

# 复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响

任宏强<sup>1</sup>, 赵利<sup>2</sup>, 王忠<sup>1</sup>, 王丽<sup>1</sup>, 张忠双<sup>2</sup>, 黄辉<sup>1</sup>

(1. 石河子大学医学院第一附属医院心内二科; 2. 石河子大学医学院, 新疆石河子市 832008)

[关键词] 复方丹参滴丸; 急性心肌梗死; 凋亡蛋白

[摘要] **目的** 探讨了复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响。**方法** 45只SD大鼠随机分为假手术组、心肌梗死组和复方丹参滴丸组, 每组15只。假手术组仅作开胸手术, 并于术后行生理盐水灌胃; 心肌梗死组和复方丹参滴丸组结扎大鼠左冠状动脉前降支建立急性心肌梗死模型, 并在术后分别给予生理盐水和复方丹参滴丸治疗。治疗3天后处死大鼠, 取心肌组织, 采用实时荧光定量PCR对大鼠心肌组织中Fas、Fas-L和p53 mRNA进行分析, 采用Western blot对Bcl-2和Bax蛋白水平进行分析, 并采用TUNEL染色法和Western blot分析心肌细胞凋亡情况。**结果** 与假手术组比较, 急性心肌梗死组和复方丹参滴丸组大鼠心肌组织中Fas、Fas-L和p53 mRNA水平明显增加( $P < 0.05$ )。而复方丹参滴丸组中Fas、Fas-L和p53 mRNA水平较急性心肌梗死组显著下降( $P < 0.05$ )。急性心肌梗死组大鼠心肌组织Bcl-2/Bax比值较假手术组明显下降( $P < 0.05$ ), 而复方丹参滴丸组较假手术组差异无显著性。心肌梗死组和复方丹参滴丸组大鼠心肌细胞凋亡指数较假手术组明显增加( $P < 0.05$ )。而复方丹参滴丸组大鼠心肌细胞凋亡指数较心肌梗死组明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** 复方丹参滴丸可明显降低急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡相关蛋白的表达水平, 对抑制急性心肌梗死细胞凋亡有着重要意义。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effect of Compound Danshen Dripping Pill on Apoptosis of Cardiac Muscle Cells and Apoptosis-related Gene Expression in Rats with Acute Myocardial Infarction

REN Hong-Qiang, ZHAO Li, WANG Zhong, WANG Li, ZHANG Zhong-Shuang, and HUANG Hui

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China)

[KEY WORDS] Compound Danshen Dripping Pill; Acute Myocardial Infarction; Apoptosis-Related Protein

[ABSTRACT] **Aim** To explore effect of compound Danshen dripping pill on apoptosis of cardiac muscle cells and apoptosis-related gene expression in rats with acute myocardial infarction. **Methods** 45 healthy majority SD rats were randomly divided into sham operation group, acute myocardial infarction group and compound Danshen dripping pill group. Rats in sham operation group underwent thoracotomy without coronary ligation. Rats in acute myocardial infarction group and compound Danshen dripping pill group underwent with coronary ligation of left anterior descending branch to establish AMI rats model. Rats in sham operation group and acute myocardial infarction group were given physiological saline. Rats in compound Danshen dripping pill group were given compound Danshen dripping pill. After 3 days, killing the rats and isolating the cardiac tissue. Fas, Fas-L and p53 mRNA of cardiac tissue in three group were analyzed by real time PCR. Bcl-2 and Bax in three groups were analyzed by western blot. Apoptosis cells index of cardiac cell in three groups were analyzed by TUNEL and Western blot. **Results** The mRNA of Fas, Fas-L and p53 in acute myocardial infarction group and compound Danshen dripping pill group were significantly higher than that in sham operation group ( $P < 0.05$ ). The mRNA of Fas, in compound Danshen dripping pill group was significantly lower than that in acute myocardial infarction group.

