

氧应激对豚鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响及益心康胶囊含药血清保护作用的研究

韩 玲¹ 陈可冀²

内容提要 目的 观察氧应激对豚鼠心肌细胞线粒体的影响,探讨抗心肌缺血中药复方——益心康胶囊(H303)含药血清对氧应激损伤的保护作用机制。方法 利用激光共聚焦显微镜,观察羟自由基损伤体系($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)与豚鼠心肌细胞共同孵育 30~60min 后对心肌细胞线粒体膜电位的影响。结果 豚鼠心肌细胞氧应激后,可致线粒体细胞色素氧化酶活性降低,以及荧光染料 Rh123 所显示的线粒体膜电位明显降低。H303 含药血清可明显减轻上述损伤,表现为明显增强豚鼠心肌细胞线粒体氧化酶活性,使心肌细胞存活率增加,并具有保护心肌细胞膜电位的作用。结论 氧应激可造成心肌线粒体膜电位降低。益心康胶囊含药血清可保护线粒体膜电位,从而发挥其膜稳定作用。

关键词 氧应激 益心康胶囊 含药血清 豚鼠心肌细胞 线粒体膜电位

Protective Effect of Yixinkang Capsule Containing Serum on Oxygen Stress Damaged Mitochondrial Membrane Potential in Guinea-pig Myocytes HAN Ling, CHEN Ke-ji *Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing (100850)*

Objective: To explore the protective effect and mechanism of Yixinkang (H303) capsule, a composite preparation of Chinese herbal medicine for antagonizing myocardial ischemia, containing serum on oxygen stress damaged mitochondrial membrane potential (MMP) in guinea-pig myocytes. **Methods:** Myocyte damage was induced by incubating myocytes with hydroxy free radical ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) generating system for 30–60 mins, then H303-containing serum was added in to observe the protective effect. MMP was detected by laser scanning confocal microscopy. **Results:** After oxygen stress, the cytochrome oxidase (CCO) activity and MMP in mitochondria significantly decreased. These changes could be significantly lessened by H303-containing serum, demonstrated as obviously increase of CCO activity and myocyte survival rate. H303-containing serum also showed a significant protective effect on membrane potential of myocytes. **Conclusion:** Oxygen stress could cause decrease of MMP in myocytes and H303-containing serum could protect it to maintain the membrane stability of mitochondria.

Key words oxygen stress, Yinxinkang capsule, drug-containing serum, myocyte of guinea-pig, mitochondrial membrane potential

能量代谢障碍是心肌缺血后心肌组织所发生的特征性改变之一。心肌细胞中富含线粒体,它是能量代谢的主要场所。其中,线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)是细胞能量产生的先决条件。心肌细胞损伤的早期往往出现 MMP 的改变。本研究利用激光共聚焦显微镜(laser confocal scanning microscopy, LCSM)观察了羟自由基生成体系($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)对单个豚鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响,对

心肌细胞内 MMP 的改变进行了定性及半定量分析。并采用血清药理学的方法,从细胞及亚细胞水平研究探讨了具有抗心肌缺血及再灌注损伤作用的中药复方益心康胶囊及复方丹参片含药血清对该损伤体系的保护作用,以试图揭示其心肌保护作用的机理。

材料和方法

1 动物 豚鼠 20 只,雄性,体重(250 ± 30)g,由军事医学科学院动物中心提供。

2 药物 益心康胶囊(简称 H303,由丹参、黄芪、川芎等组成)由上海药物研究所制药厂生产,批号 9506303,制剂为棕色粉末状物 0.4g/粒。实验时用水

1. 军事医学科学院放射医学研究所(北京 100850);2. 中国中医研究院西苑医院

溶解配成 50mg/ml 浓度。复方丹参片(简称 FD),广州制药总厂中药厂生产,批号 950905,去除糖衣,制成粉末,实验时用水溶解,配成 50mg/ml 浓度。

3 试剂 罗丹明 123(Rhodamine, Rh123),牛磺酸(taurine),多聚赖氨酸(polylysine),噻唑蓝(MTT)等均为 Sigma 产品(美国);胶原酶 I 型(Collagenase I)为 Merck 产品,其余试剂均为国产分析纯。

4 仪器 RS-232C 型酶标仪(芬兰),Bio-Rad MRC-1024 型激光共聚焦显微镜(美国),Philips 400 型透射电镜(荷兰 Philips)。

