

# 通阳活血方含药血清对兔缺血再灌注窦房结细胞凋亡和细胞骨架蛋白 Vinculin 的影响

刘如秀 彭杰 刘宇

**【摘要】 目的** 探讨治疗病态窦房结综合征的通阳活血方含药血清对模拟缺血再灌注损伤兔窦房结细胞凋亡和细胞骨架蛋白 Vinculin 的影响。**方法** 取新生乳兔窦房结细胞,以缺氧缺糖模拟缺血,以恢复氧和糖的供应模拟再灌注造成窦房结细胞损伤模型。设正常对照组、模型组、空白血清组、含药血清高、中、低剂量组,运用酶标仪、流式细胞分析仪、激光共聚焦显微镜观察各组窦房结细胞活性、凋亡及细胞骨架蛋白 Vinculin 形态的变化。**结果** 模型组活细胞量较正常组明显减少 ( $P<0.01$ );凋亡明显增多 ( $P<0.01$ );空白血清组与模型组无明显差异。细胞骨架蛋白 Vinculin 裂解明显。含药血清高、中、低剂量组活细胞量明显高于模型组 ( $P<0.05$ ),凋亡明显减少 ( $P<0.01$ ), Vinculin 结构较模型组完整,荧光强度明显高于模型组。**结论** 通阳活血方含药血清能抑制模拟缺血再灌注引起的窦房结细胞损伤;通阳活血方治疗病态窦房结综合征的机制可能与保护窦房结细胞活性、对抗细胞凋亡、保护细胞骨架蛋白 Vinculin 形态结构有关。

**【关键词】** 通阳活血方; 含药血清; 窦房结细胞; 缺血再灌注; 细胞凋亡; 细胞骨架  
**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.10.008

**Influence of Tongyang Huoxue Formula drug serum on apoptosis and Vinculin expression of sinoatrial node cells of rabbit with inchemia reperfusion** LIU Ru-xiu, PENG Jie, LIU Yu. Internal Medicine-Cardiovascular Department, Guang'anmen Hospital, Beijing 100053, China  
Corresponding author: LIU Ru-xiu, E-mail: favouritebrook1@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the influence of Tongyang Huoxue Formula drug serum on apoptosis and Vinculin expression of sinoatrial node cells of rabbit with ischemia reperfusion. **Methods** Sinoatrial node cells of newborn rabbits were separated and used to establish the sinoatrial node cells damage models by using methods of oxygen-glucose deprivation instead of ischemia and oxygen-glucose supply instead of reperfusion. The research included control group, model group, blank serum group, and high, middle and low dosage of Tongyang Huoxue Formula drug serum group. Microplate reader, flow cytometer and laser scanning confocal microscope were used to observe the activity, apoptosis and Vinculin expression of sinoatrial node cells. **Results** Compared with control group, the living cells number of model group were lessened significantly ( $P<0.05$ ), and cell apoptosis increased obviously ( $P<0.01$ ). The difference between blank serum group and model group was not significant. The cleavage of cytoskeletal protein Vinculin was obviously. Compared with model group, the living cells number of high, middle and low dosage of drug serum groups were higher ( $P<0.05$ ), cell apoptosis decreased significantly ( $P<0.01$ ), and the structure of Vinculin was more integrity and fluorescence intensity was stronger. **Conclusions** Tongyang Huoxue Formula drug serum could inhibit the sinoatrial node cells damage induced by simulated ischemia reperfusion, and the mechanism might be related with protective effect in cell viability and

基金项目: 国家自然科学基金(81173447)  
作者单位: 100053 北京,中国中医科学院广安门医院心内科  
作者简介: 刘如秀(1954-),女,本科,主任医师,博士生导师,博士后指导老师。研究方向:中西医结合防治心血管疾病。E-mail:favouritebrook1@163.com

cytoskeletal protein form and anti-apoptosis effect.

**【Key words】** Tongyang Huoxue Formula; Drugserum; Sinoatrial node cell; Ischemia reperfusion; Apoptosis; Cytoskeleton

病态窦房结综合征(sick sinus syndrome, SSS)是由于窦房结或其周围组织病变,导致冲动形成和传出障碍而产生的心律失常和一系列临床表现的综合征。通阳活血方是刘志明老中医临证 70 余年治疗 SSS 的经验方,临床疗效确切<sup>[1]</sup>。本实验采用酶标仪、流式细胞分析仪、激光共聚焦显微镜,观察通阳活血方含药血清对模拟缺血再灌注兔窦房结细胞凋亡和骨架蛋白形态结构的影响,探讨其对体外培养窦房结细胞的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

