

金丝桃苷对原代培养的大鼠心肌细胞缺氧-再给氧损伤的影响

李庆林^{1*}, 陈志武², 马传庚²

(1. 安徽中医学院药学院 安徽省现代中药重点实验室, 安徽 合肥 230038;

2. 安徽医科大学 药理学研究室, 安徽 合肥 230032)

摘 要:目的 探讨金丝桃苷对原代培养的大鼠心肌细胞缺氧-再给氧损伤的保护作用。方法 采用显微镜和 MTT 法观察缺氧-再给氧导致培养的大鼠原代心肌细胞的损伤和金丝桃苷的保护作用;流式细胞术观察金丝桃苷对心肌细胞凋亡的影响;并观察乳酸脱氢酶 (LDH) 水平的变化和细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。结果 金丝桃苷对缺氧-再给氧导致的心肌细胞损伤有一定的保护作用,可以抑制心肌细胞凋亡的发生;0.5~50 $\mu\text{mol/L}$ 金丝桃苷可以剂量依赖性地抑制心肌细胞中 LDH 的形成和细胞内 Ca^{2+} 超载。结论 金丝桃苷具有对抗缺氧-再给氧导致心肌细胞损伤的作用,其机制可能与抑制心肌细胞凋亡、钙超载和抗自由基形成有关。

关键词: 金丝桃苷; 心肌细胞; 细胞凋亡; 缺氧-再给氧

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)04-0575-03

Effects of hyperin on myocardial cell injured by hypoxia-reoxygenation in primary cultured rat

LI Qing-lin¹, CHEN Zhi-wu², MA Chuan-geng²

(1. Anhui Key Laboratory of Modern Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Key words: hyperin; myocardial cell; apoptosis; hypoxia-reoxygenation

在缺氧和再灌注过程中,由于心肌的局部缺血、缺氧和血液再灌注,大量的自由基产生和细胞内钙超载,造成心肌细胞的损伤;这些损伤包括心肌细胞的坏死和凋亡。通过干预抑制心肌细胞损伤的发生可以有效地保护心肌对抗缺血再灌注导致的损伤^[1]。金丝桃苷为黄酮醇苷类化合物,含有多个酚羟基结构。研究报道金丝桃苷有多种药理活性,可以抗心肌脂质过氧化、抑制钙超载^[2,3]。本实验进一步研究金丝桃苷对心肌细胞凋亡的保护作用和机制。

1 材料

1.1 药品:金丝桃苷 (hyperin) 由安徽省医学科学研究所制备,质量分数 $\geq 96.0\%$,临用前以 DMSO 溶解, PBS 稀释至所需浓度。

1.2 主要试剂:硝苯地平 (Nifedipine) 购自中国药品生物制品检定所;Fura-2/AM、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司;Hank's 培养基、胰蛋白酶、DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;碘化丙啶 (PI)、DNA 凋亡试剂盒 (Annexin/PI) 购自 Beckman Coulter 公司;乳酸脱氢酶 (LDH) 测试盒购自南京建成生物工程研究所;连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 购自宜兴市化学制剂三厂;其他试剂均

为市售分析纯。

1.3 动物:SD 乳鼠,2~3 d,由安徽医科大学实验动物中心提供 (皖实动准 01 号)。

1.4 仪器:MCO-15A CO_2 培养箱为三洋公司产品;DG3022A 酶标仪为南京分析仪器厂产品;日本 Olympus 荧光倒置显微镜;Coulter 公司 FACS-420 型流式细胞仪;650-60 荧光分光光度计为日本 Hitachi 公司产品。

2 方法

2.1 乳鼠心肌细胞的培养:无菌条件下取 2~3 d SD 乳鼠心室,用 pH 7.2~7.4 的 Hank's 液洗涤 3 次,剪碎,0.125% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 10 min,弃消化液,再用 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min, Hank's 液洗涤 3 次,滴管吹打至细胞分散。用 DMEM 生长液 (含 20% 胎牛血清) 调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$,加入细胞培养瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱中培养 4 h 后,弃贴壁细胞,台盼蓝染色观察细胞成活率,达 95% 以上后再将细胞悬液加至 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 温箱中培养 7 d。

