◆实验研究论著◆

心脉通颗粒含药血清对心肌细胞氧化损伤的保护作用

刘军明[1,2]，敖杰男[2]

1. 广东省中西医结合医院，广东 佛山 528200；2. 暨南大学医学院，广东 广州 510632

［摘要］ 目的：观察中药心脉通颗粒含药血清对原代培养大鼠心肌细胞 H_2O_2 损伤的抗氧化作用。方法：原代培养的大鼠心肌细胞分为 3 组，正常对照组用正常大鼠血清培养，模型组用正常大鼠血清培养后，H_2O_2 造损伤模型。心脉通组用心脉通含药血清干预 12 h 后，再加 H_2O_2 造损伤。各组分别在 H_2O_2 作用 6h 后检测实验中各指标：心肌细胞形态学的改变；MTT 法检测细胞活性的改变；细胞免疫组织化学法检测蛋白激酶 B （PKB/Akt） 的表达；RT-PCR 检测蛋白激酶 B （PKB/Akt） 和内皮细胞型一氧化氮合酶 （eNOS） 的基因表达变化。结果：各组心肌细胞在 H_2O_2 作用下活力下降，与正常对照组比较，模型组细胞活力显著下降，差异有统计学意义 （$P<0.05$），表明 H_2O_2 损伤模型建立成功；心脉通组细胞活力高于模型组，差异有统计学意义 （$P<0.05$）。在正常状态下 PKB 的转录水平较低，模型组有所升高，与正常对照组比较，差异有统计学意义 （$P<0.05$）。且心脉通组的转录水平更高，与正常对照组和模型组比较，差异均有统计学意义 （$P<0.05$）。正常情况下 eNOS 有表达，且表达水平是最高的。模型组中表达降低，与正常对照组比较，差异有统计学意义 （$P<0.05$）。心脉通组转录水平较模型组水平增高 （$P<0.05$）。结论：中药复方心脉通颗粒能够增强心肌细胞抗氧化损伤能力，保持细胞的形态和功能，抑制细胞凋亡，其机制可能是通过 PKB/AKT-eNOS 信号传导途径。

［关键词］ 心肌缺血；心肌细胞；心脉通颗粒；蛋白激酶 B （PKB/Akt）；内皮细胞型一氧化氮合酶 （eNOS）
［中图分类号］ R542.2 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 0256-7415 （2015） 05-0267-04
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2015.05.127

缺血性心脏病以及血管再通后的再灌注损伤，都可以导致细胞大量凋亡甚至死亡，严重影响心脏功能和病人的预后。心脉通中药复方为临床验证行之有效的方剂，但是其作用机理还不清楚，现通过用 H_2O_2 对心肌细胞进行损伤来模拟心肌缺血的状态，初步探讨中药复方心脉通颗粒对缺血心肌的保护作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器 DMEM 高糖培养基(GIBCO 公司)，胰酶(Amresco)，PBS 缓冲液，胎牛血清(杭州四季清公司)；冷冻离心机(德国 Heraeus 公司)；超净工作台(苏州净化设备有限公司)；CO_2 恒温培养箱(美国 FORMA 公司)；正立电动荧光显微镜 DMRA2(德国徕卡仪器有限公司)；RNA 提取试剂(天根生化科技有限公司)；梯度 PCR 仪 PC-808(日本 AXTEC 公司)；TakaRa RNA PCR Kit Ver3.0(大连宝生物工程有限公司)；微型电泳仪、BIO-RAD 凝胶成象及分析系统。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清的获取 SD 大鼠，200～250 g，共 50 只(南方医科大学实验动物中心)，雌雄各半随机分成 2 组，每组 25 只；分生理盐水灌胃组和中药复方心脉通灌胃组；给药剂量 = 临床常用量(每天 3 次，每次 2 料)× 动物等效剂量系数(0.018)(按体表面积算)× 培养基内稀释度(5 倍)；每天给药 2 次，早晚各一次，连续 2 周；于末次给药后 1～2 h 腹主动脉取血，每只鼠大概取 5 mL 血液，1500 r/min(半径 5 cm)离心取上层血清，60℃灭活 30 min，-20℃保存。

