

利心冲剂对心力衰竭大鼠模型的氧化应激和凋亡相关基因的影响

高 想 蒋日磊 蒋凤荣 唐艳芬 姜卫东 张锋莉

摘 要 **目的** 探讨利心冲剂调控心力衰竭大鼠模型氧化应激抗细胞凋亡的分子机制。**方法** 实验分组:正常组、模型组、卡托普利治疗组、利心冲剂低剂量组、利心冲剂高剂量组。腹腔注射阿霉素(ADR)5mg/kg,每 5 天 1 次,共 3 次,复制大鼠心力衰竭模型,左心室插管术测定血流动力学指标;血清学检测氧化指标 SOD_1 、MDA;Real time PCR 检测氧化应激及凋亡相关基因 SOD_1 、PGC-1 α 和 Bcl-2、Bax。**结果** 利心冲剂治疗组和模型组比较,形态学显示心肌细胞变性坏死明显减轻;左心室收缩内压显著升高;氧化应激相关指标 SOD_1 、PGC-1 α 升高、MDA 降低;凋亡相关基因 Bcl-2 升高、Bax/Bcl-2 降低;均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** 利心冲剂调控氧化应激相关基因 SOD_1 、PGC-1 α ,降低凋亡相关基因 Bax/Bcl-2 表达,减轻心肌细胞凋亡,改善心脏收缩与舒张功能。

关键词 利心冲剂 心力衰竭大鼠模型 氧化应激 凋亡相关基因

Effect of Lixin Granule on the Related Gene of Apoptosis and Oxidative Stress of Adriamycin-induced Heart Failure in Rats. Gao Xiang, Jiang Rilei, Jiang Fengrong, Tang Yanfeng, Jiang Weidong, Zhang Fengli. Department of Internal Medicine, Nan Tong TCM Hospital, Jiangsu 226001, China

Abstract Objective To observe the protective effect of Lixin granule on the related gene of apoptosis of rats with adriamycin-induced heart failure. **Methods** Sixty adult male Wistar rats were divided into 5 groups: normal control group, adriamycin(ADR) group, low-Lixin granule group, high-Lixin granule group, captopril group. Then ADR of 5mg/kg was given intraperitoneally to copy the model of heart failure, once for 5 days. The biological signal collecting system was used to record and analyze the LVSP of the rats. The pathological changes of the cardiomyocytes were observed. Real time PCR was used to record and analyze the related gene of apoptosis (Bcl-2 mRNA) and oxidative stress (SOD_1 , PGC-1 α) of rats. **Results** As compared with NC group, the LVSP of the ADR group was significantly lower ($P < 0.05$), but LVSP of the high-Lixin granule group was markedly higher than that of the ADR group ($P < 0.01$). The results of HE staining showed that the myocardial tissue in CHF group was injury. **Conclusion** High-Lixin granule treatment can relieve apoptosis of ADR on myocardium and also obviously improve the cardiac contractility of heart failure rats.

Key words Lixin granule; Adriamycin; Heart failure; Oxidative stress; Apoptosis

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是一种复杂的临床症状群,是多种心血管疾病的终末阶段,其发病率和病死率较高。近几年,在中医理论指导下组成的利心冲剂,经对临床多种原因引起心力衰竭的治疗观察,其能减轻症状,提高疗效,改善患者生活质量^[1]。但其作用机制尚不明确。本实验主要通过利心冲剂对心力衰竭模型氧化应激及凋亡相关基因 SOD_1 、PGC-1 α 、Bax/Bcl-2 的影响,探讨其对抗心力衰竭的分子作用机制。

材料与方法

1. 药品与试剂:利心冲剂主要由黄芪、黄精、补骨脂、葶苈子等组成,江苏南通市中医院提供;阿霉素,深圳万乐药业有限公司生产(批号:0505031),卡托普利,中美上海施贵宝制药有限公司生产(批号:0308E2)。抗体由美国 B&R 提供,引物由上海生物工程公司提供, SOD 、MDA 试剂盒由南京建成生物工程有限公司提供。其他化学试剂均为分析醇。

