补阳还五汤对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡及 Hsp20 表达的影响*

黄桂琼[1]，周迎春[2]，刘 彬[3]，陈 洪[1]，华 玥[2]，洪晓华[1]
（1. 惠州市中医医院，广东 惠州 516001；2. 南方医科大学南方医院，广东 广州 510515；3. 广州医科大学附属第二医院，广东 广州 510260）

［摘 要］**目的**：探讨补阳还五汤对心肌梗死大鼠左室非梗死区心肌细胞凋亡及热休克蛋白 20（Hsp20）表达的影响。**方法**：采用 SPF 级雄性 Wistar 大鼠，将大鼠随机分成模型组、补阳还五汤组和假手术组；模型组和补阳还五汤组予结扎左冠状动脉主干造成急性心肌梗死，假手术组行手术操作，但不结扎冠状动动脉；采用 TUNEL 染色检测 3 组大鼠心肌细胞凋亡情况，Western-blot 法检测 3 组大鼠心肌细胞中 Hsp20 和磷酸化-Hsp 20（p-Hsp 20）的表达，qPCR 法检测 Hsp20 mRNA 的表达。**结果**：与假手术组比较，补阳还五汤组的凋亡细胞增多，凋亡指数增加，两组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；与模型组比较，补阳还五汤组细胞凋亡明显减少，凋亡指数降低，两组比较差异具有统计学意义（$P<0.01$）；补阳还五汤组心肌细胞中 Hsp20 及 p-Hsp 20 表达较模型组增高，较假手术组降低，差异具有统计学意义（$P<0.01$）；补阳还五汤组心肌细胞中 Hsp20 mRNA 的表达较模型组升高，较假手术组降低，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。**结论**：补阳还五汤可能通过促进 Hsp20 的表达，从而起到抑制心肌细胞凋亡的作用。

［关键词］细胞凋亡；补阳还五汤；热休克蛋白 20；心肌梗塞；大鼠，Wistar
［中图分类号］R286；R228 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2014）04-0482-04

Influence of Buyanghuanwu Decoction on Myocardial Cell Apoptosis and Heat Shock Protein 20 Expression in Myocardial Infarction Rats

HUANG Guiqiong[1], ZHOU Yingchun[2], LIU Bin[3], CHEN Hong[1], HUA Yue[2], HONG Xiaohua[1]
(*1. Huizhou Hospital of TCM, Huizhou 516001, Guangdong, China; 2. Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effects of Buyanghuanwu decoction on myocardial cell apoptosis and heat shock protein 20 (Hsp20) expression at the non-infarction regions of left ventricle of myocardial infarction rats. **Methods**: One hundred and twenty male Wistar SPF rats were used. Acute myocardial infarction model was established by ligating the left main coronary artery. Rats were divided into model group (group M), Buyanghuanwu decoction group (group B) and sham group (group S). TUNEL staining was adopted to detect myocardial cell apoptosis and Westren-blot was performed to detect Hsp20 and phosphorylation-Hsp 20 (p-Hsp 20) expression in myocardial cells of all three groups. Hsp20 mRNA expression was detected by using qPCR. **Results**: Comparing with group S, both apoptotic cell number and apoptotic index of group B increased, and the differences between the two groups were statistically significant ($P<0.01$); comparing with group M, apoptotic cell number reduced and apoptotic index decreased in group B, and the differences were statistically significant ($P<0.01$); myocardial cell Hsp 20 and p-Hsp 20 expressions of group B were significantly higher than those of

*［基金项目］国家自然科学基金青年基金项目（81202841）；广东省中医药局项目（20131067）
网络出版时间：2014－08－14 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140814.2247.080.html

group M, and obviously lower than those of group S ($P<0.01$); The myocardial cell Hsp 20 mRNA expression in group B was more than in group M, and lowered more than in group S. The differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusions**: Buyanghuanwu decoction might promote the expression of Hsp 20 to inhibit myocardial cell apoptosis in the non-infarction regions of left ventricle in rats with acute myocardial infarction.

