

丁苯酞抑制大鼠急性心肌缺血导致的心肌损伤

孙明褚 俊 朱红军

摘要 目的 探讨丁苯酞(NBP)在大鼠心肌梗死后对心肌细胞线粒体损伤、心肌梗死面积及心肌细胞凋亡的作用。方法 92只雄性SD大鼠分为假手术组8只,模型组、NBP低剂量组、中剂量组和高剂量组各21只。其中模型组和NBP组通过结扎冠状动脉左前降支建立急性心肌梗死模型,假手术组仅开胸,不结扎冠状动脉。采用TUNEL法检测模型组和NBP低、中、高剂量组大鼠梗死区心肌细胞凋亡。电子透射显微镜观察模型组和NBP高剂量组梗死交界区的心肌细胞超微结构。TTC染色分析模型组和NBP高剂量组心肌梗死面积,Western blot法检测模型组和NBP高剂量组大鼠心肌梗死4h后抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax的表达水平。结果 在大鼠急性心肌梗死实验过程中,NBP预处理过的大鼠与模型组相比,NBP中、高剂量组显著减少心肌细胞凋亡($P < 0.05$);NBP高剂量组可显著缩小大鼠急性心肌梗死面积($P < 0.01$),同时可有效抑制线粒体损伤($P < 0.05$);NBP高剂量组可显著提高Bcl-2蛋白表达水平($P < 0.05$)及Bcl-2/Bax的比值($P < 0.05$)。结论 NBP通过提高Bcl-2蛋白表达水平及Bcl-2/Bax的比值,减少线粒体损伤,降低心肌梗死过程中细胞凋亡指数,缩小心肌梗死面积,有效地抑制急性心肌缺血导致的心肌损伤。

关键词 丁苯酞;冠状动脉结扎;线粒体损伤;凋亡指数;心肌梗死

中图分类号 R 541; R 541.41; R 969; R 969.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1206-04

丁苯酞(DL-3-n-butylphthalide, NBP)是从芹菜种子里提取的高纯化合物。有研究^[1]表明NBP在缺血脑组织中具有提高能量代谢、抗氧化作用,促进微循环,减少神经细胞凋亡以及抑制炎症反应的作用。NBP同样被证明可减少内皮细胞缺氧诱导的线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)的形成,线粒体损伤以及线粒体膜电荷的损失^[2]。该研究将观察NBP在心肌缺血过程中对线粒体损伤、心肌细胞凋亡、心肌梗死面积的作用,并初步探讨其机

制。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性SD大鼠92只,清洁级,225~250g,由安徽医科大学实验动物中心提供。NBP(国药准字H20050299,石药集团恩必普药业有限公司);实验用小型呼吸机(HXQ-1型);多道电生理仪(成都仪器厂, RM6240型);电子显微镜(日立, H7600);Image-Pro Plus 6图像分析软件(美国Media Cybernetics公司);Bcl-2抗体(ab32124)和Bax抗体(ab32503)(美国Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌梗死模型建立 将实验用92只SD鼠分为假手术组(8只)、模型组和NBP低、中、高剂量组(各组均为21只)。NBP组用NBP灌胃(将NBP稀释在食用油大豆油制成8mg/ml的NBP溶液备用,低剂量组按20mg/kg,中剂量组40mg/kg,高剂量组80mg/kg灌胃),假手术组和模型组只灌胃大豆油,每日2次,每次1ml/100g。以上各组灌胃饲养1周后制备心肌梗死模型。模型组和NBP组的制备过程相同,将大鼠用戊巴比妥钠腹腔内注射(70mg/kg)麻醉,电生理仪监测心电图,气管插管并连接呼吸机,设定呼吸频率45次/min,潮气量30ml。开胸,以前降支为标志,于左心耳根部下方2mm处结扎冠状动脉左前降支。术后观察心电图出现心肌梗死特征性ST-T抬高幅度超过50%并持续半小时以上者判定为MI模型成功,假手术组不结扎前降支。各组分别于结扎冠脉后4、8、12h取心脏标本。

1.2.2 心肌细胞凋亡检测 模型组和NBP低、中、高剂量组分别于结扎冠脉后4、8、12h取心脏左心室标本,每个时间点7只大鼠。采用TUNEL法检测各组心肌中的凋亡细胞:4%多聚甲醛固定10~24h,常规石蜡包埋切片,然后按照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作。以细胞核中出现绿色颗粒为阳性表达。细胞凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数。

