

体外心肌细胞缺氧/复氧模型损伤及参元丹干预的影响

杨志海 佟 彤 刘红旭 尚菊菊 邢文龙 李 享

(首都医科大学附属北京中医医院心血管科, 北京, 100010)

摘要 目的:建立体外培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧模型,观察益气逐瘀组方参元丹(SYD)对模型心肌细胞存活率和细胞损伤程度的影响,以进一步探讨其改善冠心病围手术期心肌损伤的作用机制。方法:体外培养大鼠乳鼠原代心肌细胞,建立缺氧复氧细胞模型并予分组处理,CCK 法检测心肌细胞存活率,酶法检测各组细胞培养上清液中磷酸肌酸激酶(CPK)、乳酸脱氢酶(LDH)的含量。结果:模型组存活率低于正常组($P < 0.05$),而 CPK、LDH 释放量高于正常组($P < 0.05$);SYD 含药血清组、PDTC + SYD 组以及 PDTC + 空白血清组细胞存活率均高于模型组和空白血清组($P < 0.05$),细胞酶释放量均低于模型组和空白血清组($P < 0.05$),此 3 组间的数据比较,差异不具有统计学意义。结论:参元丹能够提高心肌细胞缺氧/复氧损伤模型的细胞存活率,降低细胞损伤程度;其机制可能通过抑制核因子 NF- κ B 及其介导的氧化应激和炎症反应降低细胞损伤;提示参元丹可能具有围手术期心肌损伤的保护作用。

关键词 冠心病;围手术期心肌损伤;体外细胞模型;参元丹;NF- κ B 通路

The Effect of Shen Yuan Dan on the Vitro Myocardial Model Cells with Hypoxia/reoxygenation Injury

Yang Zhihai, Tong Tong, Liu Hongxu, Shang Juju, Xing Wenlong, Li Ting

(Department of Cardiology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

Abstract Objective: Culturing the neonatal rat myocardial cells/ hypoxia/reoxygenation model in vitro and observe the effects of Yiqi Zhuyu Formula(Shenyuandan, SYD) on the survival rate and the degree of myocardium cells injury biomarkers, and thus to further discuss the its relieving mechanism on PMI. **Methods:** Neonatal rat myocardial cells were cultured in vitro to establish the hypoxia/reoxygenation model. Then use CCK-8 assay to detect the survival rate and enzymatic assay to detect the levels of CPK and LDH on each cell culture supernatant. **Results:** Compared with the normal group, the survival rate of the model group is lower ($P < 0.05$) and the CPK and LDH release quantity is higher($P < 0.05$). The survival rate of SYD drug-containing serum group, PDTC + SYD and PDTC + blank serum group were higher than those of model group and blank group($P < 0.05$); serum cell enzyme(CPK, LDH) release quantity are lower than those of the model group and blank serum group($P < 0.05$), while there was no statistical difference among the three groups. **Conclusion:** Shen Yuan Dan can improve the cell survival rate of myocardial cell hypoxia/reoxygenation injury model and relieve cell injury. This may because it can reduce cell damage through inhibiting NF- κ B and its mediated oxidative stress and inflammatory response. It indicates that Shen Yuan Dan could protect myocardium cells.

Key Words CHD; PMI; In vitro cell model; SYD; NF- κ B pathway

中图分类号:R256.22 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.03.007

冠状动脉介入治疗(Percutaneous Coronary Intervention, PCI)已经成为冠心病最重要的治疗方法并越来越广泛的应用于临床。围手术期心肌损伤(PMI)是 PCI 常见并发症。本研究在前期研究的基础上,通过建立体外心肌缺氧/复氧细胞损伤模型,观察中医药制剂 SYD 含药血清干预对心肌细胞存活率及损伤程度的影响,并初步探讨 SYD 通过抑制核因子 NF- κ B 介导的信号通路发挥心肌保护作用的分子机制,以期进一步探讨其改善冠心病围手术

期心肌损伤的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 SD 大鼠 40 只,SPF 级,雄性,体重(200 ± 20) g,购于中国医学科学院实验动物研究所。(许可证编号:SCXK(京)2009-0007);新生 Wistar 大鼠(1~3 d),雌雄不限,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。(实验动物许可证号:SCXK(京)2006-0009)

1.2 药物与试剂 参元丹(参元益气活血胶囊,院

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81273741);北京市科委十病十药项目(编号:Z141100002214010);北京市教委科技发展计划面上项目(编号:KM201310025027)

