

# 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

马燕花<sup>1,2</sup>, 李应东<sup>2</sup>, 赵健雄<sup>1\*</sup>, 王 婷<sup>1\*</sup>

(1 兰州大学中西医结合研究所, 甘肃 兰州 730020; 2 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730020)

**摘要:**目的 探讨当归红芪超滤物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致乳鼠心肌细胞氧化损伤的保护作用及其可能机制。方法 用高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 μmol/L) 在 Wistar 乳鼠原代培养的心肌细胞上建立氧化损伤模型, 用不同质量浓度的当归红芪超滤物 (3.75、7.5、15 mg/mL) 进行干预。在倒置显微镜下观察各实验组心肌细胞的搏动频率, 用 MTT 法检测心肌细胞的存活率, 用试剂盒检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 的活性及细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性、丙二醛 (MDA)、髓过氧化物酶 (MPO) 的量。RT-PCR 技术检测 caspase 3、hsp70 基因在心肌细胞中的表达情况。结果 当归红芪超滤物显著提高氧化损伤心肌细胞的细胞活力; 与损伤组比较, 当归红芪超滤物各干预组心肌细胞 LDH、CK、MPO、MDA 量显著降低 ( $P < 0.01$ ), SOD 活性显著提高 ( $P < 0.01$ ), caspase 3 基因表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), hsp70 基因表达显著提高 ( $P < 0.05$ ), 差异具有统计学意义; 并且当归红芪超滤物的抗氧化损伤作用呈剂量依赖性。结论 当归红芪超滤物具有良好的抗氧化损伤作用, 其机制可能与清除自由基、上调 hsp70 表达、抑制 caspase 3 活性有关。

**关键词:** 当归红芪超滤物; 氧化损伤; 心肌细胞; 热休克蛋白 70

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)04-0602-06

## Protection of ultra-filtration extract mixture from *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys* on oxidative damage in cardiomyocytes of neonatal rats and its mechanism

MA Yan-hua<sup>1,2</sup>, LI Ying-dong<sup>2</sup>, ZHAO Jian-xiong<sup>1</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>

(1 Institute of Combination of Chinese Traditional with Western Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China;

2. Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China)

**Abstract: Objective** To investigate whether the administration of the ultra-filtration extract mixture from *Angelica sinensis* and *Hedysarum polybotrys* is able to protect cardiomyocytes from oxidative injury of rats induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and its potential mechanism. **Methods** Myocardial cells from 2—3 d neonatal rats were cultured in DF medium and the cellular injury was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The ultra-filtration extract mixture from *A. sinensis* and *H. polybotrys* was given in three doses of 3.75, 7.5, and 15 mg/mL. Morphological changes of cardiomyocytes were observed by microscope. Survival rate of myocardial cells was assessed using MTT. The cardiomyocyte damages were estimated by detecting lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) releases in the medium, superoxide dismutase (SOD) activities and intracellular malondialdehyde (MDA), and myeloperoxidase (MPO) contents. The levels of caspase 3 and hsp70 expression in cardiomyocytes were measured by RT-PCR. **Results** The ultra-filtration extract mixture could protect the cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury in a dose-dependent manner (3.75, 7.5, and 15 mg/mL). The ultra-filtration extract mixture could significantly decrease LDH and CK leakages and intracellular MDA and MPO contents, increase SOD activity, upregulate hsp70 expression, and downregulate caspase 3 expression. **Conclusion** The ultra-filtration extract mixture has protection on cardiomyocytes injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through improving cell antioxidant ability, upregulating hsp70 expression, and inhibiting caspase 3 activity.

**Key words:** ultra-filtration extract mixture from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. and *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.; oxidative injury; cardiomyocyte; heat shock protein 70

当归、红芪是中医补血、益气的常用药物。当归 为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.)

