灯盏花素对缺血再灌注大鼠心肌超微结构及细胞凋亡的影响

龚明玉[1], 张力[2], 杜超[1], 周晓慧[1*]
(1. 承德医学院, 承德 067000; 2. 承德医学院附属医院放疗科, 承德 067000)

[摘要] 目的: 研究灯盏花素(breviscapine)对在体大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法: 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组, 缺血再灌注组(IR 组), 灯盏花素组。灯盏花素组大鼠于术前 1 周分别 ip 不同剂量的灯盏花素(25, 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}), 另 2 组给等量生理盐水。以左冠状动脉前降支穿线结扎法制备心肌缺血模型, 松开结扎线造成再灌注。采用 Annexinv-PI 双染, 流式细胞仪检测心肌细胞的凋亡情况; 电镜观察各组大鼠心肌超微结构的变化。结果: 灯盏花素可明显降低缺血再灌注大鼠心肌细胞的凋亡率($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且较 IR 组心肌细胞超微结构损伤程度减轻。结论: 灯盏花素对缺血再灌注心肌细胞具有保护作用, 其机制可能是通过抑制心肌细胞凋亡实现的。

[关键词] 灯盏花素; 细胞凋亡; 心肌; 缺血再灌注; 超微结构
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0147-03

Influence of Breviscapine on Ultrastructure and Apoptosis of Myocardial Cells after Myocardial Ischemia and Eperfusion in Rat

GONG Ming-yu[1], *ZHANG Li*[2], *DU Chao*[1], *ZHOU Xiao-hui*[1*]
(1. *Chengde Medical College, Chengde* 067000, *China*; 2. *Department of Radiotherapy, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde* 067000, *China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of breviscapine against myocardial ischemia/reperfusion injury in rat. **Method**: 40 SD rats were randomly divided into sham operation group, ischemia/reperfusion group and breviscapine group. Rats in breviscapine group were injected with breviscapine 25, 50 mg·kg^{1}·d^{-1} respectively prior to ischemia/reperfusion. The other two groups were given normal saline instead of breviscapine equally in volume at a week before the operation. The myocardial ischemia/reperfusion model was established by ligating the left anterior descending branch of coronary artery. Apoptosis of myocytes was detected after operation in all groups by flow cytometry with Annexin V and propidium iodiode (PI) staining. The ultrastructural alterations were observed under the transmission electron microscopy. **Result:** breviscapine could decrease the occurrence rate of myocardial apoptosis during ischemia/reperfusion injury obviously($P < 0.05$, $P < 0.01$). The degree of injury on ultrastructures of myocardial cell in breviscapine group is rather alleviated compared with that in the ischemia/reperfusion group. **Conclusion:** breviscapine may protect myocardial cells during ischemia/reperfusion injury and the protective mechanism may be achieved by inhibiting myocardial apoptosis.

[Key words] breviscapine; apoptosis; myocardium; ischemia/reperfusion; ultrastructures

心肌缺血再灌注可导致心肌细胞死亡, 凋亡在心肌细胞死亡中发挥了重要的作用[1~2]。细胞凋亡的多少决定着缺血再灌注心肌损伤的严重程度, 有效抑制细胞凋亡的发生和发展, 是促进缺血再灌注后心功能恢复和减轻心肌致死性损伤的一条重要途径。近年来研究发现, 在引发缺血之前使用药物预处理可减少缺血再灌注损伤, 缩小急性心肌缺血所致的梗死面积[3], 抑制缺血再灌注过程中心肌细胞

[收稿日期] 2010-01-25(003)
[基金项目] 河北省教育厅资助项目(038701)
[通讯作者] * 周晓慧, Tel: 13503149276

凋亡和超微结构损伤[4]。灯盏花素具有活血化瘀,抗血小板凝集等多种作用,但它对缺血再灌注损伤的保护作用及机制尚不清楚。该研究旨在观察缺血再灌注后大鼠心肌细胞凋亡的特点和灯盏花素对心肌细胞凋亡的影响及初步机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 灯盏花素注射液(吉林龙泰制药股份有限公司),Annexin Ⅴ-EGFP 凋亡试剂盒(南京凯基生物科技有限公司)。