5 含药血清的制备 H303 和 FD 分别为 50、100、200、400、800mg/kg 给大鼠灌胃,灌胃后 60min 股动脉取血,4℃ 冰箱过夜,2000r/min 离心,留血清,56℃ 灭活补体,即为含药血清,-20℃ 保存备用。分别表示为:H50,H100,H200,H400,H800 和 FD50,FD100,FD200,FD400,FD800 剂量组。同时设立对照血清组(灌胃相同体积的水),同样方法取血分离血清,置 4℃ 冰箱或-20℃ 保存备用^[1,2]。

6 豚鼠心肌细胞分离制备 参考刘恭鑫方法^[3]。

7 分组及氧应激损伤豚鼠心肌细胞模型 将分离的心肌细胞 70μl(含心肌细胞 5×10^5)中分别加入不同血清 10μl,正常血清对照组(正常组)和损伤对照组加对照血清,药物保护组加入含药血清,10min 后,应用 $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤体系,将 10μl FeSO_4 (终浓度 0.2mmol/L),10μl 不同浓度的 H_2O_2 (终浓度分别为 0.005,0.05,0.5,5,10,25,50mmol/L)加入上述各组,室温下放置 30~60min,用 MTT 法测定对心肌细胞存活率的影响。

8 指标测定

8.1 细胞存活率的测定 参考郑永唐等的方法^[4]。10μl MTT 磷酸缓冲液(含 MTT 5.0mg/ml)加入正常或羟自由基损伤后的 100μl 心肌细胞(4×10^5 /孔)中,培养 2.5h 后加入 DMSO 90μl 振荡。待生成的深蓝色结晶溶解后,在酶标仪上读取光密度值。

8.2 激光共聚焦显微镜测定单个豚鼠心肌细胞线粒体膜电位 方法参考文献^[5]。急性分离的豚鼠心肌细胞悬液 200μl(5×10^5),加一定浓度的含药血清,孵育 10min 后,加损伤因素损伤 60min。弃去培养液,换无血清的 KB 液,加入终浓度 5μg/ml 的 Rh123,进行荧光负载。40min 后,洗去胞浆负载,加入台式液,上机检测。另外,向正常心肌细胞内加损伤因素,动态观察心肌细胞 MMP 的变化。

9 统计学方法 实验数据统计采用美国 Sigma plot 程序进行 χ^2 检验。

结 果

1 氧应激对豚鼠心肌细胞存活率的影响及 H303 的作用 见表 1、2。 Fe^{2+} 浓度相同(0.2mmol/L), H_2O_2 不同浓度下(0.005~50mmol/L),可使豚鼠心肌细胞存活率明显降低,具有显著的剂量依赖性。随着 H_2O_2 浓度的增加,心肌细胞存活率逐渐降低,此外,分别观察了 30min 及 60min 两个时间点的心肌细胞存活率的变化情况,结果表明也具有一定的时效性。

选择 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (0.2mmol/L/5mmol/L)损伤体系,评价 H303 含药血清对心肌细胞的保护作用(见表 2)。结果表明,向豚鼠心肌细胞中加入大鼠血清后,可使因 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤所致的心肌细胞存活率的降低更为明显。与正常组比较,H303 除 200mg/kg 含药血清组外,其他各给药组对心肌细胞均具有明显的保护作用,可使存活率明显升高($P < 0.05$)。FD 50~800mg/kg 5 个剂量组中,100 和 200mg/kg 组对 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 所致的豚鼠心肌细胞的损伤具有明显的保护作用($P < 0.05$),可使存活率较对照组显著升高,50、400、800mg/kg 组反而有使心肌细胞存活率降低的趋势。

2 氧应激对豚鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响及 H303 的作用

表 1 氧应激对豚鼠心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mmol/L)	n	细胞存活率 (%)
正 常	—	8	1.129 ± 0.089
$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$	0.2/0.005	8	0.922 ± 0.093 *
	0.2/0.05	8	0.866 ± 0.046 **
	0.2/0.5	8	0.633 ± 0.075 **
	0.2/5	8	0.447 ± 0.073 **
	0.2/10	8	0.262 ± 0.138 **
	0.2/25	8	0.218 ± 0.031 **
	0.2/50	8	0.196 ± 0.026 **