2.2 金丝桃苷对心肌细胞缺氧-再给氧损伤的影响:培养 7 d 的心肌细胞改用 5 mmol/L 连二亚硫

酸钠配制的无糖 Hank's 液培养 24 h 后,再换成 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO₂ 温箱中继续培养 24 h,造成心肌细胞的缺氧-再给氧损伤模型^[4]。给药组用不同的培养液稀释药物,金丝桃苷的终浓度分别为 0.5、5.0、50.0 μmol/L,硝苯地平的终浓度为 5.0 μmol/L;正常对照组加入等量的培养基,不采用缺氧-再给氧损伤模型;其他各组造模后再分别于 37℃ 孵育 6、9 h,用显微镜观察培养的心肌细胞的形态变化,然后每孔取上清液 10 μL 测定 LDH 的活性;剩余的液体按照 MTT 法测定细胞活力,在酶标仪上,选择 490 nm 波长测定吸光度(A)值。

分别收集同样培养处理各组细胞,用 PBS 洗涤 2 次后,制成 1×10⁶/mL 的心肌细胞悬液,70% 乙醇固定,然后加入 DNA 反应试剂和 PI 染色液,4℃ 避光保存 30 min,用流式细胞仪在激发波长为 488 nm 处测定,根据计数 10 000 个细胞的各期 DNA 的量,计算细胞凋亡率。

2.3 金丝桃苷对心肌细胞内 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i) 的影响:培养的心肌细胞按文献报道方法^[5]测定心肌细胞静息状态下 [Ca²⁺]_i 的变化:培养 1 周已贴壁的心肌细胞,去除培养基,加入终浓度为 5 μmol/L 的 Fura-2/AM,37℃ 恒温振荡孵育 45 min,离心,用 Hank's 液冲洗两次,置于 Hank's 液中备用。取金丝桃苷 (0.5、5.0、50.0 μmol/L) 与心肌细胞悬液,在 37℃、50% CO₂ 培养箱中培养 20 min。KCl (50 mmol/L)、CaCl₂ (2 mmol/L)、NE (10 μmol/L) 测定前加入,然后立即采用激发波长为 340 nm (λ_{ex}),发射波长 500 nm (λ_{em}) 测定不同条件下的细胞悬液的荧光强度 (F),然后根据仪器所测定的最大荧光值 (F_{max}) 和最小荧光值 (F_{min}),由以下公式计算 [Ca²⁺]_i,并对细胞的自发荧光的影响进行校正。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

K_d 为 Fura-2 与 Ca²⁺ 反应的解离常数,为 224 nmol/L

2.4 数据处理:实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 软件进行 t 检验分析。

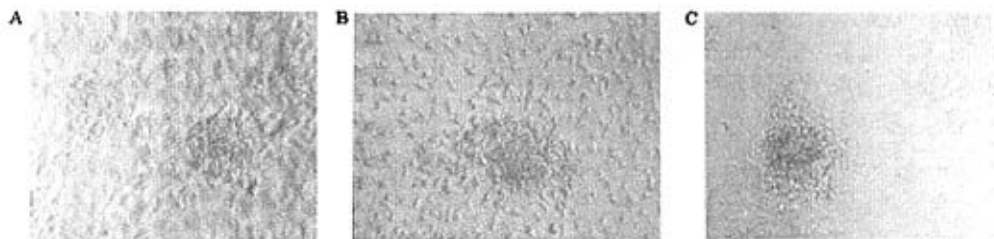
3 结果

3.1 心肌细胞形态学改变:在倒置显微镜下观察发现,心肌细胞培养至第 7 天,胞体呈圆形、梭形、三角形、多边形等,在细胞团周围呈放射状伸展,形成致密的单层。在缺氧-再给氧损伤后,心肌细胞先变得肿胀,随后呈拉网状,细胞搏动逐渐减弱、减慢至停止,最终细胞圆缩,脱落。而受药物保护的细胞,形态无明显改变,或细胞损伤程度减轻,仅见部分细胞肿胀或轻度拉网。结果见图 1。