[收稿日期] 2013-05-20

[作者简介] 任宏强, 硕士, 主治医师, 研究方向为高血压与冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 rhq34@sohu.com。赵利, 硕士, 住院医师, 研究方向为急诊重症医学, E-mail 为 420105321@qq.com。通讯作者王忠, 博士, 主任医师, 研究方向为高血压与冠心病的基础与临床研究, E-mail 为 wangzshz@163.com。

tion group ( $P < 0.05$ ). Bcl-2/Bax ratio in acute myocardial infarction group was significantly lower than that in sham operation group ( $P < 0.05$ ), but there was no statistical difference between sham operation and compound Danshen dripping pill group ( $P > 0.05$ ). Apoptosis cells index of cardiac cell in acute myocardial infarction group and compound Danshen dripping pill groups significantly higher than that in sham operation group ( $P < 0.05$ ). Apoptosis cells index of cardiac cell in compound Danshen dripping pill groups significantly lower than that in acute myocardial infarction group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Compound Danshen dripping pill can reduce apoptosis-related gene expression in rats with acute myocardial infarction and inhibit apoptosis of cardiac cell.

急性心肌梗死是临床常见的冠心病类型之一,其发病率、致死率和致残率高,已经成为严重威胁人类健康的疾病<sup>[1,2]</sup>。目前显示在急性心肌梗死早期,心肌细胞主要以凋亡为主,提示在心肌梗死早期有效阻断心肌细胞凋亡,对降低梗死区组织的坏死具有重要的意义<sup>[3]</sup>。近年来研究显示复方丹参滴丸对急性心肌梗死具有较好的治疗效果,可抑制急性心肌梗死患者左心室重构<sup>[4]</sup>。但是关于复方丹参滴丸对缺血后心肌细胞凋亡的影响研究较少。本研究采用大鼠急性心肌梗死模型分析了其对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡蛋白的影响,旨在为其在临床的推广使用提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和试剂

SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司;复方丹参滴丸购自天士力制药股份有限公司;兔抗鼠 Bcl-2 和 Bax 多克隆抗体购自 santa cruz 公司;HRP-羊抗鼠二抗购自 santa cruz 公司;Trizol 购自 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自 TAKARA 公司;SYBR Green 通用型 qPCR Master Mix 购自罗氏生物;Real-time PCR 扩增仪购自 Applied Biosystems;TUNEL 试剂盒购自罗氏生物;Powerlab 多导生理记录仪。

### 1.2 急性心肌梗死模型构建和分组

45 只 SD 大鼠分为假手术组、急性心肌梗死组和复方丹参滴丸组,每组 15 只。所有大鼠称重后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠。固定大鼠,开胸,暴露心脏。假手术组不结扎左冠状动脉前降支。急性心肌梗死和复方丹参滴丸组在左冠状动脉前降支中 1/2 处结扎。可见左心室前壁失去光泽,同时变苍白,大鼠心脏搏动减弱,采用多导生理记录仪监测显示心电图标准 II 导联,ST 段抬高和(或)T 波抬高。以上述标志作为急性心肌梗死建模成功的标志。成功后,所有大鼠关闭胸腔,切口部位局部注射青霉素进行抗感染治疗。24 h 后处死大鼠,取心脏组织进行后续试验。

### 1.3 治疗方法

假手术组和急性心肌梗死组的大鼠在术后用生理盐水灌胃,连续灌胃 3 天,1 次/天;复方丹参滴丸组在术术后灌胃复方丹参滴丸 70 mg/kg,连续灌胃 3 天,1 次/天。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 分析凋亡相关蛋白 mRNA 的表达

将假手术组、急性心肌梗死组和复方丹参滴丸组心肌组织取出后称取 0.1 g,置于 1 mL Trizol,组织匀浆后加入 200  $\mu$ L 的氯仿,混匀,在冰上静置使分层后 12 kr/min 离心 10 min,转移上清于等体积的异丙醇中,冰上静置 30 min 使 RNA 沉淀,然后 12 kr/min 离心 15 min,弃上清,沉淀部分用预冷的 75% 的乙醇溶液洗涤 2 次,8 kr/min 离心 10 min,沉淀即为 RNA,用 DEPC 水处理的双蒸水溶液中。采用分光光度仪测量 RNA 浓度,并分析 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值,分析提取的 RNA 质量。最后采用 TAKARA 逆转录试剂转录成 cDNA。