1.2.2 心肌细胞原代培养及鉴定 取刚出生 1～3 天 SD 大鼠的乳鼠 5 只(购于南方医科大学实验动物中心)。超净台下，酒精全身消毒，剪开胸腔迅速取出心脏置于预冷的 PBS 中，洗去血液。均匀剪碎至 1 mm^3 小组织块，采用逐次胰酶消化法获取大量单个心肌细胞悬液，培养基终止消化，1000 r/min(半径 5 cm)离心后将细胞与 5 mL 培养基混合成细胞悬液，差速贴壁 1 h 后，接种于 6 孔板中，24 h 换新鲜培养液一次，培养时间为 3～5 天(本实验室实验证实这时心肌细胞活力最好)。

［收稿日期］ 2014-11-10
［基金项目］ 教育部留学回国人员基金资助项目 （2003-406）
［作者简介］ 刘军明 （1980-），男，主治中医师，研究方向：中西医结合防治心血管疾病。
［通讯作者］ 敖杰男，E-mail：taojn@jnu.edu.cn。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

免疫细胞化学鉴定心肌细胞的纯度。

1.2.3 H_2O_2 损伤模型的建立及实验分组 接上述方法培养的心肌细胞，分为正常对照组(DMEM+ 细胞 + 无药大鼠血清)、模型组(DMEM+ 细胞 + 无药大鼠血清＋H_2O_2)、心脉通组(DMEM+ 细胞 + 含药大鼠血清＋H_2O_2)。第 2 天各组加入 15% 血清，其它组不加，12 h 后，在相应组加 H_2O_2，使终浓度达到 400 μmol/L[1]，H_2O_2 损伤 6～8 h 后，常规倒置显微镜下观察细胞形态，取细胞做指标检测。

1.3 心肌细胞活力检测 原代心肌细胞培养 3 天(生长接近 80% 融合)时，取 96 孔板分为空白对照组(DMEM＋无细胞，比色时以此组调零，设 12 孔)、正常对照组、模型组、心脉通组；每组设 6 复孔。最后 D- Hanks 液冲洗，更换无血清的 DMEM 培养液，同时加入 MTT 液(20 μL/ 孔)，继续孵育 4h 后，弃去上清液，加入 DMSO 液(150 μL/ 孔)，室温下，将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 min，使结晶物溶解。酶标仪检测各孔 OD 值(λ =570 nm)。

1.4 心肌细胞不同组蛋白激酶 B (PKB/Ak) 表达的免疫细胞化学技术 取造模成功的细胞，4% 多聚甲醛固定，加一抗 4℃过夜，30% 的 H_2O_2 灭活内源性酶，滴加相应二抗。加入 SABC 复合物，DAB 显色后，酒精梯度脱水，中性树胶封片。镜下观察，拍照并进行图象分析。

1.5 心肌细胞总 RNA 的提取及相应指标的 RT–PCR 按说明书所给步骤，提取 RNA，并对所提 RNA 进行纯度鉴定(OD_{260}/OD_{280} 在 1.8～2.0 之间并进行 RNA 电泳)。按试剂盒的说明进行逆转录反应。第二步将逆转录好的 cDNA 进行 PCR 扩增实验，在 NCBI(美国国立生物技术信息中心)中查询出 Akt- 1(gi：15100163)和内皮细胞型一氧化氮合酶(eNOS)(gi：46409655)的 mRNA 全序，用引物设计软件 PRIMER- 5 设计引物，并在 NCBI 中 BLAST，比对同源性，确保唯一性。Akt- 1 的上游为 5'AGGCATCCCTTCCTTACAG- 3'，下游为 5’- ACAGCCCGAAGTCCGTTA- 3’；目的基因大小为 271bp。eNOS 上游为 5’- CACGAGGACATTTTCGGACT- 3’，下游为 5’- ACCTAATGAAGCGACGCAGT- 3’，目的基因大小为 201 bp。同时设计内参的引物序列上游为 5’- AGCTATTCTAGCCTTAGACTGAT- 3’，下游为 5’- CTAGCTTAGGTCATTAGCTACTAG- 3’，目的基因产物大小为 385 bp。扩增条件同上。依说明书步骤进行 DNA 扩增，并将 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳，拍照并用 BIORAD 对凝胶图象进行灰度测定，用目的基因的灰度和内参的灰度比来表示转录水平的相对表达量。

1.6 统计学方法 采用 SPSS13.0 采用不同样本均数的方差分析，数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

