论著

文章编号:1000-5404(2007)07-0588-04

参芪扶正注射液对心肌挫伤后家兔心肌细胞凋亡的影响

吴正国[1],梁贵友[1],李正勋[2],刘日辉[3],牛义民[1],周继红[4] ([1]遵义医学院第一附属医院胸心外科,遵义 563003;[2]湖北省仙桃市第一人民医院胸心外科,仙桃 433000;[3]湖北省襄樊市中心医院胸心外科,襄樊 441000;[4]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨参芪扶正注射液对心肌挫伤后家兔心肌细胞凋亡及其 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响。**方法** 健康家兔50只,简单随机化摸球法分为4组,参考组(Reference,$n=20$)、对照组(Control,$n=10$)、参芪扶正注射液治疗组(Sen,$n=10$)和心肌挫伤组(MC,$n=10$)。利用 BIM-Ⅱ型生物撞击机制备心肌挫伤模型,应用 ELISA 法测定心肌肌钙蛋白 I(cTnI),应用 TUNEL 法并结合流式细胞术观察心肌细胞凋亡发生的情况,应用免疫组化 SABC 法观察 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。对照组除不撞击胸部外,余处理均同 MC 组。**结果** MC 组与 Sen 组在伤后4 h 血清 cTnI 含量均高于各自伤前及对照组相应时相点($P<0.05$);对照组未见 TUNEL 阳性细胞,MC 组和 Sen 组心肌细胞凋亡指数(AI)分别为(15.686 0±0.688 7)%和(5.579 0±0.191 7)%($P<0.05$),凋亡率分别为(6.932 0±0.638 0)%和(3.021 0±0.254 0)%($P<0.05$);与对照组比较,MC 组的 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达光密度值均明显增高($P<0.05$);而 Sen 组的 Bcl-2 蛋白表达光密度值高于 MC 组($P<0.05$),Bax 蛋白表达光密度值低于 MC 组($P<0.05$)。**结论** 参芪扶正注射液能有效的减少或抑制钝性心肌挫伤家兔心肌细胞的凋亡,对钝性心肌挫伤具有一定的保护作用,其抑制凋亡可能是通过上调 Bcl-2 蛋白表达和下调 Bax 蛋白表达来实现的。

关键词: 参芪扶正注射液;心肌挫伤;细胞凋亡;Bcl-2 蛋白;Bax 蛋白;cTnI

中图法分类号: R285.5; R329.28; R654.2 **文献标识码:** A

Effects of Senqi Fuzheng injection on myocardial cell apoptosis, Bcl-2 and Bax expressions in rabbits with myocardial contusion

WU Zheng-guo[1], LIANG Gui-you[1], LI Zheng-xun[2], LIU Ri-hui[3], NIU Yi-min[1], ZHOU Ji-hong[4] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003; [2]Department of Cardiothoracic Surgery, The First People's Hospital of Xiantao, Xiantao 433100; [3]Department of Cardiothoracic Surgery, Central Hospital of Xiangfan, Xiangfan 441000; [4]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of Senqi Fuzheng injection on the apoptosis of myocardial cells and the expressions of Bcl-2 and Bax in experimental rabbits with myocardial contusion (MC). **Methods** Totally 50 healthy rabbits were randomized into 4 groups: reference group ($n=20$), control group ($n=10$), Sen group ($n=10$) and MC group ($n=10$). MC model was inflicted with aid of BIM-Ⅱ biomedical impact-machine. The apoptosis of myocardial cells was analyzed by TUNEL. The expressions of Bcl-2 and Bax were detected by using immunohistochemistry with SABC method. The rate of apoptosis in myocardial cells was quantified with flow cytometry. Control group was treated similar to the MC group except the impact. **Results** The levels of serum cTnI were significantly increased 4 h after impact in MC and Sen group ($P<0.05$). Myocardial cell apoptosis was only detected in MC and Sen group, with the apoptosis index (AI) of (15.686 0±0.688 7)% and (5.579 0±0.191 7)% respectively ($P<0.05$). The rate of apoptosis was (6.932 0±0.638 0)% in MC group and(3.021 0±0.254 0)% in Sen group ($P<0.05$). Bcl-2 expression was up-regulated while Bax expression was down-regulated in Sen group compared to those in MC group ($P<0.05$). **Conclusion** Senqi Fuzheng injection can lower the AI and protect myocardial cells from MC by increasing Bcl-2 expression and decreasing Bax expression.

