

# 补阳还五汤抗缺氧再给氧乳鼠心肌细胞 凋亡的实验研究<sup>\*</sup>

佟 丽 沈剑刚 邱幸生 曲宏达 陈育尧

**内容提要** 目的 观察含补阳还五汤的大鼠血清对缺氧 24h 再给氧 4h 后新生乳鼠心肌细胞凋亡的抑制作用及对一氧化氮(NO)含量的影响。方法 采用 Annexin V-PI 双标记方法(以流式细胞仪和 ELISA 法)检测细胞凋亡,以紫外分光光度法测定心肌细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放水平,采用改良 Yu 方法测定 NO 浓度,用 Ohkawa 法测定硫代巴比妥酸(TBARS)反应物质含量。结果 补阳还五汤药物血清能显著抑制心肌细胞的凋亡及 LDH 释放,降低培养细胞上清液中 NO 和 TBARS 水平,其效应呈剂量依赖关系。结论 补阳还五汤具有抗缺氧再给氧心肌细胞凋亡作用,其机制与清除氧自由基和 NO 特性有关。

**关键词** 补阳还五汤 缺氧再给氧损伤 细胞凋亡 一氧化氮

**Study on Preventive Effect of Buyang Huanwu Decoction on Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Hypoxia-Re-oxygenation in Rats** TONG Li, SHEN Jian-gang, QIU Xing-sheng, et al *Department of Traditional Chinese Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou (510515)*

**Objective:** To observe the preventive effect of rats' serum containing Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) on cultured cardiomyocyte apoptosis of neonatal rat induced by means of 24 hrs hypoxia and 4 hrs reoxygenation, and to investigate its mechanism concerned with nitric oxide(NO). **Methods:** Myocyte apoptosis was detected by flow cytometry and ELISA with Annexin V-PI double labeled method. The lactate dehydrogenase (LDH) releasing level was measured with ultraviolet spectrophotometer. The NO concentration was determined by modified Yu method and the concentration of thiobarbituric acid response substance(TBARS) was tested by Ohkawa method. **Results:** BYHWD contained rats' serum could significantly prevent cardiomyocyte from apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation. After hypoxia-reoxygenation, the NO, LDH and TBARS levels in the supernatant of cultured liquid treated with BYHWD were significantly lower than those in non-treated cultured liquid, the effect of BYHWD was dose-dependent. **Conclusion:** BYHWD can prevent cardiomyocytes from apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation, its mechanism might be related with oxygen free radical and NO scavenging produced during the hypoxia-reoxygenation process.

**Key words** Buyang Huanwu Decoction, hypoxia-reoxygenation injury, cell apoptosis, nitric oxide

临床研究表明补阳还五汤对脑血栓、脑动脉硬化、冠心病等有确切疗效<sup>[1,2]</sup>。我们先前的研究工作发现,补阳还五汤能抑制体外培养的大鼠皮层神经元的凋亡,减少神经元缺氧过程中一氧化氮(nitric oxide, NO)氧自由基(oxygen free radicals, OFR)的生成,上调 bcl-2 的表达<sup>[3]</sup>。本研究对补阳还五汤抗缺氧再给氧所致心肌细胞凋亡及其机制进行了探讨。

## 材料与方法

1 药物与试剂 补阳还五汤(简称中药)由黄芪 120g 当归 6g 地龙 3g 赤芍 6g 川芎 3g 桃仁 3g 红花 3g 等组成,常规煎药,浓缩至每毫升含生药 2g,药材购自广东省药材公司。DMEM 培养液为 GIBCO 产品,胎牛血清为以色列 Kibbutz Beit Haemek 公司产品,HEPES 为 Farco 产品;蛋白酶 K 为 Merk 产品;Annexin V-Fluor(Boehringer Mannheim)碘化丙啉(PI)NADPH、FAD、硝酸盐还原酶、N-奈乙胺、硫代巴比妥酸、四乙氧基丙烷、磺胺、阿糖胞苷和溴化乙啶均为 Sigma 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金项目(No. 39970900)广东省中医药管理局基金项目(No. 100006) 万方数据  
第一军医大学中医系(广州 510515)

