

黄芩茎叶总黄酮对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡 及双面神激酶 2 蛋白表达的影响

于晓敏, 郝祥俊, 龚明玉*
(承德医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 观察黄芩茎叶总黄酮(*Scutellaria baicalensis* stem-leaf total flavonoid, SSTF) 对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及双面神激酶 2 (JAK2) 蛋白表达的影响。方法: 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组 (sham operation group, sham 组)、缺血再灌注组 (Ischemia reperfusion group, IR 组)、SSTF 3 个剂量组。SSTF 组于术前 1 周灌服不同剂量的 SSTF ($17.5, 35, 70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 另 2 组给等量生理盐水。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 AnnexinV/PI 双染, 流式细胞仪检测心肌细胞的凋亡情况, 采用免疫组化技术检测心肌细胞 JAK2 蛋白表达情况。结果: 与 sham 组相比, IR 组的心肌细胞的凋亡率明显增加 ($P < 0.01$), 并且 JAK2 蛋白表达增加 ($P < 0.01$); 与 IR 组相比, SSTF 可明显降低心肌细胞的凋亡率 ($P < 0.05, P < 0.01$); 降低 JAK2 蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: SSTF 抑制心肌细胞凋亡可能与降低 JAK2 蛋白表达有关。

[关键词] 黄芩茎叶总黄酮; 细胞凋亡; JAK2; 缺血再灌注

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0116-04

Effect of *Scutellaria baicalensis* Stem-leaf Total Flavonoid on Myocardial Apoptosis and Janus Kinases 2 Protein Expression during Ischemia Reperfusion in Rats

YU Xiao-min, HAO Xiang-jun, GONG Ming-yu*
(Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of *Scutellaria baicalensis* stem-leaf total flavonoid (SSTF) on myocardial apoptosis and Janus Kinases 2 protein expression during ischemia reperfusion in rats. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into sham operation group, Ischemia reperfusion group and SSTF group. Rats in SSTF group were perfused with SSTF $17.5, 35, 70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ respectively prior to ischemia reperfusion. Other two groups were given NS instead of SSTF equally at a week before the operation. Myocardial ischemia reperfusion injury model was established by ligating the left descend coronary artery (LDA) 30 min and reperfusion 2 hours. Apoptosis of myocardial cell was detected after operation in all groups by flow cytometry with Annexin V-EGFP and propidium iodide (PI) staining. The protein expression of JAK2 gene was determined by using immunohistochemical staining. **Result:** Compared with sham group, the occurrence rate of myocardial apoptosis in IR group was increased obviously ($P < 0.01$); JAK2 protein expression was up-regulated in IR group ($P < 0.01$). Compared with IR group, the occurrence rate of myocardial apoptosis in SSTF group was decreased obviously ($P < 0.05, P < 0.01$); The JAK2 protein expression was higher than that in SSTF group ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** SSTF attenuates cardiomyocytes apoptosis during ischemia reperfusion injury by down-regulating the protein expression of JAK2 gene.

[收稿日期] 20100628(009)

[通讯作者] * 龚明玉, 硕士, 副教授, 主要从事中药对心血管疾病的防治研究, Tel: 0314-2285910, E-mail: mingyugong@126.com

[Key words] *Scutellaria baicalensis* stem-leaf total flavonoid; apoptosis; JAK2; ischemia reperfusion

近年来随着心脏冠脉介入手术(PCI)和冠脉搭桥术(CABG)等心肌梗死后血运重建方法的大量开展,使急性心肌梗死的死亡率有所降低。但是,缺血心肌的血液供应恢复后可出现缺血再灌注心肌损伤,诱发加重心肌细胞凋亡,导致心肌细胞丢失增加。因此,心脏缺血再灌注损伤越来越成为研究的热点。本研究采用整体心肌缺血再灌注模型模拟临床缺血再灌注损伤病理变化,旨在观察黄芩茎叶总黄酮(*scutellaria baicalensis* stem-leaf total flavonoid, SSTF)是否具有抗凋亡等保护心肌的作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 试剂 SSTF 纯度为 61.8%,批号 010608,是黄芩茎叶的提取物,其主要成分为黄酮类化合物,为唇形科植物,由本院省重点实验室—中药研究所提供,用饱和 NaHCO₃ 溶解配制后 ig。Annexin V-EGFP 凋亡试剂盒(南京凯基生物科技有限公司)。JAK2 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Santa 公司)。