[**Key words**] cell apoptosis; buyanghuanwu decoction; heat shock protein 20; myocardial infarction; rats, Wistar

心肌梗死后心室重构（ventricular remodeling, VR）会影响心室的功能及预后。本课题组通过对心肌梗死后患者中医症候的临床观察,发现心肌梗死后心室重构为本虚标实之证,气虚血瘀是其基本病理机制。因此确立益气活血作为心梗后基本治疗原则,采用清代名医王清任的益气活血代表方补阳还五汤进行治疗,临床效果较佳,前期研究表明,补阳还五汤可显著改善心梗后心室重构大鼠的左室功能,但对于其抗心室重构的作用机制仍有待进一步明确[1]。热休克蛋白 20(heat shock protein 20,Hsp20)是小分子热休克蛋白家族成员之一,在抑制血小板聚集、舒张血管平滑肌、抗心肌细胞凋亡等方面都发挥着重要的作用,从多方面对心血管系统提供保护作用[2]。本研究采用心梗后心室重构模型,探讨补阳还五汤对心肌细胞凋亡和 Hsp20 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物及主要仪器　SPF 级雄性 Wistar 大鼠 120 只,体重 180 ~ 210 g,由南方医科大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(粤)2010—0022。江湾Ⅰ型人工呼吸机(第二军医大学仪器厂),尼康 Eclipse Ti-S 型荧光倒置显微镜(日本尼康公司),荧光定量 PCR 仪(罗氏生物),Kodak 2 000 MM图像工作站(美国柯达公司)。

1.1.2　药品　补阳还五汤按王清任《医林改错》原方组成剂量稍作调整:黄芪 110 g,当归尾 10 g,赤芍 10 g,地龙 10 g,川芎 10 g,红花 10 g,桃仁 10 g,药材由广州市药材公司提供。将上述原药材去除杂质,按组方剂量配制混合,蒸馏水浸泡 30 min后,用 TC-15 套式恒温器 250 V 电压加热煎煮。沸腾后将电压调低至 200 V 煎煮 1 h,过滤得第 1 次煎液;药渣再加水 5 000 mL,煎煮方法同前,过滤得第 2 次煎液。取两次滤液合并,80 ℃水浴蒸发浓缩至原药材含量 1 g/mL, 4 ℃保存备用。

1.1.3　试剂　异氟醚(山东力诺科峰制药有限公司),TUNEL 染色试剂盒(罗氏生物),大鼠 p-Hsp20、Hsp20 多克隆抗体(Abcam 公司),β-actin 抗体(CST 公司),RNA 提取试剂盒(Axygen 公司),RNA 逆转录试剂盒及 qPCR 试剂盒(Takara 公司)及引物合成(Invitrigen 公司)。

1.2　方法

1.2.1　模型制作　参考文献[1]所给出的方法制作大鼠急性心肌梗死模型。在左冠状动脉起源点下 1 ~ 2 mm 处结扎左冠状动脉主干,标准肢体导联Ⅱ导 ST 段抬高,肉眼观察结扎区变白时迅速将心脏放回胸腔,随即缝合肌肉和皮肤,将胸腔内的空气及血液抽尽。术后每隔 10 min 复查 1 次心电图,如连续 3 次 ST 段抬高即为急性心肌梗死造模成功。为平衡开胸手术等操作对动物的影响,设假手术组,假手术组除不结扎冠状动脉外,其余操作与模型组动物相同。术后予静脉注射青霉素 4 万 U,1 次/d,共 3 d。

1.2.2　分组与给药　将大鼠随机分成 3 组,分别为模型对照组、补阳还五汤组和假手术组,每组 15 只,共 45 只。模型对照组和补阳还五汤组大鼠予结扎左冠状动脉主干复制急性心肌梗死模型,造模成功 1 周后分组。补阳还五汤组给补阳还五汤水煎液 18.5 g/(kg·d)(生物等效剂量),假手术组和模型组予正常饮水,连续给药 12 周。于第 12 周末,水合氯醛麻醉大鼠,经腹主动脉注射 10% KCl 注射液处死,4% 中性甲醛固定心肌。