Key words: Senqi Fuzheng injection; myocardial contusion; apoptosis; Bcl-2 protein; Bax protein; cTnI

基金项目: 贵州省科技厅社发重点攻关基金(黔科合农社字2001-1132)
Supported by Key Sci & Tech Research Project of Scientific Department of Guizhou Province (2001-1132)

作者简介: 吴正国(1970-),男,湖北省汉川市人,硕士,主治医师,主要从事心脏钝性损伤方面的研究,现在遵义医学院第五附属医院胸心外科,珠海。E-mail: GMZGJL@163.com

通讯作者: 牛义民,电话: 13985603939

收稿日期: 2006-04-24; **修回日期:** 2006-09-11

现代中药药理学研究表明，党参具有抑制血小板聚集，改善微循环等作用；黄芪可改善心肌缺血，具有保护心肌和改善心肌代谢的作用。参芪扶正注射液为中药党参、黄芪为主的注射液，其对缺血再灌注损伤、心肌缺血等有保护作用[1]。我们在建立家兔心肌挫伤模型基础上，应用免疫组化 SABC 法观察 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达，通过 TUNEL 法观察凋亡心肌细胞，结合流式细胞术定量检测细胞凋亡率，研究参芪扶正注射液对心肌挫伤（myocardial contusion，MC）后家兔心肌细胞凋亡的影响，为中医药防治 MC 的临床应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和动物分组

TUNEL 试剂盒购自美国罗氏公司、Ⅱ型胶原酶购自美国 Sigma 公司、Bcl-2 和 Bax 试剂盒购自 Boster 公司、Bcl-2 和 Bax 试剂盒购自 Boster 公司、心肌肌钙蛋白 I 测定试剂盒购自大连泛邦化工技术开发有限公司、参芪扶正注射液由广东丽珠制药提供，5 ml/支，生药 = 2 g/ml，批号：050219，国药准字 Z19990065；其他试剂均为国产 AR 级。健康中国家兔 50 只（由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供），雌雄不拘，体质量（2.53 ± 0.26）kg，简单随机化摸球法分为 4 组，参考组（n = 20）、对照组（n = 10）、参芪扶正注射液治疗组（n = 10）和心肌挫伤组（n = 10）。

1.2　MC 模型的建立及各组处理

采用 BIM-Ⅱ型水平生物撞击机制成兔 MC 模型[2]。制模后 4 h MC 组用电脑微量注射泵（AJ-5803 型，上海）以 3 ml/min 的速度经右颈静脉插管给予生理盐水（10 ml/kg），Sen 组同法给予参芪扶正注射液（10 ml/kg，用生理盐水配制成 1 000 g/L）。参考组、MC 组及 Sen 组分别于撞击前 30 min、撞击后 4h 自左侧股静脉插管采血，检测血清 cTnI 浓度，由参考组测定值用公式 $\bar{x} \pm 1.96s$ 计算出撞击心脏后 4 h 家兔的 cTnI 95% 的可信区间（confidence interval，CI），MC 组和 Sen 组撞击心脏 4 h 的血清 cTnI 测值均要在该区间内；MC 组及 Sen 组动物制模 24 h 时摘取心脏，取心脏左前降支中点前壁双室心肌组织块，制备心肌组织单细胞悬液和病理石蜡切片；对照组除不撞击心脏外，余处理均同 MC 组。