设计 Fas、Fas-L 和 p53 的 PCR 引物,结果如表 1 所示,采用常规 PCR 对引物特异性和退火温度进行条件优化。然后按照下述反应体系制备反应混合物:5  $\times$  SYBR Green 通用型 qPCR Master Mix 4  $\mu$ L,上游/下游引物(10  $\mu$ mmol/L)各 1  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L,补双蒸水至终体积为 20  $\mu$ L。根据检测样本的数量配制相应的体积,对应加入 PCR 板中,每孔 20  $\mu$ L。离心将液体全部甩至管底,按照下述反应条件进行 PCR:预变性:95 $^{\circ}$ C,30 s;变性:95 $^{\circ}$ C,3 s;退火延伸:60 $^{\circ}$ C,30 s;构建溶解曲线。最后从实时荧光定量 PCR 仪上直接读取数据。

### 1.5 Western blot 分析凋亡相关蛋白的表达

分别取假手术组、急性心肌梗死组和复方丹参滴丸组大鼠心肌组织 0.2 g,置于 200  $\mu$ L 的组织裂解液中,冰上超声破碎后,冰上放置 30 min 后,12 kr/min 离心 5 min,取上清,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度。样品加入 5  $\times$  Loading buffer,沸水煮沸 5 min。然后制备 SDS-PAGE,并进行电泳。电泳结束后采用 BIO-RAD 水平电泳仪将蛋白转移

至 PVDF 膜上,置于 5% 的脱脂奶粉中包被,分别用 5% 脱脂奶粉稀释的兔抗鼠 Bcl-2 和 Bax 工作液包被 PVDF 膜并 4 °C 过夜,次日 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min。再用 5% 脱脂奶粉稀释二抗工作液,室温包

被 30 min 后,加发光液,在 sunshine chemiQ 4800 仪器拍照,同时以  $\beta$ -actin 作为内参,并进行定量分析,目的蛋白质相对表达量 = 目的蛋白质条带灰度值/ $\beta$ -actin 条带灰度值。

表 1. Fas、Fas-L 和 p53 的 PCR 引物序列

Table 1. The PCR primer sequences of Fas, Fas-L and p53

基 因	上游(5'-3')	下游(5'-3')
Fas	CACAGCATT CAGTCCTATCCACAGA	CACAGCCAACCAGATGCTTCA
Fas-L	AAATAGCCAACCCAGCACACC	CAACTTCTTCTCCTCCATTAGCACC
p53	ACAGCGTGTTGGTACCGTAT	GGAGCTGTTGCACATGTACT
$\beta$ -actin	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCA TCGTACTCCTGCTTGCTG

## 1.6 TUNEL 染色法分析细胞凋亡

心肌组织取出后迅速用 4% 的多聚甲醛固定,依次脱水后用石蜡包被,在切片机上切成 5  $\mu$ m 后的切片置于载玻片上,在 65 °C 烤箱烤 10 min,采用二甲苯和乙醇溶液进行脱水处理,然后用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min。此后步骤严格按照 TUNEL 试剂盒操作说明进行操作。然后结束后将标本放大 400 倍,随机选取梗死区和周边区域 10 个视野,计算凋亡细胞占总细胞的比例作为心肌细胞的凋亡指数。

## 1.7 统计分析

所有数据均采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 各组大鼠心肌细胞凋亡蛋白 mRNA 水平分析

