

- ciency of spleen's mice [J]. *Strait Pharm* (海峡药学), 2000, 12(3): 27-29.
- [3] Li Z B, Qiu H M, Liu G P, *et al*. Effect of Qing-Du-Yin and Yang-Zheng-Pian on granulocytopoiesis in mouse with cyclophosphamide induced [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 1999, 16(1): 34-37.
- [4] Liu S Q, Ma W X, Tang X Z, *et al*. Determination of the content of psoralen and isopsoralen in Chinese herbs by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(7): 355-358.
- [5] Wang H T. Xiaoxu used alone in clinical practice [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 30(3): 53.
- [6] Liu L L, Yuan Y, Chen W S, *et al*. Identification of Yangti (crispaterhubarb) by near infrared diffuse reflectance spectroscopy [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(11): 1024-1026.
- [7] Luo B, Zhong R, Song S S. Study on the protective effects of bone marrow lesion induced by chemical drugs *in vivo* using Xue-bao [J]. *J Clin Hematology* (临床血液学杂志), 2002, 15(1): 20-22.
- [8] Li J S, Fu J D, Tang J. Clinical study on *Astragalus* injection combined with radiotherapy and chemotherapy in treating malignant tumor [J]. *Pract Clin Med* (实用临床医学), 2002, 3(40): 67-71.
- [9] Matthew E B, Christopher B W, Yan T, *et al*. Oestrogen-mediated suppression of tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis in MCF-7 cells: subversion of Bcl-2 by anti-oestrogens [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2001, 78(5): 409-418.

西红花酸对羟自由基损伤的原代心肌细胞的保护作用

沈祥春, 钱之玉*

(中国药科大学 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 研究西红花酸 (crocetin) 对羟自由基 ($\text{OH}\cdot$) 损伤的原代培养心肌细胞的保护作用。方法 培养的原代心肌细胞加入不同浓度的西红花酸后, 用 $0.5\text{ mmol/L OH}\cdot$ 损伤原代培养的心肌细胞, 检测细胞培养上清液中的乳酸脱氢酶 (LDH)、心肌细胞线粒体琥珀酸脱氢酶 (MSD) 的活性, 心肌细胞线粒体膜电位 (MMP) 的变化, 并用流式细胞仪及 DNA 梯度电泳检测细胞凋亡。结果 $0.5\text{ mmol/L OH}\cdot$ 使细胞培养上清液中 LDH 活性增加、MSD 的活性降低、MMP 降低、心肌细胞凋亡率增加。西红花酸 $1.0, 0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 明显降低培养上清液中 LDH 活性、提高 MSD 的活性及 MMP、降低心肌细胞凋亡率, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结论 西红花酸对 $\text{OH}\cdot$ 所致的心肌细胞损伤 (凋亡) 具有保护作用。

关键词: 西红花酸; 羟自由基; 心肌细胞

中图分类号: R 286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)06-0657-04

Protection of crocetin on primary culture cardiac myocyte injured by hydroxyl free radicals

SHEN Xiang-chun, QIAN Zhi-yu

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

Abstract: **Object** To study the cardio-protective effect of crocetin on primary culture cardiac myocyte injured by hydroxyl free radicals. **Methods** After adding crocetin, primary culture cardiac myocyte was injured by 0.5 mmol/L hydroxyl free radicals which were generated by Fenton systems. The activity of lactic dehydrogenase (LDH) and mitochondrion succinic dehydrogenase (MSD) was observed. Mitochondrion membrane potential (MMP) was detected by Rh123. The ratio of cardiac myocyte apoptosis was investigated by flow cytometry and DNA ladder electrophoresis. **Results** Compared with the model group, crocetin significantly decreased the activity of LDH in culture supernatant and the ratio of cardiac myocyte apoptosis, markedly increased the activity of MSD and MMP. **Conclusion** Crocetin has the protective effect on the apoptosis of cardiac myocyte injured by hydroxyl free radical.

