

血管紧张素Ⅱ诱导心肌细胞凋亡与增殖的时相特征及益气活血药对其影响

郭书文 崔巍 王硕仁 牛福玲 王国华

摘要 **目的** 动态观察心肌细胞在血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)作用后细胞凋亡与增殖的变化情况及益气、活血中药对其的影响。**方法** 用 AngⅡ 作用于培养的 SD 大鼠乳鼠心肌细胞,利用图像分析系统、流式细胞仪、生化测定等,观察作用不同时间心肌细胞的搏动幅度、节律、频率、蛋白质含量、细胞面积大小、细胞凋亡情况以及益气、活血药对其的影响。**结果** 模型组于实验 24~48 h 细胞搏动频率加快,以 24 h 搏动幅度最大;24 h 心肌细胞面积增大,48 h 明显增大;蛋白质含量于实验 24 h 增加,48 h 达到最高含量;细胞数量 12~48 h 有增多趋势,而从 24 h 有细胞凋亡,48~72 h 凋亡率逐渐增高,72 h 达到最高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明心肌细胞在肥大增生为主期(24~48 h)进入凋亡为主期(48~96 h),益气、活血药均有良好的防治作用,尤以益气加活血药作用明显($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** AngⅡ 作用于心肌细胞后存在肥大增生时间窗与细胞凋亡时间窗的特征。细胞肥大增生为主时,可能出现心肌肥大,细胞凋亡可能是由心肌肥大向心力衰竭转变的机制之一;益气活血药对其有改善作用。

关键词 血管紧张素Ⅱ;心肌细胞;凋亡;增殖;益气活血药

Time-Phase Changed Character of Cardiac Muscle Cell Apoptosis and Proliferation Induced by Angiotensin Ⅱ and Influences of TCM Herbs for Supplementing Qi and Activating Blood Circulation on It GUO Shu-wen, CUI Wei, WANG Shuo-ren, *et al* Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100029)

Abstract **Objective** To observe the dynamic change of apoptosis and proliferation of cardiac muscle cells (CMC) after being induced by Angiotensin Ⅱ (AngⅡ), and the effect of TCM herbs for supplementing qi and/or activating blood circulation on it. **Methods** The cultured CMC of SD suckling rat were treated by AngⅡ, and the amplitude, rhythm and frequency of cell pulsation, the protein content, area size and apoptosis of cells at various phases as well as the influence of TCM herbs afterwards were determined by image pattern analysis system, flow cytometry and biochemical assay. **Results** In the model group, cell pulsation showed quickened frequency from the 24th to 48th hr after AngⅡ treatment with the highest amplitude at the 24th hr; the cell area enlarged at the 24th hr, the enlargement became evident at the 48hr. Cell content of protein increased at the 24th hr, which reached to its peak at the 48th hr; an increasing trend of cell number was shown from the 12th to 48th hr; cell apoptosis started to appear at the 24th hr, it increased gradually from the 48th to 72th hr, and reached to the peak at the 72th hr ($P<0.05$ or $P<0.01$). All the Chinese herbs, both for supplementing qi and/or activating blood circulation, especially when they were used in combination, showed favourable preventive and therapeutic effect on CMC ($P<0.05$ or $P<0.01$), either at the early phase (24—48th hrs) mainly manifesting hypertrophy and proliferation or the late phase (48—96th hrs) mainly manifesting apoptosis. **Conclusion** There exist characterized phasic windows of CMC after being treated by AngⅡ, the window of hypertrophy-proliferation phase and the window of cell apoptosis phase. When CMC were mainly in hypertrophic manner, myocardial hypertrophy may appear. Cell apoptosis may be one of the mechanisms for turning myocardial hypertrophy to heart failure, and it could be improved by Chinese herbs for supplementing qi and/or activating blood circulation.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.90209021)

作者单位:北京中医药大学 159 信箱(北京 100029)

通讯作者:郭书文, Tel:010-64286412, E-mail:guoshuwen5555777@sina.com

ing blood circulation.

