

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

龚明玉*, 杜超, 许倩, 李素婷

(承德医学院生化教研室, 河北承德 067000)

[摘要] 目的: 观察苓桂术甘汤在大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)时对心肌细胞凋亡的影响。方法: 40只SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 辛伐他汀组, 苓桂术甘汤组。辛伐他汀组药量为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 苓桂术甘汤组药量为 $50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 另2组给生理盐水 $1.0\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支方法制备心肌缺血再灌注模型。缺血30 min、再灌注2 h后, 采用流式细胞术检测心肌细胞凋亡情况, 采用免疫组化技术检测心肌细胞 Smad3, Smad7 蛋白表达的变化。结果: 与假手术组相比, 模型组心肌细胞的凋亡率明显增加($P < 0.01$), 并且 Smad3 蛋白表达增加($P < 0.01$), Smad7 蛋白表达减少($P < 0.01$); 与模型组相比, 苓桂术甘汤和辛伐他汀可明显降低心肌细胞的凋亡率($P < 0.01$); 心肌细胞 Smad3 蛋白表达减少($P < 0.05$), Smad7 蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论: 苓桂术甘汤可以抑制大鼠缺血再灌注损伤时心肌细胞凋亡, 上调 Smad7 蛋白表达, 下调 Smad3 蛋白表达, 可能是其保护 MIRI 的作用机制之一。

[关键词] 苓桂术甘汤; 心肌缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; Smad 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0273-04

Effect of Lingui Zhugan Decoction on Cardiomyocyte Apoptosis Caused by Myocardial Ischemia Reperfusion in Rats

GONG Ming-yu*, DU Chao, XU Qian, LI Su-ting

(Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Lingui Zhugan decoction on cardiomyocyte apoptosis caused by ischemia reperfusion in rats. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into sham, model, simvastatin and Lingui Zhugan decoction group. Rats in simvastatin group were perfused with Simvastatin $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, rats in Lingui Zhugan decoction group were perfused with Lingui Zhugan decoction $50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, other two groups were given NS $1.0\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ a week before the operation. Myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) model was established by ligating the left descend coronary artery. After ischemia 30 min and reperfusion 2 hours, the changes in cardiomyocyte apoptosis were detected by flow cytometry, the

[收稿日期] 20120307(013)

[通讯作者] * 龚明玉, 在读博士, 副教授, 从事中药对心血管疾病的防治研究, Tel: 18796086859, E-mail: mingyugong@126.com

[6] Terry J, Saito T, Subramanian S, et al. TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies [J]. Am J Surg Pathol, 2007, 31(2): 240.

[7] 司徒仪, 曹立幸. 子宫内膜异位症不孕的中西医结合诊治[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(11): 969.

[8] 杨帆, 王燕, 杨淑梅, 等. 祛异康对子宫内膜异位症模型大鼠血浆 TXB₂ 和 6-Keto-PGF1 α 的影响[J]. 陕西中医, 2011, 32(11): 1557.

[9] 徐晓娟, 金沈锐. 芍药甘草汤不同配伍比例对痛经大

鼠 B-内腓肽的影响研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(6): 4041.

[10] 车建华, 潘文婧, 刘倩, 等. MMP-2、MMP-9 及 EMMPRIN 在子宫内膜异位症中的表达及临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(12): 19.

[11] Ria R, Loverro G, Vacca A, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 agree with progression of ovarian endometriosis[J]. Eur J Clin Invest, 2002, 32(3): 199.

[责任编辑 何伟]

expression of Smad3, Smad 7 protein were detected by immunohistochemical staining in cardiomyocyte. **Result:** Apoptosis rate and the level of Smad3 protein in model group were higher significantly than those of sham group ($P < 0.01$), but the level of Smad7 protein was lower than that of sham group ($P < 0.01$). Apoptosis rate and the level of Smad3 protein in Linggui Zhugan decoction and Simvastatin group was lower significantly than those of model group ($P < 0.01$), but the level of Smad7 protein was higher than that of model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Linggui Zhugan decoction can inhibit cardiomyocyte apoptosis in rats with MIRI, which is realized by up-regulating Smad7 protein expression and down-regulating Smad3 protein expression.