Key words: crocetin; hydroxyl free radicals; cardiac myocyte

近期的研究结果表明心肌受损的主要途径之一是氧自由基及其引起的脂质过氧化反应而导致的心肌细胞凋亡^[1,2]。羟自由基 ($\text{OH}\cdot$) 是人体内反应性最强的氧自由基, 尽管它的半衰期短, 扩散范围小, 但极其活泼, 易溶于脂质, 因此 $\text{OH}\cdot$ 的危害性更

大, 它及其介导的脂质过氧化反应与体内许多重要生理和病理过程密切相关^[3]。西红花苷及其苷元西红花酸是西红花的主要有效成分^[4], 具有不饱和共轭烯酸结构, 属类胡萝卜素类, 具有极强的抗氧化作用^[5]。国外研究资料提示西红花酸可抑制蛋白激酶

* 收稿日期: 2003-11-13

作者简介: 沈祥春, 男, 山东郯城人, 中国药科大学博士研究生, 主要研究方向为生化药理学和心血管药理学。

* 通讯作者 Tel: (025) 83271322

A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC) 的作用^[6], 本实验室研究结果表明西红花酸对大鼠、犬由冠脉结扎引起的心肌缺血及缺血再灌注损伤具有很好的疗效, 并对缺糖缺氧心肌细胞损伤具有保护作用^[7]。本研究西红花酸对 OH· 损伤的体外培养原代心肌细胞的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: 西红花酸, 本实验室精制, 含量 > 90% (HPLC 法测定)。MTT, Fluka 产品; 低糖 DMEM 培养基, Gibco 产品; PI、罗丹明 123 (Rhodamine 123, Rh123) 为 Sigma 公司产品; Rnase A, 华美生物工程公司产品; 葛根素注射液, 广东省大日生物化学药业有限公司, 规格: 100 mg/2 mL; 批号: 0005181。

1.2 仪器: Eppendorf 5417R 冷冻离心机; FACSCalibur 流式细胞仪, Becton Dickinson 公司; 1420 Victor² 多标记免疫分析仪, PerkinElmer Lifescience 公司; GDS8000 凝胶成像分析系统 (Syngene Corporation, 英国)。

1.3 动物: 新生 1~3 d SD 乳鼠, 由中国药科大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 心肌细胞培养: 新生 1~3 d 的 SD 乳鼠, 取心室肌置 D-Hanks 液中剪成约 1 mm³ 大小的碎块, 用 0.1% 的胰蛋白酶置 37℃ 水浴, 磁力搅拌器分次消化, 共消化 8 次, 每次 10 min, 将消化所得细胞悬液收集在 100 mL 培养瓶中, 置于 5% CO₂ 培养箱中, 37℃ 培养 4 h 后吸出细胞悬液, 细胞计数后以 1 × 10⁶/mL 接种于培养板, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养 2~3 d 后, 显微镜下可见细胞单层同步搏动, 频率约 70~90 次/min, 此心肌细胞用于以下实验。

2.2 实验分组及药物处理: OH· 由 Fenton 体系产生 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{OH} \cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$)。心肌细胞实验前先用 Hank's 液清洗 3 遍, 实验设心肌细胞正常对照组, 模型对照组, 西红花酸高、低剂量组 (终浓度分别为 1.0, 0.1 μmol/L), 葛根素组 (1.0 mg/mL)。各组加入相应的药物温孵 1.5 h 后, 除正常对照组外, 其余各组均加入 0.5 mmol/L FeSO₄ 与 0.5 mmol/L H₂O₂, 使 OH· 终浓度为 0.5 mmol/L。继续培养 16 h 后检测各项指标。

2.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定: 细胞经损伤处理后, 收集上清液, 参照试剂盒说明书测定培养上清液中 LDH 的活性。

2.4 线粒体琥珀酸脱氢酶 (MSD) 活性测定: 活细胞的 MSD 能使外源性的 MTT 还原为蓝紫色结晶物, 沉积在细胞中 (而死细胞无此功能), 用 DMSO 溶解, 用酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 可以反映线粒体的功能, 同时可以间接反映活细胞的数量。

2.5 线粒体膜电位 (MMP) 的测定: 心肌细胞在造模 16 h 后, 吸取上清液, 加入缓冲液 [成分 (mmol/L): NaCl 122, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, K₂HPO₄ 0.4, CaCl₂ 1.4, HEPES 10, glucose 10] 37℃ 预温孵 30 min, 然后换成含 20 μmol/L Rh123 的缓冲液温孵 120 min, 用冰冷的缓冲液冲洗 3 次终止孵育。用 1420 Victor² 多标记免疫分析仪, 在激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm 处测荧光强度, 以荧光强度表示 MMP 的变化。

