文章编号:1000-5404(2006)19-1939-03

论著

参附注射液对大鼠缺血再灌注心肌 Bcl-2、Bax 与 c-fos 基因蛋白表达的影响

陈玉培,牟崇明,季道如,但 伶,龚文婷,王莉莎 (重庆医科大学附属第二医院麻醉科,重庆 400010)

提 要:目的 观察大鼠急性缺血再灌注损伤与凋亡相关基因 Bcl-2、c-fos 和 Bax 蛋白表达的关系及参附注射液(SF)的影响。**方法** 采用整体缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)模型,35只大鼠分为假手术组(C组)、生理盐水30 min对照组(IR 30)、生理盐水120 min对照组(IR 120)、SF 30 min组(SF 30)和SF 120 min组(SF 120),心肌缺血40 min再灌注30 min或120 min后,用免疫组化法检测Bcl-2、Bax和c-fos在心肌中的表达量。**结果** 与C组比较,IR组心肌Bcl-2、Bax和c-fos蛋白表达显著升高($P<0.01$),Bcl-2/Bax比值显著下降($P<0.01$);与IR组比较,SF组Bcl-2蛋白表达显著升高($P<0.01$),Bax和c-fos蛋白表达显著降低($P<0.01$),Bcl-2/Bax比值显著升高($P<0.01$)。**结论** SF对IR心肌保护效应可能与其促进Bcl-2蛋白高表达、抑制Bax与c-fos蛋白表达、增加Bcl-2/Bax比值,从而抑制心肌细胞凋亡有关。

关键词:参附注射液;缺血再灌注;Bcl-2;Bax;c-fos
中图法分类号:R285;R322.11;R394.3 **文献标识码**:A

Effect of Shenfu parenteral injection on Bcl-2, Bax and c-fos proteins expression in rat ischemia-reperfusion myocardium

CHEN Yu-pei, MOU Chong-ming, JI Dao-ru, DAN Ling, GONG Wen-ting, WANG Li-sha (Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To observe the relationship between acute ischemia-reperfusion injury and apoptosis related gene Bcl-2 and Bax and c-fos protein expression, and the intervention of Shenfu parenteral injection (SF) in rats. **Methods** The ischemia-reperfusion (IR) model was established by ligating the left anterior descending coronary artery. Thirty-five healthy rats were randomly divided into sham operation group (group C), IR group and SF group (8 ml/kg SF was intravenously injected 15 min before ligation). After myocardial ischemia lasting for 40 min, the myocardium was reperfused for 30 min or 120 min, then the expression of Bcl-2 and Bax and c-fos proteins was detected in myocardium by immunohistochemistry. **Results** As compared with group C, the protein expression of Bcl-2 and Bax and c-fos in the ischemic myocardium significantly increased ($P<0.01$), and Bcl-2/Bax ratio significantly decreased ($P<0.01$) in IR group. As compared with IR group, the protein expression of Bcl-2 significantly increased ($P<0.01$), and Bax and c-fos significantly decreased ($P<0.01$), Bcl-2/Bax ratio significantly increased ($P<0.01$) in SF group. **Conclusion** Protective effect of SF on ischemia-reperfusion myocardium may concern with restraining myocardial cell apoptosis through promoting Bcl-2 protein expression and decreasing Bax and c-fos protein expression as well as increasing Bcl-2/Bax ratio.