Key words Angiotensin II ;cardiac muscle cell; apoptosis; proliferation; Chinese herbs for supplementing qi and activating blood circulation

在心力衰竭情况下,循环中及心肌局部血管紧张素 II (Ang II) 增加,对心肌细胞的生存产生影响。本研究以动态探讨心肌细胞凋亡与增殖的变化情况及其时相演变特征来揭示心肌肥大发展以及向心力衰竭转变的情况,并进一步观察益气、活血中药对其的作用。

材料与方 法

1 材 料

1.1 动物 1~3 天 SD 大鼠乳鼠,SPF 级,许可证 No:SCXK 11-00-0008,北京维通利华实验动物技术有限责任公司提供。

1.2 仪器 Diagnostic Spot 2 e 显微图像分析系统,美国产;E1591 型流式细胞仪,美国 BD 公司生产。

1.3 试剂和药物 胎牛血清,美国 HYCOLONE 产品;HEPES,美国 DNN 公司产品;DMEM、胰蛋白酶,美国 GIBCO 产品;5' 溴脱氧尿嘧啶,上海生物化学研究所提供;Ang II、牛血清白蛋白、碘化丙啶(PI),均为美国 Sigma 公司产品;RnaseA,华美生物技术公司产品;FLUO-3, AM Ester, Bitium, Inc, Fremont, California, 购于北京岳泰科技有限责任公司。益气注射液:由党参、黄芪组成,每毫升含相当于生药 2 g, pH: 6.82;活血注射液:由丹参、川芎、赤芍组成,每毫升含相当于生药 2 g, pH: 6.80,均由北京中医药大学第一临床医学院制剂室按注射剂制备工艺制成。益气活血药按益气注射液与活血注射液 1:2 比例配制。各组中药用量是通过前期多个剂量水平研究筛选确立^[1]。

2 方 法

2.1 心肌细胞培养、模型建立及分组 参照文献^[2,3]方法取心肌进行心肌细胞培养。计数并调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,接种于 6 孔培养板,每孔体积为 3 ml,细胞培养至第 5 天,取出细胞,吸干原培养液,无血清 DMEM 培养液轻轻冲洗细胞 2 次,加入 1% 胎牛血清 DMEM 培养液。用 Ang II 作用心肌细胞建立模型(接种于细胞培养孔的终浓度为 10^{-7} mol/L)^[4]。将细胞分为 5 组,即空白组、模型组(加 Ang II 10^{-7} mol/L)、益气组(加 Ang II 10^{-7} mol/L 和益气药 10.5 ml/L)、活血组(加 Ang II 10^{-7} mol/L 和活血药 10.5 ml/L)、益气加活血组(加 Ang II 10^{-7} mol/L 和益气活血药 10.5 ml/L)。观察各组在实验(造模的同时给药)不同

时间(12、24、48、72、96 h)指标的变化情况。每组不同时间点各 12 孔。

2.2 心肌细胞搏动幅度、频率及节律测定 心肌细胞动态摄影,每个细胞成像 50 张,成像时间平均在 0.833 s/张。对各组各时点细胞用图像分析系统分析软件测量心肌细胞搏动舒张期的成像面积和收缩期的成像面积(像素点),用两面积之差与细胞搏动舒张期成像面积的百分比来判断心肌细胞的搏动幅度(%)。细胞搏动频率与节律:成像后每分钟细胞搏动的次数及异常节律次数。细胞数用血细胞计数法。

2.3 心肌细胞凋亡测定 分别在造模后 24、48、72、96h 各时间点,用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,胎牛血清终止消化,收集细胞悬液,用 4℃ PBS 于 1000r/min,离心 10 min,洗细胞 2 次。用终浓度为 70% 预冷乙醇固定细胞过夜(12 h 以上),取出固定好的细胞,用 4℃ PBS 洗 2 次,最后于离心管中取 0.5ml 细胞悬液,轻轻混匀,加入 RNaseA20 μg/ml(终浓度),于 37℃ 恒温水浴箱中孵育 30 min,然后用 50 μg/ml(终浓度)的碘化丙啶染色,4℃ 避光放置 60 min,混匀,过 300 目尼龙网,上流式细胞仪检测。应用 CELL Quest 软件获取细胞,以 Modfit 软件进行凋亡峰拟合 DNA 细胞周期分析,并绘出 DNA 分布图, $G_0 - G_1$ 期前的 G_1 亚峰(AP)即为细胞凋亡峰。

2.4 心肌细胞面积测定 HE 染色,用显微图像分析系统软件测量分析心肌细胞面积(单位为像素点)。方法:对各组封片成像,用特定分析软件进行细胞轮廓的界定,然后计算该细胞的像素点。

