

• 药理 •

益心康胶囊含药血清对氧应激所致 线粒体损伤的保护作用

韩玲¹, 陈可冀²

(1 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850;

2 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091)

摘要: 目的和方法: 应用羟自由基损伤体系(Fe^{2+}/H_2O_2) 在体外与大鼠心肌线粒体共同孵育 30min, 观察了氧应激对心肌线粒体的影响, 探讨益心康胶囊(H303) 含药血清对氧应激损伤的保护机制。结果: 不同浓度 Fe^{2+}/H_2O_2 可使反应体系中脂质过氧化产物明显升高; 线粒体超微结构发生明显改变; 线粒体肿胀度增加; 线粒体 GSH 含量明显降低。H303 含药血清可明显减轻上述损伤, 表现为显著抑制线粒体脂质过氧化和 GSH 含量的降低; 改善线粒体超微结构, 减轻线粒体肿胀度。结论: 氧应激可造成心肌线粒体结构和功能损伤。H303 抗心肌缺血损伤的作用机制是通过防止线粒体脂质过氧化, 保护内源性抗氧化物, 改善线粒体结构等作用而实现的。

关键词: 氧应激; 益心康胶囊; 含药血清; 心肌线粒体; 脂质过氧化

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)03-0025-04

The Protective Effect of Yi-Xin-Kang Capsule-containing Serum on Mitochondria Injury Induced by Oxygen Stress

HANG Ling¹ CHEN Keji²

(1. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing, 100850;

2. Xi-Yuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100091)

Abstract: The effect of oxygen stress on myocardial mitochondria of rat and the protective effect of Yi-Xin-Kang capsule(H303)-containing serum on oxygen stress-induced injury by incubating myocardial mitochondria with hydroxy free radical generating system (Fe^{2+}/H_2O_2) for 30 min, were observed. Result shows Fe^{2+}/H_2O_2 induced obvious injury of mitochondria concentration dependently. It was also found that mitochondria were significantly occurred with lipid peroxidation and swelled, the ultrastructures of mitochondria were changed and the content of GSH was markedly reduced. H303-containing serum showed significant protective effects on mitochondria injury induced by oxygen stress, and antagonized mitochondria lipid peroxidation and the decrease of endogenous GSH. The ultrastructures of mitochondria and their swelling degree were also improved.

Key words: Oxygen stress; Yi-Xin-Kang capsule; Drug-containing serum; Myocardial mitochondria; Lipid peroxidation

线粒体是能量代谢的重要场所, 又是调动细胞内钙稳态的重要细胞器之一, 同时也会产生自由基, 而且线粒体对氧自由基的毒性作用很敏感。在各种心肌损伤中, 线粒体往往首当其害, 进而损伤整个心肌细胞。因此, 心肌缺血不可逆性损伤的关键很可能在线粒体^[1~4]。本实验以大鼠心肌线粒体为靶标, 观察体外氧应激损伤—自由基生成体系直接攻击线粒体所造成的损伤, 并采用血清药理学的方法,

从亚细胞水平研究探讨具有抗心肌缺血作用的中药复方益心康胶囊含药血清对该损伤体系的作用, 以试图揭示其心肌保护作用的机理。

1 材料和方法

1.1 动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 250~ 280g, 动物数 100 只。上述动物由军事医学科学院动物中心提供。

1.2 药物 益心康胶囊(简称 H303, 由丹参、黄芪、川芎等组成) 上海药物研究所制药厂生产, 批号 9506303, 制剂为棕色粉末状物, 制剂标示量 0.4g/粒。

实验时用水溶解配成 50mg/ml 浓度。复方丹参片 (简称 FD), 广州制药总厂中药厂生产, 批号 950905, 去除糖衣, 制成粉末, 实验时用水溶解。

1.3 仪器 GF-型控时调速式高速分散器(江苏), CR21 型高速冷冻离心机(日立), TLL-C 型台式高速冷冻离心机(北京), RS-232C 型酶标仪(芬兰), F-4000 型荧光分光光度计(日立), Beckman DV640 型核蛋白分析仪(美国)。

1.4 含药血清的制备 H303 和 FD 分别为 50、100、200、400、800mg/kg, 给大鼠灌胃(每组 4 只), 灌胃后 60min 股动脉取血, 4℃冰箱过夜, 2000 转/min 离心, 留血清, 56℃灭活补体, 即为含药血清, -20℃保存备用。同时设立对照血清组(灌胃相同体积的水), 同样方法取血分离血清, 置 4℃冰箱或-20℃保存备用^[5,6]。

