

芦荟苷预处理对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡、TNF- α 含量和 Ca²⁺-ATPase 活性的影响

黄川锋(南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473003)

摘要: 目的 研究芦荟苷(*Barbaloin*, *Barb*)对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法 结扎大鼠左冠状动脉前降支复制心肌缺血再灌注损伤模型, 实验分为假手术组、缺血再灌注组(IR)、*Barb* 高、低剂量预处理组。采用原位缺口末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡指数(AI), ELISA 法测定血清 TNF- α 水平, 化学法测定线粒体 Ca²⁺-ATPase 活性。结果 与 IR 组比较, *Barb* 组 AI 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Ca²⁺-ATPase 活性明显增高 ($P < 0.05$)。结论 *Barb* 能明显抑制 IR 引起的心肌细胞凋亡, 其作用可能与降低 TNF- α 水平和提高 Ca²⁺-ATPase 活性有关。

关键词: 芦荟苷; 再灌注损伤; 细胞凋亡; TNF- α ; Ca²⁺-ATPase

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)10-0795-03

Effects of *Barbaloin* Pretreatment on Myocardial Cell Apoptosis, the Contents of TNF- α and Activity of Ca²⁺-ATPase in Rats with Ischemia Reperfusion

HUANG Chuanfeng (*Nanyang Medical College, Nanyang 473003, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of *Barbaloin* pretreatment on myocyte apoptosis in rat hearts with acute myocardial ischemia and reperfusion(IR). **METHODS** The left anterior descending branch of coronary artery was ligated to make a myocardial ischemia-reperfusion model in rats. The experiment rats were divided into four groups: sham operation (SO), ischemia-reperfusion (IR), *Barbaloin* (45.90 mg·kg⁻¹·d⁻¹) group. Apoptosis index (AI) of myocardium was detected by TUNEL *in situ* apoptosis assay kit, TNF- α were measured by ELISA and Ca²⁺-ATPase activity of mitochondrial were measured by chemical method. **RESULTS** Compared with IR group, AI and TNF- α was significantly decreased in *Barbaloin* group. Moreover, the activity of Ca²⁺-ATPase was increased in *Barbaloin* group. **CONCLUSION** *Barbaloin* can significantly inhibit cardiomyocyte apoptosis in ischemia-reperfusion rat hearts. The possible mechanism is to reduce TNF- α levels and raise Ca²⁺-ATPase activity in rats.

KEY WORDS: *Barbaloin*; reperfusion injury; apoptosis; TNF- α ; Ca²⁺-ATPase

细胞凋亡是心肌缺血再灌注过程中心肌细胞死亡的重要机制之一, 细胞凋亡的多少决定着缺血再灌注损伤的轻重, 亦对其预后具有重要意义^[1]。目前, 药物预处理已成为防治心肌缺血再灌注损伤的热点之一。诱发细胞凋亡的原因是多方面的, TNF- α 和 Ca²⁺-ATPase 水平与细胞凋亡密切相关^[2]。芦荟药食兼用, 具有强心活血、免疫与抗肿瘤等多方面的药理作用^[3], 而芦荟苷(*Barbaloin*, *Barb*), 作为芦荟的重要活性物质, 是从芦荟中提取得到的蒽醌类化合物。本实验探讨 *Barb* 预处理对心肌缺血再灌注时心肌细胞凋亡及 TNF- α 和 Ca²⁺-ATPase 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及仪器

芦荟苷(中国药品生物制品检定所, 纯度: 98%, 批号: 0787-200103), 使用前用生理盐水配制成 10

mg·mL⁻¹进行灌胃。TUNEL、TNF- α 试剂盒(上海天呈科技有限公司), Ca²⁺-ATPase 试剂盒(南京建成公司)。[TGL-16G高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂), TU-1810紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), 680型全自动酶标仪(美国Bio-Rad公司), RM2135型切片机(德国Leica公司), CX 31显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 实验分组