①收稿日期: 2009-07-16

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BA106A2004); 国家科技支撑计划资助项目 (2007BA137B01)

作者简介: 马燕花 (1976—), 女, 甘肃人, 博士研究生, 讲师, 主治医师, 主要研究方向为中西医结合内科临床。

Tel: 13893411954 E-mail: 617747928@qq.com

\* 通讯作者 赵健雄

Diels 的干燥根, 性甘、辛、温, 归肝、心、脾经, 其主要成分为多糖、阿魏酸、挥发油等。红芪系多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 的干燥根, 与黄芪同科异属, 以其根皮带红棕色而得名。红芪中含有众多的生物活性物质, 如氨基酸、有机酸、 $\beta$ -谷甾醇、红芪多糖、微量元素等, 且含有黄芪中不存在的抗菌成分 1-3-羟基-9-甲氧基紫檀烷。近年来研究发现, 当归、红芪有效成分均具有清除自由基<sup>[1,2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3-5]</sup>、抗辐射损伤<sup>[6]</sup>等作用。两药按 1: 5 配伍组成的当归补血汤, 为中医补血生脉的基本方, 当归红芪超滤膜提取物合剂来自于经典名方当归补血汤。膜分离技术是一项新兴的高效分离技术, 已被国际公认为 20 世纪末到 21 世纪中期最有发展前途的一项重大高新生产技术<sup>[7,8]</sup>。超滤技术是 20 世纪 60~70 年代发展起来的一种膜分离技术, 它是用多孔性半透膜为介质, 以错流方式进行滤过。由于中药中的化学成分很多, 类型非常复杂, 而传统中医的水煎剂提取方法所含杂质、非药用性成分或药用性较差的成分较多, 使中药药效低下, 超滤技术可对中药进行提纯、分离<sup>[9]</sup>, 显著提高了其药效。本实验运用超滤膜技术提取当归、红芪合剂 (1: 5) 中有效成分, 以过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 造成心肌细胞氧化损伤模型, 探讨其对心肌细胞氧化损伤的保护作用及其机制。

## 1 材料

1.1 动物: 1~2 日龄 Wistar 乳鼠由甘肃中医学院科研实验动物中心提供, SPF 级, 动物合格证编号为: SCXK (甘) 2004-0006-00000012。

1.2 主要仪器与试剂: BB16UV 型二氧化碳培养箱, 德国 Heraeus 公司; VS-1300L 型超净工作台, 苏净集团; IX71 型倒置相差光学显微镜, 日本 Olympus 公司产品; 电子天平, 德国 Sartorius 生产; 恒温孵育箱, 金坛市恒丰仪器厂; Sony717 相机, 日本; 101 型电热恒温烘箱, 北京科伟鑫实验仪器设备厂; 美国亚培全自动生化分析仪; 680 系列酶标仪, 美国伯乐 (Bio-Rad) 公司产品。PE2400 型 PCR 扩增仪, 美国 PE 公司产品; AlphaImager2200 型凝胶成像分析系统, 美国 Alpha 公司产品; DYCP31D 型电泳槽、DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪, 北京市六一仪器厂。DF 培养液: DMEM (Dulbecco's Modified Eagles' Medium) 培养基与 HamF12 培养基按 1: 1 比例混合, 为美国 Sigma 公司产品。新生牛血清 (NBCS), 杭州四季青生物材料工程研究所。胰蛋白酶消化液, 上海生物工程

有限公司。II 型胶原酶, 美国 Sigma 公司产品; 5-Br, 美国 Sigma 公司产品; 30%  $H_2O_2$ , 天津市百世化工有限公司产品。超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、髓过氧化物酶 (MPO) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所产品; MTT 试剂盒, 碧云天生物技术研究所; RT-PCR 试剂盒, Fermentas 公司; Trizol, Invitrogen; 引物由大连宝生物合成。其他试剂均为国产分析纯。当归红芪超滤膜提取物 (相对分子质量  $1 \times 10^5$  滤过物) 由甘肃中医学院科研实验中心与甘肃省膜科学研究院联合制备。

## 2 方法

2.1 当归、红芪及当归红芪合剂超滤膜提取物的制备: 依照文献提供的方法进行制备<sup>[10]</sup>, 以药材煎煮→粗滤→浓缩→微滤→超滤→浓缩→包装、贮存、备用的流程制成每毫升药液含 1 g 生药的超滤膜提取药液 (相对分子质量  $1 \times 10^5$ )。运用紫外分光光度计和高效液相色谱法对多糖及阿魏酸进行测定, 相对分子质量  $1 \times 10^5$  超滤物中不含阿魏酸, 多糖的量为 19.57 mg/mL<sup>[11]</sup>, 略高于单剂当归中的量。

