

当归红芪超滤物对辐射后心肌成纤维细胞的增殖和胶原分泌的影响

杨艺萱¹, 张兆芳^{1,2*}, 刘卉¹, 苏海燕¹, 宋鹏^{1,3}

(1. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730000; 2. 甘肃省中药炮制及质控工程技术研究中心, 兰州 730000; 3. 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**研究当归红芪超滤物对辐射后心肌成纤维细胞增殖和胶原分泌的影响。**方法:**采用差速贴壁法原代分离培养大鼠心肌成纤维细胞;当归红芪超滤物干预或射线辐射心肌成纤维细胞后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞的增殖,酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞分泌 I 型胶原(COL-I)的含量;心肌成纤维细胞通过 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)染色在流式细胞仪下检测活性氧(ROS)的含量;采用实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测心肌成纤维细胞中 COL-I 和转化生长因子- β (TGF- β)的 mRNA 表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达。**结果:**低剂量射线(0.5 Gy)辐射心肌成纤维细胞后,细胞内 ROS 的升高促进细胞增殖和胶原分泌的作用;当归红芪超滤物可以促进细胞中转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)蛋白的核转位来清除 ROS,最终抑制辐射诱导的心肌成纤维细胞的增殖和胶原分泌;并且当归红芪超滤物明显抑制心肌成纤维细胞中 COL-I 和 TGF- β mRNA 表达。**结论:**当归红芪超滤物可以抑制低剂量辐射诱导的心肌成纤维细胞增殖和胶原分泌。

[关键词] 当归;红芪;心肌成纤维细胞;辐射;增殖;胶原

[中图分类号] R285.5;R22;R24;R256.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0136-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181050

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180313.1141.010.html>

[网络出版时间] 2018-03-13 13:23

Effect of Ultra-filtration Extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on Cell Proliferation and Collagen Secretion of Myocardial Fibroblasts Induced by Radiation

YANG Yi-xuan¹, ZHANG Zhao-fang^{1,2*}, LIU Hui¹, SU Hai-yan¹, SONG Peng^{1,3}

(1. *Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;*

2. *Processing and Quality Control Engineering Technology Research Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) of Gansu Province, Lanzhou 730000, China;*

3. *Key Laboratory of Prevention and Treatment for Chronic Diseases by TCM of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on the cell proliferation and collagen deposition of myocardial fibroblasts induced by radiation. **Method:** Rat myocardial fibroblasts were separated and cultured by cell adhesion. The cell proliferation was determined by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method, and the collagen-I (COL-I) of secretion was determined by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) method after ultra-filtration extraction from Angelicae

[收稿日期] 20171025(019)

[基金项目] 甘肃省科技 B 类计划项目(1508RJZA018);甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室开放项目(GSMBKY2015-01);甘肃省卫生行业科研计划管理项目(GWGL2014-53)

[第一作者] 杨艺萱,主管技师,从事中药药理学研究,Tel:0931-8635150,E-mail:631416557@qq.com

[通信作者] *张兆芳,主任药师,从事中药制剂及药效学研究,Tel:0931-8635008,E-mail:841320143@qq.com

Sinensis Radix and Hedysari Radix or radiation to myocardial fibroblasts. The changes of reactive oxygen species (ROS) were determined by flow cytometry with indicator 2', 7'-dichloride fluorescent yellow double acetate (DCFH-DA) staining. The mRNA expressions of COL-I and transforming growth factor-beta (TGF- β) were determined by Real-time polymerase chain reaction (PCR), and the expressions of relative proteins were determined by Western blot. **Result:** The rising cellular ROS promoted cell proliferation and collagen deposition of myocardial fibroblasts induced by low-dose radiation (0.5 Gy), which however was inhibited through ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix by promoting nuclear translocation of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and eliminating ROS. The mRNA expressions of COL-I and TGF- β were both inhibited by ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix. **Conclusion:** Ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix could inhibit the cell proliferation and collagen deposition of myocardial fibroblasts induced by low-dose radiation.