Wistar大鼠40只, ♂, 体重180~220g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 合格证号: 0017798。将大鼠随机分为4组: 假手术组(sham operation group, SO): 用3号丝线穿过冠状动脉左前降支, 但不结扎; 心肌缺血再灌注组(ischemia reperfusion group, IR): 结扎冠状动脉左前降支, 造成心肌缺血, 30min后剪断缝合线, 取出硅胶管, 再灌注2h; *Barb*低剂量组(*Barb* I组): 手术前给予

作者简介: 黄川锋, 男, 硕士生, 讲师 Tel: (0377) 63526123

E-mail: hcfree@126.com

Barb(45 mg·kg⁻¹·d⁻¹)ig 1周, 其余同IR组; Barb高剂量组(Barb II 组): 手术前给予Barb(90 mg·kg⁻¹·d⁻¹)ig 1周, 其余同 IR 组。假手术组和心肌缺血再灌注组于术前分别给予同体积生理盐水ig 1周。大鼠心肌缺血再灌注模型的复制方法参见文献[4]。

1.3 标本采集与制备

1.3.1 心肌细胞线粒体制备 再灌注2 h末, 迅速剪下左冠状动脉前降支支配的左心室心肌, 取约200 mg, 冰浴中制备10%肌匀浆。将10%组织匀浆用低温离心机离心10 min (2 000 r·min⁻¹), 取上清液以10 000 r·min⁻¹的速度离心15 min, 沉淀物即为线粒体。取少许沉淀物涂片经中性红-詹纳斯绿B染液染色后, 高倍镜下见沉淀被染为亮绿色颗粒即为线粒体。将分离的线粒体用冰冷的匀浆介质制备成混悬液, 超声法破碎线粒体。

1.3.2 心肌组织切片制备 将心肌置于10%福尔马林中固定24 h, 常规石蜡包埋, 切片厚度5 μm, 做凋亡细胞检测。

1.4 指标及检测方法

1.4.1 血清TNF-α含量测定 ELISA法测定, 主要步骤: 分别将血清或不同浓度标准品(100 μL·孔⁻¹)加入反应孔中, 封闭后37 °C孵育90 min; 洗板, 加入生物素化抗体工作液(100 μL·孔⁻¹), 封闭后37 °C孵育60 min; 洗板, 加入酶结合物工作液(100 μL·孔⁻¹)封闭后37 °C孵育30 min; 洗板后加入显色剂100 μL·孔⁻¹, 避光37 °C孵育10 min; 加入终止液100 μL·孔⁻¹, 混匀后出现黄色, 即刻测量OD 450值(5 min内)。每个标准品和标本的OD值应减去空白孔的OD值, 通过标本的OD值在标准曲线上查出其浓度。

1.4.2 线粒体Ca²⁺-ATPase活性测定 吸取制备好的线粒体混悬液100 μL, 采用定磷法测定, 按试剂盒说明书操作。以每小时每毫克组织分解ATP产生的无机磷(Pi)的量表示酶活性, 即 μmol Pi/mg·prot/h。

1.4.3 心肌细胞AI检测 TUNEL法检测心肌细胞凋亡, 主要步骤: 切片脱蜡入水后蛋白酶K(20 μg·mL⁻¹)消化15 min, 新配制的1% H₂O₂甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶(POD), 加入20 μL TUNEL混合液(含TdT酶及fluorescein-dUTP), 湿盒37 °C孵育1 h, PBS液漂洗; 加POD转换液, 37 °C孵育30 min, PBS液漂洗; DAB显色, 苏木素复染。上述步骤中PBS代替TdT反应液作为阴性对照, 正常心肌组织以DNase I(10 μg·mL⁻¹)消化诱导DNA链断裂, 然后重复TUNEL法染色者为阳性对照。凋亡细胞的细胞核呈棕黄色, 正常细胞核呈蓝色。在光学显微镜下计数5个高倍视野, 先计算每个视野阳性细胞数所占细胞总数的百分比, 以5个视野的均值作为凋亡指数。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计程序对数据进行统计学分析, 结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用ANOVA方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞凋亡检测结果