2.2 乳鼠心肌细胞原代培养: 参照 Simpson 等<sup>[12]</sup>的方法, 略有改进。无菌操作下取出生 1~3 d 的 Wistar 乳鼠心脏心尖部, 立即在 PBS 液中洗去残血, 用眼科剪将心肌剪成约 1 mm<sup>3</sup> 碎块, 放入 50 mL 三角烧瓶中, 加入 0.08% 胰蛋白酶消化液 5 mL, 在 37 °C 恒温孵育箱中进行消化, 10 min 后取下吸弃上清, 再加入 5 mL 胰蛋白酶消化液, 同样消化 10 min 后取下吸弃上清, 第 3 次加入等量胶原酶消化液消化 8 min 后, 收集上清于离心管, 并向离心管中加入少量 DMEM-HamF12 (1: 1) 培养基和小牛血清终止消化。上述过程反复进行 8~10 次至组织块完全消化, 200 目钢网滤过后离心收集细胞, 重悬于含 15% 小牛血清的 DF 培养基, 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 1.5 h, 以差速贴壁法纯化心肌细胞, 将细胞密度调至  $5 \times 10^5$  / mL, 接种于 24 孔培养板中。每 48 h 换液 1 次, 培养 48 h 后可见细胞融合并出现整体搏动, 于培养 72 h 后进行实验。

2.3 氧化损伤模型的建立和实验分组: 心肌细胞按  $5 \times 10^5$  / mL 的密度分别接种于 96 孔板和 24 孔板。实验开始时, 所有细胞均更换新鲜无血清培养液。按随机原则分为 3 组: 对照组, 不加任何处理因素;  $H_2O_2$  组 (模型组)<sup>[13]</sup>: 加入终浓度 400  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$  作用 6 h; 当归红芪超滤物不同质量浓度预处理组 (超滤物组): 根据 MTT 法确定超滤物的有效

质量浓度范围为 1~22 mg/mL, 取低、中、高 (3.75、7.5、15 mg/mL, 相当于生药质量浓度) 3 个质量浓度分别加入培养基中孵育 24 h, 后加入终浓度为 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 6 h。实验结束后, 镜下观察细胞形态, 收集心肌细胞及培养上清液用于指标测定。各组设 8 孔, 重复 3 次。

2.4 倒置相差光学显微镜下观察细胞形态: 按 2.2 项乳鼠心肌细胞原代培养的方法在 24 孔板中培养心肌细胞 3 d 后, 弃去原培养液, 换成无血清的 DMEM 培养液, 按 2.3 项方法分组给药, 倒置显微镜下观察心肌细胞的形态及细胞生长状况。

2.5 细胞存活率的检测: 细胞存活率应用 MTT 法检测。心肌细胞用 DF 培养液制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5 × 10<sup>5</sup>/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 培养 3 d。换无血清 DF 培养液 24 h, 按各实验分组处理细胞, 然后每孔加入 10 μL MTT 溶液, 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 4 h, 小心弃去上清液, 加入 100 μL formazan 溶解液, 继续于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h, 直至紫色结晶完全溶解, 选择 570 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔吸光度 (A<sub>570nm</sub>) 值, 与实验孔平行设不加细胞只加培养液的空白对照孔, 比色时作为空白调零孔。

2.6 SOD、LDH、CK、MPO 活性及 MDA 的测定: 96 孔板和 24 孔板分别按实验分组处理后, 96 孔板取其上清液测定 LDH、CK 活性。将培养于 24 孔板的心肌细胞用超声破碎仪碎裂后取培养液测定 SOD、MPO 活性和 MDA 水平, 实验操作按试剂盒说明进行。

2.7 RT-PCR 检测 hsp70、caspase 3 mRNA 表达: 各实验组处理结束后弃上清液, 按 Trizol 试剂盒抽

提纯化操作方法提取心肌细胞总 RNA。提取的 RNA 通过紫外分光光度计测定 260、280 nm 吸光度值, 计算 RNA 纯度和浓度。按反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA 第一链, 再进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 50 μL: DEPC 水 24 μL, 10 × Taq buffer 50 μL, 2 mmol/L dNTP mix 5 μL, Primer I 1 μL, Primer II 1 μL, Taq DNA polymerase 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3.5 μL, Template DNA 10 μL。β-actin 作为内参照。根据文献设计引物 (表 1)。反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 之后进行如下循环: 94 °C 变性 45 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 28 个循环, 最后 72 °C 终延伸 7 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 利用凝胶成像仪拍照, 测定电泳条带吸光度值, 计算 hsp70、caspase 3 与 β-actin 吸光度比值, 作为相对定量。