[**Key words**] Angelicae Sinensis Radix; Hedysari Radix; myocardial fibroblast; radiation; proliferation; collagen

放射性心脏疾病 (radiation-induced heart disease, RIHD) 是纵膈及胸腔等部位恶性肿瘤放射治疗后发生的严重并发症之一, 主要可表现为心律失常、冠心病、心包炎、心肌炎和心肌纤维化等, 给患者带来了极大的痛苦, 目前临床上没有有效的防治药物^[1]。现代医学研究显示, 放射性损伤引起心脏炎性反应, 炎性渗出之后组织会进入纤维化修复阶段, 纤维化是各型 RIHD 共同的组织病理变化, 也是放射迟发损伤的主要形式, 可见于各种类型的放射性心脏损伤^[2]。研究表明放射性心肌纤维化的发生与心肌组织修复过程中心肌成纤维细胞 (CFs) 增殖和胶原分泌且排列紊乱密切相关^[2]。因此寻找能够抑制 CFs 的增殖和胶原过度分泌的药物对临床防治放射性心肌纤维化具有重要意义。

通过中医药减轻放射性损伤的疗法在我国已广泛使用, 并取得了较好的临床疗效^[3]。中医学认为放射性心肌损伤应属于外感火热邪毒, 损伤心气、心血的致病范畴。从临床表现来看放射性心肌损伤所出现的病证属中医学“胸痹”、“心悸”等范畴。其基本病机是本虚标实, 本虚以气虚为主, 标实以血瘀为主。当归, 具有补血行血功效; 红芪, 具有补气养血功效。当归红芪超滤膜提取物取方于益气养血经典方当归补血汤, 其养血扶正的功效切中辐射损伤病机^[4]。本文采用补气生脉的当归和红芪通过超滤膜技术制得当归红芪超滤物, 研究当归红芪超滤物对辐射后 CFs 的增殖和胶原分泌的影响及作用机制, 为放射性心肌纤维化的临床药物开发及应用奠定基础。

1 材料

1.1 动物 新生 1~3 d 龄的 Wistar 大鼠 10 只, 体

质量 6~10 g, 甘肃中医药大学 SPF 级动物实验中心提供, 合格证号 SCXK(甘)2013-0001。实验动物开展并取得了甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 2017-021)。

1.2 药物 当归和红芪购自甘肃中医药大学附属医院药剂科, 由甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任中药师分别鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根及豆科植物多序岩黄芪 *Hedy sarum polybotrys* 的干燥根, 均为正品。当归红芪超滤物制备参照文献[5], 当归和红芪饮片按 1:5 比例混合, 水煎煮 3 次, 过滤杂质。陶瓷膜微滤, 选用中空纤维超滤膜(截留相对分子质量为 100 kDa, 压力 5~6 kg·m⁻³, 温度 25 °C, 流量 100 L·h⁻¹·m⁻³)超滤。超滤液喷雾干燥成粉, 封装保存。以 DMEM 配成终浓度 100 倍的工作液。

1.3 试剂 DMEM 培养基, II 型胶原酶, 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司产品, 批号分别为 NYB0810, 17101-015, 20160708217); 二甲亚砜(DMSO), 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)(美国 Sigma 公司, 批号分别为 40204ES60, 10000001064); 胎牛血清(杭州四季青生物公司, 批号 20160905); 噻唑蓝(MTT), 青-链霉素和化学发光液(ECL)(北京索莱宝生物公司, 批号分别为 1184-43-6, B01103501, SW2010); I 型胶原(COL-I)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司, 批号 AF-585-NA); 转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和核纤层蛋白 B(Lamin B)兔多克隆抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab62352, ab8245, ab16048); RNA iso Reagent, 反转录试剂盒, Taq DNA 聚合酶和 Easy Dilution 稀释液均(Takara 公

