

藏药八味沉香散对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 所致乳鼠心肌细胞 缺氧/复氧损伤的保护作用

朱艳媚^{1*}, 陈志²

(1. 青海大学医学院, 西宁 810001; 2. 青海师范大学生命地理学院, 西宁 810008)

[摘要] 目的: 研究八味沉香散(TBP)对连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)所致乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。方法: 采用SD乳鼠心肌细胞原代培养, 采用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型, 用TBP 10, 30, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3种不同剂量预处理24 h后, 检测培养液中半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase-3)和细胞凋亡; 测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、天冬氨酸转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD), 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性和丙二醛(MDA)含量。结果: 与模型组比较, TBP 3个剂量组明显减轻心肌细胞缺氧/复氧损伤后Caspase-3和细胞凋亡($P < 0.05$); 降低LDH, CK, AST的活性和MDA含量($P < 0.05$), 同时能够升高SOD, GSH-Px活性($P < 0.05$)。结论: 八味沉香散对 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 所致乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤具有明显的保护作用。

[关键词] 藏药八味沉香散; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$; 心肌细胞缺氧/复氧损伤; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0251-03

藏药八味沉香散(Tibetan Bawei Chenxiang powder, TBP)由沉香、肉豆蔻、广枣、白芸香、木棉花、乳香、木香和诃子等8味药材组成。该药具有活血止痛、清心热、养心安神之功效, 用于热病攻心、神昏谵语, 是藏医临床治疗各种急慢性心脑血管疾病最常用的药物之一。已有研究表明该药具有明显的抗心肌缺血^[1]和保护心功能^[2]的作用。本实验以

培养乳鼠心肌细胞为基础, 从细胞水平探讨不同剂量八味沉香散对连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)所致SD乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。

1 材料

1.1 动物 新生SD乳鼠, 鼠龄2~3 d, 由青海省实验动物中心提供, 许可证号SCXK(青)2009。

1.2 试剂 藏药八味沉香散(青海藏药厂, 批号

[收稿日期] 20110901(002)

[通讯作者] *朱艳媚, 硕士, 教授, 从事心脑血管生理研究, E-mail: zhuy7989@126.com

一定的调节脂代谢的作用。因此, 从脂质代谢紊乱学说的角度研究, 芪参健骨颗粒对股骨头坏死有一定的防治作用。

[参考文献]

- [1] 田琨, 童培建. 激素性股骨头缺血性坏死动物模型研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2007, 19(1): 95.
- [2] 苏强, 孙大胜, 于秋良, 等. 不同剂量内毒素合并激素建立兔股骨头缺血性坏死模型的影像学评估[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(11): 2108.
- [3] 李鸿, 贾丙申. 激素合并内毒素诱导大鼠股骨头坏死扫描电镜观察[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(5): 256.
- [4] Wang G J, Sweet D E, Regers L, et al. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis on the femoral head

in cortisone treated rabbits[J]. J Bone Joint Surg, 1997, 59(6): 729.

- [5] Jones J P Jr. Fat embolism and osteonecrosis[J]. Orthop Clin North Am, 1985, 16(4): 595.
- [6] 李月白, 殷力, 王义生, 等. 激素诱导骨髓基质细胞成脂分化的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(11): 687.
- [7] 王坤正, 毛履真, 胡长根, 等. 激素性股骨头缺血坏死发病机制的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1994, 32(9): 515.
- [8] 王坤正, 扬万石, 黄溶, 等. 兔激素性股骨头缺血坏死早期细胞学电镜观察[J]. 中华医学杂志, 1996, 76(1): 49.

[责任编辑] 聂淑琴

Z20023300); Na₂S₂O₄ (上海化学试剂采购站经销, 批号 90878); DMEM 培养液 (Gibco 公司, 批号 61100-061); 0.25% 胰蛋白酶和四甲基偶氮唑盐 (Sigma 公司, 批号 060408); 乳酸脱氢酶 (LDH, 批号 130061)、肌酸激酶 (CK, 批号 090121)、天冬氨酸转氨酶 (AST, 批号 020121) 试剂盒由中生北控生物科技股份有限公司提供; 超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 20100629)、丙二醛 (MDA, 批号 20100630) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px, 批号 20100705) 试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 仪器 CO₂ 培养箱, 酶标仪, CKX41 型倒置显微镜, LDZ5-2 型低速自动平衡离心机, RT-PCR 分析仪。

2 方法

2.1 乳鼠心肌细胞培养 培养方法参照文献[3-4]并加以改进。选用出生后 2~3 d 的 SD 乳鼠, 无菌条件下取出心脏, 用 PBS 充分洗涤后, 剪去心房及结缔组织, 用 PBS 冲洗后将心室组织剪成约 1 mm³ 碎块, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶, 在磁力搅拌器上以 30 r·min⁻¹ 的速度消化 5~7 min, 直至心脏组织基本消化完为止。用含 20% 胎牛血清的培养基将心肌细胞沉淀, 充分吹打混匀, 用差速贴壁法去除成纤维细胞及内皮细胞, 制成密度为 2.5 × 10⁶/mL 的心肌细胞悬液, 取 100 μL 接种到 96 孔板中, 放入 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养 72 h 后行缺氧实验。

