

蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注时 心肌细胞凋亡的影响

刘明洁¹, 孙旗^{2*}, 王强², 朱晓红², 倪珊珊²

(1. 内蒙古民族大学, 内蒙古 通辽 028000; 2. 中国人民解放军第 202 医院, 沈阳 110000)

[摘要] 目的:探讨蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注损伤的保护作用。方法:健康日本大耳白兔 24 只,分 4 组,A:假手术组;B:缺血/再灌注(I/R)组;C:复方丹参滴丸(DS)对照组;D:蓝萼香茶菜总二萜(TD)组。术前 7 d A、B 组灌胃蒸馏水 5 mL·kg⁻¹·d⁻¹,C 组灌胃 DS 37.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹,D 组灌胃 TD 4.76 mg·kg⁻¹·d⁻¹。末次给药 1 h 后,结扎左冠状动脉前降支(LAD)制作兔在体心肌 I/R 模型。光镜和电镜观察各组心肌细胞结构变化。原位末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡,免疫组化测定心肌组织凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)的表达。结果:C 组和 D 组心肌细胞凋亡指数(AI)分别为 10.93%和 9.87%,与 B 组(18.40%)相比,AI 均明显下降($P < 0.05$),但 C 组和 D 组无明显差异。免疫组化分析 Bcl-2 的吸光度(A),C 组为 41.03,D 组为 52.09,均明显高于 B 组(29.47),有显著性差异($P < 0.05$)。而与 B 组相比,C 组和 D 组 Bax 的 A 明显下降($P < 0.05$),且 C 组和 D 组 Bcl-2 和 Bax 无明显差异。与假手术组相比,B 组光镜和电镜下结构损伤程度明显高于 C 组和 D 组。结论:TD 能减轻兔心肌缺血/再灌注损伤时心肌细胞凋亡,提示该药对心肌有保护作用。

[关键词] 心肌缺血/再灌注损伤; 蓝萼香茶菜; 总二萜; 细胞凋亡; 心脏保护

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0229-05

[doi] 10.11653/syjf2013190229

Influence of Total Triterpenoid from *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* Preconditioning on Apoptosis of Myocardial Cell in Rabbits Myocardial Ischemia/Reperfusion

LIU Ming-jie¹, SUN Qi^{2*}, WANG Qiang², ZHU Xiao-hong², NI Shan-shan²

(1. Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, China;

2. 202 Military Hospital of China, Shenyang 110000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of total diterpenoids from *Rabdosia japonica* var. *glaucocalyx* (TD) preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury (MI/RI). **Method:** Twenty-four rabbits were randomly divided into four groups, sham group (group A), I/R group (group B), Danshen dripping pills (DS) group (group C) and TD group (group D). Group A and B were administered distilled water (5 mL·kg⁻¹·d⁻¹) intragastrically daily for 7 days prior to the operation. Rabbits in group C, D underwent the same surgical procedure as those in group B, but received respectively oral DS (37.8 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and TD (4.76 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 7 days before the operation. Ultrastructure was observed by light microscopy and electron microscopy. TUNEL staining detected myocardial cell apoptosis index. Immunohistochemistry determined expression of apoptosis-related protein B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated x protein (Bax). **Result:** Apoptosis index of

[收稿日期] 20130206(001)

[基金项目] 内蒙古自然科学基金面上项目(2013MS1219)

[第一作者] 刘明洁, 硕士, 副教授, 从事心血管药物的基础与临床研究工作, Tel:0475-8833898, E-mail:lmjlwz@163.com

[通讯作者] * 孙旗, 博士, 教授, 从事心血管药物的基础与临床研究工作, Tel:024-288538631, E-mail:lwzlmj@163.com

myocardial cells in group C and D is respectively 10.93% and 9.87%, compared with group B (18.40%) the difference was obvious ($P < 0.05$). Immunohistopathological studies showed that A of Bcl-2 in group C, D was 41.03, 52.09, compared with group B (29.47) ($P < 0.05$). **Conclusion:** TD may reduce MI/RI in rabbit model and have protective effects on myocardium.