司,批号分别为 108-95-2,RR047A,RR820A,9160Q)。

1.4 仪器 2406-2 型医用电子直线加速器(德国 Primus 公司);RTG50005-9-VBC 型三气培养箱(美国 Thermo 公司);Mini-proteom Tetra 型 IX-71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);FACSCanto 型流式细胞仪(美国 BD 公司);ABI7500 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司);Mini-PROTEAN Tetra 小型电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 CFs 的原代分离和培养 参照文献[6]原代分离 CFs,无菌环境下剪取 1~3 d 龄 Wistar 大鼠的心尖部组织,于预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)中漂洗 3 次;将组织剪碎后移入离心管中,加入 0.08% 的胰蛋白酶溶液后反复轻柔吹打,于 37 ℃ 水浴中消化 10 min;自然沉淀弃上清(主要为红细胞、细胞碎屑及死细胞),剩余沉淀中再加入约 5 倍体积 0.08% 胰蛋白酶及 0.04% 胶原酶混合液,吹打后置 37 ℃ 水浴消化 5~8 min,静置后将上清液移入离心管中,用等体积含 15% 新生牛血清的 DMEM 培养液终止消化。以 1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃去上清液后将细胞重悬于培养液中,放入 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 1~2 h 后,用差速贴壁法去除心肌细胞。将已经贴壁的 CFs 胰酶消化后,以 1 × 10⁵ 个/mL 的密度接种于培养板,置培养箱中培养用于后续实验研究。

2.2 分组 实验分为空白组、模型组和归红芪超滤物组。空白组加入不含药物的培养基,模型组加入不含药物的培养基后进行不同剂量的辐射,归红芪超滤物组加入不同浓度的含药培养基后进行辐射。

2.3 MTT 比色法检测 CFs 的增殖 将原代培养的 CFs 以 1 × 10⁵/mL 密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,待细胞完全贴壁后进行分组干预,空白组加入 100 μL 不含药物的培养基,模型组加入 100 μL 不含药物的培养基后进行不同剂量的辐射,当归红芪超滤物组再依次加入 2 倍药物浓度的含药培养基 100 μL 后进行辐射。每个 96 孔板必须设置只含有培养基的溶剂组。每组平行 8 孔;分别培养 24,48,72 h 后吸取细胞培养液 50 μL 用于后续 ELISA 检测,再给每孔加入 0.5% MTT 20 μL,继续培养 4 h,最后每孔加入三联溶解液(10% SDS,5% 异丁醇,0.1% HCl)100 μL,过夜溶解后置于酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度 A。按以下公式计算,细胞增殖率 = (A_{实验组} - A_{溶剂组}) / (A_{空白组} - A_{溶剂组}) × 100,其中实验组包括模型组和归红芪超滤物组。

2.4 ELISA 法检测 CFs 分泌 COL-I 的含量 将上

述 2.2 项步骤中吸取的细胞培养液 50 μL 用于检测 CFs 分泌在培养液中的 COL-I 胶原的含量,标准曲线绘制及样品测定方法按照 ELISA 试剂盒说明书,于酶标仪上 450 nm 处 A,并通过绘制标准曲线计算样品中 COL-I 的含量。

2.5 CFs 中 ROS 含量的检测 将原代培养的 CFs (5 × 10⁵ 个/孔)接种于 6 孔板中。待细胞生长至完全贴壁且 80% 融合后,更换含不同药物浓度含药培养基培养 24 h,然后将模型组和药物组的细胞辐射 0.5 Gy 剂量,继续培养 12 h 后胰酶消化收集细胞,用无血清的培养基配置的 10 μmol·L⁻¹ DCFH-DA 的染液在培养箱中避光孵育 30 min,最后置于流式细胞仪下检测荧光强度。