出生 24 小时内新西兰乳兔,雌雄不拘,由北京隆安实验动物养殖中心提供,批号:11401400000095。

### 1.2 实验药物

通阳活血方药物组成:附子 6 g、红参 10 g、当归 12 g、黄芪 18 g、三七 3 g,经水煎醇提法制成含 1 g/mL 生药的无菌中药原液。含药血清制备方法:取成年新西兰大耳白兔 40 只(由北京隆安实验动物养殖中心提供,批号:11401400000095),雌雄各半,用随机数字表法随机分为 4 组,每组 10 只,通阳活血方含药血清大剂量组按照每日生药量 54.96 g/kg·体质量(相当于 70 kg 成人临床用药量 12 倍)、中剂量组按照每日生药量 27.48 g/kg·体质量(相当于 70 kg 成人临床用药量 6 倍)、小剂量组按照每日生药量 13.74 g/kg·体重(相当于 70 kg 成人临床用药量 3 倍),分别用蒸馏水配置成混悬液给兔灌胃,每天 2 次,连续 7 天;空白血清组给予等量正常饮用水。末次给药前禁食不禁水 12 小时,给药后 2 小时,耳中央动脉取血,自然分离血清,56℃ 水浴 30 分钟灭活处理,0.2 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装为通阳活血方含药血清大、中、小剂量组和空白血清组,−20℃ 冷存备用。

### 1.3 试剂

DMEM/F12(1:1)培养基(美国 Thermo 公司产品,批号:NVJ0307);胎牛血清(美国 Gibco 公司产品,批号:911585);低糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司产品,批号:DM121501D);胰酶(美晨公司,批号:C1401130);PI-Annexin V-FITC 凋亡检

测试剂盒(北京大学医学部制剂室);一抗:Monoclonal Anti-Vinculin antibody(美国 Sigma 公司产品,批号:SAB4200080);二抗:Gote Anti-Mouse IgG(H+L) Rhodamine(TRITC)(美国 Bioworld 公司产品,批号:BS11502)。

### 1.4 主要仪器

酶标仪(550 型,美国);流式细胞分析仪(BD, 美国);激光共聚焦显微镜(TCS-NT 型,德国);防震台(TMC63544,美国)。

### 1.5 方法

1.5.1 窦房结细胞的分离、培养 新生 24 小时内的乳兔 8 只,吸入乙醚麻醉,用 75% 酒精消毒乳兔皮肤及手术区。沿前正中线剪开胸腔,暴露心脏,将心底部大血管剪断,游离心脏,尽量保留大血管,用 PBS 充分清洗心脏,解剖镜下分离窦房结区域(上腔静脉与右心房交界处),用 PBS 清洗分离的组织,剪碎呈约 0.5 mm,置于 15 mL 离心管中,加入 0.1% 胰酶 10 mL,37℃ 下,消化 15 分钟,消化完毕,加入 5 mL 含血清培养基终止消化,用移液枪上下吹打 70 次,离心 400 r/min,5 分钟,将上清液移入另一 50 mL 离心管,将沉淀的组织块再加入 0.1% 胰酶 10 mL,同前法消化,终止消化后,吹打,离心,取上清细胞悬液与第一次的细胞悬液合并,如此重复一次,将三次所得的细胞悬液合并至 50 mL 离心管,1500 r/min 离心 10 分钟,弃上清,用含血清培养基 6 mL 重新悬浮细胞。取 4 个 10 cm 培养皿,各加入 10 mL 培养基,将细胞悬液等分移入培养基中,置于 37℃、CO<sub>2</sub> 浓度 5% 的细胞培养箱中孵育 1 小时(差速贴壁),光镜下观察,可见大量纤维细胞,间质细胞贴壁,将上浮细胞取出置于另 4 个培养皿中培养,24 小时后更换新培养基,之后每 48 小时更换培养基。

1.5.2 模拟缺血再灌注模型建立及实验分组 以缺氧缺糖模拟缺血,以恢复氧和糖的供应模拟再灌注,用不含胎牛血清的低糖培养基置换原培养基,放入自制的密闭盒中,持续通以 N<sub>2</sub> 充分排尽盒内空气,以模拟缺血。放入培养箱中培养 16 小时后从密闭盒中取出,更换为正常培养基,以模拟再灌注培养 3 小时。

将细胞分为正常对照组、模型组、空白血清组、含

药血清高、中、低剂量组。含药血清高、中、低剂量组及空白血清组分别加入相应兔血清(终浓度 10%),预先培养过夜(约 8 小时)。造模更换培养基时加入相应含药血清,造模后取窦房结细胞进行实验。