1.2.3　大鼠心肌组织 TUNEL 染色　将切片脱蜡、水化,洗涤后吸去水分,加入反应液(TdT 酶和-dUTP)反应,再次洗涤,用 FITC 反应液标记,经过 PI 复染后封片。镜下观察,凋亡细胞呈现出黄棕色。心肌细胞凋亡指数的测定:光镜下,细胞核中显黄棕色阳性颗粒者为凋亡细胞。每只大鼠观察 5 张切片,在 Kodak 2 000 MM 图像工作站上随机选取相等的 5 个高倍镜视野(×400),然后在计数

网格上数出凋亡细胞阳性颗粒个数及细胞总数，计算凋亡指数，公式为（凋亡细胞数/细胞总数）×100%。每张片子取其平均值。

1.2.4 Western 印迹分析　预冷 PBS 洗大鼠心肌细胞 2 次，加入 200 μL RIPA 裂解液，冰上裂解 5 min，细胞刮刮下细胞，12 000 r/min 低温离心 10min，弃沉淀。BCA 法检测蛋白浓度，加入 5 × Lodding Buffer 金属浴 95 ℃ 5 min 蛋白变性，－80 ℃ 冻存。取 15 μg 蛋白样品上样，用 1 × Lodding Buffer 补至等体积，然后进行电泳。电泳结束后，转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，分别加入 β-actin（1∶11 000）、p-Hsp20（1∶1 000）、Hsp20（1∶1 000）4 ℃缓慢摇动过夜，0.1% TBST 洗 3 次，加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG（1∶5 000）室温缓慢摇动 1 h，0.1% TBST 洗 3 次，ECL 显影，胶片曝光。

1.2.5 qPCR 检测　实时荧光定量 PCR 检测心肌细胞中 Hsp20 mRNA 的表达，用总 RNA 提取试剂盒抽提细胞总 RNA，按 Takara 反转录试剂盒说明书和 qPCR 说明书分别进行反转录和实时荧光定量 PCR 反应。qPCR 引物分别为 Hsp20 上游为 5′-CCA GAG GAA ATC TCT GTC AAG G-3′，Hsp20 下游为 5′-GTG GAA CTC TCG AGC AAT GAA-3′，β-actin 上游为 5′-CTT CCT TCC TGG GTA TGG AAT C-3′，β-actin 下游为 5′-CTG TGT TGG CAT AGA GGT CTT-3′。反应条件为：95 ℃ 预变性 5 min，95 ℃ 10 s，60 ℃ 退火 15 s，共 40 个循环。每个实验重复 3 次取平均值。

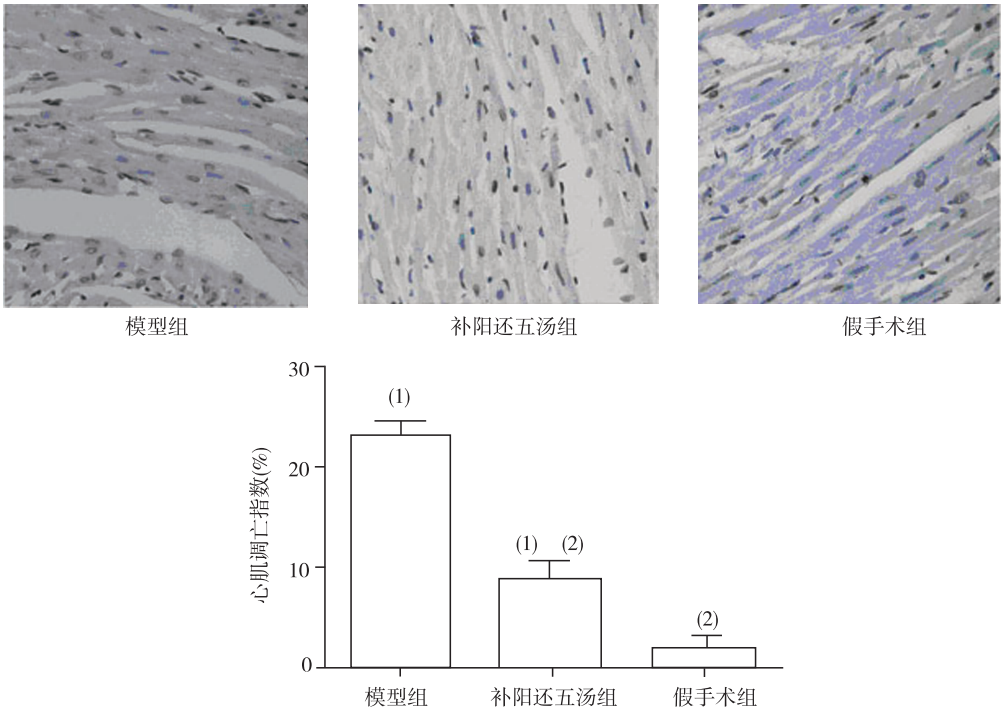
1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多重比较采用 LSD 法，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞凋亡情况