1.5 大鼠心肌线粒体(Mitochondria, mit)的分离制备^[7] 取心室肌组织+4 倍体积冷分离介质(mol/L: 蔗糖 0.25, EDTA 0.001, HEPES 0.02, pH7.4), 电动匀浆器匀浆(3000 转/分, 5sec × 2), 玻璃匀浆器匀浆(1min), 离心 600g × 10min, 取上清, 再离心 10000g × 10min, 沉淀+分离介质, 离心 10000g × 10min, 沉淀+分散介质(mol/L: 蔗糖 0.25, KCL0.02, HEPES 0.02, pH7.4)。以上操作过程均在 4℃进行, Lowry 法测 Mit 悬液的蛋白含量。电镜证实为线粒体。

1.6 氧应激损伤大鼠心肌线粒体模型

1.6.1 损伤体系浓度-效应关系 不同浓度的 Fe²⁺/H₂O₂(mmol/L: 0.2/50, 0.2/25, 0.2/10, 0.2/5, 0.2/0.5, 0.2/0.05, 0.2/0.005) 加入新鲜分离出的线粒体中(线粒体蛋白 5mg/ml), 37℃反应 30min, 10000g 离心 10min, 用线粒体悬浮介质洗 1 次, 4℃保存待测有关指标。

1.6.2 含药血清对损伤体系的影响 取血清(对照或含药血清) 0.1ml, 预先加入 0.2ml 线粒体悬液中(蛋白含量为 5mg/ml), 10min 后, 加入 0.1ml 不同浓度(根据不同实验而定)的 Fe²⁺/H₂O₂(FH), 37℃孵育 30min, 其余均同上述实验。

分组: (1) 正常血清对照组(CON) (2) Fe²⁺/H₂O₂ 损伤组(加对照血清) (3) Fe²⁺/H₂O₂-H303 含药血清组, 分别为 50, 100, 200, 400, 800mg/kg (4) Fe²⁺/H₂O₂-FD 含药血清组, 剂量同上(n=7)。

1.7 指标测定 利用 TBA 法^[8] 脂质过氧化的微量测定法, 在酶标仪上进行双波长(542nm 和 595nm) 比色, 以 540nm 处吸收值(A₅₄₀) 表示脂质过氧化程度。

根据文献^[9] 测定线粒体损伤后的 520nm 处的吸收值的变化, 表示为线粒体的肿胀度, 吸收值的降低与线粒体肿胀度成正比。利用 OPT 荧光法^[10], 在分光光度计上测定激发波长 350nm, 发射波长 430nm 下的线粒体荧光强度, 表示为线粒体还原型谷胱苷肽(GSH) 含量。将线粒体置于 3% 戊二醛中固定 2h, 1% 饿酸固定 1h, 常规冲洗、脱水、EPON872 树脂包埋并聚合, 制备超薄切片, 经铀、铅双重染色, 在 Philips 400T 透射电镜下观察线粒体结构改变。

1.8 统计学方法 实验数据按 t-检验进行组间比较。表示为 $\bar{x} \pm s$, P < 0.05, 具有统计学差异。

2 结果

2.1 氧应激对大鼠心肌线粒体脂质过氧化的影响及 H303 的作用 当线粒体与不同浓度的 Fe²⁺/H₂O₂ 在 37℃温育 30min 后, 反应体系中脂质过氧化产物明显升高。随着 H₂O₂ 浓度的增加(0.005mM - 50mM), 大鼠心肌线粒体脂质过氧化程度明显加重, 呈浓度依赖性关系(表 1)。

表 1 氧应激对大鼠心肌线粒体脂质过氧化的影响

组别	浓度 (mmol/L)	LPO (nmol/mg. pro)
CON		0.72 ± 0.21
Fe/H ₂ O ₂	0.2/0.005	1.95 ± 0.03**
	0.2/0.05	2.08 ± 0.46**
	0.2/0.5	2.11 ± 0.08**
	0.2/5	3.57 ± 0.34**
	0.2/50	6.60 ± 0.38**

注: 与 CON 组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01, $\bar{x} \pm s$, n = 7 下同。