2. 动物分组及造模:取 50 只 Wistar 大鼠适应性喂养 7 天后,随机取 10 只(雌、雄各半)作为正常组,腹腔注射等体积生理盐水,给药容积同阿霉素(ADR)。余 40 只大鼠用 ADR 造模,用药量 4mg/kg,每 5 天注射 1 次,共 3 次。末次 ADR 给药 24h 后,随机选取模型鼠 2 只,断头处死,取出心脏,用预冷 0.9% 生理盐水冲洗,取左心室心肌部分,以 10% 甲醛固定,HE 染色,光镜下观察确认造模成功后,再将所余大鼠随机分为心力衰竭模型对照组、卡托普利治疗组(0.045mg/100g)、利

基金项目:江苏省中医药局中医药科技研究专项基金(HZ07072)

作者单位:226001 江苏省南通市中医院内科(高想、唐艳芬、姜卫东、张锋莉);210046 南京中医药大学病理教研室(蒋日磊、蒋凤荣)

心冲剂低剂量治疗组[20g/(kg·d)]、利心冲剂高剂量治疗组[40g/(kg·d)]。各组均精饲料喂养,自由饮水。

3. 给药方法:卡托普利治疗组、利心冲剂低剂量组、利心冲剂高剂量组造模后次日开始灌胃给药,连续给药21天。

4. 观察项目及检测方法:(1)症状观察:观察大鼠活动度、呼吸程度、毛发光泽、水肿、死亡等,隔日称体重并记录。(2)心功能测定:实验结束后,禁食12h,麻醉后手术游离右侧颈总动脉,经右侧颈总动脉插入心室插管(充满1%肝素),通过压力传感器换能,连接至RM-6000型多导生理记录仪,记录左心室收缩压(LVSP),左心室舒张末期压(LVEDP)。(3)病理学检查:给药结束后,放血处死大鼠,取左心室心肌部分,以10%甲醛固定,常规石蜡包埋,病理切片,HE染色,光镜观察。(4)血清学检测超氧化物歧化酶(SOD₁)、丙二醛(MDA)给药

结束后,取血清,按南京建成SOD、MDA试剂盒说明书操作。(5)Real-time PCR定量检测氧化应激相关基因超氧化物歧化酶(SOD₁)、过氧化物酶体增生生物激活受体协同刺激因子-1α(PGC-1α),凋亡相关基因Bcl-2、Bax的mRNA表达。取新鲜心室组织,总RNA的提取,采用Promega公司试剂盒提取总RNA,紫外线扫描定量。PT-PCR以Oligo(DT)为引物,加入总RNA 1μg,72℃ 10min后,依次加入无RNase水,10×RT buffer, 25mmol/L MgCl₂, 250μmol/L dNTPs, RNasin和AMV反转录酶,反应体系为20μl,42℃保温15min生成cDNA,在8联管中加入SYBR Green7.5μl,引物(Bcl-2、casepase3、SOD₁、SOD₂、PGC-1α)0.6μl,cDNA2.5μl,无RNase水4.4μl在real time PCR仪上扩增。比较Ct法(ΔΔCt法)分析结果。实验所用引物如下(表1)。

表1 实验所用引物

上游引物		下游引物
SOD ₁	5'-CAAGCGGTGAACCAGTTGTG-3'	5'-TGAGGTCCTGCACTGGTAC-3'
PGC-1α	5'-AGCCGTGACCACTGACAACGAG-3'	5'-GCTGCATGCTTCTGACTGCTAAG-3'
Bcl-2	5'-AGCGTCTTCAGAGACTGCCAG-3	5'-CACCCCTGGCATCTTCTCCTT-3
Bax	5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGATGGT-3	5'-CCACCAGCTCTGAACAGTTCATGA-3
β-actin	5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAAC-3	5'-TTCATCTTCATGGTCTAGGA-3

5. 统计方法:SSPS11.0统计软件对所得结果进行处理,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析,计量资料用t检验。

结 果

1. 心肌细胞病理学变化:正常对照组心肌细胞形态正常,胞质纹理清晰;模型组部分心肌细胞水肿,脂

肪变性,部分心肌细胞肌坏死、间质出血;利心冲剂高剂量组心肌细胞排列紧密,胞质纹理清晰,无明显变性坏死。表明利心冲剂治疗后减轻了ADR对心肌细胞的毒性,心肌细胞的变性坏死明显改善,从而使心肌功能改善(图1)。

