

丹酚酸 B 干预大鼠急性心肌梗死后 心肌细胞失巢凋亡的研究*

孟庆楠, 李广斌, 耿晓丽, 郭茂娟, 范英昌

摘要 [目的] 研究丹酚酸 B(Sal B)对急性心肌梗死大鼠心肌细胞失巢凋亡的作用及其分子机制。[方法] 结扎冠脉左前降支复制大鼠急性心肌梗死(AMI)模型,实验分为假手术组、模型组和丹酚酸 B 组,其中丹酚酸 B 组于术后灌胃 120 mg/(kg·d),连续给药 4 周。各组分别于术后 1、2、4 周,采用放射免疫法检测血浆层黏连蛋白(LN)和型前胶原氨基端肽(P NP)的含量;采用 Masson 染色法检测非梗死区胶原容积分数(CVF);免疫组织化学法检测心肌组织整合素(FAK)和黏着斑激酶的表达;用原位末端标记(TUNEL)法检测心肌细胞的凋亡。[结果] 与假手术组相比较,血浆 LN、P NP 水平均升高($P<0.01$),非梗死区 CVF 升高,整合素和 FAK 的表达降低,心肌细胞凋亡指数增加($P<0.05$)。与模型组相比较,血浆 LN、P NP 水平均有所降低($P<0.01$),非梗死区 CVF 降低,整合素和 FAK 的表达增加,心肌细胞凋亡指数降低($P<0.05$)。[结论] 丹酚酸 B 可以减少急性心肌梗死大鼠心肌细胞的失巢凋亡。

关键词 丹酚酸 B;失巢凋亡;血浆层黏液连蛋白;型前胶原氨基端肽;整合素;黏着斑激酶

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1673-9043(2010)02-0080-04

Study on effect of Salvianolic acid B on apoptosis of myocardial cells after acute myocardial infarction in rats

MENG Qing-nan, LI Guang-bin, GENG Xiao-li, et al

(Department of Pathology, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To study the effect and mechanism of Salvianolic acid B (SalB) on the apoptosis of myocardial cells after acute myocardial infarction (AMI) in Rats. [Methods] Myocardial infarction was induced by ligating the descending left coronary artery in rats. The rats were divided into sham-operated group, model group and Sal B group. Sal B was given with 120 mg/(kg·d) by gastric perfusion for 4 weeks after infarction in Sal B group. The animals in each group were killed after 1 week, 2 weeks and 4 weeks of operation respectively. Radioimmunoassay was used to measure the content of laminin(LN) and Procollagen N-terminal Peptide (P NP) in serum of rats; Masson staining was used to determine collagen volume fraction (CVF) in non-infarcted regions; Immunohistochemical method was applied to examine the expression of integrin and focal adhesion kinase (FAK) in myocardial tissues; TUNEL was used to detect the changes of apoptosis of myocardial cells. [Results] Compared with sham-operated group, content of LN and P NP in serum increased ($P<0.01$) 1 week, 2 weeks and 4 weeks after operation in model group, CVF increased, expression of integrin and FAK decreased, myocardial apoptosis index increased ($P<0.05$); compared with model group, content of LN and P NP in serum was reduced ($P<0.01$) 1 week, 2 weeks and 4 weeks after operation in Sal B group, CVF was reduced, expression of integrin and FAK was increased, apoptosis of myocardial cells index was reduced ($P<0.05$). [Conclusion] Sal B can reduce the apoptosis of myocardial cells after AMI in rats, and its mechanism may be related to reducing the content of LN and P NP in serum, reducing changes of collagen and extracellular

* 基金项目 天津市卫生局课题(7KZ44)。

作者单位 300193 天津中医药大学

作者简介 孟庆楠(1984-),女,2008 级硕士研究生,主要从事中药干预心血管基础研究工作。

通讯作者 范英昌。

matrix in myocardial tissue, and activating integrin and FAK signaling pathway.