1.3　心肌肌钙蛋白 I 测定

ELISA 法测定心肌肌钙蛋白 I。具体检测步骤及结果计算方法按照试剂盒说明书进行。

1.4　TUNEL 法检测凋亡细胞

用 PBS 液作空白对照，用非免疫血清作阴性对照，具体操作步骤及结果检测按试剂盒说明书进行。凋亡细胞半定量分析：在 400 倍高倍视野下，每张切片计数 5 个高倍视野，分别计算每个视野细胞核数及凋亡阳性细胞核数，取均值，根据 Narula 方法[3] 计算出凋亡指数（AI）：AI（%）= 凋亡阳性的细胞核数/总计数的细胞核 × 100%

1.5　免疫组织化学 SABC 法检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达

免疫组织化学 SABC 法检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达，具体操作步骤及结果检测按试剂盒说明书进行。在 400 倍光镜下，每片随机选 3 个不重复的视野，运用 IBAS 全自动图像分析系统（西德 KONTRON 公司）对 Bcl-2、Bax 蛋白免疫组化结果进行分析，在计算机下测定光密度，取平均值。

1.6　流式细胞术测定细胞凋亡率

心肌组织加入细胞分离机系统（Medimachine™，BectonDickinson）制备所需单细胞悬液，用溴化丙锭进行 DNA 染色后，置入流式细胞仪测定。所得数据输入计算机，经 Bioconsort 专用软件处理，统计细胞凋亡率（apoptotic rate，AR）。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 11.0 统计软件进行，各参数比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　TUNEL 染色

TUNEL 阳性细胞计数结果为：细胞凋亡指数（AI）在对照组为 0，而 Sen 组和 MC 组 AI 分别为（5.579 0 ± 0.191 7）%、（15.686 0 ± 0.688 7）%，两组比较有统计学意义（P < 0.05）。（表 1，图 1）。

2.2　免疫组化凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 蛋白表达

与对照组比较，MC 组心肌细胞 Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白表达光密度值均明显增高（P < 0.05）；与 MC 组比较，参芪扶正注射液治疗组心肌细胞 Bax 蛋白表达光密度值明显下降（P < 0.05），Bcl-2 蛋白表达光密度值明显增高（P < 0.05）（表 1，图 2，3）。

2.3　cTnI 的测定

参考组、MC 组与 Sen 组在伤后 4 h 血清 cTnI 含量两两比较均无差别（P > 0.05），但均高于伤前 30 min 及对照组相应时相点（P < 0.05）；由参考组测定值计算出撞击心脏 4 h 后家兔的 cTnI 95% 的 CI 为 0.685，0.806 ng/ml，MC 组和 Sen 组的每个标本伤后 4 h cTnI 测值均在该区间内（表 2）。

2.4　流式细胞仪检测凋亡率

流式细胞术测定 MC 组和 Sen 组细胞凋亡率分别为（6.932 0 ± 0.638 0）% 和（3.021 0 ± 0.254 0）%，组间差异显著（P < 0.05）（表 1）。