1.5.3 细胞活性检测 将细胞种植于 96 孔板中,分组,每组取 8 个复孔,造模后,倒弃培养基,相应检测孔内加入噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)工作液 100  $\mu$ L,于培养箱内孵育 3 小时,取出吸除 MTT 工作液,加入 DMSO100  $\mu$ L,摇匀,待颜色变化,立即上酶标仪检测(设定波长 570nm)。

1.5.4 细胞凋亡检测 调整待测细胞浓度为( $5\times 10^5$ )~( $1\times 10^6$ )个/ $\text{mL}$ 。分组,每组 6 个样本,造模后,将细胞消化转移至流式离心管内,1500rpm,4℃离心 5 分钟,弃上清。加入 1 mL 预冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,同上法离心,弃上清,重复 3~4 次,加入 200ul Binding Buffer,轻轻震荡,使细胞悬浮。加入 10  $\mu$ L Annexin V-FITC,轻轻摇匀,避光,室温反应 15 分钟,加入 5ul PI,即上机检测。

1.5.5 细胞骨架蛋白 tubulin 形态观察 14mm 盖玻片放入 24 孔板中进行细胞爬片,细胞贴壁后,选取生长良好的细胞进行实验。分组,造模后吸除培养基,PBS 清洗 2 次,以 4% 多聚甲醛固定 10 分钟;吸除多聚甲醛,加入 0.02% Triton,37℃培养箱内静置 15 分钟打孔。PBS 清洗 3 次,加入一抗(1:500PBS 溶液),放入湿盒内,4℃冰箱孵育过夜;PBS 清洗 2 次,加入二抗(1:200PBS 溶液)常温孵育 1 小时,甘油封片后上机检测,每组取 4 个视野,图像采用 Image-Pro Plus 6.0 进行平均荧光强度分析。

1.6 统计学方法

采用统计程序包 SPSS13.0 软件对数据资料进行统计分析,计量资料均用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组数据均服从正态分布,方差齐,多组间资料

比较采用完全随机方差分析,两两比较采用 LSD 检验,以  $P<0.05$  为差异显著,以  $P<0.01$  为差异极显著。

2 结果

2.1 通阳活血方含药血清对窦房结细胞活性的影响

MTT 比色检测结果显示,模型组活细胞量明显低于空白对照组( $P<0.01$ ),证明造模方法可行。空白血清组与模型组比较无统计学意义( $P>0.05$ ),表明兔血清对实验无明显干扰,含药血清高、中、低剂量组活细胞量明显高于模型组( $P<0.05$ ),显示通阳活血方含药血清能保护窦房结细胞活性,见表 1。

2.2 通阳活血方含药血清对窦房结细胞凋亡的影响

流式细胞分析仪检测结果如图 1 显示,模型组细胞凋亡率明显高于正常对照组( $P<0.01$ )。空白血清组与模型组无明显差异,含药血清高、中剂量组细胞凋亡率明显低于模型组( $P<0.05$ ),低剂量组凋亡率与模型组比较无统计学意义,见表 1。

