文章编号:1000-5404(2012)15-1527-06

论著

珠子参总皂苷通过促进 Nrf2 转位拮抗新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤

贺海波[1],石孟琼[2],罗 涛[3],陈良金[2],周继刚[3],张继红[3],卢训丛[2] (443002 湖北 宜昌,三峡大学:天然产物研究与利用湖北省重点实验室[1],医学院基础医学实验中心[2],中医临床医学院内科住院部[3])

[摘要] **目的** 观察珠子参总皂苷 H_2O_2所致氧化应激损伤保护效应并探讨其机制。**方法** Wistar 乳鼠心肌细胞原代培养,用 H_2O_2建立氧化应激损伤模型,然后用珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)孵育 24 h 后,观察细胞搏动频率,MTT 法检测珠子参总皂苷对细胞活力的影响,流式细胞仪和 Hoechst33258 染色检测珠子参总皂苷对氧化应激诱导细胞凋亡及胞内 ROS 含量的影响,比色法测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)含量,同时检测培养液中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及丙二醛(MDA)含量,实时定量 PCR 技术检测珠子参总皂苷对 SOD/GPX/CAT 反应系统 SOD1、SOD2、SOD3、CAT 和 GPX1 基因表达的影响,Western blot 检测珠子参总皂苷对细胞质和细胞核 Nrf2 蛋白表达的影响。**结果** H_2O_2明显影响细胞活力和诱导凋亡(IC_{50}为 500 μmol/L),珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理能显著增加心肌细胞搏动频率和存活率($P<0.01$),抑制心肌细胞凋亡和改善细胞形态,降低细胞内 ROS 含量($P<0.01$);减轻 H_2O_2所致乳鼠心肌细胞培养液中 LDH、CK 释放量,同时能够升高 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量($P<0.05$,$P<0.01$);上调 SOD/GPX/CAT 反应系统基因表达水平和促进 Nrf2 核移位,增加心肌细胞核内 Nrf2 的表达水平($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 珠子参总皂苷抑制心肌细胞氧化应激损伤,与 Nrf2 抗氧化途径的激活和清除 ROS 有关。

[关键词] 珠子参总皂苷;过氧化氢;心肌细胞;转录因子 Nrf2;氧化应激;保护机制
[中图法分类号] R285.5; R363.13; R542.2 [文献标志码] A

Total saponin from *Rhizoma Panacis majoris* protects neonatal rat cardiomyocytes against oxidative stress-induced injuries by improving Nrf2 translocation

He Haibo[1], Shi Mengqiong[2], Luo Tao[3], Chen Liangjin[2], Zhou Jigang[3], Zhang Jihong[3], Lu Xuncong[2] ([1]Hubei Key Laboratory of Natural Products Research and Development, [2]Experimental Center of Basic Medicine, Medical College, [3]Department of Internal Medicine, Clinical Hospital of Traditional Chinese Medicine, Three Gorges University, Yichang, Hubei Province, 443002, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of total saponin from *Rhizoma Panacis majoris* on the oxidative stress-induced injuries in neonatal rat cardiomyocytes. **Methods** Neonatal rat cardiomyocytes were primarily isolated from 1- to 3-day-old Wistar rats and then treated with H_2O_2 at the IC_{50} of 50% to induce Oxidative stress-induced injury. The injuried cells were then treated with the total saponin (100 and 200 μg/ml) for 24 h. The beating rates of cardiomyocytes were observed by inverted microscopy, viability of cells and oxidative stress-induced apoptosis measured by by MTT assay, cell apoptotic rate and ROS content detected by flow cytomety, and apoptosis morphous of cells were observed by hoechst33258 through fluorescence microscopy. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), hydrogen peroxidase (CAT), malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), and creatine kinase (CK) in the culture medium were also measured. Real-time polymerase chain reaction was applied to detect the mRNA expression of SOD10-SOD3, CAT and GPX1 antioxidative genes, and expression of Nrf2 in the cell cytoplasm and nucleus were detected by Western blotting. **Results** H_2O_2 at the concentration of 200 to 800 μmol/L significantly inhibited the viability and apoptosis of cells (IC_{50} = 500 μmol/L). Total saponin from *Rhizoma Panacis majoris* (100 and 200 μg/ml) significantly increased the beating rates of cardiomyocytes and cell viability ($P<0.01$), reduced the apoptosis rate, improved apoptosis morphous, decreased intra-cellular ROS contents ($P<0.01$), improved the activities of SOD, GSH-Px and CAT, and decreased the levels of LDH, CK

[通信作者] 石孟琼,E-mail: shmq0212@126.com

and MDA ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, the mRNA expression of SOD1-SOD3, CAT and GPX1 in the cardiomyocytes was decreased remarkably in the model group, while they were up-regulated in total saponin-treatment groups ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expression of Nrf2 in the nucleus were significantly increased compared with model group ($P<0.05$, $P<0.01$) after treatment with the total saponin. **Conclusion** Total saponin from *Rhizoma Panacis majoris* effectively inhibits oxidative stress-induced injuries of cardiomyocytes by activating anti-oxidative pathway of Nrf2 and removing ROS.

