

玉郎伞黄酮对心肌缺血再灌注损伤心肌组织 ATP 酶和
凋亡蛋白的影响

吕纪华, 贺敏, 黄建春, 林兴, 黄仁彬*
(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 研究玉郎伞黄酮(FYLS) 对大鼠离体心肌缺血再灌注损伤(I/R) 心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶和凋亡蛋白的影响。方法: 离体大鼠心脏采用 Langendorff 法灌流, 停灌 30 min 再灌 30 min 造成 I/R 模型。测定心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性。同时观察药物对缺血再灌注后心肌组织病理形态、凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 表达的影响。结果: FYLS 高剂量($8 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 可显著改善缺血-再灌注所致的心功能损伤, 增加 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性; 与模型组比较, FYLS 高剂量组病理结果显示心肌组织受损程度明显减轻($P < 0.05$), 且明显降低心肌 Bax 蛋白表达($P < 0.01$), 对 Bcl-2 蛋白表达无明显影响, 但能显著增加 Bcl-2/Bax 的比率($P < 0.05$)。结论: FYLS 对 I/R 具有保护作用, 其机制可能与减轻钙超载、下调 Bax 蛋白表达、增加 Bcl-2/Bax 的比率有关。

[关键词] 玉郎伞; 心肌缺血再灌注损伤; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶; $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 13-0162-05

Effect of Flavonoid of Yulangsan on ATPase and Apoptosis-correlated Protein of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

LV Ji-hua, HE Min, HUANG Jian-chun, LIN Xin, HUANG Ren-bin*
(School of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of flavonoid of Yulangsan (FYLS) on the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ and the apoptosis-correlated proteins of myocardial ischemia-reperfusion injury (I/R) in isolated rat hearts. **Method:** Langendorff-perfusion Isolated rat hearts were prepared. I/R was induced by 30 minutes global ischemia followed by 30 minutes reperfusion. The activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ in myocardial tissues were determined. The pathological changes of myocardium and the expressions of apoptosis-correlated protein Bcl-2 and Bax were analyzed. **Result:** High dose of FYLS($8 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) could increase the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$. Histopathological examination confirmed that the degree of myocardial injury in high dose of FYLS group was obviously lessened when compared with I/R group ($P < 0.05$) . FYLS could downregulate the expression of Bax ($P < 0.01$) and significantly increase the ratio of Bcl-2/Bax ($P < 0.05$) . **Conclusion:** FYLS may offer myocardial protective effect against I/R, which may be related to its effects of reducing calcium overload, downregulating the expression of Bax protein, and increasing the Bcl-2/Bax ratio.

[Key words] flavonoid of Yulangsan; myocardial ischemia-reperfusion injury; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$

[收稿日期] 2010-01-21
[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0630002-2 A)
[第一作者] 吕纪华, 硕士, 主要从事心血管药理学研究, E-mail: ljhhappy@ yahoo. com. cn
[通讯作者] * 黄仁彬, 教授, 博士生导师, 主要从事心血管药理学与生化药理学研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: huangrenbin518@ 163. com

玉郎伞(YLS), 又称龙眼参, 原植物经考证为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* Kurz var-*laxior* (Dunn) Z. Wei 的块根。本课题组先前的研究发现, 玉郎伞黄酮(FYLS) 预处理能明显降低血浆中 AST, LDH, LDH1, MDA 含量, 能提高 SOD 活性, 降低心肌梗死范围^[1]; 进一步研究尚发现 2 种 FYLS 单体对体外培养大鼠乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤具有保护作用, 其机制可能与清除自由基、抑制心肌细胞 Ca^{2+} 超载有关^[2]。本试验应用离体心脏缺血再灌注模型, 研究 FYLS 对心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶和凋亡蛋白的影响, 进一步探讨其对 I/R 的保护作用及机制。