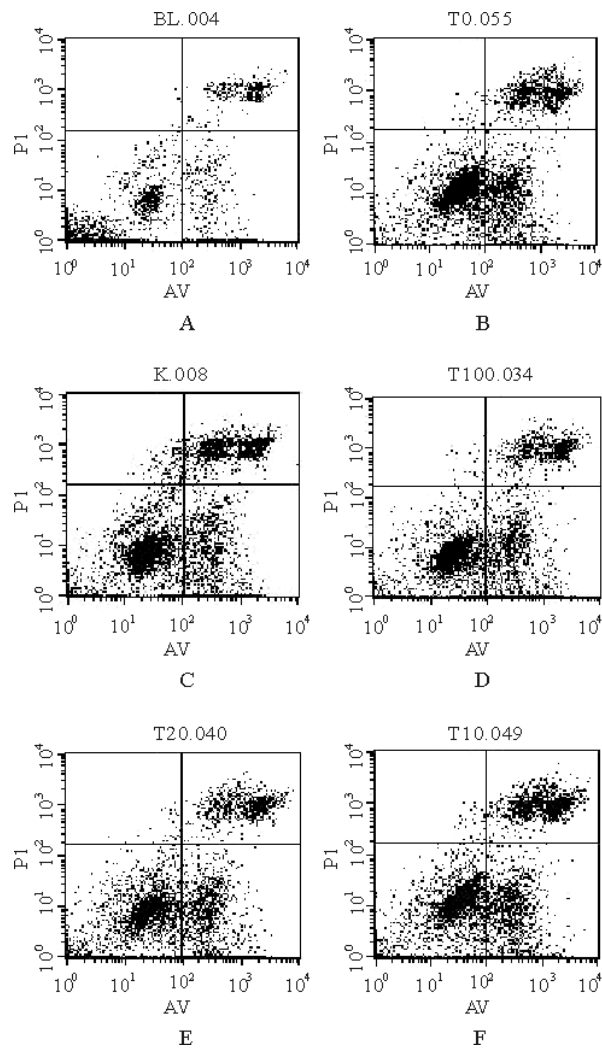
2.3 通阳活血方含药血清对窦房结细胞骨架蛋白 Vinculin 的影响

激光共聚焦显微镜观察结果显示,空白对照组细胞内 Vinculin 显色明显,数量较多,均匀分布于细胞膜附近(图 D);模拟缺血再灌注后的窦房结细胞质内 Vinculin 数量明显减少(图 C),平均荧光强度明显低于空白对照组( $P<0.01$ )(表 1);含药血清高剂量组 Vinculin 数量较模型组明显增多,显色明显(图 D),平均荧光强度明显高于模型组( $P<0.01$ )(表 1);中剂量组 Vinculin 数量较空白组有所减少,但明显优于模型组(图 E);空白血清组及低剂量组 Vinculin 数量较模型组无明显差异(图 B、D)。可见通阳活血方含药血清能保护缺血再灌注窦房结细胞 Vinculin 的形态结构。

表 1 各组兔窦房结细胞活性、凋亡率及平均荧光强度

组别	细胞活性( $n=8$ )	总凋亡率(%) ( $n=6$ )	Vinculin 荧光强度( $n=4$ )
空白对照组	0.711±0.022 <sup>a</sup>	25.735±6.693 <sup>a</sup>	7.742±0.300 <sup>a</sup>
模型组	0.499±0.055	47.993±2.541	4.499±0.432
空白血清组	0.469±0.067 <sup>c</sup>	46.953±3.361 <sup>c</sup>	4.525±0.542 <sup>c</sup>
含药血清低剂量组	0.570±0.052 <sup>b</sup>	49.472±4.233 <sup>c</sup>	4.480±0.196 <sup>c</sup>
含药血清中剂量组	0.612±0.056 <sup>a</sup>	44.040±1.941 <sup>b</sup>	5.692±0.334 <sup>a</sup>
含药血清高剂量组	0.669±0.048 <sup>a</sup>	40.123±4.326 <sup>a</sup>	7.825±0.448 <sup>a</sup>

注:与模型组比较 <sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较 <sup>b</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较 <sup>c</sup> $P>0.05$ 。



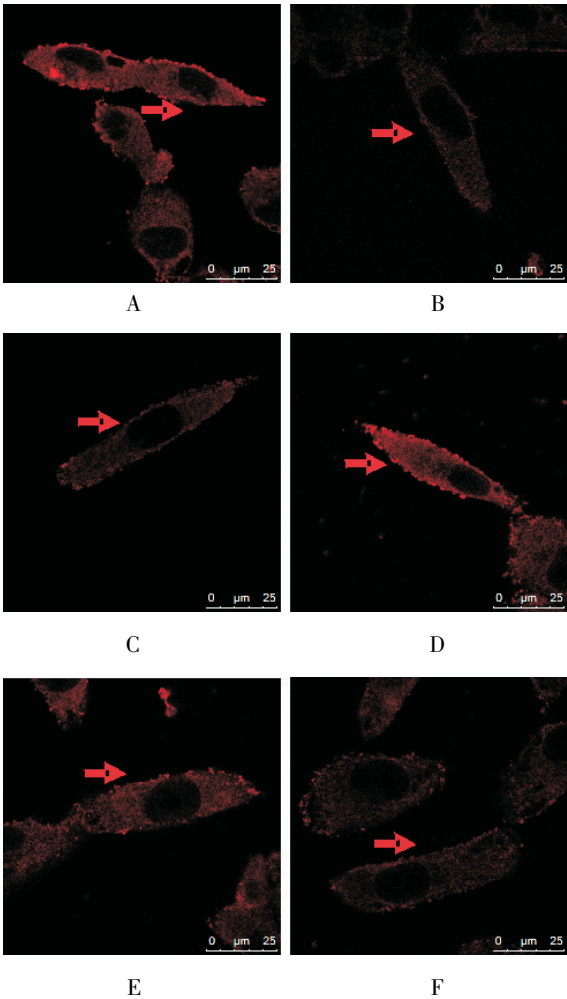
A. 空白对照组 B. 空白血清组 C. 模型组  
D. 高剂量组 E. 中剂量组 F. 低剂量组  
图 1 各组流式细胞分析图像