2.5 心肌细胞蛋白质含量的测定 参照 Lowry 法^[4]。蛋白含量(μ g) = 测定 OD 值/标准 OD 值 × 标准含量。

3 统计学方法 采用 *t* 检验。

结 果

1 各组不同时间心肌细胞搏动频率、节律变化情况 见表 1。模型组心肌细胞在 24~48h 搏动频率加快,而在 72 h 后搏动频率逐渐变慢,与空白组比较差异均有显著性($P < 0.05$),同时模型组出现搏动节律不规则,主要表现在停跳(1 次或 2 次不等)。各中药组与模型组搏动频率比较,差异均有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组不同时间心肌细胞搏动
频率比较 (次/min, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌细胞搏动频率				
		12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
空白	60	58.5±4.9	59.2±5.6	56.6±3.9	52.3±4.4	50.7±3.6
模型	60	57.3±4.2	71.4±6.9*	69.5±5.3*	41.6±4.7*	38.4±3.3*
益气	60	59.6±5.6	64.3±5.3 [△]	61.7±4.8 [△]	58.1±4.6 [△]	53.2±5.0 [△]
活血	60	60.2±6.6	58.9±3.1 [△]	61.1±5.2 [△]	56.8±5.0 [△]	51.6±4.5 [△]
益气加活血	60	60.9±5.7	62.6±5.8 [△]	59.7±5.3 [△]	56.9±4.8 [△]	53.6±4.1 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$

2 各组不同时间心肌细胞搏动幅度测定结果见表 2。模型组心肌细胞在 24 h 搏动幅度加大,而在 72 h 时后搏动幅度降低,与空白组比较差异均有显著性($P<0.05$)。24 h 各中药组与模型组心肌细胞搏动幅度比较,差异均有显著性($P<0.05$);益气加活血组各时间段心肌细胞搏动幅度加大($P<0.05$)。

表 2 各组不同时间心肌细胞搏动幅度比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌细胞搏动幅度		
		24h	48h	72h
空白	36	3.96±0.98	4.08±1.09	3.60±1.02
模型	36	8.35±1.27**	2.14±0.77*	1.59±0.45*
益气	36	5.01±1.14 [△]	3.05±1.06	2.03±0.96
活血	36	5.34±1.21 [△]	2.97±1.01	1.92±0.87
益气加活血	36	4.01±1.16 [△]	4.39±1.13 [△]	3.13±0.88 [△]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.05$;与模型组比较,[△] $P<0.05$

3 各组不同时间心肌细胞数量的变化情况 模型组心肌细胞数量从 12~48 h 有增多趋势,但与空白组比较差异无显著性。各中药组心肌细胞数量与模型组比较差异无显著性(具体数据省略)。

4 各组不同时间心肌细胞凋亡测定结果 见表 3。与空白组比较,模型组 24~96 h 心肌细胞凋亡增加($P<0.05$, $P<0.01$)。各中药组 48~96h 心肌细胞凋亡率均明显低于模型组($P<0.05$),尤以益气加活血组作用明显($P<0.01$)。

表 3 各组不同时间心肌细胞凋亡测定
结果比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌细胞凋亡率			
		24h	48h	72h	96h
空白	48	3.31±0.36	4.48±0.62	5.26±0.74	4.76±0.69
模型	48	12.46±1.12*	29.38±3.47**	42.36±6.73**	34.89±4.38**
益气	48	10.60±0.89	15.40±1.29 [△]	21.20±3.36 [△]	17.30±2.77 [△]
活血	48	12.20±1.16	14.90±2.01 [△]	18.00±3.12 [△]	12.80±1.35 [△]
益气加活血	48	6.04±0.96	5.16±0.83 ^{△△}	6.27±1.07 ^{△△}	5.39±0.88 ^{△△}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

5 各组不同时间心肌细胞蛋白质含量测定结果见表 4。与空白组比较,模型组 24~96 h 心肌细胞蛋白质含量增加($P<0.05$, $P<0.01$);以 48 h 后更明显;与模型组比较,益气组 48h 及活血组不同时间心

