

醋柳黄酮对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用

刘佳维¹, 关悦², 张秀萍³, 李丽¹

(1. 牡丹江医学院, 黑龙江牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院红旗医院, 黑龙江牡丹江 157011;

3. 黑龙江中医药大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 【目的】观察醋柳黄酮对结扎家兔冠状动脉前降支所致的心肌缺血再灌注家兔心肌组织中 Bcl-2 及 Bax 基因及蛋白表达的影响。【方法】选用 24 只健康新西兰大白兔随机分为假手术组、模型组、醋柳黄酮组 (剂量为 $0.96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。采用结扎家兔冠状动脉前降支方法复制急性心肌缺血模型, Real-time PCR 及 Western blot 方法检测 Bcl-2 及 Bax 基因及蛋白表达变化。【结果】模型组心肌组织 Bcl-2、Bax mRNA, Bax 蛋白表达显著升高 (均 $P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 醋柳黄酮组可显著升高 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达, 降低 Bax mRNA 与蛋白表达, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。【结论】醋柳黄酮对家兔冠脉结扎后引起的心肌缺血损伤的保护作用机制可能与其对凋亡基因的调节密切相关。

关键词: 醋柳黄酮/药理学; 心肌缺血/中药疗法; 细胞凋亡; 基因表达调控; 疾病模型, 动物; 家兔

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213 (2013)-02-0203-04

醋柳黄酮是从醋柳果实中提取的黄酮类化合物。通过降低血压, 舒张血管, 抗缺氧, 降低胆固醇, 阻止动脉、心肌和肝脏的脂质沉着, 干预动脉粥样硬化的发生和发展, 改善微循环等病理机制参与疾病治疗^[1-2]。醋柳黄酮已用于心脑血管疾病的治疗多年, 疗效显著^[3]。细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是由体内因素触发细胞内预存的死亡程序而导致的细胞死亡过程。在心肌缺血/再灌注损伤中, 细胞凋亡对维持组织形态、功能的稳定具有十分重要的意义^[4]。本研究观察了心肌缺血再灌注损伤后心肌组织中凋亡相关基因及蛋白 Bcl-2 及 Bax 的表达变化, 探讨醋柳黄酮对心肌缺血再灌注损伤的作用机制, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 动物 健康新西兰大白兔 24 只, 清洁级, 雌雄兼用, 体质量 $2.0 \sim 2.5 \text{ kg}$, 购自黑龙江中医药大学动物中心, 合格证号: SCXK 黑 2008007 号。

1.2 药品及试剂 醋柳黄酮片 (四川美大康药业股份有限公司, 批号: 08101); 兔抗 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗 Bax 单克隆抗体 (美国 Labvision 公司); 二抗为辣根标记羊抗兔 IgG (美国

Cellsignaling 公司); 细胞及组织总蛋白抽提试剂盒 (中国 Kang Chen 公司, KC-415); BCA (bicinchoninic acid) 蛋白质定量试剂盒 (中国 Kang Chen 公司, KC-430); KCTM 化学发光试剂盒 (中国 KangChen, KC-420); 逆转录试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); Sybgreen 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司); 荧光实时定量 PCR (美国 Applied biosystem 公司)。

1.3 动物分组、给药与模型制备 动物随机分成 3 组: 假手术组、模型组、醋柳黄酮组。后者每天给予醋柳黄酮 0.96 mg/kg , 假手术组及模型组给予等容积生理盐水, 连续灌胃 7 d。按李淑贞等^[5]的方法制备心肌缺血再灌注损伤模型: 末次给药 1 h 后, 外耳缘静脉注射 250 mg/L 乌拉坦麻醉家兔, 仰卧位固定于兔台上, 沿胸部正中线切开皮肤; 钝性分离后紧靠胸骨左缘剪断 2~4 肋软骨, 用小开胸器撑开胸腔切口, 加压止血并打开手术视野, 可见搏动的的心脏, 剪开, 用止血钳将左心耳提起; 用持针器将小弯针在冠状动脉前降支 (LAD) 根部 (离冠状动脉起始处约 $3 \sim 5 \text{ mm}$) 穿 1 条丝线, 深度约 2 mm ; 尽量减少对心肌的创伤, 稳定 15 min , 放置医用硅胶管 (直径 2 mm) 后一起结扎。持续

收稿日期: 2012-09-20

作者简介: 刘佳维 (1985-), 女, 博士研究生

通讯作者: 李丽, 女, 副教授; E-mail: lili-my@126.com

基金项目: 黑龙江省卫生厅科研课题 (编号: 2007013); 牡丹江医学院科研项目 (编号: B200808)

