维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0400-03

灯盏花素对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡和心室重塑的影响

李法琦，陈运贞
（重庆医科大学临床学院心血管内科、重庆 400016）

【摘 要】目的：研究灯盏花素对自发性高血压大鼠(SHR)心肌细胞凋亡和心室重塑的作用和机制。方法：将18只10月龄伴有左心室肥厚的SHR随机分为灯盏花素组、福辛普利组和生理盐水(对照)组进行为期8周的干预治疗，观察其对SHR收缩压、心率、左心室重量/体重指数、心肌细胞超微结构、心肌细胞凋亡、Bax和Bcl-2基因蛋白表达和心肌细胞蛋白激酶C(PKC)活性的影响。结果：灯盏花素和福辛普利均能显著降低左心室重量/体重指数(P均<0.01)、改善心肌细胞超微结构、降低心肌细胞Bcl-2基因蛋白表达和心肌细胞膜PKC活性(P均<0.01)、增加心肌细胞Bax基因蛋白表达和促进心肌细胞凋亡(P均<0.01)。福辛普利还能显著降低SHR的收缩压(P均<0.01)。结论：灯盏花素和福辛普利均能显著逆转SHR的心室重塑，具有心脏保护作用，上调细胞凋亡诱导基因(Bax基因)表达和下调细胞凋亡抑制基因(Bcl-2基因)表达及抑制心肌细胞膜PKC活性，从而促进心肌细胞凋亡是其可能的机制之一。

【关键词】高血压；心室重塑；细胞凋亡；蛋白激酶C抑制剂；血管紧张素转换酶抑制剂
【中国图书分类法分类号】R329.2+7 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-02-01

Effects of scutellarein on cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats

LI Faqi, et al
(Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To study the effects and mechanisms of protein kinase C(PKC) inhibitor(scutellarein) on cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Methods*: 18 SHRs with left ventricular hypertrophy(LVH) aged 10 months were randomly divided into 3 groups and treated for 8 weeks with scutellarein, fosinopril and 0.9% sodium chloride solution(control) respectively.The effects of above drugs on systolic blood pressure (SBP), heart rate (HR), left ventricular hypertrophic index (left ventricular weight/body weight,LVW/BW), cardiocyte ultramicrostructure, cardiac myocyte apoptosis, apoptosis-associated gene (Bax and Bcl-2 gene) protein expression and PKC activity were observed. *Results*: Compared with control group, scutellarein and fosinopril could significantly reduce left ventricular hypertrophic index(all P values less than 0.01), ameliorate ultramicrostructure of cardiac hypertrophy, suppress Bcl-2 protein expression (all P values less than 0.01), lower the membrane PKC (PKCm) activity(all P values less than 0.01), stimulate Bax protein expression and promote cardiomyocyte apoptosis of SHRs with left ventricular hypertrophy (all P values less than 0.01). Fosinopril could remarkably decrease systolic blood pressure (all P values less than 0.01) but did not affect heart rate of SHRs with left ventricular hypertrophy (all P values more than 0.05). Scutellarein could not influence systolic blood pressure and heart rate of SHRs with left ventricular hypertrophy (all P values more than 0.05). *Conclusion*: Scutellarein and fosinopril can significantly reverse ventricular remodeling of SHR and preserve cardiac muscle. The mechanisms of their above-mentioned effects may be related to increase of cardiac myocyte apoptosis triggered by them via upregulation of apoptosis induced gene(Bax gene) expression and downregulation of apoptosis suppressor gene(Bcl-2 gene) expression as well as suppression of PKC activity.

【Key words】 Hypertension; Ventricular remodeling; Apoptosis; Protein kinase C inhibitor; Angiotensin converting enzyme inhibitor

细胞增生与凋亡失衡在高血压致心肌肥厚并发展成心力衰竭过程中起着重要的作用[1]。通过调控细胞凋亡纠正细胞增生与凋亡失衡来改善高血压心

作者介绍：李法琦（1956-），男，教授，博士，
主要研究方向：高血压、冠心病基础与临床研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

肌肥厚和心力衰竭目前研究甚少[2]，目前尚未见调控SHR心肌细胞凋亡以改善心肌肥厚和心室重塑的研究报道。本文应用蛋白激酶C（PKC）抑制剂(灯盏花素)和血管紧张素转换酶抑制剂（福辛普利）干预SHR心肌细胞凋亡，从而逆转SHR心肌肥厚和心室重塑，以期为临床防治高血压及其靶器官损害提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10月龄SHR（购于中国医学科学院阜外心血管病研究所）18只(雌、雄各半)，体重193.3～369.0g，收缩压 180～256mmHg。

1.2 实验动物分组

将上述SHR大鼠按性别、体重和初始收缩压配对分为灯盏花素组、福辛普利组和生理盐水组（对照组）三组。

1.3 实验动物喂养

以组为单位按雌、雄分别喂养于塑料鼠箱内，每箱3只，普通饲料喂养，自由饮自来水。实验室条件：有空调、空气净化交换设备等。

1.4 给药方法

灯盏花素、福辛普利注射液均以生理盐水配制，均按10mg/kg/日的剂量腹腔内注射给药，每日1次，共8周；生理盐水组(对照组)以等量生理盐水(ml/kg/日)腹腔内注射，每日1次，共8周。各组均于12月龄时取材。