表 4 各组不同时间心肌细胞蛋白质含量
测定结果比较 ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白质含量			
		24 h	48 h	72 h	96 h
空白	48	70.3±8.1	73.2±10.2	69.6±7.9	71.2±8.7
模型	48	83.6±11.3*	128.7±16.4**	109.5±13.2**	112.3±14.6**
益气	48	82.7±11.2	116.5±15.8 [△]	114.5±13.6	108.7±13.2
活血	48	84.3±12.2	102.4±11.5 [△]	88.7±10.2 [△]	84.6±12.0 [△]
益气加活血	48	79.4±10.1	92.8±12.7 ^{△△}	76.9±9.4 ^{△△}	80.3±11.5 ^{△△}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

肌细胞蛋白质含量均明显降低($P<0.05$),尤以益气加活血组下降更明显($P<0.01$)。

6 各组不同时间心肌细胞面积测定结果 见表 5。与空白组比较,模型组各时间段心肌细胞面积增大($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,益气组、活血组、益气加活血组心肌细胞面积均减少($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 5 各组不同时间心肌细胞面积测
定结果 (像素点, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	心肌细胞面积		
		72 h	24 h	48 h
空白	36	4477.9±956.2	6432.1±1010.3	7011.5±1126.2
模型	36	4601.1±1100.7*	8287.5±1465.3**	11081.1±2318.2**
益气	36	4810.2±1326.2 [△]	7489.4±1122.5 [△]	7889.6±1212.7 ^{△△}
活血	36	4713.3±1432.7	7996.4±1262.2 [△]	9348.4±1472.7 [△]
益气加活血	36	4534.1±1007.4	6319.5±973.4 [△]	7411.6±1197.2 ^{△△}

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

讨 论

有研究证实,心肌肥大是心肌慢性压力超负荷时的一种有效的代偿反映,在心肌肥大发展及向心力衰竭转变的过程中,有心肌细胞丢失^[5],这种细胞丢失机制一直是研究的热点。美国 Bing 认为细胞凋亡可能是慢性压力超负荷情况下肥大向心力衰竭转变的可能机制之一^[6]。Ang II 为一种多功能的生物活性物质,经过不同的受体介导,作用于不同的靶器官引起组织的收缩、代谢、分泌和增殖等不同的效应。心脏局部的 Ang II 在心肌肥厚及心力衰竭的发生、发展中起着重要的调控作用^[7]。本研究表明模型组 24~48 h 心肌细胞搏动频率加快,24h 搏动幅度最大;24 h 心肌细胞面积增大,48 h 明显增大;蛋白质含量 24 h 增加,48 h 达到最高含量,说明 Ang II 对培养的心肌细胞的作用是在 24~48 h 以促肥大为主。同时,模型组从 24 h 开始有凋亡,48~72 h 凋亡率逐渐增高,72 h 达到最高。说明心肌细胞在 48 h 后凋亡增加,72 h 达到凋亡高峰期。此外,心肌细胞的数量在 12~48 h 有增多趋势,但差异无显著性。正因如此,凭心肌细胞凋亡率较高

时点的结果分析,其除肥大外,仍有可能存在增生,从而保持细胞凋亡与增殖自我调节的相对平衡状态,表现为以肥大增生为主的时间窗是 24~48 h,以凋亡为主的时间窗是 48~96 h。细胞肥大增生为主时,可能出现心肌肥大,细胞凋亡可能是由心肌肥大向心力衰竭转变的机制之一。益气、活血和益气加活血药均有良好的防治作用,尤以益气加活血药作用明显。

参 考 文 献

- 1 郭书文,王国华,牛福玲,等.益气、活血药对血管紧张素Ⅱ建立的心肌细胞模型影响的研究.中国中医药信息杂志 2005;12(1):33—35.
Guo SW, Wang GH, Niu FL, et al. The effects of Qi-tonics, drugs used to activate blood flow on cardiac muscle cell model made by Ang-Ⅱ. Chin J Information TCM 2005;12(1):33—35.
- 2 司徒镇强,吴军正主编.细胞培养.西安:世界图书出版西安公司,2001:60—73,173.
SiTu ZQ, Wu JZ, editor. Cell culture. Xi'an: World Press, Xi'an Publishing Company, 2001:60—73, 173.
- 3 李祥平,徐顶立,贾满盈.培哚普利和洛沙坦对心肌细胞黏附分子-1 表达的影响.中国循环杂志 1999;14(5):311—313.