Key words: Shenfu parenteral injection; ischemia-reperfusion; Bcl-2; Bax; c-fos

参附注射液(Shenfu, SF)是中医"回阳救逆"参附汤的中药配方,其主要成分是人参皂甙及乌头类生物碱。经临床研究证实,SF对各种休克、心力衰竭、心肌缺血以及室上性/室性心律失常有改善治疗作用。我们前期的研究亦证实SF对大鼠心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)有良好的保护作用[1]。本研究通过观察心肌中凋亡相关基因Bcl-2、Bax和c-fos蛋白表达与心肌缺血再灌注损伤的关系及SF对其的影响,进一步明确SF心肌保护效应的分子机制,为临床应用提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

SF:雅安三九药业有限公司出品,规格10 ml/支,批号030110;乌拉坦:化学醇,中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号020312;抗鼠Bcl-2、Bax和c-fos抗体均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 动物及实验仪器

35只健康成年Wistar大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供,雌雄不拘,体质量200~300 g;ALc-MPA多道生物信号分析系统上海奥尔科特生物科技有限公司(第二军医大学生物信号处理

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(2004-B-77)
Supported by the Scientific Research Foundation of Public Health Bureau of Chongqing (2004-B-77)
作者简介:陈玉培(1965-),男,四川省阆中市人,副主任医师,副教授,主要从事临床麻醉和心肌保护方面的研究。电话:13983084323,E-mail:cyp114@tom.com
收稿日期:2005-10-24;修回日期:2006-03-24

研究所)产品;DH-150 动物呼吸机(浙江大学医学仪器厂)。

1.3 心肌缺血再灌注损伤模型制作

大鼠在腹腔注射 20% 乌拉坦 5 ml/kg(1.0 g/kg)的麻醉下,仰卧位固定于鼠板上,针状电极插入右前肢、左前肢和右后肢皮下,连续心电图监测;颈正中切开,于3、4 气管软骨环间行气管切开插管,接 DH-150 动物呼吸机进行人工通气(潮气量 8~10 ml,频率 65~70 次/min,呼气∶吸气为 3∶1);分离右颈外静脉结扎远心端,向近心端插静脉管,以备给药。沿胸骨左缘旁 0.5 cm 依次切开皮肤、浅筋膜、深筋膜,钝性分离胸大肌和前锯肌,剪断第 3、4、5 肋骨,进入胸腔,剪开心包,暴露心脏。在左心耳根部下缘 2 mm 处进针,用 5/0 无损伤缝合针穿过左冠状动脉前降支(LAD)从肺动脉圆锥左缘出针穿线,在 LAD 表面穿线处置一双折的 10 号丝线活结结扎 LAD,以造成左心室前壁缺血 40 min。然后松开活结,恢复左冠状动脉血液灌注 30 min 或 120 min。LAD 结扎成功标准[2]:心电图显示 ST 段抬高、QRS 波变高变宽和缺血心肌变为青紫色。LAD 再通成功标准:解开结扎线后 QRS 波幅逐渐回落、抬高的 ST 段回落和缺血区心肌变红。

1.4 实验分组

大鼠分为 5 组,每组 7 只。① 假手术组:只穿线不结扎,静脉注射生理盐水 8 ml/kg,观察 120 min;② SF 30 min 组(SF 30):结扎前 15 min 静脉注射 SF 8 ml/kg,结扎 LAD 40 min,再灌注 30 min;③ SF 120 min 组(SF 120):再灌注 120 min,余同 SF 30;④ 生理盐水 30 min 对照组(IR 30):结扎 LAD 前 15 min 静脉注射生理盐水 8 ml/kg,结扎 LAD 40 min,再灌注 30 min;⑤ 生理盐水 120 min 对照组(IR 120):再灌注 120 min,余同 IR 30。

1.5 免疫组化检测心肌组织中 Bcl-2、Bax 和 c-fos 蛋白表达

组织块经 10% 多聚甲醛固定后,常规石蜡包埋,5 μm 厚连续切片,二甲苯脱蜡及梯度乙醇脱水后,按说明书操作,用 SABC 免疫组化法检测 Bcl-2、Bax 和 c-fos 蛋白的表达。光镜下见阳性细胞质呈黄色或黄棕色,每个样本随机选 10 个视野作图像分析,并用阳性积分光密度值/管壁面积计算统计值。阴性对照用 PBS 液代替抗 Bcl-2、Bax 或 c-fos 蛋白抗体。