结果显示，模型组大鼠心肌细胞核内可见到较多黄棕色核染，且细胞核皱缩不规则，显示出较多凋亡细胞的特征；补阳还五汤组黄棕色凋亡细胞数量较模型组明显减少。与模型组比较，补阳还五汤组凋亡细胞数量较模型组明显减少，凋亡指数明显降低，两组比较差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。与假手术组比较，补阳还五汤组的凋亡细胞数量增多，凋亡指数增加，两组比较差异有统计学意义（$P < 0.01$）。见图 1。



(1) 与假手术比较，$P < 0.01$；(2) 与模型组比较，$P < 0.01$

图 1　大鼠心肌细胞凋亡情况（TUNEL 染色）

Fig. 1　Apoptosis condition of rat myocardial cells

2.2　心肌细胞中 Hsp20 及 p-Hsp 20 表达

Western-blot 结果显示补阳还五汤组 Hsp20 及 p-Hsp 20 的表达明显高于模型组，而低于假手术组的表达，上述比较差异具有统计学意义（$P < 0.01$），见图 2。

2.3　心肌细胞中 Hsp20 mRNA 的表达

qPCR 检测结果显示补阳还五汤组大鼠心肌细胞 Hsp20 mRNA 的表达较模型组升高，而较假手术组降低，差异有统计学意义（$P < 0.01$），见图 3。

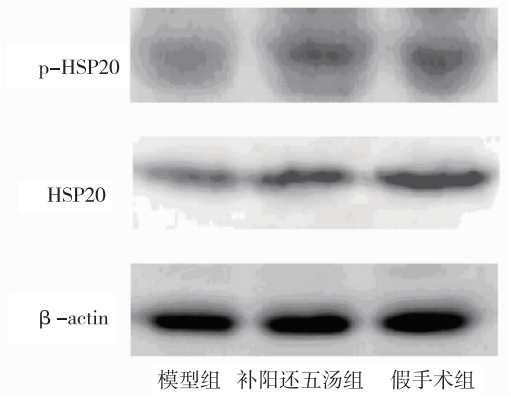
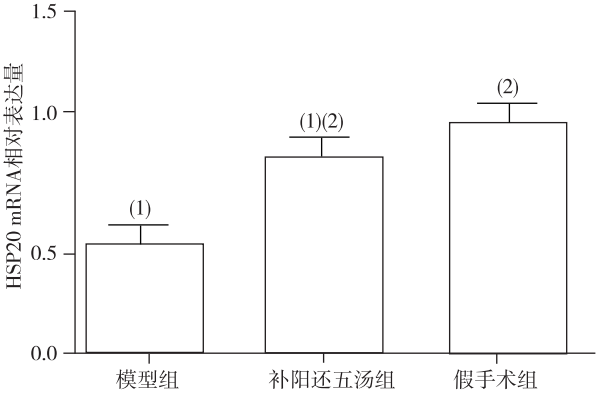