2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测 CFs 中 COL-I 和转化生长因子-β(TGF-β)基因表达的检测 分别在药物干预及辐射诱导培养 24 h 后,提取各组细胞的总 RNA,采用 Real-time PCR 分析检测 COL-I, TGF-β mRNA 表达水平。总 RNA 的提取采用 trizol 一步法,紫外分光光度计检测浓度,并用 1% 甲醛变性琼脂糖电泳检测其完整性,调整总 RNA 的浓度至 500 mg·L⁻¹,取 2 μL 将其逆转录为 cDNA。逆转录体系,PCR 扩增体系及反应条件均参照试剂盒中的说明书设定,以标本中所提取的高浓度 RNA 逆转录得到的 cDNA 作为对照品,经 10 倍梯度比例稀释后,进行 PCR 反应制备标准曲线。反应结束后,根据自动生成的标准曲线,计算出待测样本中管家基因和目的基因的相对含量。以同一样本中,目的基因与管家基因含量的比值作为评价目的基因表达水平的指标。PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火延伸 30 s,共 40 个循环。所用引物均委托大连宝生物公司根据 GenBank 所发布的序列设计并合成。见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequence for gene

基因名称	引物序列	长度/bp
COL-I	上游 5'-GAGCGGAGAGTACTGGATCG-3'	189
	下游 5'-TACTCGAACGGGAATCCATC-3'	
TGF-β	上游 5'-TGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'	170
	下游 5'-TGCTTCAGCTCCACAGAGAA-3'	
GAPDH	上游 5'-TATCGGACGCCTGGTTAC-3'	195
	下游 5'-CTGTGCCGTTGAAGTTCG-3'	

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 CFs 中 Nrf2 蛋白表达 分别在药物干预及辐射诱导培养

72 h 后,弃掉培养液,预冷的 PBS 漂洗细胞 2 遍后置于冰上,迅速加入含有蛋白酶抑制剂的 lysis buffer 裂解液 200 μL ,置于冰上反复的轻柔吹打,充分裂解细胞。收集细胞裂解液后 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上清液,按 BCA 试剂盒操作说明检测总蛋白浓度,且将各组总蛋白调至统一水平;总蛋白经 $95\ ^\circ\text{C}$ 高温变性 10 min,取含 30 μg 蛋白质的样品进行恒流凝胶电泳分离,恒压转至 PVDF 膜,室温封闭膜 2 h (3% 脱脂奶粉);然后加入一抗 (Nrf2, GAPDH 和 Lamin B 兔多克隆抗体) 后 $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜 (稀释比例均为 1:1 000);次日 $4\ ^\circ\text{C}$ 预冷的 TBST 漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000),置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 2 h, $4\ ^\circ\text{C}$ 预冷的 TBST 漂洗 3 次;最后加入增强化学发光液,在化学发光成像系统上曝光拍照,通过 Image J 软件分析相关条带的灰度值。GAPDH 和 Lamin B 分别为细胞总蛋白和细胞核蛋白的内参,目的蛋白的相对表达量为目的蛋白与内参的灰度值比值。

2.8 统计学分析 所有重复测定结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 17.0 软件处理数据,并且用单因素方差分析对数据进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同培养时间对 CFs 形态学的影响 倒置显微镜下观察到 CFs 呈不规则长梭形,细胞两极呈放射状延伸,细胞体积较大,胞质透明且折光较浅,贴壁生长且伸展性很大。CFs 生长速度较快,以 1×10^5 个/mL 的密度接种于培养板培养 24 h 后大部分细胞贴壁,培养 48 h 后细胞呈汇合状态,部分区域细胞铺满瓶底,排列紧密,有的交叉重叠生长。见图 1。

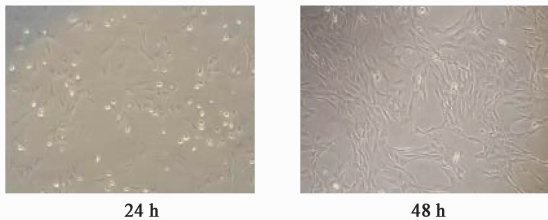


图 1 不同培养时间对 CFs 形态的影响 (倒置显微镜, $\times 100$)
Fig.1 Effect of different time for culture on morphologies of CFs (inverted microscope, $\times 100$)

3.2 当归红芪超滤物对 CFs 增殖的影响 对 CFs 作用 72 h 后当归红芪超滤物在低于 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 CFs 的增殖无明显抑制作用;而当当归红芪超滤物达到 $200\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,CFs 的增殖显著的受到抑制