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.1 统计软件行 t 检验。

2 结果

各组心肌中 Bcl-2、Bax 和 c-fos 蛋白都有表达(细胞质为黄色,细胞核为棕褐色),但表达程度有差异(图 1)。图像分析结果见表 1,IR 30、IR 120 组心肌 Bcl-2、Bax 和 c-fos 蛋白比假手术组显著升高($P < 0.01$),但 Bcl-2/Bax 值显著下降($P < 0.01$);SF 30、SF 120 组比 IR 各组的 Bcl-2 蛋白及 Bcl-2/Bax 值明显升高($P < 0.01$),而 Bax、c-fos 蛋白的表达则显著低于 IR 各组($P < 0.01$)。

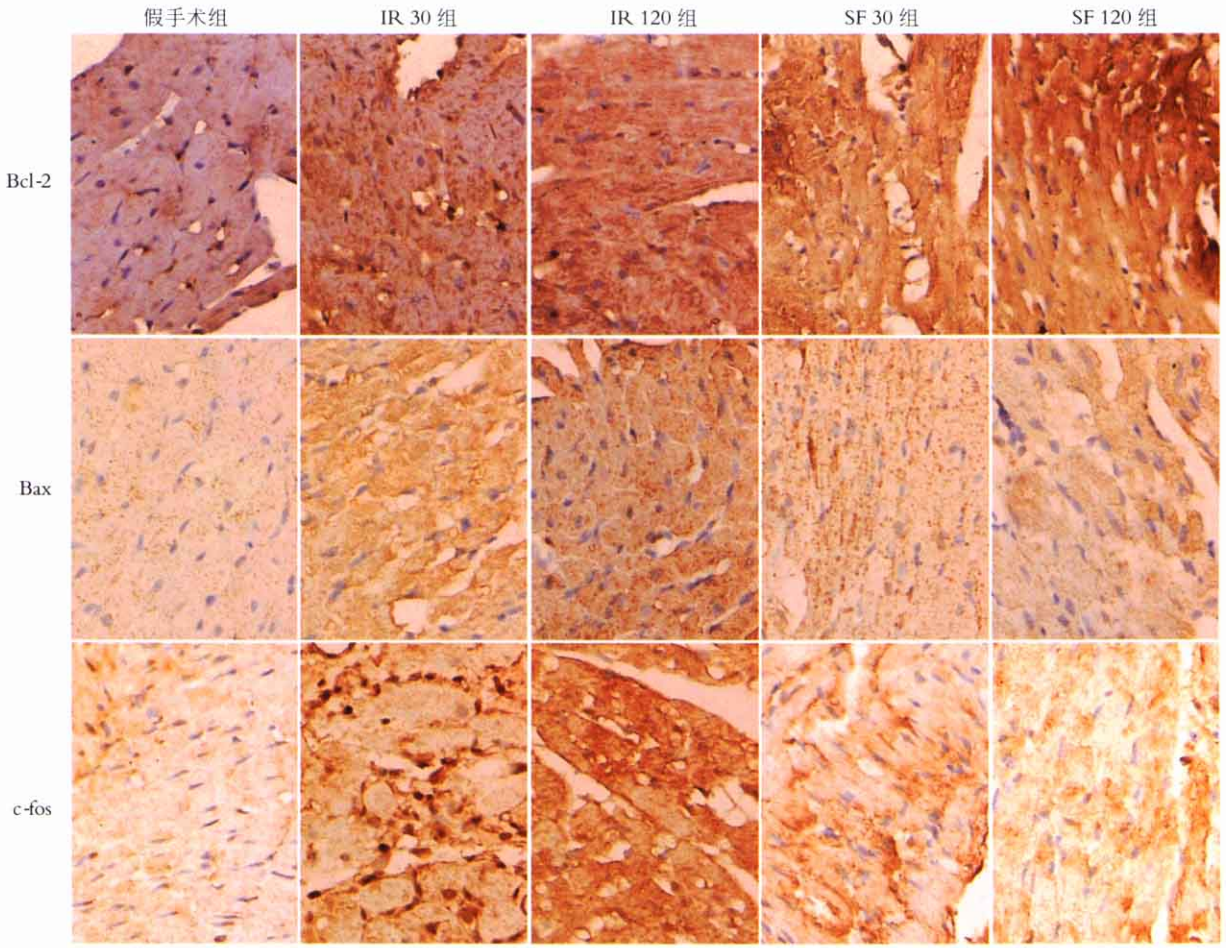


图 1 SF 对缺血再灌注心肌 Bcl-2、Bax、c-fos 蛋白表达的影响 (SABC ×400)

表 1　大鼠心肌 Bcl-2、Bax、c-fos 蛋白的表达变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	Bcl-2	Bax	c-fos	Bcl-2/Bax
假手术组	0.49 ±0.19	0.35 ±0.27	0.85 ±0.23	1.28
IR 30	2.01 ±1.56[a]	4.23 ±1.99[a]	3.87 ±0.65[a]	0.47[a]
IR 120	2.87 ±1.82[a]	4.99 ±2.04[a]	4.01 ±0.25[a]	0.57[a]
SF 30	4.12 ±1.95[ab]	2.51 ±1.98[ab]	1.96 ±0.38[b]	1.64[b]
SF 120	4.98 ±1.86[ac]	2.05 ±1.89[ac]	1.37 ±0.45[a]	2.42[ac]

a：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.01$，与 IR 30 组比较；c：$P<0.05$，与 IR 120 组比较

3　讨论