[**Key words**] myocardial ischemia/reperfusion injury; *Rabdosia japonica* var. *glaucoalyx* total diterpenoids; apoptosis; cardio-protection

心肌缺血时,冠状动脉灌注中断,因心肌细胞死亡而导致心梗^[1]。急性心梗再灌注可逆转心肌缺血和减轻心肌坏死的程度,心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MI/RI)是一个复杂的病理生理过程,与多种因素和途径相关^[2]。心肌细胞凋亡首先在兔心肌缺血再灌注损伤中被证实,并发挥了重要作用^[3]。研究表明,在心肌损伤和随后的心肌梗死中,细胞凋亡发挥了重要作用^[4],并且心肌细胞凋亡可以作为急性缺血性损伤的标志^[5]。

蓝萼香茶菜 [*Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) Hara] 是唇形科香茶菜属植物,其全草或叶入药有健胃消食、清热解酒和活血等作用^[6],主要含有蓝萼甲素、蓝萼乙素、蓝萼丙素、蓝萼丁素和蓝萼戊素等二萜类化合物^[7]。现代研究发现全草对心血管有一定作用^[8],并具有与剂量相关的心肌保护作用^[9]。二萜类化合物是蓝萼香茶菜的主要化学成分,其中蓝萼甲素具有保护心肌和改善微循环等作用^[10-11],蓝萼香茶菜的乙醇提取液能减轻心肌缺血-再灌注损伤,保护心肌^[12]。为进一步了解蓝萼香茶菜总二萜(TD)抗心肌缺血作用,并研究 TD 对兔心肌缺血/再灌注损伤的保护作用,本研究通过建立兔在体急性 MI/RI 动物模型,从心肌病理学和细胞凋亡等方面探讨 TD 对实验性 MI/RI 动物的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 健康日本大耳白兔 24 只,雄性,体重 2.5 kg ~ 3.0 kg,由沈阳药科大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(辽)2009-0002。

1.2 药物与试剂 实验药物蓝萼香茶菜总二萜(TD)由解放军第 202 医院临床药理基地提供,复方丹参滴丸(DS,天津天士力制药股份有限公司,批号 110906),肝素钠(上海三杰生物技术有限公司,批号 090201),戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号 6900183),即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),细胞凋亡试剂盒(Roche 公司)。

1.3 仪器 MP100 16 道生理仪(美国 Stoelting 公司)、JEM-1200EM 透射电镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 兔心肌缺血/再灌注动物模型的建立^[13-21]与分组 健康日本大耳白兔 24 只,适应性喂养 1 周后,随机分为 4 组,A 组(假手术组, Sham group),B 组(缺血/再灌注组, I/R group),C 组(丹参滴丸对照组, DS group)和 D 组(蓝萼香茶菜总二萜, TD group)。术前 7 d A 和 B 组 ig 蒸馏水 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, C 组 ig DS ($37.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), D 组 ig TD ($4.76 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。各组于第 7 天 ig 1 h 后于兔耳缘静脉注射戊巴比妥钠 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,麻醉后行气管插管和左颈总动脉插管, A 组麻醉开胸后,冠状动脉前降支(LAD)穿线,不收紧结扎线。B 组开胸后, LAD 穿线并收紧结扎线,使其缺血 40 min 后松开结扎线再灌注 120 min, C 和 D 组处理同 B 组。

2.2 光镜检查 心肌再灌注结束后,在结扎线以下 2 mm 处取 1 cm^3 的缺血区心肌组织,放入 4% 甲醛中固定、脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、苏木素染色、伊红染色、乙醇脱水、中性树胶封片,光镜下观察。

2.3 电镜检查 心肌再灌注结束后,在结扎线以下取 1 mm^3 缺血区心肌组织,放入 2.5% 戊二醛中固定、包埋、切片、醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色、透射电子显微镜观察并拍照。

2.4 免疫组化检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 x 蛋白 (Bax) 灌注末心尖部心肌用 4% 甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片常规脱蜡,按 SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒说明书操作,室温显色且苏木素轻度复染后,脱水、透明、封片,于显微镜下观察。通过 Olympus 数码显微照相采集图像,应用 Image Pro Plus 图像分析系统进行计算机图像分析,统一参数设定保持基线一致,其阳性追踪点为表达于胞浆或胞膜的棕黄色定位。计算切片各视野阳性点面积总和及吸光度(A)均值,以半定量分析累积吸光度值表示 Bax, Bcl-2 蛋白阳性表达强度。