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 H303 含药血清对氧应激豚鼠心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	n	细胞存活率 (%)
正 常	—	8	0.573 ± 0.072
$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$	0.2/5mmol/L	8	0.178 ± 0.033 **
	H303 保护	8	0.220 ± 0.033 *△
	50	8	0.228 ± 0.043 *△
	100	8	0.214 ± 0.038 **
	200	8	0.216 ± 0.021 **△
FD 保护	400	8	0.223 ± 0.029 **△
	800	8	0.172 ± 0.039 **
	50	8	0.226 ± 0.041 *△
	100	8	0.232 ± 0.034 *△
	200	8	0.190 ± 0.025 **
	400	8	0.191 ± 0.039 **
	800	8	0.191 ± 0.039 **

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 组比较,△ $P < 0.05$

2.1 羟自由基体系对豚鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响 见图 1。正常豚鼠心肌细胞呈典型的杆状 ,Rh123 荧光强度均匀。 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 为 $0.2\text{mmol/L}/0.005\text{mmol/L}$ 作用心肌细胞 60min 后 ,线粒体膜电位荧光强度开始有所降低 ,随 H_2O_2 浓度的增加 ,膜电位荧光强度明显降低 , H_2O_2 为 50mmol/L 时 ,荧光强度更加显著降低 ,荧光染色的心肌细胞数量大量减少(图略)。此外 ,还观察了 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤的时间—效应关系 ,发现心肌细胞损伤 30min 比损伤 60min 的线粒体膜电位的降低明显减轻。 H_2O_2 0.05mmol/L 浓度下损伤 30min ,膜电位基本无明显改变 , 0.5mmol/L 时才开始降低 , 5mmol/L 时明显降低。由此可见 ,羟自由基体系对豚鼠心肌细胞线粒体膜电位损伤具有明显的浓度依赖性和时间依赖性。

2.2 羟自由基体系对豚鼠心肌细胞膜电位影响的动态变化规律 大剂量的 H_2O_2 (25mmol/L 和 50mmol/L) 在所观察的时间内使线粒体膜电位发生明显的动态变化 ,即加入损伤因素后膜电位很快出现明显的降低 ,并随时间的延长荧光强度逐渐减弱(图略)。

2.3 H303 及 FD 对羟自由基损伤豚鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响 见图 2。正常豚鼠心肌细胞线

粒体膜电位较高 ,心肌细胞数量也较多 ,而 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤心肌细胞 60min 后 ,心肌细胞数量显著减少 ,膜电位明显降低。说明正常组的心肌细胞有明显损伤。H303 50、100、200mg/kg 含药血清对豚鼠心肌细胞具有明显的保护作用 ,表现为 (1) Rh123 染色的心肌细胞数明显多于正常组 (2) 线粒体膜电位水平也明显高于正常组。其中以 100mg/kg 含药血清组效果最好 ,50mg/kg 组染色细胞数有一定的减少 ,200mg/kg 组的心肌细胞有明显收缩现象。FD 50mg/kg 组的结果与 H303 同剂量组基本相同。

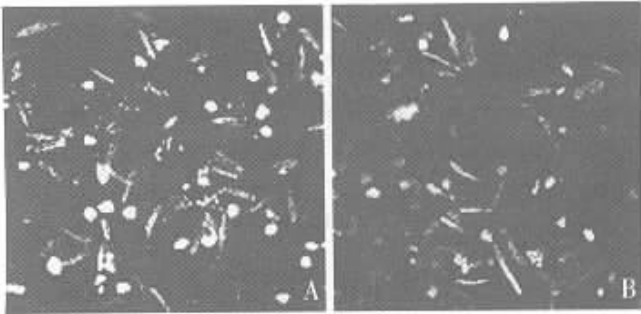


图 1 A :正常心肌细胞 ,荧光强度较强、荧光分布均匀 ;B : $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ($0.2\text{mmol/L}/0.005\text{mmol/L}$) 损伤 60min 后细胞荧光强度减弱 ,分布不均匀