选择 0.2mM/0.5mM Fe²⁺/H₂O₂ 为损伤剂量, 观察 H303 含药血清对线粒体的保护作用。结果可见, 损伤组线粒体发生了明显的脂质过氧化, 每 mg. pro 线粒体脂质过氧化水平比对照组增加了 48%。H303 五个剂量的含药血清组线粒体脂质过氧化虽然与 CON 相比也有明显增高, 但各组均可使脂质过氧化程度比损伤组显著降低, FD 组也具有明显的降低脂质过氧化作用。此外, H303 200、400mg/kg 组的脂质过氧化程度显著低于 FD 组(表 2)。

2.2 氧应激对大鼠心肌线粒体超微结构的影响及 H303 的作用 由图可见, 分离得到的正常心肌线粒体膜较完整, 嵴致密, 基质清楚, 个别线粒体稍肿胀破裂(图 A); 当心肌线粒体被 0.2mM/25mM Fe²⁺/H₂O₂ 损伤 30min 后, 线粒体内膜和外膜的完整性明显受到破坏, 如嵴排列紊乱, 甚至断裂、内容物溢出、

表2 H303 含药血清对氧应激损伤大鼠心肌线粒体脂质过氧化的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	含药血清(mg/kg)	LPO(nmol/mg. pro)	组别	含药血清(mg/kg)	LPO(nml/mg. pro)
CON		0.130 ± 0.003			
Fe/H ₂ O ₂ (0.2/5mM)		0.249 ± 0.006**			
Fe/H ₂ O ₂ -H303	50	0.223 ± 0.006#	Fe/H ₂ O ₂ -FD	50	0.211 ± 0.003#
	100	0.208 ± 0.005#		100	0.205 ± 0.007#
	200	0.199 ± 0.004# +		200	0.220 ± 0.004#
	400	0.220 ± 0.005# +		400	0.258 ± 0.008
	800	0.227 ± 0.005#		800	0.235 ± 0.009

注: 与 Fe/H₂O₂ 组比较# P < 0.05, ## P < 0.01; 与 Fe/H₂O₂-FD 组比较+ P < 0.05。

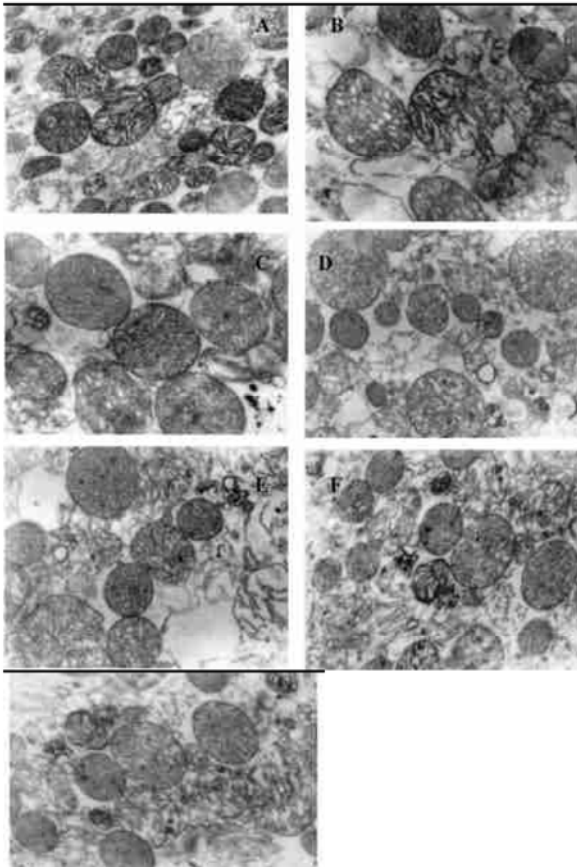


图 心肌线粒体电镜图(×30,000倍)

A: 正常心肌线粒体; B: Fe/H₂O₂(0.2/25mM) 损伤线粒体; C: Fe/H₂O₂(0.2/5mM) 损伤线粒体; D-G: Fe/H₂O₂(0.2/25mM) + H303 含药血清(分别为50, 100, 200, 400mg/kg) 保护组线粒体。