[**Key words**] total saponin from *Rhizoma Panacis majoris*; H_2O_2; cardiomyocytes; Nrf2; oxidative stress; protection mechanism

Corresponding author: Shi Mengqiong, E-mail: shmq0212@126.com

缺血性心肌损伤是由于冠状动脉受损或受阻引起心脏供血、供氧不足而导致的心脏损伤,它不但可引起急性心功能不全、心肌梗死,而且有可能慢性化演变成扩张型心肌病,最终导致充血性心力衰竭。在缺血性心肌病的发生和发展中,氧化应激扮演着重要的角色[1]。近年来研究发现 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related facor 2, Nrf2)是细胞抗击氧化应激的中枢调节者,它通过上调Ⅱ相抗氧化酶和蛋白的表达而发挥对氧化应激的保护作用[2]。珠子参具补肺养阴,祛瘀止痛,止血之功,主要用于气阴两虚、烦热口渴、虚劳咳嗽、跌扑损伤、关节痹痛、咯血、吐血、衄血、崩漏、外伤出血等症[3]。研究[4]表明,珠子参总皂苷体外可抑制 HL-60 细胞增殖和诱导其分化作用;在体对心肌缺血再灌损伤具有较好的保护作用[5]。我们在前期研究[6]中发现珠子参总皂苷对小鼠局灶性脑缺血损伤有明显保护作用,并初步证实了抗氧化损伤可能是其作用机制之一,但有关珠子参总皂苷抗氧化损伤的分子机制尚不清楚。本实验拟在此基础上,以新生大鼠心肌细胞为研究对象,建立 H_2O_2 致氧化应激损伤模型,探讨珠子参总皂苷对心肌细胞氧化应激损伤的影响及其作用机制,旨在为其用于缺血性心脏病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验动物为出生 1~3 d 的 Sprague Dawley 大鼠,SPF 级,雌雄不拘,由三峡大学实验动物中心提供,合格证:SCXK(鄂)2011-0012。珠子参总皂苷由三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室提供,纯度为 96.5%,批号:20110724;双氧水(H_2O_2,北京化工);DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gbico);四甲基偶氮唑盐(MTT)、2′-7′-二氯荧光乙酰乙酸盐(DCFH-DA,Sigma);Hoechst33258(凯基生物);Annexin V/FITC(晶美生物);乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(南京建成);SOD1、SOD2、SOD3、谷胱甘肽过氧化物酶 1(GPX1)、CAT 以及 GAPDH(上海生工合成,引物序列见表 1);Trizol 和 DEPC(上海生工);Prime Script™ RT reagent Kit、*Taq* DNA 聚合酶(大连宝生物);Nrf2 抗体(Bioworld 公司);β-actin 抗体(北京博奥森);羊抗兔二抗(北京中杉金桥);蛋白抽提试剂盒、ECL 发光试剂盒、蛋白含量测定试剂盒(碧云天);其他试剂均为市售分析纯。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因名称	引物序列	基因片段长度(bp)
SOD1	上游:5′-CAGGGCGTCATTCACTTC-3′	205
	下游:5′-CCAAGTCATCTTGTTTCTCG-3′	
SOD2	上游:5′-GGACGCCGCAGAGCAGAC-3′	360
	下游:5′-GCCCCCGCCTTGAACTT-3′	
SOD3	上游:5′-GAACCTCAGCCATGGTGG-3′	185
	下游:5′-GCTTAAGTGGTCTTGCAC-3′	
GPX1	上游:5′-TTGTTACTGAATGGCGGCGATGTT-3′	357
	下游:5′-GCGGGGGTGCTTGTTTATGG-3′	
CAT	上游:5′-CGTATCGAGAGCAAGGAAGC-3′	319
	下游:5′-CAGAGCATGATTAGGCAAACT-3′	
GAPDH	上游:5′-GCTGGGGCTCACCTGAAGG-3′	343
	下游:5′-GGATGACCTTGCCCACAGCC-3′	

