

回心草对心肌细胞缺氧损伤的保护作用

蔡小军^{1*}, 陈艳², 俞云³, 陆一¹

- (1. 南京医科大学附属无锡市人民医院药剂科, 江苏 无锡 214023;
2. 无锡卫生高等职业技术学校药学系, 江苏 无锡 214028;
3. 南京中医药大学江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究回心草水提液对心肌细胞缺氧损伤的保护作用, 并从氧化应激角度探讨其作用机制。方法: 原代培养乳鼠心肌细胞, 以 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板后第 4 天用无血清 DMEM/F12 培养 48 h, 然后置于缺氧环境 (37°C , $94\% \text{N}_2$, $1\% \text{O}_2$, $5\% \text{CO}_2$) 中继续孵育 24 h, 建立体外心肌细胞缺氧损伤模型, 并采用噻唑蓝 (MTT) 法测定 1, 2, 3, 4, 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 回心草水提液干预 24 h 后细胞的活力; 利用全自动生化分析仪测定细胞上清液中乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的含量。结果: 回心草水提液可提高缺氧损伤心肌细胞的活力, 其中 3, 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的吸光度 (A) 分别为 (0.529 ± 0.031) , (0.534 ± 0.024) , 与缺氧损伤组 A 值 (0.498 ± 0.012) 比较差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 能降低 LDH, CK 活性和 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 其中以回心草水提液 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组效果最佳。结论: 回心草水提液能够保护缺氧损伤的心肌细胞, 可能与其改善氧化应激有关。

[关键词] 回心草; 心肌细胞; 噻唑蓝; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0204-03

The Protective Effect of *Rhodobryum giganteum* on Cardiocytes Injured by Hypoxia

CAI Xiao-jun^{1*}, CHEN Yan², YU Yun³, LU Yi¹

- (1. Department of Pharmacy, Wuxi People's Hospital Attached to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China;
2. Department of Pharmacy, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China;
3. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Material Medica, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of *Rhodobryum giganteum* water extract on cardiocytes injured by hypoxia and explore its mechanism from the perspective of oxidative stress. **Method:** The injured cardiocyte model induced by hypoxia was established as follows: $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5/\text{mL}$ primary cultured neonatal rat cardiomyocytes seeded in 96-well plates were cultured for 48 h in serum-free DMEM/F12, and then placed in hypoxia (37°C , $94\% \text{N}_2$, $1\% \text{O}_2$, $5\% \text{CO}_2$) to incubate for another 24 h. 1, 2, 3, 4, 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ water extract of *R. giganteum* was added to cultivated injured cardiocytes, and after 24 h, the activity of the cells was carefully determined by A value with MTT method. Activity of super oxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) in medium was assayed by automatic biochemistry analyzer. **Result:** The A values indicated that 3, 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ *R. giganteum* water extract groups increased activity of the cells significantly compared with the model group (0.498 ± 0.012) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And it could reduce LDH, CK activity and MDA levels and increase SOD activity in medium, and 3 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ group was much better than other dose groups. **Conclusion:** Water extract of *R. giganteum* has protective effect on cardiocytes injured by hypoxia, the mechanism may be related to inhibiting oxidative stress.

[Key words] *Rhodobryum giganteum*; cardiomyocyte; MTT; oxidative stress

[收稿日期] 20111019(021)

[通讯作者] * 蔡小军, 药师, 硕士, 从事心血管药理学及临床药学研究, Tel: 15995211099, E-mail: cxjleisure999@163.com

滇产回心草是中国多民族共用的传统草药,可明显改善心脏病如冠心病、心绞痛患者的临床症状,疗效确切。本文采用缺氧损伤原代培养的大鼠乳鼠心肌细胞模型,观察回心草水提液对心肌细胞的保护作用及其部分机制,为临床更合理应用回心草提供科学的实验依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 回心草(亳州市中药材公司提供,为真藓科植物暖地大叶藓 *Rhodobryum giganteum* (Schwaegr.) Par. 的干燥全草,由南京中医药大学陈建伟教授鉴定); DMEM/F12 培养液 (Hyclone, NTE0103); 噻唑蓝 (MTT, Sigma, 批号 YY01148208Y); 胎牛血清 (Gibco, 批号 314575); 胰蛋白酶(1:250, Sigma, 批号 0458-25 g); II 型胶原酶 (Gibco, 批号 312122); 乳酸脱氢酶 (LDH) (批号 100523)、肌酸激酶(CK)检测试剂盒(批号 100171) (北京中生生物工程高技术公司); 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20100829)。

1.2 动物 新生 1~3 d Wistar 大鼠乳鼠,雌雄不拘,购于南京中医药大学实验动物中心,用于心肌细胞体外培养。动物许可证号 SCXK(沪)2010-0005。