2 实验结果

2.1 心肌细胞原代培养鉴定 见图 1。阳性信号呈棕黄色细密颗粒，位于胞浆。心肌细胞呈阳性反应，而非心肌细胞无阳性表达颗粒。结果显示心肌细胞分离、纯化效果良好，基本无其它细胞污染。

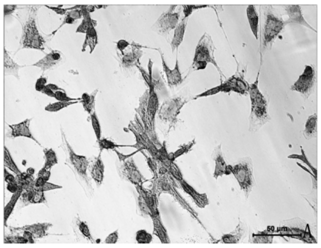

图 1 心肌细胞原代培养免疫化学图 (400×)

2.2 各组形态学改变 见图 2。常规倒置显微镜下观察细胞形态。正常对照组培养 24 h 形成同心圆放射状细胞簇，簇间借伪足相互连接形成功能合胞体搏动，每分钟 60～150 次，细胞可长成单层，长梭形或多角形，胞浆致密，核小，常为 1 个，偶可见双核，核周胞浆见粗颗粒，至 72 h 搏动频率、节律、强度趋于同步，细胞透光度好，搏动规则、有力，细胞边界由于长成一片而欠清楚。H_2O_2 作用 6 h 后，可见心肌细胞发生显著的形态学改变，多数细胞回缩变圆，胞浆浓缩、胞膜起泡，胞体变小，细胞间桥结构减少，胞间隙明显增加。细胞边界清楚，透光度下降，搏动变慢且无力。也可见部分心肌细胞脱离、悬浮，溶解坏死。H_2O_2 作用 10 h 后，细胞损伤更严重，多数细胞变小，固缩，死亡。镜下观察细胞间联系消失，细胞变为不透光的黑色点状物。心脉通组可见少量的心肌细胞伪足回缩，细胞脱落悬浮现象，但损伤程度较轻。

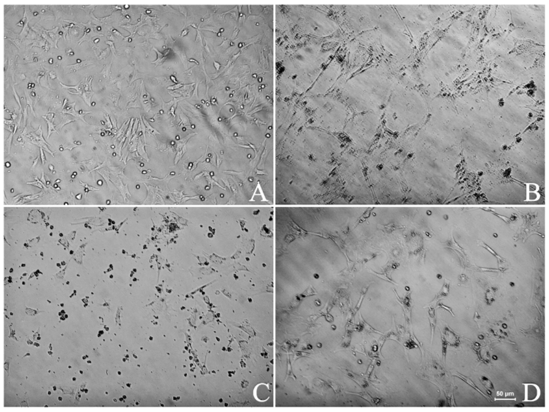

图 2 各组形态学改变 (400×)

A：正常对照组；B：模型组 H_2O_2 作用 6h；C：模型组 H_2O_2 作用 10 h；D：心脉通组

2.3 各组心肌细胞活力比较 见表 1。各组心肌细胞在 H_2O_2 作用下活力下降，与正常对照组比较，模型组细胞活力显著下降，差异有统计学意义($P<0.05$)，表明 H_2O_2 损伤模型建立成功；心脉通组细胞活力高于模型组，差异有统计学意义($P<0.05$)。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 各组心肌细胞活力比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	样本数	心肌细胞活力
正常对照组	6	0.409± 0.090
模型组	6	0.223± 0.054①
心脉通组	6	0.298± 0.041①②

与正常对照组比较，①$P<0.05$；与模型组比较，②$P<0.05$

2.4 各组 PKB 表达比较 见图 3、表 2。正常对照组中只有少数细胞胞浆中有棕黄色表达。而模型组棕黄色颗粒较正常对照组增多，心脉通组较模型组显著增多。

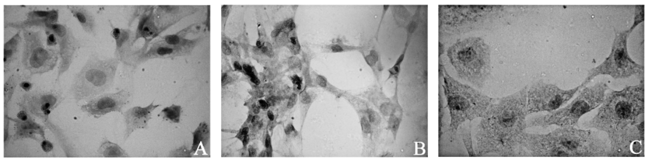

图 3 各组 PKB 表达变化 (400×)

A：正常对照组；B：模型组；C：心脉通组

表 2 各组 PKB 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	样本数	PKB 表达
正常对照组	6	83.28± 0.573
模型组	6	106.88± 2.741①
心脉通组	6	167.98± 5.749①②