1 材料

1.1 药品及试剂 玉郎伞黄酮(FYLS), 以微波提取法^[3], 分离得到总黄酮; 盐酸维拉帕米注射液, 上海禾丰制药有限公司, 批号 5E12002。上述药品均在试验时用 K-H 液配成所需浓度, 黄酮先溶于无水乙醇中, 然后用营养液稀释成所需浓度, 乙醇在溶液中的终浓度不超过 0.1%。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶试剂盒及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶试剂盒, 批号 040312、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 批号 031210, 均由南京建成生物工程研究所提供。抗 Bcl-2 多克隆抗体(DC21, 兔抗鼠, 美国 Santa Cruz Biotechnology), 批号 040706; 抗 Bax 多克隆抗体(P-19, 兔抗鼠, 美国 Santa Cruz Biotechnology), 即用型二步法(非生物素) PV6001 兔二步法检测试剂盒, 批号 030923; DAB 显色试剂盒, 批号 040927, 均由北京中山公司提供; 其余试剂均为分析纯。K-H 液配方($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 6.92, KCl 0.35, CaCl_2 0.28, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29, KH_2PO_4 0.16, NaHCO_3 2.1, 葡萄糖 2.0, pH 7.4。

1.2 动物 Wistar 大鼠, SPF 级, 雌雄兼用, 体重 (250 ± 10) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 生产许可证 SCXK(桂) 2003-0003, 动物使用许可证 SYXK(桂) 2003-0005。

1.3 仪器 MPA 离体心脏灌流实验系统、ALC-B5 恒流泵; MPA 心功能分析系统均为上海奥尔科特生物科技有限公司; PTPS-2011 彩色病理图文分析系统重庆天海医疗设备有限公司。

2 方法

2.1 离体大鼠心肌缺血-再灌注损伤模型制备 将大鼠击枕致昏, 打开胸腔, 迅速取出心脏置于预冷 (4°C) 的缓冲液中, 轻轻挤压心脏, 排空心脏内残留

血液, 迅速将心脏固定于 MPA 离体心脏灌流实验系统中。心脏用饱含 95% O_2 和 5% CO_2 的 K-H 缓冲液 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$, pH 7.4 恒压逆行灌流(压力为 80 cm 水柱压)。心脏在平稳 30 min 后停灌 30 min, 再灌注 30 min 造成缺血-再灌注损伤模型。

2.2 分组给药 正常对照组(NC) 持续灌流 90 min; 缺血-再灌注(I/R) 组; FYLS 低剂量组(FYLS_L), 含黄酮 $2 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; FYLS 高剂量组(FYLS_H), 含黄酮 $8 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 溶媒组(DFYLS); 阳性对照维拉帕米组(Ver), 含 Ver $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各给药组在停灌前 10 min 分别加入不同浓度的含药灌注液, 并持续整个再灌注过程; 除 NC 组外, 所有离体心脏均停灌 30 min, 再灌注 30 min。

2.3 FYLS 对缺血再灌注后各种生化指标的影响 灌流结束后, 取各组大鼠心尖组织约 100 mg, 冰浴下制备成 10% 匀浆, 离心后取上清液, 按照试剂盒方法测定 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性。

2.4 组织病理学观察 缺血再灌注结束后, 从左心室取部分心肌组织, 4% 多聚甲醛固定, 制成石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察, 病理损伤程度参照 Rona 等的分级标准分级。

2.5 心肌组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白测定 再灌注完毕, 切取左心室心肌, 4% 多聚甲醛固定, 心肌组织石蜡切片, 免疫组化法测定 Bcl-2 和 Bax, 方法参照二步法试剂盒说明书。光镜下观察, Bcl-2 和 Bax 蛋白阳性表达细胞的胞质呈棕黄色或棕褐色, 细胞核蓝染不表达。计数方法: 采用半定量计数法, 每张玻片分别随机选择 10 个区域, 每个区域观察 100 个细胞, 共 1 000 个细胞统计其阳性表达的细胞率。

2.6 统计学分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较采用方差分析, 计数资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 FYLS 对心肌 ATP 酶活性的影响 图 1~2 显示: I/R 时, 心肌组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性均明显降低。FYLS_H 组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性均较 I/R 组显著提高 ($P < 0.05$)。FYLS_L 组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性与 I/R 组无显著性差别。