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;FACSCalibur 流式细胞仪,美国 B&D 公司。

2 方法

2.1 动物的分组及处理 40 只 SD 大鼠随机分为 5 组:假手术组(sham 组)、缺血再灌注组(Ischemia reperfusion group, IR 组)、SSTF 低、中、高 3 个剂量组,每组 8 只,其中 SSTF 3 个组大鼠于手术前 1 周分别灌服不同剂量的 SSTF(17.5, 35, 70 mg·kg⁻¹·d⁻¹),连用 7 d;假手术组和 IR 组术前分别给予相应容积的生理盐水,时间同 SSTF 组。末次 ig 1 h 后,假手术组只在左冠状动脉前降支下方穿线,但不结扎;其他组大鼠均制备心肌缺血再灌注模型,即结扎左冠状动脉前降支 30 min,再灌注 2 h。

2.2 心肌缺血再灌注模型的制备 10% 乌拉坦 ip 麻醉(0.01 mL·g⁻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 Annexin V/PI 双染,流式细胞仪检测心肌细胞凋亡情况 再灌注后取梗死区边缘心肌组织 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 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⁻/PI⁻ 为正常细胞,Annexin⁺/PI⁻ 为凋亡细胞,Annexin⁺/PI⁺ 为坏死细胞。

2.4 SP 免疫组化检测 JAK2 基因的表达 取大鼠心肌组织,置于 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,连续切片,将切片用 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 消除内源性过氧化氢酶的活性,PBS 洗 5 min × 3 次;置于 0.01% 枸橼酸盐缓冲液中,微波炉抗原修复;PBS 洗 5 min × 3 次,滴加非免疫血清封闭液,室温孵育 20 min;倾去血清后直接滴加 1:100 的 JAK2 一抗,于 4℃ 下过夜;PBS 洗 5 min × 3 次,滴加生物素标记二抗,室温下 1 h;PBS 洗 5 min × 3 次,滴加 HRP-SA,于室温下放置 1 h;PBS 洗 5 min × 3 次,滴加 DAB 进行显色;苏木素复染细胞核,脱水、透明、封片。常规设立阴性对照。结果判定:阳性信号呈棕黄色颗粒,JAK2 表达于胞浆。定量分析:在光学显微镜 400 倍视野下,每张切片随机选取阳性细胞分布均匀的 5 个视野,计数着色细胞占视野细胞总数的百分数,取平均值。

2.5 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用 SPSS 13.5 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 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 流式细胞仪检测 Annexin V-EGFP 标记的心肌细胞凋亡情况 与假手术组相比,IR 组细胞凋亡率明显增加;与 IR 组相比,SSTF 组细胞凋亡率均明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01),提示 SSTF 可减轻缺血再

灌注诱导的大鼠心肌细胞凋亡。见表 1。

表 1 黄芩茎叶总黄酮(SSTF)对缺血再灌注大鼠心肌细胞的凋亡的影响(̄±s, n=8)

组别	浓度 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	细胞凋亡率 /%
假手术	-	6.78 ±0.96 ²⁾
缺血再灌	-	12.45 ±2.17
SSTF	17.5	10.32 ±2.04 ¹⁾
	35	9.44 ±1.85 ²⁾
	70	7.96 ±1.23 ²⁾

注:与缺血再灌注组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01(表 2 同)

