

· 基础研究 ·

人参皂甙 Rb₁ 与 Re 抗大鼠实验性缺血再灌注
心肌细胞凋亡及相关基因蛋白表达

曾和松 刘正湘 刘晓春

【摘要】目的 观察人参皂甙 Rb₁ 和 Re 对缺血再灌注心肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax、Bad、Fas 基因蛋白表达的影响,探讨人参皂甙 Rb₁ 和 Re 抑制心肌细胞凋亡的可能机制。方法 结扎 Wistar 大鼠左冠状动脉前降支(LAD),建立大鼠缺血再灌注动物模型;采用透射电镜、缺口末端标记法检测心肌凋亡细胞,利用光学显微镜进行细胞计数;免疫组织化学检测 Bcl-2、Bax、Bad、Fas 基因蛋白表达,并利用图象分析系统测量平均光密度值进行定量分析。结果 ①假手术组未发现心肌凋亡细胞;缺血再灌注组心肌凋亡细胞数为 134.45 ± 45.61 个/视野, Rb₁ 治疗组为 51.65 ± 13.71 个/视野, Re 治疗组为 90.66 ± 19.22 个/视野, 3 组间有显著差异 ($P < 0.01$); ②缺血再灌注组、Rb₁ 治疗组及 Re 治疗组 Bcl-2、Bax、Bad、Fas 基因的表达均较假手术组明显增加 ($P < 0.05$), Rb₁ 治疗组和 Re 治疗组 Bcl-2 的表达与缺血再灌注组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 而 Bax、Bad、Fas 的表达明显下降 ($P < 0.05$), Rb₁ 抑制 Bax 基因蛋白表达的效应较 Re 更为明显 ($P < 0.05$)。Rb₁ 治疗组和 Re 治疗组 Bcl-2/Bad、Bcl-2/Bax 以及 Bcl-2/Fas 比值均较假手术组及缺血再灌注组明显增加, Rb₁ 治疗组 Bcl-2/Bax 比值较 Re 治疗组增大。结论 心肌缺血再灌注诱导心肌细胞凋亡, 人参皂甙 Rb₁ 和 Re 治疗则可以显著减少缺血再灌注心肌细胞的凋亡, 其机制可能是抑制了促凋亡基因 Bax、Bad、Fas 的表达, 并使 Bcl-2/Bax、Bcl-2/Bad 以及 Bcl-2/Fas 比值增大。Rb₁ 抑制心肌细胞凋亡的作用较 Re 更好。

【关键词】 人参皂甙 Rb₁; 人参皂甙 Re; 缺血再灌注; 心肌细胞凋亡; 基因表达

Effect of ginsenoside-Rb₁ and Re against cardiomyocyte apoptosis and expression of the related gene proteins in the experimental cardiac ischemia-reperfusion in rats ZENG He-song*, LIU Zheng-xiang, LIU Xiao-chun.

* Department of Cardiology of Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of ginsenoside Rb₁ and Re on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Bad and Fas gene proteins after acute ischemia and reperfusion in rats and elucidate the possible mechanisms. Methods The ischemia-reperfusion heart model was made by ligating the left anterior descending branch of coronary artery in Wistar rats. The apoptotic cardiomyocytes were confirmed with transmission electron microscopy and counted with in situ nick labeling (TUNEL) method and light microscopy. The expression of Bcl-2, Bax, Bad and Fas gene proteins were studied by immunohistochemical staining. Mean optical density (OD) value of the gene proteins expression were quantitatively examined by image analysis system. Results A. The apoptotic cardiomyocytes were not observed in the sham-operation group. The number of the apoptotic cells were 134.45 ± 45.61 /field in the ischemia-reperfusion group, 51.65 ± 13.71 /field in the ginsenoside Rb₁-treated group and 90.66 ± 19.22 /field in the ginsenoside Re-treated group, respectively. The differences were significant among the three groups ($P < 0.01$); B. Bcl-2, Bax, Bad and Fas gene expressions were increased significantly in the ischemia-reperfusion group, ginsenoside Rb₁ and Re-treated group compared with the sham-operation group ($P < 0.05$). There were no significant difference in terms of the Bcl-2 gene expression among the ginsenoside Rb₁ and Re-treated group and the ischemia-reperfusion group ($P > 0.05$), but Bax, Bad and Fas gene expression were decreased significantly in the ginsenoside Rb₁ and Re-treated group as compared with the ischemia-reperfusion group ($P < 0.05$). Expression of Bax gene protein was inhibited significantly in the ginsenoside Rb₁-treated group as compared with the ginsenoside Re-treated group ($P < 0.05$). The ratios of Bcl-2/Bax, Bcl-2/Bad and Bcl-2/Fas were increased significantly in the ginsenoside Rb₁ and Re-treated group as compared with those in the ischemia-reperfusion group and sham-operation group. The ratio of Bcl-2/Bax was greater in the ginsenoside Rb₁-treated group compared with the ginsenoside Re-