1.2.3 心肌梗死面积测定 分别取假手术组、心梗模型制备成功12h后的模型组和NBP高剂量组大

2014-05-23 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研课题(编号:09A091、13zc006)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院心血管内科,合肥 230001

作者简介:孙明,男,硕士研究生;

褚俊,男,主任医师,教授,责任作者, E-mail: chu-

jun5656@163.com

鼠心脏, TTC 染色法进行心肌梗死面积测定: 将样本切片孵育 1% TTC 溶液 5 min 在 37 °C, 然后固定于 10% 福尔马林溶液 (pH 7.0) 中 20 ~ 24 h。观察到红色区域为非梗死区, 白色组织区域被认定为梗死区。用数码相机对 TTC 染色后的组织进行拍照, 用 Image-Pro Plus 图像分析软件对图像进行分析, 并测算梗死面积测量及占总面积的比例。

1.2.4 心肌超微结构观察 迅速取心梗模型制备成功后 4 h 模型组和 NBP 高剂量组大鼠心尖组织, 切成 1 mm³ 体积大小的样本, 于戊二醛磷酸盐缓冲液、锇酸各固定 2 h, 脱水、包埋、切片、醋酸双氧铀、枸橼酸双重染色, 在 100 kV 透射电镜下 1 : 10 000 观察心肌细胞内线粒体形态及数量的变化。每个线粒体需要评估基质、嵴和外膜的完整性和电镜密度。这 4 个参数按照正常记 1 分, 损伤记 0 分。一个有完整的基质、嵴、外膜和均匀的电镜密度的线粒体被记 4 分, 而一个带有破坏基质、嵴排列紊乱、破坏外膜和低电镜密度的线粒体记为 0 分。每个样本观察 400 个线粒体, 每组观察 7 个样本。

1.2.5 Western blot 法分析 Bax、Bcl-2 表达 于心肌梗死 4 h 后分别取假手术组、模型组和 NBP 高剂量组心脏组织 100 mg 加 1 ml 裂解液, 手动匀浆。注意尽量保持低温, 快速匀浆。1 500 r/min 4 °C 离心 15 min, 吸取上清液, Lowry 法测定蛋白质浓度。总蛋白加入等体积 2 × Loading Buffer, SDS-PAGE 电泳 (5% 浓缩胶, 10% 分离胶) 转 PVDF 膜, 120 V, 1 h, 用含 5 g 脱脂牛乳的 TBS-T 缓冲液 37 °C 封闭 1 h, 加入一抗 Bcl-2 (1 : 800) 和 Bax (1 : 800) 4 °C 过夜。TBS-T 洗膜 3 次, 每次 5 min。加入羊抗小鼠 IgG-HRP (1 : 5 000) 孵育 2 h。显影后, 将胶片置扫描仪上采集阳性条带, 分析实验结果。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 多样本均数的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 NBP 对心肌细胞凋亡的影响 TUNEL 法检测各组心肌细胞凋亡指数与时间点的关系分别见表 1, 与模型组相比, NBP 低剂量组各时间点心肌细胞凋亡指数与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); NBP 中、高剂量组 4、8 h 心肌细胞凋亡指数较模型组显著减少 ($P < 0.05$, $F_{4h} = 4.13$, $F_{8h} = 5.36$), 但 12 h 3 组心肌细胞凋亡指数差异无统计学意义 ($P > 0.05$, $F_{12h} = 2.67$)。见图 1。

表 1 各组大鼠心肌细胞凋亡指数的比较 ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

组别	4 h	8 h	12 h
模型	0.81 ± 0.07	0.48 ± 0.07	0.16 ± 0.02
低剂量	0.79 ± 0.05	0.49 ± 0.03	0.17 ± 0.03
中剂量	0.60 ± 0.06*	0.37 ± 0.03*	0.18 ± 0.02
高剂量	0.44 ± 0.058*	0.35 ± 0.06*	0.18 ± 0.03

