

西红花酸对缺糖缺氧心肌细胞损伤的保护作用

饶淑云, 钱之玉*

(中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 观察西红花酸 (crocetin) 对缺糖缺氧心肌细胞损伤的保护作用。方法 采用氰化钠和灌封高纯氮气两种缺氧方法和低糖培养, 造成心肌细胞缺糖缺氧损伤, 测定其细胞培养液中乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 的活力及心肌细胞中脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 的含量来观察西红花酸对心肌细胞的保护作用。结果 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol/L 西红花酸能显著降低缺糖缺氧心肌细胞 MDA 的含量以及 LDH、CK 的活性。结论 西红花酸对缺糖缺氧损伤的心肌细胞具有显著的保护作用。

关键词: 西红花酸; 心肌细胞; 缺氧; 丙二醛

中图分类号: R286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)04-0427-03

Cardioprotective effect of crocetin against low glucose and hypoxia injury in cultured rat cardiac myocytes

RAO Shu-yun, QIAN Zhi-yu

(Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Key words: crocetin; cardiac myocytes; hypoxia; MDA

西红花酸属类胡萝卜素类化合物, 具有不饱和共轭多烯酸结构, 是西红花的有效成分之一, 文献报道西红花酸具有抗肿瘤^[1]、抗动脉粥样硬化^[2]等多种药理作用, 本实验室一直致力于从中药栀子中提取分离西红花酸 (crocetin) 及其药效机制研究, 研究发现西红花酸体外具有抗氧化作用^[3], 可增加冠脉血流量, 整体动物实验发现西红花酸可改善心肌供血供氧, 缩小通过组织化学法所显示的梗死区, 对异丙肾上腺素所致急性心肌缺血有保护作用^[4], 对大鼠、犬由冠脉结扎引起的心肌缺血具有很好的保护作用。本研究采用原代培养的乳鼠心肌细胞观察西红花酸对缺糖缺氧心肌细胞损伤的保护作用。

1 材料

1.1 药物与试剂: 西红花酸, 本实验室精制, 含量 > 90% (HPLC 测定)。氰化钠, 中国药科大学库房提供; 胰蛋白酶 (Trypsin 1:250, 上海生工生物工程公司); DMEM 培养基 (Gibco), 高糖型和低糖型; 所用培养基均加双抗 (青霉素、链霉素各 100 U/mL); 5-溴-2-脱氧尿嘧啶 (5-bromo-2-deoxyuridine, Sigma); 噻唑蓝 (MTT, Amresco), 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司)。丹参注射液 (15 g/10 mL, 批号 0204232, 正大青春宝药业有限

公司); 葛根素注射液 (100 mg/2 mL, 批号 0209171, 广东省大日生物化学药液有限公司); 乳酸脱氢酶 (LDH), 肌酸激酶 (CK) 和丙二醛 (MDA) 测试盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 动物: 新生 1~3 d 的 SD 乳鼠 30 只, 由中国药科大学动物房提供。

2 方法

2.1 乳鼠心肌细胞的分离培养^[5]: 新生 1~3 d 乳鼠表面皮肤酒精消毒后, 开胸剪取心室放入平皿, 用 PBS 缓冲液反复清洗 3 遍, 剪成约 1 mm³ 组织块, 放入三角瓶, 加入 8~10 mL 0.1% 胰蛋白酶, 磁力搅拌器上 37 °C 水浴消化 10 min, 重复 6~8 次, 收集各次离心下来的细胞, 加入 15% 小牛血清 DMEM 培养基, 100 mL 培养瓶 37 °C 孵箱中孵育 1.5 h, 然后吸出心肌细胞悬液离心 (非心肌细胞先贴壁), 加入含 15% 小牛血清 DMEM 培养基和 5-溴-2-脱氧尿嘧啶 (终浓度为 0.1 mmol/L), 调整细胞浓度为 10^6 /mL, 接种到 24 孔板, 每孔 1 mL; 96 孔板, 每孔 200 μ L; 小培养瓶, 每瓶 3 mL; 继续培养, 48 h 后细胞贴壁, 更换培养基为含 1% 小牛血清 DMEM, 以后每 2 天换 1 次液, 培养 4 d 后实验。

