

白藜芦醇对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌细胞凋亡的影响

林 岩^{1,2,3} 周 丽¹ 王 珺² 肖 薇² 李 波² 金 莉² 王国忠² 刘吉成¹

摘要 **目的** 观察白藜芦醇(resveratrol, Res)对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的大鼠心肌细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 利用 ISO 建立乳鼠心肌细胞凋亡模型,分为正常对照组(无血清 DMEM 培养液)、模型组(无血清 DMEM 培养液加入 ISO 1 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h)、白藜芦醇干预组(分别向培养基中加入 ISO 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 Res 50 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h)和白藜芦醇对照组(向无血清 DMEM 培养液中加入 Res 50 $\mu\text{mol/L}$)。Hochest33258 染色检测细胞凋亡率;电镜观察心肌细胞超微结构;检测培养液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)漏出量;Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。**结果** 模型组心肌细胞数量减少,细胞核形态不规则,可见凋亡小体,细胞凋亡率增加。白藜芦醇干预组和白藜芦醇对照组细胞膜完整,核膜清晰,核内染色质浓缩,细胞损伤程度减轻。与正常对照组比较,模型组心肌细胞凋亡率和 LDH 漏出量均增加,Bcl-2 蛋白水平下调,Bax 蛋白水平上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇干预组和白藜芦醇对照组心肌细胞凋亡率和 LDH 漏出量均降低,Bcl-2 蛋白表达上调,Bax 蛋白表达下调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Res 明显减轻 ISO 诱导的心肌细胞凋亡,其机制可能与逆转凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达有关。

关键词 心肌细胞;白藜芦醇;细胞凋亡;Bcl-2;Bax

Effect of Resveratrol on Isoproterenol Induced Cardiomyocyte Apoptosis Rats LIN Yan^{1,2,3}, ZHOU Li¹, WANG Jun², XIAO Wei², LI Bo², JIN Li², WANG Guo-zhong², and LIU Ji-cheng¹ 1 Institute of Medicine, Qiqihar Medical University, Heilongjiang (161006) 2. Department of Pathophysiology, Qiqihar Medical University, Heilongjiang (161006); 3 ITCWM Postdoctor Research Center, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin (150040)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect and mechanism of resveratrol (Res) on isoproterenol (ISO) induced cardiomyocyte apoptosis rats. **Methods** Primary cultured neonatal cardiomyocyte apoptosis rat model was established using ISO. Apoptosis cells were then randomly divided into 4 groups, i. e., the normal control group (non-serum DMEM culture fluid), the model group (non-serum DMEM culture fluid + ISO 1 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h), the Res + ISO group (ISO 1 $\mu\text{mol/L}$ + Res 50 $\mu\text{mol/L}$ for 48 h), the Res control group. (non-serum DMEM culture fluid + Res 50 $\mu\text{mol/L}$). The apoptosis rate was measured by Hochest33258 staining. Ultrastructural changes of cardiomyocyte were observed by electron microscope. Leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture fluid was measured. Protein expressions of Bcl-2 and Bax were detected using Western blot. **Results** The count of cardiomyocytes were reduced and the nucleus shape was irregular. The apoptosis bodies were visible and the apoptosis rate was increased in the model group. The cell membrane was complete with clear nuclear membrane in the Res + ISO group and the Res control group. Nuclear chromatin was concentrated and cell injured degree was attenuated in the Res + ISO group and the Res control group. Compared with the normal control group, the apoptosis rate and LDH leakage increased, the protein expression of Bcl-2 was down-regulated, and the expression

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81100170);齐齐哈尔医学院科研基金(No. QY2016Z-14, QY2016B-07)

作者单位:1. 齐齐哈尔医学院医药研究所(黑龙江 161006);2. 齐齐哈尔医学院病理生理教研室(黑龙江 161006);3. 黑龙江中医药大学中西医结合博士后流动站(哈尔滨 150040)

通讯作者:刘吉成, Tel:0452-6731303, E-mail: qyybliu@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 07. 0849

of Bax was up-regulated in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the apoptosis rate and LDH leakage decreased, the protein expression of Bcl-2 was up-regulated, and the expression of Bax was down-regulated in the Res + ISO group and the Res control group ($P < 0.05$). Conclusion Res could obviously attenuate ISO induced cardiomyocyte apoptosis, and its mechanism might be associated with reversing protein expressions of Bcl-2 and Bax.