2.8 统计学分析: 采用统计软件 SPSS 11.0 进行统计学分析, 定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间差异比较用单因素方差分析, 两组间比较用 *t* 检验。

3 结果

3.1 心肌细胞形态学改变: 正常心肌细胞伸出伪足互相融合成片, 细胞核折光性好, 搏动具有整体性、协调性和规律性。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞皱缩, 细胞核暗淡, 搏动明显减弱, 部分停搏, 搏动幅度强弱不一。各当归红芪超滤物干预组心肌细胞伪足变细, 搏动频率不同程度地减弱。见图 1 和表 2。

3.2 心肌细胞存活率: 模型组心肌细胞严重受损, 细胞存活率显著降低, 与对照组比较具有统计学意义 (*P* < 0.01)。当归红芪超滤物干预组心肌细胞的受损显著改善, 存活率显著提高, 与模型组比较差异显著 (*P* < 0.01)。见表 2。

表 1 hsp70、caspase 3、β-actin 基因的 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR Primer of hsp70, caspase 3, and β-actin

基因	上游序列 (5'→3')	下游序列 (5'→3')	退火温度/°C	片段长度/bp
hsp70	5'-CGCGACCTGAACAAGAGCAT-3'	5'-TCGAAGGTCACCTCGATCTG-3'	52	363
caspase 3	5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3'	5'-CATGGGATCTGTTCCTTGC-3'	50	288
β-actin	5'-TGAACCTAAGGCCAACCGTGA-3'	5'-TCTGCTGGAAGGTGGACAGTGAG-3'	56	735

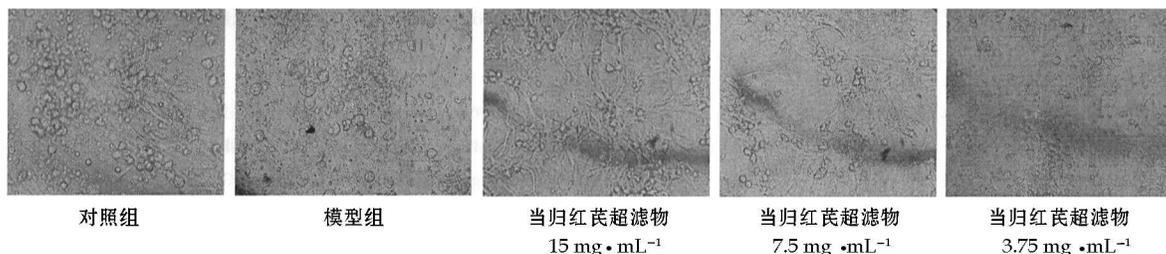


图 1 当归红芪超滤物对氧化损伤乳鼠心肌细胞形态学的影响

Fig 1 Effects of ultra filtration extract mixture from *A. sinensis* and *H. polybotrys* on morphology of cardiomyocytes of neonatal rats

3.3 培养介质中 SOD、LDH、CK、MPO 活性及 MDA 水平: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理使细胞膜的通透性增加, 培养表 2 当归红芪超滤物对氧化损伤乳鼠心肌细胞搏动频率和存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effects of ultra-filtration extract mixture from *A. sinensis* and *H. polybotrys* on beating frequency and survival rate of cardiomyocytes of neonatal rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	搏动频率/ (次·min <sup>-1</sup> )	A <sub>570 nm</sub>	存活率/ %
对照	-	98.2 ± 13.4	0.603 ± 0.018	89.7
模型	400 μmol·L <sup>-1</sup>	20.1 ± 3.3 <sup>**</sup>	0.245 ± 0.021 <sup>**</sup>	29.5
当归红芪超滤物	3.75 mg·mL <sup>-1</sup>	43.7 ± 9.6 <sup>△△</sup>	0.427 ± 0.015 <sup>△△</sup>	43.9
	7.50 mg·mL <sup>-1</sup>	71.1 ± 6.7 <sup>△△</sup>	0.528 ± 0.013 <sup>△△</sup>	64.4
	15.00 mg·mL <sup>-1</sup>	86.9 ± 8.4 <sup>△△</sup>	0.554 ± 0.011 <sup>△△</sup>	77.6

