

黄芪注射液对大鼠左室重构及凋亡基因 Caspase-3 的影响

马 兰 关振中

摘要 目的 观察黄芪注射液对大鼠心肌梗死后左室重构及凋亡基因 caspase-3 的影响。**方法** 制作心肌梗死大鼠模型,实验分为 4 组,Ⅰ组(假手术组)、Ⅱ组(假手术+黄芪组)、Ⅲ组(模型组)和Ⅳ组(模型+黄芪组)。Ⅱ和Ⅳ组大鼠术后每日腹腔注射黄芪注射液 2ml,Ⅰ组和Ⅲ组大鼠给等体积生理盐水,连续用药 4 周后,观察左室结构变化,心肌羟脯氨酸含量及用免疫组化检测 caspase-3 表达。**结果** 与Ⅲ组比较,Ⅳ组心肌超微结构和左室重构指标改善,羟脯氨酸含量减少($P < 0.05$),caspase-3 阳性细胞明显减少,caspase-3 mRNA 表达明显下调($P < 0.05$)。**结论** 黄芪注射液能改善大鼠心肌梗死后左室重构,并下调凋亡基因 caspase-3 表达,抑制凋亡。

关键词 黄芪注射液;心肌梗死;左室重构;caspase-3

Effect of Astragalus Injection on Left Ventricular Remodeling and Apoptotic Gene Caspase-3 in Rats After Myocardial Infarction MA Lan, and GUAN Zhen-zhong *The Second Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin (150086)*

Abstract Objective To investigate the effect of Astragalus injection (AI) on left ventricular remodeling and the expression of apoptotic gene caspase-3 in rats after myocardial infarction (MI). **Methods** The MI model was established. The experimental animals were divided into 4 groups, Group I (the sham-operated group), Group II (the sham-operated plus AI group), Group III (the model group), Group IV (the model plus AI group). Animals in the II and IV group were intraperitoneally injected with 2ml AI once a day after operation, while animals in the I and III group were treated with normal saline of equal volume. After treated for 4 weeks successively, the structural change of left ventricle and the level of oxyproline in myocardium were observed, and expression of caspase-3 was determined by immunohistochemical method. **Results** As compared with Group III, the ultrastructure of myocardium and indexes of left ventricular remodeling were improved, the myocardial content of oxyproline decreased ($P < 0.05$), the caspase-3 positive cells reduced and caspase-3 mRNA expression significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** AI can improve left ventricular remodeling, inhibit apoptosis by down-regulate the expression of apoptotic gene caspase-3 in rats after MI.

Key words Astragalus injection; myocardial infarction; left ventricular remodeling; caspase-3

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后的室室重构是心力衰竭、心功能低下产生的主要原因。如何改善室室重构,降低 AMI 后的死亡率已引起人们的广泛关注。很多研究证明药物(如转换酶抑制剂)治疗可以改善左室重构^[1,2]。本研究观察黄芪注射液对大鼠心肌梗死后左室重构以及对凋亡基因 caspase-3 的影响,并进一步了解 caspase-3 在室室重构中所起的作用。

材料和方法

1 药物和试剂 黄芪注射液(每毫升含生药 1g),成都地奥九弘制药厂生产,批号 9809101;羟脯氨酸试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供;免疫组化试剂盒,由天津津脉基因测绘技术有限公司提供;RT-PCR 试剂盒,为 Promega 产品;Trizol 试剂,为美国 Invitrogen 公司产品;引物合成由博亚公司完成,引物序列如下:

caspase-3: 5'GGCCTGAAATACGAAGTCA3';
5'GCATGCCATATCATCGTCAG3'.
β-actin : 5'GTGGGGCGCCCCAGGCACCA3';

基金项目:黑龙江省科技攻关课题(No. GC04C30106)
作者单位:哈尔滨医科大学附属第二医院(哈尔滨 150086)
通讯作者:马 兰, Tel :13030099055, E-mail: malan1963@yahoo.com.cn

5'GTCCTTAATGTAACGCACGATTTC3'.

