

地黄多糖对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤保护作用的研究

孙立峰

摘 要 **目的** 研究地黄多糖(RPS)对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。**方法** 取出生3天的SD大鼠乳鼠分离心肌细胞,培养72h后分为6组:空白对照组、缺氧/复氧模型对照组、地黄多糖(10、20、40 $\mu\text{g/ml}$)干预组和舒血宁注射液(SXN, 100 $\mu\text{g/ml}$)干预组,每组设10个复孔。各组细胞经药物干预6h后,通过倒置光学显微镜观察各组细胞形态变化,通过甲基四唑蓝(MTT)比色法测定细胞存活率,通过流式细胞术测定细胞凋亡率;测定各组细胞培养液中心肌酶[谷草转氨酶(AST)、磷酸肌酸激酶(CPK)、乳酸脱氢酶(LDH)]含量;测定各组细胞中抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)]活性和丙二醛(MDA)含量。**结果** 与缺氧/复氧模型对照组相比,地黄多糖干预组心肌细胞形态明显好转,细胞存活率明显升高、凋亡率显著降低,培养液中AST、CPK、LDH含量显著降低,细胞中SOD、GSH-Px、CAT活性显著升高且MDA含量显著降低,其中以地黄多糖40 $\mu\text{g/ml}$ 干预组效果最为显著,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 地黄多糖能够有效改善缺氧/复氧损伤心肌细胞形态、提高细胞存活率、降低细胞凋亡率、改善抗氧化酶活性、抑制氧化应激损伤,提示地黄多糖对缺氧/复氧损伤心肌细胞具有保护作用。

关键词 地黄多糖 乳鼠 心肌细胞 缺氧/复氧损伤 保护

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.038

Protective Effects of Rehmannia Glutinosa Polysaccharides on Cardiocytes of Neonatal Rat Impaired by Hypoxia-reoxygenation. Sun Lifeng. Department of Cardiac Surgery, Xingtai People's Hospital, Hebei 054031, China

Abstract Objective To investigate the protective effects of rehmannia glutinosa polysaccharides (RPS) on cardiocytes of neonatal rat impaired by hypoxia-reoxygenation (H/R). **Methods** Cardiocytes of neonate rat were cultivated for 72 hours and divided into six groups: Normal control group, H/R group, RPS (10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) treatment groups and SXN (100 $\mu\text{g/ml}$) treatment group ($n = 10$). 6 hours after the drugs were given, the morphology changes was observed and the survival rate was determined by MTT; the activity of AST, CK, LDH in culture medium were detected; the activity of SOD, CAT, GSH-Px and the content of MDA in cardiomyocytes were also determined; the apoptosis rate were detected. **Results** Compared with the H/R group, the morphology of cardiomyocytes in RPS treatment groups were improved, the survival rate was significantly increased, the activity of CPK, AST and LDH in culture medium were significantly decreased, the activity of SOD, GSH-Px, CAT in cardiomyocytes were significantly increased and the content of MDA was significantly decreased, the apoptosis rate was significantly decreased. All of the difference in RPS 40 $\mu\text{g/ml}$ treatment group was the most significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** RPS could effectively improve the morphology of cardiomyocytes impaired by H/R, increase the survival rate, improve the activity of antioxidant, depress oxidative stress and decrease the apoptosis rate, suggesting that RPS had protective effects on cardiocytes of neonatal rat impaired by H/R.

Key words RPS; Neonatal rat; Cardiomyocytes; Hypoxia-reoxygenation; Protection

地黄为玄参科植物地黄(rehmannia glutinosa libosch, RGL)的新鲜或干燥根茎,为我国传统中药品种之一,首载于《神农本草经》,具有清热凉血、养阴生津的功效。地黄多糖(rehmannia glutinosa polysaccharides, RPS)为地黄的主要活性成分之一,具有抗氧化、降血糖、提高免疫力等多种药理学作用^[1-4]。

朱敏丰等^[5]研究发现,地黄多糖能够有效改善脑缺血再灌注损伤小鼠线粒体过氧化损伤而起到保护作用,本实验将通过制备乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤模型,研究地黄多糖对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。