基金项目:湖北省自然科学基金(No. 2000J050)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科(曾和松、刘正湘);华中科技大学同济医学院神经生物学系(刘晓春)

treated group. **Conclusion** Myocardial ischemia-reperfusion could induce cardiomyocyte apoptosis, and ginsenoside Rb_1 and Re could significantly inhibit cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats. Ginsenoside Rb_1 and Re inhibited cardiomyocyte apoptosis by inhibiting expression of pro-apoptotic Bax, Bad and Fas gene and raising the protein expression ratios of Bcl-2/Bax, Bcl-2/Bad and Bcl-2/Fas. Effect of Ginsenoside Rb_1 was more effective in inhibiting cardiomyocyte apoptosis than ginsenoside Re.

【Key words】 Ginsenoside Rb_1 ; Ginsenoside Re; Ischemia/reperfusion; Cardiomyocyte apoptosis; Gene expression

近年来的研究表明,人参与人参皂甙对动物以及人体外循环手术的心肌再灌注损伤有保护作用^[1-3]。Gottlieb 等^[4]指出心肌细胞凋亡在心肌缺血再灌注损伤中起关键性作用。最近我们通过大鼠的在体实验发现人参对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,并且能抑制缺血再灌注所诱导的心肌细胞凋亡^[5]。人参皂甙为人参的主要成分,目前已确定结构的人参皂甙单体至少有 30 种以上,其药理效应不尽相同。人参皂甙 Rb_1 和 Re 分别为人参二醇组组分和人参三醇组组分。人参皂甙 Rb_1 和 Re 对缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响及相关基因蛋白表达尚未见报道。本研究拟应用人参皂甙 Rb_1 和 Re 治疗实验性心肌缺血再灌注大鼠,观察其对心肌细胞凋亡和 Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 基因蛋白表达的影响,并比较两者对抑制心肌细胞凋亡及基因表达的差异。

材料与方法

一、材料和动物分组

采用健康成年 Wistar 大鼠(清洁级,同济医学院实验动物中心提供)20 只,体重 200 ~ 250 g,雌雄不限,随机分为假手术组、缺血再灌注组、人参皂甙 Rb_1 治疗组(Rb_1 治疗组)和人参皂甙 Re 治疗组(Re 治疗组),每组各 5 只。兔抗大鼠 Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,分别由北京中山公司和武汉博士德公司提供。细胞凋亡检测试剂盒-POD 为德国 Boehringer Mannheim 公司产品。人参皂甙 Rb_1 和 Re(简称 Rb_1 和 Re)由中国药品生物制品检定所提供,批号分别为 0704-2000 和 0216-2000。

二、动物模型的制作

乙醚麻醉,从左侧胸骨旁第 3 ~ 4 肋间开胸挤出心脏。在动脉圆锥和左心耳交界处高位结扎左冠状动脉前降支(LAD)后,将心脏放回原位,关闭胸腔。30 min 后再次用上述方法挤出心脏,松解 LAD 的结扎部位后将心脏放回胸腔内。伤口局部给予青霉素粉剂抗感染,然后缝合皮肤。各组的手术步骤及给药方法如下。