与模型组比较: * $P < 0.05$

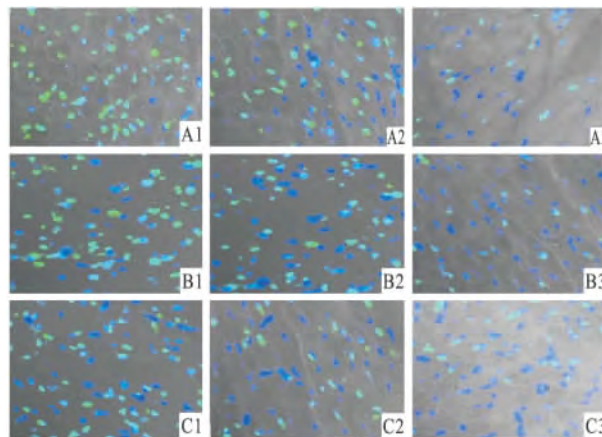


图 1 NBP 对心肌细胞凋亡的影响 TUNEL × 200

A: 模型组; B: NBP 中剂量组; C: NBP 高剂量组; 1: 4 h; 2: 8 h; 3: 12 h

2.2 NBP 对大鼠心肌梗死面积的影响 结果显示: 假手术组无梗死区域, 模型组梗死面积比为 $(49.7 \pm 6.8)\%$, 而 NBP 高剂量组梗死面积为 $(5.9 \pm 1.2)\%$ 。与假手术组相比, 模型组和 NBP 高剂量组心肌梗死面积均显著增大 ($P < 0.01$, $F = 2.94$), 与模型组相比, NBP 高剂量组大鼠急性心肌梗死面积显著缩小 ($P < 0.01$)。见图 2。

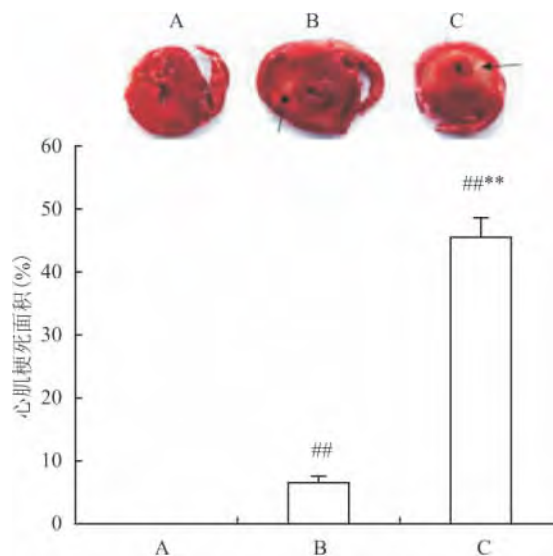


图 2 NBP 对大鼠心肌梗死面积的影响

A: 假手术组; B: 模型组; C: NBP 高剂量组; 与假手术组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

2.3 NBP 对心肌细胞超微结构的影响 假手术组线粒体呈卵圆形, 基质、嵴、外膜以及电镜密度均匀完整, 模型组线粒体减少, 基质肿胀、外膜、嵴均不完整, 电镜密度降低, 细胞内肌纤维紊乱, 线粒体评分低。而 NBP 高剂量组心肌细胞内线粒体损伤较模型组明显改善, 线粒体评分较前者明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

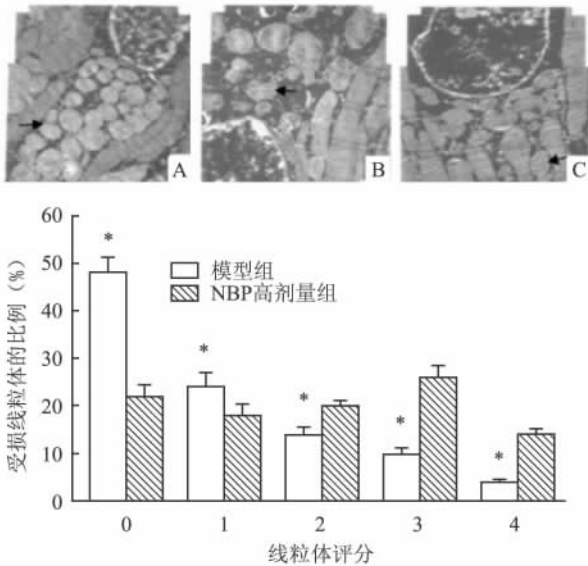


图3 NBP 对心肌细胞超微结构的影响 SP × 10 000
A:假手术组; B:模型组; C:NBP 高剂量组; 与 NBP 高剂量组比较: * $P < 0.05$