表 1　兔心肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化

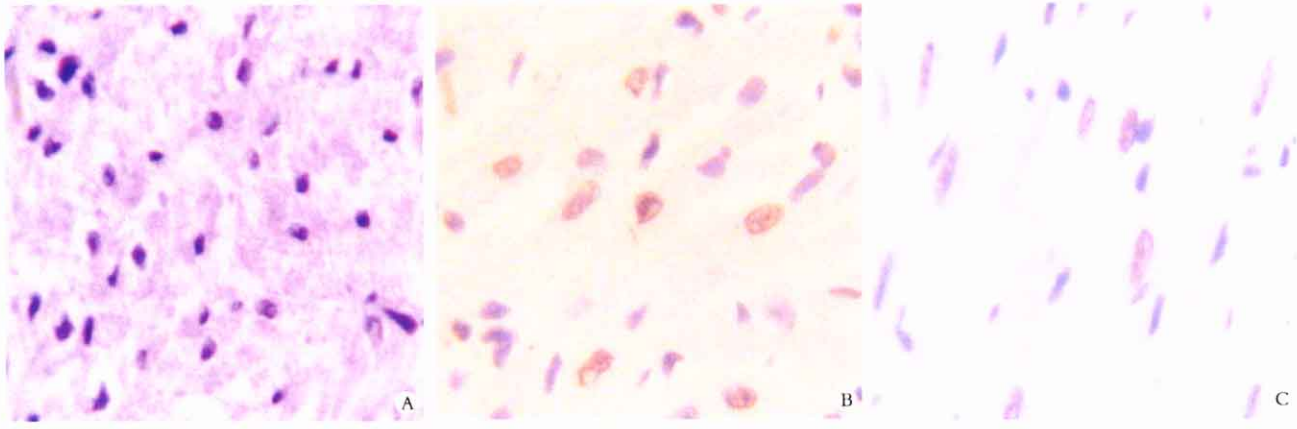
组别	例数	凋亡指数（%）	凋亡率（%）	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白
对照组	10	0	0	0.056 2 ± 0.003 8	0.062 9 ± 0.001 7
挫伤组	10	15.686 0 ± 0.688 7[b]	6.932 0 ± 0.638 0[b]	0.438 2 ± 0.017 5[b]	0.274 7 ± 0.001 3[b]
治疗组	10	5.579 0 ± 0.191 7[a]	3.021 0 ± 0. 254 0[a]	0.157 7 ± 0.003 8[a]	0.711 3 ± 0.037 0[a]

a：P < 0.05，与挫伤组比较；b：P < 0.05，与对照组比较

表 2　各组兔血清心肌肌钙蛋白 I 含量的变化（ng/ml）

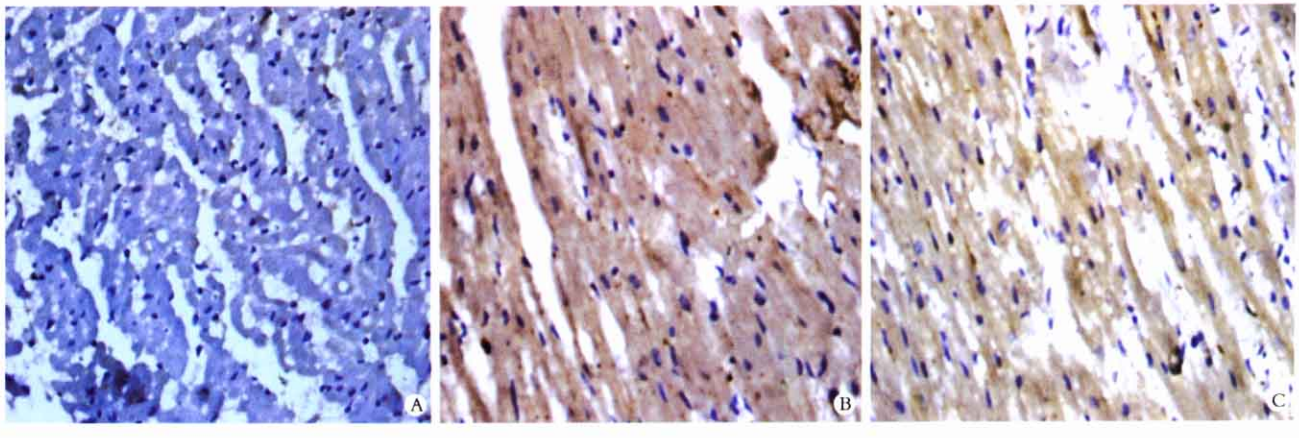
组别	例数	伤前 30 min	伤后 4 h
对照组	10	0.115 0 ± 0.009 5	0.120 0 ± 0.008 4
挫伤组	10	0.113 0 ± 0.009 9	0.748 9 ± 0.035 1[ab]
治疗组	10	0.116 0 ± 0.008 7	0.746 9 ± 0.031 0[abc]
参考组	20	0.115 7 ± 0.007 4	0.745 0 ± 0.031 5[ab]

