

黄芪丹参复方成分对一氧化氮合成阻滞孕鼠胎盘细胞凋亡调控基因(*bcl-2/Bax*)蛋白影响研究

王若光, 尤昭玲, 李春梅, 陈学东, 刘小丽, 贺福元, 李杰
(湖南中医学院中西医结合系, 湖南长沙 410007)

摘要:目的: 研究黄芪丹参复方成分提高胎盘血供的分子机制, 为临床有效防治胎盘血供不足所致妊娠并发症提供思路。方法: 提取分离中药黄芪、丹参复方有效成分, 运用 NOS(一氧化氮合酶) 阻滞剂 L-精氨酸甲酯(L-NAME) 制作一氧化氮合成阻滞大鼠模型, 免疫组化 SABC 法检测胎盘滋养细胞凋亡调控基因(*bcl-2/Bax*) 蛋白表达变化。结果: *bcl-2* 蛋白质表达正常对照组、黄芪丹参复方组明显高于模型组($P < 0.01$), *Bax* 蛋白质表达正常对照组、黄芪丹参复方组、硝酸甘油组均明显低于一氧化氮合成阻滞模型组。结论: 黄芪丹参复方成分可能通过影响凋亡调控基因(*bcl-2/Bax* 蛋白) 表达变化, 阻抑滋养细胞异常凋亡, 防止胎盘浅表着床, 有利于滋养细胞的植入, 从而达到提高胎盘血液供应目的。

关键词: 妊娠; 高血压; 并发症; 凋亡; 滋养细胞; 蛋白质

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)05-0044-03

妊娠高血压综合征(简称妊高征, PIH, 下同) 和胎儿宫内生长迟缓(即胎萎不长, IUGR, 下同) 是导致孕产妇和婴儿病率及死亡率升高的主要原因, 严重影响人口质量。确切病因均尚未明确。本研究通过大鼠胎盘滋养细胞凋亡调控基因(*bcl-2/Bax* 蛋

白) 表达变化, 探讨中药黄芪丹参复方成分对胎盘着床过程滋养细胞浸润活力影响的机制。

1 材料

1.1 动物 中国科学院上海实验动物中心提供清洁级 SD 系大鼠 110 只(实验动物合格证: 中科动管 003 号)。雌雄 2: 1 分笼饲养, 鼠龄 100~ 120d, 体重 200~ 250g。雌鼠按妊娠顺序随机分为模型组、正常对照组、硝酸甘油组、黄芪丹参复方组, 每组 15 只进行实验。

1.2 药物 以益气化淤立法黄芪丹参复方组分(黄芪提取黄芪皂甙、黄酮类; 丹参提取丹参酮、丹参醌、

收稿日期: 2004-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(No: C30000225), 国家中医药管理局基础研究项目(No: 2000-JT-17), 湖南省教委青年项目(No: 01B014)

通讯作者: 王若光, Tel: 0731-5381292, E-mail: dplnw@public.cs.hn.cn

丹参酸,各成分比例 4:1:2:2:1),25%乙醇作溶媒,离心清液 0.25 μ m 微孔滤膜过滤,由湖南中医学院药学院制成注射液,每毫升相当于生药量为 2g,灭菌冷藏备用。硝酸甘油批号 20010924,北京明兴制药出品。

1.3 试剂 L-精氨酸甲酯(L-NAME, L-Ornithine, USA Cayman Chemical 公司产品)。Bcl-2/Bax 免疫组化检测盒 Boster 公司产品(SA1020-小鼠/兔 IgG,适用于一抗为小鼠单克隆和兔多克隆抗体;SA1021-小鼠 IgG,适用于一抗为小鼠 IgG 类单克隆抗体;SA1022-兔 IgG,适用于一抗为兔多克隆抗体;SA1026-小鼠 IgM,适用于一抗为小鼠 IgM 类单克隆抗体)。

2 方法

2.1 动物造模 于妊娠第 10d 起皮下注射 L-NAME,每天 125mg/kg 体重,正常对照组 10 只,于妊娠第 10d 开始皮下注射双蒸水,量同模型组,分别至妊娠第 18d。黄芪丹参复方组、硝酸甘油组造模方法同模型组,并且分别同期腹腔注射黄芪丹参复方组分 1050mg/kg 体重或硝酸甘油 1350 μ g/kg 体重。妊娠第 18d,25%乌拉坦麻醉下,剖腹取胎及胎盘。

2.2 免疫组化及染色 新鲜标本修整 0.2~0.5cm² 放入 4% 多聚甲醛中固定 10min,取出 30% 蔗糖液脱水至沉,取出 OCT(甲基纤维素)包裹,异戊烷液氮法速冻。YO-202 型冰冻切片及一次性切片刀(浙江金华益迪医疗设备厂)分别 5~20 μ 切片;载玻片清洗、硅化、多聚赖氨酸包被;切片纯丙酮固定 15min,0.5% H₂O₂/甲醇溶液浸 30min,灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗 3 次。滴加正常山羊血清封闭液,室温 20min。甩去多余液体,不洗。滴加适当稀释的一抗,37℃ 1h 左右。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG,20~37℃ 20min,0.1M PBS 洗 2min \times 3 次。滴加试剂 SABC,20~37℃ 20min,0.1M PBS 洗 5min \times 4 次。DAB 室温显色,镜下控制反应时间 15min 左右。苏木素轻度复染。脱水,透明,封片。显微镜观察。电镜观察图片统计凋亡细胞数目。统计方法:数据输入 SPSS10.0 方差分析统计。