1.1.2 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)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的分组及处理 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组:灯盏花素 I 组、灯盏花素 II 组、假手术组和缺血再灌注组,每组 10 只。灯盏花素 2 个组大鼠于手术前 1 周分别 ip 不同剂量的灯盏花素(25, 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}),连用 7 d;假手术组和缺血再灌注组术前分别 ip 相应容积的生理盐水,时间同灯盏花素组。

1.2.2 心肌缺血再灌注模型的制备 灯盏花素组和缺血再灌注组大鼠均制备心肌缺血再灌注模型,具体方法如下:10% 乌拉坦 ip 麻醉(1 mL/100 g)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,以往已有实验证实此缺血再灌注时间足以引起心肌细胞凋亡[5~6]。假手术组仅分离前降支,但不结扎。

1.2.3 Annexinv/PI 双染,流式细胞仪检测心肌细胞的凋亡 再灌注后取梗死区边缘心肌组织 5 mm^3,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 4 ℃离心 5 min,收集细胞。加入 1 mL 预冷的 PBS 洗涤细胞两次。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。

1.2.4 电镜观察心肌细胞超微结构 各组动物实验完毕后,取缺血再灌注部位的心肌,常规电镜样品包埋,半薄切片,光镜选区定位,超薄切片,铀、铅双染,透射电镜(J EOL 100CX2 Ⅱ)下观察心肌细胞超微结构变化。

1.2.5 统计学分析 数据以均数 ±标准差(x̄±s)表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测 Annexinv-EGFP 标记的心肌细胞凋亡情况 缺血再灌注组与假手术组相比,细胞凋亡率明显增加($P < 0.01$),灯盏花素组细胞凋亡率均明显低于缺血再灌注组($P < 0.05, 0.01$)见表 1。

表 1 各组大鼠心肌细胞的凋亡情况(x̄±s, $n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg^{-1}·d^{-1}	细胞凋亡率 /%
假手术	—	5.45 ±1.21[1)]
缺血再灌注	—	19.80 ±2.74
灯盏花素 I	25	17.20 ±2.13[1)]
灯盏花素Ⅱ	50	12.40 ±1.89[2)]

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

2.2 心肌细胞超微结构改变

2.2.1 假手术组 心肌细胞超微结构变化轻微,粗细肌丝清晰可见,肌小节一致,肌原纤维明暗带清楚,线粒体结构正常,嵴排列规则。

2.2.2 缺血再灌注组 心肌细胞严重水肿,部分肌节周期性结构破坏,肌丝断裂、溶解,线粒体肿胀,嵴部分断裂,染色质浓缩边集,呈新月体样改变。

2.2.3 灯盏花素组 较缺血再灌注组心肌纤维超微结构损伤程度明显减轻,多数心肌纤维仍肿胀,线粒体轻度肿胀,外膜完整,肌原纤维较规则。肌膜不平整,肌浆网轻度扩张,凋亡细胞明显减少。

3 讨论

近年来,尽管再灌注治疗方法迅速发展,包括溶栓、PCI 及 GABG,但急性心肌梗死死亡率仍很高,再灌注损伤是主要原因之一。因此,减轻再灌注损伤具有重要的临床意义。心肌缺血再灌注损伤可以产生 4 种类型的心功能障碍:心肌顿抑、无复流现象、再灌注心律失常和致死性再灌注损伤。研究发现细胞凋亡参与心肌缺血再灌注损伤过程[7]。抑制心肌细胞凋亡能够减少缺血再灌注后的心肌梗死体积几乎达到 50% ~70%,改善心功能[8]。因此抗凋亡对

防治心肌缺血再灌注损伤具有十分重要的意义。研究证实,有些中药可保护缺血再灌注心肌且毒副作用较小[9~10]。该实验应用灯盏花素使缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡减少,超微结构减轻,得到了与上述研究一致的结果[11]。