KEYWORDS cardiomyocyte; resveratrol; apoptosis; Bcl-2; Bax

心肌肥大是高血压、心力衰竭等多种心血管疾病的共同病理过程,肾上腺素能 β -受体系统活性增强和血浆中儿茶酚胺物质的持续增高参与心衰的发生发展^[1]。白藜芦醇(resveratrol, Res)作为葡萄属植物抗毒素是一类广泛存在于植物中的多酚类化合物^[2]。近年,Res 对心血管的保护作用已受到广泛关注,表现为抑制血小板聚集,调节血脂代谢,引起血管舒张,减轻心肌梗死面积等作用^[3,4]。

本课题前期研究表明,Res 对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的大鼠心肌细胞肥大具有抑制作用^[5]。研究显示,细胞凋亡参与了心肌肥大向心力衰竭的转变,但 Res 对心肌细胞凋亡影响如何还不清楚^[6,7]。因此,本研究利用乳鼠心肌细胞原代培养,旨在探讨 Res 对 ISO 诱导的心肌细胞凋亡和凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 的表达影响,从而为研究心力衰竭的临床治疗提供实验依据。

材料与方法

1 动物 20 只新生 1~3 天 SD 乳鼠,雌雄不拘,由齐齐哈尔医学院动物研究所提供,动物合格证编号:SYXK(黑)2008004。

2 药品与仪器 Res(R5010)、异丙肾上腺素(I6379)和胰蛋白酶(批号:0973)均购自美国 Sigma 公司;DMEM 培养基(批号:12100-046)、新生牛血清(批号:16010-159)购自美国 GIBCO 公司;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号:20150228)测试盒购于南京建成生物工程研究所;Hoechst33258 细胞凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司(批号:20150324),其他试剂均为国产分析纯。Bcl-2、Bax 一抗和二抗(辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔 IgG 和兔抗鼠 IgG)购自武汉博士德生物科技有限公司, β -actin 一抗购自美国 Santa Cruz 公司。二氧化碳孵箱(美国 Thermoformalnc 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);电泳仪、电泳槽(上海天能科技有限公司)。

3 方法

3.1 乳鼠心肌细胞原代培养 参照文献[8,9],无菌条件下,开胸取心室肌,采用 0.25% 胰酶分次消

化至单细胞悬液,离心,弃上清,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液,CO₂ 孵箱中差速贴壁 90 min,吸取未贴壁的心肌细胞接种到培养板上,置入 37 °C,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中继续培养,细胞贴壁 24 h 后出现自发性同步搏动,于接种 48 h 后换正常培养基继续培养。

3.2 细胞分组及处理 心肌细胞随机分为 4 组。正常对照组:无血清 DMEM 培养液;模型组:无血清 DMEM 培养液加入 ISO 1 μ mol/L 作用 48 h;白藜芦醇干预组:分别向培养基中加入 ISO 1 μ mol/L 和 Res 50 μ mol/L 作用 48 h;白藜芦醇对照组:向无血清 DMEM 培养液中加入 Res 50 μ mol/L,观察 Res 是否损伤心肌细胞。

3.3 透射电镜检测细心肌细胞超微结构 细胞培养 48 h 后,PBS 洗细胞 3 次,离心后收集细胞,经固定、梯度脱水、包埋及聚合后,做超薄切片,用透射电镜观察心肌细胞超微结构,拍照并进行分析。

3.4 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡率 细胞培养 48 h,用 PBS 洗 1~2 遍,弃 PBS,每孔加入 0.5 mL 4% 多聚甲醛 4 °C 固定过夜,弃多聚甲醛,PBS 洗 3 遍,每次 10 min,弃 PBS 后,每孔加入 10 mg/L Hoechst33258 染液 0.5 mL,染色 30 min,在倒置荧光显微镜下拍照。连续观察 10 个高倍视野,采用双盲法计数每 100 个细胞中的阳性细胞数,取其平均值作为细胞凋亡率。

3.5 Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 取各组心肌细胞,加裂解液,离心后吸取上清液,Bradford 法测定蛋白质浓度。各组取蛋白 30 μ g 上样,SDS-PAGE 电泳,蛋白转至 PVDF 膜,封闭液室温封闭 1 h 后分别加入一抗为 Bcl-2 和 Bax 多克隆抗体和 β -actin 单克隆抗体,浓度均为 1:500,4 °C 孵育过夜,相应二抗孵育 1.5 h,浓度 1:5 000。化学发光 ECL 显色。电泳成像系统定量扫描分析,结果以 β -actin 校正。