[Key words] Linggui Zhugan decoction; myocardial ischemia reperfusion injury; apoptosis; Smad protein

目前,心血管系统疾病依然是导致人类死亡的头号杀手,缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)成为阻碍缺血再灌注心肌从再灌注策略中获得最佳疗效的主要难题^[1]。已有的实验和临床研究证明,心肌 IRI 的一个重要表现是心肌细胞的凋亡^[2-3]。因此,积极探索 IRI 的病因病理和预防及治疗,具有重大意义。中药成分复杂,有望在心血管病治疗方面起到改善 IRI 的作用。张仲景之苓桂术甘汤为治疗痰饮之祖方,原用于治疗阳虚水饮所致短气、心胸满闷、气上冲胸、起则头眩等症,但具体的机制尚不清楚。本实验旨在观察苓桂术甘汤对 IRI 时细胞凋亡的影响,从更深层次探讨苓桂术甘汤对心肌的保护作用及机制。

1 材料

1.1 药物和试剂 苓桂术甘汤按原方比例(茯苓:桂枝:白术:甘草 4:3:3:2),以上药材购于河北省承德市中药材公司,其品系鉴定符合药用标准^[4],常规方法煎煮 3 次,将 3 次滤液混合,60℃水浴浓缩,制成含生药 2 g·mL⁻¹药液,4℃冰箱保存备用。辛伐他汀片(宜昌长江药业有限公司,批号 080317,规格 10 mg),Annexin V-EGFP 凋亡试剂盒(南京凯基生物科技有限公司, KGA103), Smad3, Smad7 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Santa 公司, sc-8832)。

1.2 动物 健康 SD 大鼠 40 只,体重(220 ± 20)g,雌雄各半,购自天津市山川红实验动物科技有限公司,许可证号 SCXK(津)2009-001。

1.3 仪器 DB-3 型心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司), DW-2000 型动物人工呼吸机(上海嘉鹏科技有限公司), 图像分析仪(Beckman 公司, USA)。

2 方法

2.1 动物的分组及处理 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组、模型组、辛伐他汀组和苓桂术甘汤组,每组 10 只。辛伐他汀组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和苓桂

术甘汤组(50 g·kg⁻¹·d⁻¹)大鼠于造模前 1 周分别灌胃,连用 7 d;假手术组和模型组术前分别给予生理盐水(10 mL·kg⁻¹),时间同上。

2.2 心肌缺血再灌注模型的制备 10%乌拉坦腹腔注射麻醉(10 mL·kg⁻¹)大鼠,仰卧位固定,用针型电极插入大鼠四肢皮下记录标准肢体 II 导联心电图。于胸骨左缘 3~4 肋间切开胸壁,暴露心脏,在左心耳与肺动脉干之间结扎左冠状动脉前降支,同时在结扎线与血管之间穿一直径 2 mm,长 5 mm 的硅胶管,结扎 30 min;然后剪断缝合线,取出硅胶管,再灌注 2 h,假手术组仅分离前降支,但不结扎。

2.3 检测心肌细胞的凋亡 再灌注后取左冠状动脉前降支支配区的心肌组织 5 mm³,机械法制备单细胞悬液,经 200 目尼龙网过滤。取 1 mL 细胞,1 500 r·min⁻¹、4℃、离心 5 min,收集细胞。加入 1 mL 冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。将细胞重悬于 500 μL Binding Buffer,加入 5 μL Annexin V-EGFP 和 5 μL Propidium Iodide (PI),轻轻混匀,室温避光反应 15 min,上机检测,自动计算凋亡心肌细胞的百分比。结果判定:Annexin V⁻/PI⁻为正常细胞,Annexin V⁺/PI⁻为凋亡细胞,Annexin V⁺/PI⁺为坏死细胞。

2.4 心肌组织 Smad3, Smad7 免疫组织化学染色 实验结束,速取左室心尖相同部位的心肌,置于 10%的中性福尔马林溶液中固定,制作石蜡切片,切片厚 4 μm,常规脱腊水化,一抗为兔抗大鼠 Smad3 或 Smad7 单克隆抗体(1:100)稀释,4℃过夜,加入二抗生物素化羊抗兔 IgG(1:500)稀释,以 PBS 替代一抗作为阴性对照, DAB 显色,苏木精复染,中性树脂胶封片,光镜观察阳性信号。结果判定:以心肌细胞膜及胞浆出现黄色或棕黄色颗粒为阳性。在高倍镜下每张切片任意选取 10 个视野(×400),分析并计数阳性表达细胞占整个视野的百分比,取平均值。