Key words: Salviolic acid B; apoptosis; LN; P NP; Integrin; FAK

失巢凋亡又称为“anoikis”,源于古希腊语,意思为无家可归(homelessness)。细胞与细胞外基质(ECM)失去联系后诱导的凋亡定义为失巢凋亡。急性心肌梗死后随梗死时间的延长,心肌细胞会发生失巢凋亡^[1]。丹参是一种应用于心血管疾病的传统中药,丹酚酸 B(SalB)是从丹参水溶性成分丹酚酸中提取的有效单体。研究表明丹酚酸 B 有减轻缺血再灌注损伤模型动物的心肌缺血程度,减小心肌梗死范围,减少氧自由基对心肌细胞的毒害,保护心肌细胞等作用^[2],但是有关丹酚酸 B 对心肌细胞失巢凋亡的作用及机制少有报道。本实验研究了丹酚酸 B 对急性心肌梗死(AMI)后大鼠心肌细胞失巢凋亡的作用,并进一步探讨其相关机制。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器 雄性 SD 大鼠 90 只,体重 180~200 g(军事医学科学院第四研究所);丹酚酸 B(批号:081130,纯度 75%,天津中医药大学一制药厂);血浆层黏连蛋白(LN)、型前胶原氨基端肽(P NP)放射免疫试剂盒(北京北方试剂公司);Masson 三色试剂盒(广州市俚科贸易有限公司);羊抗大鼠黏着斑激酶(FAK)、羊抗大鼠整合素 β_1 、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物有限公司);原位末端标记(TUNEL)试剂盒(罗氏公司);DMX120 型显微镜数码摄像机系统(NIKON 日本);图像分析系统(Image Pro Plus6.0 美国)。

1.2 大鼠心肌梗死模型的制备及分组 实验动物用乙醚全身麻醉后,进行常规备皮消毒,开胸分离心包,在右室流出道与左心房之间,距主动脉根部 2~3 mm 处用 0 号线穿过左冠状动脉前降支,连同一小束心肌一起结扎,心电图显示 ST 段显著抬高时,即表明急性心肌梗死造模成功,随后将心脏送回胸腔,逐层关胸,局部予青霉素注射预防感染,假手术组只穿线而不结扎。去除在术中死亡的大鼠,将造模成功并存活的大鼠,随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(MI 组)、丹酚酸 B 组(SalB 组),每组 24 只。术后丹酚酸 B 组每天定时灌胃,给予丹酚酸 B 120 mg/(kg·d),连续 4 周,其余两组给予等体积的生理盐水灌胃。

1.3 标本留取和处理 各组分别于术后 1、2、4 周随机各取 8 只大鼠,乙醚麻醉后,心尖部取血 3 mL,

放入含有肝素的试管中,离心后吸取血浆,低温保存,迅速开胸,取出心脏并用生理盐水洗净,剪除大血管及附着的结缔组织,称质量放入 4%多聚甲醛溶液中,用于石蜡包埋切片。

1.4 指标检测

1.4.1 病理组织学检查 石蜡切片脱水后,每组取 6 张切片分别做苏木精-伊红(HE)染色,观察大鼠心肌梗死后心肌组织的病理学改变。

1.4.2 血浆层黏连蛋白(LN)和 P NP 含量的测定 采用放射免疫法检测血浆 LN 和 P NP 的含量,严格按试剂盒说明书操作。

1.4.3 Masson 三色法测定胶原容积密度分数(CVF) 每张 Masson 染色切片在放大 400 倍下从非梗死区获取切片图像,随机选取 5 个视野,通过测量选定区域染色组织的面积,将测量的面积与观察下的整个面积的比例来作为每个视野中胶原组织占百分比。富含胶原的血管边界区域不包括在测量范围内。最后取均数 CVF。

1.4.4 免疫组化法检测整合素 β_1 (INT β_1)、激活整合素 FAK 的表达 用病理图像分析仪测 INT β_1 和 FAK 的平均光密度,指标判定标准,心肌组织中 INT β_1 表达:以心肌细胞胞浆内或细胞外基质出现棕黄色颗粒为阳性判定标准。FAK 表达:阳性信号存在心肌细胞、血管内皮细胞及炎细胞胞浆内,镜下呈棕黄色为阳性细胞。免疫组化阳性反应强度,用图像分析系统进行定量分析。阳性反应强度用积分光密度(IOD)表示,IOD 值=阳性反应面积/平均光密度。

1.4.5 原位末端标记法检测心肌细胞凋亡 每张切片在放大 400 倍下从非梗死区获取切片图像,记数每张切片凋亡阳性细胞数目占总心肌细胞数目的比例,计算凋亡细胞指数(AI)。

1.5 统计学处理 数据采用 SPSS(13.0)统计分析软件处理,计量资料所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,先行正态分布及方差齐性检验,再用单因素方差分析进行组间比较。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织病理学改变 光镜下假手术组心肌纤维排列整齐,心肌间质几乎无炎细胞浸润。模型

组心肌纤维肿胀排列紊乱,在梗死后1周和2周心肌间质出现大量炎细胞浸润,4周时大部分坏死心肌被肉芽组织取代,并可见瘢痕形成。丹酚酸B组炎性细胞浸润,瘢痕形成较模型组明显减轻。