2 动物 正常健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 250~300g, 由本院实验动物中心提供。

3 方法

3.1 模型的制作 用 1% 戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后将大鼠四肢固定, 用无菌注射针刺入四肢皮下连接心电图机, 气管切开接微型呼吸机(频率 60 次/min, 潮气量 20ml/kg), 胸骨左缘 3-4 肋间开胸, 结扎左冠状动脉前降支, 心电图出现 ST 段弓背向左抬高呈单相曲线示为 AMI 模型成功的标志, 将心脏放回胸腔原处, 关闭胸腔。假手术组将丝线在冠状动脉前降支打一松结, 术后动物自行清醒, 单笼饲养。

3.2 分组 将动物随机分为 4 组, I 组(假手术组, 17 只)、II 组(假手术+黄芪组, 17 只)、III 组(模型组, 18 只)、IV 组(模型+黄芪组, 16 只)。II 组和 IV 组术后每日腹腔注射黄芪注射液 2ml。I 组和 III 组每日给予等体积生理盐水腹腔注射, 均连续给药 4 周。

3.3 左室结构观察 动物麻醉后将心脏取出, 立即用预冷的生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 沿房室环剪去心房及右室, 剩下的室间隔及左室游离壁作为左室重量, 测量左心室重量及梗死区和非梗死区室壁的厚度。

3.4 心肌超微结构观察 取心肌梗死区心肌横切厚度约 2mm 放入 2% 戊二醛中 4℃ 固定 24h, 然后常规制备电镜切片, 透射电镜观察心肌超微结构。

3.5 心肌组织羟脯氨酸含量测定 通过测量心肌中羟脯氨酸含量可推算心肌胶原蛋白的含量, 取梗死区及非梗死区心室肌各 200mg 制成匀浆, 按羟脯氨酸测试盒说明操作, 最后取上清液用 721 型分光光度计在 550nm 处测定样品吸光度值, 计算羟脯氨酸含量。

3.6 caspase-3 测定 采用免疫组化方法。取左心室肌横切厚度约 2mm, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24h。常规脱水石蜡包埋切片, 按免疫组化试剂盒说明操作, 一抗的稀释浓度为 1:500, 胞浆呈棕褐色者为阳性细胞。

3.7 caspase-3 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 方法。将心室肌放在液氮中研磨, 加入 1ml Trizol 试剂提取总 RNA, 取 2μg 总 RNA 用于逆转录, 逆转录体系为 20μl, 2μl 的逆转录产物用于 PCR 扩增, 为 25μl 反应体系, 同时扩增 β-actin 作为内参照。caspase-3 的产物片段为 316bp, β-actin 的产物片段为 540bp。PCR 的反应条件为 94℃ 预变性 3min, 然后 32 个循环扩增, 最后 72℃ 延伸 3min, 每个循环包括 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s。其中产物经 1.5% 琼脂

糖凝胶电泳, 通过 Tanon GIS2010 凝胶成像系统计算电泳条带的强度, 将其与 β-actin 蛋白条带强度的比值作为 caspase-3 mRNA 表达量。

4 统计学方法 采用方差分析。

结 果

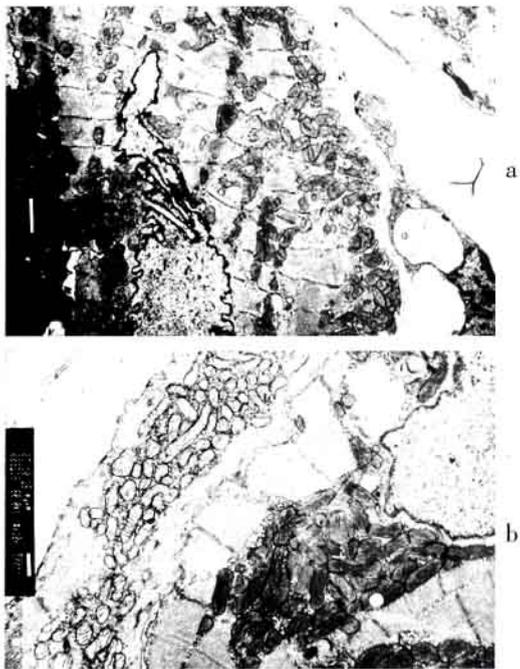
1 各组大鼠左室结构变化 见表 1。各组体重和左室重量/体重比值比较差异无显著性。梗死区室壁厚度: III 组明显变薄, 而 IV 组梗死区室壁厚度变薄明显减轻(与 III 组比较, P<0.01)。非梗死区室壁: III 组明显增厚(与 I 组比较, P<0.05), 而 IV 组室壁增厚则明显减轻(与 III 组比较, P<0.05)。