急性心肌梗死组和复方丹参滴丸组大鼠心肌组织中 Fas、Fas-L 和 p53 等凋亡相关蛋白 mRNA 水平较假手术组明显增加( $P < 0.05$ )。复方丹参滴丸组大鼠在经过复方丹参滴丸灌胃治疗后心肌组织中 Fas、Fas-L 和 p53 等凋亡相关蛋白 mRNA 水平较急性心肌梗死组明显下降( $P < 0.05$ ;图 1)。

### 2.2 三组大鼠心肌细胞 Bcl-2/Bax 比值分析

急性心肌梗死组梗死区域心肌细胞中 Bcl-2/Bax 比值较假手术组明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 2)。而复方丹参滴丸组梗死区域心肌细胞中 Bcl-2/Bax 比值较急性心肌梗死组明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。虽然复方丹参滴丸组心肌细胞中 Bcl-2/Bax 比值较假手术组低,

但是两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;图 2)。

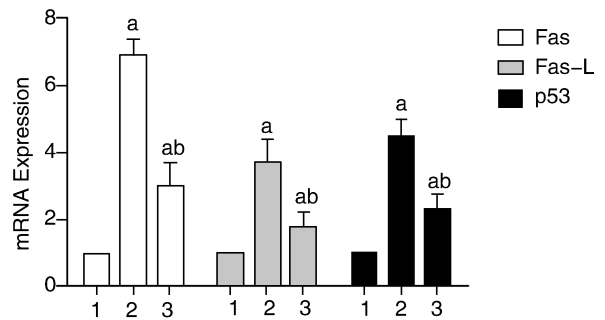


图 1. 3 组大鼠心肌组织中 Fas、Fas-L 和 p53 等 mRNA 水平比较 1 为假手术组,2 为急性心肌梗死组,3 为复方丹参滴丸组。a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与急性心肌梗死组比较。

Figure 1. The comparison of Fas, Fas-L and p53 in three groups of rats myocardial tissue

### 2.3 三组大鼠心肌细胞凋亡水平分析

假手术组心肌细胞凋亡指数仅为 1.80%,而急性心肌梗死组和复方丹参滴丸组凋亡指数分别为 45.28% 和 10.50%,急性心肌梗死组和复方丹参滴丸组凋亡指数明显高于假手术组( $P < 0.05$ )。而复方丹参滴丸组大鼠接受复方丹参滴丸治疗后凋亡指数较急性心肌梗死组显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 3)。

## 3 讨 论

急性心肌梗死时心肌细胞在缺血、缺氧等因素诱导下可发生细胞凋亡,该过程是在诸多的凋亡基因的调控下进行。Bcl-2/Bax 比值在介导细胞凋亡过程中发挥着重要作用。Bcl-2 具有抑制细胞凋亡

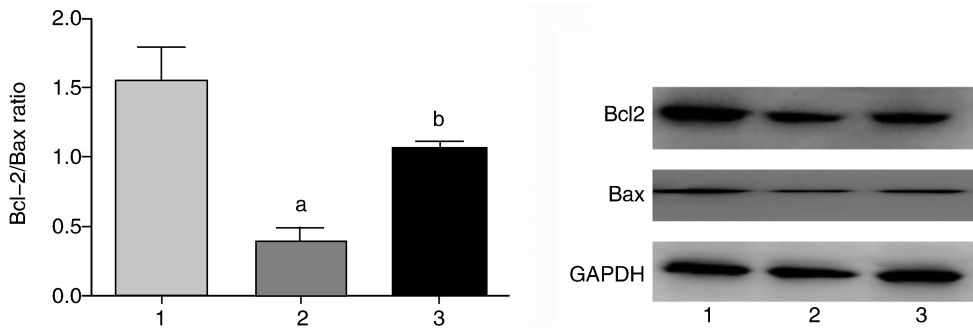


图 2. 三组大鼠心肌细胞 Bcl-2/Bax 比值比较 1 为假手术组, 2 为急性心肌梗死组, 3 为复方丹参滴丸组。a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与急性心肌梗死组比较。

