

讨 论

上呼吸道感染是冬春季的常见病、多发病。主要通过飞沫传播,老幼体弱人群尤其易感。90%左右由病毒引起^[5],细菌感染常继发于病毒感染之后。本病常可引起严重并发症,潜在危害很大。近年来出现的 SARS、甲型 H1N1 流感、禽流感等呼吸道传染病给人类健康带来了很大的威胁。因此积极预防上呼吸道感染,至关重要。中医药在上呼吸道感染的防治方面有其独到之处。在祖国医学中有一种方法,即将芳香性中草药装入特制布袋中,佩戴在身上以预防疾病,俗称“香佩疗法”。此疗法具有芳香辟秽、开窍醒脑、祛邪解毒、清热消肿、散风止痒、安神定志等功效。香佩疗法在我国具有悠久的历史,早在春秋战国时期就有佩戴芳香性植物以防秽避邪的记载,如《山海经·西山经》中“熏草……佩之可以已疢”。汉代《中藏经》已积累了较多的治疗经验,如用绛囊盛安息香来防治传尸、肺痿、时气、瘴疟等病。清代吴尚先《理渝骈文》中也载有用辟瘟囊佩胸前防治四时感冒,以绛囊盛七宝如意丹佩胸前预防瘟疫,用抗癘丸佩胸前防治尸癘等,故民间有“带个香草袋,不怕五虫害”之说。但中医药预防上呼吸道感染的效果评价目前尚

缺乏临床有效的大样本量调查研究。

本次研究为前瞻性、大样本、群体抽样的方法进行香佩疗法预防上呼吸道感染的效果观察,并进行有效性评价。结果表明观察组上呼吸道感染发病人数 106 例,发病率 14.42%,对照组发病人数 414 例,发病率为 54.98%。观察组的发病率明显低于对照组,且具有统计学意义。香佩疗法对幼儿的保护率 PR 为 73.77% (95% CI: 68.85% ~ 78.69%), IE 为 3.81。可初步评价认为香佩疗法对幼儿上呼吸道感染的预防起到了良好的效果。

参考文献

- 1 中华医学会儿科学会呼吸学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 反复呼吸道感染的临床概念和处理原则. 中华儿科杂志, 2008, 46(2): 108
- 2 朱汝南, 邓洁, 王芳, 等. 2000 年秋冬季至 2002 年夏北京地区急性呼吸道感染病毒病原学研究[J]. 临床儿科杂志, 2003, 21(1): 25-28
- 3 朱汝南, 钱渊, 王芳, 等. 2001~2005 年北京地区婴幼儿甲型流感病毒感染的研究[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(7): 518-522
- 4 胡亚美, 江载芳, 诸福棠. 实用儿科学. 7 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1139-1142
- 5 郭亚云. 56 例老年人肺炎的临床分析[J]. 中华当代医学杂志, 2006, 4(4): 55 (收稿: 2009-12-28) (修回: 2010-01-24)

白藜芦醇对缺氧诱导大鼠乳鼠心肌细胞凋亡的作用

刘丹妮 周秋兰 朱 丹 黄秀兰

摘 要 目的 观察白藜芦醇(Res)对缺氧诱导大鼠乳鼠心肌细胞凋亡的保护作用。方法 建立体外培养大鼠乳鼠心肌细胞缺氧模型, MTT 法检测心肌细胞活力, Hoechst33258 染色检测心肌细胞凋亡, 测定心肌细胞内总抗氧化能力(T-AOC)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果 经 8h、12h、16h、24h 缺氧培养后, 心肌细胞抑制率分别为(22.13 ± 3.22)%、(29.75 ± 0.34)%、(37.43 ± 6.42)% 和(45.47 ± 7.32)%; 心肌细胞缺氧培养 24h 后, 呈现典型的凋亡形态学变化; 心肌细胞内 GSH-Px 活性从(46.96 ± 8.36) U/ml 下降到(27.13 ± 4.76) U/ml ($P < 0.01$); 心肌细胞内 T-AOC 为(2.68 ± 0.31) U/ml, 缺氧 24h 后下降到(1.28 ± 0.27) U/ml ($P < 0.05$)。Res(25、50、75 μmol/L)可剂量依赖性降低 8h、12h、16h、24h 缺氧培养所引起的心肌细胞抑制率升高($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 心肌细胞凋亡形态学改变逐渐改善, 50 μmol/L 和 75 μmol/L Res 作用更明显; 剂量依赖性升高心肌细胞内 GSH-Px 活性和 T-AOC 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 Res 可减轻缺氧诱导大鼠乳鼠心肌细胞凋亡程度。

