

- bedside[J]. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84(2-3): 97-107.
- [12] KNUDSEN E S, KNUDSEN K E. Tailoring to RB; tumour suppressor status and therapeutic response [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(9): 714-724.
- [13] HARBOUR J W, DEAN D C. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(4): 65-67.
- [14] SNYDER E L, DOWDY S F. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids *in vivo* [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2005, 2(1): 43-51.
- [15] WADIA J S, DOWDY S F. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 579-596.
- [16] 刘双又, 王晶, 胡俊波, 等. 磷脂酰肌醇 3-激酶上的一段多肽对 Jurkat 细胞的周期阻滞作用 [J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(12): 758-759.
- DOI 10.3870/yydb.2012.12.003

从氧化应激角度探讨葛根素注射液 对心肌的保护作用机制

陆守荣, 王滨, 万鹤鸣, 张炳山, 郭华, 王卓, 郁洁

(南京医科大学附属无锡人民医院老年医学科, 江苏无锡 214023)

摘要 目的 从氧化应激角度探讨葛根素注射液对心肌细胞的保护作用机制。方法 建立大鼠乳鼠体外心肌细胞损伤模型。设空白对照组, 模型组, 葛根素注射液低、中、高剂量组(终浓度分别为 25, 50, 100 mg · L⁻¹), 观察葛根素注射液对细胞活力的影响。利用全自动生化分析仪测定细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量。结果 模型组和葛根素注射液高剂量组心肌细胞悬液吸光度(A值)分别为(0.503±0.014), (0.539±0.012); LDH 分别为(61.58±3.41), (53.54±2.01) U · L⁻¹; CK 分别为(12.61±1.02), (7.49±0.44) U · L⁻¹; CK-MB 分别为(6.30±0.42), (2.52±0.44) U · L⁻¹; SOD 分别为(24.31±0.63), (25.34±0.34) U · mL⁻¹; MDA 分别为(1.39±0.22), (1.08±0.11) μmol · L⁻¹。葛根素注射液可明显提高缺氧损伤心肌细胞的活力, 能降低 LDH、CK、CK-MB 活性, 降低 MDA 浓度, 提高 SOD 活性(P<0.05 或 P<0.01)。结论 抑制氧化应激是葛根素注射液保护心肌细胞的作用机制之一。

关键词 葛根素注射液; 心肌细胞; 氧化应激

中图分类号 R286; R285.5

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)12-1539-03

Protective Mechanism of Puerarin Injection on Cardiocytes from the Perspective of Oxidative Stress

LU Shou-rong, WANG Bin, WAN He-ming, ZHANG Bing-shan, GUO Hua, WANG Zhuo, YU Jie (Department of Geriatrics, Wuxi People's Hospital, Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China)

ABSTRACT Objective To observe the effect of puerarin injection on cultured cardiocytes in the perspective of oxidative stress, and explore the mechanism of myocardial protection. **Methods** Neonatal cardiocytes were cultured and the cytotoxicity in cultured cardiocytes was induced by anoxia. Then, a method of serum pharmacology was used to study the effect of puerarin injection on cell viability, which was analyzed using the MTT assay. Super oxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and creatine kinase MB (CK-MB) activity in medium were assayed by automatic biochemistry analyzer. **Results** The absorbance (A) values, LDH, CK, CK-MB, SOD activity and MDA levels of the model group and puerarin injection group were as follows: A values (0.503±0.014), (0.539±0.012); LDH (61.58±3.41), (53.54±2.01) U · L⁻¹; CK (12.61±1.02), (7.49±0.44) U · L⁻¹; CK-MB (6.30±0.42), (2.52±0.44) U · L⁻¹; SOD (24.31±0.63), (25.34±0.34) U · mL⁻¹; MDA (1.39±0.22), (1.08±0.11) μmol · L⁻¹, respectively (P<0.05 or P<0.01). The A values indicated that the puerarin injection increased the activity of the cells significantly as compared with the model group. And it could significantly reduce LDH, CK, CK-MB activity and MDA levels and increase SOD activity in the medium as compared with model group (P<0.05 or P<0.01). **Conclusion** Puerarin injection can inhibit oxidative stress in myocardial cells, thereby to protect myocardium.