($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 当归红芪超滤物对 CFs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Effect of ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on proliferation of CFs ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞增殖率/%
空白	-	100.00 ± 10.23
当归红芪超滤物	25	99.92 ± 9.82
	50	98.01 ± 10.14
	100	96.54 ± 9.63
	200	$76.25 \pm 8.29^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 辐射对 CFs 增殖和 COL-I 分泌的影响 辐射剂量 $1.0\ \text{Gy}$ 时,CFs 的增殖在辐射后 24,48,72 h 均受到明显的抑制;而当辐射剂量是 $0.5\ \text{Gy}$ 时,CFs 在 48,72 h 均表现出促进细胞增殖的作用;不同剂量辐射对 CFs 分泌 COL-I 的影响与辐射对 CFs 增殖的结果一致,大剂量辐射导致 CFs 分泌 COL-I 减少;而当辐射剂量是 $0.5\ \text{Gy}$ 时,CFs 分泌在细胞外的 COL-I 明显增多。研究结果表明低剂量辐射 ($0.5\ \text{Gy}$) 可以促进 CFs 的增殖和 COL-I 分泌,尤其在 $0.5\ \text{Gy}$ 辐射后 72 h 时 CFs 的增殖和 COL-I 分泌较空白组显著增高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 不同剂量的辐射对 CFs 增殖和 COL-I 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of different dose radiation on proliferation and COL-I secretion of CFs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	辐射剂量 /Gy	时间 /h	细胞增殖率 /%	COL-I / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	24	100.34 ± 9.54	24.54 ± 1.22
		48	136.28 ± 14.52	26.36 ± 3.01
		72	168.61 ± 15.32	32.69 ± 3.29
辐射	0.5	24	94.05 ± 11.22	22.55 ± 1.84
		48	$161.93 \pm 19.39^{1)}$	$31.93 \pm 2.99^{1)}$
		72	$191.87 \pm 16.92^{2)}$	$39.66 \pm 3.81^{2)}$
	1.0	24	$79.65 \pm 9.64^{1)}$	23.41 ± 2.03
		48	$101.35 \pm 10.53^{2)}$	$24.65 \pm 2.01^{1)}$
		72	$115.60 \pm 11.82^{2)}$	$26.22 \pm 2.54^{2)}$
2.0	24	$49.23 \pm 5.13^{2)}$	$18.42 \pm 2.14^{2)}$	
	48	$56.14 \pm 7.21^{2)}$	$20.19 \pm 2.54^{2)}$	
	72	$58.32 \pm 6.19^{2)}$	$21.11 \pm 2.61^{2)}$	

3.4 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 增殖和 COL-I

分泌的影响 当归红芪超滤物质量浓度 > 50 mg·L⁻¹时,CFs 的增殖在 0.5 Gy 辐射后 48,72 h 均受到抑制,并且当当归红芪超滤物质量浓度为 100 mg·L⁻¹时,抑制 CFs 增殖的效果最显著($P < 0.01$);当归红芪超滤物对辐射后 CFs 胶原分泌的

影响与抑制 CFs 增殖的结果基本一致,当归红芪超滤物质量浓度为 100 mg·L⁻¹时,抑制 CFs 分泌 COL-I 的效果最显著($P < 0.01$)。研究结果表明当归红芪超滤物可以抑制低剂量 0.5 Gy 辐射诱导的 CFs 增殖和 COL-I 分泌。见表 4。