图 2　大鼠心肌细胞中 HSP20 及 p-HSP20 的表达（Western-blot）

Fig. 2　HSP20 and p-HSP20 expression in rat myocardial cells



(1) 与假手术比较，$P < 0.01$；(2) 与模型组比较，$P < 0.01$

图 3　大鼠心肌细胞中 Hsp20 mRNA 表达（qPCR）

Fig. 3　HSP20mRNA expression in rat myocardial cells

3　讨论

在急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI）后发生的左心室进行性扩张和外形改变被称为“梗死后心室重构”，包括心室容积、形状 、室壁厚度、心肌结构和超微结构等方面的改变，重构部位包括心肌梗死区和非心肌梗死区[3]。心肌细胞表型改变是心室重构的病理基础，是病理性刺激诱发胚胎基因的重新表达。

Hsp 是生物受到环境中物理、化学、生物、精神等刺激时发生应激反应而合成的蛋白质，它是一类高度保守的蛋白质 ，普遍存在于原核和真核生物中，主要作为分子伴侣而参与蛋白质的折叠、转运及组装等过程，能恢复或加速清除细胞内已变性的蛋白质而稳定细胞结构[4]。小分子量热休克蛋白作为热休克蛋白家族中的一个亚组，不仅仅在机体应激状态，而且在生理状态下也都发挥着重要的生物学作用[5]。Hsp20 是小分子热休克蛋白家族成员之一，在心脏等器官有较高表达，研究已证实 Hsp20 对心血管具有保护功能[6]。Hsp20 在应激状态下的对心脏起重要的保护作用，在缺血再灌注损伤中，通过转染腺病毒载体上调 Hsp20 的表达，能通过抑制缺血再灌注损伤模型大鼠心脏血流动力学改变、抑制心肌细胞的凋亡，减轻缺血再灌注损伤，阻断 Hsp20 则会增加大鼠心肌对缺血再灌注的敏感性，加重血流动力学改变及心肌细胞凋亡[7-9]。

本课题组前期研究表明，补阳还五汤能显著改善心梗后心室重构大鼠的左室功能，具有良好抗心梗后心室重构的作用，且疗效优于卡托普利作为阳性对照。本研究探讨补阳还五汤对 Hsp 20 表达的影响，由于目前仍未发现能促进 Hsp20 表达的有效药物，故本实验中未设阳性对照组。

采用 TUNEL 染色法镜下观察各组心肌细胞凋亡情况，补阳还五汤组凋亡细胞数量较模型组明显减少，凋亡指数与模型组比较显著降低，提示补阳还五汤能明显抑制心肌细胞的凋亡。同时采用 Western-blot 检测各组 Hsp20 及 p-Hsp20 的表达及 qPCR 法检测各组 Hsp20 mRNA 的表达，结果显示补阳还五汤组 Hsp20、p-Hsp20 及 Hsp20 mRNA 的表达均明显高于模型组，提示补阳还五汤可能通过上调 Hsp20 的表达来抑制心肌细胞凋亡。

4　参考文献

[1] 郑锵，周迎春. 补阳还五汤改善心梗后心室重构大鼠左室功能的研究[J]. 新中医，2010(6)：109.

[2] 李晓英，赵玉生. 小分子热休克蛋白 20 与心血管病的研究新进展[J]. 国外医学（老年医学分册），2007(6)：271－274.