材料与方法

1. 实验动物:SPF级雄性SD大鼠3天乳鼠,由河北省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(冀)2008-1-003。

2. 试验药物与试剂:地黄多糖(陕西慈缘生物技术有限公司提供,批号:20141108,纯度 $\geq 98\%$);舒血宁注射剂(神威药业有限公司,7.0mg:2ml,批号:Z13070538);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);二甲基亚砷(DMSO,国药集团化学试剂有限公司);甲基四唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司);AST、CPK、LDH、MDA 含量检测试剂盒和 SOD、GSH-Px、CAT 活性检测试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);其余试剂均为分析纯。

3. 主要仪器:超净工作台(江苏苏净集团);CO₂ 培养箱(日本三洋集团);液氮罐(成都金凤液氮容器有限公司);-80℃ 冰箱(美国 Thermoscientific 公司);超速低温离心机(德国 Kendro 公司);酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);卓越 310 型全自动生化分析仪(武汉精诚伟业医疗设备有限公司);UV762 型紫外-可见分光光度计(上海楚定分析仪器有限公司);FACSAria 流式细胞仪(美国 BD 公司);倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司);恒温水浴箱(北京医疗设备厂)。

4. 乳鼠心肌细胞的分离与培养:参照李澎等^[6]报道的方法分离和培养乳鼠心肌细胞:无菌环境下取 SD 大鼠 3 天乳鼠心脏组织,剪取心室组织并剪碎后加入 0.1% 的胰酶,37℃ 环境中振荡消化 6min,去上清,取沉淀继续用 0.1% 胰酶消化 6min,如此循环直至组织碎块消化完毕,1500r/min 离心 10min 后取沉淀,加入心肌细胞培养基,吹打均匀,壁立 1.5h。收集未贴壁细胞,调整细胞至 6×10^8 个/升,接种于 35mm 培养皿中,37℃、5% CO₂、100% 湿度,培养 72h 后用于实验。

5. 分组与心肌细胞缺氧/复氧损伤模型的制备:取分离并培养 72h 后状态良好的乳鼠心肌细胞,随机分为空白对照组、缺氧/复氧模型对照组、地黄多糖(10、20、40μg/ml)干预组和舒血宁注射液(100μg/ml)干预组,每组设 10 个复孔;参照李澎等^[6]方法制备缺氧/复氧损伤心肌细胞模型:弃去培养基,无糖台氏液冲洗 3 遍;每孔加入无糖台氏液 2ml(经 95% N₂-5% CO₂ 混合气饱和 15min),敞盖置于缺氧盒内(通入 95% N₂-5% CO₂ 混合气,1L/min);15min 后,夹闭缺氧盒内通气并将其置于细胞培养箱内 2.5h,此段过程为缺氧;然后进行复氧:取出培养皿,吸出上清液,每孔加入 2ml 2.5% 胎牛血清 DMEM 培养基,

置于培养箱内继续培养 2h;其中空白对照组不进行缺氧复氧处理。各组细胞造模完成后立即给药进行干预,干预时间为 6h。

6. 细胞形态学变化的观察:去掉培养液,用 PBS 溶液冲洗 2 次,然后用去离子水洗剂至显微镜下细胞间隙清晰止,晾干后通过光学显微镜观察细胞形态。

7. 细胞存活率的测定:将心肌细胞接种于 96 孔培养板内,每孔加入 MTT(5mg/ml)20μl,37℃ 恒温孵育 4h,弃掉上清液,每孔加入 150μl DMSO,振荡 15min 后用酶标仪测定波长 490nm 处 A 值,然后计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

8. 培养液中 AST、CPK、LDH 活性的检测:取心肌细胞培养液,根据试剂盒要求,通过全自动生化分析仪平行测定各组细胞培养液中 AST、CPK、LDH 含量。

9. 细胞中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量的检测:弃培养基,迅速刮取细胞,每孔加入 2ml PBS 溶液,冰浴环境中超声细胞粉碎仪处理 30s,随后 3500r/min 低温(4℃)离心 10min,取上清液,根据试剂盒要求,通过紫外-可见分光光度计平行测定各组细胞裂解液中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量。