Li XP, Xu DL, Jia MY. Perindopril and losartan effect on tumor necrosis factor alpha induced intercellular Adhesion molecule-1 expression in cultured cardiac myocytes. Chin J Circ 1999; 14(5):311—313.

- 4 徐叔云,卞如濂,陈修主编.药理实验方法学.第2版.北京:人民卫生出版社,1991:490.
Xu SY, Bian RL, Chen X, editor. Methodology of pharmacological experiment. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991:490.
- 5 Anversa P, Hiler B, Ricci R, et al. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. J Am Coll Cardiol 1986; 8(6):1441—1448.
- 6 Bing OH. Hypothesis: Apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. J Mol Cell Cardiol 1994;26(8):943—948.
- 7 李永勤,高广道,楚雍烈,等.容量负荷性肥厚中心肌血管紧张素Ⅱ-1 型 mRNA 受体表达的动态变化.生理学报 1998; 50(3):303—308.
Li YQ, Gao GD, Chu YL, et al. Dynamic changes of angiotensin Ⅱ type-1 receptor mRNA expression in volume-overloaded ventricular hypertrophy. Acta Physiol Sin 1998; 50(3):303—308.

(收稿:2005-04-01 修回:2005-06-20)

首届国际中西医结合肝病学术会议在沪召开

首届国际中西医结合肝病学术会议暨第十四次全国中西医结合肝病学术会议于 2005 年 9 月 21—24 日在上海召开。上海中医药大学副校长刘平教授作为中国中西医结合学会肝病专业委员会主任委员与本次大会主席主持本次会议,上海市卫生局、中国中西医结合学会、上海浦东新区科协等领导参加了开幕式,上海中医药大学校长陈凯先院士开幕辞。

会议收到论文 198 篇,与会代表 300 余人来自我国各省市及香港特别行政区、美国、法国、日本、澳大利亚等,会议邀请国际肝病权威美国西奈山医学院 Friedman 教授与哈佛大学医学院 Schuppan 教授等到会发表主题演讲。大会共进行专题报告 11 篇,大会发言 12 篇,壁报交流 60 余篇,内容主要涉及慢性肝炎、肝纤维化与肝硬化、脂肪肝、肝癌等,基本反映了国内外中西医结合肝病研究新进展,并讨论形成了“肝纤维化中西医结合诊疗指南的草案”。大会进行了新一届肝病专业委员会换届选举,刘平教授继续担任中国中西医结合学会肝病专业委员会主任委员,曙光医院胡义扬教授担任副主任委员兼秘书长。

本次大会的成功举办,标志着我国中西医结合治疗肝病的水平近年得到较大提高,并开始迈向国际化。

(刘成海)

第四次全国中西医结合男科学学术会议在贵阳召开

第四次全国中西医结合男科学会议于 2005 年 8 月 19—23 日在贵阳召开,来自全国各地代表 180 余人出席了本次会议,大会收到论文 200 余篇。大会作了中西医结合男科学未来发展的方向、如何做好男科临床工作、泌尿男科研课题申请存在的问题与对策等 14 个专题报告,并进行了论文交流。大会学术交流论文从基础理论研究到临床经验总结,涉及到中西医结合男科的各个方面,会议论文内容丰富,构思新颖独特,反映了当前中西医结合男科学的水平。会议期间举行了“瑞和之夜”晚会,晚会之后举办男科沙龙,代表们分别以“勃起功能障碍”、“前列腺疾病”和“男性不育症”为主题分组进行讨论,代表们发言积极,会场气氛热烈,将此次大会推向了一个高潮。

为了更好的促进医生之间学术交流及医患之间的沟通,会上介绍了中国中西医结合学会男科专业委员会网站“男康网”(www.adpyncn.com)改版升级后的概况,为男科同道、医患之间提供了网络空间。大会在原有的 36 位委员的基础上,新增了李学斌、郭军、姜辉、商学军等 12 位同志为中国中西医结合学会第一届男科专业委员会委员。

此次会议为男科同道提供了良好的学术交流平台,展示了中西医结合的临床与科研水平,推动了中西医结合男科学学术的发展,尤其是有利于西部中西医结合男科学事业的发展。

(中国中西医结合学会男科专业委员会)