与对照组比较: <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>△△</sup>  $P < 0.01$

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs control group; <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs model group

表 3 当归红芪超滤物对氧化损伤乳鼠心肌细胞 LDH、CK、MPO、MDA、SOD 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effects of ultra-filtration extract mixture from *A. sinensis* and *H. polybotrys* on LDH, CK, MPO, MDA, and SOD in oxidative damage cardiomyocytes of neonatal rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	MPO/(U·L <sup>-1</sup> )	LDH/(U·L <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·L <sup>-1</sup> )	CK/(U·L <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )
对照	-	38.47 ± 1.12	138.07 ± 11.27	2.34 ± 0.50	42.69 ± 1.53	118.33 ± 5.77
模型	400 μmol·L <sup>-1</sup>	114.00 ± 3.24 <sup>**</sup>	274.36 ± 15.16 <sup>**</sup>	3.82 ± 0.64 <sup>**</sup>	201.47 ± 2.71 <sup>**</sup>	58.23 ± 2.45 <sup>**</sup>
当归红芪超滤物	3.75 mg·mL <sup>-1</sup>	85.22 ± 4.18 <sup>△△</sup>	201.06 ± 18.13 <sup>△△</sup>	3.11 ± 0.35 <sup>△△</sup>	132.54 ± 1.92 <sup>△△</sup>	71.45 ± 7.11 <sup>△△</sup>
	7.50 mg·mL <sup>-1</sup>	71.52 ± 1.03 <sup>△△</sup>	183.48 ± 9.88 <sup>△△</sup>	2.80 ± 0.32 <sup>△△</sup>	99.6 ± 6.18 <sup>△△</sup>	83.36 ± 6.63 <sup>△△</sup>
	15.00 mg·mL <sup>-1</sup>	59.76 ± 1.84 <sup>△△</sup>	167.22 ± 10.11 <sup>△△</sup>	2.51 ± 0.28 <sup>△△</sup>	88.14 ± 1.06 <sup>△△</sup>	101.34 ± 2.14 <sup>△△</sup>

与对照组比较: <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>△△</sup>  $P < 0.01$

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs control group; <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs model group

表 4 当归红芪超滤物对氧化损伤乳鼠心肌细胞 hsp70、caspase 3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effects of ultra-filtration extract mixture from *A. sinensis* and *H. polybotrys* on expression hsp70 and caspase 3 mRNA in oxidative damage of cardiomyocytes of neonatal rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量	hsp70/β-actin	caspase-3/β-actin
对照	-	0.73 ± 0.08	0.59 ± 0.06
模型	400 μmol·L <sup>-1</sup>	0.78 ± 0.12 <sup>*</sup>	0.88 ± 0.05 <sup>**</sup>
当归红芪超滤物	3.75 mg·mL <sup>-1</sup>	1.03 ± 0.11 <sup>△△</sup>	0.81 ± 0.01 <sup>△</sup>
	7.5 mg·mL <sup>-1</sup>	1.39 ± 0.04 <sup>△△</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>△△</sup>
	15.00 mg·mL <sup>-1</sup>	1.43 ± 0.02 <sup>△△</sup>	0.67 ± 0.07

与对照组比较: <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

与模型组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$  <sup>△△</sup>  $P < 0.01$

<sup>\*</sup>  $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$  vs control group

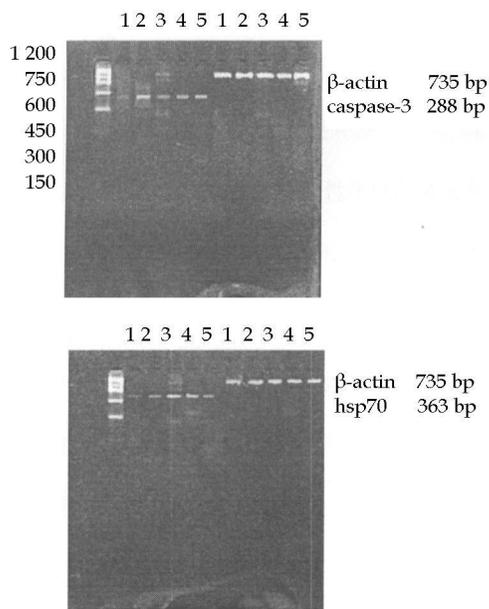
<sup>△</sup>  $P < 0.05$  <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs model group

