

开心胶囊对心肌梗死后心衰大鼠心肌细胞凋亡及 bcl-2、p53 蛋白表达的影响

★ 赵锋利¹ 周迎春² 靳利利³ 王大伟⁴ 罗小星¹ 陈镜合¹ (1. 广州中医药大学第一附属医院 ICU 广州 510405; 2. 南方医科大学南方医院中医内科 广州 510515; 3. 广东省第二中医院心内科 广州 510095; 4. 广东省中医院急诊科 广州 510120)

摘要:目的:观察开心胶囊对冠脉结扎法致心肌梗死后心衰大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法:结扎左冠状动脉主干致大鼠心肌梗死后缺血性心衰动物模型,随后分为假手术对照、心衰空白对照、开心胶囊大剂量、开心胶囊小剂量、开博通等5组,不同实验条件处理8周后,分别测定梗死周围心肌细胞的凋亡指数和 bcl-2、p53 蛋白的表达。结果:心衰空白对照组凋亡指数较假手术对照组增加($P < 0.05$);开心胶囊大剂量组较心衰空白对照组减少($P < 0.05$)。心肌细胞 bcl-2 蛋白表达结果表明,心衰空白对照组表达较假手术组增加($P < 0.001$);开心胶囊大剂量组较心衰空白对照组增多($P < 0.05$)。各组 p53 蛋白表达未能显示阳性结果。结论:开心胶囊对心肌梗死后缺血性心衰大鼠的心肌细胞凋亡有调节作用,可能是其发挥临床疗效的重要作用机制之一。

关键词:开心胶囊;心肌梗死;心力衰竭;细胞凋亡;bcl-2;p53

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

心力衰竭是危害人类健康的一种病理综合征,见于各种心血管疾病。心力衰竭患者一旦出现典型症状,病情将进行性加重,死亡率与恶性肿瘤病人相仿^[1]。开心胶囊是广州中医药大学第一附属医院陈镜合教授研制的中药复方制剂,临床上用于防治心肌梗死后心室重构,治疗心肌梗死后心力衰竭患者,具有一定疗效。为进一步阐明验方开心胶囊的作用机制,我们开展了开心胶囊对心肌梗死心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡调控作用的实验研究。现将实验过程及结果报告如下:

1 材料与方

1.1 药物 (1)开心胶囊由西洋参、麦冬、五味子、黄芪、桂枝、丹参、益母草、山楂、香附等药物组成。经广州中医药大学第一附属医院制剂室用水醇分提法制成胶囊,每粒 0.45 g。使用时将其溶于生理盐水中,混匀后用于动物灌胃。(2)卡托普利:每次饲喂前,将卡托普利在研钵内充分研磨粉碎,再用蒸馏水稀释各饲。

1.2 实验动物 健康 SD 大鼠 140 只,雌雄各半,

体重 250 ~ 300 g,由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.3 动物造模及分组处理 参考文献方法[2],根据作者经验稍加调整,将大鼠腹腔注射 5% 戊巴比妥钠(1 ~ 2 ml/kg)麻醉。胸部去毛,仰卧位固定于解剖台上,75% 酒精消毒手术视野。经喉气管插管,以专用小动物呼吸机行正压人工呼吸(潮气量 3 ml/100g,呼吸频率 70 次/min)。在无菌操作下,于胸骨左侧 2 cm 处于胸骨平行做一 2 cm 纵切口,切开胸大肌,暴露肋骨,剪断第 4、5、6 肋骨,打开胸腔,切开心包,暴露心脏,左手拇指固定心尖,食指向左上提起左心耳,于左冠状动脉起源点下 2 ~ 4 mm 处,用 0 号丝线结扎左冠状动脉主干造成心肌梗死模型。随即逐层缝合胸壁,并留置直径 1 mm 塑料管,用针筒抽出胸腔内空气,撤离小动物呼吸机。假手术对照组手术丝线仅穿过左冠状动脉主干而不结扎冠状动脉外,其余操作均与梗死组动物相同。术后记录标准肢导联及胸前导联心电图,ST 段弓背抬高者为造模成功。术后给与青霉素 4 万 U,肌肉注

射,每日 1 次,共 3 天。造模成功后 3 d 除假手术对照组外,余随机分为心衰空白对照组(不加任何药物处理因素,仅饲以正常饮水与饲料)、开心胶囊高剂量组(以开心胶囊 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃)、开心胶囊低剂量组(以开心胶囊 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃)、卡托普利对照组(通过自由饮水饲以卡托普利 1 g/L ,卡托普利剂量按文献报道,以体表面积公式来折算剂量^[3])4 组。