通信作者:刘红旭,男,现任首都医科大学附属北京中医医院心血管科主任,主任医师,教授,博士研究生导师,邮编:100010, Tel: (010) 52176633

内制剂,99 京卫制字[056]第 F-2037 号)。将参元丹除去包衣,称重溶于蒸馏水中,以 10 倍量蒸馏水煮提 3 次,每次 30 min,合并煮提液,浓缩至含生药 0.048 g/mL 的药液备用;

II 型胶原酶 (Collagenase II), Sigma; 胰蛋白酶 (Trypsin), Ameresco; DMEM/F12 混合培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12Ham), Hyclone; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco (特级); PBS 平衡盐溶液, Sigma; 5-溴脱氧尿嘧啶 (5-Bromo-2'-Deoxyuridine, Brd-u), Sigma; 吡咯烷二硫代氨基甲酸酯 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC), Sigma; 无糖 Earle's 液, M&C Gene Technology; 青霉素-链霉素混合液 (10 000 U/mL), 中国医学科学院医学工程研究所; 细胞增殖-毒性检测试剂盒 (CCK-8), DOJINDO; 肌酸磷酸激酶 (CPK) ELISA 试剂盒, Rapidbio (RB); 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 95% N₂ + 5% CO₂ 混合气体, 由北京中医医院氧气站提供。

1.3 仪器 CO₂/O₂ 三气培养箱 (美国 Thermo Scientific, 3131); 超净台 (再鑫, CLASS100); 高压蒸气灭菌系统 (日本 SANYO, MLS-3750); 电热恒温鼓风干燥箱 (重庆万达公司, CS101-1FB); 低温高速离心机 (德国 Sigma, 3-18K); 电子分析天平 (德国, AE200); 激光共聚焦显微镜 (日本 OLYMPUS, FV1000); 生物分光光度计 (德国 Eppendorf, AG22331)

2 方法

2.1 含药血清的制备 将 50 只大鼠随机分为给药组和空白组, 每组 25 只。给药组给予参元丹 0.048 g/mL、10 mL/kg, 空白组给予等量生理盐水, 连续给药 5 d, 2 次/d, 最后一次给药后 1 h 对大鼠进行腹腔麻醉, 腹主动脉取血, 静置 2 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 无菌条件下分离血清, 将 SYD 含药血清和空白血清 2 组血清分别合并混匀, 56 ℃, 30 min 灭活, 4 mL 分装, 封口膜密封, -80 ℃ 保存备用。

2.2 原代心肌细胞培养 将出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠固定于泡沫板上, 75% 乙醇常规消毒乳鼠胸部皮肤。超净台内沿乳鼠第 3、4 肋间眼科剪打开胸腔, 眼科镊取出心脏, 至于盛有预冷 PBS 培养皿中。剪掉大血管等非心肌组织, 反复清洗 4 次, 将心脏剪成 1 mm³ 大小的组织块, 加入 5 倍于组织体积的胰酶、胶原酶混合消化液 (1:1 比例, 胰酶以 PBS 液配制终浓度为 0.08%, 胶原酶以 DMEM/F12 培养液配制, 终浓度为 0.08%), 于 37 ℃ 消化, 消化完毕后轻

轻吹打组织块, 重复消化步骤, 收集除第一次以外的细胞悬液至 15 mL 离心管中, 加入等量的含胎牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化, 4 ℃、800 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 轻柔吹打成单细胞悬液。过 200 目筛网, 差速贴壁分离法纯化心肌细胞 (90 min)。加入 Brd-U 抑制成纤维细胞生长, 以 5 × 10⁵ 密度种板。细胞于 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度环境培养, 48 h 换液后开始正式实验。

2.3 细胞造模及分组给药 正常培养 48 h 的心肌细胞, 用 DMEM/F12 培养基同步化, 24 h 后进入造模及分组实验: 先弃去培养液, PBS 洗 3 遍, 加入预先以 95% N₂ + 5% CO₂ 混合气饱和 15 min 的无糖 Earle's 液: 1) 模型组: 三气培养箱低氧模式 (1% O₂、5% CO₂, 下同) 中缺氧培养 2 h 后, 用氧气饱和的 DMEM/F12 换液后正常培养 4 h; 2) SYD 含药血清组: 缺氧培养 2 h 后, 加入 10% SYD 含药血清继续正常培养 4 h; 3) 空白血清组: 缺氧培养 2 h 后, 加入 10% 空白血清继续正常培养 4 h; 4) NF-κB 抑制剂 PDTC + SYD 含药血清组: 缺氧培养 2 h 后, 加入终浓度为 10⁻⁴ mol/L 的 PDTC 和 10% SYD 含药血清继续正常培养 4 h; 5) NF-κB 抑制剂 PDTC + 空白血清组: 缺氧培养 2 h 后, 加入终浓度为 10⁻⁴ mol/L 的 PDTC 和 10% 空白血清继续正常培养 4 h; 6) 正常对照组: 不做任何处理, 加入培养基正常培养 6 h。