#### 4 讨论

目前抗氧化的研究已成为近年研究心血管疾病防治的热点之一。我国中药资源丰富, 传统的中医药学为开发利用中草药提供了基础。中药的有效成分与氧化应激损伤的关系是一个值得研究的领域。随着科技的不断发展, 提取工艺的不断改进, 对中药主要成分的研究越来越深入。当归、红芪中多种主

养介质中 LDH、CK 的量增加, 当归红芪超滤物可显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致心肌细胞膜通透性的改变, 减少 LDH、CK 的外漏。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞内 MDA、MPO 量增加、SOD 活性降低, 当归红芪超滤物可显著降低心肌细胞内 MDA、MPO 的量, 提高 SOD 活性, 两组比较差异显著 ( $P < 0.01$ ); 且呈剂量依赖关系, 随超滤物质量浓度的增加 LDH、CK、MDA、MPO 量逐渐减少, SOD 活性逐渐增强。见表 3。

3.4 hsp70、caspase 3 mRNA 表达: 对照组 hsp70、caspase 3 mRNA 呈低水平表达, 模型组 hsp70、caspase 3 mRNA 表达量显著增加, 与对照组相比差异有统计学意义; 与模型组比较, 各超滤物干预组 hsp70 mRNA 呈过度表达, 而 caspase 3 mRNA 表达量显著降低, 差异有统计学意义。见表 4 和图 2。



1 对照组 2 模型组

3~5 当归红芪超滤物 15、7.5、3.75 mg·mL<sup>-1</sup>组

1 control group 2 model group

3~5 ultra-filtration extract mixture from *A. sinensis*

and *H. polybotrys* (15, 7.5, 3.75 mg·mL<sup>-1</sup>) groups

图 2 各组心肌细胞 hsp70 和 caspase 3 mRNA 表达

Fig. 2 Expression of hsp70 and caspase 3 mRNA in cardiomyocytes

要成分如多糖、苯酚类、香豆素类、黄酮类、有机酸类等化合物,都具有抗氧化损伤作用。当归红芪超滤膜提取物来自于经典名方当归补血汤,利用超滤膜技术分离、提纯而成。本实验用高浓度  $H_2O_2$  造成心肌细胞氧化损伤模型,用当归红芪超滤物进行干预,研究结果显示,当归红芪超滤物可明显提高心肌细胞存活率,减少 LDH、CK 外漏,降低细胞内 MDH、MPO 的量,提高 SOD 活性,且具有一定剂量依赖关系,随超滤物质量浓度增加,对心肌细胞的保护作用亦增强。说明当归红芪超滤物可以通过清除自由基提高心肌细胞抗氧化损伤能力。

热休克蛋白 (heat shock proteins, hsp) 是细胞在应激情况下启动热休克基因从而产生的一种结构高度保守的蛋白质,几乎存在于从原核生物到真核生物的所有生物体;除了热应激外,低氧、缺血、酸中毒、活性氧等诸多因素都能诱导 hsp 的合成,因此它又被称为“应激蛋白”。其中 hsp70 是一组具有内源性保护作用的应激性蛋白质。机体应答氧化应激时在不同的组织产生保护性的酶和热休克蛋白。氧化应激促进 hsp70 族的合成<sup>[14]</sup>。hsp70 通过如下机制对心肌细胞发挥保护作用<sup>[15]</sup>: (1) 提高心肌细胞蛋白质的正确折叠或聚集能力,保持新合成蛋白分子的恰当构型,防止在正确的多聚体形成前新合成蛋白质的错误折叠或聚集。(2) 促使受损心肌细胞、变性蛋白质的恢复或加速其降解和消除,能重新激活某些酶的作用,以维护细胞的功能和生存。(3) 抑制心肌细胞凋亡。(4) 保护心肌细胞肌动蛋白和细胞骨架。(5) 增加心肌细胞一氧化氮合成。(6) 允许心肌细胞新合成蛋白分子穿过细胞膜,陪伴蛋白分子在细胞内跨膜转运。Jiang 等<sup>[16]</sup> 研究发现,大鼠心肌细胞经热休克预处理后,心肌 hsp70 明显表达,耐受  $H_2O_2$  损伤的能力增强,而  $H_2O_2$  诱导的线粒体损伤和凋亡显著抑制。