1.4 测定指标 凋亡细胞原位检测及凋亡指数,凋亡相关基因 p53 蛋白和 bcl-2 蛋白表达阳性率的测定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 for windows 统计软件包进行统计分析。

1.6 标本的制备及测定 分组饲养 8 周后,开始制作标本切片,处死动物,开胸取出心脏,称重。自房室沟切除心房,冰生理盐水洗净血液,10% 中性甲醛将心室固定、脱水、透明、浸蜡包埋后切片。切面平行于乳头肌,各连续切 5 张,片厚 $5 \mu\text{m}$ 。随后进行:

(1)凋亡细胞原位标记检测:各组每一标本取切片一张采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的带荧光的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)^[4]原位标记心肌凋亡细胞核中的 DNA 片断 3'-OH 末端,具体按细胞凋亡试剂盒(宝灵曼生物制品公司)说明要求进行。细胞核中有棕褐色颗粒者为阳性染色细胞。在光学显微镜下,随机取 10 个视野,每视野计数 100 个心肌细胞,记录其中 TUNEL 阳性细胞总数,并以每 100 个细胞中的阳性数为凋亡指数(AI)。

(2)SP 免疫组织化学染色法检测 bcl-2 和 p53 蛋白表达:两者的测定按检测试剂盒(博士德生物制品公司)说明要求的步骤进行,bcl-2 有阳性表达的细胞浆内可呈现棕黄色颗粒,再运用 UIC 计算机图像分析系统定量分析 bcl-2 蛋白的灰度值(Gray scale value)。灰度值是反映符合条件的像素点(pixels)透光密度的定量指标,透光密度(灰度值)越高,表示像素点越少,即 bcl-2 蛋白阳性表达越少;同理,灰度值越低,则表示 bcl-2 蛋白阳性表达越多。p53 蛋白表达阳性表现为细胞核内出现棕黄色颗粒,在光学显微镜下,随机取 10 个视野,每视野计数 100 个内膜细胞,记录其中阳性细胞总数,并以每 100 个细胞中的阳性数为阳性率。

2 实验结果

2.1 各组心肌细胞凋亡原位检测的比较结果 假手术组大鼠心肌细胞核均呈蓝色,显示无细胞凋亡;心衰空白组较多细胞核呈现黄棕色核染,细胞核皱缩不规则,显示较多细胞凋亡,与假手术组比较差异

非常显著($P < 0.001$);开心胶囊大、小剂量及卡托普利组大鼠心肌细胞凋亡指数较梗死组明显减少,差异非常显著性意义($P < 0.01$)。说明开心胶囊可抑制心衰心肌细胞凋亡。见表 1。

表 1 各组大鼠不同处理 8 周后
心肌细胞凋亡程度(AI)的比较表($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	凋亡指数(%)
假手术对照组	6	0**
心衰空白对照组	6	$23.78 \pm 3.99^{\Delta\Delta}$
卡托普利对照组	6	$8.58 \pm 1.20^{*\Delta\Delta}$
开心胶囊大剂量	6	$8.78 \pm 1.00^{*\Delta\Delta\&}$
开心胶囊小剂量	6	$12.62 \pm 2.36^{*\Delta\Delta\#}$

注:与心衰空白对照组比较,** $P < 0.001$,* $P < 0.01$;与假手术对照组比较, $\Delta\Delta P < 0.001$;与卡托普利对照组比较, $\#P < 0.01$, $\&P > 0.05$ 。

2.2 各组 bcl-2 蛋白的表达结果 在心衰空白组的包浆及包膜周围存在 bcl-2 蛋白的表达,假手术组未发现 bcl-2 蛋白的表达;与心衰空白组比较,各治疗组的 bcl-2 蛋白表达量均增加,开心胶囊大剂量组及卡托普利组有显著性差异($P < 0.05$),而开心胶囊小剂量组虽有增加,但无显著性差异($P > 0.05$)。提示开心胶囊有促进 bcl-2 蛋白表达的作用,此作用可能是开心胶囊抑制心肌细胞凋亡的作用机制之一。见表 2。

表 2 各组大鼠不同处理 8 周后
心肌细胞 bcl-2 蛋白表达的比较表($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	阳性表达灰度值
假手术对照组	6	204.37 ± 17.21
心衰空白对照组	6	$124.89 \pm 8.78^{**}$
卡托普利对照组	6	$116.18 \pm 11.67^{**\#}$
开心胶囊大剂量	6	$99.0 \pm 17.31^{**\&}$
开心胶囊小剂量	6	$119.30 \pm 12.69^{**\&\$}$