免疫组化阳性等级按以下方法计算:①阳性细胞数:阳性细胞 $\leq 10\%$ 、 $\leq 30\%$ 、 $\leq 70\%$ 和 $> 70\%$ 分别计 1、2、3 和 4 分;②阳性着色强度:杂交信号强度可分为弱、中、强三级分别计 1、2 和 3 分,上述两种计分相加,1~3 分者为阴性,4~5 分者为阳性,6~7 分者为强阳性。每组选 5 个不同个体标本,每个标本随机取 10 张切片,每个切片 400 倍光镜下观察 3

个视野,共计 30 个视野,积分累计进行统计分析。

3 结果与分析

结果见表 1,图 1~8。

表 1 胎盘滋养细胞 bcl-2、Bax 蛋白表达比较
($\bar{x} \pm s, n = 30$)

分组	bcl-2	Bax
正常对照组	18.27 \pm 3.58 ¹⁾	5.17 \pm 2.44 ¹⁾
模型组	1.57 \pm 0.97	33.0 \pm 5.94
硝酸甘油组	9.27 \pm 2.05 ¹⁾	6.57 \pm 1.28 ¹⁾
黄芪丹参复方治疗组	16.53 \pm 2.14 ¹⁾	4.83 \pm 1.37 ¹⁾

注:与模型组比¹⁾ $p < 0.01$

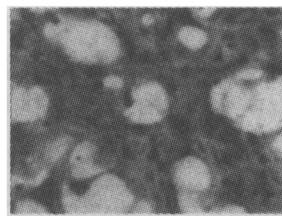


图 1 bcl-2 正常对照组

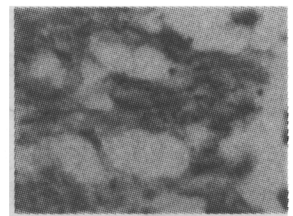


图 2 bcl-2 模型组

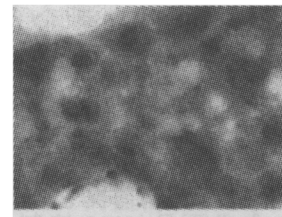


图 3 bcl-2 对照药
硝酸甘油组

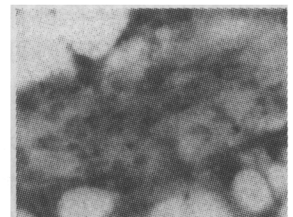


图 4 bcl-2 黄芪
丹参复方治疗组

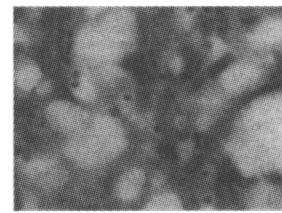


图 5 Bax 正常对照组

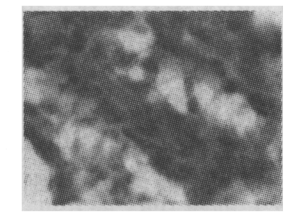


图 6 Bax 模型组

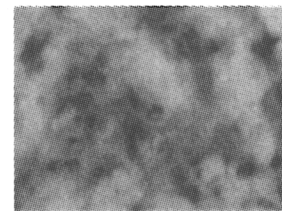


图 7 Bax 对照药
硝酸甘油组

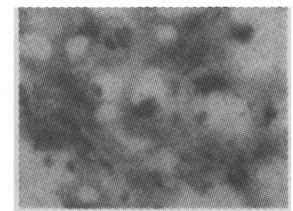


图 8 Bax 黄芪丹参
复方治疗组

bcl-2 作为抑制凋亡基因与 Bax 一起形成的异源二聚体,共同调节细胞的凋亡。上述结果表明:bcl-2 表达黄芪丹参复方组、硝酸甘油组与模型组对比,水

平明显增高, 差异有显著意义($p < 0.01$), 说明模型组胎盘滋养细胞存在异常凋亡趋势和条件。黄芪丹参复方及硝酸甘油对之存在阻抑作用, 可能是通过刺激 bcl-2 表达而实现的。Bax 表达比较硝酸甘油组、黄芪丹参复方组与模型组有显著差异($p < 0.01$)。一氧化氮合成阻滞导致胎盘有效循环下降, 滋养细胞缺血缺氧, 可能诱发 bcl-2/Bax 表达变化, 诱使滋养细胞异常凋亡增加。