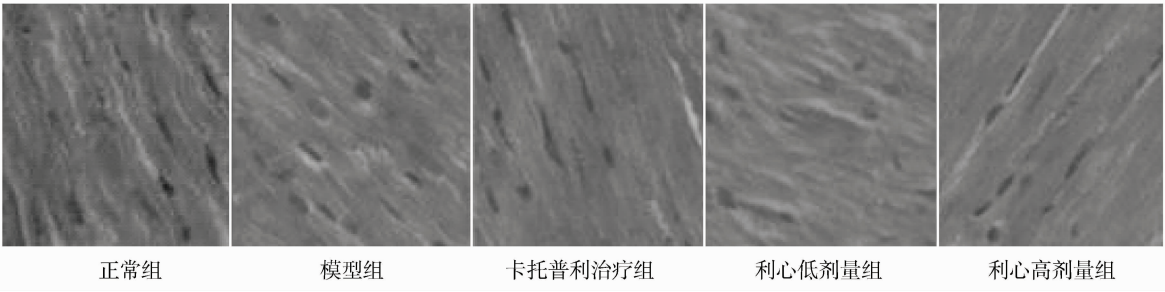


图1 实验各组心肌细胞形态学改变

2. 大鼠心力衰竭各组血流动力学的测定($\bar{x} \pm s$)表2。阿霉素作用后左心室收缩压、左心室舒张末期压发生明显的改变,利心冲剂治疗后改善心脏的动力学,以阳性药物与高剂量最为明显($P < 0.01$)。

3. 大鼠心力衰竭各组氧化应激相关基因SOD₁、PGC-1α的改变,见图2。阿霉素作用后SOD₁与PGC-1α明显降低($P < 0.01$),利心冲剂治疗后SOD₁与PGC-1α明显升高,以高剂量最为明显(P

表2 实验各组血流动力学的测定

组别	动物数 (n)	左心室收缩压 (mmHg)	左心室舒张末期压 (mmHg)
正常组	10	169.33 ± 6.65	4.73 ± 0.35
模型组	10	109.5 ± 5.09 *	19.42 ± 1.41 *
卡托普利治疗组	10	163.17 ± 9.99 **	12 ± 0.91 **
利心冲剂低剂量组	10	148.33 ± 6.02	18.1 ± 0.45
利心冲剂高剂量组	10	153.67 ± 6.56 **	9.17 ± 0.75 **

与正常组相比较,* $P < 0.05$;与模型组相比较,** $P < 0.01$

($P < 0.01$)。利心冲剂能改善心肌细胞的氧化压力,从而减轻细胞的损伤。

4. 大鼠心力衰竭各组血清氧化应激指标 SOD_1 、MDA 的改变,见图 3。阿霉素作用后 SOD_1 明显降低、MDA 明显升高($P < 0.05$),促进 ROS 在心肌细胞中聚积,增加细胞损伤;利心冲剂治疗后 SOD_1 明显升高、MDA 明显降低,以高剂量最为明显($P < 0.05$;

$P < 0.01$),减轻 ROS 对心肌细胞的损伤。

5. 大鼠心衰各组凋亡相关基因 Bcl-2、Bax/Bcl-2 的改变,见图 4。阿霉素作用后 Bcl-2 明显降低($P < 0.01$);Bax/Bcl-2 比值 > 1 ,促进细胞凋亡;利心冲剂治疗后 Bcl-2 明显升高,以高剂量最为明显($P < 0.01$),Bax/Bcl-2 比值 < 1 ,抑制心肌细胞凋亡。