1.3 仪器 37 °C 5% CO₂ 培养箱及 94% N₂-5% CO₂-1% O₂ 培养箱 (FORMA3111, USA), 倒置相差显微镜 (LEICA DMIL, GER), 超净工作台 (苏州净化设备厂), 酶联免疫检测仪 (BIORAD, USA), 全自动生化分析仪 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 药物制备 回心草:精密称取 200 g 的回心草药材置煎煮容器内,加入相当于药材量的 20 倍冷水浸泡 30 min,加热回流提取 2 次,每次 2 h,滤过,合并滤液。浓缩。加 95% 的乙醇 600 mL,配成 75% 浓度醇沉 18 h。抽滤,取滤液,回收乙醇,水浴蒸干,真空干燥。加双蒸水配至 1 g·mL⁻¹,即 200 mL。临用前充分摇匀,用生理盐水稀释成 10, 20, 30, 40, 50 g·L⁻¹, 0.22 μm 滤网过滤除菌,4 °C 冰箱保存备用。

2.2 原代培养心肌细胞缺氧损伤模型的制备及实验分组^[1-2] 乳鼠无菌条件下取出心脏,以 D-Hanks 液冲洗,剪碎。用终浓度 0.08% 胰蛋白酶消化 5 min,弃上清液,再用 0.05% II 型胶原酶和 0.04% 胰蛋白酶,37 °C 消化 10 min,自然沉淀后弃上清,加入含血清的培养基终止消化,过 200 目网筛,1 200 r·min⁻¹ 离心 12 min,弃上清。50 mL DMEM/F12 培养基重悬细胞,90 min 差速贴壁纯化心肌细胞,最后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液

调整细胞浓度至 3 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ /mL,接种于 96 孔板,48 h 后更换培养液。第 4 天用无血清 DMEM/F12 继续培养 48 h,使同步化。设空白对照组,DMEM/F12 90 μL + 生理盐水 (NS) 10 μL,置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱内孵育 24 h; 缺氧损伤组,DMEM/F12 90 μL + NS 10 μL,置于缺氧环境 (37 °C, 94% N₂, 1% O₂, 5% CO₂) 中孵育 24 h; 复方丹参组,DMEM/F12 90 μL + 复方丹参 10 μL (终质量浓度为 6 g·L⁻¹),其余操作同缺氧损伤组。回心草提取液各剂量组:DMEM/F12 90 μL + 回心草提取液 10 μL (终浓度分别为 1, 2, 3, 4, 5 g·L⁻¹),其余操作同缺氧损伤组。每组设 9 个复孔。

2.3 MTT 法测定细胞活力 吸去培养液,每孔加入 0.5 g·L⁻¹ MTT 溶液 100 μL。于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h 后,弃上清,每孔加入 DMSO 100 μL 待溶解后,于 570 nm 波长下读取吸光度 (A),A 愈高表示细胞生长愈旺盛。

2.4 LDH, CK, SOD 活性和 MDA 含量的测定 收集细胞培养上清液,2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 以去除死细胞,将同组上清液合并,以酶动力学法测定 LDH, CK 活性,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,硫代巴比妥酸法测定 MDA 质量。

2.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对正常心肌细胞活力的影响 回心草水提液 1, 2, 3, 4, 5 g·L⁻¹ 各组 A 值分别为 (0.565 ± 0.023), (0.571 ± 0.028), (0.575 ± 0.034), (0.572 ± 0.021), (0.576 ± 0.029), 与空白对照组 A 值 (0.579 ± 0.046) 比较无显著差异,表明回心草水提液对正常心肌细胞无明显毒性。

3.2 对缺氧损伤心肌细胞活力的影响 心肌细胞经缺氧损伤后,其 A 值明显下降,与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。回心草水提液各剂量组均能不同程度升高缺氧损伤心肌细胞 A 值,其中 3, 4 g·L⁻¹ 组与缺氧损伤组比较差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

3.3 对缺氧损伤心肌细胞 LDH, CK 活性的影响 心肌细胞经缺氧损伤后,LDH, CK 活性明显升高,与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); 不同剂量回心草提取液均能降低 LDH, CK 活性,与缺氧损伤组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。其中以 3 g·L⁻¹ 组效果最佳。表 2。

3.4 对缺氧损伤心肌细胞 SOD, MDA 的影响 心

表 1 回心草水提液对缺氧心肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	A
空白对照	-	0.575 ± 0.010
缺氧损伤	-	0.498 ± 0.012 ¹⁾
复方丹参	6	0.553 ± 0.015 ³⁾
回心草	1	0.503 ± 0.011
	2	0.507 ± 0.017
	3	0.529 ± 0.031 ²⁾
	4	0.534 ± 0.024 ³⁾
	5	0.515 ± 0.029