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠心肌细胞的培养 取 1~3 d 的 Wistar 大鼠乳鼠,在无菌条件下,取出心脏剪刀破碎至 1 mm×1 mm×1 mm 大小,加入约心脏 10 倍体积用胰酶和胶原酶的混合酶分次消化,然后加入 15% 胎牛血清终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用含 15% 血清的 DMEM 培养液重悬,接种于培养瓶中,在 37 ℃,CO_2 孵箱中培养 1.5 h,用差速贴壁法去除成纤维细胞后,用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释至所需的细胞密度,接种到 96 孔培养板(细胞密度 5×10^4/ml,)或 6 孔培养板(细胞密度 3×10^5/ml)中,于 37 ℃,CO_2 孵箱中培养。待细胞融合贴满瓶底,且有节律同步搏动时,然后进行分组和给药实验。

1.2.2 珠子参总皂苷对新生大鼠心肌细胞的实验 为了考查珠子参总皂苷对新生大鼠心肌细胞活性是否存在潜在的影响,我们先进行珠子参总皂苷对新生大鼠心肌细胞活力的潜在影响测试。取在 96 孔板中培养的原代心肌细胞,贴壁后,分别加入不同浓度(0、25、50、100、250、500、1 000 μg/ml)珠子参总皂苷,孵育 24 h,测定细胞活力。具体方法:孵育完毕后,向各孔细胞中加入 20 μl MTT(5 g/L),继续培养 4 h,弃去培养液,加入 150 μl DMSO 溶液,振荡 10 min,然后用酶标仪测定波长 570 nm 的光密度值 $D(570)$,按下式求得心肌细胞的存活率:存

活率 =[各组细胞 $D(570)$/正常组细胞 $D(570)$]×100%。

1.2.3 H_2O_2 对新生大鼠心肌细胞氧化损伤浓度的确定 取在 96 孔板中培养的原代心肌细胞,加入不同浓度 H_2O_2(0、200、400、600、800 μmol/L),空白对照组只加入培养基,作用 2 h,然后测定心肌细胞活力,检测方法同 1.2.2。H_2O_2 的 IC_{50} 值为细胞活力为 50% 时 H_2O_2 的浓度,以下进行实验时 H_2O_2 致氧化应激损伤模型按照此浓度进行。

1.2.4 珠子参总皂苷对 H_2O_2 致氧化损伤的实验

1.2.4.1 实验分组 接种于 96 或 6 孔培养板中的心肌细胞采用完全随机设计分组法分为正常组、模型组、珠子参总皂苷低和高剂量组;模型组和珠子参总皂苷治疗组先用 1.2.3 实验确定的 H_2O_2 浓度作用 2 h,更换培养液后,珠子参总皂苷低、高剂量组分别加入 100、200 μg/ml 珠子参总皂苷,孵育 24 h,然后进行相应的实验。

1.2.4.2 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致心肌细胞损伤细胞形态和搏动频率的影响 将上述接种在 6 孔培养板中的各组心肌细胞经过相应处理后,于显微镜下观察心肌细胞的形态及自发搏动性。并计数各组心肌细胞搏动的频率和节律。

1.2.4.3 心肌细胞存活率 接种于 96 孔培养板中的各组心肌细胞经过相应处理后,进行细胞活力测定,检测方法同 1.2.2。

1.2.4.4 生化指标的测定 按照试剂盒说明书,测定心肌细胞培养液中 LDH、CK 和 MDA、GSH-Px、CAT、SOD 的水平。

1.2.4.5 DCFH-DA 染色法检测细胞内 ROS 量 各组心肌细胞经过相应处理后,用 0.02% EDTA 消化细胞,用无血清培养基重悬,终浓度 10 μmol/L 的 DCFH-DA 37 ℃孵育 1 h,用 PBS 清洗 2 遍,每个样品收集 1×10^4 细胞进行流式细胞仪检测。

1.2.4.6 Hoechst33258 检测凋亡细胞形态 将处理过的细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化后收集,用 37 ℃的 PBS 冲洗 24 孔板 2 次,加入 1 ml 的 4% 多聚甲醛于 4 ℃固定 10 min,自然晾干,每孔加入终浓度为 10 mg/L 的 Hoechst33258 染液 100 μl,室温避光染色 10 min,水冲净晾干,激发光波长 450 nm,发射光波长 490 nm。荧光显微镜下观察凋亡细胞形态学变化。