2.2 对氰化钠造成心肌细胞损伤的影响^[6]: 心肌细

收稿日期: 2003-08-05

作者简介: 饶淑云 (1978—), 女, 江西南城人, 在读硕士研究生, 主要从事生化药理研究。

Tel: (025) 83271322 E-mail: raoshuyun@hotmail.com

* 通讯作者

胞悬液接种到 24 孔板, 每孔 1 mL, 4 d 后开始造模, 分 6 组, 每组 6 孔。正常组 (1 mL 高糖 DMEM 培养基); 模型组和给药组加氰化钠, 终浓度为 5 mmol/L, 模型组 (0.9 mL 低糖 DMEM 培养基) + 0.1 mL 50 mmol/L NaCN); 西红花酸高、中、低剂量组 (0.8 mL 低糖 DMEM 培养基 + 0.1 mL 50 mmol/L NaCN + 0.1 mL 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol/L 西红花酸), 西红花酸终浓度分别为 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} mol/L; 阳性药丹参注射液^[7]组 (0.8 mL 低糖 DMEM 培养基 + 0.1 mL 50 mmol/L NaCN + 0.1 mL 1.5 g/L 丹参注射液)。24 h 后用分光光度法测定细胞上清液中 LDH、CK 活力及细胞内 MDA 含量。

2.3 氰化钠损伤的心肌细胞 MTT 实验: 心肌细胞悬液接种到 96 孔板, 分 6 组, 每组 8 孔, 分组及药物处理同 2.2 项。另设无细胞空白组, 消除培养基对吸光度的影响。24 h 后每孔加入 20 μ L MTT (5 g/L), 继续培养 4 h, 小心吸出细胞上清液, 加入 200 μ L DMSO 裂解, 15 min 后于 570 nm 波长处酶联免疫仪上测定各孔吸光度 (A) 值。

2.4 对高纯氮气密封致心肌细胞损伤的影响^[7]: 心肌细胞悬液接种到 25 mL 培养瓶中, 培养 4 d 后开始实验。缺糖 DMEM 培养基预先通高纯氮气 (99.999%, 南京五十五动力气体公司提供) 0.5 h, 备用。实验分 6 组, 每组 6 瓶, 正常组加 2 mL 高糖 DMEM 培养基; 模型组加入 2 mL 氮气饱和的低糖 DMEM 培养基; 西红花酸高、中、低剂量组分别加入 1.8 mL 氮气饱和的低糖 DMEM 培养基和 0.2 mL 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol/L 西红花酸 (终浓度分别为 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} mol/L); 阳性药组加入 1.8 mL 氮气饱和的低糖 DMEM 培养基和 0.2 mL 10 g/L 葛根素注射液^[8] (终浓度为 1 g/L)。除正常组外其余各组加药后再充高纯氮气 30 s, 密封瓶口造成细胞缺糖缺氧。6 h 后取细胞培养上清液测定 LDH、CK 活力及细胞内 MDA 含量。

3 结果

3.1 对氰化钠损伤心肌细胞生化指标的影响: 结果见表 1。与正常组比较, 模型组细胞 MDA 含量增加 ($P < 0.05$), LDH、CK 外漏显著增加 ($P < 0.01$), 说明模型组细胞损伤严重。西红花酸高、中剂量组中 LDH、CK 外漏减少 ($P < 0.05$), MDA 含量降低。

3.2 MTT 实验结果: 见表 2。结果表明, 与模型组比较, 西红花酸高、中剂量组及丹参组吸光度值均有显著增加 ($P < 0.05, 0.01$)。

表 1 西红花酸对氰化钠损伤的心肌细胞 LDH、CK 外漏和细胞 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of crocetin on leakage of LDH, CK, and MDA content in cardiac myocytes injured by NaCN ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	剂量	LDH	CK	MDA
		/ (mol · L ⁻¹)	/ (U · L ⁻¹)	/ (nmol · mg ⁻¹)
正常	-	100.33 ± 8.07**	3.08 ± 0.66**	2.74 ± 0.06*
模型	-	207.36 ± 17.27	8.91 ± 1.40	3.17 ± 0.25
西红花酸	1×10^{-6}	172.13 ± 20.07**	5.90 ± 0.95**	2.76 ± 0.16*
	1×10^{-7}	163.66 ± 24.84**	5.94 ± 0.82**	2.77 ± 0.31
	1×10^{-8}	217.39 ± 5.06	6.77 ± 1.91	2.82 ± 0.19
丹参	0.15 g/L	141.81 ± 27.13**	6.55 ± 1.08**	2.95 ± 0.16

