

原花青素对心肌缺血再灌注模型大鼠心肌细胞凋亡的影响

刘 丹*,刘 义[#](辽宁医学院药理学教研室,辽宁 锦州 121001)

中图分类号 R285.5;R542.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2138-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.10

摘 要 目的:研究原花青素(PC)对心肌缺血再灌注模型大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法:实验分为对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)与PC高、低剂量(100、50 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续2周。末次给药后结扎冠状动脉左前降支(LAD)30 min再灌注120 min,复制大鼠心肌缺血再灌注模型。测定肌酸激酶同工酶(CK-MB)活性;以活性氧(ROS)荧光探针二氢乙啶测定心肌组织中ROS的含量;Western blot法测定缺血心肌p53、半胱氨酸蛋白酶(Caspase)9的蛋白表达;原位末端转移酶标记(TUNEL)法检测心肌细胞的凋亡。结果:与对照组比较,模型组大鼠CK-MB活性显著增强,ROS水平显著升高,p53、Caspase-9蛋白的表达显著增强,心肌细胞凋亡指数显著升高($P<0.01$);与模型组比较,PC高、低剂量组大鼠CK-MB活性显著减弱,ROS水平显著降低,p53、Caspase-9蛋白的表达显著减弱,细胞凋亡指数显著降低($P<0.01$)。结论:PC可以明显减少大鼠心肌缺血再灌注后的细胞凋亡,其作用机制可能与抑制ROS-p53-Caspase-9途径的激活有关。

关键词 缺血再灌注;原花青素;信号转导;细胞凋亡

Effects of Procyanidin on Cardiocyte Apoptosis of Rats after Myocardial Ischemia Reperfusion

LIU Dan, LIU Yi(Dept. of Pharmacology, Liaoning Medical University, Liaoning Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of procyanidin (PC) on cardiocyte apoptosis of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. METHODS: SD rats were randomly assigned into 4 groups: control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and PC high-dose and low-dose groups (100, 50 mg/kg) via i.g. administration, once a day, for consecutive 2 weeks. After last administration, myocardial ischemia-reperfusion model was induced by ligating LADCA for 30 min followed by 120 min of perfusion. The activity of CK-MB was detected after experiment. The content of ROS was determined by ROS fluorescent probe dihydroethidium; the expressions of p53 and Caspase-9 were determined by Western blotting; myocardial apoptosis was measured by the method of TUNEL. RESULTS: Compared with control group, the contents of ROS, the expressions of p53 and Caspase-9 increased significantly in model group, and the cardiocyte apoptosis index increased significantly ($P<0.01$); compared with model group, the content of ROS, the expressions of p53 and Caspase-9 decreased significantly, and the cardiocyte apoptosis index decreased significantly ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Procyanidin can reduce cardiocyte apoptosis after ischemia-reperfusion. This beneficial effect is partially dependant on ROS-p53-Caspase-9 signal transduction pathway.

KEY WORDS Ischemia reperfusion; Procyanidin; Signal transduction; Cardiocyte apoptosis

近年来,随着冠心病治疗技术的发展,溶栓和经皮冠状动脉介入术等措施可使阻塞的冠状动脉实现再通,从而挽救濒临死亡的心肌组织。但人们发现在心肌组织血流恢复后反而出现了组织细胞损伤加重的状态,即再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury),引起心肌功能障碍及心律失常的发生,严重影响患者预后。如何减轻再灌注损伤已经成为目前的研究热点。原花青素(Procyanidin, PC)是葡萄籽提取物中一种有效成分,具有一定的抗炎、抗氧化、抗衰老、改善内皮功能^[1]等多种功效,现在已有多项研究^[2-3]显示PC对心肌缺血再灌注损伤有保护作用。本研究通过复制大鼠心肌缺血再灌注模型,从细胞凋亡方面,观察PC对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护

作用,并探讨其可能机制,以为后期实验提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

DH-150型动物人工呼吸机(浙江医科大学仪器实验厂);电泳槽(美国Bio-Rad公司);DNM-9602G型酶标分析仪(上海京工实业有限公司);7170A型全自动生化分析仪(日本日立公司)。

1.2 药品与试剂

PC(天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,批号:20110739,纯度: $>95\%$);原位末端转移酶标记技术(TUNEL)细胞凋亡原位检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);兔抗大鼠p53多克隆抗体、兔抗大鼠半胱氨酸蛋白酶(Caspase)9多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);活性氧(ROS)荧光探针二氢乙啶(沈阳碧云天生物技术有限公司)。