1.2.4.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组心肌细胞经过相应处理后,用 0.02% EDTA 消化细胞,制备细胞悬液,1 000 r/min 离心 7 min,弃上清液,PBS 洗涤,收集细胞;用 Annexin V-FITC 试剂盒中 binding buffer 悬浮细胞,调节细胞浓度为 1×10^6/ml,取 100 μl 上述细胞,分别加入 PI 和 Annexin V-FITC,混匀后室温避光 15 min 后,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4.8 实时定量 PCR 检测 用 Trizol 试剂提取心肌细胞总 RNA,将提取的 RNA 反转录为 cDNA;在反应管中加入 SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ (2×) 12.5 μl,PCR 正义引物 1 μl,PCR 反义引物 1 μl,DNA 模板 2 μl,灭菌蒸馏水 8.5 μl,最终反应体系为 25 μl。放入实时定量 PCR 扩增仪中按 95 ℃预变性 30 s、95 ℃ 变性 5 s、退火 30 s、72 ℃延伸 20 s 条件扩增 40 次。利用 PCR 仪绘出扩增曲线,进行结果分析。

1.2.4.9 Western blot 检测 Nrf2 蛋白水平 按照细胞质-核蛋白提取试剂盒说明,提取心肌细胞质蛋白和核蛋白,进行蛋白定量后,加样品缓冲液煮沸 5 min,各取 20 μl 加样;10% 聚丙烯酰胺凝胶,在 120 V、28 mA 条件下电泳 1.5 h;100 mA 条件下 PVDF 膜转膜 3 h;5% 脱脂牛奶封闭,滴加 Nrf2 一抗(1∶50),4 ℃过夜;用含 0.1% Tween 20 的 TBS 冲洗 5 min×3 次,再加二抗(1∶500)室温下孵育 2 h,用 0.1% TBST 冲洗 15 min×3 次,ECL 发光检测,X 线片显影,扫描图像,测得各条带的灰度值,以 β-actin 为内对照标准化后,比较其表达量的变化。

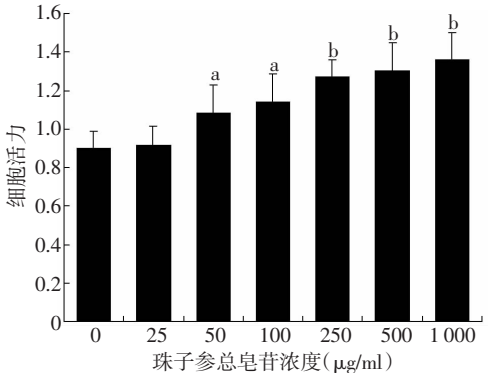
1.3 统计学分析

每项实验至少重复 3 次,所有实验结果的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所有数据分析在 SPSS 13.0 统计软件上进行单因素方差分析及 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 珠子参总皂苷对新生大鼠心肌细胞活性的影响

通过用 MTT 法进行珠子参总皂苷对新生大鼠心肌细胞活性分析,我们发现在珠子参总皂苷在 25 ~ 1 000 μg/ml 浓度范围内孵育 24 h,对新生大鼠心肌细胞没有明显的细胞毒性,相反,珠子参总皂苷还可以提高心肌细胞细胞活力近 40%,与空白组(珠子参总皂苷 0 μg/ml)比较具有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$,图 1)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白组(珠子参总皂苷 0 μg/ml)比较

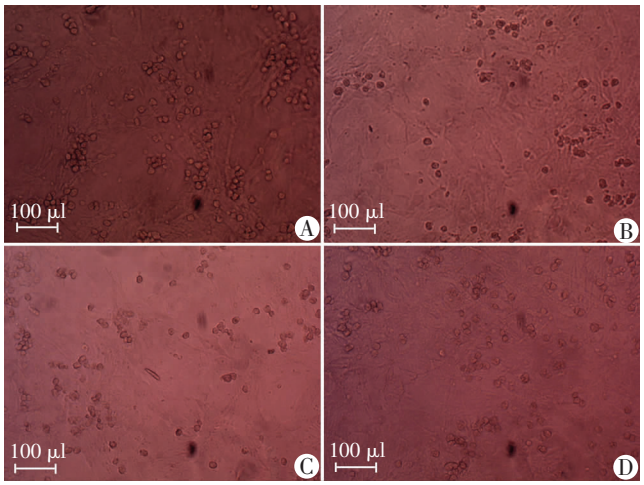
图 1 不同浓度珠子参总皂苷对新生大鼠心肌细胞活性的影响

2.2 H_2O_2 对新生大鼠心肌细胞活性的影响

H_2O_2(200 μmol/L)处理细胞 2 h 后,细胞大部分存活,活力为 94.12%,随着 H_2O_2 剂量的升高(400 μmol/L 和 600 μmol/L),细胞活力显著下降,分别为 70.48% 和 43.63%,至处理浓度 800 μmol/L 时,细胞大部分死亡,细胞活力仅为 21.17%。H_2O_2 的半数致死浓度(IC_{50} 值)约为 500 μmol/L。