（下转第 489 页）

于不能检测混合基因型感染。其他基因分型方法均存在一定的局限性,如不能将目前确定的 HCV 亚型全部分开、敏感性较低等。

目前,全球约有 1 亿 7 千万人感染 HCV,不同国家和地区人群的 HCV 基因型分布,有明显的差异, 1a 在美国和北欧为优势基因型,在中东地区 l b型占感染 HCV 人群的多数,2a 和 2b 型则在北美、日本较为多见,2c 型主要分布在地中海一带及远东地区,3a 型在欧洲的吸毒者中较常见,4 型主要在北非和中东流行,5 型基本分布在南非,6 型在越南、澳大利亚以及我国的香港地区分布较广[3]。在我国大陆地区,1b 和 2a 型为较常见的基因型,其中以 1b 型为主,约占 90% 以上。在本研究中,贵州地区主要流行的基因型为 1b 型 58 份,占 35.4%,3a 型 25 份(15.2%),3b 型 38 份(23.2%),6a 型 35 份(21.3%),没有发现 4 与 5 型;与 1999 年丁静娟等[4]采用线探针核酸杂交方法进行的贵州地区 98 例 HCV 血清的基因型主要是 1b 和 6a(分别占 74.5% 和 10.2%)、其他基因型还有 3a,3b 未发现 2、4、5 型的结果存在差异;与太原、南京的分布不一致,同广东、重庆地区分布相近[5-8]。因贵州处于中国南部,临近东南亚,而 6 型在东南亚分布较广,人员流动频繁,HCV 各亚型(包括新亚型)病毒株流行的几率趋于增加。本结果显示贵州地区 HCV 流行的基因型较复杂,除了优势株外,其他基因型也较常见,可能和该地区人口流动性增大造成与其他地域的 HCV 基因型别相互交叉感染有关。

本研究通过 HCV Core-E1 特异性引物 PCR 和基因序列系统进化树分析法,初步研究了贵州地区的 HCV 基因型的分布状态,发现贵州地区 HCV 基因型存在着多样性,说明该地区基因型复杂,有必要在临床推广 HCV 基因分型的常规检测。这对今后 HCV 疫苗的研制以及丙型肝炎免疫学诊断试剂特异性和敏感性的提高具有重要意义。

4　参考文献

[1] Ray SC, Arthur RR, Carella A, et a1. Genetic epidemiology of hepatitis C virus throughout Egypt[J]. J Infec Dis, 2000(182):698 - 707.

[2] 张瑞, 杜绍财. 丙型肝炎病毒基因分型的研究进展[J]. 中华检验医学杂志, 2006(5):469 - 471.

[3] Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on[J]. Journal of General Virology, 2004(11):3173 - 3188.

[4] 丁静娟. 李媛媛, 田苗, 等. 线探针核酸杂交分析贵州地区 HCV 感染株基因型. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999(3):243 - 246.

[5] 王琰, 朱新宇, 王霞, 等. 太原地区丙型肝炎病毒基因分型及其临床意义[J]. 实用肝脏病杂志, 2010(2):109 - 111.

[6] 胡婷, 沈传来, 郑杰. 南京地区丙型肝炎病毒基因分型的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2009(2);72 - 75.

[7] 袁小珍, 陈伟烈, 张健珍. 广东地区丙型肝炎患者 HCV 基因亚型分析[J]. 国际医药卫生导报, 2012(18):2649 - 2651.

[8] 张帆, 王小红, 王宇明, 等. 重庆地区 HCV 基因亚型的分布状态[J]. 第四军医大学学报, 2005(14):1253 - 1256.

(2014-05-15 收稿,2014-06-27 修回)
中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 赵　毅

(上接第 485 页)

[3] 郝玉明, 朱文玲. 心肌梗死后的心室重构[J]. 中华心血管病杂志, 2005(2):196 - 197.

[4] 蒲力群, 王逢会, 霍满鹏. 热休克蛋白的研究进展[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2008(1):72 - 75.

[5] 郭坤, 刘银坤. 小热休克蛋白家族的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2006(4): 318 - 320.

[6] Salinthone S, Tyagi M, Gerthoffer WT. Small heat shock proteins in smooth muscle[J]. Pharmacol Ther, 2008(1):44 - 54.

[7] Fan GC, Chu G, Kranias EG. Hsp20 and its cardioprotection. Trends Cardiovasc Med[J]. 2005(4): 138 - 141.

[8] Zhu YH, Ma TM, Wang X. Gene transfer of heat-shock protein 20 protects against ischemia/reperfusion injury in rat hearts[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005 (10):1193 - 1200.

[9] Qian J, Ren X, Wang X. Blockade of Hsp20 phosphorylation exacerbates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressed autophagy and increased cell death[J]. Circ Res, 2009 (12):1223 - 1231.

(2014-03-08 收稿,2014-03-25 修回)
中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 赵　毅