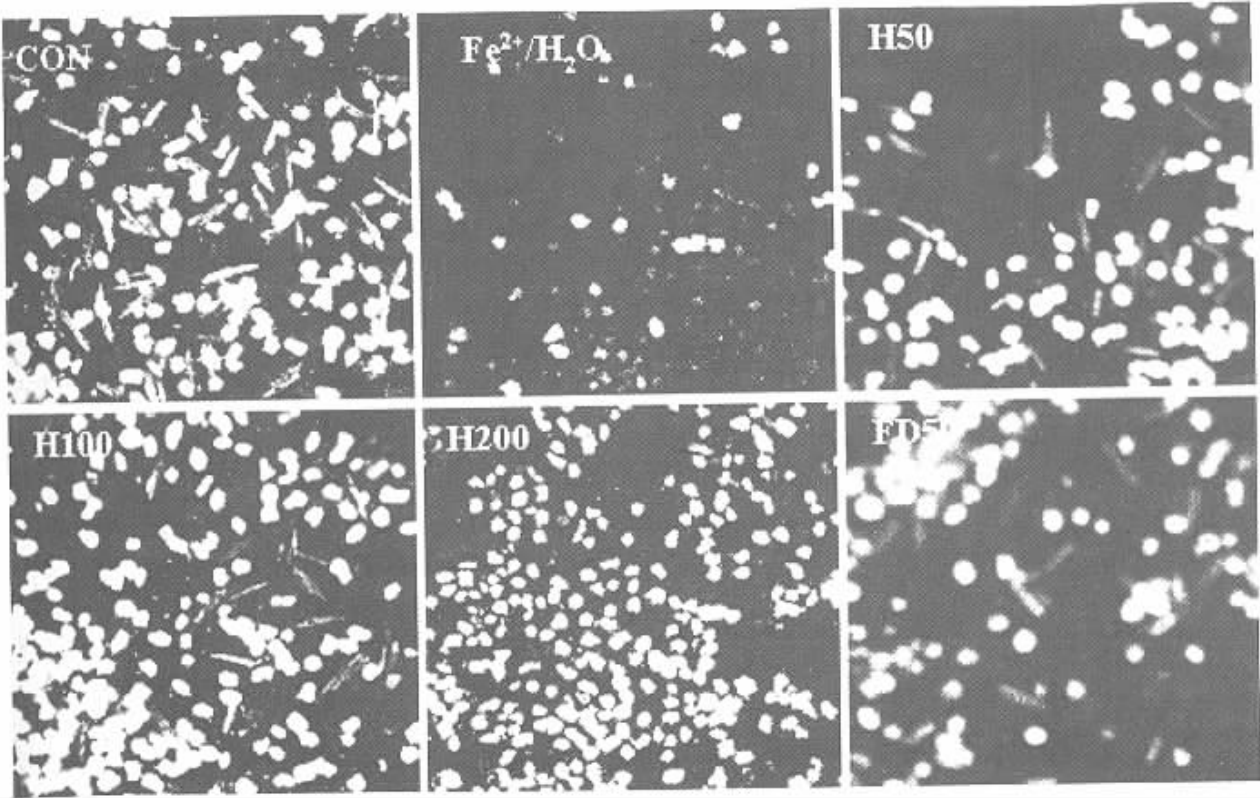


图 2 CON 为正常对照血清心肌细胞 , $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 为 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 损伤心肌细胞 60min 后 ,心肌细胞数量减少 ,膜电位降低 ,H50、H100 及 H200 组及 FD50 组心肌细胞数明显多于 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 组 ,膜电位也高于 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 组

讨 论

中药血清药理学方法是目前中药学体外研究的较好的方法。目前国内已越来越多地应用此方法开展体外药理学研究⁽⁶⁻⁸⁾。该方法解决了体外实验中方法学的难题,其应用使我们从细胞、亚细胞乃至分子水平对中药复方的研究成为可能。

本实验选用了能产生典型的 Fenton 反应及能引起显著脂质过氧化反应的 $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ 体系,作为体外攻击线粒体、产生氧化应激的体系,观察对心肌细胞线粒体 MMP 等的影响。结果发现,该体系引起的心肌细胞线粒体氧化应激损伤,具有明显的浓度依赖性和时间依赖性,即随着 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 浓度的增加,作用时间的延长,线粒体膜的损伤程度加重,并可引起一系列的病理改变。氧化应激早期,心肌细胞线粒体 MMP 即可发生显著变化,这对研究药物抗氧化应激损伤提供了一个良好的模型。