2.3 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致心肌细胞损伤细胞形态和搏动频率的影响

新生大鼠心肌细胞在经过 H_2O_2 损伤后,模型组心肌细胞质空泡形成,细胞伪足收缩或消失,折光率下降,异形心肌细胞数目增加并有大量细胞脱落、悬浮、溶解坏死;用珠子参总皂苷处理后可见少量的心肌细胞伪足回缩,细胞脱落、悬浮和溶解坏死现象,但损伤程度较模型组显著减轻,且死亡细胞明显减少(图 2);通过进行细胞搏动频率分析,我们发现正常组心肌细胞搏动频率为(96.4±3.5)/min,用 H_2O_2 损伤后,模型组心肌细胞的搏动频率降至(24.3±6.2)/min,与正常组比较具有显著性差异($P<0.01$);用珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后细胞搏动频率分别恢复为(69.4±4.9)、(75.7±5.9)次/min,与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$)。



A:正常组;B:模型组;C:珠子参总皂苷低剂量组;D:珠子参总皂苷高剂量组

图2 显微镜观察珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致各组新生大鼠心肌细胞损伤细胞形态的变化

2.4 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致新生大鼠心肌细胞损伤细胞活性的影响

模型组心肌细胞经 H_2O_2 损伤后细胞活性明显下降(0.43 ± 0.06),与正常组(0.88 ± 0.09)比较有显著性差异($P<0.01$);用珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后,受 H_2O_2 损伤的心肌细胞活性变为(0.66 ± 0.05)和(0.70 ± 0.07),分别提高了49.7%和59.1%,与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$)。

2.5 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤的影响

与正常对照组相比,模型组心肌细胞培养液中 MDA 含量显著升高,LDH 和 CK 活性明显增强($P<0.01$),而 GSH-Px、CAT 和 SOD 活性明显降低($P<0.01$),实验结果显示心肌细胞在用 H_2O 致氧化应激后,对心肌细胞造成了损伤;用珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后可使培养液中 MDA 含量和 LDH、CK 活性显著降低,GSH-Px、CAT 和 SOD 活性明显升高,与模型组比较具有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$)。其中以珠子参总皂苷高剂量更为显著(表2)。

表2 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致各组新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤的影响(μmol/L,$\bar{x}\pm s$)

组别	LDH	CK	MDA	GSH-Px	CAT	SOD
正常组	31.68±4.78	11.57±3.18	10.85±2.76	75.11±5.42	19.88±1.54	98.51±3.49
模型组	54.99±5.01[a]	39.19±4.55[a]	26.91±3.17[a]	49.34±4.54[a]	9.27±2.53[a]	68.83±4.07[a]
珠子参总皂苷组						
低剂量	43.93±4.66[b]	30.52±2.17[b]	17.26±1.83[c]	59.26±3.41[b]	14.58±2.18[b]	78.44±4.51[b]
高剂量	40.53±3.04[c]	23.34±3.44[c]	15.82±2.66[c]	63.10±3.01[c]	16.10±3.35[b]	82.71±3.37[c]

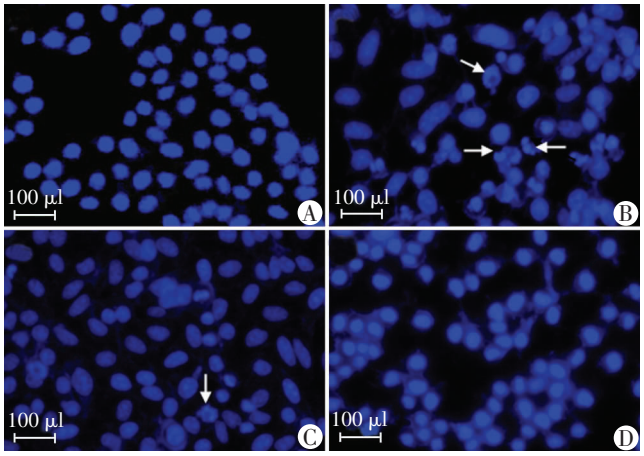
a:$P<0.01$,与正常组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与模型组比较

2.6 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤细胞内 ROS 的影响

新生大鼠心肌细胞经 H_2O_2 处理后,模型组细胞内的 ROS 急剧增加[荧光强度为(58.83±4.07)],与正常组[荧光强度为(13.97±3.31)]比较,具有显著性差异($P<0.01$);用珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后,荧光强度分别降为(32.79±2.62)和(29.63±2.88),与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$)。