近年来，随着临床冠脉内溶栓、PTCA、体外循环、冠脉搭桥术等治疗手段的广泛应用，MIRI 越来越引起人们的广泛重视。研究证实，心肌缺血再灌注（myocardial ischemia-reperfusion，MIR）可诱导缺血心肌细胞凋亡相关基因的蛋白表达。Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡过程中发挥主要调节作用的一类因子，按功能可分为两大类：一类是抗凋亡蛋白，以 Bcl-2、Bcl-xl 为代表，主要分布于线粒体、内质网及细胞质中[3]，具有抗细胞凋亡作用；一类是促凋亡蛋白，以 Bax、Bad、Bid 为代表，主要分布于细胞质中，具有促细胞凋亡作用。Bcl-2 家族蛋白通过二聚体网络的形式相互作用，调控细胞的凋亡，不同二聚体间的精细平衡决定了细胞是继续存活还是走向死亡[2]。Bax 蛋白虽为 Bcl-2 家族蛋白的成员，但其功能却于 Bcl-2 蛋白相反，Bax 蛋白为同型二聚体，也可于 Bcl-2 蛋白形成异二聚体，Bcl-2 和 Bax 对细胞凋亡的调控，不仅取决于自身表达水平的高低，还与 Bcl-2/Bax 值有关，当 Bcl-2/Bax > 1∶2 时，细胞存活，反之，细胞死亡[4]，因此 Bcl-2/Bax 值也是决定细胞凋亡的关键因素。本研究结果显示，MIR 各组心肌中 Bcl-2、Bax 蛋白都有表达，但表达程度有差异，30 min 再灌注和 120 min 再灌注组心肌中的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达显著高于假手术组（$P<0.01$），但 Bcl-2/Bax 值显著下降（$P<0.01$），提示 MIR 既可诱导抗凋亡 Bcl-2 基因的蛋白表达，也可诱导促凋亡 Bax 基因的蛋白表达，但 Bax 表达显著强于 Bcl-2 的表达，Bcl-2/Bax 值比假手术组显著降低，表明 MIR 可引起心肌细胞发生凋亡，从而加重心肌的缺血再灌注损伤；而用 SF 预处理后，与 IR 组比较，30 min 再灌注和 120 min 再灌注心肌 Bcl-2 蛋白明显升高（$P<0.01$），Bax 的蛋白表达显著降低（$P<0.01$），Bcl-2/Bax 值也明显升高，提示 SF 可以通过促进 Bcl-2 蛋白表达，抑制 Bax 蛋白表达，并使 Bcl-2/Bax 值增加，使心肌细胞存活，从而减轻心肌的缺血再灌注损伤，表明 SF 对 MIRI 的保护效应与 Bcl-2 基因的表达上调和 Bax 基因的表达下调有关。