3.2 金丝桃苷对缺氧-再给氧损伤心肌细胞的影响:缺氧-再给氧可以引起心肌细胞的损伤和 LDH 的释放,金丝桃苷可以剂量依赖性抑制 LDH 的释放 (P<0.05、0.01),保护缺氧-再给氧导致的心肌细胞损伤,降低心肌细胞的凋亡率。结果见表 1。

3.3 金丝桃苷对心肌细胞 [Ca²⁺]_i 的影响:心肌细胞在正常的培养条件下,测得细胞外 Ca²⁺ 的浓度为 1.3 mmol/L 时, [Ca²⁺]_i 为 (78.6±9.4) nmol/L;金丝桃苷 (0.5、5.0、50.0 μmol/L) 对心肌细胞静息状态下 [Ca²⁺]_i 无明显影响,其值分别为 (76.2±8.0)、(78.4±11.1)、(80.8±10.5) nmol/L;心肌细胞培养液中加入 2 mmol/L CaCl₂ 后,细胞 [Ca²⁺]_i 升高,而加入药物后,心肌细胞 [Ca²⁺]_i 也随之上升,但组间比较无明显差异。结果见表 2。

当心肌细胞培养液中加入 50 mmol/L KCl、10 μmol/L NE 后,心肌细胞 [Ca²⁺]_i 分别升高到 (401.8±35.6)、(189.4±20.3) nmol/L;金丝桃苷可以明显抑制不同刺激引起的 [Ca²⁺]_i 升高,结果见表 2。



A-正常组 B-缺氧-再给氧组 C-金丝桃苷 (5.0 μmol/L) 组

A-normal group B-hypoxia-reoxygenation group C-hypericin (5.0 μmol/L) group

图 1 金丝桃苷对原代培养的大鼠心肌细胞缺氧-再给氧损伤的保护作用

Fig. 1 Protection of hypericin on myocardial cell injured by hypoxia-reoxygenation in primary cultured rat

表 1 金丝桃苷对原代培养的缺氧-再给氧损伤心肌细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of hyperin on myocardial cell injured by hypoxia-reoxygenation in primary cultured rat ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂 量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A ($n=8$)	LDH/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, $n=8$)		调亡率/% ($n=3$)
			6 h	9 h	
正常对照	—	$0.39 \pm 0.08^{**}$	$375 \pm 61^{**}$	$428 \pm 72^{**}$	$5.4 \pm 2.7^{**}$
缺氧-再给氧	—	0.08 ± 0.02	$1\ 000 \pm 163$	$1\ 267 \pm 242$	25.9 ± 1.1
金丝桃苷	0.5	$0.12 \pm 0.04^{*}$	$821 \pm 120^{*}$	$1\ 089 \pm 154$	21.5 ± 1.3
	5.0	$0.20 \pm 0.05^{**}$	$623 \pm 107^{**}$	$784 \pm 136^{**}$	$15.6 \pm 3.7^{*}$
	50.0	$0.31 \pm 0.07^{**}$	$542 \pm 125^{**}$	$740 \pm 113^{**}$	$11.3 \pm 2.9^{**}$
硝苯地平	5.0	$0.29 \pm 0.06^{**}$	$687 \pm 142^{**}$	$852 \pm 181^{**}$	$12.4 \pm 2.7^{**}$

与缺氧-再给氧组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$

$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs hypoxia-reoxygenation group

表 2 金丝桃苷对原代培养大鼠心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of hyperin on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of myocardial cell in primary cultured rat ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	剂 量/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	正常培养	不同状态下 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ /($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
			加入 CaCl_2 $2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	加入 KCl $50\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	加入 NE $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照	—	78.6 ± 9.4	125.2 ± 16.9	401.8 ± 35.6	189.1 ± 20.3
金丝桃苷	0.5	76.2 ± 8.0	115.2 ± 11.8	341.9 ± 42.8 (11.9%)	$133.7 \pm 21.5^{**}$ (29.1%)
	5.0	78.4 ± 11.1	123.4 ± 10.6	$261.5 \pm 34.2^{**}$ (34.0%)	$115.2 \pm 19.3^{**}$ (39.2%)
	50.0	80.0 ± 10.5	132.7 ± 9.5	$211.2 \pm 12.7^{**}$ (47.4%)	$108.1 \pm 24.0^{**}$ (12.9%)