2.7 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤细胞凋亡形态的影响

各组心肌细胞经过相应处理,经 Hoechst33258 染色之后,于荧光显微镜下观察,正常组细胞核为染色均匀,形状规则的椭圆形核;模型组细胞核呈现凋亡细胞典型的核固缩浓染,染色质边缘化,并可见 DNA 在核小体间断裂,形成凋亡体;用珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后凋亡细胞数量少于模型组,大部分细胞染色质呈弥漫均匀低强度荧光,核固缩细胞数目显著减少,染色质边聚和核碎片减少,大多数细胞核形态趋于正常(图3)。



A:正常组;B:模型组;C:珠子参总皂苷低剂量组;D:珠子参总皂苷高剂量组

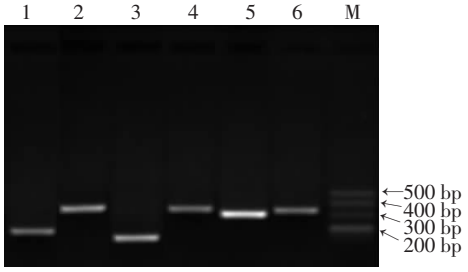
图3 荧光显微镜观察珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致各组新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤凋亡细胞形态变化 (↑:凋亡体)

2.8 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致新生大鼠心肌细胞凋亡的影响

正常组心肌细胞凋亡率小于5%,说明正常组心肌细胞也有少量细胞发生凋亡。模型组细胞凋亡率(35.49±4.18)%,明显高于正常组($P<0.01$);珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后细胞凋亡率分别为(27.39±3.49)%和(19.47±4.68)%,与模型组比较具有显著性差异($P<0.01$)。

2.9 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致心肌细胞氧化应激损伤心肌细胞 SOD、GPX1 和 CAT 基因表达的影响

与正常组相比,模型组心肌细胞中 SOD1、SOD2、SOD3、GPX1 和 CAT mRNA 表达明显下降($P<0.01$);珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后可使 H_2O_2 所致心肌细胞氧化应激损伤心肌细胞中 SOD1、SOD2、SOD3、GPX1 和 CAT mRNA 水平改善,与模型组比较具有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$),而且其改善作用随剂量的增加而增强(图4,表3)。



1:SOD1;2:SOD2;3:SOD3;4:GPX1;5:CAT;6:GAPDH;M:标准

图 4 珠子参总皂苷 100、200 μg/ml 处理后 SOD、GPX1、CAT 的电泳结果

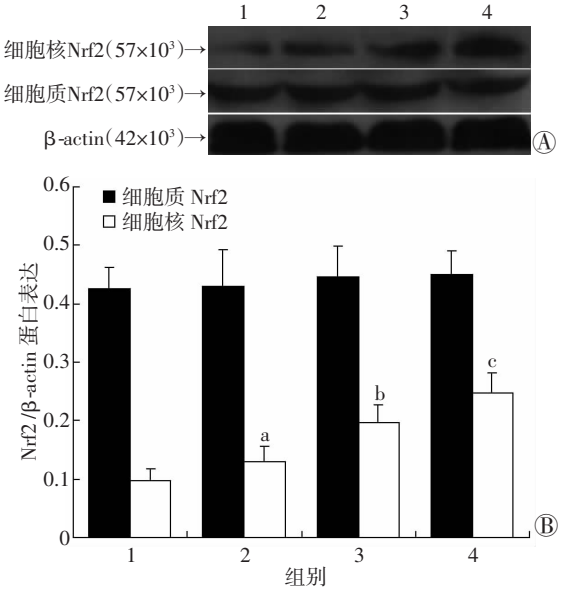
表 3 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致各组新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤心肌细胞 SOD、GPX1 和 CAT 基因表达的影响(μmol/L,$\bar{x} \pm s$)

组别	SOD1	SOD2	SOD3	GPX1	CAT
正常组	1.18 ±0.07	1.40 ±0.07	1.27 ±0.06	0.96 ±0.07	1.39 ±0.05
模型组	0.79 ±0.07[a]	0.97 ±0.06[a]	0.87 ±0.03[a]	0.68 ±0.06[a]	1.03 ±0.05[a]
珠子参总皂苷组					
低剂量	0.94 ±0.06[b]	1.17 ±0.05[c]	0.98 ±0.06[b]	0.86 ±0.05[c]	1.16 ±0.06[b]
高剂量	1.03 ±0.06[c]	1.24 ±0.07[c]	1.11 ±0.08[c]	0.89 ±0.04[c]	1.22 ±0.05[c]

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

2.10 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致心肌细胞氧化应激损伤心肌细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