表 4 不同浓度的当归红芪超滤物对辐射后 CFs 增殖和 COL-I 分泌的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on proliferation and COL-I secretion of CFs after radiation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	辐射剂量/Gy	质量浓度/mg·L ⁻¹	时间/h	细胞增殖率/%	COL-I 分泌量/mg·L ⁻¹
空白	-	-	24	100.21 ± 8.43	24.86 ± 2.03
			48	135.96 ± 12.50	25.92 ± 2.84
			72	169.24 ± 13.72	31.96 ± 4.09
模型	0.5	-	24	96.16 ± 10.92	23.06 ± 2.04
			48	158.63 ± 10.87 ¹⁾	32.05 ± 3.19 ¹⁾
			72	190.59 ± 15.42 ²⁾	38.96 ± 3.58 ²⁾
当归红芪超滤物	0.5	25	24	97.05 ± 10.22	23.55 ± 2.04
			48	161.69 ± 18.19 ¹⁾	32.03 ± 2.99 ¹⁾
			72	181.78 ± 15.42 ²⁾	37.66 ± 3.81 ²⁾
	0.5	50	24	98.09 ± 11.09	22.65 ± 1.84
			48	148.93 ± 10.39 ³⁾	27.93 ± 2.99 ⁴⁾
			72	171.87 ± 12.92 ⁴⁾	32.66 ± 3.81 ⁴⁾
	0.5	100	24	101.45 ± 7.43	24.86 ± 2.03
			48	130.74 ± 10.04 ⁴⁾	26.02 ± 2.84 ⁴⁾
			72	163.94 ± 12.21 ⁴⁾	30.89 ± 3.07 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 5~7 同)。

3.5 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 中 COL-I 和 TGF-β mRNA 表达的影响 0.5 Gy 的辐射明显促进了 CFs 中 COL-I 和 TGF-β mRNA 表达,当给辐射后的 CFs 中加入当归红芪超滤物时,CFs 中 COL-I 和 TGF-β mRNA 表达与 0.5 Gy 辐射组比较明显受到抑制,且当归红芪超滤物质量浓度为 100 mg·L⁻¹时抑制效果最显著($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 中 COL-I 和 TGF-β mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on relative expression of COL-I and TGF-β mRNA of CFs after radiation($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	辐射剂量 /Gy	质量浓度 /mg·L ⁻¹	COL-I	TGF-β
空白	-	-	1.02 ± 0.15	1.01 ± 0.12
模型	0.5	-	1.81 ± 0.22 ²⁾	2.13 ± 0.31 ²⁾
当归红芪超滤物	0.5	50	1.53 ± 0.17 ³⁾	1.75 ± 0.16 ³⁾
		100	1.27 ± 0.11 ⁴⁾	1.31 ± 0.09 ⁴⁾

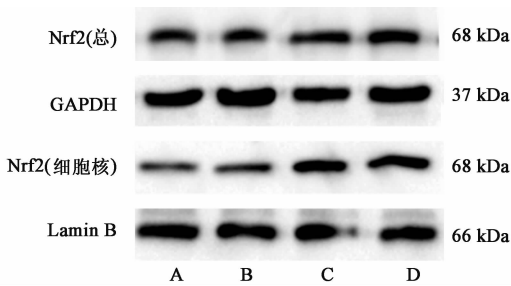
3.6 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 中 ROS 含量的影响 0.5 Gy 的低剂量辐射明显促进了 CFs 中 ROS 的生成,当给辐射后的 CFs 中加入当归红芪超滤物时,CFs 中 ROS 的生成与模型组比较明显受到抑制,且当归红芪超滤物质量浓度为 100 mg·L⁻¹时抑制效果最显著($P < 0.01$)。实验结果表明当归红芪超滤物抑制辐射后 CFs 的增殖和胶原分泌与辐射诱导的氧化应激反应密切相关。见表 6。

表 6 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 中 ROS 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on ROS of CFs after radiation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	辐射剂量/Gy	质量浓度/mg·L ⁻¹	ROS/%
空白	-	-	100.00 ± 6.84
模型	0.5	-	186.43 ± 15.54 ²⁾
当归红芪超滤物	0.5	50	152.89 ± 16.64 ³⁾
		100	121.14 ± 11.59 ⁴⁾