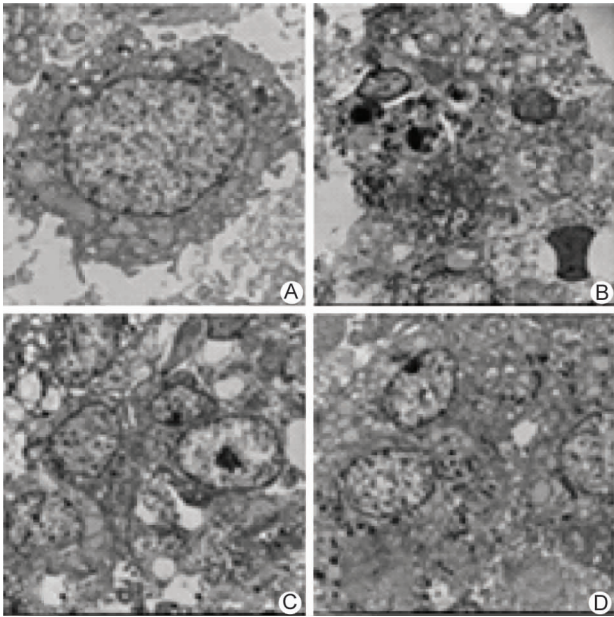
3.6 心肌细胞培养上清液 LDH 水平检测 收集经不同处理的心肌细胞培养上清液,按试剂盒说明进行检测。

3.7 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组心肌细胞的观察 倒置显微镜观察显示:与正常对照组比较,模型组细胞数量减少,细胞坏死和皱缩增多,搏动节律不齐,频率明显减慢;与模型组比较,白藜芦醇干预组心肌细胞形态较规则,细胞搏动频率规则,改善显著,呈现向心性同步化搏动。

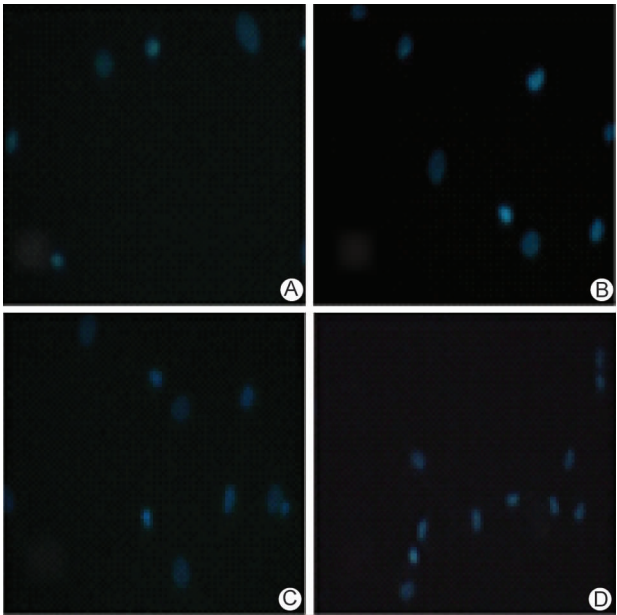
2 各组心肌细胞超微结构变化比较(图 1) 正常对照组心肌细胞核完好,线粒体数量正常、包膜完整,嵴排列连续、整齐;模型组细胞核形态不规则,核内染色质散乱,可见凋亡小体形成,线粒体数量增多,线粒体内无嵴结构;白藜芦醇干预组和白藜芦醇对照组与模型组比较,细胞膜完整,核膜清晰,核内染色质浓缩,细胞损伤程度减轻。



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为白藜芦醇干预组;D 为白藜芦醇对照组

图 1 各组心肌细胞超微结构比较 (电镜, $\times 8\,000$)

3 各组心肌细胞凋亡情况比较(图 2,表 1) 模型组细胞核致密浓染、核固缩,颜色发白甚至呈亮白色;白藜芦醇干预组和白藜芦醇对照组致密浓染的凋亡细胞减少。与正常对照组比较,模型组心肌细胞凋亡率增加($P < 0.05$)。与模型组比较,白藜芦醇干预组和白藜芦醇对照组心肌细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为白藜芦醇干预组;D 为白藜芦醇对照组

图 2 各组心肌细胞凋亡率比较 (Hoechst33258 染色, $\times 400$)

4 各组心肌细胞培养液 LDH 水平比较(表 1) 与正常对照组比较,模型组 LDH 释放量增加($P < 0.05$);与模型组比较,白藜芦醇干预组和白藜芦醇对照组 LDH 释放量降低($P < 0.05$)。