2.4 NBP 对 Bcl-2、Bax 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 比值的影响 假手术组、模型组和 NBP 高剂量组梗死 4 h 后, Western blot 法检测 3 组心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平并计算 Bcl-2/Bax 比值, 见图 4、表 2, 与模型组和假手术组比较, NBP 高剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$, $F = 2.16$), 且 NBP 高剂量组 Bcl-2/Bax 的比值较模型组显著提高 ($P < 0.05$)。与 NBP 高剂量组和假手术组比较, 模型组 Bax 蛋白表达水平显著 ($P < 0.05$, $F = 2.47$)。

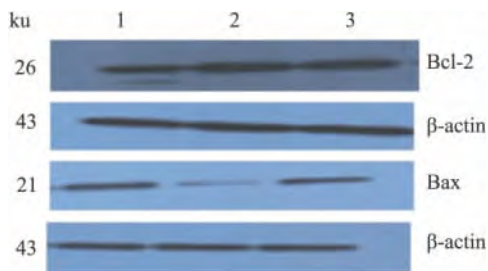


图4 Western blot 法检测 NBP 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平的作用
1:假手术组; 2:NBP 高剂量组; 3:模型组

表2 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平以及 Bcl-2/Bax 比值 ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
假手术	0.77 ± 0.04	0.77 ± 0.05	1.00 ± 0.11
NBP 高剂量	1.31 ± 0.05 [#]	0.32 ± 0.07 [#]	4.31 ± 1.02 [#]
模型	0.80 ± 0.03	1.01 ± 0.09 [*]	0.80 ± 0.08

与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与假手术组比较: ^{*} $P < 0.05$

3 讨论

心肌急性缺血可导致心肌细胞线粒体结构、功能、代谢及膜电位方面发生损伤和改变。大量的细胞及分子水平的研究^[3-4]显示多种细胞因子对线粒体功能有损伤作用, 包括钙离子负荷、ROS 以及促细胞凋亡的 Bcl-2 家族 (Bax/Bak 和 Bid 等)。上述因子及介质可单独或相互作用于线粒体, 改变 MPT。线粒体膜渗透性孔道 (mitochondria permeability transition pore, MPTP) 的打开使线粒体基质增加, 线粒体肿胀。基质膨胀可使线粒体内膜平整, 同时释放促细胞凋亡因子, 减少 ATP 的产生, 增强酶促反应, 进一步促进细胞凋亡^[5]。所以, 抑制 MPT 可减少急性缺血过程中线粒体损伤, 进而降低心肌损伤。本研究显示, 在大鼠在急性心肌缺血过程中, 心肌细胞线粒体出现缺损和肿胀改变明显增多, 而使用 NBP 预处理后大鼠较模型组明显改善, 证实了 NBP 在大鼠急性心肌缺血状态下也可抑制线粒体的损伤程度。

大量文献^[6]报道 Bcl-2 家族蛋白 (包括促凋亡蛋白 Bax/Bak 和 Bid, 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl) 在调节心肌细胞凋亡过程发挥着关键作用。在各种病理过程如心肌缺血状态下, 促凋亡蛋白比率增大。Bcl-2 蛋白通过阻止 Bax/Bak 蛋白的激活调节 MPTP^[7], 同时 Bcl-2 蛋白也可通过阻断孔道开放来提高钙离子超载诱导的 MPTP 的开放的阈值^[8]。文献^[9]报道 Bcl-2 转基因大鼠在缺血/再灌注损伤状态下可大量表达 Bcl-2 蛋白, 心肌细胞凋亡及坏死面积都较对照组有显著减少。本研究显示 NBP 同样可以显著提高 Bcl-2 蛋白表达水平, 降低 Bax 蛋白表达水平, 提高 Bcl-2/Bax 比值。由此可以表明 NBP 对急性心肌缺血过程中线粒体保护效应主要通过提高 Bcl-2 蛋白表达水平, 降低 Bax 蛋白表达水平, 提高 Bcl-2/Bax 比值, 进而提高 MPTP 开放的阈值, 减少线粒体损伤的程度。