Figure 2. The comparison of Bcl-2/Bax in three groups of rats myocardial tissue

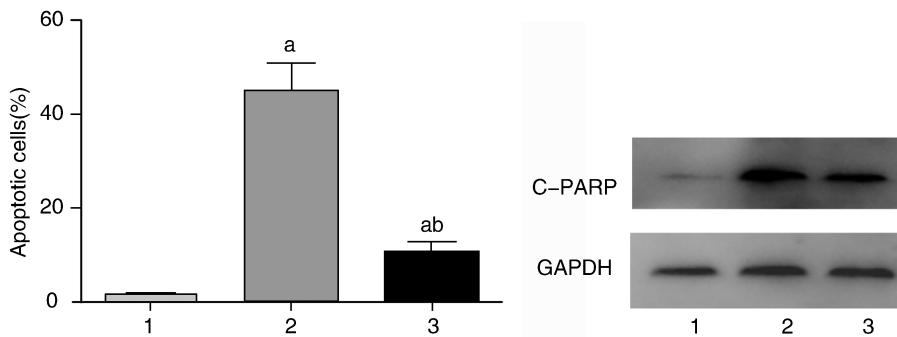


图 3. 三组大鼠心肌细胞凋亡指数比较 1 为假手术组, 2 为急性心肌梗死组, 3 为复方丹参滴丸组。a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与急性心肌梗死组比较。

Figure 3. The comparison of apoptotic in three groups of rats myocardial tissue

的作用, 而 Bax 具有直接促进细胞凋亡的作用, Bcl-2 和 Bax 是正负调控的凋亡蛋白, Bcl-2/Bax 比值决定着细胞区域凋亡还是存活<sup>[5,6]</sup>。近年来研究显示急性心肌梗死患者心肌细胞中 Bcl-2/Bax 比值明显下降<sup>[7-9]</sup>。本研究大鼠心肌梗死区域心肌细胞 Bcl-2/Bax 比值较假手术组明显下降, 提示急性心肌梗死患者梗死区心肌细胞区域凋亡。Fas 和 Fas-L 是另一对与细胞凋亡相关的基因, Fas 和 Fas-L 相互作用, 促进 Caspases-8, Caspase-3 信号通路的激活, 最终可导致细胞凋亡<sup>[10,11]</sup>。研究显示急性心肌梗死患者心肌细胞中 Fas 和 Fas-L 表达上调, 介导了心肌细胞的凋亡<sup>[12,13]</sup>。本研究结果与目前报道一致。p53 是另一个介导细胞凋亡的调节蛋白, 当细胞受到损伤、辐射等影响时, p53 表达上调并介导细胞凋亡<sup>[14,15]</sup>。本实验通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 显示急性心肌梗死区域心肌细胞中 p53 mRNA 和蛋白质水平明显增加, 说明急性心肌梗死细胞存在 p53 介导的细胞凋亡。上述可见, 上述凋亡蛋白的高表达和失衡导致了急性心肌梗死心肌细胞的大量凋亡, 最后坏死, 导致心脏功能受损。因此如

何有效阻断心肌细胞的凋亡, 对降低心肌细胞凋亡, 暂时性保护心脏功能具有重要的意义。

复方丹参滴丸是由丹参、三七、冰片组成, 现代药理学研究证实证明, 其具有扩张冠状动脉血管, 增加冠状动脉血流, 降低心肌耗氧量. 改善心肌缺血, 同时可减少心室重构, 改善心肌功能的作用<sup>[16]</sup>。关于其对进行心肌梗死梗死区心肌细胞的凋亡的影响目前研究较少, 尚未见相关报道。本研究构建了大鼠急性心肌梗死模型, 分析了复方丹参滴丸对大鼠心肌梗死区域心肌细胞凋亡的影响, 旨在为临床复方丹参滴丸治疗急性心肌梗死提供理论依据。