与正常对照组比较，①$P<0.05$；与模型组比较，②$P<0.05$

2.5 各组 PKB 和 eNOS 转录水平变化比较 见图 4、图 5、表 3。在正常状态下 PKB 的转录水平较低，模型组有所升高，与正常对照组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。且心脉通组的转录水平更高，与正常对照组和模型组比较，差异均有统计学意义($P<0.05$)。正常情况下 eNOS 有表达，且表达水平是最高的。模型组中表达降低，与正常对照组比较，差异有统计学意义($P<0.05$)。心脉通组转录水平较模型组水平增高($P<0.05$)。

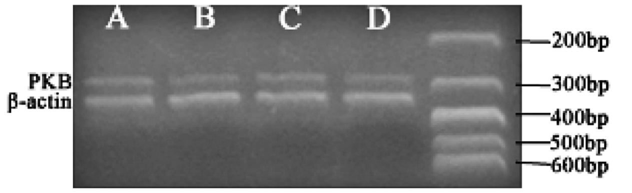

图 4 各组 PKB 电泳图

A：正常对照组；B：模型组；C：心脉通组

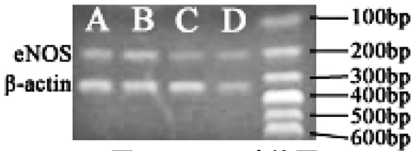

图 5 eNOS 电泳图

A：正常对照组；B：模型组；C：心脉通组

表 3 各组 PKB 和 eNOS 转录水平变化比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	样本数	PKB	eNOS
正常对照组	6	0.40± 0.022	1.01± 0.052
模型组	6	0.60± 0.026①	0.63± 0.032①
心脉通组	6	0.88± 0.027①②	0.92± 0.154①②

与正常对照组比较，①$P<0.05$；与模型组比较，②$P<0.05$

3 讨论

氧自由基在缺血心肌凋亡过程中起重要作用，本实验也进一步证实了氧化应激和缺血性心脏病有密切关系。PKB (protein kinase B)又称 Akt，处于多条信号通路的重要交叉点，PKB 的磷酸化在缺血所导致的细胞损伤方面有重要作用，如雌激素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用部分是通过磷酸化 PKB 而起到的[2]。PKB 的作用底物有很多，其中 eNOS 可催化 L- 精氨酸与分子氧反应而产生 NO。NO 有调节血管张力，抑制白细胞黏附，抑制血小板聚集，抑制平滑肌细胞分裂增殖等生理功能[3]。eNOS 和 NO 系统对心肌缺血的保护作用可能是通过抑制细胞凋亡，刺激新生血管生成，及抑制 TGF- β1/ Smad- 2 信号传导途径来实现的[4]。

H_2O_2 可启动 PKB 通路，PKB 的直接下游底物 eNOS 必定出现相应变化，心脉通含药血清可以提高 PKB 和 eNOS 在氧化损伤细胞中的表达；进而增加 NO 的产生，PKB 的活化和 eNOS 的增加可以抑制心肌细胞的凋亡，对氧化损伤状态下的心肌细胞产生保护作用，推测中药复方心脉通颗粒的作用是通过 PKB/AKT- eNOS- NO 途径，这也可能是其主要途径。

中医学所认识的胸痹心痛包括急慢性缺血性心脏病。胸痹心痛又多与血瘀有关。本实验以气血理论为基础，H_2O_2 损伤很好模拟了缺血性心肌病，外界环境(H_2O_2)的损伤产生了细胞功能的损害，即产生了阳的不足，细胞跳动频率的下降也说明了阳或气的虚损，也即《伤寒论》所谓“阳微”。心脉通颗粒以人参、黄芪、丹参为主，组方以气药配以活血化瘀药，可以改善心脏的缺氧状态，减轻缺血对心脏的损伤。单味中药抗氧化作用研究很多，复方药较少。心脉通颗粒中药复方主要组成成分是总黄酮类物质，这为黄酮类成分的中药在对抗氧化损伤方面提供了一定证据，也为以后临床组方治疗心血管系统疾病方面提供了一定依据。但其详细完整的作用机制还有待于进一步研究证实。

参考文献

[1] Kemp TJ，Causton HC，Clerk A. Changes in gene expression induced by H_2O_2 in cardiac myocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun，2003，307(2)：416-421.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[2] Arturo Rodriguez-Hernandez, Ivan Rubio-Gayosso, Israel Ramirez, et al. Intraluminal-restricted 17β-estradiol exerts the same myocardial prote-ction against ischemia/reperfusion injury in vivo as free 17β-estradiol[J]. Steroids, 2008, 73(1): 528-538.
[3] 汤健，周爱儒. 心血管分子生物学[M]. 北京：北京医科大学出版社，1999：108-114.
[4] Lei-Lei Chen, Hang Yin, Jun Huang. Inhibition of TGF-β1 signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis[J]. Cardiovascular Pathology, 2007, 16(4): 221-230.

