

# 红花水提物对乳鼠心肌细胞 $H_2O_2$ 所致损伤的保护作用及 ESR 谱研究

叶锦霞<sup>1,2</sup>, 王 岚<sup>1</sup>, 杨 滨<sup>1</sup>, 梁日欣<sup>1\*</sup>

- (1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
2. 福建中医学院中西医结合研究院, 福建福州 350108)

**[摘要]** 目的: 观察红花水提物对体外培养大鼠乳鼠心肌细胞  $H_2O_2$  损伤的保护作用及电子自旋共振 (ESR) 波谱的影响。方法: 建立心肌细胞  $H_2O_2$  损伤模型, 实验分 5 组, 空白对照组, 模型对照组:  $H_2O_2$  ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 1 h; 红花水提物 500, 100, 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  剂量组: 分别给予不同浓度的红花水提物, 预处理 24 h, 然后换为  $H_2O_2$  ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 1 h。实验结束后分别收集细胞上清液测定乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS) 和黄嘌呤氧化酶 (XOD) 活性, 用自旋捕集技术结合电子自旋共振波谱技术 (Electron Spin Resonance, 简称 ESR) 检测各组细胞悬液中氧自由基信号的强弱。结果: 红花水提物各剂量组能够明显提高  $H_2O_2$  损伤后的心肌细胞的搏动频率, 使细胞存活率提高, 减少心肌细胞 LDH 的释放, 降低培养液中 MDA 和 XOD 的含量, 同时提高 SOD, NO 和 GSH-Px 的活性, 使细胞悬液中的 ESR 氧自由基信号明显减弱。结论: 红花水提物对体外培养乳鼠心肌细胞具有保护作用, 其机制与其减少活性氧产生、增强氧自由基的清除、增强内源性抗氧化酶的活性有关。

**[关键词]** 红花水提物; 心肌细胞; 过氧化氢 ( $H_2O_2$ ); 电子自旋共振

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0056-04

## ESR study and Protection of Water Extract of *Carthamus tinctorius* L. on Injury of Cardiomyocytes induced by Hydrogen Peroxide

YE Jin-xia<sup>1,2</sup>, WANG Lan<sup>1</sup>, YANG Bin<sup>1</sup>, LIANG Ri-xin<sup>1\*</sup>

- (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the antioxidant effects of water extract of *Carthamus tinctorius* L. on injury of cardiomyocytes induced by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and to detect reactive oxygen species (ROS) for exploring the mechanisms. **Methods:** In cultured neonatal rat cardiomyocytes, the antioxidant effect of water extract of *Carthamus tinctorius* L. was investigated after  $H_2O_2$  ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) induced damage. The spontaneous beating, the survival rate and release of LDH, MDA, SOD, NO, NOS, GSH-Px and XOD enzyme activity in supernatant were investigated, and cell suspension was collected for detecting reactive oxygen species (ROS) by electron spin resonance (ESR). **Results:** Preconditioning by water extract of *Carthamus tinctorius* L. increased the spontaneous beating and the survival rate, and decreased the release of LDH, MDA and SOD with the rise of SOD, NO, NOS and GSH-Px enzyme activity, while in the cell suspension ROS signal decreased significantly. **Conclusion:** Water ex-

**[收稿日期]** 2009-07-27

**[基金项目]** 科技部国际合作项目(十一五科技计划)(2006DFB31720)

**[通讯作者]** \* 梁日欣, Tel: (010)64014411-2948; E-mail: liangrixin@sina.com

tract of *Carthamus tinctorius* L. has antioxidative effect. The mechanisms are likely related with scavenging of free radicals, enhancing its clearance, enhancing endogenous antioxidant activity.