Caspase 3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (称为 caspases) 家族成员,是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶。根据其在级联反应中的位置及 N 端序列上的特点不同,可将其分为在上游调控其他 caspase 活化的始起 caspase (caspase 1、2、4、5、8、9、10) 和下游直接介导凋亡实施的效应 caspase (caspase 3、6、7、14)。其中 caspase 3 处于核心位置,发挥非常重要的作用,被称为死亡蛋白酶。现代研究表明多种心脏疾病的病理过程都有凋亡机制参与。其中自由基导致的细胞凋亡是心肌受损的主要途径。 $H_2O_2$  是一种强氧化剂,可诱导心肌细胞凋亡

甚至死亡。目前认为细胞凋亡的发生机制主要有两条信号通路介导其发生,一条是通过 Fas/FasL 及 TNF/TNFR 依次激活 caspase 8 和 caspase 3 的死亡受体通路;另一条是通过线粒体的信号通路,即各种损伤因素通过促进线粒体释放细胞色素 C (cytochrome C) 等信号分子,然后激活 caspase 9 和 caspase 3 而介导细胞凋亡的发生。Caspase 在整个凋亡过程中起中心作用。肖为民等<sup>[13]</sup> 研究证实过氧氢通过线粒体通路和死亡受体诱导心肌细胞凋亡。

本实验用  $400 \mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  造成心肌细胞氧化损伤模型,用当归、红芪合剂超滤膜提取物进行干预,来研究其对心肌细胞的保护作用。实验结果表明,高浓度  $H_2O_2$  可诱导 hsp70 表达轻度增加 ( $P < 0.05$ ),同时促凋亡基因 caspase 3 表达亦显著增加 ( $P < 0.01$ ),促进心肌细胞凋亡,与对照组比较,具有统计学意义。当归红芪超滤膜提取物干预组 hsp70 基因则呈过度表达,而 caspase 3 基因表达显著下调,与损伤组比较,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。实验结果证实当归红芪超滤膜提取物具有抗心肌细胞凋亡的作用,其可能机制为:提高心肌细胞抗氧化能力;通过上调 hsp70 基因表达来抑制 caspase 3 活性。对于 hsp70 基因通过何种通路调控 caspase 3 活性本实验未深入研究。

现代药理学研究表明,许多传统中药具有心血管药理作用,本实验通过研究证实,当归红芪超滤物可通过上调 hsp70 和下调 caspase-3 表达抑制氧化损伤心肌细胞的凋亡,这为运用中药干预细胞凋亡提供了分子学基础,也为更加深入地研究这些药物提供了依据。

#### 参考文献:

- [1] 李贵荣, 吕昌银, 杨胜圆. 当归多糖清除活性氧自由基作用的研究 [J]. 南华大学学报: 理工版, 2002, 20(6): 747-749
- [2] 邓红娟, 郭延生, 曲亚玲, 等. 生当归、酒当归和油当归体外清除自由基活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 784-787
- [3] Shang P, Qian A R, Yang T H, et al. Experimental study of anti-tumor effects of polysaccharides from *Angelica sinensis* [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(9): 1963-1967
- [4] 姚宝泰, 赵健雄, 王学习, 等. 红芪总多糖体内抗肿瘤的实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(7): 627-629
- [5] 李云龙, 黄静, 郭弘川, 等. 红芪化学成分和抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1195-1198
- [6] Sun Y L, Tang J, Gu X H, et al. Water soluble polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: preparation, characterization and bioactivity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2005, 36(5): 283-289
- [7] 郭立玮. 中药制药工业对膜科学技术的重大需求与关键问题 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1849-1855