3.2 FYLS 对心肌组织病理改变的影响 光镜下观

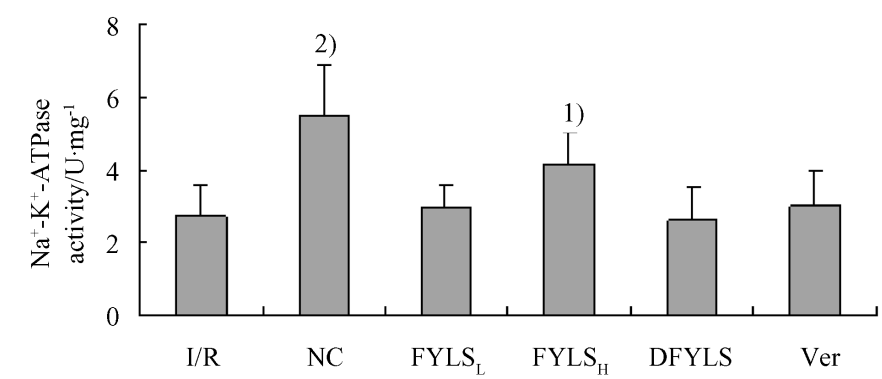


图 1 FYLS 对心肌 $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 酶活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
与 I/R 模型组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ (图 2, 表 1 ~2 同)

察, 正常对照组肌纤维排列整齐、横纹清晰、胞核明显, 无细胞肿胀。I/R, FYLS 组心肌组织坏死, 核碎裂、消失, 心肌细胞肿胀明显, 肌纤维断裂, 间质水

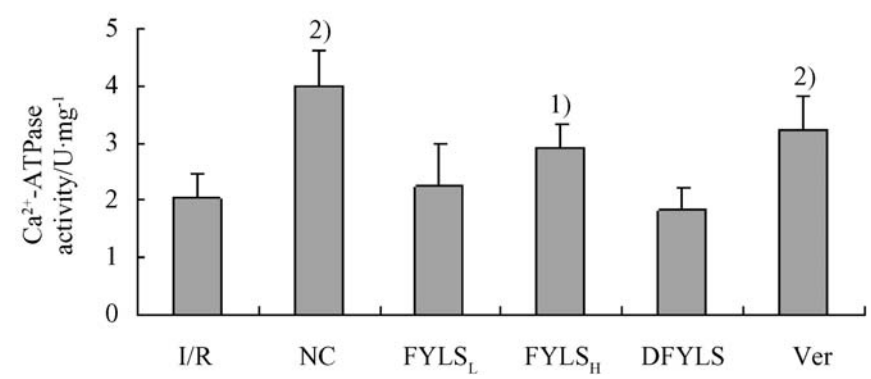


图 2 FYLS 对心肌 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 酶活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

肿, 有少量中性粒细胞浸润。FYLS_H 组心肌细胞肿胀明显减轻, 少许炎细胞浸润。FYLS_L 组心肌细胞肿胀略减轻, 核碎裂, 炎细胞浸润。见图 3 及表 1。