[**Key words**] water extract of *Carthamus tinctorius* L. ; cardiomyocytes; hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) ; electron spin resonance

过氧化氢( $H_2O_2$ )作为活性氧家族中的一员,氧化作用很强,可由超氧阴离子自发歧化生成,并能进一步生成羟自由基。也可直接作用于膜脂质,形成脂质过氧化物,导致细胞膜的损伤,而且还可通过脂质过氧化物分解代谢产物丙二醛(MDA),促使蛋白质交联聚合反应引起细胞损伤<sup>[1]</sup>。本研究采用 $H_2O_2$ 所致心肌细胞氧化损伤模型,观察红花水提取物预处理对 $H_2O_2$ 的红花水提取物抗氧化作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠乳鼠,由中国医学科学院实验动物研究所提供,动物饲养合格证号:SCXK(京)2005-0013。

**1.2 药品和试剂** 红花水提取物(新疆红花,加水提取过滤,浓缩至 $3.333\text{ g 生药}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),由中国中医科学院中药研究所分析室杨滨研究员提供。5-溴脱氧尿嘧啶(5-BrdU, Sigma, 批号:129H09661),过氧化氢( $H_2O_2$ , 市售分析纯,北京化学试剂厂,批号:20070703), PBN (N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron, Sigma, 批号:3376-24-7); MDA(批号 20070124), 乳酸脱氢酶(LDH, 批号 20070124), 超氧化物歧化酶(SOD, 批号 20070123), 一氧化氮(NO, 批号 20070121), 氧化氮合酶(NOS, 批号 20070110), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px, 批号 20071026)和黄嘌呤氧化酶(XOD, 批号 20071024)测定试剂盒,均为南京建成生物工程研究所产品。小牛血清(美国 Hyclone 公司产品,批号:AGM7412)。噻唑蓝(MTT)(Sigma 公司产品,批号:MT2128)。

**1.3 仪器** MCO-15AC 型  $CO_2$  培养箱(日本 SANYO 公司), 450 型酶联免疫检测仪(日本 BIO-RAD 产品); ESR200D-SRC 型电子自旋共振波谱仪(德国 Bruker 公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠乳鼠心肌细胞原代培养**<sup>[2-4]</sup> 参照 Webster<sup>[2]</sup>等方法,无菌取出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠乳鼠心尖部组织,剪碎后,以适量不含  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  的 0.06% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液,  $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心 10 min, 洗 3 次。用含 20% (体积分数)

新生牛血清,  $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  青、链霉素的 DMEM 培养基于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $CO_2$  饱和湿度条件下培养 2 h, 以差速贴壁分离法和  $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 5-BrdU 纯化心肌细胞。以细胞密度为  $1\times 10^6$  个/mL, 每孔  $100\text{ }\mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板。培养 48 h 后换液, 加入含 20% 新生牛血清的 DMEM 常规培养基培养, 培养第 4 天用于实验。

### 2.2 红花水提取物对心肌细胞抗氧化作用的影响<sup>[5]</sup>

取培养 4 天的心肌细胞, 随机分为 5 组: ①空白对照组: 加入正常普通培养基  $100\text{ }\mu\text{L}$ ; ②模型对照组: 加入正常普通培养基  $100\text{ }\mu\text{L}$ ; ③红花水提取物 500, 100, 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (终浓度, 下同) 剂量组: 各孔加入不同浓度的红花水提取物  $100\text{ }\mu\text{L}$  (DMEM 普通培养基配制) 孵育 24 h。然后将空白对照组换为无菌三蒸水  $100\text{ }\mu\text{L}$ , 模型组和各给药组换为  $H_2O_2$  溶液 ( $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 无菌三蒸水新鲜配制)  $100\text{ }\mu\text{L}$ , 再孵育 1 h。取造模前、造模后 1 h 两个时间点, 观察各组心肌细胞形态学变化, 同时记录搏动频率 ( $\text{b}\cdot\text{min}^{-1}$ )。实验后收集细胞上清液, 待测 SOD, MDA, LDH, NO, NOS, XOD 和 GSH-Px 等指标, MTT 法检测细胞存活率。