由图 5 可知,实验各组心肌细胞质中 Nrf2 蛋白表达水平无明显差别($P>0.05$)。在细胞核中可见正常组细胞核中 Nrf2 表达较少,模型组胞核中 Nrf2 表达较正常组有所增加,但没有统计学差异($P>0.05$);珠子参总皂苷(100、200 μg/ml)处理后可使细胞核中 Nrf2 蛋白表达水平升高,与模型组比较具有显著性差异($P<0.05$,$P<0.01$),其中以珠子参总皂苷高剂量更为显著。



A: Western blot 检测结果;B: 半定量分析结果

1:正常组;2:模型组;3:珠子参总皂苷低剂量组;4:珠子参总皂苷高剂量组

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

图 5 珠子参总皂苷对 H_2O_2 所致各组新生大鼠心肌细胞氧化应激损伤心肌细胞 Nrf2 蛋白表达的影响

3 讨论

当前心血管疾病已成为除脑血管疾病及恶性肿瘤以外的人类三大死亡原因之一,积极开展对缺血性心肌损伤的防治及深入研究,一直以来是医学领域关注的重点。而细胞水平进行心肌保护研究已成为近年来的热点,其最大优点在于排除了在体心脏研究中神经因素和体液因素的影响[7]。因此,本实验选取了体外培养的新生大鼠心肌细胞作为观察对象,研究珠子参总皂苷处理对 H_2O_2 所致心肌细胞氧化应激损伤的保护作用。

珠子参具有较广泛的药理作用,对消化系统、中枢神经系统、心脑血管系统、免疫系统等具有广泛的药理作用[8]。我们前期研究[6]发现珠子参总皂苷对心脑缺血性损伤具有较好的保护作用,并初步证实了抗氧化损伤可能是其作用机制之一。本实验将在此基础上进一步证实其对心肌缺血性损伤的保护作用及抗氧化的作用机制。本实验结果表明,珠子参总皂苷对H_2O_2所致心肌细胞氧化应激损伤具有显著地改善作用,能有效提高氧化应激损伤的心肌细胞活性,恢复细胞搏动频率;在受损的心肌细胞形态学分析中,我们发现珠子参总皂苷能显著改善心肌细胞折光率,减少质空泡形成,抑制细胞脱落、悬浮、溶解坏死的发生,显示出了对 H_2O_2 所致心肌细胞氧化应激损伤较好的保护作用。

近年来,随着对活性氧族(reactive oxygen species, ROS: $O_2^{-}\cdot$、H_2O_2、OH·、NO 及 $ONOO^-$ 等)研究的深入,证实了 ROS 的大量堆积及脂质过氧化是导致心肌细胞氧化应激损伤的重要机制之一。研究[9]表明,在正常情况下,细胞内氧自由基的产生和清除是平衡的,但是在氧化应激情况下,大量产生 ROS 可破坏线粒体膜和细胞膜的完整性,使心肌细胞膜的通透性增加,导致细胞内酶 LDH、CK 等酶的大量释放。因此,ROS 损伤被认为是引起心肌细胞氧化损伤的主要机制。我们在进行心肌细胞培养液的生化分析和细胞内 ROS 含量检测中,发现模型组心肌细胞心肌酶和氧化还原系统受到明显破坏,提示 H_2O_2 诱发了心肌细胞氧化损伤,实验结果与文献[10]报道一致。

通常情况下,内源性抗氧化物酶(如 SOD、CAT 和 GSH-Px 等)是防止氧化应激产生的心肌损伤的第一道防线,这些内源性的抗氧化物酶通过清除过量的 ROS 使机体处于平衡状态[11]。而产生这一生物体抗氧化应激的防御机制主要是通过抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)。ARE 是许多抗氧化基因上游中的顺式作用增强元件。近年研究证实

Nrf2 通过介导 ARE 参与调节编码抗氧化蛋白,被称为机体内一个重要的保护性转录分子。在正常情况下,Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Keap1)耦联,并与肌动蛋白细胞骨架结合锚定于质;当受到 ROS 或其他亲核剂信号攻击后,Nrf2 与 Keap1 解耦联后被激活转位进入细胞核中,与 Maf 蛋白结合成异二聚体,异二聚体与基因中的 ARE 结合后激活了 Nrf2-ARE 信号通路以及其下游的抗氧化蛋白,发挥细胞保护作用[12]。本研究中,我们检测了心肌细胞质内和核 Nrf2 蛋白表达情况,结果表明珠子参总皂苷能够诱导 Nrf2 由质转入核内,从而促进了相关抗氧化基因的转录。