OS组心肌细胞核呈蓝色, 细胞轮廓清楚。IR组出现许多凋亡心肌细胞, 细胞核呈棕黄色, 坏死区细胞结构模糊不清。Barb II组凋亡细胞较Barb I组明显减少, 细胞结构基本完整。结果见图1。

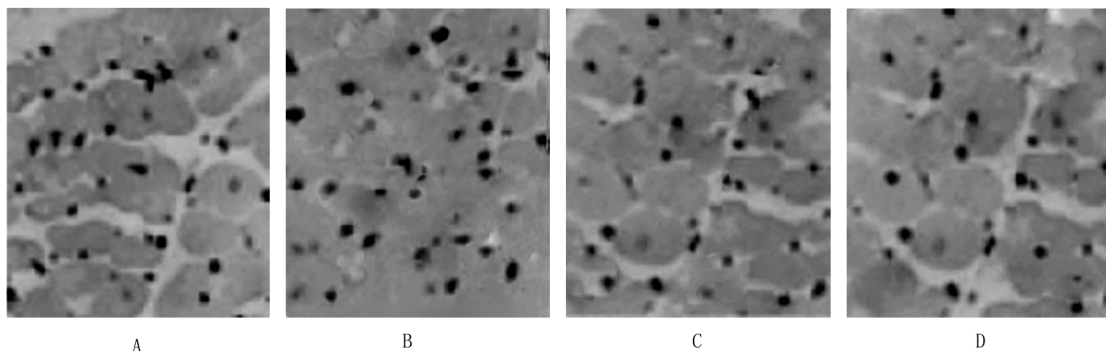


图1 各组大鼠心肌细胞凋亡结果(Tunel法, ×400)

A-SO组; B-IR组; C-Barb I组; D-Barb II组

Fig 1 Apoptotic results of cardiomyocytes (Tunel staining, ×400)

A-SO group; B-IR group; C-Barb I group; D-Barb II group

2.2 AI、TNF-α、Ca²⁺-ATPase结果

各组大鼠心肌细胞AI、线粒体Ca²⁺-ATPase活

性和血清TNF-α含量见表1。由表可见, 与SO组比较, IR组与Barb组的TNF-α水平显著增高,

Ca²⁺-ATPase 活性明显降低。与 IR 组比较, Barb 组 TNF-α 水平明显降低, Barb II 组 Ca²⁺-ATPase 活性显著增高, Barb I 组 Ca²⁺-ATPase 活性未见明显变

化。IR 组和 Barb 组 AI 明显高于 SO 组, 与 IR 组相比, Barb I、II 组的心肌细胞 AI 明显降低。

表 1 各组大鼠心肌 AI、Ca²⁺-ATPase、TNF-α 结果比较(̄x ± s)

Tab 1 Results of AI, Ca²⁺-ATPase and TNF-α (̄x ± s)

组别	Barb 剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	例数	AI/%	Ca ²⁺ -ATPase/ U·mg ⁻¹ prot	TNF-α/ng·L ⁻¹
SO 组	/	10	2.01±0.79	3.38±0.31	40.52±4.36
IR 组	/	10	15.27±2.23 ¹⁾	1.66±0.27 ¹⁾	133.26±10.58 ¹⁾
Barb I 组	45	10	13.15±2.06 ⁴⁾	1.83±0.23 ¹⁾	80.25±6.43 ¹⁾³⁾
Barb II 组	90	10	9.52±1.85 ¹⁾³⁾	2.05±0.36 ¹⁾⁴⁾	56.38±5.52 ²⁾³⁾

注: 与 SO 组相比, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05; 与 IR 组相比, ³⁾P<0.01, ⁴⁾P<0.05

Note: Compared with SO group, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05; compared with IR group, ³⁾P<0.01, ⁴⁾P<0.05