具有抗心肌缺血及再灌注损伤作用的中药复方——H303 含药血清与大鼠心肌线粒体共同孵育,能不同程度地保护线粒体免遭脂质过氧化或羟自由基的直接损伤,对所观察的各指标有不同程度的改善,H303 是通过如下途径发挥其抗氧化损伤作用的。

1 改善心肌细胞存活 MTT 方法可检测细胞线粒体将 MTT 还原成甲 的能力。MTT 主要被电子传递过程中的细胞色素氧化酶和线粒体的泛醌还原,它可反映电子传递的完整性,是一个细胞死亡的间接早期指标。本实验表明,豚鼠急性分离的心肌细胞经不同浓度的 H_2O_2 和 Fe^{2+} 作用一定时间,随着作用时间的延长及 H_2O_2 浓度的增加,MTT 被还原的量明显减少,表明羟自由基诱导细胞死亡具有时间依赖性和浓度依赖性关系。H303 含药血清可通过清除自由基,抗脂质过氧化作用,保护线粒体呼吸链的酶功能,从而使得 MTT 还原能力维持或增强,即保持了心肌细胞的存活率。

2 保护线粒体膜电位 MMP 是指膜两侧离子浓度不同产生的跨膜电位差,而离子浓度的差别又源于多种离子渗透脂质双层膜的扩散性的不同。Rh123 是一种可渗透到细胞内、带阳离子、相对无毒的电位敏感性荧光染料,在线粒体膜内、外可形成与膜电位相关的重新分布。细胞内的线粒体可被 Rh123 染成绿色,通过激光共聚焦显微镜可测定线粒体膜电位的变化⁽⁹⁾。

我们利用 LCSM 直接从亚细胞水平观察活细胞

线粒体的分布及其膜电位的高低。通过 LCSM 观察发现,羟自由基能明显降低豚鼠心肌细胞 MMP。大剂量 H_2O_2 可引起 MMP 显著的动态性进行性降低,即发生了 MMP 的崩溃。意味着氧化应激造成了线粒体膜结构的改变,引起了通透性的增加,即可能出现了线粒体通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)道的开放,发生了线粒体通透性转换,使线粒体基质内的离子、小分子及某些蛋白释放,内膜两侧离子梯度消失,因此导致膜电位的下降甚至崩溃。

选用能引起膜电位降低的 H_2O_2 观察 H303 含药血清对 MMP 的保护作用,显示:H303 能拮抗羟自由基所致的 MMP 下降,并明显增加心肌细胞存活率。因此推测可能是通过抗自由基损伤及保护内源性抗氧化物作用,而保护了线粒体膜结构及膜蛋白酶,而使得线粒体膜电位得以维持,即作用于损伤引起的病理改变的早期,防止了其更为严重的病理现象如细胞凋亡或死亡的发生。H303 的这一特点,使得药物的防治能针对疾病的起始环节,可能产生较好的疗效,因此具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- 李仪奎,吴健宇.中药的血清药理研究方法.见:苏定冯主编.药理学进展.北京:科学出版社,1998:257—262.
- 周明眉,杨奎,姜远平等.中药血清药理学的方法学研究 IV——采血时间的确定及时效关系研究.中药药理与临床 1998;14(增):110.
- 刘恭鑫,顾全堡,顾棋,等.大鼠、豚鼠心肌细胞的简单、快速分离.中国应用生理学杂志 1997;13(4):361—362.
- 郑永唐,袁昆龙.测定细胞存活核增殖的 MTT 方法的建立.免疫学杂志 1992;8:266—269.
- Scaduto RC, Grotjohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. Biophys J 1999;197(1 pt 1):469—477.
- 崔晓兰,贺玉琢,高英杰,等.中药药理研究的新思路——中药血清药理学.中国中医药科技 1997;4(4):239—240.
- 杨奎,周明眉,姜远平等.中药血清药理学的方法学研究 I——含药血清药理作用强度与体内给药量效关系研究.中药药理与临床 1998;14(增):108.
- 周明眉,杨奎,姜远平等.中药血清药理学的方法学研究——反应体系中含药血清加入量的研究.中药药理与临床 1998;14(6):44—46.
- 李楠主编.激光扫描共聚焦显微术.北京:人民军医出版社,1997:79—85.

(收稿 2000-09-13 修回 2001-03-02)