2.2 缺氧/复氧 (A/R) 心肌细胞模型制备及给药 参照文献[5-6]并加以改进。取培养 72 h 的心肌细胞 50 孔, 随机分为 5 组, 每组 10 孔。①A/R 模型组, 加入终浓度为 5 mmol·L⁻¹ Na₂S₂O₄ 溶液, 刺激细胞 1 h 之后用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液换去缺氧培养液, 继续培养 24 h; ②正常对照组: 除不加入 Na₂S₂O₄ 外, 其他处理同缺氧/复氧模型组; ③八味沉香散低剂量组 (TBP-I); ④八味沉香散中剂量组 (TBP-II); ⑤八味沉香散高剂量组 (TBP-III) 共 5 组, 其中八味沉香散低、中、高剂量组每组分别加八味沉香散至 20% 血清培养基使其终浓度为 10, 30, 100 mg·L⁻¹ 作用 24 h 后, 其他步骤同模型组。

2.3 观察指标及检测方法 复氧 1 h 后每孔吸出细胞上清液 100 μL, 按照试剂盒的方法于全自动生化分析仪上测 LDH, CK, AST 值; 另复氧 1 h 后每孔吸出细胞取上清液 100 μL, 按试剂盒说明书进行 SOD, MDA 和 GSH-Px 含量的检测; RT-PCR 技术检测培养液中半胱天冬氨酸蛋白酶 (Caspase-3);

TUNEL 法检测培养液中细胞凋亡^[7]。

$$\text{细胞凋亡率} = (\text{凋亡细胞数} / \text{细胞总数}) \times 100\%$$

2.4 统计学分析 采用 SPSS 12.0 统计学软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数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 八味沉香散对 A/R 乳鼠心肌细胞培养液中 Caspase-3 和凋亡率的影响 A/R 组 Caspase-3 和凋亡率均高于正常对照组 (P < 0.05), 表明造模成功; 八味沉香散组 Caspase-3 表达和凋亡率较 A/R 组明显降低, 表现为剂量依赖性 (P < 0.05)。见表 1。

表 1 八味沉香散对 A/R 乳鼠心肌细胞培养液中 Caspase-3 表达和凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	Caspase-3 /μg·L ⁻¹	凋亡率 /%
正常对照	-	17.32 ± 3.74	13.75 ± 2.79
A/R	-	42.84 ± 5.78 ¹⁾	30.56 ± 3.47 ¹⁾
TBP	10	33.75 ± 3.94 ^{1,2)}	20.74 ± 4.15 ^{1,2)}
	30	27.49 ± 5.13 ^{1,2)}	20.08 ± 3.28 ^{1,2)}
	100	20.81 ± 3.85 ^{1,2)}	18.94 ± 4.59 ^{1,2)}

注: 与正常对照组比较¹⁾ P < 0.05; 与 A/R 比较²⁾ P < 0.05 (表 2~3 同)。

3.2 八味沉香散对 A/R 乳鼠心肌细胞培养液中 LDH, CK, AST 的影响 A/R 组 CK 和 LDH 活力均高于正常对照组 (P < 0.05), 表明造模成功; 八味沉香散组 CK 和 LDH 活力较 A/R 组明显降低, 表现为良好的剂量依赖性 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 八味沉香散对 A/R 乳鼠心肌细胞培养液中 LDH, CK, AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	LDH	CK	AST
正常对照	-	26.45 ± 2.17	8.67 ± 1.53	18.57 ± 2.13
A/R	-	68.13 ± 1.98 ¹⁾	20.32 ± 2.14 ¹⁾	52.46 ± 2.98 ¹⁾
TBP	10	48.26 ± 2.51 ^{1,2)}	13.56 ± 2.04 ^{1,2)}	28.46 ± 2.54 ^{1,2)}
	30	39.57 ± 2.91 ^{1,2)}	12.47 ± 1.74 ^{1,2)}	22.98 ± 1.08 ^{1,2)}
	100	31.25 ± 2.38 ^{1,2)}	10.72 ± 1.98 ^{1,2)}	20.45 ± 2.34 ^{1,2)}

3.3 八味沉香散对缺氧复氧乳鼠心肌细胞培养液中 SOD, GSH-Px 活性及 MDA, 含量的影响 与正常对照组相比, A/R 组和八味沉香散不同剂量组 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量相比较, 均有显著性差异 (P < 0.05); 与 A/R 组比较, 八味沉香散不同剂量组与模型组比较也有显著性差异 (P < 0.05)。

