

活血胶囊对动脉粥样硬化兔平滑肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

李静 彭宁 刘勤社 周洁 任得志

【摘要】 目的 探讨活血胶囊干预对动脉粥样硬化兔主动脉平滑肌细胞凋亡及凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响。**方法** 通过高脂饮食建立实验性动脉粥样硬化兔动物模型,采用 TUNEL 法检测平滑肌细胞凋亡,SP 免疫组化法检测凋亡相关因子 Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果** 与模型组比较,活血胶囊低、高剂量组均能降低兔主动脉平滑肌细胞凋亡的凋亡指数 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),降低 Bax 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),升高 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),并呈现一定的量效关系 ($P < 0.05$)。**结论** 活血胶囊可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,减少平滑肌细胞凋亡,从而抑制动脉粥样硬化斑块的形成。

【关键词】 活血胶囊; 动脉粥样硬化; 平滑肌细胞凋亡; Bcl-2; Bax

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.07.008

Effect of Huoxue Capsule on the apoptosis of vascular smooth muscle cell and expression of Bcl-2 and Bax protein on rabbits with atherosclerosis LI Jing, PENG Ning, LIU Qin-she, et al. Traditional Chinese Medicine department, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China
Corresponding author: LIU Qin-she, E-mail: drlijing@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of Huoxue Capsule on the apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC) and expression of Bcl-2 protein and Bax protein on rabbits with atherosclerosis. **Methods** The experimental model of rabbits with atherosclerosis were induced by atherogenic diet. The cell apoptosis were detected by TUNEL staining, and the expression of Bcl-2 protein and Bax protein were examined by SP immunohistochemical staining. **Results** Compared with the experimental model of rabbits, treatment with both high dose and low dose of Huoxue Capsule decreased the apoptotic index of VSMC and the expression of Bax protein ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and increased the expression of Bcl-2 protein ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, the effect of treatment with high dose of Huoxue Capsule was better than with low dose of Huoxue ($P < 0.05$). **Conclusion** Huoxue Capsule increased expression of Bcl-2 protein and decreased expression of Bax protein in rabbits with arteriosclerosis, and decreased the apoptosis of VSMC, which might be associated with its inhibiting effect on atherosclerotic plaque.

【Key words】 Huoxue Capsule; Atherosclerosis; Smooth muscle cell apoptosis; Bcl-2;

Bax

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是严重危害人类健康的心血管疾病,其发病率呈逐年上升趋势^[1],近年来随着分子心血管病研究的深入,越来越多的资料表明细胞凋亡参与了 As 的发生、发展

过程,甚至有学者提出细胞凋亡是 As 病变的主要特征,并已经成为 As 领域研究的热点之一^[2]。本研究基于中医学对 As 的气虚血瘀的病机认识,运用活血胶囊对 As 动物模型进行干预,探讨活血胶囊对细

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划(2008BAI51B01);陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项计划(2009ZDKG-85)

作者单位:710068 西安,陕西省人民医院中医科(李静、彭宁、刘勤社、周洁);陕西省中医医院心脏内科(任得志)

作者简介:李静(1975-),硕士,主治医师。研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail: drli560@126.com

通讯作者:刘勤社(1963-),主任医师,硕士研究生导师。研究方向:中西医结合临床和中药药理。E-mail: drlijing@126.com

胞凋亡的影响及其抗动脉粥样硬化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

54 只健康雄性日本大耳白兔,购自西安交通大学医学院动物实验中心,体重 1.5 ~ 2.5 kg。

1.2 实验用药

活血胶囊(主要成分为黄芪、桃仁、红花、牛膝、酸枣仁、川芎、赤芍、枳壳、地黄、桔梗、当归等),国药准字: B20020336, 0.35 g/粒,西安大唐制药有限公司生产。辛伐他汀片,国药准字: H19990366, 40 mg/片,杭州默沙东制药有限公司。戊巴比妥钠,批号: F20030816,中国医药集团上海试剂公司。