关键词 白藜芦醇 大鼠乳鼠心肌细胞 缺氧 凋亡

Effects of Resveratrol on Neonatal Rat Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Hypoxia. Liu Danni, Zhou Qiulan, Zhu Dan, Huang Xiulan. Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China

基金项目: 国家民族事务委员会资助项目(08 zy13); 中央民族大学“985 工程”资助项目

作者单位: 100081 北京, 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院

通讯作者: 黄秀兰, 电子信箱: hxlcn@sina.com

Abstract Objective To investigate the effect of resveratrol(Res) on neonatal rat cardiomyocyte lesion induced by hypoxia. **Methods** The cardiomyocytes of neonatal rats were cultured in vitro and the model of cardiomyocytes hypoxia was established. The cardiomyocyte vitalities were determined by MTT assay. The cardiomyocyte apoptosis was detected by Hoechst33258 fluorescent staining. The levels of total antioxidant capacity(T - AOC) and glutathione peroxidase(GSH - Px) were measured as well. **Results** After the administration of hypoxia for 8, 12, 16 and 24 hours, the cardiomyocyte inhibitory was $(22.13 \pm 3.22)\%$, $(29.75 \pm 0.34)\%$, $(37.43 \pm 6.42)\%$ and $(45.47 \pm 7.32)\%$, respectively. After the administration of hypoxia for 24 hours, the typical morphologic changes of apoptosis in cardiomyocytes were showed. The intracellular GSH - Px activity decreased from (46.96 ± 8.36) U/ml to (27.13 ± 4.76) U/ml ($P < 0.01$). The level of T - AOC was attenuated from (2.68 ± 0.31) U/ml to (1.28 ± 0.27) U/ml ($P < 0.05$). Res $(25, 50, 75 \mu\text{mol/L})$ could dose - dependently inhibited the raising of cardiomyocyte inhibitory induced by hypoxia for 8, 12, 16 and 24 hours ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$). The morphologic changes of apoptosis in cardiomyocytes was improved. The effects of $50 \mu\text{mol/L}$ and $75 \mu\text{mol/L}$ Res were more obvious. The levels of GSH - Px and T - AOC of cardiomyocytes increased dose - dependently ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Res could improve the apoptosis of neonatal rat cardiomyocyte induced by hypoxia.

Key words Resveratrol; Neonatal rat cardiomyocyte; Hypoxia; Apoptosis

心肌细胞缺氧性损伤不仅是缺血性心肌病最为常见的并发症,而且是严重损伤后心脏和其他脏器功能损害或者衰竭的重要原因。白藜芦醇(resveratrol, Res)有抗心脑血管缺血、抗炎、抗肿瘤等多种药理学活性^[1-4]。近年来,Res对心血管疾病的预防和治疗作用已受到广泛关注。动物实验证明^[1],Res可减小心肌梗死面积,对冠脉结扎致大鼠心肌缺血性损伤具有治疗作用。本研究通过建立体外培养新生大鼠乳鼠心肌细胞缺氧模型,利用现代细胞生物学技术,观察Res对缺氧诱导心肌细胞凋亡的保护作用,并初步探讨其作用机制。

方法与材料

1. 材料:(1)药品和试剂:99%白藜芦醇(resveratrol, Res)由长沙康隆生物制品有限公司馈赠。DEME培养基、新生牛血清,购自Gibco;胰蛋白酶(1:250)、5-溴-2-脱氧尿嘧啶(5-bromo-2-deoxyuridine, 5-BrdU)、Hoechst33258,购自Sigma;青霉素钠盐、硫酸链霉素,购自北京药物研究所;谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH - Px)测定试剂盒、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T - AOC)测定试剂盒,购自南京建成生化有限公司。(2)仪器:Benchmark Plus酶标仪(美国BIO - RAD);HERA cell 150型三气培养箱(美国Thermo);70 - 20型全自动生化分析仪(日本HITACHI);MilliQ Academic型超纯水系统(Millipore,美国)。(3)实验动物:新生1~3天SD(Sprague Dawley)大鼠,由北京大学医学部实验动物中心提供,动物合格证号:scxk(京)2006 - 0008。

2. 方法:(1)大鼠乳鼠心肌细胞的分离培养:采用胰蛋白酶消化、差速贴壁法获得纯度较高的心肌细胞。无菌条件下取出新生乳鼠心室,多次消化,收集细胞,预培养90min后分离纯化心肌细胞。用含15%小牛血清和5-BrdU(终浓度为0.1mmol/L)的DMEM将细胞浓度调整为 $8 \times 10^5/\text{ml}$ 接种。48h后更换为含1%小牛血清的DMEM,用于实验。(2)体外心肌细胞缺氧模型的建立:心肌细胞培养于37℃、5% CO₂的