3.2 SP 免疫组化检测 JAK2 蛋白的表达情况 与假手术组比较,缺血再灌注组 JAK2 蛋白表达阳性细胞率明显比假手术组高(P<0.01),而 SSTF 组

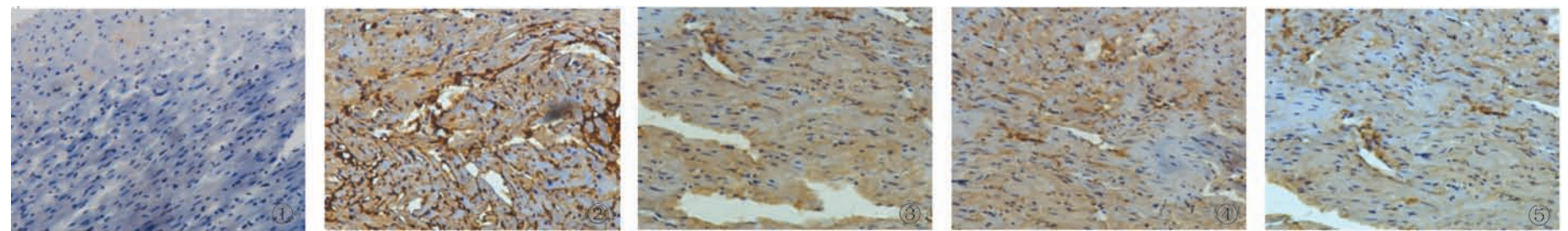


图 1 SSTF 对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡相关基因 JAK2 蛋白表达的影响

假手术组; 缺血再灌注组; SSTF17.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹组; SSTF 35 mg·kg⁻¹·d⁻¹组; SSTF 70 mg·kg⁻¹·d⁻¹组

4 讨论

心肌缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤广泛见于临床,是一个复杂的病理生理过程,多因素参与了其发生、发展变化,是阻碍缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效的主要难题,研究和探讨心肌缺血再灌注损伤的机制以及减轻这种心肌损伤的有效措施已成为心脏病学领域中的重大课题。在动物体内阻断左冠状动脉前降支造成急性心肌缺血,并在预定时间内恢复血供予以再灌注,是模拟人类缺血性心脏病恢复血供治疗必需的实验方法^[1]。SSTF 为黄芩茎叶的提取物,其主要成分为黄酮类化合物, SSTF 具有抗氧化及改善心脑血管的供血等广泛的药理活性^[2-3]。本研究以在体大鼠左冠状动脉结扎法建立 IR 损伤模型,通过观察 SSTF 对 IR 心肌细胞凋亡的影响及凋亡相关基因的表达情况,综合评价 SSTF 对缺血再灌注大鼠心肌的保护作用及其可能的作用机制,为心肌缺血的临床治疗提供新的药物。IR 过程中除细胞坏死外,还有另一种细胞死亡的形式即细胞凋亡,细胞凋亡的多少决定着 IR 损伤的轻重^[4-7]。正常细胞膜内表面含有磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS),在细胞凋亡早期,PS 可从膜内迁移到膜外,用荧光染料标记与 PS 有高度结合性的 Annexin V,可通过流式细胞仪识别凋亡细胞。

JAK2 蛋白表达阳性细胞率明显较缺血再灌注组低(P<0.05, P<0.01);说明 IR 增加 JAK2 蛋白表达, SSTF 下调 JAK2 蛋白表达。见表 2 及图 1。

表 2 SSTF 对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡相关基因 JAK2 蛋白表达的影响(̄±s, n=8)

组别	浓度 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	阳性细胞率 /%
假手术	-	0.096 ±0.018 ²⁾
缺血再灌	-	0.278 ±0.049
SSTF	17.5	0.254 ±0.047
	35	0.223 ±0.036 ¹⁾
	70	0.198 ±0.025 ²⁾

利用 PI 不能进入细胞膜完整的正常细胞和凋亡细胞,但能进入胞膜破损的坏死细胞,在流式细胞仪上可区分凋亡细胞和坏死细胞,并计算百分率^[8]。本实验采用 Annexin V-EGFP/PI 双染试剂盒结合流式细胞仪的精确分析,对早期凋亡细胞、坏死细胞和活细胞进行鉴别与定量。研究显示,与 sham 组比较,IR 组细胞凋亡率明显增加,与 IR 组相比, SSTF 组细胞凋亡率均明显降低,提示 SSTF 可减轻缺血再灌注诱导的大鼠心肌细胞凋亡。