表 1 各组大鼠左室结构变化比较 (x̄ ± s)

组别	鼠数	体重 (g)	左室重量/体重比 (mg/g)	梗死区室壁厚度 (mm)	非梗死区室壁厚度 (mm)
I	9	323 ± 16	2.46 ± 0.14	—	1.78 ± 0.16
II	10	330 ± 20	2.43 ± 0.10	—	1.83 ± 0.12
III	12	315 ± 17	2.33 ± 0.12	0.91 ± 0.07*	2.53 ± 0.19*
IV	9	321 ± 19	2.41 ± 0.16	1.32 ± 0.11 [△]	2.11 ± 0.20* [△]

注: 与 I 组非梗死区室壁厚度比较, * P<0.01; 与 III 组比较, [△]P<0.05

2 各组大鼠心肌超微结构变化 I 组和 II 组心肌细胞超微结构未见异常表现(图略); III 组(模型组)可见心肌细胞肌节结构排列紊乱, Z 线不清, 核畸变, 固缩; 与 III 组比较, IV 组超微结构改变轻微, 核周线粒体丰富, 嵴完整(见图 1)。



注: a 为 III 组 (×4 000), b 为 IV 组 (×10 000)

图 1 大鼠心肌超微结构

3 各组大鼠心肌组织羟脯氨酸含量测定结果见表 2。左室梗死区羟脯氨酸含量:Ⅲ组梗死区含量明显升高(与同组非梗死区比较, $P < 0.05$),Ⅳ组含量升高明显减轻(与Ⅲ组比较, $P < 0.05$);非梗死区羟脯氨酸含量:Ⅲ组明显升高(与Ⅰ组比较, $P < 0.01$)。

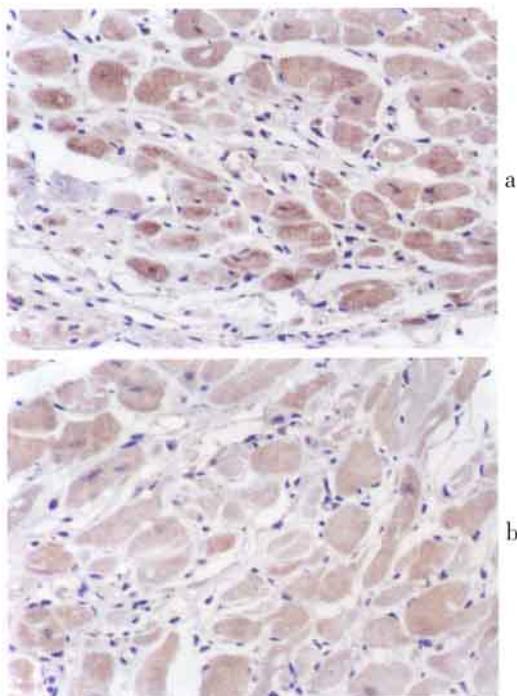
表 2 各组大鼠心肌组织羟脯氨酸含量变化比较 ($\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{prot}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	羟脯氨酸含量	
		梗死区	非梗死区
I	8	—	0.71 ± 0.04
II	7	—	0.73 ± 0.06
III	9	$1.19 \pm 0.12^*$	$0.90 \pm 0.07^* \blacktriangle$
IV	8	$0.96 \pm 0.06^* \triangle$	$0.81 \pm 0.09^\triangle$

注:与Ⅰ组非梗死区比较, * $P < 0.01$;与Ⅲ组比较, $\triangle P < 0.05$;与同组梗死区比较, $\blacktriangle P < 0.05$

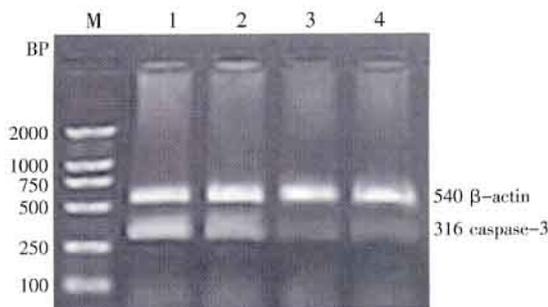
4 Ⅲ组和Ⅳ组大鼠 caspase-3 蛋白表达结果见图 2。免疫组化结果示Ⅲ组 caspase-3 阳性细胞的数量明显增多,蛋白表达增高,而Ⅳ组 caspase-3 表达明显降低。