### 2.3 红花水提取物对细胞悬液中自由基信号的影响<sup>[6-7]</sup>

取培养 4 d 的心肌细胞, 随机分为 5 组: ①空白对照组: 孔中加入正常普通培养基  $0.8\text{ mL}$ ; ②模型对照组: 孔中加入正常普通培养基  $0.8\text{ mL}$ ; ③红花水提取物 500, 100, 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量组: 在孔中加入不同浓度的红花水提取物  $0.8\text{ mL}$  (DMEM 普通培养基配制), 共同孵育 24 h。然后各组(除空白对照组换为无菌三蒸水外)换为  $H_2O_2$  溶液 ( $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 无菌三蒸水新鲜配制), 每孔  $0.25\text{ mL}$ , 接着每组同时加入终浓度为  $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PBN  $0.25\text{ mL}$ , 小心吹打均匀后, 于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 孵育 1 h 后, 小心刮取细胞, 收集细胞悬液于  $5\text{ mL}$  EP 管中。于每个 EP 管中加入  $0.4\text{ mL}$  乙酸乙酯, 充分混匀后,  $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心 10 min; 小心吸取上层无色液体  $60\text{ }\mu\text{L}$  于样品管中, 放入 ESR 波谱仪的谐振腔中进行测定。测定条件: X 波段, 中心磁场:  $3385\text{ G}$ , 扫描宽

度:400 G,调制幅度:3.2 G,增益: $4 \times 10^5$ ,微波功率:20 mV,测试温度:室温。

**2.4 统计学方法** 应用 SPSS 11.0 统计软件,数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较使用单因素方差分析,统计学显著性设定  $P < 0.05$ 。

### 3 结果

**3.1 心肌细胞形态学变化** 倒置显微镜下发现,模型组发生了明显的形态改变,表现为细胞膜伪足收缩或消失,细胞折光率下降,异形心肌细胞数目增加并有大量细胞死亡,搏动幅度减弱,节律不齐,频率减慢;而红花水提物的各剂量组细胞形态变化均未及模型组明显,且死亡细胞明显减少。见图 1。

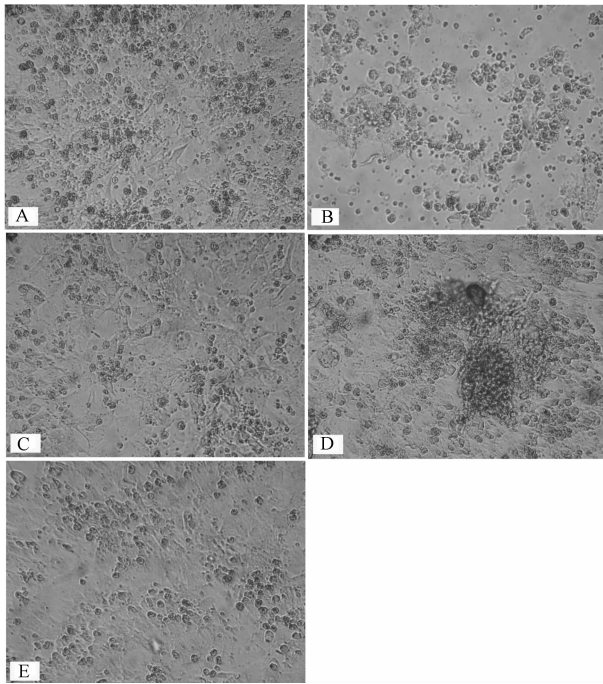


图 1 红花提取物对 $H_2O_2$ 损伤心肌细胞形态学的影响( $\times 160$ )

A. 正常心肌细胞;B.  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  损伤心肌细胞 1 h 后; C. 红花水提取物  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  孵育 24 h 后  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  损伤心肌细胞 1 h 后;D. 红花提取物  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 24 h 后  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  损伤心肌细胞 1 h 后;E. 红花提取物  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 24 h 后  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} H_2O_2$  损伤心肌细胞 1 h 后

**3.2 对心肌细胞搏动频率和存活率的影响** 红花水提取物(终浓度  $500, 100, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )组均能不同程度地提高  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $H_2O_2$  损伤后的细胞存活率,改善受损心肌细胞的搏动情况,提高受损心肌细胞的搏动频率并趋于正常搏动频率,与模型组比较具有显著性差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 红花水提取物对  $H_2O_2$  所致心肌细胞损伤搏动频率和存活率(A)的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	心肌细胞搏动频率( $\text{b} \cdot \text{min}^{-1}$ )		存活率 (%)
		造模前	造模后	
空白对照组	-	$91.50 \pm 3.00$	$82.40 \pm 5.32^{(2)}$	$0.79 \pm 0.03^{(2)}$
模型对照组	-	$87.00 \pm 14.28$	$57.60 \pm 5.59$	$0.57 \pm 0.02$
红花水提取物	500	$92.00 \pm 6.93$	$76.60 \pm 4.22^{(2)}$	$0.68 \pm 0.03^{(2)}$
	100	$87.00 \pm 12.49$	$70.40 \pm 4.16^{(2)}$	$0.61 \pm 0.01^{(2)}$
	20	$87.00 \pm 15.87$	$70.00 \pm 3.81^{(2)}$	$0.59 \pm 0.01$