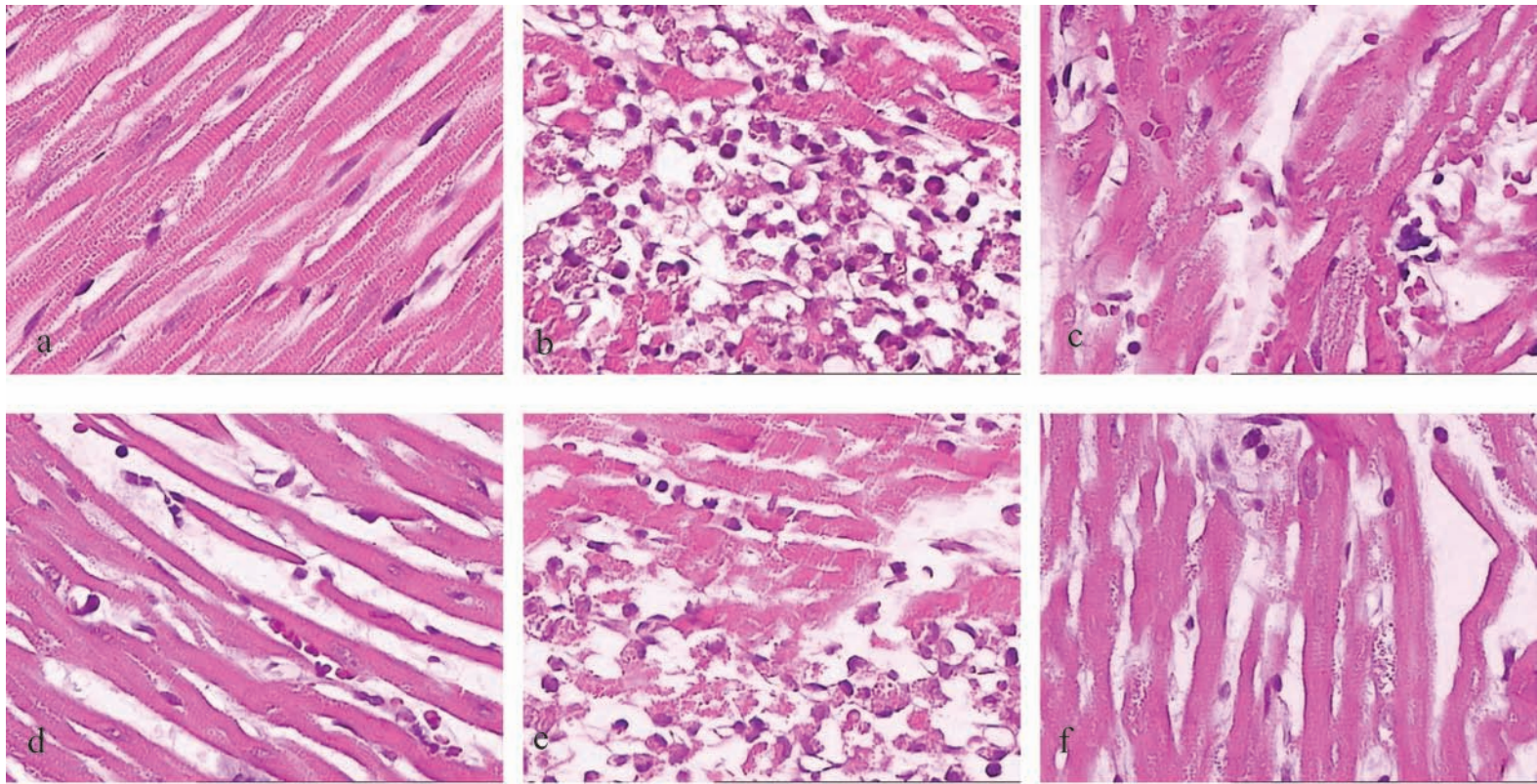


图 3 FYLS 对 I/R 心肌组织病理学的影响(HE, $\times 400$)
a. NC 组 b. I/R 模型组 c. FYLS_L 组 d. FYLS_H 组 e. DFYLS 组 f. Ver 组(图 4 ~5 同)

表 1 FYLS 对 I/R 心肌组织病理学的影响(病理损伤等级) ($n=8$)				
组别	0 / n	I / n	II / n	III / n
NC	8	0	0	0
I/R	0	1	5	2
FYLS _L	0	2	6	0
FYLS _H ¹⁾	0	4	4	0
DFYLS	0	1	6	1
Ver ²⁾	0	6	2	0

3.3 FYLS 对凋亡相关蛋白表达的影响 NC 组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达极低。I/R 组 Bax 蛋白表达增高, Bcl-2 蛋白表达有所增加, 但 Bcl-2/Bax 明显降低。与之相比, FYLS_H 明显降低 Bax 蛋白表达($P<0.01$), 对 Bcl-2 无显著性影响, 但可明显升高 Bcl-2/Bax($P<0.05$)。如图 4 ~5 及表 2 所示。

表 2 FYLS 对 Bcl-2, Bax 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)			
组别	Bcl-2 / %	Bax / %	Bcl-2 / Bax
NC	$7.44 \pm 3.01^{1)}$	$6.26 \pm 2.17^{2)}$	$1.19 \pm 0.29^{2)}$
I/R	22.59 ± 7.97	61.09 ± 13.93	0.37 ± 0.10
FYLS _L	25.23 ± 10.99	53.11 ± 13.48	0.50 ± 0.26
FYLS _H	28.11 ± 8.95	$22.10 \pm 9.72^{2)}$	$1.40 \pm 0.48^{1)}$
DFYLS	24.49 ± 10.40	58.19 ± 18.00	0.47 ± 0.25
Ver	$38.46 \pm 12.52^{1)}$	$26.29 \pm 16.67^{1)}$	$1.75 \pm 0.67^{1)}$

4 讨论
I/R 是缺血性心脏病以及心脏体外循环术后重要的病理生理过程, 是造成临床溶栓治疗、心脏移植、冠状动脉搭桥术失败的重要原因, I/R 可表现为心肌顿抑、细胞坏死等。
在细胞逆浓度梯度运输物质的功能中, 细胞膜