a：P < 0.05，与伤前 30 min 比较；b：P < 0.05，与对照组比较；c：P > 0.05，与挫伤组比较



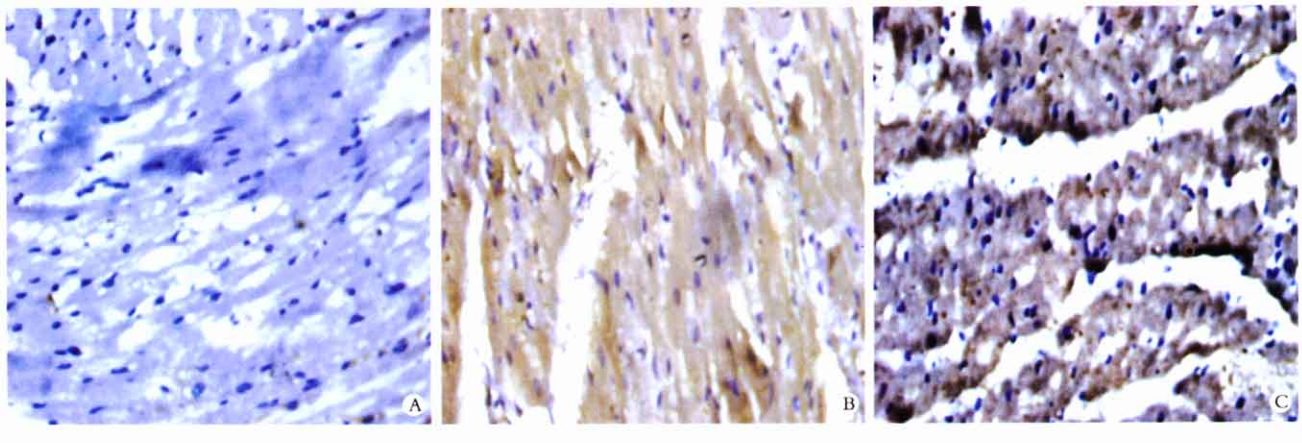
A:对照组; B:挫伤组; C:治疗组

图1 心肌组织凋亡细胞病理学观察 (TUNEL×400)



A:对照组; B:挫伤组; C:治疗组

图2 心肌组织 Bax 蛋白的表达 (SABC×400)



A:对照组; B:挫伤组; C:治疗组

图3 心肌组织 Bcl-2 蛋白的表达 (SABC×400)

3 讨论

以往对心肌挫伤的心肌保护的研究,大多侧重于如何减少心肌细胞坏死方面,对于心肌挫伤后心肌细胞是否存在凋亡现象以及采用药物抑制和减少心肌挫伤后心肌细胞凋亡的研究国内外尚少见报道。参芪扶正注射液对心肌缺血再灌注损伤、心肌缺血等有保护作用[1],但其对心肌细胞凋亡的影响及其机制的研究目前国内外尚少见报道。

在正常情况下,血液中 cTnI 的含量很低,当一些

病变引起心肌细胞损伤时，cTnI 迅速弥散入血液中，致使血液中 cTnI 的含量迅速升高。由于目前对实验性动物心肌挫伤的损伤级别还无明确统一的标准，本实验特设立参考组，计算出心脏钝性损伤 4 h 后 cTnI 95% 的可信区间，MC 组和 Sen 组的每个标本在制模 4 h 所测 cTnI 值必须在该可信区间内，否则屏除。本实验结果显示，参考组、MC 组与 Sen 组在伤后 4 h 血清 cTnI 含量均高于伤前 30 min 及对照组相应时相点（$P<0.05$），提示 MC 组和 Sen 组的每个标本都存在心肌挫伤；参考组、MC 组与 Sen 组在伤后 4 h 血清 cTnI 含量两两比较均无显著差异（$P>0.05$），而且 MC 组和 Sen 组的每个标本伤后 4 h cTnI 测值均在撞击心脏 4 h 后家兔的 cTnI 95% 的可信区间内，提示 MC 组和 Sen 组的每个标本伤后 4 h cTnI 测值都在同一水平，研究表明[4]，cTnI 是一种反映心肌细胞损伤高度灵敏与特异的标志物，由此认为，MC 组和 Sen 组的每个标本心肌挫伤的损伤程度都在同一水平。该方法也为今后制定心肌挫伤的损伤级别的标准提供了有益的思路。