培养箱中,通入99.9%的N₂,将O₂浓度平衡至1%,用于体外缺氧实验。(3)MTT法检测细胞活力:实验分为:正常对照组、缺氧模型组、Res干预组(25、50、75μmol/L)。将心肌细胞以 $8 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于96孔板,按分组要求给予不同处理因素,每组设8~10个平行孔。取出药物作用后的96孔板,吸弃培养液,加入含0.5g/L MTT的DMEM 200μl,孵育4h。吸弃液体,每孔加200μl DMSO,室温静置10min,酶标仪检测λ_{570nm}处OD值。取每组的OD值均数,计算细胞抑制率。细胞抑制率(%) = (细胞对照组OD - 给药组OD) / (细胞对照组OD - 空白对照组OD) × 100%。(4)Hoechst33258染色检测心肌细胞凋亡:收集心肌细胞,PBS漂洗悬浮,用95%乙醇(4℃)固定15min,调整细胞密度至 $(0.5 \sim 2.0) \times 10^6$ 个/毫升。取100μl细胞悬液,加入1μl浓度为1g/L的Hoechst33258染液染色10min。选用UV激发滤片和400~500nm阻断滤片,荧光显微镜下观察。(5)测定心肌细胞内GSH - Px活性:收集心肌细胞,反复冻融3次,按试剂盒说明进行检测。(6)测定心肌细胞内T - AOC水平:收集心肌细胞,反复冻融3次,按试剂盒说明进行检测。(7)统计学处理:实验重复3次。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用F检验和t检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为统计学差异有显著性。

结 果

1. Res对不同缺氧时间大鼠乳鼠心肌细胞生长状况的影响:结果见表1。随着缺氧时间的延长,心肌细胞抑制率逐渐增加。经8h、12h、16h、24h缺氧培养后,心肌细胞抑制率分别为 $(22.13 \pm 3.22)\%$ 、 $(29.75 \pm 0.34)\%$ 、 $(37.43 \pm 6.42)\%$ 和 $(45.47 \pm 7.32)\%$ 。Res(25、50、75μmol/L)可剂量依赖性降低8h、12h、16h、24h缺氧培养所引起的心肌细胞抑制率升高(与缺氧模型组比较, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),提示Res可改善缺氧对心肌细胞生长的抑制作用。

表 1 Res 对不同缺氧时间心肌细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞抑制率			
		8h	12h	16h	24h
缺氧模型	—	22.13 ± 3.22	29.75 ± 5.34	37.43 ± 6.42	45.47 ± 7.32
Res	25	6.82 ± 0.05^a	14.02 ± 2.40^a	16.34 ± 2.72^b	20.51 ± 4.21^b
Res	50	-0.25 ± 0.01^b	-2.21 ± 0.01^b	-13.24 ± 2.73^b	4.28 ± 0.26^c
Res	75	-4.07 ± 0.53^c	-9.19 ± 1.47^c	-20.25 ± 3.52^c	-1.56 ± 0.31^c

与缺氧模型组比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$, $^cP < 0.001$

2. Res 对缺氧诱导大鼠乳鼠心肌细胞凋亡的影响: Hoechst33258 是一种 DNA 亲和染料, 能与 DNA 螺旋小沟富含 A-T 重复序列特异结合。经荧光显微镜观察, 正常心肌细胞核呈椭圆形, 呈均匀深蓝色荧光 (第 126 页彩图 1A)。心肌细胞缺氧培养 24h 后, 胞核着色不均匀, 有明亮的荧光, 呈现典型的凋亡形态学变化, 包括染色质凝集、核固缩、核边缘化、核碎裂等, 偶见游离的凋亡小体 (第 126 页彩图 1B)。与缺氧模型组比较, 随着药物浓度增加, 心肌细胞凋亡逐渐改善, 高荧光强度的细胞逐渐减少, 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 75 $\mu\text{mol/L}$ Res 作用更明显, 心肌细胞核荧光基本均匀, 细胞形态比较完整, 未见凋亡小体 (第 126 页彩图 1D ~ 图 1E)。

3. Res 对大鼠乳鼠心肌细胞内 GSH-Px 的影响: 正常对照组心肌细胞内 GSH-Px 活性为 (46.96 ± 8.36) U/ml, 缺氧培养 24h 后下降到 (27.13 ± 4.76) U/ml (与正常对照组比较, $P < 0.01$)。Res (25、50、75 $\mu\text{mol/L}$) 可剂量依赖性升高心肌细胞内 GSH-Px 活性, 心肌细胞内 GSH-Px 活性分别升高到 (33.55 ± 6.34) U/ml、(37.67 ± 6.73) U/ml 和 (41.44 ± 7.91) U/ml (与模型组比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果提示, 缺氧可降低大鼠乳鼠心肌细胞内 GSH-Px 活性, Res 可增加心肌细胞内 GSH-Px 活性 (图 1)。