40 min 后放松结扎线, 恢复灌流。假手术组胸部切开, 仅在冠状动脉下方穿线, 而不进行结扎, 其他操作同模型组。

1.4 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达 实验结束后, 取各组家兔缺血再灌注心肌组织, 按细胞及组织总蛋白抽提试剂盒说明书提取缺血再灌注心肌组织蛋白; BCA 蛋白质定量试剂盒进行蛋白定量; 将提取的蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳; 转膜; 脱脂奶粉封闭 1 h; 将封闭过的膜加入一抗 4℃ 过夜, 抗原抗体结合。TBST (含体积分数 0.05% 的 Tween-20 的 Tris-HCV 缓冲液) 洗膜 3 次, 每次 5 min。分别将 Bcl-2 (稀释倍数 1:3 000) 和 Bax (抗体及 β -actin 稀释倍数 1:10 000) 覆于膜上, 4℃ 过夜。加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 抗体及 HRP 标记的抗生物素抗体, 室温孵育膜 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 然后用 TBS (Tris-HCl 缓冲盐溶液) 洗膜, 加入发光液, 在 25℃ 温育 5 min, 按 KC™ 化学发光试剂盒说明书进行 X 光胶片曝光, 等条带清晰后将胶片取出, 采用凝胶成像系统分析各电泳条带。

1.5 Real-time PCR 检测 Bcl-2、Bax mRNA 表达 取各组家兔缺血再灌注心肌组织, 按照 Trizol 试剂盒的说明书提取总 RNA。采用紫外吸收测定法检测 RNA 溶液的 D_{260}/D_{280} 的比值, 各样本比值范围控制在 1.8~2.1 之间。按 Invitrogen 逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 按陆兴热等^[6]方法设计 Bcl-2 及 Bax 引物: Bcl-2 Forward: 5'-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3', Reverse: 5'-ATCCCAGCCTCCGTTATCC-3'; Bax Forward: 5'-GCTGGACATTGGACTTCCTC-3', Reverse: 5'-CAAAGATGGTCACGGTCTGC-3'; β -actin Forward: 5'-TGGCTCTAACAGTCCGCC-3', Reverse: 5'-AGTGGACGTGGACATCCG-3'。将脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) (2.5 mmol/L) 2.5 μ L、10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L、MgCl₂ 溶液 1.5 μ L、Taq 聚合酶 1U、2 \times Sybergreen、Bcl-2、Bax 或 β -actin 上下游引物各 1 μ L 及 cDNA 模板 1 μ L, 加无 RNA 酶水补足 25 μ L, 轻弹管底将溶液混合。按如下反应条件进行 Real-time PCR 反应: 50℃、2 min; 95℃、10 min; 95℃、15 s、60℃、1 min、95℃、15 s (40 个循环); 95℃、15 s; 60℃、1 min。Real-time PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[7] (即表达升高或降低的倍数) 表示。

1.6 统计方法 数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表

示, 采用 SPSS 17.0 统计软件, 组间比较用 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 醋柳黄酮对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 表 1、图 1 结果显示: 与假手术组比较, 模型组 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 醋柳黄酮组 Bcl-2 蛋白表达显著高于模型组 ($P < 0.05$), Bax 蛋白表达显著低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组心肌组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of Bcl-2 and Bax protein expression in the myocardial tissues of different groups p

组别	N	Bcl-2	Bax
假手术组	8	3.12 \pm 0.02	1.32 \pm 0.20
模型组	8	1.78 \pm 0.13 ^①	2.34 \pm 0.16 ^①
醋柳黄酮组	8	2.42 \pm 0.19 ^②	1.99 \pm 0.17 ^②

① $P < 0.01$ 与假手术组比较; ② $P < 0.05$ 与模型组比较

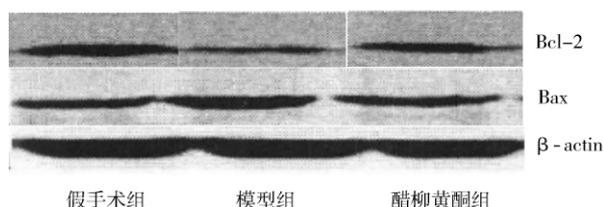


图 1 各组心肌组织中 Bcl-2、Bax 蛋白表达凝胶电泳图

Figure 1 Bcl-2 and Bax protein expression in the myocardial tissues of different groups examined by gel electrophoresis

2.2 醋柳黄酮对缺血再灌注心肌组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响 表 2 结果显示: 与假手术组比较, 模型组 Bcl-2、Bax mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$); 醋柳黄酮组 Bcl-2 mRNA 表达显著高于模型组 ($P < 0.05$), Bax mRNA 表达显著低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组心肌组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of Bcl-2 and Bax mRNA expression in the myocardial tissues of different groups $n_2 - \Delta\Delta CT$