3.7 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 中 Nrf2 蛋白表达的影响 辐射后对 CFs 中总 Nrf2 蛋白的表达与空白组比较无明显变化,当给辐射后的 CFs 中加入当归红芪超滤物时,CFs 中总 Nrf2 蛋白的表达与 0.5 Gy 辐射组比较明显增多($P < 0.05$, $P < 0.01$)且当归红芪超滤物质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时增多效果最显著($P < 0.01$)。细胞核中的 Nrf2 蛋白与总 Nrf2 蛋白变化情况一致。实验结果表明当归红芪超滤物抑制辐射诱导 CFs 的氧化应激与 Nrf2 蛋白的表达密切相关。见图 2,表 7。



A. 空白组; B. 模型组; C. 当归红芪超滤物 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 当归红芪超滤物 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 2 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 中 Nrf2 蛋白表达的影响
Fig. 2 Effect of ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on Nrf2 protein expression of CFs after radiation

表 7 当归红芪超滤物对辐射后 CFs 中 Nrf2 蛋白的相对表达量影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of ultra-filtration extraction from Angelicae Sinensis Radix and Hedysari Radix on relative expression of Nrf2 protein of CFs after radiation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	辐射剂量 /Gy	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Nrf2(总) /GAPDH	Nrf2(细胞核) /LominB
空白	-	-	0.46 ± 0.08	0.43 ± 0.07
模型	0.5	-	0.42 ± 0.10	0.49 ± 0.09
当归红芪超滤物	0.5	50	$0.69 \pm 0.08^{3)}$	$0.97 \pm 0.12^{3)}$
		100	$0.72 \pm 0.11^{4)}$	$1.03 \pm 0.13^{4)}$

4 讨论

心肌纤维化是指在心肌的正常组织结构中胶原纤维过量积聚心脏组织中胶原浓度显著升高或胶原成分发生改变,其发生机制及调控因素复杂。心肌纤维化与心肌细胞和心肌成纤维细胞凋亡、炎症反应及心脏衰竭的发生和发展密切相关,其作为多种心血管疾病的终末结构性病理改变^[2]。研究表明^[7]心肌组织中心肌成纤维细胞分泌的胶原纤维的数量分布及排列发生改变均可导致纤维化的发

生,是心肌纤维化的物质基础。心肌纤维化可降低心脏的收缩和舒张功能导致慢性心力衰竭、恶性心律失常和猝死,对其发生机制及药物干预的研究具有重要临床意义。当归红芪超滤物是采用现代超滤膜技术研制的中药制剂,选用甘肃道地药材红芪取代了李东垣所创造的当归补血汤中的黄芪,再经超滤膜技术制备当归红芪超滤物。

ROS 源自细胞内正常代谢产物,且具有特定的化学活性。所有有氧呼吸的细胞在常规生长代谢过程中或受到外界因素的刺激时,都会产生 ROS。由于 ROS 本身是一个重要的信号分子,可激活多种氧敏感性激酶和转录因子,从而调节多种蛋白基因的表达,间接调控生理和病理过程,如促进细胞增殖或凋亡等^[8]。Nrf2 是机体抵抗氧化应激的重要调节因子。正常情况下,Nrf2 作为一种转录因子存在于细胞浆中,与肌动蛋白结合蛋白(Keap1)相互作用后被降解,因此 Nrf2 与 Keap1 解偶连是确保 Nrf2 对抗氧化防御体系中目标基因转录调控的第一步。活化的 Nrf2 从 Keap1 解离后发生核转位,与核内蛋白结合形成异二聚体后激活反应原件调控基因转录^[9]。因此,细胞内的抗氧化水平可以通过检测细胞质和细胞核中 Nrf2 蛋白的表达量直接反映。