3 讨论

细胞凋亡在心脏传导系统的发育成熟中具有重要的作用,窦房结、房室结与传导阻滞细胞的胚胎发育及出生后数周的发育过程中均有细胞凋亡发生,在窦房结的发育、成熟过程中,凋亡不足可留下引发心率失常的基础,凋亡过度可引起病态窦房结综合征等病变<sup>[2]</sup>。模拟缺血再灌注可诱导培养窦房结细胞凋亡,且随缺血时间的延长,窦房结细胞凋亡率逐渐增加<sup>[3]</sup>。鉴于病窦的发病常伴随缺血性心脏病的出现,故窦房结缺血再灌注损伤所致的细胞凋亡可能是其病因之一。

心肌骨架系统破坏是缺血再灌注损伤主要的发生机制<sup>[4]</sup>,Vinculin 是细胞骨架系统中重要成分之一,Vinculin 在细胞中与细胞微丝骨架相连,并将

微丝锚定于细胞膜上,vinculin 也介导细胞外基质与细胞骨架的连接,Vinculin 在维持细胞形态、调节细胞粘附、运动、增殖及细胞膜内外信号转导等过程中起重要作用<sup>[5]</sup>。



A. 空白对照组 B. 空白血清组 C. 模型组  
D. 高剂量组 E. 中剂量组 F. 低剂量组  
图 2 各组 Vinculin 激光共聚焦显微镜图像

通阳活血方是刘志明老中医临证 70 余年治疗病态窦房结综合征的有效经验方。刘老认为病窦的病机为心肾阳虚、瘀血阻滞,主要证候为阳虚血瘀。心阳不振,心脉失于温煦鼓动,气血运行不利;心阳不能外达,导致阳气郁闭不通,属本虚标实之证,治宜以“通阳活血”为基本法则。通阳活血方由附子、人参、当归等组成。附子辛甘性热,能温心肾之阳;人参大补元气,能助附子之温,振奋心阳,有扶正祛邪之功;当归补血活血,温通经脉,使阳气外达。诸药相配,共奏“通阳活血”之功。

本实验 MTT 检测结果中,模型组与空白对照组存活细胞量有明显差异,表明造模方法可行;空白

血清组与模型组无明显差异,显示兔血清对实验结构无干扰。含药血清高、中、低剂量组存活细胞量都明显高于模型组,且呈浓度依赖的量效关系,表明药物浓度选取有效可行。流式细胞检测结果显示,模型组细胞大量凋亡,证实缺血再灌注是导致窦房结细胞的凋亡的可能原因;含药血清高、中剂量组细胞凋亡率明显低于模型组,显示通阳活血方能减少细胞凋亡是其治疗病窦的可能机制之一。

激光共聚焦显微镜观察显示空白对照组细胞 Vinculin 显色明显,数量较多,均匀分布于细胞膜附近;模型组 Vinculin 数量明显减少,表明缺血再灌注使 Vinculin 大量裂解;Vinculin 的破坏能导致胞质中微丝失去锚定点,使骨架网状结构受损,细胞膜失去支持、脆性增加;细胞膜内外信号转导受阻,从而使窦房结细胞在形态结构及功能方面发生病理改变。而含药血清高、中剂量组 Vinculin 都有不同程度的明显增加。以上实验结果表明通阳活血方保

护骨架蛋白 Vinculin 是其治疗病态窦房结综合征的可能机制之一。

## 参 考 文 献

- [1] 刘金凤,汪艳丽,徐利亚,等. 益气通阳方治疗病态窦房结综合征临床观察[J]. 中国中医药信息杂志,2014,4(21):1-4.
- [2] James TN. Apoptosis in congenital heart disease[J]. Coron Artery Dis, 1997, 8(10):599-616.
- [3] 钟理,宋治远. 模拟缺血-再灌注诱导原代培养乳鼠窦房结细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报,2001,1(23):59-61.
- [4] Iwai K, Hori M, Kitabatake A, et al. Disruption of microtubules as an early sign of irreversible ischemic injury. Immunohistochemical study of in situ canine hearts[J]. Circ Res, 1990, 67(3):694.
- [5] Ziegler WH, Gingras AR, Critchley DR, et al. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin [J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36 (Pt 2):235-239.

(收稿日期:2014-11-24)

(本文编辑:蒲晓田)