

紫芪方含药血清对肠上皮细胞 缺氧复氧损伤的保护效应

史成和^{1*}, 陆松敏², 张 沂¹, 张雅琳¹, 张莲萍¹, 凌 云¹

(1. 海军总医院药剂科, 北京 100037; 2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所二室, 重庆 420042)

[摘要] 目的: 探讨紫芪方对 IEC-6 肠上皮细胞缺氧复氧损伤的保护效应。方法: 建立 IEC-6 细胞缺氧复氧损伤模型; 采用血清药理学方法, 在细胞培养液中加入不同给药剂量制备的紫芪方药物血清(给药 1 次和间隔 1 h 两次给药 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ DJ-1, SJ-1; 给药 1 次和间隔 1 h 两次给药 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; DJ-2, SJ-2), 和参附药物血清(间隔 1 h 两次给药 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ SF) 及对照血清(C)。测定 LDH 漏出量及其细胞生长曲线。结果: 与对照组比较, SJ-1, SJ-2 两组制备的药物血清能明显减少 IEC-6 细胞 LDH 的漏出量, 其中 SJ-1 ($P < 0.05$), SJ-2 ($P < 0.01$); SJ-2 组 24 h 细胞活力明显高于缺氧复氧细胞损伤组及参附血清组 ($P < 0.05$), 并随时间而逐渐增强。结论: 紫芪方对 IEC-6 肠上皮细胞缺氧复氧损伤具有显著保护效应。

[关键词] 缺氧复氧; 肠上皮细胞; 紫芪方; 乳酸脱氢酶; 细胞生长曲线

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)09-0026-03

肠上皮细胞对缺血缺氧损伤极为敏感, 创伤后小肠黏膜上皮细胞的大量凋亡导致细胞间的紧密连接丧失, 肠屏障功能受损, 细菌或内毒素可通过细胞间隙直接进入血液或淋巴循环, 是导致不可逆体克和多器官功能衰竭(MODS)发生的重要原因^[1]。肠上皮细胞的缺氧复氧损伤可导致肠黏膜屏障功能严重受损, 如何提高肠上皮细胞对缺血缺氧损伤修复能力的药物研究已成为目前抗休克药物新的研究方向, 近年来研究表明: 天然药物对休克后肠上皮细胞损伤具有多方面保护作用^[2-4]。

紫芪方由人参、白及、大黄、三七等组成, 具有补气活血等作用。前期实验资料表明: 紫芪方对失血性休克大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能具有保护作用^[5]。本实验采用血清药理学方法^[6], 以 IEC-6 小肠上皮细胞缺氧复氧损伤为模型, 在体外观察药物血清对细胞生长及乳酸脱氢酶(LDH)漏出量的影响, 探讨紫芪方对肠道上皮细胞损伤保护机制。

材料与方法

1 材料

1.1 药品与主要试剂 黄芪(*Astragalus membranaceus* Bge. 山西产); 大黄(*Rhizoma palmatum* L. 四川产); 人参(*Panax ginseng* C. A. Mey. 吉林产); 附子(*Aconitum szechuanensis* Debx. 四川产); 丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge. 四川产); 白及(*Bletilla striata* (Thunb.) Reiehb. f.)。中药材均由重庆中药研究所秦松云教授鉴定。实验药物制剂自制(生药量 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。DMEM(高糖)培养基干粉、胎牛血清购自 Hyclone 公司; 胰蛋白酶 RPMI 1640 购自 GIBCOBRL 公司; HEPES 购自 BM 公司; 噻唑蓝(MTT) Sigma 公司; 二甲基亚砜(DMSO) Sigma 公司; 大鼠肠上皮细胞 IEC-6 株引自中国科学院上海细胞研究所; LDH 试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号: 20040108)。

1.2 实验动物 Wistar δ 大鼠(200 \pm 30) g 第三军医大学野战外科研究所动物室提供(标准二级动物房, SCXK(渝)20020003)。

1.3 主要实验仪器 POLYSTAT 衡温循环水浴箱(USA); SHELLBA CO₂ 培养箱; (USA), BIO-RAD 公司 450 型酶标仪; 洁净工作台(北京半导体设备一厂), ORION 720A 型 pH 仪(USA); leica 倒置立体显微镜(德国)。

2 方法

2.1 IEC-6 肠上皮细胞的培养 细胞接种于 250 mL 的培养瓶中, 加入含体积 10% 小牛血清和青链霉素

[收稿日期] 2006-07-10

[基金项目] 国家“973”重点基础研究发展规划项目 (G19999054203)

[通讯作者] * 史成和, Tel: (010) 66958228; E-mail: loveson2001shi@yahoo.com.cn

的 DMEM 培养液中,于 37℃、湿度 95%、5% 的 CO₂ 孵箱中培养, (1~ 2) d 更换培养液, 90% 融合时用 1 g/L 胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。

2.2 实验药物的制备 按处方称取饮片,清水浸泡 1 h,煎煮 3 次(30, 15, 15 min),合并提取液,常压加热浓缩至相对密度为 1.2 左右,加入 95% 乙醇至药液含醇量 70% 静置过夜,水浴蒸发至药液无乙醇味,加蒸馏水,过滤后收集于密闭容器(0.5 g·mL⁻¹)。