- [8] 曹云台, 郭立伟, 施栋磊, 等. 陶瓷膜应用于中药精制的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 314-317.
- [9] 董 艳, 高瑞昶, 潘 勤, 等. 超滤和纳滤分离技术提取纯化地黄低聚糖的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 359-363.
- [10] 陈舜华. 应用超滤膜精制中药制剂的实验研究 [J]. 净水技术, 2004, 23(2): 16-18.
- [11] 李应东. 当归、红芪及其合剂超滤膜提取物促缺血心肌血管新生的实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2005.
- [12] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cell [J]. *Circ Res*, 1982, 50: 101-116.
- [13] 肖卫民, 蒋碧梅, 石永忠, 等. 从凋亡信号通路探讨热休克蛋白保护过氧化氢所致心肌细胞凋亡的机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 283-286.
- [14] 张红波, 万亚涛, 王蓬哲, 等. 在细胞应激反应中 HSP70 的保护与调节作用 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(14): 228-229.
- [15] Latchman D S. Heat shock proteins and cardiac protection [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 51: 637-646.
- [16] Jiang B, Xiao W, Shi Y, et al. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells [J]. *Cell Stress Chapter*, 2005, 10(3): 252-262.

## 龟板提取物上调维生素 D 受体表达促骨髓间充质干细胞向成骨分化

侯秋科<sup>1</sup>, 吴 静<sup>1</sup>, 易香华<sup>1</sup>, 陈东风<sup>1,2\*</sup>, 周健洪<sup>1</sup>, 李伊为<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学 解剖学教研室, 广东 广州 510405; 2. 南京大学 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

**摘 要:**目的 探讨龟板提取物诱导大鼠骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 向成骨分化和对维生素 D 受体 (VDR) 表达的影响。方法 从大鼠骨髓中分离 MSCs, 体外培养, 利用流式细胞术检测 MSCs 表面抗原 CD44 细胞标志, 体外培养 MSCs 分成不同的组观察其向成骨分化, 在培养基中不加任何处理的作为对照组, 培养基中加成骨诱导液诱导 MSCs 向成骨分化作为阳性对照组, 龟板提取物组在培养基中加龟板提取物, 诱导 7 d 后, 通过免疫化学染色、Western blotting、原位杂交、RT-PCR 等方法观察龟板提取物对原代培养的 MSCs 向成骨分化的成骨分化标记分子碱性磷酸酶 (ALP)、骨桥蛋白 (OPN) 及 VDR 阳性表达及 VDR mRNA 的表达情况。结果 免疫组化染色显示, 龟板提取物组成骨分化标记分子 ALP、OPN 和 VDR 的阳性百分比明显高于对照组, Western blotting 结果也显示龟板提取物组的 ALP、OPN 和 VDR 的蛋白表达水平高于对照组; 同时原位杂交、RT-PCR 结果表明, 龟板提取物诱导 MSCs 向成骨分化过程可明显促进 VDR mRNA 的表达。结论 龟板提取物可促 MSCs 向成骨分化, 其机制可能与 VDR 的上调有关。

**关键词:** 龟板提取物; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化; 维生素 D 受体

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)04-0607-06

## Induction of *Plastrum testudinis* extract to mesenchymal stem cells differentiation into osteoblast through up-regulating expression of vitamin D receptor

HOU Qiu-ke<sup>1</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, YI Xiang-hua<sup>1</sup>, CHEN Dong-feng<sup>1,2</sup>, ZHOU Jian-hong<sup>1</sup>, LI Yi-wei<sup>1</sup>

(1. Department of Anatomy, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract: Objective** To investigate vitamin D receptor (VDR) mechanism implicated in the osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by *Plastrum testudinis* extracts (PTE). **Methods** MSCs were dissociated from rat bone marrow and were marked using the expression of CD44 by the flow cytometry (FCM). MSCs Cultured *in vitro* were divided into different groups for the effects of MSCs differentiation into osteoblast, MSCs seeded in culture medium without treatment served as controls, MSCs seeded in culture medium with osteo-induction treatment served as positive controls, PTE was added and the cells were incubated for 7 d. Then immunohistochemistry, Western blotting, *in situ* hybridization, and RT-PCR were applied to observing the expression of the osteoblast differentiation specific marker (ALP, OPN) as well as the VDR and VDR mRNA expression. **Results** Immunohistochemistry

①收稿日期: 2009-07-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472272, 30772861)

作者简介: 侯秋科 (1983-), 女 (壮族), 广西柳州人, 研究生在读, 研究方向为中医药调控神经干细胞防治重大神经疾病。

Tel: (020) 36585448 E-mail: houqiuke@126.com

\* 通讯作者 陈东风 Tel: (020) 36588581 E-mail: cdf27212@21.cn.com