1.3 动物

* 硕士研究生。研究方向:心血管药理。电话:0416-4197198。E-mail:liudan5900@163.com

[#] 通信作者:教授,硕士研究生导师。研究方向:心血管药理。电话:0416-4197198。E-mail:jyliuyi@163.com

健康成年SD大鼠40只,♂,体质量250~300 g,由辽宁医学院动物实验中心提供[动物使用许可证号:SCXK(辽)2003-0007]。

2 方法

2.1 复制模型^[4]

ip大鼠10%乌拉坦(5 mg/kg)麻醉后手术台固定,取颈正中切口,分离颈总动脉备实验结束时动脉插管取血,气管插管进行机械通气,于胸骨左旁第2~3肋间行纵行切口,分离胸大肌与肋间肌,结扎肋间动静脉,剪断肋骨,破胸膜、心包膜。在左心耳下缘左冠状动脉前降支起始部处用6.0聚丙烯纺织纤维线穿线,留线暂不结扎,待血压、呼吸稳定10~15 min后再收紧结扎线,结扎之前在预结扎的冠状动脉左前降支(LAD)处放置一根长约0.5 cm直径1.5 mm的乳胶管。LAD缺血30 min后再松开活结进行再灌注,再灌注120 min。冠脉LAD结扎成功标志为结扎线远端心肌颜色发绀,心电图表现为S-T段进行性抬高和/或T波高耸和/或QRS高大增宽。再灌注成功标准为剪短结扎线后,心电图ST段回落50%以上或者缺血部位心肌颜色恢复。

2.2 分组与给药

实验分为4组,即对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)与青花素高、低剂量(100、50 mg/kg)组。每天清晨ig给药,给药2周后复制大鼠心肌缺血再灌注模型。

2.3 指标的测定

2.3.1 肌酸激酶同工酶(CK-MB) 再灌注结束后120 min,颈动脉插管采血1.0 ml,3 000 r/min离心10 min,取血清置于一80℃贮藏,备用。应用全自动生化分析仪测定CK-MB活性。

2.3.2 心肌组织中ROS的测定 取左心室心肌组织0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm,放入液氮中速冻后于一80℃贮藏,备用。恒冷切片预冷,从-80℃冰箱中取出组织,放置于滴有OCT包埋剂的组织支架上,温度平衡后切片,厚度10 μm,将切片贴于预先处理好的载玻片上。用PBS(pH7.4)将ROS荧光探针DHE稀释至10 μmol/L,取稀释后的检测液滴于组织上,37℃潮湿环境中避光孵育30 min。孵育结束后,用PBS清洗。荧光显微镜下选择N21滤色镜观察和拍摄细胞红色发射图像,ROS阳性细胞在整个核区被染成红色。用图像分析软件Image-Pro Plus 6.0计算平均吸光度(A)值。

2.3.3 Western blot法测定p53、Caspase-9蛋白的表达 取大鼠心肌进行蛋白制样。取-80℃低温保存的心肌组织约100 mg,加入1 ml细胞裂解液,匀浆破碎,4℃下15 000 r/min离心30 min取上清,BCA法测定蛋白质含量,制成含蛋白量相等的样品。行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。然后将蛋白电转到硝酸纤维素膜上,用含5%脱脂奶粉的TBS中封闭,加入一抗,4℃封闭过夜;第2天,TBS洗膜3次,加入辣根过氧化物酶偶联的二抗室温摇床孵育1 h;按Western blot发光试剂盒说明书显影,用图像分析软件Image J计算各蛋白的相对光密度值,以β-actin为内参。

2.3.4 TUNEL细胞凋亡原位检测方法检测细胞凋亡率 麻醉经颈动脉取血后,取出心脏,将缺血区心肌组织(左心室前壁中间段)剪下,10%中性甲醛固定24 h,常规石蜡包埋,采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法,按照试剂盒说明进行心肌组织切片细胞凋亡的原位检测。光镜下正常心肌细胞核呈蓝绿色,凋亡细胞核呈深浅不一的棕褐色。每