2.5 末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡 凋亡细胞的

细胞核浓缩,染色质断裂,因此在染色质 DNA 分子上双链或单链上产生一系列的 DNA 的 3'-末端缺口。在脱氧核糖核苷酸末端转移酶的作用下,可将荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸化酶或生物素标记的脱氧三磷酸尿苷连接到凋亡细胞染色质 DNA 的 3'-末端,经激发光激发或酶联反应可以检测细胞凋亡情况^[22]。

各组实验结束后,取距 LAD 结扎线约 2 mm 处的左室前壁中段的心肌缺血组织,4% 甲醛固定,制作石蜡切片后按照试剂盒说明书操作,在光镜下观察。光镜下观察分析结果:每一心脏随机抽取 3 张切片,每张切片随机取 5 个高倍视野,着色为黄色或棕黄色者为 TUNEL 阳性细胞,计数凋亡细胞数与正常细胞数,计算心肌细胞凋亡指数(AI)。

$$\text{心肌细胞凋亡指数} = (\text{凋亡心肌细胞数} / \text{正常心肌细胞数}) \times 100\%$$

2.6 统计学处理 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有资料输入 SPSS 19 统计软件进行处理,采用方差分析对数据进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

3 结果

3.1 各组动物心肌组织结构的变化 A 组心肌细胞形态正常,且排列规则。B 组心肌细胞水肿,排列不规则,组织间隙增大,部分区域有心肌纤维断裂。C 组心肌细胞形态基本正常,且排列较规则,细胞间隙稍增宽,心肌横纹肌隐约可见。D 组心肌细胞形态较正常,且排列规则,见图 1。

3.2 各组心肌组织电镜下结构的变化 A 组心肌细胞结构完整,排列整齐,肌丝无明显改变,Z 线清楚,线粒体结构完整。B 组心肌纤维排列模糊,紊乱,Z 线不清,线粒体严重肿胀,空泡化。C 组心肌纤维排列轻度模糊,线粒体轻度肿胀,线粒体嵴模糊。D 组心肌纤维排列较整齐,肌丝无明显改变,Z 线清楚,线粒体肿胀,结构较完整,嵴模糊,见图 2。

3.3 心肌细胞 Bax 和 Bcl-2 检测 A 组有少量 Bcl-2 蛋白表达,与 A 组比较,B 组 Bcl-2 蛋白表达减少。与 B 组比较,C 组和 D 组 Bcl-2 蛋白表达显著增加。A 组有少量 Bax 蛋白表达,与 A 组比较,B 组 Bax 蛋白表达显著增加。与 B 组比较,C 组和 D 组 Bax 蛋白表达显著减少,见表 1,图 3~4。

3.4 心肌细胞凋亡检测 表 1 显示,C 组和 D 组心肌细胞凋亡指数明显小于 B 组($P < 0.05$),但 C 组和 D 组无明显区别。见图 5。

4 讨论

缺血再灌注损伤是一个基本的、特有的炎症损

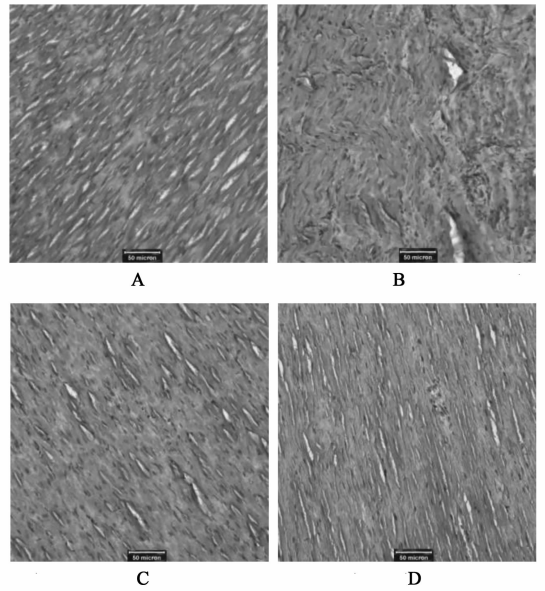


图 1 蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注损伤心肌病变的影响(HE 染色, $\times 40$)