2.2 血浆LN和P NP浓度的变化 与假手术组相比较,模型组大鼠血浆LN、P NP的浓度从术后1周、2周和4周逐渐增加,有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相比较,丹酚酸B组大鼠血浆LN、P NP的浓度均有所降低,且2周和4周时有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 大鼠AMI后血浆LN、P NP浓度的

动态变化($\bar{x}\pm s$) $\mu\text{g/L}$

组别	n	LN			P NP		
		1周	2周	4周	1周	2周	4周
Sham组	8	0.88±0.13	0.89±0.06	0.90±0.15	2.72±0.41	2.77±0.63	2.70±0.37
MI组	8	1.76±0.13*	2.85±0.43**	2.98±0.37**	4.31±0.29*	4.95±0.28**	5.97±0.12**
Sal B组	8	1.06±0.18	1.29±0.35 ^Δ	1.42±0.39 ^Δ	3.47±0.56	3.51±0.14 ^Δ	4.54±0.12 ^Δ

注:与假手术组相比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比较,^Δ $P<0.05$ 。

2.3 非梗死区心肌胶原的变化 与假手术组相比较,模型组大鼠CVF在术后1周、2周至4周逐渐增加,有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相比较,丹酚酸B组CVF均有所降低,且2周和4周时有统计学意义($P<0.05$)。Masson染色显示:假手术组心肌间质可见散在的胶原,模型组术后1周、2周至4周间质胶原含量逐渐增加,2周和4周时出现明显纤维化;与模型组相比较,丹酚酸B组胶原含量和纤维化程度均有所减轻。见表2。

表2 非梗死区胶原容积密度分数(CVF)的变化($\bar{x}\pm s$) %

组别	n	1周	2周	4周
Sham组	8	2.13±0.56	2.15±0.48	2.14±0.37
MI组	8	3.48±0.41*	5.24±0.58*	6.21±0.39**
Sal B组	8	2.82±0.61	3.73±0.32 ^Δ	4.69±0.60 ^Δ

注:与假手术组相比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比较,^Δ $P<0.05$ 。

2.4 心肌组织INTβ1、FAK表达的变化 与假手术组相比较,模型组INTβ1、FAK表达在术后1周、2周至4周逐渐降低,有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比较,丹酚酸B组INTβ1、FAK表达均有所增加,且2周和4周时有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.5 心肌细胞凋亡的改变 与假手术组相比较,模型组心肌细胞凋亡指数于术后1周、2周至4周逐渐增加,有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比较,

丹酚酸B组细胞凋亡指数均有所下降,且2周和4周时有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表3 大鼠AMI后心肌组织INTβ1、FAK表达
灰度值的动态变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	INTβ1		
		1周	2周	4周
Sham组	8	2 813.26±161.27	2 806.17±140.08	2 854.92±156.43
MI组	8	1 928.06±132.08*	1 724.35±119.26*	1 550.67±178.54*
Sal B组	8	2 043.26±143.27	1 926.17±106.24 ^Δ	1 797.43±119.28 ^Δ

组别	n	FAK		
		1周	2周	4周
Sham组	8	2 214.32±227.54	2 231.92±208.34	2 205.07±183.45
MI组	8	1 849.28±146.32*	1 680.92±210.76*	1 493.78±197.28*
Sal B组	8	1 927.32±153.05	1 884.67±232.65 ^Δ	1 632.27±207.75 ^Δ

注:与假手术组相比较,* $P<0.05$;与模型组相比较,^Δ $P<0.05$ 。

表4 非梗死区心肌细胞凋亡指数变化($\bar{x}\pm s$) %

组别	n	1周	2周	4周
Sham组	8	0	0	0
MI组	8	3.62±0.45**	11.73±0.82**	19.52±0.49**
Sal B组	8	2.50±0.56	9.83±0.78 ^Δ	14.57±0.67 ^Δ