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡: 心肌细胞经 0.06% 的胰蛋白酶消化后, 收集细胞, 用预冷的 70% 乙醇固定, -20℃ 过夜, 500 r/min 离心 3 min 去除乙醇, 细胞沉淀用 PBS 洗 1~2 次, 并用 0.5 mL 磷酸枸橼酸缓冲液 (PCB) 抽提小分子 DNA 30 min, 500 r/min 离心 3 min 去除 PCB, 细胞沉淀用 PI 染液染色 30 min, 过 300 目尼龙网去除细胞团, 激发波长 488 nm, 发射波长 630 nm, FACSCalibur 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡。

2.7 DNA 琼脂糖凝胶电泳: 心肌细胞经 0.06% 的胰蛋白酶消化后, 制成细胞悬液, 收集 6 × 10⁶ 细胞, 加入细胞裂解液 2 mL (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, pH8.0 及 0.1 mg/mL 蛋白酶 K), 50℃ 作用 12 h, 再用苯酚-氯仿抽提后, 无水乙醇沉淀 DNA, 用 Rnase A 去除 RNA。样品以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 2 h, 溴化乙啶染色, 紫外光下拍照。

2.8 统计方法: 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验统计差异。

3 结果

3.1 对心肌细胞培养上清液中 LDH 活性及心肌细胞 MSD 活性的影响: 结果见表 1。OH· 可使培养上清液中 LDH 活性增高, 提示细胞膜损伤, 细胞内 LDH 外漏; MSD 的活性降低, 提示心肌细胞能量代谢障碍, 同时间接反应心肌细胞数目减少, 而西红花酸对 OH· 所致的 LDH 外漏及 MSD 活性的降低具有明显的保护作用。

3.2 对 MMP 的影响: 结果见表 2。0.5 mmol/L OH· 使 MMP 降低, 表现为 Rh123 的荧光强度减

弱, 西红花酸可以提高 MMP。

表 1 西红花酸对 OH · 损伤心肌细胞

LDH 活性和 A_{570} 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of crocetin on LDH activity and A_{570} of cardiac myocyte injured by OH · ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	终浓度	LDH/(U · L ⁻¹)	A_{570}
正常对照	—	154.99 ± 20.30	0.987 ± 0.345
模型	—	245.50 ± 47.89 [#]	0.311 ± 0.064 [#]
葛根素	1.0 mg · mL ⁻¹	141.35 ± 36.53 [*]	0.487 ± 0.112 [*]
西红花酸	1.0 μmol · L ⁻¹	122.33 ± 63.43 [*]	0.529 ± 0.210 [*]
	0.1 μmol · L ⁻¹	162.84 ± 38.12 [*]	0.508 ± 0.394

与正常对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs normal control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 2 西红花酸对 OH · 损伤心肌细胞 MMP

的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of crocetin on MMP of cardiac myocyte injured by OH · ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	终浓度	荧光值 (× 100)
正常对照	—	1 359.2 ± 215.7
模型	—	1 150.1 ± 31.2 [#]
葛根素	1.0 mg · mL ⁻¹	1 277.9 ± 101.3 [*]
西红花酸	1.0 μmol · L ⁻¹	1 273.6 ± 110.7 [*]
	0.1 μmol · L ⁻¹	1 264.0 ± 69.6 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$;

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs normal group;

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

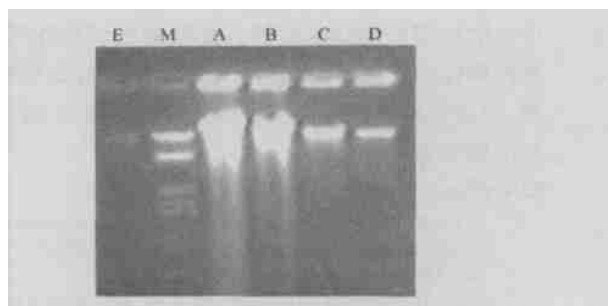
3.3 对心肌细胞凋亡的影响

3.3.1 流式细胞仪检测细胞凋亡: 检测结果表明 0.5 mmol/L OH · 作用于培养的原代心肌细胞 16 h 后, 出现明显的凋亡峰, 模型组凋亡率高达 21.59%, 而西红花酸高、低剂量组均具有明显降低凋亡率的作用, 凋亡率分别为 8.77%, 11.76%, 提示其对心肌细胞凋亡具有一定的保护作用。正常对照组与葛根素组的凋亡率分别为 0.90%, 12.52%。