本研究结果显示大鼠急性心肌梗死模型采用复方丹参滴丸治疗后早期急性梗死区域的凋亡蛋白 (Fas, Fas-L 和 p53) mRNA 水平明显下降, 尽管跟假手术组比较仍然偏高, 但是其可下调梗死区域的凋亡。同时复方丹参滴丸组大鼠心肌梗死区域心肌细胞 Bcl-2/Bax 比值明显增加, 提示复方丹参滴丸可抑制心肌细胞的凋亡。本研究进一步采用 TUNEL 染色法分析了复方丹参滴丸处理后大鼠心肌细胞的凋亡水平, 结果显示复方丹参滴丸组大鼠



急性心肌梗死区域心肌细胞的凋亡水平较急性心肌梗死组明显下降,但是与假手术组比较,复方丹参滴丸组细胞凋亡水平仍然较高,说明复方丹参滴丸可对急性心肌梗死区域心肌细胞的凋亡有一定的抑制作用,而无法完全抑制。

综上所述,复方丹参滴丸可明显降低急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡相关蛋白的表达水平,对抑制急性心肌梗死细胞凋亡有着重要意义。

#### [参考文献]

- [1] Wartenberg KE. Malignant middle cerebral artery infarction [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2012, 18(2): 152-163.
- [2] Potu C, Tulloch-Reid E, Baugh D, et al. Left ventricular thrombus in patients with acute myocardial infarction; Case report and Caribbean focused update [J]. *Australas Med J*, 2012, 5(3): 178-183.
- [3] Hojo Y, Saito T, Kondo H. Role of apoptosis in left ventricular remodeling after acute myocardial infarction [J]. *J Cardiol*, 2012, 60(2): 91-92.
- [4] 林小端. 复方丹参滴丸对急性心梗后早期心室重构的临床研究 [J]. *世界中医药*, 2011, 6(2): 111-113.
- [5] Yang YJ, Chen YF, Ruan YM, et al. Beneficial effects of carvedilol on cardiomyocyte apoptosis and bcl-2/bax expression after acute myocardial infarction an experiment with rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2006, 86(13): 919-922.
- [6] Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins; mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1378-386.
- [7] 齐帅. 促红细胞生成素对大鼠急性心肌梗死心肌细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. *中国基层医药*, 2009, 16

(11): 1930-931.

- [8] 陈杰, 沈映冰, 许静, 等. 刺囊酸对缺氧复氧诱导心肌细胞凋亡相关基因表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(2): 135-138.
  - [9] Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction [J]. *Pharmacol Ther*, 2004, 104(1): 1-16.
  - [10] Fertin M, Bauters A, Pinet F, et al. Circulating levels of soluble Fas ligand and left ventricular remodeling after acute myocardial infarction (from the REVE-2 study) [J]. *J Cardiol*, 2012, 60(2): 93-97.
  - [11] 王双双, 孔根现, 杨升华, 等. 骨髓间充质干细胞拮抗氧化型低密度脂蛋白致人脐静脉内皮细胞凋亡 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(2): 105-108.
  - [12] Risti T, Djordjevi VB, Deljanin-Ili M, et al. Serum Fas/FasL levels in dependence on clinical presentations of coronary disease and their relationship with risk factors [J]. *Vojnosanit Pregl*, 2010, 67(7): 537-542.
  - [13] 刘新建, 温慧敏, 黄英, 等. 大鼠缺氧缺血后海马神经元凋亡及凋亡抑制蛋白 XIAP 表达的变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(5): 2323-324.
  - [14] Zhang Y, Köhler K, Xu J, et al. Inhibition of p53 after acute myocardial infarction; reduction of apoptosis is counteracted by disturbed scar formation and cardiac rupture [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(3): 471-478.
  - [15] 沈晓君, 高爱社, 关怀敏, 等. 丹参酮 II A 对兔动脉粥样硬化病灶凋亡相关基因表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(1): 90-92.
  - [16] 王志强, 张国栋. 复方丹参滴丸联合曲美他嗪对慢性充血性心力衰竭心室重构的抑制作用 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2011, 9(4): 397-398.
- (此文编辑 李小玲)