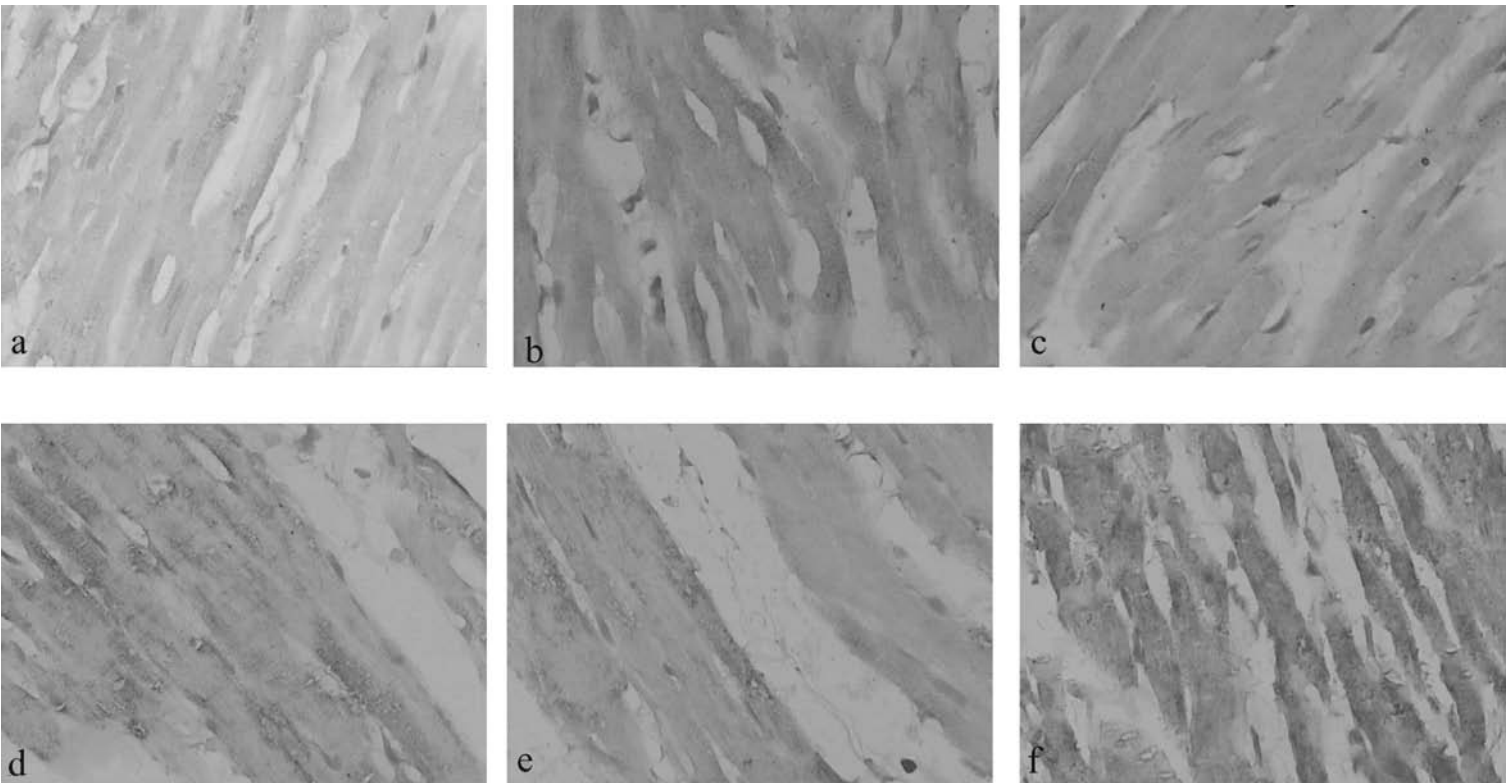


图 4 FYLS 对 I/R 心肌组织 Bcl-2 表达的影响(免疫组织化学染色, ×400)