5 4 组大鼠 caspase-3 mRNA RT-PCR 产物电泳结果见图 3。4 组均有 caspase-3 的特异性扩增条带。Ⅲ组 caspase-3 条带强度与 β -actin 条带强度比值为 0.84,而Ⅳ组二者比值为 0.65,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。



注:a 为Ⅲ组,b 为Ⅳ组

图 2 caspase-3 蛋白表达 (x200)



注:M 为 DNA 分子量标准;1 为Ⅲ组,2 为Ⅳ组,3 为Ⅰ组,4 为Ⅱ组

图 3 caspase-3 mRNA RT-PCR 产物电泳

讨 论

心肌梗死后心肌细胞肥大,左室扩张以及心肌间质纤维化等一系列结构的变化被称为左室重构,它影响着心脏的功能以及预后,心室重构的变化主要表现为梗死区心肌组织水肿坏死,室壁变薄和心室扩大,而非梗死区心肌细胞肥大,心肌失代偿性肥厚和增生^[3,4]。本实验结果显示 AMI 后梗死区室壁明显变薄,而非梗死区室壁增厚,而且胶原纤维沉积,心肌纤维化,梗死区室壁尤为明显。间质的胶原代谢在左室重构中起着重要作用,AMI 后心肌细胞外基质的主要变化是胶原损伤,而且这种胶原蛋白的沉积与心律失常和心脏破裂关系密切。本实验用黄芪注射液治疗 4 周,黄芪作为益气药,可以扩张冠状动脉,改善血管内皮功能,而且具有正性肌力作用,可以抑制磷酸二酯酶活性。有文献报道黄芪可以逆转 AMI 后心室重构^[5,6],而本室实验结果显示黄芪可以改善梗死区室壁变薄的程度,抑制心肌纤维化,改善左室重构与文献报道一致。

本实验还发现黄芪可以降低凋亡基因 caspase-3 的表达,抗细胞凋亡。caspase-3 作为凋亡过程的最终执行者作用尤为重要,很多研究表明心肌细胞发生凋亡时,caspase-3 的表达增加^[7]。而本实验结果也证实 AMI 后心肌细胞 caspase-3 表达增加,而黄芪注射液可以降低 caspase-3 的表达。同时电镜也显示,黄芪不仅可以改善 AMI 后心肌细胞超微结构的损伤,而且可以抑制心肌细胞核固缩染色质边集等细胞凋亡表现,从而抑制细胞凋亡。总之,本实验表明黄芪注射液可以改善大鼠心肌梗死后的左室重构,改善心肌纤维化,而这种作用可能与其降低凋亡基因 caspase-3 的表达、抗细胞凋亡有关。

参 考 文 献

1 Kim YK, Mankad S, Kim SJ, et al. Adding angiotensin II

type 1 receptor blockade to angiotensin-converting enzyme inhibition limits myocyte remodeling after myocardial infarction. J Card Fail 2003 ;9(3):238—245.

2 Mankad S, d' Amato TA, Reichek N, et al. Combined angiotensin II receptor antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition further attenuates postinfarction left ventricular remodeling. Circulation 2001 Jun 12;103(23):2845—2850.

3 Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. Exp Cell Res 1996;226(2):316—327.

4 Li Q, Li B, Wang X, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. J Clin Invest 1997;100(8):1991—1999.

5 王振涛,王硕仁,赵明镜,等. 活血和益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究. 中国中西医结合杂志 2002;22(5):376—378.

Wang ZT, Wang SR, Zhao MJ, et al. Comparative study on effect for activating blood circulation and replenishing qi on left ventricular remodeling in rats with left heart failure after myocardial infarction. Chin J Integr Tradit West Med 2002;22(5):376—378.

6 张金国,高东升,魏广和,等. 黄芪注射液对急性心肌梗死早期患者左室重塑及心功能的影响. 中国中西医结合杂志 2002;22(5):346—348.

Zhang JG, Gao DS, Wei GH, et al. Effect of Astragalus injection on early left ventricular remodeling and cardiac function in elderly patients with acute myocardial infarction. Chin J Integr Tradit West Med 2002;22(5):346—348.

7 Saitoh T, Nakajima T, Kawahara K. Possible involvement of apoptotic death of myocytes in left ventricular remodeling after myocardial infarction. Jpn J Physiol 2003 ;53(3):247—52.