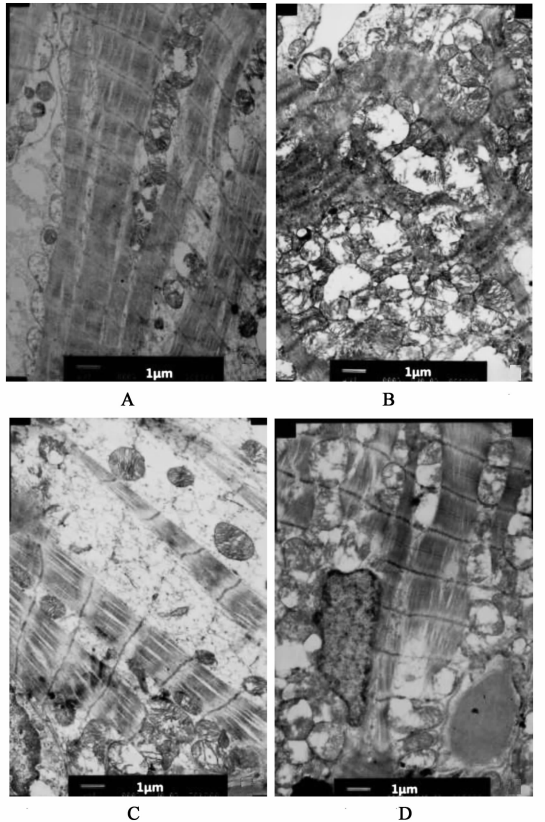


图 2 蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注损伤心肌微结构的影响(透射电镜, $\times 6000$)

伤过程^[23],在心肌缺血再灌注损伤的用药中,中药已成为日益重要的治疗药物,中药在动脉粥样硬化

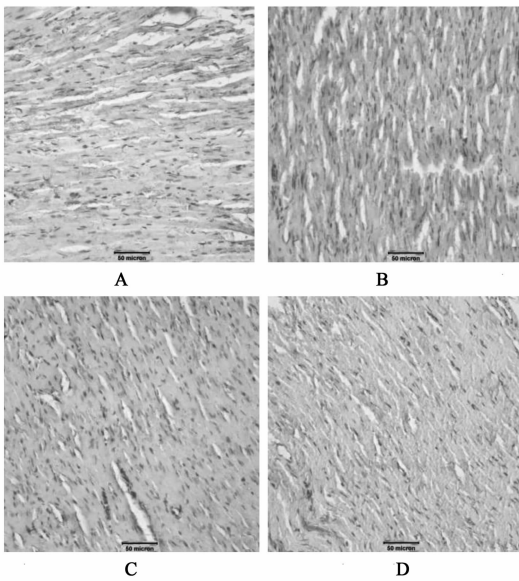


图 3 蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注损伤心肌细胞 Bax 表达的影响(免疫组化, ×40)

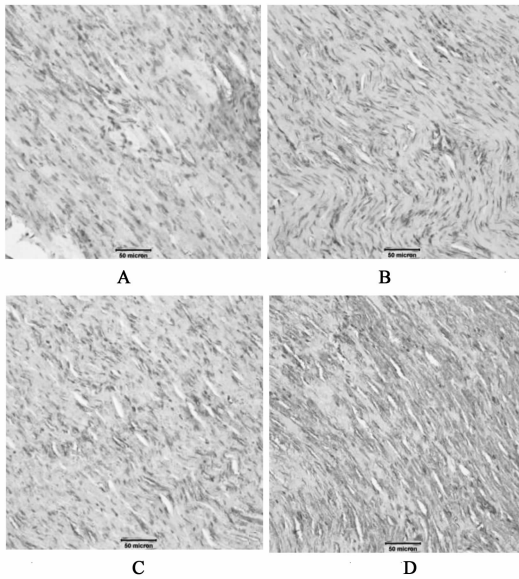


图 4 蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注损伤心肌细胞 Bcl-2 表达的影响(免疫组化, ×40)