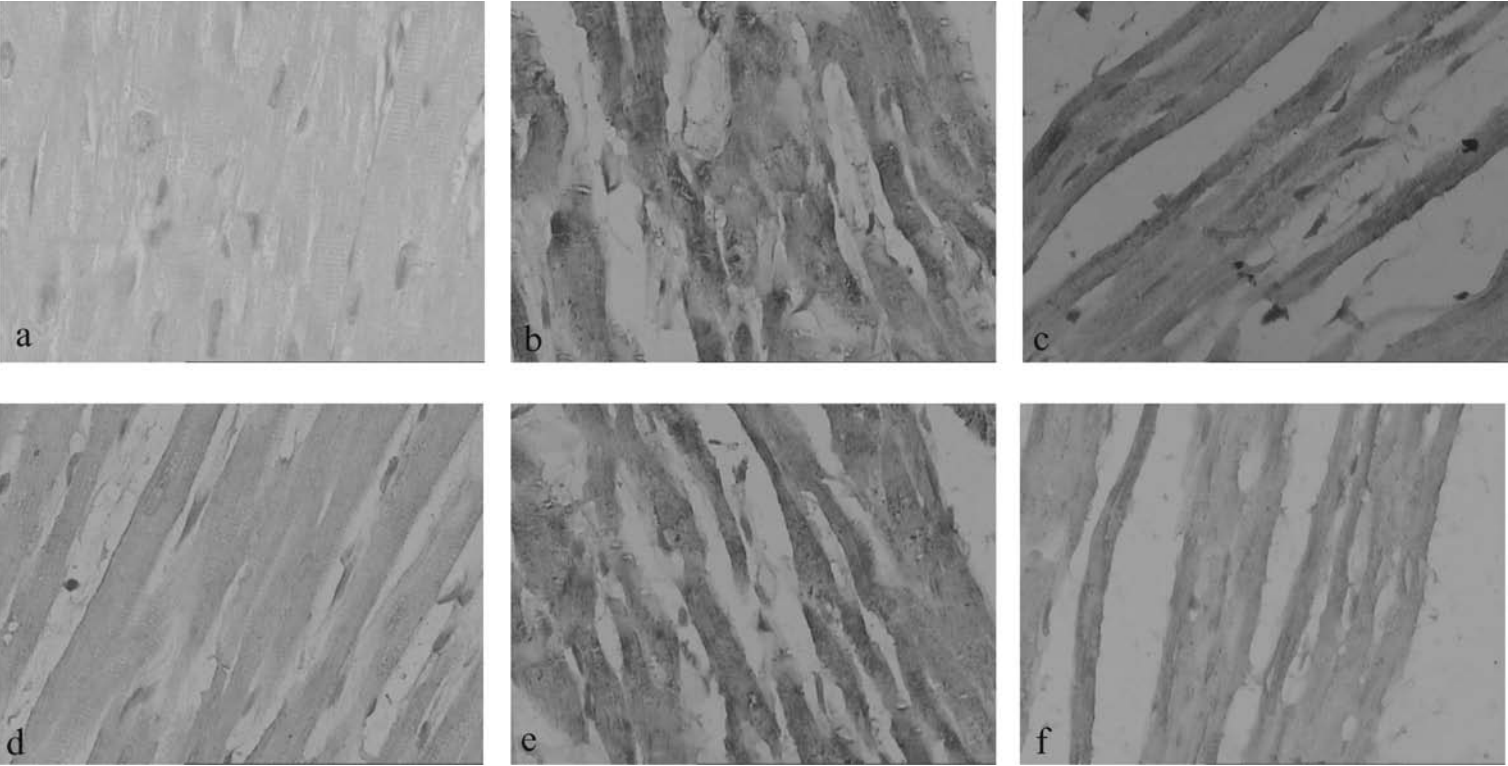


图 5 FYLS 对 I/R 心肌组织 Bax 表达的影响(免疫组织化学染色, ×400)

能利用代谢驱动物质进行逆浓度梯度的主动运输。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶通过水解 ATP 逆电化学梯度进行离子转运,是维持细胞功能正常和离子内环境稳定的物质基础。I/R 时产生大量的氧自由基,心肌细胞膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶受自由基氧化作用影响而活性下降。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性降低可导致细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 的聚积, K^+ 的流失,离子内环境紊乱,加速细胞的损伤。提高 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性可能有助于心肌的保护^[4]。本试验结果显示, FYLS_H 组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性均比 I/R 模型组显著升高,提示 FYLS 对 ATP 酶活性有显著的改善效果,可以防止水钠潴留,同时也减轻和避免了细胞内钙的进一步超载。可能是其拮抗 I/R