表 1 各组心肌细胞凋亡率和 LDH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞凋亡率(%)	LDH(U/L)
正常对照	5	2.64 ± 0.95	458.36 ± 26.32
模型	5	$5.52 \pm 0.66^*$	$725.36 \pm 34.22^*$
白藜芦醇干预	5	$2.97 \pm 0.29^\Delta$	$507.94 \pm 29.34^\Delta$
白藜芦醇对照	5	$2.48 \pm 0.46^\Delta$	$484.51 \pm 25.63^\Delta$

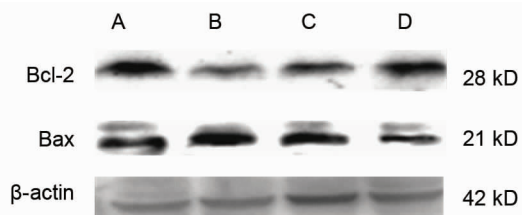
注:与正常对照组比较, $^*P < 0.05$;与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$

5 各组心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平比较(图 3,表 2) 与正常对照组比较,模型组心肌细胞 Bcl-2 蛋白水平下调($P < 0.01$),Bax 蛋白水平上调($P < 0.05$)。与模型组比较,白藜芦醇干预组和白藜芦醇对照组逆转了 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平($P < 0.05$)。

表 2 各组心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Bcl-2	Bax
正常对照	3	1.55 ± 0.01	1.33 ± 0.04
模型	3	$1.26 \pm 0.02^{**}$	$1.51 \pm 0.01^*$
白藜芦醇干预	3	$1.41 \pm 0.06^\Delta$	$1.46 \pm 0.02^\Delta$
白藜芦醇对照	3	$1.45 \pm 0.06^\Delta$	$1.33 \pm 0.02^\Delta$

注:与正常对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$;与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为白藜芦醇干预组;
D 为白藜芦醇对照组

图 3 各组心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白电泳图

讨 论

心力衰竭是临床心脏患者的主要死亡原因。在心衰发生和发展过程中,伴有肾上腺素能 β -受体系统活性增强和血浆中儿茶酚胺物质的持续增高。ISO 作为非选择性 β -肾上腺素受体 (β -AR) 激动剂,具有拟儿茶酚胺的作用,长期的儿茶酚胺类刺激和 β -受体激动可导致心肌细胞的凋亡和心肌的纤维化重构,参与心衰的发生^[10]。本实验结果显示,ISO 明显增加心肌细胞凋亡率,诱导心肌细胞凋亡,细胞 LDH 漏出量增加,同时抑制抗凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达,增加促凋亡基因 Bax 蛋白表达。一般认为心肌属于终末分化的不可再生性组织,其凋亡必然造成参与收缩活动的心肌细胞减少,进而心肌细胞肥大、纤维化增生,促进心力衰竭的发生和发展。近来还有研究提示,凋亡的关键酶 Caspase 活化可直接引起心肌收缩蛋白的降解,这些都可使心脏的泵血活动逐渐减弱,参与心衰的发生^[11,12]。因此,抑制心肌细胞凋亡是防治心力衰竭的有效途径之一。

Res 是一类主要存在于虎杖、藜芦、葡萄、花生等植物中的多酚类化合物,具有抗肿瘤、抗炎、清除自由基、抗氧化等多方面药理活性^[13,14]。Res 有顺式和反式两种同分异构体存在形式,反式异构体可在紫外光照射下转化为顺式异构体。天然植物中主要以反式白藜芦醇存在,其生理活性及稳定性强于顺式异构体。细胞凋亡受多种相关基因及蛋白调控,其中 Bcl-2 家族是目前最受关注的凋亡相关基因家族^[15]。Bcl-2 通过调节线粒体膜上通透性转换孔来调节线粒体膜的通透性,通过阻止细胞色素 C 释放入胞质而抑制细胞凋亡,而 Bax 可直接结合到线粒体膜上,改变膜的通透性,引起细胞色素 C 释放入胞浆,激活 Caspases 家族,最终引起凋亡^[16]。Bcl-2 作为一种重要的内源性抗凋亡基因,通过调节 Bcl-2/Bax 的平衡,保持线粒体稳定,抑制细胞凋亡。本研究观察了 Res 预处理对 ISO 诱导的心肌细胞凋亡的影响。结果显示,Res 显著抑制心肌细胞凋亡,

并逆转 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达,降低心肌细胞 LDH 漏出量,减轻心肌细胞损伤。最新研究证实,Res 通过影响 MAPK 信号通路,抑制心肌细胞凋亡,对低温环境诱导的心肌肥大发挥保护作用^[17]。