张切片于凋亡细胞分布区域各取5个高倍视野,计算出平均100个细胞中的凋亡细胞数,并以百分数(%)表示凋亡指数(AI)。

2.4 统计学方法

用SPSS16.0统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较应用SNK法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PC对模型大鼠血清CK-MB活性的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清CK-MB活性显著增强($P < 0.01$);与模型组比较,PC高、低剂量组大鼠血清CK-MB活性显著减弱($P < 0.01$)。PC对模型大鼠血清CK-MB活性的影响见表1。

表1 PC对模型大鼠ROS、p53、Caspase-9、CK-MB水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 1 Effects of procyanidin on ROS, p53, Caspase-9 and CK-MB in model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	CK-MB, U/L	ROS	p53, %	Caspase-9, %
对照组	983.47 ± 185.86	4.58 ± 0.67	29.23 ± 2.39	22.93 ± 2.11
模型组	5 044.72 ± 317.53*	22.63 ± 1.60*	65.83 ± 2.99*	57.46 ± 3.97*
PC低剂量组	3 885.34 ± 213.66*	16.84 ± 1.37*	43.48 ± 2.64*	40.86 ± 2.65*
PC高剂量组	2 907.69 ± 260.59*	12.42 ± 0.95*	37.76 ± 1.67*	33.12 ± 2.52*

与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$

vs. control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.01$

3.2 PC对模型大鼠心肌组织ROS水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织ROS水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,PC高、低剂量组大鼠心肌组织ROS水平显著降低($P < 0.01$)。PC对模型大鼠心肌组织ROS水平的影响见表1。

3.3 PC对模型大鼠心肌组织p53、Caspase-9蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织p53、Caspase-9蛋白表达显著增强($P < 0.01$);与模型组比较,PC高、低剂量组大鼠心肌组织p53、Caspase-9蛋白表达显著减弱($P < 0.01$)。PC对模型大鼠心肌组织p53、Caspase-9蛋白表达的影响见表1、图1。

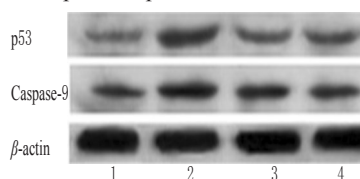


图1 p53、Caspase-9蛋白的表达

1. 对照组; 2. 模型组; 3. PC低剂量组; 4. PC高剂量组

Fig 1 The expression of p53 and Caspase-9

1. control group; 2. model group; 3. PC low-dose group; 4. PC high-dose group

3.4 PC对模型大鼠心肌细胞凋亡的影响

与对照组比较,模型组大鼠心肌细胞AI显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,PC高、低剂量组大鼠心肌细胞AI显著减少($P < 0.01$)。PC对模型大鼠心肌细胞凋亡的影响见表2、图2。

4 讨论

心肌缺血再灌注损伤的发生与多种因素有关,而细胞凋亡、氧化应激和钙超载为最主要因素^[4]。细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是心肌缺血时心肌损伤的主要形式,细胞的坏死随后发生,心肌细胞的凋亡在一定程度上决定了心肌损伤的程

表2 PC对模型大鼠心肌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Tab 2 Effects of PC on cardiocyte apoptosis, in model rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	<i>n</i>	AI, %
对照组	10	4.31±0.74
模型组	10	21.35±3.10*
PC低剂量组	10	13.45±2.14*
PC高剂量组	10	9.43±1.73*

与对照组比较: * $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.01$

vs. control group: * $P<0.01$; vs model group: * $P<0.01$

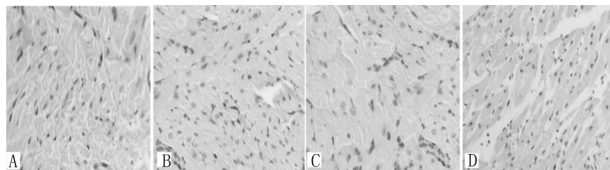


图2 PC对模型大鼠心肌细胞凋亡的影响

A.对照组; B.模型组; C.PC低剂量组; D.PC高剂量组

Fig 2 Effects of PC on cardiocyte apoptosis in rats

A. control group; B. model group; C. PC low-dose group; D. PC high-dose group

度。氧化应激与细胞凋亡联系密切,它可以在心肌缺血再灌注的数十秒内产生大量的ROS,这是造成再灌注损伤的直接原因。已有研究^[5]表明,通过下调ROS的量可以减少细胞凋亡,减轻心肌再灌注损伤。ROS通过激活多种信号因子引起细胞凋亡,加重心肌损伤^[6]。