2.5 统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处

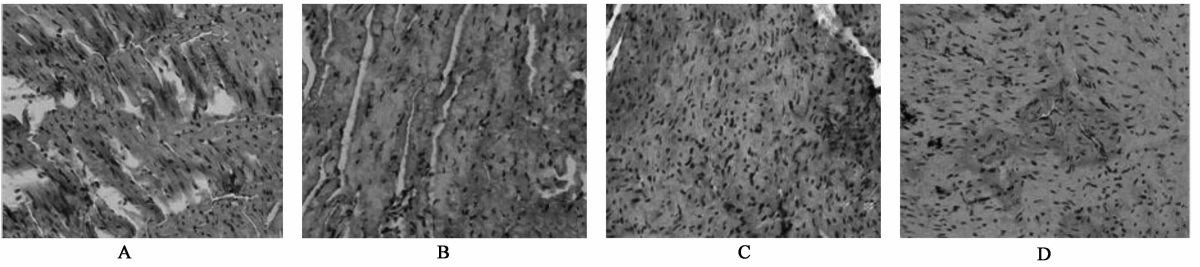
理采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料多组间的比较用方差分析,两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 Annexin-EGFP 标记的心肌细胞凋亡情况 与假手术组相比,模型组细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$),与模型组相比,苓桂术甘汤和辛伐他汀组心肌细胞凋亡率均明显降低 ($P < 0.01$)。苓桂术甘汤组和辛伐他汀组心肌细胞凋亡率无统计学差异。见表 1。

3.2 对 MIRI 大鼠心肌组织中 Smad3 及 Smad7 蛋

白表达的影响 各组大鼠心肌组织 Smad3 及 Smad7 蛋白表达免疫组化结果见表 2 及图 1~2。阳性产物呈棕黄色,主要分布在胞浆及胞膜。结果表明:假手术组心肌细胞胞浆内有大量 Smad7 蛋白表达,少量的 Smad3 蛋白表达。与假手术组相比,模型组 Smad3 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$),但 Smad7 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,辛伐他汀和苓桂术甘汤组,Smad3 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$),但 Smad7 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$);苓桂术甘汤组和辛伐他汀组比较无统计学差异。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 辛伐他汀 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组; D. 苓桂术甘汤 $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 各组大鼠心肌 Smad3 蛋白表达(免疫组化, $\times 400$)

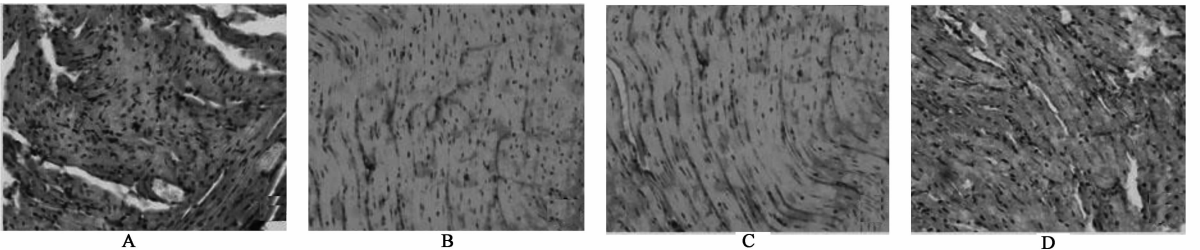


图 2 各组大鼠心肌 Smad7 蛋白表达(免疫组化, $\times 400$)

表 1 各组大鼠心肌细胞的凋亡情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	细胞凋亡率/%
假手术	-	6.74 ± 0.30
模型	-	$15.54 \pm 0.38^{1)}$
辛伐他汀	0.02	$13.46 \pm 0.40^{2)}$
苓桂术甘汤	50	$13.23 \pm 0.39^{2)}$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 苓桂术甘汤对 MIRI 大鼠心肌组织中 Smad3 及 Smad7 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Smad3 阳性细胞率/%	Smad7 阳性细胞率/%
假手术	-	0.054 ± 0.008	0.289 ± 0.022
模型	-	$0.196 \pm 0.014^{1)}$	$0.099 \pm 0.023^{1)}$
辛伐他汀	0.02	$0.170 \pm 0.009^{2)}$	$0.187 \pm 0.023^{2)}$
苓桂术甘汤	50	$0.169 \pm 0.012^{2)}$	$0.192 \pm 0.019^{2)}$

4 讨论

临床大量研究表明,缺血性心脏病多属于中医的胸痹、心悸、水肿、虚劳、厥证的范畴。张仲景之苓桂术甘汤为治疗痰饮之祖方,原用于治疗阳虚水饮所致短气、心胸满闷、气上冲胸、起则头眩等症。因此,本研究在血瘀证基础上,建立 MIRI 模型应用苓桂术甘汤处理,观察对大鼠 MIRI 的保护作用及机制。