10. 细胞凋亡的检测:采用 0.25% 胰酶消化细胞,1500r/min 离心 5min 后取沉淀,经 PBS 溶液润洗 2 次后,根据 Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒要求:加入 500μl Binding Buffer、5μl Annexin V、5μl PI,混匀,室温避光孵育 10min,通过流式细胞仪进行检测,最后在流式二维图中计算凋亡率。

11. 统计学方法:使用软件 SPSS 15.0 进行统计学分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞形态学的影响:通过光学显微镜观察发现:空白对照组细胞形态未见异常:呈单层簇状生长,伪足多而饱满,呈放射状生长,搏动明显、节律一致;模型对照组细胞伪足减少,大量细胞脱落、悬浮,搏动减弱、频率降低、节律不齐;经地黄多糖 20、40μg/ml 干预 6h 后,缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞形态明显改善(图 1)。

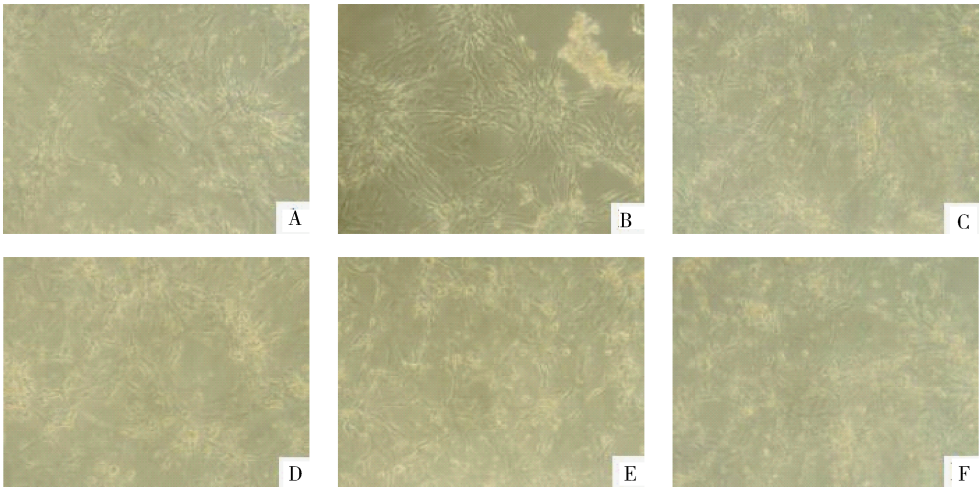


图1 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞形态学的影响

A. 空白对照组;B. 缺氧/复氧模型对照组;C. 地黄多糖 10 μ g/ml 干预组;D. 地黄多糖 20 μ g/ml 干预组;
E. 地黄多糖 40 μ g/ml 干预组;F. 舒血宁注射液 100 μ g/ml 干预组

2. 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞存活率的影响:缺氧/复氧模型对照组乳鼠心肌细胞存活率较空白对照组显著降低($P < 0.01$);经地黄多糖 20、40 μ g/ml 干预 6h 后,缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞存活率显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$,表 1)。

3. 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞培养液中 AST、CPK、LDH 含量的影响:缺氧/复氧模型组乳鼠心肌细胞培养液中 AST、CPK、LDH 活性较空白对照组显著升高($P < 0.01$);而经地黄多糖 20、40 μ g/ml 干预 6h 后,培养液中 AST、CPK 含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中 40 μ g/ml 干预组培养液

中 LDH 含量显著降低($P < 0.01$,表 2)。

表1 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (μ g/ml)	存活率 (%)
空白对照组	—	97.3 $\pm$ 1.2
缺氧/复氧模型对照组	—	52.8 $\pm$ 4.9 *
地黄多糖干预组	10	59.4 $\pm$ 5.3
	20	67.1 $\pm$ 5.8 #
	40	80.5 $\pm$ 6.7 ##
舒血宁注射液干预组	100	69.2 $\pm$ 5.3 #