组别	N	Bcl-2	Bax
假手术组	8	1.01 \pm 0.11	1.00 \pm 0.06
模型组	8	2.55 \pm 0.16 ^①	5.02 \pm 0.12 ^②
醋柳黄酮组	8	4.51 \pm 0.19 ^①	2.01 \pm 0.21 ^②

① $P < 0.01$ 与假手术组比较; ② $P < 0.05$ 与模型组比较

3 讨论

临床试验证明醋柳黄酮是治疗缺血性心脏病、心绞痛、慢性心功能不全、高血脂症,预防动脉粥样硬化、心肌梗塞、脑血栓等疾病的纯天然药物^[8]。药理学研究^[9]表明:醋柳黄酮具有多种生物活性和药理活性,如增加心肌营养血流量,降低心肌耗氧量,提高动物耐缺氧能力;抗垂体后叶素所致的急性缺血性心肌损伤,对心肌有明显的保护作用;抑制血小板聚集作用和降低胆固醇作用等,并可明显抑制家兔主动脉 Ca^{2+} 内流依赖性收缩。

细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤的重要病理机制,参与其损伤过程。心肌细胞凋亡的调节基因主要有 C-Myc、p53 及 Bcl-2 家族^[10],凋亡刺激最后会集中作用于促凋亡蛋白 Bcl-2 上^[11]。亦有报道^[11]称:凋亡相关蛋白中的 Bcl-2 家族是细胞凋亡的关键调节因子,其抗凋亡和促凋亡成员协同作用,发挥着细胞凋亡开关的作用。抗凋亡蛋白平时被隔离在线粒体等细胞器内抑制促凋亡因子的释放,具有抑制细胞凋亡的功能,但一旦与激活的促凋亡蛋白发生相互作用后,便丧失了抑制细胞凋亡的作用,导致线粒体等细胞器的功能丧失及细胞器内促凋亡因子的释放,造成细胞凋亡。心肌缺血再灌注损伤时,细胞内 Ca^{2+} 骤然增加,导致细胞内和线粒体的 Ca^{2+} 超载,过多的 Ca^{2+} 使心肌细胞过度挛缩和线粒体膜上通透性转换孔(MPTP)开放,从而导致心肌细胞死亡^[12]。Bcl-2 可通过抑制自由基的产生及细胞内钙超载,降低线粒体膜的通透性,阻止细胞色素 C 从线粒体内释放并抑制线粒体凋亡诱导因子等,发挥着抑制细胞凋亡的作用^[13-14],而 Bax 的作用则与 Bcl-2 相反,发挥促进细胞凋亡作用^[15],可损伤线粒体。Bax 对于细胞色素 C 的释放起着关键的作用,在凋亡信号的刺激下,Bax 可从胞质转移到线粒体膜上,从而启动线粒体介导的细胞凋亡^[16]。Wang 等^[17]也报道 Bcl-2 能保护缺血再灌注造成的损伤,此保护是通过 Bcl-2 抑制细胞色素 C 从内质网中释放而减少缺血和其他形式的细胞损伤而起作用的^[18]。

本研究结果显示:与假手术组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),Bax 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),Bcl-2、Bax mRNA 表达显著升高($P < 0.01$);醋柳黄酮组 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达均显著高于模型组($P < 0.05$),Bax

mRNA 和蛋白表达均显著低于模型组($P < 0.05$),这与 Wang 等^[19]的 Bax 基因及蛋白表达均下调结果一致。心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡是由氧自由基及细胞钙超载的作用诱发的,而 Bcl-2 则通过一种抗氧化剂作用或通过抑制氧自由基的产生和改变细胞内 Ca^{2+} 外流,并调节细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)含量而抑制凋亡;Bax 基因则是通过使 Bcl-2 基因表达下调,升高细胞内 Ca^{2+} 而发生细胞凋亡。因此,本研究结果表明醋柳黄酮可能通过调节 Bcl-2 及 Bax 而对心肌缺血再灌注损伤起到保护作用。

参考文献:

- [1] 乔春萍,朱福,卢振国,等. 醋柳黄酮对高脂血症的疗效观察[J]. 国外医学:心血管疾病分册,2003,30(3):183.
- [2] 廖晓阳,毛正中,王家良,等. 醋柳黄酮治疗原发性高血压的疗效及经济学评价[J]. 中国循证医学杂志,2004,4(10):689.
- [3] 刘慧芳,刘应才. 醋柳黄酮的心血管保护作用[J]. 医学综述,2007,13(7):546.
- [4] 吴锦波,吴平生. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 医学综述,2011,17(19):2961.
- [5] 李淑贞,顾宇,张兰兰,等. 补阳还五汤预处理对 MIRI 家兔心肌酶及氧化指标的影响[J]. 西部医学,2010,22(1):15.
- [6] 陆兴热,代宏剑,高仕萍,等. 三七总苷对人胃癌 BGC-823 细胞 bcl-2 和 bax 表达的影响[J]. 药物分析杂志,2011,31(3):570.
- [7] Xia D Y, Sanders A, Shah M, et al. Real-time polymerase chain reaction analysis reveals an evolution of cytokine mRNA production in allograft acceptor mice[J]. Transplantation, 2001, 72: 907.
- [8] Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases[J]. Am J Clin Nutr, 2002, 76(3):560.
- [9] 王玮,张海峰,蔡源源. 醋柳黄酮的研究进展[J]. 河南大学学报,2008,27(4):17.
- [10] 姚震,焦解歌,冯建章. 心肌缺血再灌注损伤与细胞凋亡关系的实验研究[J]. 海南医学院学报,2000,6(3):129.
- [11] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: critical controll points[J]. Cell, 2004, 116(2):205.
- [12] 吴锦波,吴平生. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 医学综述,2011,17(19):2961.
- [13] Yang E, Korsmeyer S J. Molecular thanatopsis: A discourse on the bcl-2 family and cell death[J]. Blood, 1996, 88(2):386.
- [14] Cook S A, Sugden P H, Clerk A. Regulation of bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiomyocytes: Association with changes in mitochondrial membrane potential[J]. Circ Res, 1999, 85(10):940.
- [15] Yang B, Johnson T, Thomasg, et al. Expression of apoptosis-

- related genes and proteins in experimental chronic renal scarring [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12 (2): 275.
- [16] 丛义梅, 刘鹏, 金大鹏, 等. Bcl-2 家族与细胞凋亡的关系 [J]. *中华医学研究杂志*, 2008, 8 (2): 125.
- [17] Wang C, Neff D A, Krolikowski J G, et al. The influence of B-cell lymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits [J]. *Anesth Analg*, 2006, 102: 1355.
- [18] Kluck R M, Bossy Wetzell E, Green D R, et al. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [J]. *Science*, 1997, 275: 1132.
- [19] Wang N Y, Minatoguchi S W, Chen X H, et al. Antidiabetic drug miglitol inhibits myocardial apoptosis involving decreased hydroxyl radical production and Bax expression in an ischaemia/reperfusion rabbit heart [J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 142: 983.

【责任编辑: 黄玲】

Protective Effect of Sindacon on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rabbits

LIU Jiawei¹, GUAN Yue², ZHANG Xiuping³, LI Li¹

(1. Medical College of Mudanjiang, Mudanjiang 157011 Heilongjiang, China;

2. Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011 Heilongjiang, China;

3. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040 Heilongjiang, China)

Abstract: Objective To study the effect of sindacon on bcl-2 and bax protein and gene expression in myocardial tissues of rabbits with myocardial ischemia and reperfusion induced by ligation of anterior descending coronary artery. **Methods** Twenty-four rabbits were randomly divided into sham operation group, model group and sindacon group (in the dosage of $0.96 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Rabbit model of myocardial ischemia and reperfusion was induced by ligation of anterior descending coronary artery. Western blot and real-time PCR methods were used to detect the expression of bcl-2 and bax. **Results** The expression levels of Bcl-2 and Bax mRNA as well as Bax protein were increased, and Bcl-2 protein was decreased obviously in the myocardial tissues of model group ($P < 0.01$ compared to the sham operation group). Sindacon had an effect on increasing Bcl-2 mRNA and protein expression, and on decreasing Bax mRNA and protein expression in the myocardial tissues of model rabbits ($P < 0.05$ compared to the model group). **Conclusion** Sindacon has protective effect on rabbits with myocardial ischemia and reperfusion injury, and the protective mechanism may be related to the regulation of apoptosis-associated genes.

Key words: Sindacon/pharmacology; Myocardial ischemia/TCD therapy; Apoptosis; Gene expression regulation; Disease models, animal; Rabbits

(Continued from page 202)

experiment one, and RAW264.7 cells in the left 6 groups was pre-cultured with 50 mg/L of OX-LDL for 24h, and then was co-cultured with the corresponding serum for another 24 h. Oil red O staining was applied for detection of lipid phagocytosis by RAW264.7 cells. **Results** Absorbance value was decreased in four RA-RAS serum groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the results of oil red O staining showed that large amount of lipid droplets were found in RAW264.7 cells of RA-RAS serum groups, and a great quantity of foam cells (macrophages having OX-LDL) were broken, especially in the 5:1 RA-RAS (*Danggui Buxue* Decoction) serum group. **Conclusion** The therapeutic mechanism of *Danggui Buxue* Decoction (Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis at the proportion of 5:1) for reducing or eliminating the atherosclerotic plaque is probably related to the inhibition of OX-LDL phagocytosis by murine macrophages (RAW264.7).

Key words: *Danggui Buxue* Decoction/pharmacology; Atherosclerotic plaque/TCD therapy; Macrophages/pathology; Cell culture