2.4 细胞存活率测定及细胞培养液中 LDH、CPK 含量测定 各组细胞经造模给药后, 严格按照试剂盒说明书步骤进行加样操作, 用分光光度计测得各组 OD 值。

酶活性计算公式:

$$\text{CPK, LDH 活性 (U/L)} = \frac{\text{测定 OD 值} - \text{对照 OD 值}}{\text{标准 OD 值} - \text{空白 OD 值}} \times \text{标准品浓度} \times 1000$$

2.5 统计学方法 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据采用 SPSS 15.0 统计软件包 (PN: 32119001, SN: 5045602) 进行分析, 使用 Student-Newman-Keuls Test 法进行组间差异性比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组心肌细胞存活率的影响 模型组 OD 值明显低于正常组 ($P < 0.05$), 而与空白血清组比较未见明显差异 ($P > 0.05$); SYD 含药血清组、PDTC + SYD、PDTC + 空白血清组均高于模型组和空白血清组 ($P < 0.05$)。SYD 含药血清组与 PDTC + SYD 2 组均能明显提高 OD 值, 后者略高于前者, 但组间比较没有统计学意义 ($P > 0.05$); SYD 组略高于 PDTC + 空白血清组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组细胞存活率($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	样本(n)	存活率(OD 值)
正常对照组	6	0.46 ± 0.03
模型组	6	0.24 ± 0.05 [#]
SYD 含药血清组	6	0.37 ± 0.06 ^{*△}
空白血清组	6	0.26 ± 0.04
PDTC + SYD 含药血清组	6	0.41 ± 0.07 ^{*△}
PDTC + 空白血清组	6	0.34 ± 0.04 ^{*△}

注:与正常组对比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$;与空白血清组相比,[△] $P < 0.05$ 。

3.2 各组细胞上清液 CPK、LDH 水平 与正常组对比,模型组在缺氧复氧过程中产生明显的细胞损伤($P < 0.05$),空白血清组未见明显的改善损伤作用($P > 0.05$);而 SYD 含药血清组、PDTC + SYD、PDTC + 空白血清组的药物干预均能不同程度改善细胞损伤($P < 0.05$),但 3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞培养液中 CPK、LDH 水平($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	样本(n)	CPK(U/L)	LDH(U/L)
正常对照组	6	162.2 ± 16.9	188.4 ± 18.8
模型组	6	332.4 ± 22.3 [#]	412.6 ± 24.6 [#]
SYD 含药血清组	6	198.8 ± 19.8 ^{*△}	277.4 ± 28.3 ^{*△}
空白血清组	6	275.3 ± 25.4	388.5 ± 22.7
PDTC + SYD 含药血清组	6	177.6 ± 27.6 ^{*△}	231.6 ± 38.8 ^{*△}
PDTC + 空白血清组	6	203.1 ± 20.9 ^{*△}	278.3 ± 26.6 ^{*△}

注:与正常组对比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$;与空白血清组相比,[△] $P < 0.05$ 。

4 讨论

在 PMI 发生的机制研究中^[1-3],无论是手术操作过程引起的微小血管闭塞、痉挛造成的心肌缺血缺氧,或是缺氧/复氧、缺血再灌注过程引起的氧化应激、钙超载、炎症反应,均会造成心肌细胞的损伤、代谢和结构的破坏,并引起细胞最终的坏死和凋亡。心肌细胞损伤后,细胞内的蛋白和各种酶类由于细胞功能结构的改变而释放到细胞外,其中 CPK、LDH 以及他们的同工酶对于心肌损伤的判断具有较高的灵敏度和特异性。