3.3.2 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果: 见图 1。0.5 mmol/L OH · 使心肌细胞 DNA 有规律的断裂, 出现明显细胞凋亡的特征图谱即“DNA ladder”。

4 讨论

西红花酸为多不饱和共轭烯酸的类胡萝卜素类物质, 具有极强的抗氧化作用^[5]。OH · 是一种氧自由基, 直接作用于膜结构上的不饱和脂肪酸, 诱发脂质过氧化反应, 使膜的基本特性如变构、离子传递、酶活性等发生变化, 从而改变它们的功能^[8]。本实验结果表明 0.5 mmol/L OH · 损伤的心肌细胞的培养上清液中 LDH 活性明显提高, 而西红花酸两个



A-OH · (0.5 mmol/L) B-西红花酸 (0.1 μmol/L)
C-西红花酸 (1.0 μmol/L) D-对照品 E-葛根素 (1 mg/mL)
A-OH · (0.5 mmol/L) B-crocetin (0.1 μmol/L)
C-crocetin (1.0 μmol/L) D-control E-puerarin (1 mg/mL)

图 1 心肌细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of DNA extracted from cardiac myocytes

剂量组均可以明显降低上清液中的 LDH。MSD 是反映细胞存活的重要指标之一, 常采用 MTT 法, 测定 A_{570} 反应酶的活性。本实验结果表明, 0.5 mmol/L OH · 明显降低 A_{570} , 1.0 μmol/L 西红花酸可以明显提高 MTT 法检测心肌细胞 A_{570} 的值。本实验中 0.5 mmol/L OH · 所致细胞培养上清液中 LDH 增加及 A_{570} 降低与文献报道一致^[9]。西红花酸降低细胞培养上清液中 LDH, 增强线粒体琥珀酸脱氢酶活力, 提示其对 OH · 所致的膜损伤具有一定的保护作用。

Sureda 等发现 Rh123 主要聚集在线粒体, 通过测定细胞内 Rh123 的荧光强度可以反映线粒体膜电位变化^[10]。细胞受损后, 线粒体膜通透性增加, 膜电位降低, 线粒体对 Rh123 的荧光强度下降。本实验结果证实, OH · 可促使线粒体膜通透性增加, 降低 Rh123 的荧光强度, 而西红花酸可以提高 Rh123 的荧光强度, 提示西红花酸对 OH · 损伤的心肌细胞线粒体膜具有保护作用, 这与前期体外抗氧化研究结果相一致^[5]。

细胞凋亡是在基因调控下的细胞死亡。细胞膜鼓泡或出芽、核固缩、胞浆浓集及凋亡小体形成为其形态学特征, DNA 断裂在琼脂糖凝胶电泳图谱上呈“梯”状带 (DNA Ladder) 为其生化特征。本实验采用 DNA 琼脂糖凝胶电泳和流式细胞仪两种检测方法考察 OH · 对心肌细胞凋亡的影响, 结果提示 OH · 可导致心肌细胞凋亡, 西红花酸对 0.5 mmol/L OH · 所致的细胞凋亡具有一定的改善作用, 表现为减低心肌细胞的凋亡率。

本实验结果提示, 西红花酸对 0.5 mmol/L OH · 诱导的心肌细胞损伤 (凋亡) 具有保护作用, 其

可能的作用机制是通过西红花酸的抗氧化作用,而发挥膜保护作用,从而阻止 LDH 外漏,保护线粒体膜,提高线粒体膜电位和琥珀酸脱氢酶活力,保证心肌细胞的能量供应。

References:

- [1] Ferrai R, Agnoletti L, Comini L, *et al.* Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure [J]. *Eur Heart J*, 1998, 19(Suppl B): B2-B11.
- [2] Wang D Q, She W M, Tian Y P, *et al.* Cell damage in Chinese Hamster V79 cells treated with hydrogen peroxide [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1995, 22(3): 278-281.
- [3] Maclellan W R, Schneider M D. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease [J]. *Cir Res*, 1997, 81(2): 137-144.
- [4] Gao W Y, Zhu D Y. Advances in chemical and pharmacological studies on *Crocus* (*Crocus* L.) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 389-391.
- [5] Gong G Q, Liu T Z, Li L W, *et al.* Antioxidative activity of crocetin *in vitro* [J]. *China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(4): 306-309.
- [6] Wang B H, Polya G M. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 55-63.
- [7] Rao S Y, Qian Z Y. Cardioprotective effect of crocetin against low glucose and hypoxia injury in cultured rat cardiac myocytes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(4): 427-429.
- [8] Mak I T, Weglicki W B. Protection by β -blocking agents against free mediated sarcolemmal lipid peroxidation [J]. *Circ Res*, 1988, 63(1): 262-266.
- [9] Gao C X, Ding Z S, Kang W Y, *et al.* The study of damaging effect of hydroxyl radicals on cultured myocardial cells [J]. *J Zhejiang Tradit Chin Med Coll* (浙江中医学院学报), 2002, 26(3): 52-54.
- [10] Sureda F X, Escubedo E, Gabriel C, *et al.* Mitochondrial membrane potential measurement in rat cerebellar neurons by flow cytometry [J]. *Cytometry*, 1997, 28(1): 74-80.

肉苁蓉总苷对大鼠局灶性脑缺血损伤的影响

蒋晓燕, 王晓雯, 王雪飞, 刘凤霞, 孟新珍, 朱伟江*

(新疆医科大学 药理教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 研究肉苁蓉总苷 (GCs) 对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用。方法 采用插线法阻塞大鼠大脑中动脉 (MCAO) 制造大鼠局灶性脑缺血模型, 采用 NBT 染色测定脑梗死范围, 用“重量求面积法”计算梗死组织占对侧大脑质量的百分比作为对梗死范围的判定, 行为指标评分采用 11 分评分制, 并测定缺血脑组织的抗氧化酶活性及丙二醛 (MDA) 含量。结果 GCs 125, 250 mg/kg 可明显缩小脑梗死范围, 改善神经症状, 脑组织超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性明显升高, MDA 含量显著下降。结论 GCs 对大鼠局灶性脑缺血损伤具有神经保护作用, 此作用可能与 SOD、GSH-Px 活性水平的升高有关。

关键词: 肉苁蓉总苷; 局灶性脑缺血; 抗氧化酶; 丙二醛

中图分类号: R 286.10

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)06-0660-03

Effects of glycosides of cistanche on focal cerebral ischemic rats

JIANG Xiao-yan, WANG Xiao-wen, WANG Xue-fei, LIU Feng-xia,

MENG Xin-zhen, ZHU Wei-jiang

(Department of Pharmacology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: **Object** To study the protective effects of glycosides of cistanche (GCs) on focal cerebral ischemic rats. **Methods** Focal cerebral ischemia in rats was induced by 24 h occlusion of the middle cerebral artery (MCAO). The infarct area was measured by nitrobenzene thiocyanate (NBT) staining technique. The content of neurological deficits was evaluated by 0—11 scales. The activities of antioxidant enzymes and contents of MDA in ischemic brain tissue were analyzed. **Results** Significant decrease in infarct area and improvement in neurological deficits were observed by oral administration of GCs 125, 250 mg/kg, respectively. Significant increase in activities of SOD and GSH-Px, and significant decrease in contents of MDA in rats were also observed after 24 h MCAO. **Conclusion** GCs has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemia and the effect may be related to the increase in activities of SOD and GSH-Px.

Key words: glycosides of cistanche (GCs); focal cerebral ischemia; antioxidant enzyme; MDA

收稿日期: 2003-10-13

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (200121112)

作者简介: 蒋晓燕 (1972—), 女, 湖北省武汉市人。讲师, 硕士, 现于上海第二医科大学神经生物学实验室攻读博士学位, 研究方向为生化药理。Tel: (021) 63846590-776577 E-mail: wxfjxy22103@hotmail.com