与空白对照组比较, * $P < 0.01$;与缺氧/复氧模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表2 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞培养液中 AST、CPK、LDH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (μ g/ml)	AST (U/ml)	CPK (U/ml)	LDH (U/L)
空白对照组	—	20.5 $\pm$ 4.3	1.31 $\pm$ 0.26	498.2 $\pm$ 87.4
缺氧/复氧模型对照组	—	36.1 $\pm$ 7.0 *	2.54 $\pm$ 0.50 *	1017.6 $\pm$ 183.9 *
地黄多糖干预组	10	32.7 $\pm$ 7.2	2.18 $\pm$ 0.42	903.5 $\pm$ 164.1
	20	26.5 $\pm$ 6.1 #	1.83 $\pm$ 0.36 #	839.2 $\pm$ 143.5
	40	23.8 $\pm$ 5.3 ##	1.57 $\pm$ 0.29 ##	645.3 $\pm$ 116.4 ##
舒血宁注射液干预组	100	27.1 $\pm$ 6.4 #	1.76 $\pm$ 0.27 #	804.6 $\pm$ 137.5

与空白对照组比较, * $P < 0.01$;与缺氧/复氧模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4. 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞中 SOD、GSH - Px、CAT 活性和 MDA 含量的影响:与空白对照组相比,缺氧/复氧模型对照组乳鼠心肌细胞中 SOD、GSH - Px、CAT 活性较空白对照显著降低且 MDA 含量显著升高($P < 0.01$);而地黄多糖 20、40 μ g/ml 干预组乳鼠心肌细胞中 SOD、CAT 活性较缺氧/复氧模型对照组显著升高且 MDA 含量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中 40 μ g/ml 组 GSH - Px 活

性显著升高($P < 0.05$),结果见表 3。

5. 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞凋亡的影响:通过流式细胞术分析发现,空白对照组乳鼠心肌细胞凋亡率非常低,而缺氧/复氧模型对照组乳鼠心肌细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);经地黄多糖 20、40 μ g/ml 干预 6h 后,缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$,图 3、表 4)。

表 3 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞中 SOD、GSH - Px、CAT 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	SOD (U/mg prot)	GSH - Px (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
空白对照组	-	114.7 ± 20.1	4.31 ± 0.85	32.8 ± 5.1	5.94 ± 1.13
缺氧/复氧模型对照组	-	$56.8 \pm 17.3^*$	$2.50 \pm 0.71^*$	$14.5 \pm 3.6^*$	$12.07 \pm 2.85^*$
地黄多糖干预组	10	63.5 ± 18.4	2.76 ± 0.78	17.1 ± 4.0	10.63 ± 2.71
	20	$79.0 \pm 20.8^\#$	2.94 ± 0.83	$23.2 \pm 3.9^\#$	$8.09 \pm 1.84^{##}$
	40	$93.6 \pm 22.7^{##}$	$3.58 \pm 0.94^\#$	$27.5 \pm 4.6^{##}$	$6.52 \pm 1.63^{##}$
舒血宁注射液干预组	100	$82.5 \pm 19.1^\#$	2.91 ± 0.77	$22.8 \pm 3.7^\#$	$7.75 \pm 1.54^{##}$

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与缺氧/复氧模型组比较, $^\#P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$