1.3 主要试剂与仪器

Bcl-2 多克隆抗体,编号 BA0412, Bax 多克隆抗体,编号 BA0315,武汉博士德生物工程有限公司; TUNEL 检测试剂盒,编号 G3250,美国 Promega 试剂公司。MOTIC Med 6.0 数码医学图像采集与分析系统,厦门麦克奥迪有限责任公司。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及模型制备^[3] 将 54 只大耳白兔随机分为正常对照组 10 只及造模组 44 只。正常对照组喂饲普通饲料,造模组喂饲由普通饲料+1% 胆固醇粉+7.5% 蛋黄粉+2% 猪油配制的高脂饲料。所有实验兔均单笼饲养,自由饮水,每日每只予以 150 g 饲料。喂养 10 周,期间观察动物进食和行为变化,定期称量并记录体重,第 10 周末,将所有实验兔禁食 12 小时以上,经耳缘静脉抽取空腹血检测血清 TC、TG 及 LDL-C 水平,结果显示造模组血脂水平均显著升高;随机选取 4 只造模组兔处死后,剥离主动脉全长,剖开血管壁均可见明显隆起斑块,表明兔 As 模型建立成功。再依据随机数字表将造模组兔分为模型组、辛伐他汀组、活血胶囊高剂量及低剂量组,每组 10 只,各组继续喂饲相应的饲料 10 周。

1.4.2 给药方法 将辛伐他汀片研末、活血胶囊去壳后的内容物,分别用蒸馏水制备混悬液,经胃管给药。参照动物与人体体重等效剂量折算系数,依据每只实验兔的体重,计算出相应的给药剂量。每天 1 次,连续给药 10 周。每 2 周称量体重一次,据此调整给药剂量。其中辛伐他汀为阳性对照药,模型组用等容积的蒸馏水灌胃。干预过程中,有 4 只动物因误灌入气管死亡,3 只因急性肠炎死亡,1 只

死因不明,解剖后发现肝脏多发肿块、破裂。

1.4.3 TUNEL 法检测平滑肌细胞凋亡 留取主动脉瓣上至腹主动脉全长,用 4% 多聚甲醛固定、酒精梯度脱水、透明、石蜡包埋,连续切片,切片厚度 5 μm ,分别作 HE 染色和采用 TUNEL 法检测兔主动脉平滑肌细胞凋亡,在滴加 PBS 视野下,显微镜观察凋亡细胞形态学改变,以细胞核出现褐色者为阳性,每张玻片上随机选取 10 个不同区域,每个区域计数 100 个细胞,计算出每 1000 个细胞中阳性细胞的数量,作为每只实验兔的检测值,取每组实验兔的平均值,以凋亡细胞数占总细胞数的百分比为凋亡指数,进行统计分析。

1.4.4 SP 免疫组化法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

采用 SP 免疫组化法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达,阴性对照应用 PBS 代替一抗。每例切片随机观察 10 个不重叠的 400 倍视野,应用数码医学图像分析系统计算出 Bcl-2、Bax 阳性染色面积与染色强弱相结合的积分光密度(IOD 值),取平均值作为每只实验兔的检测值。

1.5 统计学处理方法

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 分析软件,采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用最小显著差数法(LSD 法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管壁的组织形态学观察

模型组兔主动脉内膜面可见浅黄色斑块样突起,边缘清楚,大小不等,散在或融合成片,光镜下可见血管内膜增厚向管腔隆起,内含大量泡沫细胞和散在粥样坏死灶,血管中膜平滑肌排列紊乱、大量增殖迁入内膜,脂质空泡增多,内皮细胞大量脱落。相比之下,造模组兔主动脉 As 程度相对较轻。正常对照组光镜下血管结构清晰完整,内膜光滑,中膜平滑肌细胞排列整齐,未见泡沫细胞。

2.2 As 兔血管平滑肌细胞凋亡结果分析

模型组及各给药组均可见凋亡的血管平滑肌细胞,发生凋亡的细胞体积缩小,核仁固缩,核染色加深,呈现黄褐色。统计血管平滑肌细胞凋亡数目:模型组平均(241.50 \pm 50.76)个/1000 个,活血胶囊低剂量组平均(204.13 \pm 19.92)个/1000 个,活血胶囊高剂量组平均(164.67 \pm 36.71)个/1000 个,辛伐他汀组平均(164.86 \pm 28.32)个/1000 个。以细胞