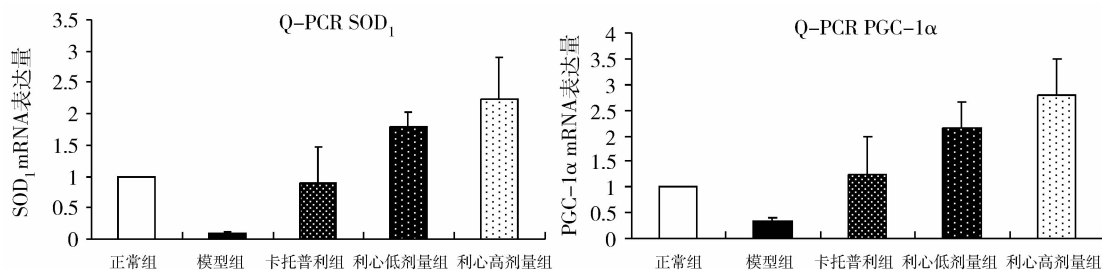


图 2 实验各组氧化应激相关基因 SOD_1 、PGC-1 α mRNA 表达量

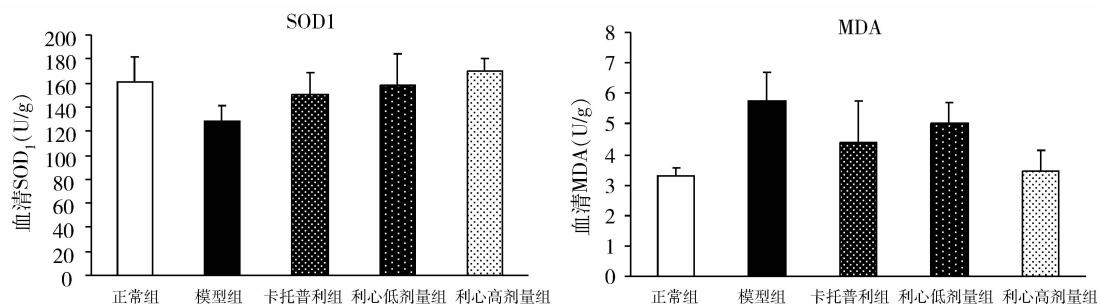


图 3 血清比色法检测 SOD_1 、MDA 的变化量

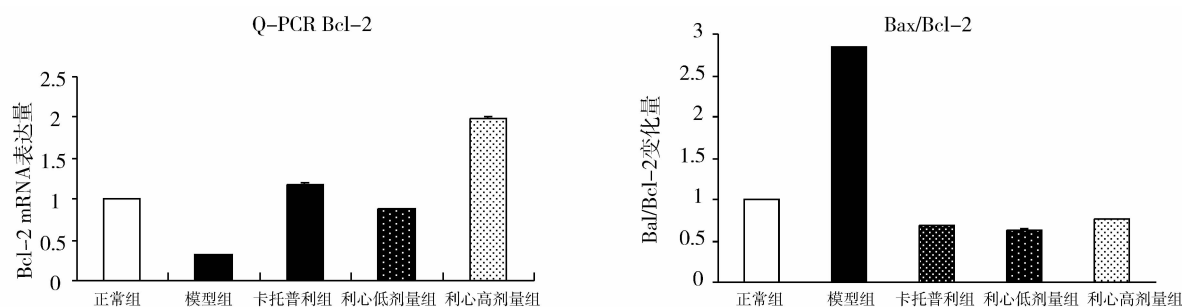


图 4 实验各组凋亡相关基因 Bcl-2、Bax/Bcl-2 mRNA 的变化量

讨 论

中医文献中无心力衰竭之病名,但从其临床表现看,当属“心悸”、“喘证”、“水肿”等病证范畴。多数研究者认为本病属本虚标实之证,本虚为心气虚、心阳虚,标实为血瘀、水阻、痰饮。基于以上认识,以益气补肾利水为法则,组建利心冲剂治疗心力衰竭,取得了满意的疗效,临床血清检测 BNP 明显降低,心功

能得到恢复,为了进一步阐明利心冲剂的分子作用机制打下良好的临床基础。ADR 属葱环类化合物,在体内代谢过程中,主要通过细胞色素 P450 酶及 NADPH 依赖的氧化还原循环反应途径产生 ROS,ROS 首先破坏心肌细胞膜,引起膜流动性和完整性的改变及心脏的脂质过氧化作用,同时损伤线粒体、肌质网、溶酶体等亚细胞器,最终引起细胞死亡,ADR 复制心力

衰竭模型已经得到公认^[2]。实验结果显示, ADR 作用后, 大鼠的毛发、体重均与正常对照组有明显的差异; 3 周后心功能检测、心脏病理学观察发现心肌有变性以及坏死病理改变, 与正常对照差异明显, 为进一步研究药物作用机制提供基础。