中医药在改善动脉粥样硬化血管内皮功能、减轻过氧化损伤、抑制炎症反应、减轻心肌缺血再灌注损伤等方面的功能已经得到证实。首都医科大学附属北京中医医院心血管科刘红旭主任医师基于冠心病心绞痛“气虚血瘀”的病理特点而制成的具有“益气逐瘀”功效的院内制剂——参元丹,临床上对不稳定心绞痛具有良好疗效。我们前期的研究结果表明^[4-9],参元丹具有改善心肌缺血、减轻缺血再灌注

损伤及促进内源性心肌保护作用,提示在 PMI 中可能发挥心肌保护作用。

核因子- κ B(NF- κ B)是一种能与免疫球蛋白 κ 轻链基因增强子上一段 10bp 的核苷酸序列特异结合的核蛋白。通常情况下它们都是以二聚体形式和其抑制蛋白 I κ B 结合在一起,存在于胞浆中,在受到诸如缺血缺氧、机械损伤、病毒感染、放射线照射等应激条件下,NF- κ B 被激活,进而启动相关靶基因的转录,参与炎症反应、免疫反应、细胞凋亡等病理生理过程。研究表明,机体氧化应激与 NF- κ B 激活密切相关,氧化应激过程中活性氧(ROS)大量增加,通过促进具有 κ B 结合位点的炎症反应因子(如 IL-6、IL-8、TNF- α 等)的表达参与 NF- κ B 激活过程^[10]。因此,氧化应激可能作为始动因素,激活 NF- κ B 介导的炎症反应通路,参与了 PCI 后 PMI 发生发展的全过程。吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(Pyrrolidine Dithiocarbamate,PDTC)为二硫氨基酸酯,具有抗氧化及金属螯合作用,可以特异性抑制 NF- κ B 活性,有效抑制氧化应激所致的 NF- κ B 的过度表达,可阻止细胞因子诱导炎症反应递质基因表达。王云等^[11]研究也表明,使用 NF- κ B 激活抑制剂吡咯二硫氨基甲酸酯(PDTC)可使心肌 NF- κ B 活性明显降低,减轻白细胞粘附和浸润,缺血再灌注损伤显著减轻。

综上所述,抑制 PCI 造成的过氧化损伤和炎症反应,调节 NF-KB 通路的活性可能是减轻 PCI 后 PMI 损伤的重要途径。因此,本实验设计通过 SYD 和 PDTC 干预,检测缺氧/复氧过程引起细胞损伤后细胞的存活率和 CPK、LDH 释放量,来初步探讨中医药制剂对心肌保护的作用机制。

CCK-8 法以其高灵敏度、低细胞毒性、方便快捷的特点广泛应用于细胞增殖-毒性检测试验。CPK 和 LDH 作为较稳定的细胞酶,其释放水平的高低可以反映细胞损伤程度的高低。本研究中 SYD 含药血清组、PDTC + SYD 组以及 PDTC + 空白血清组细胞存活率均高于模型组和空白血清组,细胞酶释放量均低于模型组和空白血清组,且结果均具有统计学意义,表明参元丹能够改善损伤后的细胞状况,降低细胞结构的破坏程度。此 3 组间的数据比较,差异不具有统计学意义,但 SYD 的干预效果略高于 PDTC + 空白血清,且 SYD 和 PDTC 两者联合干预效果更好,提示 SYD 可能具有调控细胞缺氧/复氧过程中氧化应激和炎症反应的作用,而这种作用可能与调节 NF- κ B 通路的活性有关,后期实验可以进一步研究核因子 NF-KB 相关调控因子的基因和蛋白

表达情况,以更高层次探讨 SYD 在发挥围手术期心肌保护作用方面的分子机制。

5 结论

参元丹能够提高心肌细胞缺氧/复氧损伤模型的细胞存活率,降低细胞损伤程度;其机制可能通过抑制核因子 NF- κ B 及其介导的氧化应激炎症反应信号通路降低细胞损伤;提示参元丹可能具有围手术期心肌损伤的保护作用。

参考文献

- [1] Saadesddin SM, Hahbab MA, Sobki SH, Ferns GA. Biochemical detection of minor myocardial injury after elective, uncomplicated, unsuccessful percutaneous coronary intervention in patients with stable angina: clinical outcome[J]. Ann Clin Biochem, 2002, 39(Pt4): 392-397.
- [2] Stone GW, Mehran R, Dangas G, Lansky AJ, Kornowski R, Leon MB. Differential impact on survival of electrocardiographic Q-wave versus enzymatic myocardial infarction after percutaneous intervention: a device specific analysis of 7147 patients[J]. Circulation, 2001, 104: 642-647.
- [3] Okmen E, Cam N, Sanli A, Unal S, Tartan Z, Vural M. Cardiac Troponin I increase after successful percutaneous coronary angioplasty: predictors and long-term prognostic value[J]. Angiology, 2006, 57: 161-169.
- [4] 刘红旭, 邓新荣, 金玫等. 不稳定性心绞痛患者血浆内皮素、一氧

化氮水平及中药治疗的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(10): 585-587.