（责任编辑：骆欢欢）

辛开苦降法抗大鼠应激性胃黏膜损伤的作用机制研究

郭春秀，聂娅，黎鹏程，梁媛，谭达全

湖南中医药大学，湖南 长沙 410007

［摘要］ 目的：观察预先给予辛开苦降的代表方半夏泻心汤对水浸束缚应激大鼠胃黏膜表皮生长因子（EGF）、前列腺素 E_2（PGE_2）含量的影响。方法：SD 大鼠随机分为空白组、模型组、中药组（半夏泻心汤）、西药组（奥美拉唑）。每组动物相应药物灌胃 3 天。除空白组外，其他大鼠水浸束缚应激（WRS）造模。计算大鼠胃黏膜损伤指数（UI），HE 染色光镜下观察大鼠胃黏膜病理改变，酶联免疫法检测各组大鼠胃黏膜中 EGF、PGE_2 的含量。结果：与空白组比较，模型组大鼠胃黏膜肉眼、光镜观察病理改变明显，模型组大鼠 UI 最高，与空白组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$），提示造模成功；与模型组比较，中药组和西药组 UI 均降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与空白组比较，模型组 EGF 含量升高，PGE_2 含量显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，中药组和西药组可显著升高胃黏膜中 EGF、PGE_2 的含量，差异有统计学意义（$P<0.05$）；中药组胃黏膜中 EGF、PGE_2 的含量低于西药组（$P<0.05$）。结论：辛开苦降的半夏泻心汤可显著对抗应激性胃黏膜损伤，其抗损伤发生的机制之一可能是通过升高胃黏膜中 EGF、PGE_2 的含量，增强对胃黏膜保护作用。

［关键词］ 应激性胃黏膜损伤；辛开苦降法；半夏泻心汤；表皮生长因子（EGF）；前列腺素 E_2（PGE_2）
［中图分类号］ R573 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 0256-7415（2015）05-0270-04
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2015.05.128

应激性溃疡是机体在遭受严重的身体和心理障碍等应激状态时，发生的一种以炎性糜烂、浅表性溃疡及胃肠道出血为特征的急性胃黏膜病变。中医学认为，心理应激属于情志致病范畴，引发脏腑气机失调是其致病的重要特点，所以防治的关键是调理脾胃中焦气机，使全身枢纽协调通畅。斡旋脾胃气机的代表方就是辛开苦降法之半夏泻心汤，研究证实其可有效地预防应激性溃疡的发生。胃黏膜的急性损伤主要是由于胃黏膜的保护因子和攻击因子失去平衡。因此如何调整胃黏膜保护因子与攻击因子的平衡，改善胃黏膜上皮细胞的生存环境，对抗应激状态下胃黏膜损伤的发生，是预防应激性胃黏膜损伤发生的关键。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理 健康 SD 大鼠 40 只，雄性，体重 180～220 g，购自湖南斯莱克景达生物有限责任公司，动物合格证号：SCXK(湘)2011-0003。40 只大鼠按随机数字表法随机分为 4 组：空白组、模型组、中药组、西药组，每组 10 只。实验程序经湖南中医药大学实验动物中心动物伦理委员会批准。4 组动物于实验前饲养于湖南中医药大学动物实验中心，适应性饲养 1 周，控制室温(25±2)℃，相对湿度(65±5)%，饲养条件相同。中药组给予半夏泻心汤药液按照 1 mL/100 g 灌胃；西药组给予奥美拉唑 1 mL/100 g 灌胃；空白组和模型组以等量生理盐水灌胃处理。均每天 1 次，持续 3

［收稿日期］ 2014-11-01
［基金项目］ 湖南省中医药管理局资助项目（2012038）；湖南省教育厅资助项目（14C0868）；湖南中医药大学中医基础理论校级重点学科资助
［作者简介］ 郭春秀（1979-），女，讲师，研究方向：中医治则与治法研究。
［通讯作者］ 谭达全，E-mail：gcxiu2005@126.com。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net