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与缺氧损伤组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 回心草水提液对缺氧心肌细胞 LDH, CK 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$) U·L⁻¹

组别	剂量/g·L ⁻¹	LDH	CK
空白对照	-	47.68 ± 3.57	5.61 ± 0.50
缺氧损伤	-	59.18 ± 4.36 ¹⁾	14.42 ± 0.95 ¹⁾
复方丹参	6	49.97 ± 3.14 ³⁾	7.34 ± 0.93 ³⁾
回心草	3	50.96 ± 3.74 ³⁾	7.43 ± 0.59 ³⁾
	4	53.80 ± 3.06 ³⁾	8.50 ± 0.76 ³⁾
	5	52.58 ± 2.05 ³⁾	8.67 ± 0.36 ³⁾

肌细胞经缺氧损伤后,SOD 活性明显下降,MDA 含量明显上升,与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。回心草水提液各组均能升高 SOD 活性、降低 MDA 含量。3,4 g·L⁻¹ 组的 SOD 活性与缺氧损伤组比较差异显著 ($P < 0.01$);3 g·L⁻¹ 组的 MDA 含量与缺氧损伤组比较差异显著 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 回心草水提液对缺氧心肌细胞 SOD, MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
空白对照	-	25.51 ± 0.24	0.59 ± 0.15
缺氧损伤	-	24.16 ± 0.67 ¹⁾	1.31 ± 0.17 ¹⁾
复方丹参	6	25.45 ± 0.73 ³⁾	1.14 ± 0.13 ²⁾
回心草	3	25.43 ± 0.50 ³⁾	0.68 ± 0.15 ³⁾
	4	25.92 ± 0.35 ³⁾	1.17 ± 0.24
	5	24.72 ± 1.19	1.18 ± 0.21

4 讨论

心肌缺血已成为危及人类健康和生命的常见病和多发病,其发病率呈日渐上升趋势。氧是心肌细胞活动必不可少的物质。心脏没有“氧仓库”,完全依赖心肌血供,所以一旦缺血,立刻会引起缺氧,使心脏活动时必需的能量供应不足,引起心绞痛、心功能下降等。

缺血性心肌损伤的发生、发展是涉及多种机制共同参与的复杂过程,传统的中医药治疗本病有着悠久的历史和丰富的经验,且治疗有其独到之处,副作用小,疗效显著。回心草现代临床主要用于治疗

冠心病^[3]。本研究选用缺氧损伤原代培养的大鼠乳鼠心肌细胞模型,观察回心草水提液对心肌细胞的保护作用及其机制。实验结果显示,回心草水提液各剂量组均能不同程度升高缺氧损伤心肌细胞 A 值,其中 3,4 g·L⁻¹ 组的 A 与缺氧损伤组比较差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。提示回心草水提液可减轻缺氧对心肌细胞造成的损伤。

CK 是与细胞内能量运转、ATP 再生有直接关系的重要激酶,它可逆地催化肌酸与 ATP 之间的磷酸基反应。LDH 是一种糖酵解酶,能催化乳酸脱氢生成丙酮酸。心肌缺血时,磷脂酶激活、游离脂肪酸产生、大量儿茶酚胺释放以及白细胞释放的自由基均能导致细胞质膜损伤和通透性增加,引起心肌酶释放增加^[4]。CK, LDH 是实验和临床均公认的对心肌缺血有诊断意义的酶,可作为判断心肌缺血及损伤程度的指标。此外,心肌缺血时,细胞内有氧化呼吸链遭到破坏,自由基清除系统如 SOD 等活性降低,产生大量多余的自由基,破坏细胞膜上的不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化反应产生 MDA。MDA 值间接反映机体组织细胞受自由基损伤程度。本实验结果显示,心肌细胞经缺氧损伤后,LDH,CK 活性及 MDA 含量明显升高,SOD 活性降低。而回心草水提液能降低 LDH,CK 活性及 MDA 含量,升高 SOD 活性,其中 3,4 g·L⁻¹ 组与缺氧损伤组比较差异显著 ($P < 0.01$)。

根据此研究结果,作者将对回心草有效成分对心肌的保护作用作深入研究,以求为进一步探讨回心草方药对心肌细胞的保护机制奠定基础。

[参考文献]

[1] Wang Dong-xiao, Liu Ping, Liao Hong-bo, et al. Protective effect of piperine and its derivatives on myocardial cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14 (37): 6943.

[2] 陈日, 陈胜喜. 缺氧预处理对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中南大学学报: 医学版, 2004, 29 (2): 204.

[3] 蔡鹰, 魏群利, 陆晓和, 等. 回心草对脐静脉内皮细胞的保护作用及对分泌一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(7): 79.

[4] Niu P, Shindo T, Iwata H, et al. Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage [J]. Circulation, 2004, 109 (14): 1789.

[责任编辑 聂淑琴]