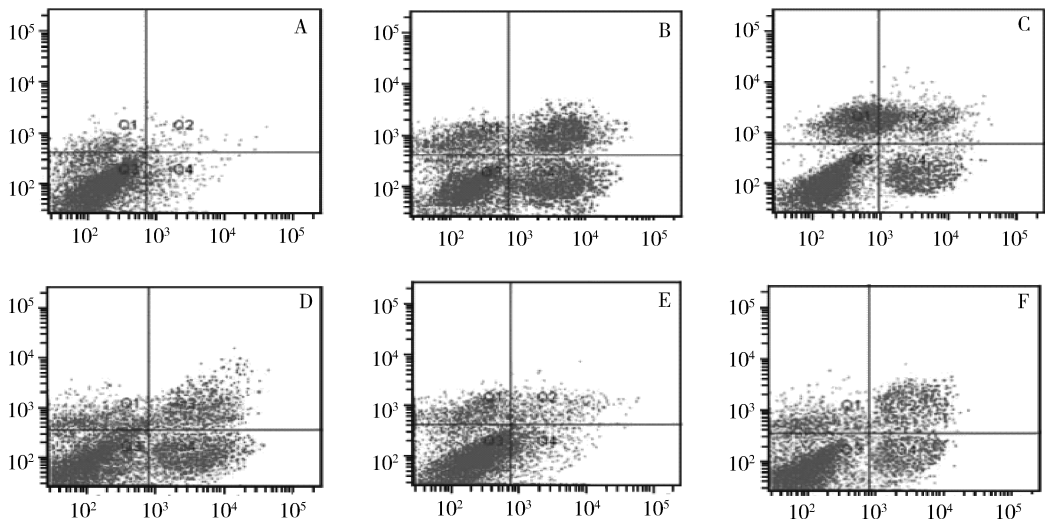


图 3 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞凋亡的影响

A. 空白对照组; B. 缺氧/复氧模型对照组; C. 地黄多糖 10 $\mu\text{g/ml}$ 干预组; D. 地黄多糖 20 $\mu\text{g/ml}$ 干预组;
E. 地黄多糖 40 $\mu\text{g/ml}$ 干预组; F. 舒血宁注射液 100 $\mu\text{g/ml}$ 干预组

表 4 地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	凋亡率 (%)
空白对照组	-	4.3 ± 0.6
缺氧/复氧模型对照组	-	$52.1 \pm 6.4^*$
地黄多糖干预组	10	37.5 ± 5.9
	20	$22.1 \pm 4.6^\#$
	40	$18.7 \pm 4.3^{##}$
舒血宁注射液干预组	100	$23.5 \pm 3.8^\#$

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与缺氧/复氧模型组比较, $^\#P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$

讨 论

急性心肌梗死是目前导致人类死亡的主要疾病之一,目前临床上主要是采用溶栓、介入手术等手段及时恢复血流再灌注,但往往导致心肌组织损伤加重,即“再灌注损伤”。其病理机制仍不明确,但随着研究的深入,发现再灌注后氧自由基大量生成和过剩而诱发氧化应激损伤以及诱发的继发性细胞凋亡在心肌细胞缺血再灌注损伤发病过程中发挥着重

要的作用^[7,8]。地黄多糖 (rehmannia glutinosa polysaccharide, RPS) 是我国传统中药地黄的主要活性成分之一,具有抗氧化、降血糖、提高免疫力等多种药理学作用。本实验通过分离培养并建立缺氧/复氧乳鼠心肌细胞模型进行研究发现,缺氧复氧模型对照组细胞呈现伪足减少,大量细胞脱落、悬浮,搏动减弱、频率降低、节律不齐等病理性变化,且细胞凋亡率显著升高,而经地黄多糖干预 6h 能够有效改善缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞形态、提高细胞存活率并抑制其凋亡率,其中 20、40 $\mu\text{g/ml}$ 干预组较模型对照组具有显著性差异,该研究结果与李澎等^[3]和张爽等^[4]的研究报道结果基本一致,提示地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞具有保护作用。

Lartigue 等^[9]和 Jin 等^[10]研究发现,正常生理状态下,体内生成的氧自由基在超氧化物歧化酶(SOD)能够催化还原氧自由基生成过氧化氢,并且在GSH - Px 和 CAT 催化作用下能够进一步还原生成对人体无害的水和氧;所以,SOD、GSH - Px 和 CAT 共同构成

了机体抗氧化酶防御系统,它们的活性能够反映机体抗氧化能力水平;此外 Laumbach 等^[11]研究发现,细胞膜极易受氧自由基的攻击发生脂质过氧化而最终生成丙二醛(MDA),所以血清中 MDA 的含量能够间接反映心肌细胞损伤程度。血清中心肌酶(AST、CPK、LDH)含量水平是临床上诊断心肌细胞损伤的常用指标,正常状态下,血清中心肌酶含量非常低,而当心肌细胞膜受氧自由基攻击而受损后,将导致心肌酶释放入血,而导致血清中 AST、CPK、LDH 含量陡然增高,所以三者血清中的含量能够敏感地反映心肌细胞受损程度^[12]。本实验研究发现,地黄多糖 20、40 $\mu\text{g/ml}$ 干预 6h 能够显著提高缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞中抗氧化酶(SOD、GSH - Px、CAT)活性、降低细胞培养液中 MDA 含量,显著降低细胞培养液中 AST、CPK 含量,且 40 $\mu\text{g/ml}$ 干预组培养液中 LDH 含量显著降低,提示地黄多糖能够有效提高缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞自由基清除能力,降低缺氧/复氧乳鼠心肌细胞损伤。