近年研究表明氧化应激反应可以促进心肌纤维化的发展,其机制主要是 ROS 通过上调 TGF- β 表达促进心肌成纤维细胞的增殖和代谢^[10]。射线辐射可以直接电离组织的细胞产生 ROS,当细胞内 ROS 堆积或细胞消除 ROS 的防御机制被破坏时,体内的氧化与抗氧化作用失衡,引发细胞内多种信号分子的活化,或信号通路的改变,最终导致辐射后细胞整体生物学行为改变^[9]。相关研究^[6, 11]发现辐射可以诱导心肌成纤维细胞中 ROS 的堆积,而当红芪超滤物可以清除辐射诱导的心肌成纤维细胞中 ROS 的堆积,但他们的研究中所使用的辐射剂量为 10 Gy,这个剂量对细胞造成了严重的损伤,甚至未通过细胞凋亡途径直接杀死细胞,因此他们的研究中未发现低剂量辐射诱导心肌成纤维细胞增殖和胶原分泌的现象。目前研究表明细胞中高剂量的 ROS 累积导致细胞增殖抑制和凋亡的发生,但低剂量的 ROS 可以促进细胞增殖和基质分泌^[12]。本实验中发现 $> 1 \text{ Gy}$ 的辐射对 CFs 有明显的抑制作用,而低剂量辐射 (0.5 Gy) 可以促进 CFs 的增殖和 COL-I 分泌,说明 0.5 Gy 的辐射诱导了细胞内低剂量的 ROS 生成,而 $> 1 \text{ Gy}$ 的辐射诱导细胞产生了高剂量的 ROS,不同剂量的辐射诱导细胞产生的 ROS

含量是细胞整体生物学行为改变的关键。

综上所述,低剂量辐射(0.5 Gy)可以促进 CFs 的增殖和 COL-I 分泌,并且 CFs 中 ROS 和核转录因子 Nrf2 蛋白的含量明显升高;而当归红芪超滤物却明显抑制了低剂量辐射诱导的 CFs 增殖和 COL-I 分泌,并且当归红芪超滤物可以促进 CFs 中核转录因子 Nrf2 蛋白的核转位及 ROS 的清除。本实验研究明确了当归红芪超滤物对低剂量辐射诱导的 CFs 增殖和胶原分泌有显著的抑制作用,且药理学机制与增强细胞内的抗氧化途径密切相关。

[参考文献]

[1] Filopei J, Frishman W. Radiation-induced heart disease [J]. *Cardiol Rev*, 2012, 20(4): 184-188.

[2] Mandraffino G, Dalbeni A, Paunovic N, et al. Radiation-induced heart and vessel atherosclerosis disease [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 172(2): 505-506.

[3] 杨利丹, 杨云霜, 杜磊, 等. 补肾解毒方对辐射损伤小鼠胸腺、脾脏的影响[J]. *中医杂志*, 2016, 57(1): 67-70.

[4] 刘凯, 柴辉, 孙少伯, 等. 当归红芪超滤膜提取物对(12)C(6+)重离子束辐射致H22荷瘤小鼠免疫功能损伤的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(8): 661-668.

[5] 陈张敏, 李荣科, 张鹏飞, 等. 当归-红芪超滤膜提

取物对糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β_1 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(5): 113-118.

[6] 李应东, 刘野. 当归黄芪超滤膜提取物含药血清对辐射心肌成纤维细胞增殖和胶原的影响[J]. *江苏中医药*, 2010, 42(3): 70-71.

[7] GU J, LI H L, WU H Y, et al. Sodium tanshinone II_A sulfonate attenuates radiation-induced fibrosis damage in cardiac fibroblasts [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(9): 941-952.

[8] 李昂, 邢雅琪, 李晓霞, 等. 氧化应激中 ROS 对 FOXO3a 转录因子的调控作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(9): 1203-1207.

[9] 姚争光, 张文, 张万年, 等. Nrf2-Keap1 蛋白相互作用小分子抑制剂的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2017, 27(4): 325-333.

[10] 王世祥, 陆志锋, 许卫, 等. 依达拉奉可减轻大鼠氧化应激及延缓心肌纤维化[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(11): 1591-1596.

[11] 刘野, 李应东. 当归红芪超滤膜提取物含药血清对辐射心肌成纤维细胞 SOD 和羟脯氨酸的影响[J]. *甘肃中医学院学报*, 2010, 27(3): 1-3.

[12] Sarniak A, Lipinska J, Tytman K, et al. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation [J]. *Postep Hig Med Dos*, 2016, 70(1): 1150-1165.

[责任编辑 全燕]