表3 八味沉香散对 A/R 乳鼠心肌细胞培养液中 MDA 含量, SOD, GSH-Px 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·L ⁻¹	SOD /U·L ⁻¹	MDA /nmol·L ⁻¹	GSH-Px /U·L ⁻¹
正常对照	-	60.43 ± 4.78	28.78 ± 2.56	172.47 ± 5.42
A/R	-	32.97 ± 3.27 ¹⁾	50.81 ± 3.75 ¹⁾	90.28 ± 6.74 ¹⁾
TBP	10	40.67 ± 2.94 ^{1,2)}	44.42 ± 3.81 ^{1,2)}	116.87 ± 5.76 ^{1,2)}
	30	47.58 ± 3.46 ^{1,2)}	34.67 ± 2.94 ^{1,2)}	137.59 ± 6.08 ^{1,2)}
	100	54.19 ± 4.08 ^{1,2)}	30.52 ± 3.09 ^{1,2)}	154.37 ± 5.48 ^{1,2)}

4 讨论

体外培养 SD 乳鼠心肌细胞缺氧复氧模型是目前最为常用的模拟心肌缺血再灌注的细胞模型之一^[8],该模型能够排除神经、体液、冠脉差异等因素的影响,使所有细胞处于均一的环境中,可观察藏药对心肌细胞的直接作用,从细胞水平评价藏药对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制^[9]。

Na₂S₂O₄ 是一种氧清除剂,它能迅速清除融入培养液中的氧,造成心肌细胞缺氧,但又不会损伤细胞膜;缺氧后换液,洗去 Na₂S₂O₄ 后即造成复氧^[10]。细胞凋亡是在严格基因控制下需要特定蛋白质合成的过程,是控生长发育动态平衡的必要手段^[11],维持器官的正常形态,控制细胞数量,清除异常、错位及无功能的或有害的细胞等。caspase-3 被认为是 caspase 家族介导细胞凋亡的最终执行者,实验结果表明:缺氧复氧组细胞凋亡明显增多, caspase-3 显著增强,说明低氧所产生的凋亡刺激信号激活了依赖于 caspase-3 家族的细胞凋亡,这可能时由于低氧等应激刺激激活细胞凋亡的信号转导系统和调控系统而诱导细胞凋亡,与其他相关报道基本一致^[12]。心肌在缺血缺氧时,心肌细胞内的心肌酶可因细胞的损伤而漏出,其中 LDH,CK 和 AST 是反映细胞损伤敏感的生化指标^[13],SOD 是超氧阴离子自由基的清除剂,可抑制自由基启动脂质过氧化保护细胞免受损伤;MDA 是脂质过氧化降解的主要产物,反应组织脂质过氧化的损伤程度;GSH-Px 水平可以提高组织的抗氧化能力。结果显示:在正常培养细胞的培养液中 LDH,CK,AST 含量很低,而损伤细胞的培养液中含量明显升高,八味沉香散处理的细胞培养液中 LDH,CK 和 AST 的含量下降,且一定范围内有剂量依赖性。

由此可见,藏药八味沉香散对 Na₂S₂O₄ 造成的心肌细胞的缺氧/复氧损伤具有一定的保护作用。

本课题通过研究发现,八味沉香散对缺血缺氧的心肌细胞保护作用机制是降低低氧所产生的凋亡刺激信号激活 Caspase-3 家族诱导的细胞凋亡;使胞内抑制钙超载,减少细胞内 ROS 的生成,清除自由基、抗氧化作用而对细胞起到保护作用。

[参考文献]

- [1] 杨梅,格日力,周小梅,等.藏药抗缺氧作用的初步研究[J].中国中药杂志,2004,29(11):1117.
- [2] 王建新,李永芳,李生花,等.八味沉香散对心肌缺血大鼠的保护作用[J].华西药学杂志,2006,21(6):550.
- [3] 马芳芳,沈晓丽,林立芳,等.缺氧诱导因子-1对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2009,23(3):223.
- [4] 梁启明,曲绍春,于晓风,等.刺五加叶皂苷对乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中国中药杂志,2009,34(19):2498.
- [5] 曹艳花,刘珊珊.生脉注射液对乳鼠心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J].山东医药,2010,50(14):38.
- [6] 刘丹,何明,易波,等.Pim-3对抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的研究[J].中国药理学通报,2009,25(3):321.
- [7] 王怡悦,莫绪明,马志飞,等.葡萄籽原花青素对小鼠深低温脑缺血-再灌注损伤的影响[J].江苏医药,2011,37(4):376.
- [8] 余薇,姚社,李璐,等.葛花总黄酮对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J].广东医学,2010,31(14):1794.
- [9] 李澎,王建农,卢树杰,等.山楂叶原花青素对乳鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国中药杂志,2009,34(1):96.
- [10] 吴启端,王绮雯,陈奕芝,等.β-细辛醚对缺血-再灌注损伤心肌细胞的保护作用[J].广州中医药大学学报,2009,26(3):251.
- [11] Ni Jhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neuronal development and disease [J]. Rev Neurosci, 2000,23:73.
- [12] 韩英,刘楠,陈荣华,等.大鼠脑缺血再灌注损伤后的细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 的表达 [J]. 中国临床神经科学, 2006, 14(1): 15.
- [13] 韩凤昭,彭涛,王林,等.红景天苷衍生物 NO₃ 对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用 [J]. 中国新药杂志,2009,18(3):248.

[责任编辑 聂淑琴]