1.5 测定指标及方法

1.5.1 无创血压(收缩压)和心率测量 应用RMB－ⅢA型电脑大鼠血压心率仪以鼠尾容积法监测SHR在清醒状态下的尾部收缩压和心率，每周测量1次。

1.5.2 心室肥厚指数计算以左心室湿重/体重(LVW/BW，mg/g)计算左心室心肌肥厚指数。

1.5.3 心肌细胞凋亡检测与半定量分析 用改良的末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷缺口末端标记法[3]原位标记心肌凋亡细胞核中的脱氧核糖核苷酸片段3'OH末端显示心肌凋亡细胞的存在。正常心肌细胞核呈蓝色，而凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。半定量分析：光镜下计数5个高倍视野(放大400倍)中凋亡阳性心肌细胞核数目及其占总细胞核数目的比例，求其均值。

1.5.4 心肌细胞超微结构观察 取上述各组大鼠左心室游离壁中部心室心肌标本（约1mm^{3}大小），立即置于冰冷的4%戊二醛（pH7.2）固定1h，常规制样用日产H-600型透射电子显微镜观察（放大倍数500～17000倍）。每只大鼠观察5张切片。

1.5.5 Bax和Bcl-2基因蛋白表达检测与半定量分析 采用免疫组化法检测Bax和Bcl-2基因蛋白表达[4]。Bax和Bcl-2基因蛋白表达均位于心肌细胞浆，表达阳性的心肌细胞DAB显色其胞浆呈棕黄色。半定量分析：光镜下计数5个高倍视野(放大400倍)中Bax或Bcl-2阳性心肌细胞数目及其占总细胞数目的比例，求其均值。

1.5.6 心肌细胞膜和浆PKC的提取和活性测定 参照Gu氏同位素法[5]。PKC活性表示为每毫克酶蛋白每分钟催化^{32}P 转移到Histon Ⅲ-SS中的pmol数(pmol/min.mg pr.)。

1.5.7 心肌细胞膜和浆PKC蛋白质含量测定 用Coomessie Brilliant Blue染料结合法[6]。

1.6 统计学分析

多组间比较用F检验，多组间两两比较用Newman-Keuls检验，治疗前后比较用配对t检验。实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 灯盏花素和福辛普利对SHR收缩压、心率和左心室心肌肥厚指数的影响（表1）

与对照组比较，灯盏花素和福辛普利能明显降低SHR左心室心肌肥厚指数（$P<0.05$和0.01），福辛普利还能显著降低SHR的收缩压($P<0.01$)，两药对SHR的心率均无显著影响(P均>0.05)。

2.2 灯盏花素和福辛普利对SHR心肌细胞超微结构的影响

表1 灯盏花素和福辛普利对SHR收缩压、心率和左心室心肌肥厚指数的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n		SBP(mmHg)	HR(beats/min)	LVW/BW(mg/g)
对照组	6	治疗前	207.50 ± 23.86	368.27 ± 42.76	—
		治疗后	201.33 ± 23.75	375.50 ± 27.49	3.84 ± 0.28
灯盏花素组	6	治疗前	210.17 ± 23.52	362.50 ± 37.43	—
		治疗后	199.18 ± 14.48	381.33 ± 37.59	3.22 ± 0.19$^{\triangle}$
福辛普利组	6	治疗前	207.83 ± 24.56	370.12 ± 49.63	—
		治疗后	130.83 ± 10.52$^{\blacktriangle\,\star}$	335.83 ± 26.36	2.75 ± 0.54*

注：与治疗前比较，$^{\blacktriangle}P<0.01$；与对照组比较，$^{\star}P<0.01$；与对照组和灯盏花素组比较，$^{\star}P<0.01$；与对照组比较，$^{\triangle}P<0.05$。SBP：收缩压；HR：心率；LVW/BW：左室湿重/体重。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 灯盏花素和福辛普利对SHR心肌细胞凋亡、Bax和Bcl-2基因蛋白表达、PKC活性的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	AMN/HPF	AI(%)	BaxPC/HPF	BaxPC/TPC (%)	Bcl-2PC/HPF	Bcl-2PC/TPC (%)	PKCcA(pmol /min.mg pr.)	PKCmA(pmol /min.mg pr.)
C组	38.77 ± 19.83	6.11 ± 2.80	40.30 ± 21.63	6.32 ± 3.08	57.65 ± 21.95	8.32 ± 2.34	30.48 ± 3.47	222.82 ± 40.22
D组	85.27 ± 24.46$^{\diamond\diamond}$	13.62 ± 4.68$^{\diamond\diamond}$	73.22 ± 30.10$^{\diamond\diamond}$	14.29 ± 4.74$^{\diamond\diamond}$	21.63 ± 10.96$^{\diamond\diamond}$	3.34 ± 1.57$^{\diamond\diamond}$	24.82 ± 2.68	143.60 ± 37.20$^{\diamond\diamond\blacklozenge}$
F组	88.50 ± 17.32$^{\diamond\diamond}$	13.09 ± 4.44$^{\diamond\diamond}$	92.40 ± 25.34$^{\diamond\diamond}$	15.09 ± 4.92$^{\diamond\diamond}$	20.47 ± 10.17$^{\diamond\diamond}$	3.20 ± 1.39$^{\diamond\diamond}$	27.65 ± 3.43	174.35 ± 38.82$^{\diamond\diamond}$