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 2 氰化钠损伤心肌细胞 MTT 实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Results of MTT assay of cardiac myocytes injured by NaCN ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	剂量 / (mol · L ⁻¹)	A
正常	-	0.18 ± 0.02*
模型	-	0.14 ± 0.03
西红花酸	1×10^{-6}	0.22 ± 0.09*
	1×10^{-7}	0.20 ± 0.04**
	1×10^{-8}	0.16 ± 0.04
丹参	0.15 g/L	0.25 ± 0.05**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.3 心肌细胞生长状态的观察: 分离下来的心肌细胞孵育 48 h 后更换为 1% 血清的培养基可见细胞的生长情况, 心肌细胞贴壁后逐渐展开, 形态多样, 从圆形到梭形, 三角形, 星形, 多角形, 此时可见单个细胞搏动, 频率较快, 不一致, 90~120 次/min, 然后多个临近的细胞伸出的伪足交联成细胞簇, 单个细胞搏动转变为细胞簇搏动, 最后多个细胞簇同步搏动, 频率 30~50 次/min。

3.4 西红花酸对高纯氮气密封造成心肌细胞损伤生化指标的影响: 结果见表 3。高、中剂量西红花酸能够显著降低 LDH、CK 的外漏及 MDA 的生成。

4 讨论

4.1 心肌细胞培养方法: 乳鼠心肌经胰酶消化下来的细胞除了心肌细胞, 还有很多杂细胞, 主要包括成纤维细胞和内皮细胞, 本实验采用差速贴壁的方法, 同时心肌细胞培养开始的 48 h 加入含终浓度为 0.1 mmol/L 的 5-溴-2-脱氧腺嘧啶 (5-BrdU)^[6,9~11] 的 15% 血清培养基培养, 48 h 后更换为含 1% 小牛血清的培养基培养。15% 血清有利于心肌细胞贴壁, 加入 5-BrdU 的目的是用来抑制成纤维细胞的增殖, 提高心肌细胞的纯度, 48 h 后 15% 血清培养

表 3 西红花酸对低氧损伤的心肌细胞 LDH, CK 外漏和细胞 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of crocetin on leakage of LDH, CK, and MDA content in cardiac myocytes injured by hypoxia ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂 量	LDH	CK	MDA
		$/(mol \cdot L^{-1})$	$/(U \cdot mL^{-1})$	$/(nmol \cdot mg^{-1})$
正常	—	113.85 $\pm$ 30.17*	2.12 $\pm$ 0.92**	1.48 $\pm$ 0.08**
模型	—	370.65 $\pm$ 65.85	9.78 $\pm$ 1.75	2.39 $\pm$ 0.07
西红花酸	1×10^{-6}	183.43 $\pm$ 38.15*	6.15 $\pm$ 0.76**	2.03 $\pm$ 0.05**
	1×10^{-7}	290.96 $\pm$ 47.50*	7.14 $\pm$ 1.08*	2.08 $\pm$ 0.13**
	1×10^{-8}	381.40 $\pm$ 66.46	7.91 $\pm$ 1.52	2.15 $\pm$ 0.35
葛根素	1 g/L	282.10 $\pm$ 63.90*	6.10 $\pm$ 1.94**	2.01 $\pm$ 0.12**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

基更换为 1% 血清培养基^[10]是为了防止 15% 血清刺激成纤维细胞的增殖,也防止无血清培养基促进心肌细胞凋亡^[11]。同时心肌细胞培养的时间不宜过长,一般培养 3~4 d 可见心肌细胞成簇搏动,即可开始造模。目前部分文献仅采用差速贴壁的办法提高心肌细胞的纯度,这是值得商榷的。