- [5] 尚菊菊, 刘红旭, 郭玉红, 赵子厚, 周萍, 张锁雅. 参元丹对垂体后叶素诱发大鼠急性心肌梗死影响的血清学研究[J]. 世界急危重病医学杂志, 2005, 2(4): 791-794.
- [6] 解欣然, 李爱勇, 林燕, 刘红旭. 参元丹后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(10): 1977.
- [7] 尚菊菊, 李爱勇, 杨洪志, 刘卫红, 刘红旭. 参元丹药理预适应对大鼠缺血再灌注心肌梗死面积、蛋白激酶 C 及热休克蛋白 70 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(8): 1730-1733.
- [8] 吴宝, 尚菊菊, 刘红旭. 参元丹后处理对体外心肌细胞缺血/再灌注模型细胞凋亡及相关基因 Bcl-2、Bax 表达的影响[A]. 中华中医药学会心病分会第十二次学术年会论文集, 47-54.
- [9] Liu HX, Shang JJ, Chu FY, et al. Protective effects of Shen-Yuan-Dan, a traditional Chinese medicine, against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and invitro[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 956397.
- [10] Canty TD, Boyle EM, Angie BS, Morgan EN, Verrier ED, Pohlman TH. Oxidative stress induces NF- κ B nuclear translocation without degradation of I κ B- α [J]. Circulation, 1999, 100: 11, 361-364.
- [11] 王云, 渠川铮, 王莉, 陈树兰. 抑制核转录因子减轻心肌缺血再灌注损伤[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2001, 17(2): 105-107.

(2016-02-24 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 397 页)

本临床研究为近 10 年的探索性研究, 尽管在随访中采取了众多方法和措施, 由于本研究跨越的时间段较长, 纳入病例有限, 许多资料难以保存完整, 加之患者近 10 年的病情演变较复杂, 仍有 13.4% 失访率出现, 由于冠心病多为老年患者, 10 年间随着年龄增长自身死亡风险大大增加, 对生存质量分析产生了一定影响, 这也为临床中医中药的长期跟踪研究提供了借鉴。

参考文献

- [1] 黄兆辉, 周忠江, 侯玉清. 冠状动脉支架置入术后双联抗血小板疗程进展[J]. 中华介入心脏病学杂志, 2014, 22(12): 803-805.
- [2] 廖家桢, 刘娟芳, 宋崇顺, 等. 中医气血理论指导冠心病治疗的临床及实验研究[J]. 中药药理与临床, 1986, 1: 40-43.
- [3] 农一兵, 林谦, 吴旻, 等. 凉血生肌中药对冠状动脉介入术后再狭窄及心血管事件的干预作用[J]. 中华中医药杂志: 原中国医药学报, 2008, 23(2): 161-164.
- [4] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性稳定性心绞痛诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(3): 195-206.
- [5] 官玉红. ACC/AHA 不稳定型心绞痛与非 ST 段抬高心肌梗死治

疗指南(2002 年最新重要修订)[J]. 内科急危重症杂志, 2002, 8(4): 230-232.

- [6] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(12): 710-712.
- [7] McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC[J]. Eur J Heart, 2012, 33(14): 1787-1847.
- [8] 中国心脏起搏与心电生理杂志编辑部, 中国生物医学工程学会心脏起搏与电生理分会. 心脏猝死的防治建议[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2002, 16(6): 401-416.
- [9] 钱荣立. WHO 专家咨询报告. 关于糖尿病的新诊断标准与分型[J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(1): 5-6.
- [10] 崔晓云, 吴旻, 农一兵, 等. 凉血生肌方对冠心病介入术后再狭窄及心血管事件的干预[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 30-32.
- [11] 王晓才, 农一兵, 林谦, 等. 冠心病中医证候与冠心病发病的相关研究[J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2007, 14(2): 4-6.

(2016-02-24 收稿 责任编辑: 洪志强)