c-fos 基因属于立即早期反应基因（immediate-early gene，IEG）家族，其特征为静止的细胞受外界的刺激时早期快速反应表达。研究表明，c-fos 基因参与了心肌缺血与再灌注损伤的基因调节[5]。MIRI 诱导 c-fos 基因表达，可能与缺血再灌注使蛋白合成受抑制及 Ca^{2+}、IP_3、cAMP 等第二信使的参与密切相关[6]，其表达产物 c-fos 蛋白可由细胞质转入核内 AP-1（activator protein 1），并与 DNA 上特异性位点结合而启动靶基因表达，编码一些酶、受体、神经肽、离子通道蛋白等细胞内蛋白，这就把细胞外的刺激信号转为细胞内基因表达的刺激信号，最终影响细胞代谢与功能的改变。因此 c-fos 基因可能在对外刺激转录偶联传递过程中，起着核内“第三信使”的重要作用[7]。c-fos 蛋白可以启动心肌细胞的凋亡，参与缺血后梗死灶的发展核梗死后心功能不全的发生[8]。本研究结果显示，IR 各组 c-fos 蛋白的表达显著高于假手术组（$P<0.01$），且 IR 30 min 组细胞核上有表达呈棕褐色；而 SF 各组则又明显低于 IR 组，且细胞核上未见棕褐色颗粒表达，说明 MIR 可以诱导 c-fos 基因蛋白的表达，且 c-fos 蛋白可由细胞质转入细胞核内，SF 可以抑制 c-fos 蛋白的表达。因此 SF 对 MIRI 保护效应又可能与 c-fos 基因蛋白表达下调有一定关系。

综上所述，IR 可诱导心肌细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 和 c-fos 蛋白的表达，且可引起 Bcl-2/Bax 值下降，因此加重了心肌的缺血性损伤；而 SF 可以促进 Bcl-2 蛋白表达上调和 Bax 与 c-fos 蛋白表达下调，增加 Bcl-2/Bax 值，减轻心肌细胞发生凋亡，从而减轻 MIRI，这可能是 SF 对 MIRI 保护效应的分子机制。至于 SF 如何引起凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 和 c-fos 蛋白表达的变化，尚有待进一步深入研究。

参考文献：

[1] 陈玉培，牟崇明，季道如，等. 参附注射液预干预对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报，2005，30（2）：220－223，288.

[2] LINDSTEN T，ROSS A J，KING A，*et al*. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues[J]. Mol Cell，2000，6（6）：1389－1399.

[3] REED J C. Bcl-2 family proteins[J]. Oncogene，1998，17（25）：3225－3236.

[4] 樊廷俊，夏　兰，韩贻仁. 线粒体与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理学报，2001，33（1）：7－12.

[5] BRAND T，SHARMA H S，FLEISCHMANN K E，*et al*. Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion[J]. Circ Res，1992，71（6）：1351－1360.

[6] 刘茂红，游国雄. 噪音对大鼠脑神经细胞损伤的机制研究[J]. 现代康复，2000，4（3）：412.

[7] MORGAN J I，CURRAN T. Proto-oncogene transcription factors and epilepsy[J]. Trends Pharmacol Sci，1991，12（9）：343－349.

[8] GOTTLIED R A，BURLESON K O，KLONER R A，*et al*. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. J Chin Invest，1994，94（4）：1621－1628.

（编辑　陈聪连）