2 含药血清制备 采用血清药理学实验方法制备含药血清和空白对照血清<sup>[4]</sup>。补阳还五汤按临床给药剂量与大鼠(雄性 Wistar 大鼠,体重 280~300g,由第一军医大学实验动物中心提供)体表面积换算成中药低剂量组(13g/kg),以此剂量的 2 倍为中药中剂量组(26g/kg)4 倍为中药大剂量组(52g/kg);大鼠分组后,按给药剂量灌胃 7 天,正常组灌胃同体积自来水,末次给药后 4h,腹主动脉取血,分离血清,再用 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤,56℃ 灭活 30min,分装,置 -20℃ 低温冰箱保存备用。

3 缺氧再给氧心肌细胞模型 参照 Tanaka 方法<sup>[5]</sup>取新生 Wistar 大鼠(1~3 日龄,第一军医大学实验动物中心提供),75% 乙醇浸泡消毒,再以 75% 乙醇皮肤消毒,打开腹腔,取心室肌肉组织,0.06% 胰蛋白酶消化,离心,细胞接种于含 10% 胎牛血清和阿糖胞苷的高糖 DMEM 培养液中(5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub>)培养 48h,然后以含 5% 胎牛血清不含酚红的低糖 DMEM 培养基培养 24h 后,将细胞置于 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 环境中培养 24h,造成缺氧模型,然后变换培养条件(5% CO<sub>2</sub>、95% O<sub>2</sub> 环境中)再给氧 4h,造成缺氧再给氧心肌细胞损伤模型。单纯缺氧模型为心肌细胞置于 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 环境中培养 24h,但不予以再给氧。

4 实验分组 1 组为正常对照组;2 组为单纯缺氧模型组;3 组为缺氧再给氧模型组,以上 3 组均加 5% 空白对照血清;4 组为缺氧再给氧加补阳还五汤大剂量组;加 5% 大剂量含药血清;5 组为缺氧再给氧加补阳还五汤中剂量组;加 5% 中剂量含药血清;6 组为缺氧再给氧加补阳还五汤小剂量组;加 5% 小剂量含药血清。空白血清及含药血清均在造模前加入培养液中,剂量为每个样本体积的 5%。

5 细胞凋亡的测定 用 ELISA 法,以 Boehringer Mannheim 公司细胞凋亡 ELISA 试剂盒检测细胞核 DNA 断裂形成的单核小体和多核小体,操作方法参照试剂盒说明书;以 Bio-Rad 450 酶标仪于 405nm 波长处测定样品光密度值,计算凋亡细胞富集因子(enrichment factor,EF)。

6 细胞凋亡 Annexin V-PI 双标记流式细胞仪检测 参照文献<sup>[6]</sup>的方法。细胞加入含 Annexin V-Flores 和 PI 的孵育缓冲液于 4℃ 孵育 20min,分别于 488nm 波长处和 560nm 波长处检测 Annexin V 和 PI 标记的细胞,以不含 Annexin V 和 PI 的孵育缓冲液作阴性对照,检测凋亡细胞百分率(%)。

7 LDH 测定 采用中国科学院中生物生物工程公司 LDH 试剂盒,以 Beckman DU-604 型紫外分光光度

计测定。

8 NO 测定 采用改良 Yu 方法<sup>[7]</sup>200 $\mu$ l 培养上清与 90mU/ml 硝酸盐还原酶、0.28mmol/L NADPH、35mmol/L FAD 各 100 $\mu$ l,0.1mol/L pH7.5 的磷酸盐缓冲液 200 $\mu$ l 于 25℃ 共同孵育 1h,煮沸 3min,加入等体积的 Griess 试剂(2% N-奈乙胺、0.2% 磺胺,1:1 混合),于 60℃ 孵育 10min,以 Bio-Rad 450 型酶标仪 550nm 波长处测定其吸收值,以硝酸钠(0~20nmol/L)为标准品,NO 单位以  $\mu$ mol/L 表示。