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (下同)

**3.3 对细胞上清液中 MDA, LDH, SOD, NO 和 GSH-Px 等水平的影响** 不同浓度的红花水提取物对心肌细胞  $H_2O_2$  氧化应激损伤所致的 SOD, NO 和 GSH-Px 含量降低具有很好的抑制作用,与模型组比较有显著性差异,而又可以减少细胞上清液中 MDA, LDH 和 XOD 的含量,能够稍提高上清液中 NOS 水平,但未见显著性差异。说明红花水提取物具有减轻  $H_2O_2$  氧化应激损伤作用的趋势,与模型组相比,具有显著性差异。见表 2~3。

表 2 红花水提取物对心肌细胞  $H_2O_2$  损伤 SOD, MDA, LDH 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	SOD ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	LDH ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	MDA ( $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
空白对照组	-	$2.11 \pm 0.49$	$181.42 \pm 27.14^{(2)}$	$0.38 \pm 0.18$
模型对照组	-	$1.50 \pm 0.54$	$869.59 \pm 96.66$	$0.49 \pm 0.09$
红花水提取物组	500	$1.81 \pm 0.90$	$76.46 \pm 30.98^{(2)}$	$0.21 \pm 0.11^{(2)}$
	100	$2.48 \pm 0.79^{(1)}$	$130.33 \pm 39.40^{(2)}$	$0.26 \pm 0.09^{(2)}$
	20	$1.94 \pm 0.24$	$150.31 \pm 24.21^{(2)}$	$0.25 \pm 0.10^{(2)}$

表 3 红花水提取物对心肌细胞  $H_2O_2$  损伤 NO, NOS, XOD, GSH-Px 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NO ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NOS ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	XOD ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	GSH-Px ( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
空白对照组	-	$7.57 \pm 1.28^{(2)}$	$19.85 \pm 8.46^{(2)}$	$9.21 \pm 0.72$	$124.66 \pm 12.63^{(2)}$
模型对照组	-	$2.39 \pm 1.72$	$9.31 \pm 0.43$	$9.59 \pm 0.72$	$92.75 \pm 4.92$
红花水提取物组	500	$11.01 \pm 2.58^{(2)}$	$9.72 \pm 0.32$	$9.38 \pm 0.60$	$122.73 \pm 3.99^{(2)}$
	100	$7.67 \pm 0.51^{(1)}$	$10.83 \pm 1.34$	$8.70 \pm 0.46^{(1)}$	$129.59 \pm 9.26^{(2)}$
	20	$11.85 \pm 4.84^{(2)}$	$11.40 \pm 1.93$	$8.95 \pm 0.67$	$112.94 \pm 15.11^{(2)}$

**3.4 对自由基信号的影响** 活性氧自由基的信号峰为典型的 3 个峰,而以第 2 峰受干扰因素最小,也最稳定。因此每组细胞氧自由基与 PBN 形成的自旋加合物信号的相对值可用各组谱线第 2 峰的高度来表示。模型组中自旋加合物信号峰值明显较高,与空白组比较,具有显著性差异。而红花各给药组能不同程度使信号峰值降低,与模型组比较,有显著

性差异。说明红花水提物能够减少心肌细胞  $H_2O_2$  损伤后自由基生成,具有保护心肌细胞免受氧化损伤的作用。结果见表 4,图 2。

表 4 红花水提物对心肌细胞  $H_2O_2$  损伤后  
自由基信号的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 ( $mg \cdot L^{-1}$ )	自由基信号 峰-峰值 (cm)
空白对照组	-	$1.35 \pm 0.22^{2)}$
模型对照组	-	$2.04 \pm 0.19$
红花水提物组	500	$1.75 \pm 0.25^{1)}$
	100	$1.76 \pm 0.23$
	20	$1.76 \pm 0.17^{1)}$