细胞凋亡是基因控制的细胞程序性死亡,在心肌缺血再灌注损伤中起重要作用。细胞凋亡的诱导及调控过程极其复杂,涉及多条细胞内信号转导通路。近年来研究显示,在心肌缺血再灌注导致细胞凋亡的过程中,janus 激酶信号转导子与转录激活子(janus kinase signal transducers and activators of transcription, jak/stat)信号转导通路与心肌缺血再灌注损伤有关^[9-12]。JAK 家族是一组受体相关蛋白酪氨酸激酶,成员包括 JAK1, JAK2, JAK3 和 TYK2, JAKs 为调控细胞增殖、分化、凋亡各种信号途径的重要组分, JAKs 的活化在影响细胞凋亡中起重要作用。STAT 家族为 JAK 的重要底物,成员包括 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b 和 STAT6。JAK/STAT 通路的转导途径为:许多细胞外

信号与靶细胞上相应的受体结合后,首先活化蛋白激酶 JAK,进而使胞浆中转录因子 STAT 磷酸化而激活,两个磷酸化的 STAT 分子形成二聚体进入细胞核,在核内与靶基因启动子中特异的 DNA 序列结合诱导靶基因表达,从而发挥多种生物学效应^[13]。本研究采用免疫组化技术检测心肌细胞中 JAK2 蛋白的表达情况,结果发现,假手术组心肌细胞浆中 JAK2 蛋白表达较少,IR 组 JAK2 蛋白表达明显比假手术组高($P < 0.01$),而 SSTF 组 JAK2 蛋白表达明显较缺血再灌注组低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明缺血再灌注能增加 JAK2 蛋白表达,而 SSTF 下调 JAK2 蛋白表达。

总之,本实验结果提示 SSTF 能下调 JAK2 蛋白表达减少细胞凋亡而发挥抗心肌缺血再灌注损伤作用。缺血再灌注所涉及的细胞信号转导机制复杂,包括细胞外信号分子、细胞膜上信号接收器、细胞内信号转导通路及其效应等多方面的变化,并在多层次和诸多环节存在交互作用。深入认识再灌注损伤的细胞信号转导途径,有助于阐明其细胞分子机制,为临床防治提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Ferez-Santander S M, Marquez M F, Pena Duque M A, et al. Myocardial reperfusion injury. Rev Esp Cardiol, 2004, 57(Suppl 1): 9.
- [2] 赵淑敏, 杨宏光, 孔祥玉, 等. 黄芩茎叶总黄酮预处理对缺血再灌注心肌超氧化物歧化酶和丙二醛含量的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 31(10): 52.
- [3] 张力, 龚明玉, 张泓波, 等. 黄芩茎叶总黄酮预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41(5): 437.
- [4] Saeed S A, Waqar M A, Zubairi A J, et al. Myocardial ischemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil [J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2005, 15 (8): 507.
- [5] 李小冰, 鄧兴义, 胡建国. 硫酸锌抗大鼠移植心脏早期心肌细胞凋亡的实验研究[J]. 新乡医学院学报, 2007, 24(1): 40.
- [6] 朱兵, 秦宇红, 杨雪. 促红细胞生成素对缺氧乳鼠心肌细胞凋亡及坏死的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2008, 11(2): 181.
- [7] 刘旭, 徐平. 心肌缺血-再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 18(18): 981.
- [8] Wilkins R C, Kutzner B C, Truong M, et al. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay [J]. Cytometry, 2002, 48(1): 14.
- [9] Bolli R, Dawn B, Xuan Y T. Emerging role of the JAK-STAT pathway as a mechanism of protection against ischemia/reperfusion injury [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(11): 1893.
- [10] Dawn B, Xuan Y T, Guo Y, et al. IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2 [J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(1): 61.
- [11] Mascareno E, EI-Shafei M, Maulik N, et al. JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion [J]. Circulation, 2001, 104(3): 325.
- [12] Yang X P, Irani K, Mattagajasingh S, et al. Signal transducer and activator of transcription 3alpha and specificity protein 1 interact to upregulate intercellular adhesion molecule-1 in ischemic-reperfused myocardium and vascular endothelium [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(7): 1395.
- [13] 黄文林, 朱孝峰. 信号转导 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 182.

[责任编辑 聂淑琴]