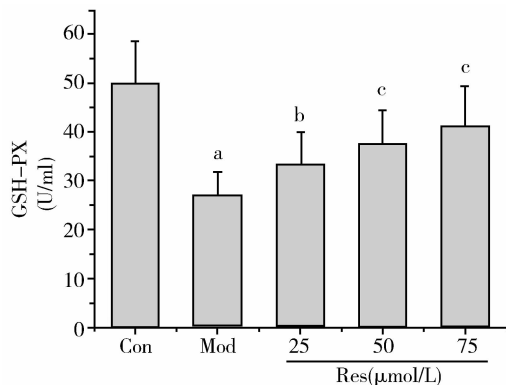


图 1 Res 对缺氧条件下大鼠乳鼠心肌细胞 GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

与正常对照组比较, $a: P < 0.01$; 与缺氧模型组比较, $b: P < 0.05$, $c: P < 0.01$

4. Res 对缺氧条件下大鼠乳鼠心肌细胞内 T-AOC 水平的影响: 正常对照组心肌细胞内 T-AOC 为 (2.68 ± 0.31) U/ml, 缺氧 24h 后下降到 (1.28 ± 0.27) U/ml ($P < 0.05$)。给予 25、50、75 $\mu\text{mol/L}$ Res 干预后, 心肌细胞 T-AOC 分别升高到 (1.56 ± 0.35) U/ml、(2.07 ± 0.38) U/ml 和 (2.56 ± 0.46) U/ml。与缺氧模型组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ Res 组具有显著性差异 ($P < 0.05$), 75 $\mu\text{mol/L}$ Res 组呈高度显著性差异 ($P < 0.01$)。提示缺氧可导致心肌细胞 T-AOC 降低, Res 可增加在缺氧条件下心肌细胞内 T-AOC 水平 (图 2)。

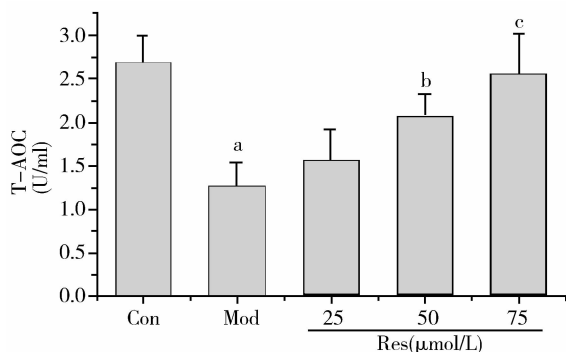


图 2 Res 对缺氧条件下大鼠乳鼠心肌细胞内 T-AOC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

与正常对照组比较, $a: P < 0.05$; 与模型组比较, $b: P < 0.05$, $c: P < 0.01$

讨 论

细胞凋亡是心肌细胞缺血缺氧诱导心肌细胞死亡的主要因素之一^[5]。细胞凋亡的形态学特征是细胞容积浓缩, 以细胞核的形态改变尤为突出, 染色质致密聚集成斑块状及聚集在核膜周边。本研究结果表明, 缺氧可显著降低大鼠乳鼠心肌细胞的存活率, 在缺氧培养后 8h 即开始出现, 随着缺氧时间延长, 心肌细胞存活率呈进行性下降, 形态损伤渐加重。经荧光染料 Hoechst33258 染色后观察, 在缺氧 12h 即可见到部分细胞出现典型的凋亡形态学特征, 表现为核固缩、核碎裂、核边缘化等。推测缺氧引起心肌细胞存

活率下降的主要原因可能是细胞凋亡。

心肌细胞的抗氧化能力强弱与心肌细胞凋亡存在着密切联系。缺氧条件下,细胞内防御体系被激活,其抗氧化作用主要通过 3 条途径:①消除自由基和活性氧以免引发脂质过氧化;②分解过氧化物,阻断氧化链;③除去起催化作用的金属离子。GSH - Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化 H_2O_2 分解的酶,催化还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 对 H_2O_2 的还原反应,可起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。细胞内总抗氧化能力和 GSH - Px 活性的变化,是反应细胞对缺氧耐受的重要指标。由于缺氧可诱导细胞内产生大量自由基,过量积累会对细胞产生不可逆的损伤,最终导致细胞坏死或凋亡;而 GSH - Px 在细胞缺氧时活性增加,可有效清除自由基等有害物质,保护细胞免受损伤。新近研究表明,Res 抗缺氧诱导心肌细胞凋亡作用与 SIRT1 - FoxO1 通路有关^[6]。本研究发现在给予 Res 干预后,心肌细胞总抗氧化能力和 GSH - Px 活性显著升高,推测 Res 可能通过上调心肌细胞 GSH - Px 活性,提高其细胞内总