9 培养上清中硫代巴比妥酸反应物质(TBARS)含量测定 参照 Ohkawa 法<sup>[8]</sup>,用 Beckman DU-640 型紫外分光光度计于 532nm 处测定其吸收值,以四乙氧基丙烷(10nmol/ml)为标准品,培养上清中 TBARS 单位以  $\mu$ mol/L 表示。

10 统计学方法 实验数据以 SPSS 8.0 统计软件包进行单因素方差分析和 LDS 法。

## 结 果

1 补阳还五汤对心肌细胞凋亡的抑制作用 见表 1。单纯缺氧(2 组)24h 后,单核小体和多核小体 EF 值和心肌细胞凋亡率增加( $P<0.05$ ),再给氧 4h(3 组)后,单核小体和多核小体 EF 值和心肌细胞凋亡率进一步增加(与 2 组比较, $P<0.05$ ),说明缺氧再给氧可诱导心肌细胞凋亡。加入含补阳还五汤各剂量血清后,单核小体和多核小体 EF 值和心肌细胞凋亡率均下降(与 3 组比较, $P<0.05$ ),且随着药物剂量的增加,抑制作用增强,凋亡细胞数减少,说明 EF 值和心肌细胞凋亡的抑制作用与含药血清中补阳还五汤的剂量有关。

2 补阳还五汤对 LDH 释放的抑制作用 见表 2。缺氧再给氧后(3 组),培养心肌细胞上清中 LDH 水平显著升高(与 2 组比较, $P<0.05$ )。补阳还五汤血清各剂量组 LDH 水平下降,其中补阳还五汤大、中、小剂量与 3 组比较差异有显著性( $P<0.05$ ),提示补阳还五汤具有保护缺氧再给氧所造成的心肌组织损伤的作用。

3 补阳还五汤对 NO 和 TBARS 的抑制作用 见表 2。缺氧 24h(2 组),培养心肌细胞上清中 NO、TBARS 水平比 1 组升高( $P<0.05$ ),再给氧 4h 后(3 组),NO 水平显著低于 2 组( $P<0.05$ ),而 TBARS 水平显著高于 2 组( $P<0.05$ )。补阳还五汤血清各剂量组 NO 和 TBARS 水平均下降(与 3 组比较, $P<0.05$ ),并与剂量有关,提示补阳还五汤能清除 NO 和 OFR、抑制脂质过氧化损伤。

表 1 补阳还五汤对缺氧再给氧心肌细胞凋亡的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	EF (OD 值)	凋亡细胞	坏死细胞
			(%)	(%)
1	5	1	2.80±0.07	2.45±0.12
2	5	2.48±0.28*	13.40±2.79*	6.88±0.78*
3	5	3.40±0.28 <sup>△</sup>	17.35±1.05 <sup>△</sup>	25.40±7.25 <sup>△</sup>
4	5	2.62±0.22 <sup>▲</sup>	13.68±1.54 <sup>▲</sup>	11.33±1.45 <sup>▲</sup>
5	5	2.14±0.18 <sup>▲</sup>	8.82±0.55 <sup>▲</sup>	7.68±1.05 <sup>▲</sup>
6	5	1.88±0.15 <sup>▲</sup>	6.79±0.95 <sup>▲</sup>	6.44±0.78 <sup>▲</sup>

注:与 1 组比较,\* $P<0.05$ ;与 2 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与 3 组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$

表 2 补阳还五汤对缺氧再给氧心肌细胞 LDH 释放、NO 和 TBARS 的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	LDH	NO	TBARS
		(u/ml)	( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{mol/L}$ )
1	5	2.60±0.31	2.47±0.09	4.10±0.21
2	5	7.82±0.47*	14.20±0.78*	5.33±0.43*
3	5	12.77±0.56 <sup>△</sup>	12.32±0.27 <sup>△</sup>	7.41±0.42 <sup>△</sup>
4	5	9.56±0.33 <sup>▲</sup>	10.44±0.72 <sup>▲</sup>	6.28±0.88 <sup>▲</sup>
5	5	7.22±0.58 <sup>▲</sup>	8.48±0.72 <sup>▲</sup>	5.44±0.47 <sup>▲</sup>
6	5	6.78±0.74 <sup>▲</sup>	7.51±0.57 <sup>▲</sup>	5.23±0.66 <sup>▲</sup>