破裂的膜形成小泡甚至形成空泡, 基质模糊不清(图B)。随着损伤剂量的降低, 0.2mM/5mM Fe²⁺/H₂O₂ 组, 上述损伤表现有所减轻, 但线粒体仍有明显水肿, 多数呈圆形, 嵴排列紊乱, 基质模糊(图C); 选择该损伤剂量观察 H303 含药血清的保护作用, 发现 50mg/kg 组, 线粒体结构较完整, 但个别线粒体肿胀较明显, 线粒体呈圆形(图D); 100mg/kg 组, 线粒体有一定水肿, 但嵴致密, 排列较整齐, 个别线粒体空泡化(图E); 200mg/kg 组, 较损伤组变化有所改善, 线粒体膜较完整, 嵴较规则, 线粒体水肿明显的减

轻, 但仍有少量线粒体嵴排列紊乱, 且空泡化(图F); 400mg/kg 组(图G), 线粒体膜结构完整, 水肿程度不明显, 但也有嵴排列紊乱及断裂现象。

2.3 氧应激对大鼠心肌线粒体肿胀度的影响及 H303 的作用 随着 H₂O₂ 浓度的增加, A₅₂₀ 值呈进行性下降趋势, 0.2mM/50mM 和 0.2mM/5mM 两个浓度下, 吸光度值显著低于 CON 组, 说明该浓度可导致线粒体形态改变, 肿胀度增加(表3)。选择 0.2mM/5mM 的 Fe²⁺/H₂O₂ 作为损伤剂量, 发现 H303 含药血清与线粒体共同孵育, 可使线粒体肿胀度降低, 即表现为 A₅₂₀ 吸光度值的降低有所改善, 其中以 100、200mg/kg 组较为明显(与损伤组比较, P < 0.05), 说明 H303 含药血清能够显著抑制 Fe²⁺/H₂O₂ 引起的线粒体的肿胀。(表3)

表3 氧应激对大鼠心肌线粒体肿胀度的影响以及 H303 含药血清的作用($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	浓度(nmol/L)	肿胀度(A _{520nm})	组别	剂量(mg/kg)	肿胀度(A _{520nm})
CON		0.368 ± 0.008	CON		0.360 ± 0.002
Fe/H ₂ O ₂	0.2/0.05	0.357 ± 0.005	Fe/H ₂ O ₂ (0.2/5mM)		0.332 ± 0.002**
	0.2/0.5	0.351 ± 0.006	Fe/H ₂ O ₂ -H303	50	0.343 ± 0.002
	0.2/5	0.339 ± 0.007*		100	0.350 ± 0.003#
	0.2/50	0.340 ± 0.004*		200	0.351 ± 0.003#
				400	0.338 ± 0.002

2.4 氧应激对大鼠心肌线粒体 GSH 含量的影响及 H303 的作用 GSH 是体内的一种重要的抗氧化物质, 其含量降低标志着细胞内抗氧化能力下降。本研究结果显示: 0.005mM-50mMH₂O₂ 呈剂量依赖性地使线粒体 GSH 含量降低, 与对照组比较分别降低了 28~54%。选择 0.2mM/0.5mM 损伤剂量, 观察 H303 含药血清对线粒体 GSH 的保护作用, 发现 H303 400mg/kg 含药血清组可使线粒体 GSH 含量明显增加, H303 与损伤组及 FD 同剂量组相比, 均有显著性差异, H303 200mg/kg 组 GSH 含量也较 FD 同剂量组明显增加。(表4)

表 4 氧应激对大鼠心肌线粒体还原型谷胱甘肽的影响

组别	浓度 (nmol/L)	GSH (荧光强度值)	组别	剂量 (mg/kg)	GSH (荧光强度值)
CON	-	2047.8 ± 69.2	CON		1909.6 ± 145.6
Fe/H ₂ O ₂	0.2/0.005	1469.5 ± 42.8**	Fe/H ₂ O ₂ (0.2/0.5mM)		905.7 ± 36.3**
	0.2/0.05	1325.2 ± 60.0**	Fe/H ₂ O ₂ -H303	100	915.7 ± 101.3**
	0.2/0.5	1330.2 ± 86.5**		200	952.1 ± 26.1** +
	0.2/5	1206.5 ± 100.4**		400	978.8 ± 28.0**#
	0.2/10	1077.7 ± 104.3**	Fe/H ₂ O ₂ -FD	100	910.4 ± 38.5**
	0.2/25	1006.8 ± 72.8**		200	836.4 ± 70.7**
	0.2/50	944.2 ± 43.2**		400	765.3 ± 118.3**