1. 缺血再灌注组:缺血 30 min,再灌注 6 h,结扎 LAD 前 10 min 舌下静脉注射生理盐水 10 ml/kg 体重。
2. Rb_1 治疗组:缺血 30 min,再灌注 6 h,结扎 LAD 前 10 min 舌下静脉注射 Rb_1 20 mg/kg 体重(0.2%

Rb_1 生理盐水溶液 10 ml/kg 体重)。

3. Re 治疗组:缺血 30 min,再灌注 6 h,结扎 LAD 前 10 min 舌下静脉注射 Re 20 mg/kg 体重(0.2% Re 生理盐水混悬溶液 10 ml/kg 体重)。

4. 假手术组:手术步骤与以上 3 组基本相同,但只穿线而不结扎 LAD,穿线前 10 min 舌下静脉注射生理盐水 10 ml/kg 体重。

以上 4 组大鼠均于再灌注 6 h 断头处死,立即开胸取出心脏用冰冷生理盐水洗涤后取左心室前壁缺血和再灌注部位心肌组织(假手术组取左心室前壁相应部位的心肌组织),经 4% 多聚甲醛(含 1% DPEC)固定后常规石蜡包埋,6 μ m 切片待检。

三、透射电镜观察

缺血再灌注组及假手术组大鼠断头处死后,迅速取左心室前壁心肌组织 0.5 ~ 1 mm³,用冰冷生理盐水冲净血液,立即浸于 3% 戊二醛中固定 1 h,反复冲洗后用 1% 锇酸固定 3 h,然后酒精梯度(无水乙醇、95%、90%、80%、70%)脱水,环氧树脂渗透、包埋,超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双染色后进行电镜观察。

四、TUNEL 法凋亡心肌细胞检测

1. 石蜡切片常规脱蜡至水。
2. 3% H_2O_2 孵育 10 min 以消除内源性过氧化氢酶的活性。
3. 20 μ g/ml 蛋白酶 K 37℃ 消化 15 min。
4. 滴加 TUNEL 反应液 37℃ 孵育 2 h。
5. 加正常羊血清 37℃ 孵育 30 min,以中和负电荷防止非特异性染色。
6. 滴加转换 POD 液 37℃ 孵育 40 min。以上每步后均以 PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次。
7. DAB/ H_2O_2 37℃ 显色 3 min。
8. 苏木素复染 30 s,水洗,脱水,透明,封片。

阳性反应:以细胞核呈棕褐色示心肌细胞凋亡阳性,在光学显微镜 200 倍下观察每个视野中的凋亡细胞数,每组计数 100 个视野(每组 5 只大鼠各取 1 张切片,每张切片取 20 个视野),然后取其均值作为此组的代表值。

五、免疫组织化学检测基因蛋白的表达

1. 石蜡切片常规脱蜡至水。
2. 3% H_2O_2 孵育 10 min 以消除内源性过氧化氢

酶的活性。蒸馏水冲洗, PBS 浸洗 5 min。

3. 滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育 15 min。

4. 分别滴加兔抗 Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 蛋白多克隆抗体(每张切片仅滴加一种抗体), 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 min × 3 次。

5. 滴加生物素标记羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 15 min, PBS 洗涤 3 min × 3 次。

6. 滴加辣根酶标记链霉素卵白素, 37℃ 孵育 15 min, PBS 洗涤 3 min × 3 次。

7. DAB 显色, 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 封片。

阳性反应: 以细胞浆呈棕褐色为 Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 蛋白表达阳性, 在光学显微镜 400 倍下用图象分析系统测量光密度值, 每组选 10 个视野(每组 5 只大鼠各取 1 张切片, 每张切片取 2 个视野)分别测量, 然后计算均值作为此组的代表值。