缺血再灌注损伤是指组织缺血再灌注后,由于活性氧产生、中性粒细胞活化等导致炎症、细胞凋亡和损伤的过程,且再灌注后加重组织细胞的代谢障碍和结构破坏,使组织损害进一步加重^[5]。损伤在心血管疾病及心脏外科手术中普遍存在,如何防治已经成为医学研究的热点^[6]。近年已有一些实验和临床研究发现,细胞凋亡可能是心肌缺血再灌

注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 发病机制中的重要环节之一^[7]。大鼠经历缺血再灌注损伤后,会导致大量心肌细胞的凋亡^[8]。

本研究观察到大鼠 MIRI 后,心肌细胞凋亡率明显增高,与假手术组比较差异显著($P < 0.01$),苓桂术甘汤可以降低大鼠心肌细胞凋亡率,与模型组比较差异显著($P < 0.01$),辛伐他汀属于他汀类药物,是临床治疗冠心病的典型药物,具有抑制细胞凋亡,抗心肌缺血保护心肌的作用,在大鼠 MIRI 后,在降低心肌细胞凋亡率上,苓桂术甘汤组与辛伐他汀组比较无显著差异,说明苓桂术甘汤和辛伐他汀一样,都可以通过抑制 MIRI 过程中的细胞凋亡,减轻缺血再灌注损伤。

心肌缺血再灌注损伤机制及保护的研究越来越受到人们的重视。TGF 超家族包括 TGF- β 家族和 BMP 家族,二者是 Smad 蛋白的经典激活因子。TGF- β 作为 TGF- β 超家族成员之一,是一种多功能的生长因子,Smad 蛋白家族是属于 TGF 超家族的下游信号转导分子,是目前发现的 TGF 唯一的作用底物,是把 TGF 信号从细胞外传递到细胞核的中介分子,在 TGF 信号传递过程中起着重要的作用^[9]。在心肌细胞中 TGF- β 的主要作用可以通过活化 Smad3 蛋白,进而诱导心肌细胞的凋亡^[10]。而 Smad7 蛋白是 TGF- β 信号转导的抑制剂^[11]。

本实验采用制备大鼠 MIRI 方法,模拟临床上急性心肌梗死后的溶栓过程,用苓桂术甘汤预处理,探讨苓桂术甘汤对 IRI 的心肌保护作用与 Smad 蛋白的关系。结果显示,IRI 后心肌细胞 Smad3 蛋白明显增高,Smad7 蛋白明显降低,而苓桂术甘汤组和辛伐他汀组心肌细胞 Smad3 蛋白明显下降,Smad7 蛋白明显升高,与模型组比较,差异显著。综上所述,Smad3 及 Smad7 蛋白参与心肌细胞 IRI 后细胞凋亡的信号传导,TGF- β /Smad 途径可能是参与 MIRI 诸多途径之一。苓桂术甘汤可抑制 Smad3 的表达,增加 Smad7 蛋白的表达,从而抑制心肌细胞凋亡,保证心肌结构和功能的稳定。这可能对防治缺血性心脏病和维护围手术期患者安全具有重要意义,为减轻 MIRI 开辟了新思路。

[参考文献]

- [1] Van Domburg R T, Sonnenschein K, Nieuwlaat R, et al. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2005,46(1):15.
- [2] McCully J D, Wakiyama H, Hsieh Y J, et al. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. AM J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(5): 1923.
- [3] Kucharczak J, Simmons M J, Fan Y, et al. To be, or not to be; NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis [J]. Oncogene, 2003,22(56):8961.
- [4] 郭兰忠. 现代实用中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:215.
- [5] Han J Y, Fan J Y, Horie Y. Ameliorating effects of compounds derived from *Salvia miltiorrhiza* root extract on microcirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion [J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(2):280.
- [6] Villanueva D S, Poirier P, Standley P R. Prevention of ischemic heart failure by exercise in spontaneously diabetic BB Wor rats subjected to insulin withdrawal [J]. Metabolism,2003,52(6):791.
- [7] Scarabelli T M, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium [J]. Curr Probl Cardiol, 2006, 31(3): 181.
- [8] Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, et al. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal [J]. Basic Res Cardiol,2001,96(3):219.
- [9] 史永军,田宇彬,赵清喜. Smad3 蛋白家族的研究现状[J]. 中华腹部疾病杂志,2002,2(5):497.
- [10] Schneiders D, Heger J, Best P, et al. SMAD proteins are involved in apoptosis induction in ventricular cardiomyocytes [J]. Cardiovasc Res,2005,67(1):87.
- [11] 苏丽婷. Smad 蛋白在转化生长因子- β 信号转导通路中的作用与机制[J]. 医学分子生物学杂志,2008,5(4):352.

[责任编辑 聂淑琴]