注：与对照组比较，$^{\diamond\diamond}P<0.01$；与福辛普利组比较，$^{\blacklozenge}P<0.05$。AMN：凋亡心肌细胞核；HPF：高倍视野；AI：凋亡指数；TPC：总细胞核;；BaxPC：Bax阳性细胞数；Bcl-2PC：Bcl-2阳性细胞数；PKCmA：心肌细胞膜PKC活性；PKCcA：心肌细胞浆PKC活性；pr.: protein。C：对照；D：灯盏花素；F：福辛普利。

灯盏花素组和福辛普利组SHR的心肌纤维肥大、心肌肌浆网扩张和心肌线粒体增生等心肌细胞超微结构改变均较对照组显著改善。

2.3 灯盏花素和福辛普利对SHR心肌细胞凋亡、Bax和Bcl-2基因蛋白表达、PKC活性的影响（表2）

与对照组比较，灯盏花素组和福辛普利组凋亡阳性的心肌细胞核数目和心肌细胞凋亡指数(阳性细胞核/总细胞核×100%)、Bax基因蛋白表达阳性的心肌细胞数目及其占总细胞数的百分率均显著增加、Bcl-2基因蛋白表达阳性心肌细胞数目及其占总细胞数的百分率均显著降低(P均<0.01)，但灯盏花素组与福辛普利组比较均无显著性差异(P均>0.05)；灯盏花素和福辛普利均能显著降低SHR心肌细胞膜PKC活性(P均<0.01)，且灯盏花素组降低更明显($P<0.05$)，但两药对SHR心肌细胞浆PKC活性均无显著影响(P均>0.05)。

3 讨 论

灯盏花素是从中药灯盏花中分离得到的黄酮类化合物，又名野黄芩甙元(Scutellarein)，它是灯盏花的有效成份，为较强的非竞争性PKC抑制剂[7]，也具有抗血凝、促纤溶方面的作用，临床上已用于脑血管病及其后遗症的治疗。SHR显著左心室肥厚时其心肌细胞膜PKC活性显著增加，提示PKC活性变化在高血压心脏重塑中起重要作用[8]，所以本实验采用灯盏花素进行为期8周的干预治疗，以便了解PKC抑制剂对SHR左心室肥厚的作用及其机制。结果表明，灯盏花素在显著抑制心肌细胞膜PKC活性的同时其心肌细胞凋亡和细胞凋亡诱导基因(Bax基因)蛋白表达也明显增加，而细胞凋亡抑制基因(Bcl-2基因)蛋白表达明显降低，左心室肥厚指数显著降低。提示PKC抑制剂—灯盏花素可能通过抑制SHR过高的心肌细胞膜PKC活性和调控心肌细胞凋亡相关基因蛋白表达，促进心肌细胞凋亡[9]，改善SHR的左心室肥厚，从而逆转高血压的心室重塑。

福辛普利是第三代含次磷酸基团的长效血管紧张素转换酶抑制剂，其抑制血管紧张素转换酶的作用强而持久，具有较强的降压和逆转心室肥厚的作用[10]。本研究结果显示，福辛普利不仅能显著降低SHR的血压和改善SHR的左心室肥厚及心肌细胞超微结构变化，而且还能显著降低心肌细胞膜PKC活性、增加细胞凋亡诱导基因(Bax基因)蛋白表达、减少细胞凋亡抑制基因(Bcl-2基因)蛋白表达、促进心肌细胞凋亡。这可能是血管紧张素转换酶抑制剂逆转心室重塑的新机制。血管紧张素转换酶抑制剂抑制PKC活性的结果与国外报道一致[11]，但其机制尚不清楚，可能与直接抑制PKC或通过阻断受体后（磷脂酶C-PKC-钙）信号传导通路间接抑制PKC有关。

本文结果提示，PKC抑制剂和血管紧张素转换酶抑制剂均能通过调控细胞凋亡相关基因促进心肌细胞凋亡而改善SHR的左心室肥厚，从而逆转SHR的心室重塑。然而，其调控SHR心肌细胞凋亡相关基因的机制并不清楚，尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 李法琦，陈运贞. 自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡的变化及其意义[J]. 中华心血管病杂志，1999;27:459-463.

[2] Diez J, Panizo AP, Hernandez M, et al. Is the regulation ot apoptosis altered in smooth muscle cell of adult spontaneously hypertensive rats[J]? Hypertension, 1997;29:776-780.

[3] Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin section: in situ end labeling ot fragmented DNA[J]. J Histochem Cytochem, 1993;41:7-12.

（下转第416页）