凋亡是缺血和非缺血性心脏病心肌细胞死亡的形式之一, 在 CHF 的发生发展中起到重要作用^[3]。Bax 与 Bcl-2 是一对常用的促凋亡和抗凋亡基因, Bax/Bcl-2 代表凋亡程度, 当值在大于 1 时, 促进心肌细胞凋亡。当值在小于 1 时, 抑制心肌细胞凋亡。模型组病理形态学显示, 心肌细胞呈一定量的凋亡, 心脏室壁张力以及心脏指数的改变, 凋亡相关基因 Bcl-2 明显降低, 提示 ADR 能过特定信号通路激活凋亡家族基因诱导凋亡。造模后经利心冲剂治疗后, 以上病理及病理生理学的改变均得到一定的改善, 利心冲剂减少心肌细胞凋亡, 缓解心肌重构, 改善心功能, 降低 Bax/Bcl-2 比值, 从而使得线粒体的通透性降低, Caspase9 释放减少, 抑制线粒体依赖性凋亡信号通路从而对心力衰竭心肌细胞起保护作用。

近年来, 慢性心力衰竭的氧化应激机制和抗氧化剂在慢性心力衰竭病变过程中的防治作用日益引起关注^[4,5]。值得注意的是, 细胞凋亡和氧化压力往往交织在一起, 不可分割。当心肌细胞缺血时, 激活心肌细胞中 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidases, NOX)、黄嘌呤氧化酶等产生 ROS, 此外, 凋亡可以引起免疫

细胞的激活从而产生 ROS。实验结果显示, ADR 增高的 ROS 可促进 Ca^{2+} 内流, 上调 Bax 的表达, 线粒体通透性转变孔的开放, Caspase 家族的激活, 导致细胞凋亡; 利心冲剂能增加心肌细胞以及血清中 SOD_1 的活性, PGC-1 α 的表达, 激活 UCP2 和 UCP3 的表达, 从而消除阳离子梯度、降低线粒体膜电位、减少线粒体 ROS 的生成, 加速 ROS 的清除, 减少心肌细胞的损伤, 改善心脏功能。对于其作用的分子信号通路仍有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 高想, 倪卫兵, 陶志强, 等. 中西医结合治疗慢性心力衰竭 60 例临床观察[J]. 江苏中医药, 2007, 39(6): 32-33
- 2 阳冠明, 孙胜涛, 李树全. β 胡萝卜素对 ADR 致大鼠心肌组织的超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 表达改变的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 465-470
- 3 Schulze PC, Spate U. Insulin-like growth factor and muscle wasting in chronic heart failure[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(10): 2023-2035
- 4 A Moehizuki M, Yano M, Oda T, et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca^{2+} leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(16): 1722-1732
- 5 Pei J J, Khatoon S, An W L, Nordlinger M, et al. Role of protein kinase b in alzheimer's neurofibrillary pathology[J]. Acta Neuropathol, 2003, 105(4): 381-392 (收稿: 2010-01-18) (修回: 2010-04-07)

生物荧光法检测结核分枝杆菌 ATP 含量

张国龙 石瑞如 张霞 王伟 秦殊 彭志刚 付光宇

摘要 目的 建立生物荧光技术检测结核分枝杆菌 ATP 含量的方法并观察几种抗结核药物(异烟肼, 利福平, 乙胺丁醇, 链霉素, 卡那霉素)的作用。**方法** 结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的菌悬液, 经高温裂解, 提取 ATP, 用生物荧光技术检测 ATP 含量。条件稳定后, 观察菌数和 ATP 浓度的关系, 以及加入不同浓度的抗结核药物后 1 周之内 ATP 的动态变化。**结果** 菌液加入裂解液后 100℃煮沸 8min, 迅速降至室温, 加入荧光素酶, 3~5min 时测荧光值。按上述步骤提取和测定时菌数和 ATP 浓度成正比关系。含药液体培养情况: 随药物浓度增加, ATP 量下降, 培养至第 7 天时, 药物的敏感性可以初步进行判断。**结论** 所建立的生物荧光法检测结核分枝杆菌 ATP 含量, 具有简便、快速、敏感、可重复性强等特点, 有望成为结核菌体外药敏试验的一种有用的方法。

基金项目: 河南省医学科技攻关项目(2006149)

作者单位: 450008 郑州, 河南省胸科医院检验科(张国龙、石瑞如、张霞、王伟、秦殊); 上海美全生物科技有限公司(彭志刚); 郑州市安图绿科生物有限公司(付光宇)

通讯作者: 张国龙, 电子信箱: guolongzhang@hotmail.com