表 1 蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注损伤心肌 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达和凋亡指数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Bcl-2/A	Bax/A	凋亡指数/%
假手术	-	55.95 ± 18.96	20.75 ± 6.45	4.60 ± 1.50
缺血再灌注	-	29.47 ± 9.61 ¹⁾	61.77 ± 16.85 ¹⁾	18.40 ± 4.10 ¹⁾
复方丹参滴丸	37.8	41.03 ± 13.07 ^{1,2)}	37.22 ± 13.11 ^{1,2)}	10.93 ± 2.91 ^{1,2)}
蓝萼香茶菜总二萜	4.76	52.09 ± 15.79 ²⁾	27.95 ± 7.95 ²⁾	9.87 ± 3.07 ^{1,2)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与缺血再灌注组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

6 个外显子编码,且过表达 Bax 加速凋亡细胞的死亡。Bcl-2 蛋白是胞浆蛋白,起抗凋亡作用。另一个途径是死亡受体途径,Fas-Fas 配体系统诱导心肌梗后心肌细胞凋亡。细胞凋亡的生化特征是在核小体被

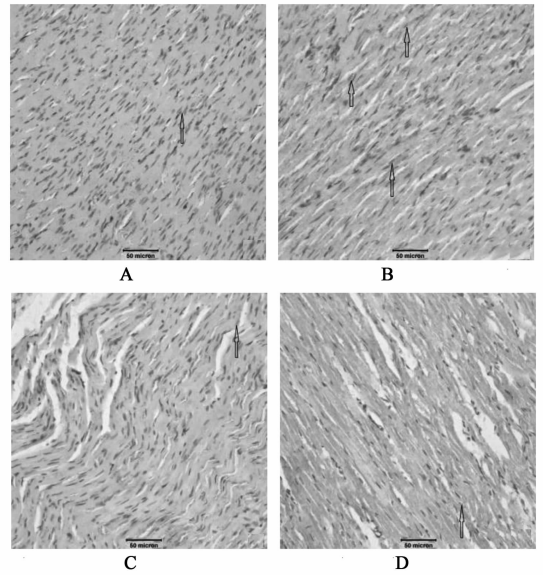


图 5 蓝萼香茶菜总二萜预处理对兔心肌缺血/再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响(×40)

等心血管疾病的防治中具有良好的效果,但由于其成分复杂,作用机制难以明确、质量难以控制及毒副作用,限制了其在临床中的广泛应用^[24],近年对中药复方的研究也开始加深,中医中药治疗疾病多以复方为主,复方的研究虽然比较复杂,但是有着重大的意义^[25]。本研究选用中药蓝萼香茶菜总二萜于术前灌胃家兔,显示该药能使凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达增加,Bax 表达减少。与缺血再灌注组相比,给药组和对照组凋亡指数减少,但给药组和对照组相比,无明显差异,提示 TD 对心肌缺血再灌注损伤有保护作用且可能有抗凋亡作用,但与丹参滴丸的作用相当。各组光镜和电镜下观察心肌细胞损伤的程度与心肌细胞凋亡指数基本一致。

细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤发病机制中的重要环节,细胞凋亡又称程序性细胞死亡,包括心肌缺血在内的许多心脏病理学形式^[26]。细胞凋亡有两个传统途径,一个是线粒体损伤途径,如 Bax 是被

内源性核酸内切酶所诱导 DNA 碎片^[27],这可通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测到,TUNEL 法可检测细胞凋亡率。Bcl-2 是一种原癌基因,具有促进细胞生存、抗凋亡作用,Bcl-2 在抑制心肌细胞死亡,促进心

肌细胞生存中起了关键作用^[28], Bax 是促凋亡基因。本研究中,与 IR 组比较,D 组 Bcl-2 蛋白表达显著增加,而 Bax 蛋白表达显著减少。本研究结果提示蓝萼香茶菜总二萜预处理对心肌缺血再灌注损伤有保护作用,提示该药可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达、下调 Bax 蛋白表达而起到抗细胞凋亡作用。

[参考文献]