4 讨论

胎盘的生长发育是一个动态过程, 为更好地适应胎儿的需要, 胎盘通过蜕膜细胞及滋养细胞的增殖与凋亡不断进行组织结构的改建, 进而实现其功能的完善^[1~3]。bcl-2 基因作为细胞凋亡的潜在抑制基因调节细胞凋亡, Bax 与 bcl-2 蛋白有 45% 同源性, Bax 与 bcl-2 能够形成异源或同源二聚体, bcl-2/Bax 的比例决定了细胞是存活或是凋亡。研究发现^[4~7]先兆子痫和胎儿宫内生长迟缓(IUGR)孕妇胎盘凋亡增加, 前者可能由高表达 Fas 介导; 两者凋亡增加原因与胎盘低灌注和绒毛缺氧有关, 而加入表皮生长因子(EGF)则可对抗缺氧, 减少凋亡。本研究表明, NO 合成阻滞模型胎盘滋养细胞凋亡增加, bcl-2 表达下降, Bax 表达上升, 说明 NO 合成阻滞导致胎盘滋养细胞凋亡增加是通过 bcl-2/Bax 表达比值变化实现的。同时说明 NO 合成不足(NOS 抑制、eNOS mRNA 表达下降)与滋养细胞凋亡增加、血管形成障碍(VEGF mRNA 表达下降)、基质崩解(MMP-9 mRNA 表达上升)、免疫反应增加(MCP-1 mRNA 表达上升, iNOS 表达上升合成 NO 释入组织间隙)等因素之间存在互动关系。

在 PIH 和 IUGR 血管重铸过程中, 滋养叶细胞浸润仅达蜕膜段, 滋养细胞丧失浸润活力, 胎盘浅表着床, 产生滋养叶细胞缺血缺氧。其病理特征为蜕膜基底部及壁层的螺旋小动脉中发生急性粥样硬化, 纤维素样坏死和巨噬细胞、淋巴细胞浸润血管壁。生理情况下, 绒毛细胞滋养层细胞分泌 TNF α , 诱发绒毛轴心的间质细胞分泌粒-巨噬细胞集落刺激因子, 调节滋养层细胞增殖、分化及凋亡。病理状态下, TNF α 过多释放, 引起内皮细胞损伤, 在胎盘局部引起滋养层细胞凋亡增加, 滋养细胞丧失浸润活力, 导致胎盘浅表着床。胎盘滋养细胞凋亡增多, 被认为是引起 IUGR 的一个主要病理过程^[7~11]。动脉粥

样硬化组织中存在 TNF α , 可能通过抑制 eNOS 基因表达, 使 NO 产生减少, 引起与动脉粥样硬化相关的血管舒张减弱。TNF α 诱导细胞凋亡机理与氧自由基有关, TNF α 可促进人绒毛膜滋养层细胞内氧自由基的生成, 细胞内的氧自由基即可直接损伤 DNA, 也可攻击蛋白质, 尤其可使酶活性蛋白质的功能丧失, 从而诱导细胞凋亡^[4,8~11]。胎盘滋养细胞的凋亡过程和变化与 PIH IUGR 时胎盘浅表着床以及与 NO 和 NO 相关因素之间可能存在相互联系。

参考文献:

- [1] 孟会, 王晨虹. 胎盘凋亡的分子机制研究进展[J]. 国外医学妇幼保健分册, 2002, 13(4): 170.
- [2] 邓文慧, 余其霞, 李旭. 妊娠与细胞凋亡[J]. 生殖与避孕, 2001, 21(4): 195.
- [3] 丁峰, 陈士岭, 邢福其. 肿瘤坏死因子与女性生殖器官的细胞凋亡[J]. 国外医学妇产科分册, 1998, 25(4): 224.
- [4] 邢福其, 孔令红, 陈士岭, 等. 肿瘤坏死因子 α 与 γ 干扰素诱导人绒毛膜脚层细胞凋亡的研究[J]. 中华妇产科杂志, 1999, 34(8): 476.
- [5] 姚小鹏, 李强, 刘忠令. 一氧化氮与血管平滑肌细胞的增殖和凋亡[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2002, 22(4): 201.
- [6] 郭玉娜, 张为远. 正常妊娠及妊高征孕胎盘组织中细胞凋亡及增殖基因表达的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2001, 10(4): 267.
- [7] Halperin R, Peller S, Rotschild M, et al. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies [J]. Gynecol Obstet Invest, 2000, 50: 84-87.
- [8] Mari PT, Voravit S, Kathleen H, et al. Apoptosis in human term placenta [J]. Gynecol Obstet Invest, 2000, 50: 88-91.
- [9] Steegers T RP, Smith SC, Steegers EA, et al. Folate affects apoptosis in human trophoblastic cell [J]. Br J Obstet Gynaecol, 2000, 107: 1513-1515.
- [10] Ejima K, Koji T, Tsuruta D, et al. Induction of apoptosis in placentas of pregnant mice exposed to lipopolysaccharides: possible involvement of Fas/fas ligand system [J]. Biology of Reproduction, 2000, 62: 178-185.
- [11] Donghai D, Moulton BC, Ogle TF. Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl-2 family members [J]. Biology of Reproduction, 2000, 63: 188-195.