注:与心衰空白对照组比较, $\#P < 0.05$, $\&P > 0.05$;与假手术对照组比较,** $P < 0.001$;与卡托普利组比较,* $P > 0.05$, $\$P < 0.05$ 。

2.3 各组 p53 蛋白的表达结果 运用免疫组织化学染色方法多次检测心肌细胞 p53 蛋白表达情况,未能发现 p53 蛋白阳性表达结果。可能与本实验所用抗体不特异有关,需待以后进一步深入探讨。

3 讨论

细胞凋亡广泛存在于人体组织细胞,参与许多生理和病理过程,具有重要意义。已有研究提示机体的多种损伤都可诱导心肌细胞的凋亡,在心肌梗死后缺血性损伤导致心室重构并逐步发生心力衰竭的过程中,心肌细胞凋亡起了重要作用。

高位结扎大鼠左冠状动脉主干起点下 $2 \sim 4 \text{ mm}$ 所致心衰模型,有一定的临床发病拟似性,可较好的模拟轻度心肌缺血性心衰。此法造模伴有心脏局部

高效液相色谱-蒸发光散射法测定解热消炎片中猪去氧胆酸的含量

★ 吴雪茹¹ 何芳² 熊颖¹ (1 广州中医药大学附属骨伤科医院 广州 510240; 2 广州固志医药科技有限公司 广州 510663)

摘要:目的:建立用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法测定解热消炎片中猪去氧胆酸的含量测定方法。方法:采用Kromasil 100-5 C₁₈色谱柱,以乙腈-0.1%乙酸溶液(50:50)为流动相,流速为1 ml/min。蒸发光散射检测器参数:漂移管温度为40℃,雾化气体为空气,压力3.0 bar。结果:猪去氧胆酸在1.987~15.890 μg范围内有良好的线性关系, $r=0.999\ 6$;平均回收率为100.37%,RSD为1.10%($n=6$)。结论:HPLC-ELSD法测定猪去氧胆酸的含量适用于解热消炎片生产过程中的质量控制。

关键词:解热消炎片;猪去氧胆酸;高效液相色谱-蒸发光散射法

中图分类号:R284.1 **文献标识码:**A

解热消炎片是由胆酸、猪去氧胆酸、水牛角浓缩粉、黄芩苷、栀子提取物等中药、天然药组成的复方制剂,具清热解毒、镇惊安神之功效,用于外感风热引起的发烧、咽喉肿痛、扁桃腺炎、咽炎等症。原质量标准中无猪去氧胆酸含量测定方法,为更好的控制成品质量,本研究采用高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定制剂中猪去氧胆酸的含量,为解热消炎片的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪;ELSD800

蒸发光散射检测器;Kromasil 100-5 C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);SK-1200H型超声波清洗仪(功率:45 W,频率:59 kHz)。

1.2 药品与试剂 猪去氧胆酸对照品为东京化成工业株式会社提供,纯度为98.1%;解热消炎片样品(广州固志医药科技有限公司,批号:070101)、阴性对照样品(自制);乙腈为色谱纯;水为重蒸水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil 100-5C₁₈(4.6mm

神经内分泌等的持续激活,及心肌肥大,心室重构等过程的不断进展,符合早期轻度心衰由适应至适应不良,由代偿至失代偿的动态演变过程。目前无症状性心衰及轻度心衰的研究多以心肌梗死后患者为研究对象,采用此模型亦有一定拟似性。

实验结果显示,假手术组大鼠心肌组织无细胞凋亡;模型组大鼠心肌组织有较多细胞凋亡,与假手术组比较有显著差异;中药大、小剂量组及卡托普利组心肌组织心肌细胞凋亡较少,与心衰空白对照组比较有显著性差异。说明心衰心肌组织存在细胞凋亡,开心胶囊减少心肌细胞凋亡而防治心脏功能减退可能是其治疗机理之一。开心胶囊还有促进 Bcl-2 蛋白高表达的作用,可抑制心力衰竭大鼠心肌细

胞凋亡,从而减少心肌细胞的缺失,延缓病情的进展,起到治疗作用。

参考文献

- [1] Kalon KL Ho. The epidemiology of heart failure, the Framingham Study[J]. JACC, 1993, 22 (supplement. A): 6.
- [2] 郭麟. 人类疾病的动物模型[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982: 146, 147, 177.
- [3] 林海龙, 雷立权, 卢兴, 等. 长期应用疏甲丙脯酸对心肌梗死大鼠心脏构筑与左室功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1993, 9 (1): 20-23.
- [4] Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme[J]. Am J Pathol, 1995, 147: 251-266.

(收稿日期:2008-06-03)