六、统计学处理

全部数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 作两样本均数差异的 t 检验。

结 果

一、心肌细胞凋亡的形态学观察

透射电镜发现假手术组心肌细胞胞核大小、形态正常, 染色质分布均匀, 仅在胞浆中出现线粒体肿胀、少量肌丝溶解等手术损伤性改变, 未见明显的凋亡性改变。缺血再灌注后则出现胞核皱缩、染色质边集、胞浆浓缩、细胞体积缩小等凋亡特征性改变。

二、心肌凋亡细胞计数

假手术组未检出心肌凋亡细胞(图 1)。缺血再灌注组(图 2)、Rb₁ 治疗组(图 3)和 Re 治疗组(图 4)均检出不同程度的心肌凋亡细胞。缺血再灌注组心肌细胞凋亡数为 134.45 ± 45.61 个/视野, Rb₁ 治疗组为 51.65 ± 13.71 个/视野, Re 治疗组为 90.66 ± 19.22 个/视野, 3 组间比较均有显著差异($P < 0.01$)。缺血再灌注后凋亡心肌细胞显著增多, Rb₁ 和 Re 治疗组心肌凋亡细胞较缺血再灌注组显著减少, 说明缺血再灌注可以诱导心肌细胞发生凋亡, Rb₁ 和 Re 可以显著抑制缺血再灌注所致的心肌细胞凋亡。但 Rb₁ 抑制心肌细胞凋亡的作用较 Re 更好。

三、Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 基因蛋白表达

缺血再灌注组、Rb₁ 和 Re 治疗组 Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 基因蛋白表达较假手术组均明显增加。Rb₁ 和 Re 治疗组 Bax、Bad 和 Fas 基因蛋白表达较缺血再灌注组显著下降, 而 Bcl-2 基因蛋白的表达与缺血再灌注组无显著差异。假手术组与缺血再灌注组的 Bcl-2/Bax、Bcl-2/Bad、Bcl-2/Fas 比值均比较接近, 而 Rb₁ 和 Re 治疗组上述比值则较前两组明显增大。Rb₁ 治疗组 Bax 基因蛋白表达明显低于 Re 治疗组, 其 Bcl-2/Bax 比值明显大于 Re 治疗组。

结果显示: 缺血再灌注后 Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 基因蛋白表达明显增加, Rb₁ 和 Re 治疗后使 Bax、Bad、Fas 基因蛋白表达明显降低, 但 Rb₁ 和 Re 对缺血再灌注所诱发的 Bcl-2 基因蛋白的表达的增加无抑制作用。说明 Bcl-2/Bax、Bcl-2/Bad、Bcl-2/Fas 比值增大是因为 Bax、Bad、Fas 基因蛋白表达受到抑制, 使抑制心肌细胞凋亡的 Bcl-2 基因蛋白功能相对增强所致。Rb₁ 抑制 Bax 基因蛋白表达的效应较 Re 更为明显, 因此 Rb₁ 治疗组 Bcl-2/Bax 比值较 Re 治疗组大, 具体数据见表 1。

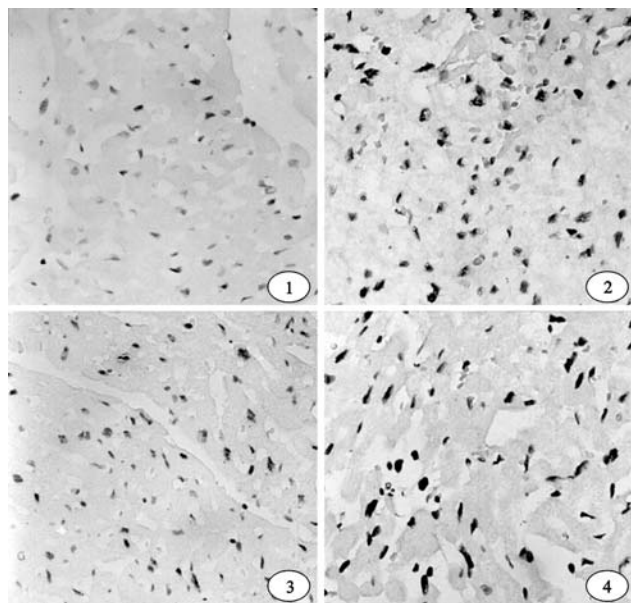


图 1 假手术组未见心肌凋亡细胞(TUNEL × 200); 图 2 缺血再灌注组心肌凋亡细胞(TUNEL × 200); 图 3 Rb₁ 治疗组心肌凋亡细胞(TUNEL × 200); 图 4 Re 治疗组心肌凋亡细胞(TUNEL × 200)