- [1] Vincent W Wong, Mahidi Mardini, N Wah Cheung, et al. High-dose insulin in experimental myocardial infarction in rabbits: protection against effects of hyperglycaemia[J]. *J Diabetes Complications*, 2011, 25(2):122.
- [2] Hua-Sheng Ding, Jun Yang, Fei-Li Gong, et al. High mobility box 1 mediates neutrophil recruitment in myocardial ischemia-reperfusion injury through toll like receptor 4-related pathway [J]. *Gene*, 2012, 509(1):149.
- [3] Fei Ye, Wei Fang, Feng Wang, et al. Evaluation of adenosine preconditioning with ^{99m}Tc-His₁₀-annexin V in a porcine model of myocardium ischemia and reperfusion injury: preliminary study[J]. *Nucl Med Biol*, 2011, 38(4):567.
- [4] Yasuhiro Ishihara, Norio Shimamoto. Sulfaphenazole attenuates myocardial cell apoptosis accompanied with cardiac ischemia-reperfusion by suppressing the expression of Bimel and Noxa[J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 119(3):251.
- [5] Sasa Sopka, Christine Mertens, Anna Bettina Roehl, et al. Effects of xenon and isoflurane on apoptosis and inflammation in a porcine myocardial infarction model[J]. *Ann Anat*, 2013, 195(2):166.
- [6] 高长久,于双双,梁启超. 蓝萼香茶菜研究新进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2011, 32(1):54.
- [7] 杨文华,张健,王剑文. 蓝萼香茶菜化学成分和生物活性研究近况[J]. 抗感染药学, 2011, 8(4):227.
- [8] 刘兰娣,叶丽卡,潘东军,等. 蓝萼香茶菜对大鼠全心缺血再灌注时心肌 c-fos 基因表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4):358.
- [9] 朱晓红,王强,金勇,等. 蓝萼香茶菜总二萜对小鼠心肌血流量影响[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(7):837.
- [10] 崔婷婷,赵丽娟,刘岩,等. 蓝萼香茶菜的毒理学研究[J]. 中国医药指南, 2010, 8(19):246.
- [11] Li Wen Gao, Jian Zhang, Wen Hua Yang, et al. Glucocalyxin A induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through mitochondria-mediated death pathway[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25:51.
- [12] 沈晓丹,王冰,刘春宇,等. 蓝萼香茶菜的化学成分研究(I)[J]. 中草药, 2009, 40(12):1883.
- [13] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1053.
- [14] H Kitagawa, T Yamazaki, T Akiyama, et al. Isoflurane attenuates myoglobin release during ischemic and/or reperfusion periods[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2008, 52(5):650.
- [15] 冉珂,段开明,邹定全,等. 异氟醚延迟预处理对兔心肌缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2008, 24(8):679.
- [16] 潘从泽,王云飞,高秀梅,等. 复方丹参与穿山龙总皂苷配伍对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17):170.
- [17] 潘蓉,李玲. 丹参水提物对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心率及心肌酶谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):232.
- [18] 龚明玉,杜超,许倩,等. 苓桂术甘汤对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):273.
- [19] 高伟敏,吴素煊,刘书哲,等. 银杏叶提取物对兔心肌缺血的保护作用[J]. 军医进修学院学报, 2009, 30(4):533.
- [20] 彭艳玲,刘兴德,孙传聪. 缺血后处理对家兔缺血-再灌注心功能和 MDA、SOD 的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 34(2):137.
- [21] Asgeri M, Ahmadpour F, Negargar S, et al. The comparative myocardial protection by propofol and isoflurane in an *in vivo* model of ischemia reperfusion [J]. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 2011, 15(1):56.
- [22] 柳忠辉. 医学免疫学实验技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:185.
- [23] Liuyi Dong, Yifei Fan, Xu Shao, et al. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(12):3211.
- [24] 张海燕,邹伟魁,贺娅,等. 中药对血管平滑肌细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):273.
- [25] 陈钰,刘晓秋,郭丽丽,等. 中药在心肌细胞钙信号转导通路研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):319.
- [26] Rosanna Di Paola, Emanuela Mazzon, Irene Paterniti, et al. Olprinone, a PDE3 inhibitor, modulates the inflammation associated with myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(2/3):612.
- [27] Sheng Kang, Yue-jin Yang, Yi-ling Wu, et al. Myocardium and microvessel endothelium apoptosis at day 7 following reperfused acute myocardial infarction [J]. *Microvasc Res*, 2010, 79(1):70.
- [28] Xin Duan, Bingyang Ji, Xiaohua Wang, et al. Expression of microRNA-1 and microRNA-21 in different protocols of ischemic conditioning in an isolated rat heart model[J]. *Cardiology*, 2012, 122(1):36.

[责任编辑 聂淑琴]