注:与 1 组比较,\* $P<0.05$ ;与 2 组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与 3 组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$

## 讨 论

缺氧再给氧可诱发心肌细胞凋亡和坏死,细胞凋亡发生时,是细胞启动自杀程序引起的细胞主动死亡,受基因调控,其特点是无炎症反应发生。而细胞坏死是在受到强烈病理刺激下发生的急速细胞死亡,细胞膜及细胞器膜破裂,溶酶体释放,可诱导炎症反应。本实验研究表明缺氧再给氧可诱发心肌细胞凋亡和坏死,比单纯缺氧所造成的损伤大,其凋亡细胞和坏死细胞数均高于前者。同时,由于坏死细胞的增加,释放出大量的 LDH,使培养液中 LDH 的浓度显著增高,补阳还五汤在抑制细胞凋亡的同时,也抑制了细胞的坏死,使 LDH 的释放减少,起到了保护心肌细胞的作用。

我们先前的研究证实 OFR 与 NO 在离体心肌缺血再灌注损伤中具有协同作用<sup>[9]</sup>。氧自由基与 NO 结合可生成过氧亚硝基(ONOO<sup>-</sup>),后者可分解成多种小分子细胞毒性物质损伤细胞<sup>[10]</sup>。有报道 ONOO<sup>-</sup>能直接损伤心肌细胞<sup>[11]</sup>。我们最近研究显示,OFr 和 NO 在心肌缺血再给氧所致细胞凋亡过程中起重要作用<sup>[12]</sup>。TBARS 是 OFR 所致脂质过氧化生成的产物,反映机体的氧化损伤程度。我们的实验结果表明在缺氧再给氧所致的细胞损伤时,NO 和 TBARS 水平显著增高,表明了心肌细胞在缺氧再给氧损伤时,NO 和

OFR 起到了重要的作用。补阳还五汤能减少损伤过程中 NO 和 OFR 的生成,提示补阳还五汤对心肌细胞的保护机制与清除 OFR、抑制脂质过氧化作用有关。补阳还五汤抑制细胞凋亡的基因调控机制有待于深入研究。

## 参 考 文 献

1. 张 玲. 补阳还五汤治疗老年病近况. 安徽中医学院学报 1997;16(5):63—64.
2. 王临江,王佩芳. 补阳还五汤临床及实验研究进展. 上海中医药杂志 1995;3:39—41.
3. 曲宏达,佟 丽,沈剑刚,等. 补阳还五汤对体外培养大鼠皮层神经元缺氧凋亡的影响. 第一军医大学学报 2002;22(1):35—38.
4. 孟 李,王宁生. 含药血清的制备方法. 中药新药与临床药理 1999;10(5):290—292.
5. Tanaka M, Ito H, Adachi S, et al. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Circ Res 1996;75(3):426—433.
6. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin. J Immunol Methods 1995;184(1):39—51.
7. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, et al. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:1691—1695.
8. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95(5):351—358.
9. Zhao BL, Shen JG, Fu ZG, et al. Synergic effects of NO and oxygen free radicals in the injury of ischemia-reperfused myocardium ESR studies on NO free radicals generated from ischemia-reperfused myocardium. Sinica China 1996;39(5):491—500.
10. Behar-Cohen FF, Heydolph S, Faure V, et al. Peroxynitrite cytotoxicity on retinal pigmented epithelial cells in culture. Biochem Biophys Res Commun 1996;222(3):842—849.
11. Ishida H, Ichimori K, Hirota Y, et al. Peroxynitrite induced cardiac myocyte injury. Free Rad Bio Med 1996;20(3):343—350.
12. Shen JG, Quo XS, Jiang B, et al. Chinonin, a core drug against cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation. Biochem Biophys Acta 2000;1500:217—226.

(收稿 2001-06-04 修回 2002-03-10)