与正常对照组比较: $^{**}P<0.01$, 括号中数值是抑制率

$^{**}P<0.01$ vs normal control group, value in parentheses is inhibitory rate

4 讨论

缺血-再灌注可以导致心肌细胞的损伤,研究表明自由基和细胞内钙超载引起细胞损伤乃至细胞凋亡的发生。心肌细胞的凋亡是缺血性心肌细胞损伤病变的重要形式之一,在心肌细胞凋亡的发生过程中,缺血是细胞凋亡的诱导者,再灌注具有加速心肌细胞凋亡的作用。而其中氧自由基的形成是再灌注期间组织损伤的病理机制之一^[6]。

金丝桃苷是黄酮类成分,研究已表明其有清除自由基的作用^[7];金丝桃苷的抗自由基作用是直接作用的结果,还是通过抑制 Ca^{2+} 内流,以钙拮抗剂样作用发挥了保护心肌的作用效果;或者是两种方式兼而有之未见文献报道。本研究表明在静息状态下,金丝桃苷对心肌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无明显影响,提示了金丝桃苷对心肌细胞 Ca^{2+} 的被动扩散无影响。当细胞外液中加入了 $50\ \text{mmol/L}$ KCl 时,高钾引起心肌细胞膜电位的升高(去极化),进而心肌细胞膜上的电压依赖性钙通道被激活,细胞外的 Ca^{2+} 内流,引起细胞内的 Ca^{2+} 超载。加入 NE 可以兴奋心肌细胞上的 α_1 受体,通过激活 G 蛋白与磷脂酶 C (PLC), IP_3 生成增加,使细胞内 Ca^{2+} 释放;同时也可以直接通过引起钙通道的改变使细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞内^[8]。结果显示金丝桃苷可以浓度依赖性的抑制高钾去极化引起的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高作用,对 NE 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高也呈现出一定的抑制作

用。因此认为金丝桃苷对心肌的电压依赖性和受体操纵性钙通道均有不同程度的抑制作用,从而减少心肌细胞的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,表现出抗心肌缺血-再灌注损伤作用。本实验结果表明金丝桃苷可能通过抗自由基的生成和抑制钙离子通道发挥保护缺血心肌的作用。其机制可能首先是其抗自由基形成,再进一步通过钙拮抗作用发挥保护心肌的作用效果。而其更深入的作用机制有待于进一步研究。

References:

- [1] Shen J G, Quo X S, Jiang B, *et al.* Chinonin, a novel drug against cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1500(2): 217-226.
- [2] Wang W Q, Ma C G, Xu S Y. Protective effect of hyperin against myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1996, 17(4): 341-344.
- [3] Chen Z W, Ma C G, Fang M, *et al.* The blocking effect of hyperin on the inward flow of calcium ion [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1999, 20(1): 27-30.
- [4] Salvaterra C G, Goldman W F. Direct effect of hypoxia on apparent intracellular calcium levels in cultured pulmonary vascular smooth muscles cells [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 143: 373-380.
- [5] Li X T, Wang Y L. Effects of tetrandrine on cytosolic free calcium in cultured rat myocardial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1996, 17(1): 55-58.
- [6] Gao F, Gong B, Christopher T A, *et al.* Anti-apoptotic effect of Benidipine, a long-lasting vasodilating calcium antagonist, in ischemic-reperfused myocardial cells [J]. *Brit J Pharmacol*, 2001, 132: 869-878.
- [7] Li Q L, Chou G X, Chen Z W, *et al.* Inhibitory mechanism of hyperin on the apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion of rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2002, 37: 849-852.
- [8] Toescu E C. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca^{2+} increases [J]. *Cell Calcium*, 2004, 36: 187-199.