:包括疼痛、肿胀和关节活动

范围,记录由下蹲位站立、爬坡或上下楼梯时的疼痛情况。(2)两组患者均在术前、术后 3 个月和最后一次随访时行血常规、凝血 4 项、肝肾功能检查。

3 **统计学方法** 采用 χ^2 检验。

结 果

1 **疗效标准** 参照有关文献(中华骨科杂志 1985;5(4):198—201)标准,优:疼痛消失,关节活动正常。良:疼痛基本消失,劳累后有不适感,关节活动正常。可:疼痛较术前减轻,劳累后可加重,关节活动略受限。差:疼痛较术前无改善,甚至加重。

2 **两组疗效比较** 治疗组 38 例,优 16 例(42.1%),良 19 例(50.0%),可 3 例(7.9%),优良率为 92.1%;对照组 30 例,优 9 例(30.0%),良 13 例(43.3%),可 8 例(26.7%),优良率为 73.3%。两组优良率比较差异有显著性($P<0.05$)。

3 **两组患者术后血常规、凝血 4 项、肝肾功能与术前比较** 差异无显著性(具体数据略)。说明血塞通软胶囊无凝血改变和肝肾功能损害。

讨 论 中医学认为本病为关节劳损引起的气血凝滞、经络淤塞不通或复感风寒湿邪、痹阻经络所致。骨内静脉淤阻,骨内压增高,血液循环障碍,骨营养代谢失调,导致局部疼痛,这也正是中医“通则不痛,痛则不通”理论的具体体现。手术使髌骨内压力降低,血液循环改善,疼痛减轻,但是这种效果能否长期维持或通过什么手段长期维持,是临床医生最关心的问题。三七为云南特产珍贵药材,具有止血不留瘀、活血不妄行的血液调节作用。血塞通软胶囊其主要成分为三七总皂苷,辅以药用油脂,并以油脂为载体,作成软胶囊剂型,具有抗胃酸降解、吸收迅速、药效高、生物利用度好的优点,克服了中药剂量大、疗效慢的弊端。本品与手术减压相配合,有利于局部血液循环的改善、动脉供血和静脉回流系统的重新建立,治疗效果更加稳定,为治疗本病提供了新的前景。

(收稿 2004-07-14 修回 2004-11-25)