KEY WORDS Puerarin injection; Cardiocytes; Oxidative stress

葛根素注射液主要有效成分葛根素是由豆科植物野葛或甘葛藤根中提出的一种黄酮苷,可用于辅助治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死、视网膜动静脉阻塞、突发性耳聋及缺血性脑血管病、小儿病毒性心肌炎、糖尿病等,但其药理作用机制的研究尚不完善。笔者采用原代培养大鼠乳鼠心肌细胞缺氧损伤的模型,从氧化应激的角度探讨葛根素注射液保护心肌的作用机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂 葛根素注射液(规格:2 mL; 50 mg,天津药业集团新郑股份有限公司生产,批准文号:国药准字 H20055995), DMEM/F₁₂ 培养液(Hyclone, NTE0103);胎牛血清(浙江杭州四季青公司,批号:314575);胰蛋白酶(1:250, Amresco 公司); II 型胶原酶(Gibco, 批号:312122);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH, 批号:110425)、肌酸激酶(creatine kinase, CK, 批号:110173)、心肌型肌酸激酶同工酶(MB isoenzyme of creatine kinase, CK-MB)检测试剂盒(批号:110528,均由上海劲马生物科技有限公司提供);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malonyldialdehyde, MDA)(南京建成生物工程研究所,批号:20110926)。

1.1.2 动物 新生 1~3 d Wistar 乳鼠,雌雄不拘,均由苏州大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(苏)2007-007]。

1.1.3 主要仪器 37 ℃、5%二氧化碳(CO₂)培养箱(THERMO, FORMA3111 型, USA);倒置相差显微镜(OLYMPUS);酶标仪(BIORAD);37 ℃、94%氮气(N₂)-5% CO₂-1% 氧气(O₂)培养箱(THERMO, FORMA3131 型, USA)。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞缺氧损伤模型的制备 乳鼠无菌条件下取出心脏,将心室肌剪成 1 mm³的组织块培养。收集未贴壁的细胞悬液并调整细胞浓度至 5 × 10⁵ · mL⁻¹,接种于 96 孔板,于 37 ℃、5% CO₂培养箱中培养 48 h 后换液^[1-3]。第 4 天用无血清 DMEM/F₁₂ 继续培养 48 h,使同步化。设空白对照组,模型组,葛根素注射液低、中、高剂量组(终浓度分别为为 25, 50, 100 mg · L⁻¹),采用 MODEL3131 型三气培养箱,94%

N₂-5% CO₂-1% O₂条件下缺氧复氧孵育 24 h,空白对照组于原条件下培养。同一水平 6 孔并列。

1.2.2 观察指标 ①噻唑蓝比色法测定细胞活力吸去培养液,每孔加入 5 g · L⁻¹噻唑蓝溶液 50 μL。于 37 ℃、5% CO₂培养箱中孵育 4 h 后,弃上清液,每孔加入二甲亚砷溶液 150 μL 待溶解后,于 490 nm 波长下读取吸光度(A)值,A 值愈高表示细胞生长愈旺盛。②心肌细胞释放 LDH、CK、CK-MB 的活性收集细胞培养上清液,2 500 r · min⁻¹(r=12.5 cm)离心 10 min,以酶代动力学法测定 LDH、CK、CK-MB 活性,具体操作按照试剂盒说明书进行。③上清液 SOD 活性、MDA 含量收集细胞培养上清液,2 500 r · min⁻¹(r=12.5 cm)离心 8 min,测定 SOD 及 MDA 含量,具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.0 软件进行统计分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析;以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 噻唑蓝法检测细胞活力结果 模型组心肌细胞严重受损,A 值为(0.503±0.014),显著降低,与空白对照组(0.569±0.018)比较差异有统计学意义(P<0.01)。表明心肌细胞缺氧损伤模型制备成功。葛根注射液低、中、高剂量组 A 值分别(0.507±0.075), (0.523±0.019), (0.539±0.012),表明心肌细胞的受损程度显著改善,其中中、高剂量组与模型组比较差异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。

2.2 对 LDH、CK、CK-MB 活力的影响 心肌细胞经缺氧损伤后,LDH、CK、CK-MB 活性明显升高,与空白对照组比较差异有统计学意义(P<0.01);葛根注射液各剂量组 LDH、CK 及 CK-MB 活性均不同程度降低,并呈现剂量依赖性。与模型组比较差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

2.3 对 SOD、MDA 的影响 心肌细胞缺氧损伤后,SOD 明显下降,MDA 含量明显上升,与空白对照组比较差异显著(P<0.01)。葛根注射液各组均能升高 SOD、降低 MDA 含量,与模型组差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

3 讨论

近年来,心肌缺血性疾病发病率呈逐渐上升趋势。抗氧化的研究已成为目前研究心血管疾病防治的热点之一。葛根素结构含有两个酚羟基,所以能结合氧自由基,阻断其对组织细胞膜的破坏,从而抑制细胞膜损害引起的膜通道和离子泵功能的改变,保护细胞膜的稳定性^[4]。

收稿日期 2012-05-27 修回日期 2012-07-18

作者简介 陆守荣(1982-),男,江苏盐城人,住院医师,硕士,从事老年医学研究工作。电话:(0)13861753149, E-mail: lushourong6@163.com。

表 1 葛根素注射液对缺氧损伤心肌细胞释放 LDH、CK、CK-MB 的影响

Tab. 1 Effect of puerarin injection on LDH, CK and CK-MB in cultured hypoxia cardiomyocytes

U · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$, $n=6$

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	LDH	CK	CK-MB
葛根素注射液组	25	58.72±1.38	9.44±1.26 ^{*1}	4.36±0.50 ^{*1}
	50	57.75±1.53 ^{*2}	7.81±0.61 ^{*1}	3.91±0.71 ^{*1}
	100	53.54±2.01 ^{*1}	7.49±0.44 ^{*1}	2.52±0.44 ^{*1}
模型组	…	61.58±3.41 ^{*3}	12.61±1.02 ^{*3}	6.30±0.42 ^{*3}
空白对照组	…	48.83±3.04	6.02±0.37	1.16±0.13

与模型组比较, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$; 与空白对照组比较, ^{*3} $P<0.01$ Compared with the model group, ^{*1} $P<0.01$, ^{*2} $P<0.05$; compared with the blank control group, ^{*3} $P<0.01$

表 2 葛根素注射液对缺氧心肌细胞 SOD 及 MDA 的影响

Tab. 2 Effect of puerarin injection on SOD and MDA in cultured hypoxia cardiomyocytes

 $\bar{x} \pm s$, $n=6$

组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	SOD/(U · mL ⁻¹)	MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
葛根素注射液组	25	24.56±0.21	1.32±0.15
	50	24.96±0.42 ^{*1}	1.27±0.22
	100	25.34±0.34 ^{*2}	1.08±0.11 ^{*2}
模型组	…	24.31±0.63 ^{*3}	1.39±0.22 ^{*3}
空白对照组	…	25.43±0.43	0.63±0.11

与模型组比较, ^{*1} $P<0.05$, ^{*2} $P<0.01$; 与空白对照组比较, ^{*3} $P<0.01$ Compared with the model group, ^{*1} $P<0.05$, ^{*2} $P<0.01$; compared with the blank control group, ^{*3} $P<0.01$

此外, 心肌细胞缺氧损伤时, 心肌细胞膜在溶酶体、氧自由基等攻击下损伤严重, 通透性增加, CK、CK-MB、LDH 释放明显增加, 且其漏出量与细胞损伤程度呈正相关^[5], 是实验和临床均公认的对心肌缺血有诊断意义的酶。

建立缺氧损伤原代培养的大鼠乳鼠心肌细胞模型, 在细胞水平进行心肌损伤及保护因素的研究是近年国内外发展的方向, 利用这个模型可以模拟缺血心肌的病理状态, 同时可以排除神经、体液等复杂因素的影响。体外培养的心肌细胞在实验中具有准确、可靠、经济、简便、快速、重复性好、可比性强、易于观察、易于生化测定等优点, 可以从细胞水平、分子水平探索缺血心肌组织的病理机制, 也可以直接观察药物对心肌细胞的作用, 为研究单一因素对心肌细胞的影响提供了便利条件。因此, 笔者在本实验中选用缺氧损伤原代培养的大鼠乳鼠心肌细胞模型, 研究了葛根素注射液对心肌细胞的保护作用, 并从氧化应激角度探讨了其作用机制。结果显示, 心肌细胞经缺氧损伤后, 其 A 值

和 SOD 值均明显下降, 而 LDH、CK、CK-MB、MDA 含量明显上升($P<0.01$)。表明心肌细胞在缺氧损伤条件下搏动减弱甚至停止, 脂质过氧化反应增强, 这些结构和功能的改变与心脏缺血-再灌注损伤的结果基本相似, 心肌细胞缺氧损伤模型制备成功。葛根素注射液可明显提高缺氧损伤心肌细胞的活力($P<0.05$), 能降低 LDH、CK、CK-MB 活性和 MDA 浓度, 提高 SOD 活性。并且随着葛根素注射液剂量的增加, 其保护作用逐渐增强, 呈现明显的剂量依赖关系, 其中以 100 mg · L⁻¹ 剂量组作用最佳。可见, 促进体内自由基的清除、抑制氧化应激是葛根素注射液保护心肌的作用机制之一。与相关文献报道一致^[6]。总之, 葛根素能够有效降低缺血-再灌注损伤, 但其是否还通过其他途径发挥心肌保护作用仍需深入研究。

参考文献

- [1] WANG D X, LIU P, LIAO H B, et al. Protective effect of piperine and its derivatives on myocardial cells [J]. J Clin Reha Tiss Eng Res, 2010, 14(37): 6943-6945.
- [2] 马燕花, 李应东, 赵健雄, 等. 当归红芪超滤物对氧化损伤乳鼠心肌细胞的保护作用及其机制[J]. 中草药, 2010, 41(4): 602-608.
- [3] FRANGOIANNIS N G, SMITH C W, ENTMAN M L. The inflammatory response in myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(1): 31-45.
- [4] 鲍晓梅, 李珍, 秦小同. 葛根素预处理对体外大鼠心肌缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(6): 15-18.
- [5] 简洁, 刘曦, 黄仁彬, 等. 玉郎伞两种黄酮单体对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 942-945.
- [6] 巩红岩, 秦元旭, 王更富, 等. 葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血-再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 165-169.

DOI 10.3870/ydyb.2012.12.004