临床上,检测 LDH 等心肌酶是评价急性心肌梗死进程与预后的重要手段之一。LDH 在心肌组织含量尤为丰富,当心肌细胞受到损伤时,心肌酶 LDH 从胞浆中漏出,培养细胞上清中 LDH 水平升高,测定上清中 LDH 活性已成为反映心肌损伤程度的敏感指标^[12]。Res 可以增强超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶的活性,提高机体清除自由基的能力,降低血管内皮细胞氧化应激损伤。结合研究结果提示 Res 通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,使 Bcl-2/Bax 比值增加,阻止各种促凋亡蛋白从线粒体中释放,减轻了细胞对凋亡的易感性。

综上所述,Res 能明显抑制 ISO 诱导的乳鼠心肌细胞凋亡,上调 Bcl-2/Bax 比值可能是其发挥作用的重要机制之一。如何增强细胞抗凋亡能力,减少心肌细胞的缺失,针对心肌细胞凋亡发生的关键环节阻断凋亡、延缓心力衰竭的形成和发展可能是今后药物治疗的一个新方向。

参 考 文 献

- [1] Marian AJ. Beta-adrenergic receptors signaling and heart failure in mice, rabbits and humans[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(1): 11-13.
- [2] 白杨,潘隽丽,苏薇薇. 白藜芦醇与白藜芦醇甙的研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(1): 55-59.
- [3] 沈利兰,王晓敏,何柏林. 白藜芦醇对糖尿病作用的实验研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 279-281.
- [4] Brown L, Kroon PA, Das DK, et al. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2009, 33(9): 1513-1523.
- [5] 林岩,肖薇,金莉,等. 内质网应激介导白藜芦醇对心肌细胞肥大的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1721-1725.
- [6] 沈启明,马丽红,王少霞,等. 心复力颗粒对阿霉素致扩张型心肌病心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(6): 783-787.
- [7] 冯俊,李树生,梁黔生,等. 丹参酮 II 对心力衰竭大鼠的心肌凋亡及 miR-133 水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7): 930-933.
- [8] 张金艳,李澎,李貽奎,等. 丹皮酚、芍药苷及二者配伍对体外培养心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响[J]. 中国中

- 医结合杂志, 2012, 32(4): 510-514.
- [9] Lin Y, Zhang X, Wang L, et al. Polyamine depletion attenuates isoproterenol-induced hypertrophy and endoplasmic reticulum stress in cardiomyocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(5): 1455-1465.
- [10] Feldman DS, Elton TS, Sun B, et al. Mechanisms of disease: detrimental adrenergic signaling in acute decompensated heart failure[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008, 5(4): 208-218.
- [11] Wang HJ, Wang W, Cornish KG, et al. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure[J]. Hypertension, 2014, 64(4): 745-755.
- [12] 马兰, 关振中. 黄芪注射液对大鼠左室重构及凋亡基因 Caspase-3 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(7): 646-649.
- [13] 王世君, 王兴祥, 范芳华, 等. 白藜芦醇抑制血管紧张素 II 诱导的大鼠心脏成纤维细胞增殖的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(4): 334-338.
- [14] Ozkan OV, Yuzbasioglu MF, Ciralik H, et al. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Tohoku J Exp Med, 2009, 218(3): 251-258.
- [15] Asmarinah A, Paradowska-Dogan A, Kodariah R, et al. Expression of the Bcl-2 family genes and complexes involved in the mitochondrial transport in prostate cancer cells[J]. Int J Oncol, 2014, 45(4): 1489-1496.
- [16] Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, et al. The rheostat in the membrane: Bcl-2 family proteins and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2014, 21(2): 206-215.
- [17] Yin K, Zhao L, Feng D, et al. Resveratrol attenuated low ambient temperature-induced myocardial hypertrophy via inhibiting cardiomyocyte apoptosis[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(6): 2451-2462.
- (收稿: 2015-05-26 修回: 2016-02-29)

欢迎订阅 2016 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖; 2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”, 列入中国期刊方阵; 2003—2014 年连续 12 年被评为“百种中国杰出学术期刊”; 3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助; 4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”; 2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目。并被多种国内外知名检索系统收录, 如: 中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引 (Medline)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引 (WPRIM) 等; 为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 被编入《中文核心期刊要目总览》, 每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本, 月刊, 128 页; 铜版纸印刷, 彩色插图。国内定价: 25.00 元/期。全年定价: 300.00 元。国际标准刊号: ISSN 1003-5370, 国内统一刊号: CN 11-2787/R, 国内邮发代号: 2-52, 国外代号: M640。国内外公开发行人, 在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62874291; E-mail: cjim@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn>。