凋亡指数作为评价平滑肌细胞凋亡水平指标,表 1 结果显示:模型组细胞凋亡指数最高,各给药组与模型组相比,平滑肌凋亡细胞指数明显减降低,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中以活血胶囊高剂量组和辛伐他汀组细胞凋亡指数降低最为显著($P<0.01$),活血胶囊高剂量组细胞凋亡指数较低剂量组降低幅度更明显($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组动物血管平滑肌细胞凋亡指数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血管平滑肌细胞凋亡指数(%)
模型组	8	24.15±5.08
活血胶囊高剂量组	9	16.47±3.67 ^{bc}
活血胶囊低剂量组	8	20.41±1.99 ^a
辛伐他汀组	7	16.49±2.83 ^{bc}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与活血胶囊低剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

2.3 Bcl-2 和 Bax 免疫组织化学光镜观察及图像分析结果

活血胶囊高、低剂量组,辛伐他汀组及模型组均可见染成棕黄色的 Bcl-2 阳性表达信号,各给药组与模型组相比,Bcl-2 表达均比模型组增多,差异具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),以活血胶囊高剂量组和辛伐他汀组表达增多最显著($P<0.01$),活血胶囊高剂量组的表达值略低于辛伐他汀组,但尚未达到统计学差异;活血胶囊高与低剂量组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);同时各给药组均可见染成棕黄色的 Bax 阳性表达信号,以模型组 Bax 蛋白表达值最高,各给药组阳性表达值均比模型组减少,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),以活血胶囊高剂量组和辛伐他汀组 Bax 表达减少最显著($P<0.01$),两组间比较无显著性差异;活血胶囊高与低剂量组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 活血胶囊对兔 As 斑块内 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2	Bax
		IOD 值($\times 10^6$)	IOD 值($\times 10^6$)
模型组	8	28.51±3.69	47.97±9.45
活血胶囊高剂量组	9	37.71±4.19 ^{bc}	32.25±6.98 ^{bc}
活血胶囊低剂量组	8	33.20±4.50 ^a	40.02±5.83 ^a
辛伐他汀组	7	38.19±5.64 ^{bc}	31.81±8.03 ^{bc}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与活血胶囊低剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨论

血管平滑肌细胞位于血管壁中膜,是构成血管壁结构的重要组成部分,是维持血管张力和功能的主要细胞成分,其结构和功能的改变,是多种心血管疾病的病理生理学基础。近年的研究认为在 As 过程中细胞凋亡始终存在,而巨噬细胞和血管平滑肌细胞是凋亡细胞的主要来源,大量凋亡后的血管平滑肌细胞不能被及时清除,发生继发性坏死,使细胞内的脂质释放并堆积形成脂质池,血管平滑肌细胞凋亡失调和凋亡小体清除不足可能是加剧 As 发展的重要因素。细胞凋亡是受多种因素调控的过程,与其关系最密切的是 B 细胞淋巴瘤/白血病基因 2(b cell lymphoma/leukemia gene 2, Bcl-2)蛋白家族,可以分为两类:一类是抗细胞凋亡基因,代表基因是 Bcl-2 基因,其高表达可阻止多种凋亡因子所致的细胞死亡,延长细胞寿命;另一类是促细胞凋亡基因,代表基因是 Bax 基因,可通过其自身形成的同源二聚体促进细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 在细胞内的表达是决定凋亡是否发生的重要因素^[4],两者一正一负共同调节凋亡发生。

中医学认为 As 发生发展的主要病因病机是气虚血瘀,益气活血法是防治 As 的重要手段之一。大量药理学及中药复方的研究结果明具有益气活血化瘀功效的中药或复方能抑制炎症反应,从而减轻或延缓 As 的进程,增加斑块稳定性^[5-6]。活血胶囊组方针对气虚血瘀这一最基本的病机,首选炙黄芪大补脾胃之元气,生地、当归补血活血,桃仁、红花、川芎、赤芍活血化瘀,全方共奏益气养血、活血化瘀理气安神等功效。前期的临床及动物实验研究表明其能够抗血小板聚集、降低血液黏度、改善微循环,能够有效调节血脂,抑制炎症反应,减少斑块内巨噬细胞浸润等作用^[3]。