姜丁文等^[7]在对高糖环境下的心肌细胞凋亡机制进行了研究,发现ROS可以通过激活下游的p53、Caspase-9来促进细胞凋亡。另外有研究^[8]表明,在神经退行性疾病中,ROS-p53-Caspase-9途径也在细胞凋亡中发挥了重要作用。p53是一种重要的抗癌基因,与细胞凋亡关系密切^[9],ROS的移除可以使p53的表达降低,而p53可以反馈调节ROS的量^[10]。研究表明^[11],p53基因是心肌细胞凋亡的激活因子,应用抑制剂抑制p53基因的表达,可以减轻细胞的凋亡。p53可以从胞浆转移到线粒体表面,从而激活内源性线粒体损伤途径^[12]。内源性线粒体损伤途径是心肌缺血再灌注时的主要途径之一,许多凋亡刺激包括p53、Bax等可以诱导线粒体释放细胞色素C,释放到细胞质中的细胞色素C与凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)以及Procaspase-9结合形成凋亡小体,进一步将Procaspase-9激活成Caspase-9,活化的Caspase-9再以级联放大的形式激活下游的Caspase-3、6、7等,启动线粒体凋亡通路,促进细胞凋亡^[13-14]。

本研究结果表明,与模型组比较,PC高、低剂量组大鼠心肌细胞AI明显下降,CK-MB活性也明显减弱,提示PC可以抑制大鼠缺血再灌注损伤所致的细胞凋亡而发挥保护作用,并且具有一定的剂量依赖性。

而PC是通过什么机制减轻细胞凋亡的呢?本研究对ROS-p53-Caspase-9途径的蛋白表达进行了测定,发现与模型组比较,PC高、低剂量组大鼠心肌组织ROS水平与p53、Caspase-9的表达明显下降,且PC高剂量组比PC低剂量组降低更明显,提示PC可能通过抑制ROS的产生来抑制p53、Caspase-9的表达,从而抑制内源性线粒体损伤途径的激活,减少心肌再灌注时的细胞凋亡,减轻再灌注损伤。

综上所述,PC可以明显减少缺血再灌注后的心肌细胞凋

亡,减轻再灌注损伤,可能与其抑制ROS-p53-Caspase-9信号通路有关。本研究为PC能够减轻再灌注损伤提供了一定的实验依据,但应用于临床,仍需大量临床试验。

参考文献

- [1] 于晗,刘义. PC对心肌缺血再灌注损伤大鼠血管内皮细胞活性因子的研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2011, 11(2): 94.
- [2] 王红珊,曹毅敏,杨晋,等. 葡萄籽PC对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(2): 161.
- [3] 张国霞,武艳,韩冬梅. PC对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3): 170.
- [4] Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 100(2): 179.
- [5] Zhang L, Jiang H, Gao X, *et al*. Heat shock transcription factor-1 inhibits H₂O₂-induced apoptosis via down-regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 347(1/2): 21.
- [6] Wang X, Cui L, Joseph J, *et al*. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(3): 753.
- [7] 姜丁文,刘畅,王筠,等. 活性氧激活线粒体凋亡通路介导高糖诱导心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国医学工程, 2011, 19(1): 21.
- [8] Shibata N, Kobayashi M. The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Brain Nerve*, 2008, 60(2): 157.
- [9] Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, *et al*. The p53 family and programmed cell death[J]. *Oncogene*, 2008, 27(50): 6 507.
- [10] Liu H, Pedram A, Kim JK. Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 α -mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 β [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(1): 119.
- [11] Liu P, Xu B, Cavalieri TA, *et al*. Pifithrin- α attenuates p53-mediated apoptosis and improves cardiac function in response to myocardial ischemia/reperfusion in aged rats[J]. *Shock*, 2006, 26(6): 608.
- [12] Endo H, Saito A, Chan PH. Mitochondrial translocation of p53 underlies the selective death of hippocampal CA1 neurons after global cerebral ischaemia[J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(6): 1 283.
- [13] 张义军,马文明,王政平. PC对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后海马线粒体CytC的释放和Caspase-9的影响研究[J]. 中国药房, 2008, 19(22): 1 702.
- [14] Arnold S, Lee I, Hüttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1 655(1): 400.

(收稿日期:2012-09-18 修回日期:2013-04-10)