Kajstarn 等[12]研究发现,梗死后急速、大量的心肌细胞缺失是由坏死所致,而随后心肌细胞的缺血性死亡则与凋亡有关。该实验 IR 组在缺血边缘区由于存在侧枝循环和终末端动脉吻合,心肌缺血缺氧的情况较轻,心肌受到的损伤程度较小,但却触发了内源性核酸内切酶激活途径,出现染色质浓缩边集,呈新月体样改变的心肌细胞凋亡改变,与 Kajstarn 等研究结果一致。

有研究表明[13~15],氧化应激、钙反常、炎症反应及细胞凋亡等均参与了心肌缺血再灌注损伤,细胞凋亡是再灌注损伤发病机制中的一个重要环节。灯盏花素是国内临床上治疗心脑血管疾病的常用药之一,它是从中药灯盏花中分离得到的黄酮类化合物,现代药理研究表明灯盏花具有扩张血管、改善微循环、增强局部脑血流、抑制凝血因子Ⅳ活性、抑制蛋白激酶 C 移位激活、抗凋亡等作用[16~17]。该实验超微电镜显示灯盏花素使缺血中心区心肌细胞超微结构损伤明显减轻,心肌细胞肌原纤维排列较整齐,凋亡心肌细胞减少,流式细胞仪法显示,心肌细胞凋亡指数显著低于 IR 组。不同浓度灯盏花素对心肌细胞超微结构损伤和心肌细胞凋亡均有明显的抑制作用,且有随浓度增高效果越显著,但达到一定浓度后保护作用就不再明显提高。证实灯盏花素对缺血再灌注心肌细胞有保护作用,其机制可能通过抑制心肌细胞凋亡实现的。

[参考文献]

[1] Kovacevic M, Simic O, Jonjic N, *et al*. Apoptosis and cardiopulmonary bypass. J Card Surg, 2007, 22: 129.

[2] Freude B, Masters T N, Robicsek F, *et al*. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(2): 197.

[3] 姜淑芳,巩晓兴,苗中云. 白藜芦醇对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 解放军保健医学杂志, 2007, 9(1): 34.

[4] 赵淑敏,孔祥玉,周健,等. 黄芪预处理对缺血再灌注大鼠心肌超微结构的保护作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(24): 256.

[5] Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, *et al*. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia reperfusion injury. Am J Physiol Heart Cir Physiol, 2004, 286(5): H1923.

[6] Das S, Cordis GA, Maulik N, *et al*. Pharmacological preconditioning with resveratrol: a role of CREB-dependent BCL-2signaling via adenosine A3 receptor activation. Am J Physiol Heart Cirl Physiol, 2005, 288(1) H328.

[7] Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, *et al*. Apoptosis in human acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1997, 95(2): 320.

[8] Lee P, Sata M, Lefer DJ, *et al*. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo[J]. Am J Physiol Heart Cric Physiol, 2003, 284(2): H456.

[9] 贺运河,古继红,陈光贤,等. 益气活血法对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(8): 707.

[10] 张英,黄维义,林燕. 姜黄素抗心肌缺血再灌注损伤作用及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(22): 2736.

[11] Ruixing Y, Al-Ghazali R, Wenwu L, *et al*. Pretreatment with probucol attenuates cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia/reperfusion. Scand J Clin Lab Invest, 2006, 66(7): 549.

[12] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, *et al*. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats[J]. Lab Invest, 1996, 74(1): 86.

[13] Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and p rotection: the relevance to anesthesia p ractice[J]. Anesth Analg, 2005, 101(5): 1275.

[14] 张艳芳,张俊河,杨廷桐,等. 白细胞介素 1 及白细胞介素 8 在心肌缺血再灌注损伤中的动态演变及药物干预效果[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(45): 9 083.

[15] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury[J]. N Engl J Med, 2007, 357(11): 1121.

[16] 张卫东, ThiBang Tam HA, 陈万生,等. 中药灯盏细辛中酚酸类化合物的结构与活性研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(8): 579.

[17] 盛净,赵佩琪,黄震华,等. 灯盏细辛干预血小板、凝血功能对急性冠状动脉血栓形成后溶栓的影响[J]. 中华心血管病杂志, 1999, 27(2): 1152.