2.3 药物血清的制备 选择(200±30)g Wistar 大鼠,每组 5 只,分别给予参附液(20 g·kg⁻¹间隔 1 h 两次给药, SF)、蒸馏水 20 mL·kg⁻¹(S)和紫芪方药液 10 g·kg⁻¹(DJ-1), 20 g·kg⁻¹(DJ-2)及间隔 1 h 重复两次给药 10 g·kg⁻¹(SJ-1) 20 g·kg⁻¹(SJ-2)(灌药前禁食禁水 12 h),给药 1 h 后无菌条件下经颈动脉采集血液,3 000 r·min⁻¹, 10 min 离心,取上层血清,56℃水浴灭活 30 min,西林瓶收集,-20℃储存备用。

2.4 缺氧复氧 IEC-6 细胞损伤模型制备 将 IEC-6 细胞接种于 12 孔培养板,调节细胞数 2×10⁵·mL⁻¹,加入 10% 小牛血清的 DMEM 培养液常规培养成致密单层,倾去上层培养液,加入 0.1 mL 新鲜细胞培养液,以减少气体弥散距离,少量培养液能维持细胞存活,置入一密闭容器中(由第三军医大学烧伤研究所提供,直径(40×25)cm,具有两个气体进出口的密闭容器),充入混合气体(95% N₂ 和 5% 的 CO₂) 4 min,常压下测得容器内气体氧体积分数为< 1%,密闭后置入培养箱中缺氧 1.5 h,后置入培养箱中复氧 1 h。取出细胞培养板,加 0.8 mL 培养液和 0.1 mL 不同浓度的药物血清使培养液体积达到 1 mL,置入培养箱培养 24 h(培养箱条件为 37℃ 95% 的空气和 5% 的 CO₂)。

2.5 测定 LDH 实验分 8 组,每组 6 孔,正常细胞组(N)、缺氧复氧损伤组(A/R)和缺氧复氧损伤不同因素处理组(参附对照组(SF)、小剂量组(DJ-1)、大剂量组(DJ-2)、双倍小剂量组(SJ-1)、双倍大剂量组(SJ-2)。不同因素处理组在缺氧复氧模型制备后分别加入不同药物血清 0.1 mL 处理。依照上述实验分组及模型处理方法,于复氧后 24 h 取上清液,按 LDH 检测试剂盒说明书操作,在 490 nm 处采用紫外分光光度法检测。

2.6 对 IEC-6 肠上皮细胞缺氧复氧损伤细胞活力及细胞生长曲线的影响 采用 MTT 法,IEC-6 小肠上

皮细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液调整浓度,按每孔 1×10⁵·mL⁻¹ 细胞接种在 8 块 96 孔细胞培养板内,5% CO₂ 孵箱 37℃ 培养 24 h 后,待细胞贴壁,更换培养液,培养液量 200 μL,继续培养 24 h 后,4 块培养板设为正常对照组,每组 8 孔,弃原培养液,更换新鲜培养液(200 μL);另 4 块培养板设为损伤和药物干预组(SJ-2),每组 8 孔,弃原培养液后加入 20 μL 培养液,按照上述方法制备缺氧复氧模型后,分别加入 20 μL SF 血清 20 μL SJ-2 血清和 160 μL 培养液,空白对照组加入 180 μL 培养液,CO₂ 培养箱继续培养。于 0, 24, 48, 72 h 分别取出正常对照组及损伤和药物干预组两块培养板,加入 20 μL/孔 MTT 液,继续 37℃ 孵箱中孵育 4 h,然后吸除培养板各孔中液体,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷并震荡 10 min,在 BIO-RAD 450 型酶标仪上测定对照组及各样品组各孔在 490 nm 波长吸收值(OD 值)。

2.7 统计学方法 结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 Origin 统计软件对结果进行处理,采用单因素方差分析, P< 0.05 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 对 IEC-6 肠上皮细胞缺氧复氧损伤 LDH 漏出量的影响 结果表明:IEC-6 细胞缺氧复氧后细胞 LDH 漏出量较正常对照组明显升高(P< 0.01),SJ-1 组较损伤组 LDH 量明显减少(P< 0.05),DJ-2 和 SJ-2 组较损伤组 LDH 最显著降低(P< 0.01);同时 SJ-2 组较阳性药物对照组(SF) LDH 量显著降低(P< 0.05)。结果见表 1。

表 1 紫芪方含药血清对 IEC-6 细胞缺氧复氧损伤 LDH 漏出量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量(含药血清 μL)	LDH 值(U·L ⁻¹)
N	—	784.98±53.64 ²⁾
A/R	—	1 312.67±78.94 ¹⁾
SF	20	1 045.53±79.28 ¹⁾
DJ-1	20	1 190.19±59.05
DJ-2	20	1 002.78±97.59 ¹⁾
SJ-1	20	1 089.19±71.47 ¹⁾
SJ-2	20	891.40±35.78 ²⁾