本实验发现,与正常对照组比较,As 模型组动脉管腔明显狭窄,粥样斑块广泛形成,动脉内膜增厚,平滑肌细胞核固缩,可见成堆的泡沫细胞,平滑肌细胞凋亡率显著增高,抗凋亡基因蛋白 Bcl-2 表达显著下降,促凋亡基因蛋白 Bax 表达明显升高。活血胶囊能够有效升高血管平滑肌细胞及斑块内 Bcl-2 蛋白的表达,降低血管平滑肌细胞及斑块内 Bax 蛋白的表达,降低血管平滑肌细胞凋亡指数,并显示一定的量效关系,推断活血胶囊可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,减少血管平滑

肌细胞凋亡,从而抑制动脉粥样硬化斑块的形成。

参 考 文 献

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis [J]. Nature, 2000, 407(6801):233-241.
- [2] Vannini N, Pfeffer U, Lorusso G, et al. Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E-selectin expression and modulation as a model [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(3): 221-225.
- [3] 周洁,刘勤社,张晓艳,等.活血胶囊对家兔动脉粥样硬化斑块稳定性的影响[J].中药新药与临床药理,2011,22(5): 528-531.
- [4] Sukhotnik I, Voskoboinik K, Lurie M, et al. Involvement of the bax and bcl-2 system in the induction of germ cell apoptosis is correlated with the time of reperfusion after testicular ischemia in a rat model[J]. Fertil Steril, 2009, 92(4):1466-1469.
- [5] 莫新民,曾英,侯斌,等.稳斑方对模型兔动脉粥样硬化斑块稳定性的影响[J].中医杂志,2009,50(8):740-742.
- [6] 牛晓玲,孙志广,陆茵.活血化痰中药抗动脉粥样硬化慢性炎症反应的研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(9): 36-38.

(收稿日期:2012-05-10)

(本文编辑:刘群)

破格救心汤治疗严重心力衰竭安全性研究

黄臻 温珊 颜芳 梁伟雄 徐国峰 陈党红 孙良生 张锦祥 邓贤斌 曾祥琿 罗士针 原嘉民

【摘要】 目的 破格救心汤中破格重用超常规剂量的附子以治疗严重心力衰竭,本研究通过临床观察探讨其用药安全性。**方法** 采用前瞻性、同期、开放、对照试验设计,选择 54 例符合入选标准的严重心力衰竭患者分别进入常规治疗组和破格救心汤组,常规治疗组给予抗心衰标准治疗,破格救心汤组在此基础上加用破格救心汤,疗程 2~3 周。观察两组患者用药前后的生命体征、全血细胞分析、肝功能(谷丙转氨酶、谷草转氨酶)、肾功能(尿蛋白、尿素、肌酐),持续心电监测,判断不良事件,采集安全性数据。**结果** 破格救心汤组治疗过程中未出现附子中毒症状,治疗后复查血常规、肝肾功能无异常,治疗全程无异常心电波动,未出现严重不良反应。**结论** 破格救心汤治疗严重心力衰竭具有良好的安全性。

【关键词】 破格救心汤; 心力衰竭; 安全性

【中图分类号】 R541.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.07.009

Clinical study on security effects of Poge Jiuxin Decoction treating patients with congestive heart failure HUANG Zhen, WEN Shan, YAN Fang, et al. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine Classic Clinical Application of Base, Guangzhou 510370, China

Corresponding author: HUANG Zhen, E-mail: 13610140005@139.com

【Abstract】 Objective Observation of clinical safety in patients with chronic cardiac insufficiency (heart function grade III-IV) patients for heart failure treatment with the additional treatment of taking Poge Jiuxin Decoction. **Methods** This is a pioneering study. Over the same time period, using an open, non-randomized controlled trial design, 54 subjects who met the inclusion criteria were selected who were experiencing an acute exacerbation of their chronic heart failure condition. They were divided into the treatment

基金项目:广东省中医药局 2010 年建设中医药强省科研课题(2010383)

作者单位:510370 广州,广东省中医院中医经典临床应用研究基地[黄臻(博士研究生)、温珊、颜芳、徐国峰、陈党红、孙良生、张锦祥、邓贤斌、曾祥琿、罗士针];广东省中医院 GCP 办公室(梁伟雄);广州中医药大学[原嘉民(硕士研究生)]

作者简介:黄臻(1977-),女,2008 级在读博士研究生,主治医师。研究方向:中医药综合疗法治疗急危重症及疑难杂症。E-mail: 13610140005@139.com