作为终末分化阶段的心肌细胞，在正常情况下是不存在明显的凋亡现象的。本实验中，MC 家兔与对照组比较，心肌组织切片中 TUNEL 阳性细胞数目以及流式细胞仪检测到的心肌细胞凋亡率均显著增加，提示在心肌挫伤过程中发生了心肌细胞凋亡；Sen 组中 TUNEL 阳性细胞数目以及心肌细胞凋亡率均比心肌挫伤组显著降低，表明参芪扶正注射液能有效的减少家兔心肌挫伤后心肌细胞的凋亡，对钝性心肌挫伤具有一定的保护作用，这为参芪扶正注射液的进一步开发应用打下基础。

研究表明，细胞凋亡的发生与 Bcl-2 和 Bax 这一对凋亡调控基因的表达水平密切相关[5]。Bcl-2 为凋亡抑制因子，其高表达可抑制凋亡；而 bax 为促凋亡因子，其过度表达将加速细胞凋亡。在本实验中，与对照组比较，MC 组中 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白表达光密度值均明显增高，同时可检测到较多数量的凋亡心肌细胞，表明心肌挫伤后心肌细胞凋亡与 Bcl-2 和 Bax 这一对凋亡调控基因的表达变化有着某种联系。与 MC 组相比，Sen 组 Bcl-2 蛋白表达光密度值显著增加，同时 Bax 蛋白表达光密度值显著降低，心肌细胞凋亡指数和凋亡率均明显减少，提示参芪扶正注射液可能是通过上调 Bcl-2 蛋白表达，下调 Bax 蛋白的表达来减少或抑制心肌细胞凋亡的发生，从而达到其心肌保护作用。

陈吉球等[6]认为心肌缺血时心肌细胞有凋亡发生，Bcl-2 和 Bax 蛋白对心肌缺血时细胞凋亡的调控起着十分重要的作用；李欣志等[1]认为参芪扶正注射液能通过改善心肌缺血明显抑制犬和大鼠心肌缺血及再灌注损伤。由此我们推测，参芪扶正注射液可能是通过某种细胞内信号转导途径，通过血流动力学的改变改善心肌缺血，从而影响凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达，减少心肌挫伤后心肌细胞的凋亡。参芪扶正注射液抑制心肌挫伤后心肌细胞凋亡的具体作用机制，有待更深入的研究。

参考文献：

[1] 李欣志，尚晓泓，马晓斌，等. 参芪扶正注射液对犬和大鼠实验性急性心肌缺血的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，2003，9(9)：668-672.

[2] 闵家新，朱佩芳，王正国，等. 不同致伤条件撞击对兔钝性胸部创伤伤情影响的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2000，22(6)：509-511.

[3] Narula L, Haider N, Virmani R, *et al*. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure[J]. N Engl J Med, 1996, 335(16): 1182-1189.

[4] 赵保健. 心肌肌钙蛋白 I 的临床应用及检测方法进展[J]. 国外医学：放射医学核医学分册，2003，27(5)：212-215.

[5] Sutton M G, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy[J]. Circulation, 2000, 101(25): 2981-2988.

[6] 陈吉球，梁丽凡，肖　军，等. 心肌细胞凋亡的研究进展[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，2000，20(5)：347-350.

（编辑　王　红）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有 1 个、2 个或 3 个，但“姓”只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q

本刊编辑部