表 1 4 组心肌细胞 Bcl-2、Bax、Bad、Fas 基因蛋白表达光密度值及比值

组 别	Bcl-2	Bax	Bad	Fas	Bcl-2/Bax	Bcl-2/Bad	Bcl-2/Fas
假手术组	0.0700 ± 0.01414	0.0960 ± 0.02716	0.1010 ± 0.02025	0.0680 ± 0.01229	0.7292	0.6931	1.0294
缺血再灌注组	0.1190 ± 0.03446 *	0.2070 ± 0.03945 *	0.1370 ± 0.00823 *	0.0900 ± 0.01767 *	0.5749	0.8686	1.2796
Rb ₁ 治疗组	0.1250 ± 0.02953 ##	0.1150 ± 0.02121 △△	0.1192 ± 0.01541 #△△	0.0700 ± 0.02309 △	1.0870	1.0487	1.7857
Re 治疗组	0.1350 ± 0.02799 ##	0.1200 ± 0.02789 ##△△	0.1160 ± 0.02716 △	0.0750 ± 0.01958 △	0.9167	1.1638	1.8000

注: 缺血再灌注组与假手术组比较, * $P < 0.01$; Rb₁ 和 Re 治疗组与假手术组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Rb₁ 和 Re 治疗组与缺血再灌注组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

讨 论

细胞凋亡是一种受基因调控的主动性细胞死亡,表现为凋亡信号通路的启动及相关基因的表达。Bcl-2 是其中一种关键的抑制细胞凋亡基因,Bax、Bad 和 Fas 则是细胞凋亡的促进基因^[6-9]。Bcl-2 基因家族成员通过相互竞争形成同型或异型二聚体调控线粒体变化,间接调节蛋白酶和核酸酶活性,从而双相调节细胞凋亡。有研究发现,Bcl-2 家族蛋白质的活性由其磷酸化状态及其与其他家族成员形成同型或异型二聚体的能力所控制^[10],并且形成同型或异型二聚体的能力依靠其相对数量及其磷酸化状态^[11]:一方面 Bcl-2 与 Bax 结合形成异型二聚体而使 Bax 失活;另一方面如 Bcl-2 被磷酸化或 Bad 与 Bcl-2 相结合,Bax 就从该二聚体中释放出来,游离的 Bax 然后可以形成诱导细胞死亡的同型二聚体,当其易位到线粒体后破坏线粒体膜的功能,进而导致细胞色素 C 及 apaf-1 释放入胞浆,启动 Caspase 酶系级联反应从而导致细胞凋亡。许多研究发现 Fas 在心肌细胞中有丰富的表达,提示心肌细胞是 Fas/FasL 死亡受体信号转导途径介导细胞凋亡的靶器官^[12-15];并且在缺血再灌注的动物模型中发现心肌细胞凋亡数量明显增加,同时伴有 Fas 水平的明显增加^[15,16]。Fas 与 FasL 结合后,Fas 三聚化而被激活,使接头蛋白 FADD/MORT1 结合到 Fas 上,并通过 FADD 的 N 末端的死亡效应子结构域(death effector domain, DED)结合 caspase-8,促进其自身活化,从而触发细胞死亡级联反应^[17],导致细胞凋亡。研究发现凋亡终点事件的发生不仅与凋亡促进基因的表达密切相关,而且依赖于凋亡抑制基因表达产物与凋亡促进基因表达产物之间的比值^[18,19]。