在机体内源性抗氧化体系中,SOD/GPX/CAT 反应系统是其中最主要的一组抗氧化酶体系,它们分工合作共同抵御机体在受到外源或内生的氧化应激损伤。其中 3 种亚型 SOD(SOD1 ~ SOD3)负责将活性氧转换成 H_2O_2,然后 GPX 和 CAT 将 H_2O_2 解离成水[13]。研究表明,上调 SOD 基因的表达将增强机体清除氧自由基的能力,或缺失 CAT、GPX1 将会导致严重的氧化损伤[12]。本实验通过心肌细胞培养液中 SOD、MDA、GSH-Px、CAT 水平及细胞内 ROS 含量和 SOD1、SOD2、SOD3、CAT、GPX1 基因表达进行了分析,发现 H_2O_2 致心肌细胞氧化应激损伤心肌细胞时,模型组细胞培养液中 SOD、GSH-Px、CAT 水平和胞内 SOD1、SOD2、SOD3、CAT 和 GPX1 基因表达显著下降,ROS 含量显著升高,而珠子参总皂苷能够明显逆转上述变化,实验结果提示珠子参总皂苷可能通过促进 SOD/GPX/CAT 反应系统基因的表达,从而增强脑细胞对 $O_2^{\cdot-}$、H_2O_2 的转化能力,从而拮抗 H_2O_2 致心肌细胞氧化应激损伤。

为了进一步证实珠子参总皂苷对 H_2O_2 致心肌细胞氧化应激损伤的保护作用,我们还分别检测了培养液中 LDH、CK 水平和细胞凋亡分析。LDH、CK 是心肌细胞胞质中特异性酶。由于心肌缺血损伤使心肌细胞膜通透性增加,心肌细胞内的一些重要酶如 LDH、CK 等大量的外漏,因此测定 LDH、CK 外漏的程度可间接反映心肌细胞的受损程度;而凋亡的检测则更直接反映了心肌细胞当前的状况[14]。本实验结果显示:与模型组比较,珠子参总皂苷处理后可使心肌细胞培养液中 LDH、CK 水平明显下降,使心肌细胞凋亡数量明显减少,同时可使细胞形态恢复或趋于正常。这说明珠子参总皂苷处理具有抗心肌细胞氧化应激损伤的保护作用。

综上所述,我们的研究表明珠子参总皂苷能够通过诱导 Nrf2 核移位,来促进抗氧化基因的转录,促进抗氧化酶体系的表达增强,进而抑制 H_2O_2 致心肌细胞氧化应激损伤中 ROS 增加,起到抗 H_2O_2 诱导心肌细胞损伤作用。

参考文献:

[1] 徐媛青, 贺海波, 张长城, 等. Nrf2-ARE 通路及其在缺血性心肌损伤中的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(6): 695 - 698.

[2] Luo C, Urgard E, Vooder T, *et al*. The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress: aging and anti-aging [J]. Med Hypotheses, 2011, 77(2): 174 - 178.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 254 - 255.

[4] 陈涛, 胡卫, 巩仔鹏, 等. 珠子参皂苷对人早幼粒白血病 HL-60 细胞增殖抑制和诱导分化的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 831 - 833.

[5] 韩红, 李麟仙, 王琼仙, 等. 珠子参总皂甙、三七总皂甙及绞股兰总皂甙对心肌缺血再灌损伤的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 1994, 10(2): 128 - 133.

[6] 金家红, 贺海波, 石孟琼, 等. 珠子参总皂苷对小鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(24): 2631 - 2633.

[7] 裴天仙, 徐长庆, 于靖, 等. 槲皮素抗阿霉素诱导的培养心肌细胞的凋亡[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 534 - 538.

[8] Chan H H, Sun H D, Reddy M V, *et al*. Potent alpha-glucosidase inhibitors from the roots of Panax japonicus C. A. Meyer var. major[J]. Phytochemistry, 2010, 71(11/12): 1360 - 1364.

[9] Andreadou I, Iliodromitis E K, Farmakis D, *et al*. To prevent, protect and save the ischemic heart: antioxidants revisited[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(8): 945 - 956.

[10] 朱艳媚, 芦殿香, 曾阳, 等. 藏药八味沉香散对 H2O2 所致乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 青海医学院学报, 2011, 32(2): 109 - 102.

[11] He H, Xu J, Xu Y, *et al*. Cardioprotective effects of saponins from Panax japonicus on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140(1): 73 - 82.

[12] 李维朝, 蒋电明, 朱凤臣, 等. 内毒素预处理激活大鼠急性脊髓损伤 Nrf2 蛋白抑制 Caspase-3 的表达[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(19): 2029 - 2033.

[13] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al*. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(1): 44 - 84.

[14] 朱晓洁, 梁飞, 王秀宏, 等. 钴原卟啉对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (3): 352 - 356.

(**收稿**:2012-01-18;**修回**:2012-03-17)

(编辑 张 维)