3 讨论

细胞凋亡对缺血再灌注损伤产生重要的影响, 细胞凋亡增多加重缺血再灌注损伤, 减少细胞凋亡则有防止缺血再灌注损伤的作用^[5-6]。药物预处理减少心肌细胞凋亡已成为心肌保护的研究热点之一。细胞凋亡在心肌缺血再灌注损伤中的发生机制可能与钙超载、氧自由基大量产生、凋亡基因调控失调等多方面因素有关, 目前证据显示线粒体功能改变在细胞凋亡中起关键作用^[7]。心脏需氧量很大, 心肌缺血时, 随着 ATP 含量的下降, 线粒体 Ca²⁺-ATPase 活力下降及肌浆网钙摄取能力降低, 使 Ca²⁺内流增加引起“钙超载”, 并在此过程中产生氧自由基, 进一步产生损害作用, 是导致心肌细胞死亡的“最后共同通路”^[8]。TNF-α 是一种促凋亡因子, 它是心肌缺血过程中持续表达的一种重要的参与免疫应答的病理因素, 并通过 NF-κB 信号通路表达而参与再灌注损伤的发生过程。

本实验结果显示, 大鼠心肌缺血再灌注损伤后 TNF-α 水平明显升高, Ca²⁺-ATPase 活性明显降低。经 Barb 干预后, 再灌注损伤心肌细胞 AI 和 TNF-α 水平显著降低, Barb II 组 Ca²⁺-ATPase 活性明显增高(P<0.05), Barb I 组酶活性变化不明显, 可能与 TNF-α 抑制 Ca²⁺-ATPase 活性有关^[9]。研究表明体内的氧自由基可以攻击膜上的 Ca²⁺-ATPase, 使酶蛋白巯基偶联, 从而引起酶活性降低^[10], 会进一步促进缺血再灌注心肌细胞凋亡。由此推测, 芦荟苷抑制心肌缺血再灌注引起细胞凋亡的机制可能与降低 TNF-α 水平和调节 Ca²⁺-ATPase 活性有一定关系, 其作用途径和详尽机制有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] GONG M Y, YU X M, ZHOU X, et al. Effects of total Flavonoid in scutellaria baicalensis stem-leaf on myocyte apoptosis and expression of apoptosis-associated genes in rat hearts with acute myocardial ischemia and reperfusion [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2008, 19 (1):153-154.
- [2] ZHENG B, ZHANG Q H, LI Y R. Research progress of the mechanism of myocardial ischemia reperfusion-injury [J]. J Binzhou Med Univ (滨州医学院学报), 2008, 31 (2): 121-123.
- [3] WU C L. The pharmacological action of aloe and its application [J]. Foreign Med Sci (国外医学 中医中药分册), 2004, 16 (1): 92-94.
- [4] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacological Experimental Methodology (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:1066.
- [5] LI K, ZHENG S Y. Research progress of myocardial reperfusion injury and myocardial apoptosis [J]. Med Recapit (医学综述), 2008, 14 (1):8-10.
- [6] NORDLIE M A, WOLD L E, SIMKHOVICH B Z, et al. Molecular aspects of ischemic heart disease: ischemia / reperfusion induced genetic changes and potential applications of gene and RNA interference therapy [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2006, 11(1):17-19.
- [7] RUIXING Y, AL-GHAZALI R, WENWU L, et al. Pretreatment with probucol attenuates cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia/reperfusion [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2006, 66 (7): 549-551.
- [8] RUAN C W, ZHANG D F, WANG S S, et al. The effects of Huangqi on myocyte apoptosis and the expression of apoptosis-associated genes in rat heart with acute myocardial ischemia and reperfusion [J]. J Tongji Univ: Med Sci (同济大学学报: 医学版), 2003, 24(3):182-184.
- [9] FU C, CAO C M, ZHANG J, et al. Mechanism of negative inotropic effect of tumor necrosis factor-α on rat myocardium [J]. J Zhejiang Univ: Med Sci (浙江大学学报: 医学版), 2003, 32(3):181-186.
- [10] LIU P, XU B, FORMAN L J, et al. L-NAME enhances microcirculatory congestion and cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia-reperfusion in rats [J]. Shock, 2002, 17(3): 185-192.

收稿日期: 2009-03-03