本研究再次证实心肌缺血再灌注可诱导心肌细胞凋亡,并且发现人参皂甙 Rb₁ 和 Re 均有显著减少缺血再灌注心肌细胞凋亡的作用。而 Rb₁ 抑制心肌细胞凋亡的作用较 Re 更好。通过免疫组化检测发现,心肌缺血再灌注使 Bcl-2、Bax、Bad 和 Fas 基因的表达明显增加,Rb₁ 和 Re 治疗明显抑制 Bax、Bad、Fas 基因的表达,但对缺血再灌注所诱发的 Bcl-2 基因蛋白表达的增加无明显抑制作用,导致 Bcl-2/Bad、Bcl-2/Bax、Bcl-2/Fas 比值的增大。证实了缺血再灌注损伤是通过诱导 Bax、Bad 和 Fas 的表达增加而导致心肌细胞凋亡。人参皂甙 Rb₁ 和 Re 通过下调缺血再灌注时心肌细胞中的促凋亡基因 Bax、Bad 和 Fas 的表达,从而增大 Bcl-2/Bax、Bcl-2/Bad、Bcl-2/Fas 比值,通过上述机制起到抑制缺血再灌注心肌细胞凋亡的作用,从而减轻心肌缺血再灌注损伤。另外,Rb₁ 治疗组 Bax 基因蛋白表达明显低于 Re 治疗组,也说明 Rb₁ 抑制心肌细胞凋亡作用较 Re 更好的原因可能是由于更显著的抑制了促凋亡基因 Bax 的表达。

参 考 文 献

- Maffei-Facino R, Carini M, Aldini G, et al. Panax ginseng administration in the rat prevents myocardial ischemia-reperfusion damage induced by hyperbaric oxygen: evidence for an antioxidant intervention. *Planta Med*, 1999, 65: 614-619.
- 李永杰,于振香,徐茂凤,等. 人参二醇组皂甙对实验犬心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究. *中国老年学杂志*, 1998, 18: 369-370.
- 陈立波,赵洪序,张秀和,等. 体外循环中人参二醇组皂甙的心肌保护作用. *中华胸心血管外科杂志*, 1998, 14: 366-368.
- Gottlieb RA, Engler RL. Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 874: 412-426.
- 刘晓春,刘正湘,施静. 人参对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡影响的实验研究. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, 9: 261-263.
- Strasser A, Harris AW, Jacks T, et al. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*, 1994, 79: 329-339.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, 1994, 369: 321-323.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993, 74: 609-619.
- Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, 1995, 80: 285-291.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, 281: 1309-1312.
- Cook SA, Pool-Wilson PA. Cardiac myocyte apoptosis. *Eur Heart J*, 1999, 20: 1619-1629.
- Tanaka MT, Itoh N, Adachi S, et al. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*, 1994, 75: 426-433.
- Watanabe-fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol*, 1992, 148: 1274-1279.
- Felzen B, Shilkrot M, Less H, et al. Fas (CD95/ APO-1)-mediated damage to ventricular myocytes induced by cytotoxic T lymphocytes from perforin-deficient mice: a major role for inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Circ Res*, 1998, 82: 438-450.
- Stephanou A, Scarabelli TM, Brar BK, et al. Induction of apoptosis and Fas receptor/Fas ligand expression by ischemia/reperfusion in cardiac myocytes requires serine 727 of the STAT-1 transcription factor but not tyrosine 701. *J Biol Chem*, 2001, 276: 28340-28347.
- Yue TL, Ma XL, Wang X, et al. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Circ Res*, 1998, 82: 166-174.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998, 281: 1305-1308.
- White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev*, 1996, 10: 1-15.
- Jayanthi S, Deng X, Bordelon M, et al. Methamphetamine causes differential regulation of pro-death and anti-death Bcl-2 genes in the mouse neocortex. *FASEB J*, 2001, 15: 1745-1752.

(收稿日期:2002-10-29)

(本文编辑:乔 致)