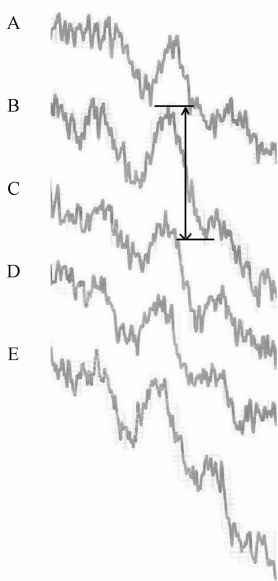


图 2 红花水提物对心肌细胞  $H_2O_2$  损伤后自由基的 ESR 波谱影响

A. 空白组; B. 模型组; C. 红花  $500 mg \cdot L^{-1}$  组;  
D. 红花  $100 mg \cdot L^{-1}$  组; E. 红花  $20 mg \cdot L^{-1}$  组

注:以 B 组为例,图中箭头之间的距离,为自由基 ESR 波谱中的第二峰峰值。

#### 4 讨论

$H_2O_2$  是体内氧化代谢的产物,也是一类 ROS,它不仅能直接氧化细胞膜上的脂质及蛋白,而且能自由穿过细胞膜和细胞内的铁离子反应生成  $\cdot OH$  等活性更强的自由基,引起一系列的损伤,常被作为膜脂质过氧化损伤的攻击剂。本研究选用  $H_2O_2$  作为氧化剂,对体外培养的心肌细胞造成损伤,可模拟体内自由基对心肌细胞的氧化损伤,同时又可以排

除药物代谢动力学和体液因素的干扰,观察红花水提物对心肌细胞的保护作用。

实验结果发现模型组的 SOD, GSH-Px, NO, NOS 值明显降低,说明心肌细胞  $H_2O_2$  损伤后,抗氧化能力降低;而与自由基生成密切相关的促氧化酶 XOD 活力、脂质过氧化物 MDA 含量和 LDH 含量显著升高,造成细胞大量损伤和死亡。说明心肌细胞  $H_2O_2$  损伤与增加氧化产物及提高促氧化酶活性有关。给予红花水提物预处理,发现红花各剂量组在提高 GSH-Px 活性方面更突出,与 GSH-Px 特异性催化还原型谷胱甘肽(GSH)对  $H_2O_2$  的还原反应相吻合。同时也能显著减少 LDH 的漏出量和 MDA 的生成。提示红花水提物能抵抗心肌细胞的  $H_2O_2$  损伤,可能是通过抑制 XOD 活性,有效清除自由基,抑制 MDA 和 LDH 的释放,提高 SOD, NO 和 GSH-Px 的活性,而达到保护心肌细胞,抑制其氧化损伤的作用。

自旋捕集技术的应用,成功地解决了活性氧自由基的检测,与 ESR 技术的结合,能够准确直观地检测氧自由基。本实验用自旋捕集技术与 ESR 技术结合,观察各组细胞悬液中的氧自由基信号。结果发现,红花水提物各剂量能明显减弱细胞悬液中 ROS 信号,提示其减轻心肌细胞  $H_2O_2$  损伤的作用可能也是通过相应减少自由基产生,增强其清除而实现的,促进了抗氧化中药抗氧化功效体系的建立。

#### [参考文献]

[ 1 ] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社, 1999: 9.

[ 2 ] Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH. Cardioprotection in an in vitro model of hypoxic preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(1): 453.

[ 3 ] 汪长华. 心肌细胞的培养及注意事项[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2003, 17(3): 230.

[ 4 ] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司, 2000: 186.

[ 5 ] 曹纯章, 卜丽莎, 高申, 等. 过氧化氢对培养心肌细胞损伤作用的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 628.

[ 6 ] 孙成文, 赵春燕, 钟国赣. 人参二醇单体对大鼠心肌作用的单钙通道分析及 ESR 谱研究[J]. 基础医学与临床, 1994, 14(4): 46, 290.

[ 7 ] 田晓华, 丛建波, 施定基, 等. 褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学的 ESR 研究[J]. 营养学报, 1997, 19(1): 32.