3 讨论

我们认为中药血清药理学方法是目前中药学体外研究的较好的方法。它解决了体外实验中方法学的难题,其应用使我们进一步从细胞、亚细胞乃至分子水平研究中中药复方作用机制成为可能。自 90 年以来,国内已初步尝试开展了血清药理学研究,至今已有若干有关报道^[11-13]。

本实验选用能产生典型的 Fenton 反应以及能引起显著脂质过氧化反应的 Fe²⁺/H₂O₂ 体系,作为体外攻击线粒体,产生氧化应激的体系。结果发现,随着 Fe²⁺/H₂O₂ 浓度的增加,线粒体膜的损伤程度加重,并可引起一系列的病理改变:线粒体膜的脂质过氧化,使线粒体膜结构发生了改变,膜屏障功能丧失,膜内外离子交换障碍,引起线粒体在 520nm 处吸光值下降即线粒体膨胀度增加。这种损伤在电镜观察中也得到证实。同文献报道一致,有人将抗坏血酸和 FeSO₄ 与鼠肝线粒体一同孵育,可诱导线粒体的肿胀^[14]。此外,还发现羟自由基损伤线粒体后,其 GSH 含量明显降低。众所周知,GSH 在细胞的脂质过氧化损伤防御中发挥着重要的作用,其含量的降低标志着细胞抗氧化能力的降低^[15]。

本实验将 H303 含药血清与大鼠心肌线粒体共同孵育,直接观察对线粒体氧应激损伤的保护作用,发现 H303(1) 具有明显的保护线粒体免遭脂质过氧化损伤的作用,此作用可能是保护线粒体结构和功能的基础;(2) 防止或减轻线粒体的肿胀,保护了线粒体结构的完整;(3) 保护了线粒体的内源性抗氧化物质,从而使氧自由基的生成与清除保持平衡,使生物膜免遭氧化损伤。

参考文献:

[1] Vanden Hoek TL, et al. Mitochondrial electron transport can

become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 2441-2450.

[2] Roberto Ferrari. The role of mitochondria in ischemic heart disease [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996, 28(suppl I): 1-10.

[3] Luc D, Daniel M, Lucy M, et al. Myocardial ischemia and in vitro mitochondrial metabolic efficiency [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1996, 158: 161-169.

[4] Kay L, Saks VA, Rossi A. Early alteration of the control of mitochondrial function in myocardial ischemia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 3399-3411.

[5] 李仪奎, 吴健宇. 药理学进展 [M]. 北京: 科学出版社 1998. 257-262.

[6] 周明眉, 杨奎, 姜远平, 等. 中药血清药理学的方法学研究 IV—采血时间的确定及时效关系研究 [J]. *中药药理与临床*, 1998, 14(增): 110.

[7] Mccormack JG, Denton RM. Role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart [J]. *Biochem J*, 1984, 218: 235-247.

[8] 孙士勇, 徐波, 李秋菊, 等. 在 96 孔板上进行脂质过氧化的微量测定 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1995, 22(2): 165-169.

[9] Miller RN, Hunter FE. The effect of halothane on electron transport, oxidative phosphorylation, and swelling in rat liver mitochondria [J]. *Mol Pharmacol*, 1970, 6(1): 67-77.

[10] Hissin PJ, Hilf A. A Fluorometric methods for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues [J]. *Anal Biochem*, 1976, 74: 214-226.

[11] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药药理研究的新思路—中药血清药理学 [J]. *中国中医药科技*, 1997, 4(4): 239-240.

[12] 杨奎, 周明眉, 姜远平, 等. 中药血清药理学的方法学研究 I—含药血清药理作用强度与体内给药量关系研究 [J]. *中药药理与临床*, 1998, 14(增): 108.

[13] 周明眉, 杨奎, 姜远平, 等. 中药血清药理学的方法学研究—反应体系中含药血清加入量的研究 [J]. *中药药理与临床*, 1998, 14(6): 44-46.

[14] 张西哲, 赵会军, 付宏杰, 等. 组织中氧化型和还原型谷胱甘肽荧光测定法 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(2): 136-138.

[15] 高妹娟, 刘锡锰, 高贵, 等. 谷胱甘肽的抗线粒体脂质过氧化作用 [J]. *生物化学杂志*, 1997, 13(3): 287-291.