抗氧化能力,从而减轻缺氧诱导心肌细胞凋亡程度,其机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Lin JF, Lin SM, Chih CL, *et al.* Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats[J]. *Life Sci*, 2008, 83(9 - 10):313 - 317
- 2 Tsai SK, Hung LM, Fu YT, *et al.* Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats [J]. *J Vasc Surg*, 2007, 46(2):346 - 353
- 3 Lee M, Kim S, Kwon OK, *et al.* Anti - inflammatory and anti - asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(4):418 - 424
- 4 Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials[J]. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2009, 2(5):409 - 418
- 5 Abbate A, Morales C, De Falco M, *et al.* Ischemia and apoptosis in an animal model of permanent infarct - related artery occlusion[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 121(1):109 - 111
- 6 Chen CJ, Yu W, Fu YC, *et al.* Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia - induced apoptosis through the SIRT1 - FoxO1 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378(3):389 - 393

(收稿:2010 - 01 - 05)

γ 射线预处理制备胚胎干细胞滋养层的实验研究

刘尧 杨明 王惠 杨卫兵 秦茂林 李红丽

摘要 目的 筛选并建立稳定、高效的胚胎干细胞滋养层细胞体外培养的最佳条件,利于胚胎干细胞的培养。**方法** 清洁级昆明系孕 12.5 天、14.5 天、18.5 天雌鼠和新生 (P0) 昆明小鼠各 5 只。无菌取上述各孕龄小鼠胚胎分离培养原代鼠胚成纤维细胞 (MEF) 并传代;以 $^{60}Co\gamma$ 射线 (30Gy, 20℃) 分别照射 10、20、25min 后制备滋养层细胞。**结果** 胚龄及 $^{60}Co\gamma$ 射线照射对 MEF 的细胞活性、生长增生和分泌功能有影响。(1) 细胞活性状态:①E12.5 天、E14.5 天、E18 天鼠胚和 P0 来源的第 3 ~ 5 代 MEF 活性均较好。E18.5 天鼠胚和 P0 来源的第 6 代 MEF, 后期深染变形细胞的比例增多达 32%, 与 E14.5 天鼠胚来源同代细胞相比有显著差异 ($P < 0.05$);②E14.5 天来源的第 3 ~ 6 代细胞采用 $^{60}Co\gamma$ 射线照射 10min 组, 细胞仍生长迅速。照射 20min 组, 细胞可维持存活达 20 天以上, 细胞密度无显著变化。照射 25min 组, 细胞存活 14 天左右且细胞密度无显著增加。(2) 细胞分泌功能:①E14.5 天鼠胚来源的第 3 ~ 6 代 MEF 以及用 $^{60}Co\gamma$ 射线照射 10min 组和 20min 组并培养 5 天时均可见较多数目的 I 型胶原蛋白免疫阳性细胞, 且染色较深;② $^{60}Co\gamma$ 射线照射 25min 组, 培养 5 天后第 3 ~ 4 代 MEF 中 I 型胶原蛋白阳性细胞数目与正常组相比无明显差异;但第 5 代后 MEF 中 I 型胶原蛋白阳性细胞数目减少, 染色浅淡。**结论** E14.5 天鼠胚来源的第 3 ~ 6 代是用于制备滋养层的最佳来源; $^{60}Co\gamma$ 射线 (30Gy, 20℃) 照射 20min 可作为预处理制备滋养层细胞的最佳条件。

关键词 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 胚胎干细胞 (ESC) 滋养层 $^{60}Co\gamma$ 射线

Study on the Pretreatment of Embryonic Stem Cell Feeder Layers by γ - Irradiation. Liu Yao, Yang Ming, Wang Hui, Yang Weibing, Qin Maolin, Li Hongli. Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, Third Military Medical University of Chinese

基金项目:广西壮族自治区科学研究与技术开发基金资助 (桂科攻 0592007 - 1G);解放军第一八一医院科研基金

作者单位:400038 重庆,解放军第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室 (刘尧、秦茂林、李红丽);541002 桂林,解放军第一八一医院皮肤科 (杨明、王惠、杨卫兵)

通讯作者:李红丽,电子邮箱:lihlimm@163.com