4.2 缺氧缺糖模型: 心肌是体内摄氧量最高的组织,这一特点决定了心肌细胞对各种能引起心肌缺血缺氧的因素特别敏感,而短时间急剧缺血缺氧比长时间持续轻度缺氧更易造成心肌损伤。本实验选用两种方法造模,用 5 mmol/L 氰化钠阻断呼吸链缺糖培养 24 h 造成心肌细胞化学性缺氧损伤,另外采用传统方法灌封高纯氮气,密封培养,使细胞氧分压过低,同时缺糖培养 6 h 造成损伤。结果发现西红花酸对化学性缺氧和生理性缺氧损伤的心肌细胞都具有一定的保护作用。

4.3 MTT 实验结果可以反应活细胞及琥珀酸呼吸链的状态,结果表明西红花酸高、中剂量组细胞活性与模型组比较显著增加,说明西红花酸对氰化钠造成的心肌细胞损伤有一定保护作用。

心肌细胞富含氧化酶,当心肌细胞因缺血缺氧受到损伤时,膜的完整性遭到破坏,细胞通透性增加,胞内的酶外漏,测定细胞培养上清液中 LDH, CK 水平能反应细胞损伤的程度。本实验两种方法造成心肌细胞缺糖缺氧损伤,模型组 LDH, CK 释放增加,与正常组比较差异极显著,表明细胞损伤严重,而西红花酸 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol/L 能够显著降低 LDH, CK 的外漏,说明西红花酸对损伤心肌细胞有一定保护作用。MDA 是体内氧自由基攻击

生物膜脂质过氧化的产物,测定细胞内 MDA 含量能够间接反应细胞损伤程度,结果显示西红花酸 1×10^{-6} mol/L 能显著降低 MDA 含量,推测药物具有抗自由基^[12]和稳定细胞膜的作用。

实验分别采用了两种常用的药物丹参和葛根素作为阳性对照,结果显示西红花酸减少 MDA 的含量比丹参强,减少 LDH, CK 的外漏与丹参、葛根素相当,但西红花酸的使用剂量小于这两种药物,该结果提示西红花酸有可能成为一种高效低毒的心血管药物,其深入的作用机制正在研究。

References:

- [1] Abdullaev F I. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Exp Biol Med*, 2002, 227(1): 20-25.
- [2] Gainer J I, Jones J R. The use of crocetin in experimental atherosclerosis [J]. *Experientia*, 1975, 31: 548-549.
- [3] Gong G Q, Liu T Z. Antioxiadative effect of crocetin *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(4): 306-309.
- [4] Liu T Z, Qian Z Y. Protective effect of crocetin on isoproterenol-induced myocardial injury in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(5): 439-442.
- [5] Xu S Y, Bian R L, Chen X, *et al.* *Methodology of Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [6] Douwe E, Atsma E M, Lars B, *et al.* Role of calcium-activated neutral protease (Calpain) in cell death in cultured neonatal rat cardiomyocytes during metabolic inhibition [J]. *Circ Res*, 1995, 76(6): 1071-1078.
- [7] Ke Y H. Effects of *Salvia miltiorrhiza* Injection on cardiomyocyte apoptosis in neonatal rats [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med* (山东中医药大学学报), 2001, 25(5): 376-378.
- [8] Zhu Z T, Li H J, Lu Y, *et al.* Inhibitive effect of puerarin on increased NO production by neonatal cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation injury [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 33(4): 343-346.
- [9] Xing F D, Rokosh D G, Simpson P C. Autonomus and growth factor-induced hypertrophy in cultured neonatal mouse cardiac myocytes: Comparison with rat [J]. *Circ Res*, 2000, 87(9): 781-788.
- [10] Satoaki M, Tetsuya T, Natsuya K, *et al.* Cardioprotective effect of angiotension-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes [J]. *Circulation*, 1999, 99(6): 817-822.
- [11] Ricky M, Frank C B. Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(18): 12567-12575.
- [12] Tseng T H, Chu C Y, Huang J M, *et al.* Crocetin protects against oxidative damage in rat primary hepatocytes [J]. *Cancer Lett*, 1995, 97(1): 61-67.