现有研究^[10]显示在心肌缺血/再灌注损伤过程中, 抑制心肌细胞凋亡可减少心肌梗死面积达 50% ~ 70%, 同时可有效降低心脏功能紊乱, 且心肌急性缺血 30 min 后就可检测到 Caspase 酶激活, 60

min 后可检测到细胞核内 DNA 链裂解。本研究通过 TTC 染色也验证了大鼠急性心肌缺血后心肌损伤面积较假手术组明显增加,而 NBP 可显著减少大鼠心肌急性缺血导致的心肌梗死面积。同时本研究显示 NBP 在心肌急性缺血后的 4 h 和 8 h,NBP 组心肌细胞凋亡数目均较模型组显著减少,这也证实了 NBP 具有减少大鼠急性心肌缺血导致心肌细胞凋亡。

参考文献

- [1] Zhang T ,Jia W P ,Sun X J. 3-n-butylphthalide (NBP) reduces apoptosis and enhances vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulation in diabetic rats [J]. *Neurol Res* ,2010 ,32(4) : 390 -6.
- [2] Li L ,Zhang B ,Tao Y , et al. DL-3-n-butylphthalide protects endothelial cells against oxidative/nitrosative stress , mitochondrial damage and subsequent cell death after oxygen glucose deprivation *in vitro* [J]. *Brain Res* ,2009 ,1290(1) : 91 -101.
- [3] Gottlieb R A. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* ,2011 ,16(3 -4) : 233 -8.
- [4] Machado N G ,Alves M G ,Carvalho R A , et al. Mitochondrial involvement in cardiac apoptosis during ischemia and reperfusion: can we close the box? [J]. *Cardiovasc Toxicol* ,2009 ,9(4) : 211 -27.
- [5] Karlsson L O ,Zhou A X ,Larsson E , et al. Cyclosporine does not reduce myocardial infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* ,2010 ,15(2) : 182 -9.
- [6] Adams J M ,Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential [J]. *Curr Opin Immunol* ,2007 ,19(5) : 488 -96.
- [7] Gustafsson A B ,Gottlieb R A. Bcl-2 family members and apoptosis ,taken to heart [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* ,2007 ,292(1) : 45 -51.
- [8] Zhu L ,Yu Y ,Chua B H , et al. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice [J]. *J Mol Cell Cardiol* ,2001 ,33(12) : 2135 -44.
- [9] Brocheriou V ,Hagege A A ,Oubenaissa A , et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury [J]. *J Gene Med* ,2000 ,2(5) : 326 -33.
- [10] Toldo S ,Breckenridge D G ,Mezzaroma E , et al. Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in the mouse [J]. *J Am Heart Assoc* ,2012 ,1(5) : e002360.

DL-3-n-butylphthalide inhibits myocardial infarction in acute myocardial ischemia

Sun Ming , Chu Jun , Zhu Hongjun

(Dept of Cardiovascular Medicine , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the effects of DL-3-n-butylphthalide (NBP) on the mitochondria infarction , size of myocardial infarction and myocardial apoptosis after acute myocardial ischemia in rats. **Methods** 92 male SD rats were divided into sham operation group (8 rats) , model group (21 rats) , and low-dose NBP group (21 rats) , medium-dose NBP group (21 rats) , high-dose NBP group (21 rats). The model and NBP groups were made into MI model by ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery , but not in sham-operated group. Model group and NBP group were taken heart specimens after coronary artery ligation. Cardiomyocyte apoptosis was analyzed by TUNEL in each group. Size of MI was analyzed by TTC staining in sham-operated group , model group and high-dose NBP group. Electron perspective microscopy was applied in observing mitochondria infarction in model group and high-dose NBP group after myocardial infarction. The expressions of Bcl-2 protein and Bax protein were detected by Western blot. **Results** Compared with model group , butylphthalide significantly increased expression of Bcl-2 protein ($P < 0.05$) and the ratio of Bcl-2/Bax ($P < 0.05$) , inhibited mitochondria infarction ($P < 0.05$) , reduced myocardial infarct size ($P < 0.01$) and cardiomyocyte apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusion** Butylphthalide significantly inhibits myocardial infarction by increasing expression of Bcl-2 protein and the ratio of Bcl-2/Bax and decreasing mitochondria infarction , reducing myocardial infarct size and cardiomyocyte apoptosis in rats during the acute myocardial ischemia process.

Key words DL-3-n-butylphthalide; coronary artery ligation; mitochondria infarction; apoptosis index; myocardial infarction