(收稿:2004-07-05 修回:2005-04-16)

缓肺颗粒对慢性阻塞性肺疾病缓解期患者肺通气功能的影响

周庆伟¹ 李素云¹ 吴纪珍²

2000 年 9 月—2004 年 9 月,我们用缓肺颗粒治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)缓解期患者 68 例,并与安慰剂治疗的 68 例作对照,现报告如下。

临床资料 所有患者均符合本病的诊断和分级标准[中华呼吸和结核杂志 1997;20(4):199—203],中医辨证标准参照《中药新药临床研究指导原则》。选择确诊为 COPD 并处于缓解期,中医辨证符合肺肾气虚者。136 例中住院患者 64 例,门诊 72 例。按数字表法随机分为两组,治疗组 68 例,男 45 例,女 23 例;年龄 58~73 岁,平均(70.31±5.01)岁;病程(17.39±2.12)年;病情程度:轻度 10 例,中度 44 例,重度 14 例。对照组 68 例,男 46 例,女 22 例;年龄 56~74 岁,平均(68.98±6.36)岁;病程(18.31±6.06)年;病情程度:轻度 8 例,中度 46 例,重度 14 例。两组患者资料比较差异无显著性。

治疗方法 治疗组患者服用缓肺颗粒(药物组成:人参、黄芪、白术、防风、麦冬、五味子、补骨脂、蛤蚧、山萸肉、冬虫夏草、沉香、葶苈、全蝎、杏仁、浙贝母、川芎等组成,每克颗粒剂相当于原生药 5.78g,由河南中医学院第一附属医院药剂科提供),每次 10g,每日 3 次;对照组服用安慰剂(由山楂和麦芽制成颗粒剂),剂量及服法同治疗组;疗程均为 2 个月。两组患者治疗期间均不应用其他药物与治疗方法。

肺功能测定:所有患者应用 Sensor Medics Ros System 肺功能仪测定肺功能,选择一秒用力呼气容积(FEV_{1.0})、最大呼吸中期流量(MMEF)、最大呼气流速(PEF)作为观察指标,治疗

前后各测定 1 次,每次检查均重复 3 次,取其高值,3 次之间差异在±5%以内。

统计学方法:采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行 *t* 检验。

结果 两组患者肺通气功能测定结果 见表 1。治疗后治疗组患者 FEV_{1.0}、MMEF、PEF、FEV₁% 均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且改善程度明显优于对照组($P < 0.01$)。对照组上述指标治疗前后无明显改变。两组患者均未发现任何不良反应。

表 1 两组患者治疗前后肺通气功能测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	FEV _{1.0} (L)	MMEF(L/s)	PEF(L/s)	FEV ₁ %
治疗	治疗前	1.44±0.34	0.78±0.25	2.04±0.85	50.63±12.70
	(68) 治疗后	1.67±0.50* [△]	0.88±0.35* [△]	2.58±1.54** [△]	61.63±12.70** [△]
对照	治疗前	1.44±0.34	0.78±0.23	2.00±0.84	50.74±12.27
	(68) 治疗后	1.38±0.54	0.76±0.27	2.01±0.82	50.74±14.30

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组治疗后比较,[△] $P < 0.01$;()内数据为例数

讨论 COPD 临床表现以咳、喘、痰、气短为主要症状,属中医学咳嗽、喘证、哮证、肺胀等范畴。病机为肺脾肾气虚,痰瘀互阻于肺。遵中医“缓则治其本”原则,在治疗上以补肺健脾纳气、活血化痰立法,拟定中药复方缓肺颗粒,方中人参、黄芪补肺益气;白术健脾补气;防风祛风解表;五味子收敛肺气;补骨脂、蛤蚧、山萸肉、冬虫夏草、沉香补肺益肾,纳气定喘改善呼吸功能;杏仁、葶苈、浙贝母宣肺清热化痰;川芎、全蝎活血化痰通络而减轻气道阻塞。全方具有补肺固卫、益肾纳气、健脾化痰、固本平喘、活血化痰的功效。长期应用可通过改善患者通气功能,提高免疫功能,减少疾病的加重,阻止疾病进展。

(收稿:2004-10-29 修回:2005-04-06)

作者单位:1. 河南中医学院第一附属医院(郑州 450000);2. 河南省人民医院