的机制之一。

研究表明,心肌短时缺血后即可出现凋亡,再灌后加剧,而细胞凋亡的触发是一个级联式基因表达的结果,有许多基因参与此过程,主动合成新的大分子蛋白质,对凋亡的发生、发展起到促进或抑制作用^[5]。按其表达产物对凋亡过程的影响,将凋亡相关基因分为凋亡促进基因(如 c-myc, p53, bax, ice, c-fos 等)和凋亡抑制基因(如 bcl-2, bcl-xl 等)。在这一基因调控网络中, Bcl-2 基因家族起关键作用, Bcl-2 和 Bax 之间的比值是决定细胞凋亡与否的关键^[6-7]。我们用免疫组化法检测发现 I/R 组大鼠心肌 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达均增高, Bax 蛋白表达上调更多,因而 Bcl-2 和 Bax 的比值显著降低。FYLS_H 可明显降低 Bax 表达,对 Bcl-2 表达无明显影响,但却

可以使 Bcl-2 与 Bax 的比率明显增加, 因此认为, FYLS 可能具有抗凋亡作用。

综上所述, 减轻细胞内钙超载, 下调 Bax 蛋白、增加 Bcl-2/Bax 比例, 抑制细胞凋亡, 可能是 FYLS 发挥抗 I/R 作用、保护心肌组织的重要机制。

[参考文献]

[1] 黄仁彬,张绪东,蒋伟哲,等. 玉郎伞黄酮对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(11) :870.

[2] 简洁,刘曦,黄仁彬,等. 玉郎伞两种黄酮单体对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J],中国药理学通报,2009, 125(7) : 942.

[3] 简洁,林兴,黄仁彬. 玉郎伞总黄酮提取工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8) : 8.

(上接第 161 页)

缓衰老能起到一定的积极作用。

本试验还发现黄芩和红花水提物能显著升高衰老小鼠的胸腺系数,说明黄芩和红花可能通过增强机体的免疫功能而延缓衰老,有待进一步证实。

[参考文献]

[1] 陈瑗,周玫. 自由基医学[J]. 北京:人民军医出版社, 1991:142.

[2] 张明霞,李效忠. 红花抗衰老作用的实验研究[J]. 中草药, 2001, 32(1) : 52.

[3] 金 鸣,李金荣,蔡亚欣,等. 红花水溶性成分抗氧化作用的研究[J]. 心肺血管病杂志, 1998, 17(4) : 227.

[4] 陈桂枝,罗德生,郑红花,等. 四氯化碳肝损伤与脂质过氧化时黄芩煎剂的保护作用[J]. 咸宁学院学报:医学版, 2005, 19(1) : 31.

[5] 张永钦,周井炎,徐辉碧. 黄芩甙的抗氧化作用[J]. 华中理工大学学报, 1999, 27(4) : 111.

[6] 陈瑾歆. 自由基与衰老关系的研究进展[J]. 川北医学院学报, 2004, 19(1) : 207.

[4] 李建生,赵君玫,郭盛典,等. 川芎 和参麦注射液对脑缺血-再灌注损伤老龄大鼠心肌组织 ATP 酶和自由基代谢的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8 (6) : 347.

[5] 张红星,周利,张唐法. 电针刺激内关穴对心肌缺血再灌注损伤家兔心肌细胞凋亡调控基因的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29(1) : 13.

[6] Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expression and molecular mechanisms in apoptosis [J]. Pharmacol Ther, 2004, 101(1) :1.

[7] Kukhta V K, Marozkina N V, Sokolchik I G, et al. Molecular mechanisms of apoptosis [J]. Ukr Biokhim Zh, 2003, 75(6) :5.

[责任编辑 何伟]

[7] 李磷,丁安伟,等. 衰老机理研究进展[J]. 西北药学杂志, 2000, 15(4) : 177.

[8] Takeda T. Senescence-acceleratedmouse (SAM): a biogerontological resource in aging research [J]. Neurobiol Aging, 1999, 20(2) : 105.

[9] 聂伟,张永祥. 快速老化小鼠-研究衰老及衰老相关疾病的动物模型[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(2) : 132.

[10] 李国星,刘克明,何宁,等. 快速老化鼠和自然衰老鼠中超氧化物歧化酶的比较研究[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(9) : 820.

[11] Boldyrev A A, Yuneva M O, Sorokina E V, et al. Antioxidant systems in tissues of senescence accelerated mice[J]. Biochem (Mosc) , 2001, 66 (10) : 1157.

[12] Yokozawa T, Satoh A, Cho E J. Ginsenoside Rd attenuates oxidative damage related to aging in senescence accelerated mice [J]. Pharm Pharmacol, 2004, 56(1) : 107.

[责任编辑 何伟]