注:与假手术组相比较,* $P<0.05$;与模型组相比较,^Δ $P<0.05$ 。

3 讨论

急性心肌梗死后随梗死时间的延长,心肌细胞外基质不断改变,心肌细胞会发生“失巢凋亡”。本文从细胞外基质(ECM)出发研究丹酚酸B对失巢凋亡的干预作用。层黏连蛋白(LN)是细胞外基质中一重要成分,对血浆LN的测定可以间接反应机体的黏着水平^[3],P NP是由型前胶原(PC)在内肽酶的作用下而形成,它能间接了解胶原的代谢状态^[4],因此本研究检测了AMI后LN和P NP的改变。AMI后心肌组织最明显的改变是胶原的改变,因此进行了Masson染色,检测胶原容积密度分数(CVF)的变化。研究发现,与假手术组相比较,模型组大鼠于术后1周、2周至4周,血浆LN和P NP的浓度、非梗死区CVF、心肌纤维化逐渐增加,心肌细胞凋亡指数逐渐增加,表明大鼠AMI后随梗死时间的延长,细胞外基质的成分及数量发生改变,心肌细胞所处的微环境不断丧失,心肌细胞逐渐发生失巢凋亡。与模型组相比较,丹酚酸B组大鼠于术后1周、2周和4周,血浆LN、P NP的浓度、非梗死区CVF、心肌纤维化均有所降低,心肌细胞凋亡指数降低,表明丹酚酸B在大鼠AMI后抗心肌细胞外基质的改变,抗心肌纤维化,抗心肌细胞失巢凋

亡方面具有积极的作用。

研究认为,整合素信号途径是失巢凋亡调节的关键部分,整合素是细胞与 ECM 黏着的重要成分,FAK 作为整合素介导信号的传递者,是避免失巢凋亡的很好的候选靶标^[4]。近年来研究发现激活整合素-FAK 信号通路,可下调失巢凋亡的相关信号^[5]。本研究发现,与假手术组相比较,模型组 INTβ1、FAK 的表达在术后 1 周、2 周至 4 周逐渐降低,表明 AMI 后随梗死时间的延长,整合素-FAK 信号通路不断被抑制,细胞凋亡逐渐增加。与模型组相比较,丹酚酸 B 组大鼠 INTβ1、FAK 在术后 1 周、2 周和 4 周的表达均有所升高,细胞凋亡指数降低,表明丹酚酸 B 在大鼠 AMI 后,抗心肌细胞凋亡方面有积极的作用,其作用机制可能与激活整合素 FAK 信号通路有关。

心肌梗死在传统中医学中属于“厥心痛”范畴,丹参是一种活血化瘀中药,在中医学中应用较为广泛,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功能。研究报道其水溶性成分丹酚酸 B 具有心肌缺血再灌注保护作用,抗动脉粥样硬化、抗肝、肾纤维化,抗

肿瘤等多方面的作用。本研究发现丹酚酸 B 在大鼠 AMI 后,具有抗心肌细胞失巢凋亡的作用,为丹酚酸 B 在心血管疾病中的应用提供了更为广阔的前景。

参考文献:

- [1] 龚开政,张振刚.失巢凋亡在心血管疾病发病机制中的作用[J].中国介入心脏病学杂志,2005,13(5):328-330.
- [2] 李克明,付桂香.丹参中丹酚酸 B 的药理研究进展[J].中日友好医院学报,2008,22(6):366-367.
- [3] 陈晓锋,唐礼江,朱敏,等.急性心肌梗死患者血清 C、PC-、LN、HA 水平测定的临床意义[J].苏州大学学报(医学版),2003,23(6):710-711.
- [4] Liu XW, Bernardo MM, Fridman R, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the FAK/PI 3-kinase and MAPK signalling pathway[J]. J Biol Chem, 2003, 279(41):40364-40372.
- [5] Hazl Ehurst L A, Argila Gos RF, Dal Tonw S. Beta1 integrin mediated adhesion increases bimp protein degradation and contributes to drug resistance in leukaemia cells[J]. Br J Haematol, 2007, 136:269-275.

(收稿日期 2009-12-11)

投稿须知:摘要、关键词与正文格式

摘要 临床研究、实验研究、中药研究等栏目的文章,均须附中英文摘要。中英文摘要的文意要一致。采用第三人称撰写,不用“本文”等主语。论著类文稿的摘要形式使用结构式。结构式摘要主要分目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)4 部分。

关键词 各类文稿均须标引关键词。关键词选词要规范,应尽量从美国国立医学图书馆编辑的最新版 Index Medicus 的 Medical Subject Headings (MeSH)词表中选用规范用词,中文译名可参照中国医学科学院医学信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。中医药词汇以中国中医研究院图书情报研究所编著的《中医药学主题词表》为准。未被词表收录的词如确有必要也可作为关键词标注。关键词数目一般 3~8 个,不得少于 3 个,关键词之间用“;”分隔。无摘要的文稿,只需标注中文关键词,关键词置于正文之前;附中英文摘要的文稿须标中英文关键词,中文关键词置于中文摘要下方,英文关键词应与中文关键词相对应,置于英文摘要下方。