注:与模型组比较²⁾ P< 0.01, ¹⁾ P< 0.05

3.2 对 IEC-6 肠上皮细胞缺氧复氧损伤细胞活力及细胞生长曲线的影响 结果表明:缺氧复氧后细胞培养 24 h 后细胞活力较正常对照组明显降低(P< 0.01);紫芪组(SJ-2)细胞活力明显高于损伤组及参

附组($P < 0.05$); 72 h 后紫芪组(SJ-2) 细胞活力与正常组差异不大($P > 0.05$); 除紫芪组外各组均进入细胞生长平台期。表 2 各组细胞不同时段 OD 值。

表 2 各样品 0 h 24 h 48 h 72 h 96 h OD 值的均值($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.188 6 \pm 0.021 3	0.375 7 \pm 0.030 1 ²⁾	0.445 2 \pm 0.060 5	0.455 4 \pm 0.034 3	0.453 6 \pm 0.047 4
A/R 组	—	0.242 5 \pm 0.032 6 ¹⁾	0.305 6 \pm 0.021 1	0.403 0 \pm 0.027 9	0.417 8 \pm 0.045 5
SF 组	—	0.261 3 \pm 0.020 7 ²⁾	0.421 1 \pm 0.028 0	0.482 2 \pm 0.049 4	0.437 0 \pm 0.048 3
SJ-2	—	0.303 4 \pm 0.017 8 ^{1, 3)}	0.413 8 \pm 0.033 4	0.521 6 \pm 0.061 6	0.530 8 \pm 0.041 7

注: 与损伤组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 SF 组比较³⁾ $P < 0.05$

4 讨论

紫芪方是在传统方剂“参附汤”的基础上制定以扶正固脱、通瘀开闭为治疗原则的中药复方。目的在于防止机体休克的发生发展和减少由于失血、严重创伤等疾病继发的“二次打击”发生。药物血清制备没有采取长时间大剂量反复给药后收集血清的方法, 而是采取了单次给药和间隔给药两种方式, 使研究最大程度上接近于临床用药的方式。实验表明: 紫芪提取液大剂量单次给药、小剂量和大剂量间隔 1 h 两次给药的药物血清均对缺氧复氧造成的肠上皮细胞损伤具有保护效应。

实验显示: 缺氧再复氧后损伤后, 24 h 后细胞活力与正常对照组比较显著降低($P < 0.01$), 增殖抑制; 紫芪组细胞活力明显高于损伤组及参附组($P < 0.05$); 72 h 后紫芪组细胞活力与正常组无显著差异($P > 0.05$), 并且除紫芪组外各组均进入细胞生长平台期, 而紫芪方组细胞仍能活跃增殖。提示: 肠上皮细胞缺氧复氧后, 活细胞琥珀酸脱氢酶活性降低, 线粒体功能及细胞活力显著下降。紫芪方药物血清对肠上皮细胞缺氧再复氧后的线粒体功能具有明显的保护作用。

研究结果表明: 乳酸脱氢酶(LDH) 漏出量和细

胞活力的检测表示了细胞损害及修复的状况, SJ-2、参附组 A/R 组、正常对照组的 LDH 漏出量的减少及细胞活性的提高与模型组比有非常显著性差异($P < 0.01$)。资料表明: 线粒体在缺血缺氧细胞死亡与异常凋亡中起重要的调节作用, 线粒体除了产生 ATP 供给细胞所需能量外; 同时线粒体又是个十分敏感的细胞器, 对损伤反应迅速; 线粒体具有相对独立的基因组, 其更容易受到损伤。同时线粒体又是控制真核细胞生长繁殖、死亡的重要细胞器。本研究结果提示: 紫芪方对肠上皮细胞线粒体的保护是保护细胞功能的主要原因。其发挥药物效应的成分及其作用的分子机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Wang P, Ba ZF Cioffi, -W-G, *et al.* Is gut the “motor” for producing hepatocellular dysfunction after trauma and hemorrhagic shock? [J]. *J Surg-Res*, 1998, 74(2): 141-148.
- [2] 柏干荣, 陆松敏, 李萍, 等. 三七皂苷 Rg1 对失血性休克大鼠肠上皮细胞线粒体损伤保护作用的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38(9): 665-667.
- [3] 彭维杰, 傅颖, 徐亚利. 黄芪注射液对烫伤大鼠肠源性感染及其肠道机械屏障功能的影响[J]. *江西医学院学报*, 2002, 42(5): 19-22.
- [4] 林茵绿, 杜顺福, 蔡元坤. 大黄对重症急性胰腺炎大鼠肠道屏障功能保护的实验研究[J]. *河北中医*, 2002, 24(11): 875-878.
- [5] 伊远学, 史成和, 刘建仓, 等. 参芪阻克方对失血性休克大鼠肠粘膜上皮细胞线粒体细胞色素和能荷的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(15): 1329-1331.
- [6] 赵万红, 曹永孝, 袁泽飞. 中药血清药理学的方法学探讨[J]. *中药新药与临床药理*, 2002, 13(2): 122-124.
- [7] 杨奎, 沈映君, 王一涛, 等. 中药血清药理学研究方法在中药影响内生致热原研究中的应用[J]. *中药药理与临床*, 1995, (3): 1.