综上所述,地黄多糖对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞具有保护作用,作用机制可能与其能够有效改善抗氧化酶活性、抑制氧化应激损伤进而降低细胞凋亡率有关。

参考文献

- 1 赵国平,戴慎,陈仁寿,等. 中药大辞典[M]. 2 版(上册). 上海:上海科学技术出版社,2006: 56
- 2 张玉琴,徐伟,李煌,等. 龙须藤研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012,8(8): 207-209
- 3 李澎,王建农,卢树杰,等. 山楂叶原花青素对乳鼠心肌细胞缺

- 血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2009,34(1): 96-99
- 4 张爽,李红,杨世杰. 蒺藜皂苷单体 B 对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2010,26(2): 208-212
- 5 朱敏丰. 地黄多糖对局灶性脑缺血小鼠线粒体过氧化损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2015,31(2): 40-43
- 6 李澎,王建农,卢树杰,等. 山楂叶原花青素对乳鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2009,34(1): 96-99
- 7 Zhao YJ, Wang YL, Du LJ, *et al.* Effect of spermine preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury and cardiomyocyte apoptosis in isolated perfused rat heart[J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28(8): 1135-1140
- 8 刘艳霞,顾云,辛毅,等. 大鼠急性心肌缺血再灌注损伤诱导细胞凋亡的实验研究[J]. 心肺血管病杂志, 2009,28(3): 191-194
- 9 Lartigue A, Burlat B, Coutard B, *et al.* The megavirus chilensis Cu, Zn - superoxide dismutase: the first viral structure of a typical CCS - independent hyperstable dimeric enzyme[J]. J Virol, 2014,2588(14): 254-261
- 10 Jin Y, Liu K, Peng J, *et al.* Rhizoma dioscoreae nipponicae polysaccharides protect HUVECs from H2O2 - induced injury by regulating PPAR γ factor and the NADPH oxidase/ROS - NF - κ B signal pathway[J]. Toxicol Lett, 2014,232(1): 149-158
- 11 Laumbach RJ, Kipen HM, Ko S, *et al.* A controlled trial of acute effects of human exposure to traffic particles on pulmonary oxidative stress and heart rate variability[J]. Part Fibre Toxicol, 2014,11(1): 45-51
- 12 文朝. 心肌坏死标志物联合检测在急性心肌梗死早期诊断及鉴别中的意义[J]. 中国实验诊断学, 2013,17(11): 2013-2015

(收稿日期:2015-09-08)

(修回日期:2015-10-11)

AMI 患者心率减速能力的变化及短期预后的影响研究

安永平

摘要 **目的** 研究分析急性心肌梗死(AMI)患者的心率减速力(DC)与连续心率减速力(DRs)指标对于其短期预后的影响作用。**方法** 选取四川大学华西医院心血管内科收治的确诊 AMI 患者 180 例(AMI 组)和体检健康研究对象 100 例(健康组),对两组进行 24h 动态心电图监测,比较分析两组的 DC、DRs 值差异,并观察不同 DC、DRs 危险分层的 AMI 患者 6 个月内出现不良心血管事件的发生率差异。**结果** AMI 组患者的 DC、DR2、DR4、DR8 的测定值均显著的小于健康组且差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。AMI 组患者的中高风险比例(45.00%)显著的高于健康组的(11.00%)且差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。AMI 组低风险患者的左心室舒张末期内径(LVEDD)显著的低于中、高风险 AMI 患者($P < 0.05$),低风险患者的左心室射血分数(LVEF%)显著的高于中、高风险患者($P < 0.05$)。高风险的 AMI 患者的心源性病死率(18.18%)、严重心力衰竭发生率(36.36%)、心律失常率(40.91%)、再发心绞痛/心肌梗死率(50.00%)均显著的高于中、低风险的 AMI 患者($P < 0.05$)。**结论**