

丹参酮 II A 对大鼠心肌细胞 H9C2 氧化损伤的保护作用

刘 畅 王庸晋 曹文君

【摘要】 目的:探究丹参酮 II A 对大鼠心肌细胞 H9C2 氧化损伤的保护作用。
方法:建立 H_2O_2 诱导大鼠心肌细胞 H9C2 氧化损伤模型。将体外培养的 H9C2 细胞随机分为空白对照组、DMSO 溶剂对照组、 H_2O_2 模型组、丹参酮 II A 高、中、低剂量组。用 MTT 法测定心肌细胞存活率,并检测培养液上清中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)以及丙二醛(MDA)的水平。 结果:与空白对照组相比, H_2O_2 模型组细胞存活率显著降低,LDH、MDA 水平升高,SOD 水平降低;与 H_2O_2 模型组相比,丹参酮 II A 高剂量组心肌细胞存活率显著增高,LDH 和 MDA 水平降低,SOD 水平升高($P<0.01$)。结论:丹参酮 II A 能够减轻心肌细胞氧化损伤。

【关键词】 丹参酮 II A;H9C2 心肌细胞;氧化损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.04.014

Protective effects of tanshinone II A on hydrogen peroxide-injured H9C2 myocardial cells LIU Chang, WANG Yongjin, CAO Wenjun. *Key Lab of Lipid Metabolism and Haematology, Changzhi Medical College, Shanxi 046000, China*

【Abstract】 Objective: To investigate the protective effects of tanshinone II A on oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) in myocardial cells. **Methods:** Myocardial injury models in H9C2 cells induced by H_2O_2 were established. H9C2 cells cultured in vitro were randomly divided into six groups: normal group, DMSO solvent control group, H_2O_2 model group, tanshinone II A high, medium and low dose groups. The survival rate of myocardial cells was determined by MTT method. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were detected in the supernatant of the medium. **Results:** Compared with normal group, the survival rate of H9C2 myocardial cells in the H_2O_2 model group was significantly decreased. Furthermore, the levels of LDH and MDA were increased, while the level of SOD was decreased remarkably. Compared with H_2O_2 model group, the survival rate of H9C2 myocardial cells treated with high dose of tanshinone II A was increased. In addition, the levels of LDH and MDA were decreased, while the level of SOD was increased significantly ($P<0.01$). **Conclusion:** Tanshinone II A can protect myocardial cells from oxidative damage.

【Key words】 Tanshinone II A; H9C2 myocardial cell; Oxidative injury

冠状动脉内溶栓、冠状动脉支架置入术及冠状动脉搭桥术在治疗缺血性心脏病中的应用日益广

泛,随着心肌供血的改善,缺血-再灌注损伤带来的问题日益突显。研究发现,在缺血-再灌注损伤、心力衰竭等病变过程中通常都会出现心肌组织氧化损伤。心肌损伤区能够产生大量氧自由基,使链式脂质发生过氧化反应,进而损伤心肌组织,使用自由基清除剂能够减轻心肌细胞的氧化损伤^[1]。

丹参是一种活血化瘀的传统中药,其脂溶性有效成分为丹参酮 II A^[2]。丹参酮 II A 具有抑制血小

基金项目:长治医学院科技创新项目(CX2014-01);山西省科学技术发展计划(20130321029-01)

作者单位:046000 山西省长治医学院血脂代谢与血液病山西省高校重点实验室

通信作者:王庸晋,Email:xiaophailch@163.com

板黏附聚集、抗动脉粥样硬化和血栓形成、抗缺氧缺血、保护心血管内皮细胞和心肌细胞、改善微循环等多种作用^[3-4]。本研究用过氧化氢(H_2O_2)体外诱导大鼠心肌细胞氧化损伤模型,观察不同浓度的丹参酮ⅡA处理对 H_2O_2 诱导的心肌细胞氧化损伤的保护作用及机制,为研究丹参酮ⅡA的临床药理学作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系和主要试剂

大鼠 H9C2 心肌细胞系,购于中国科学院上海生命科学研究院。DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自 Hyclone 公司;丹参酮ⅡA 购自中国药品生物制品检定所;MTT 购自美国 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;实验中所用其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞培养 在 37°C 、5% CO_2 条件下,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养大鼠 H9C2 心肌细胞,每 2 d 换 1 次液。培养至细胞融合度达 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,培养至 6~7 代时,将细胞接种于 6 孔板中培养,调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,待细胞生长至融合状态,分组进行实验。

1.2.2 H_2O_2 诱导 H9C2 心肌细胞氧化损伤 取生长状态良好的 H9C2 心肌细胞,将其随机分成 5 组:分别加入 0、100、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 孵育细胞 4 h,用 MTT 法检测细胞存活率。

1.2.3 丹参酮ⅡA 预处理 把生长良好的 H9C2 心肌细胞随机分成 6 组:空白对照组、溶剂对照组(加入含 0.5% DMSO 的培养基)、 H_2O_2 模型组(加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 孵育 4 h)、丹参酮ⅡA 低剂量组、中剂量组、高剂量组(分别加入 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L 丹参酮ⅡA 预孵育细胞 12 h,再加入 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 继续孵育 4 h)。每组设 6 个平行孔,实验重复 3 次。

1.2.4 MTT 法检测心肌细胞存活率 将处理过的 H9C2 心肌细胞接种于 96 孔培养板中,细胞密度为 $2 \times 10^4/\text{孔}$ 。每孔加入 50 μL 新鲜的 MTT (5 mg/mL),于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 4 h,弃上清,每孔加入 200 μL DMSO, 37°C 轻摇 10 min,之后用酶标仪测定 490 nm 波长下的吸光度。心肌细胞存活率的计算公式为:心肌细胞存活率 = (实

验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.5 培养基中 LDH、SOD、MDA 水平测定 取 50 μL 细胞培养上清液,使用比色法测定 LDH,使用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD,使用硫代巴比妥酸比色法测定 MDA,严格按照试剂盒说明书进行操作。

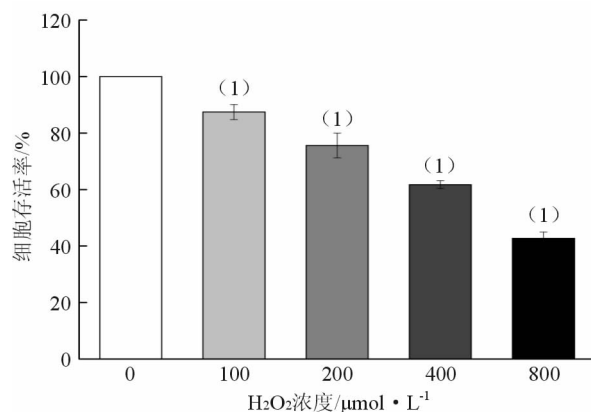
1.3 统计学分析

运用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据之间比较使用单因素方差分析(One Way ANOVA),组间两两比较使用 LSD 法。 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 H_2O_2 诱导大鼠心肌细胞氧化损伤

随着 H_2O_2 浓度增加,H9C2 心肌细胞存活率降低($P < 0.01$),H9C2 心肌细胞损伤程度呈现 H_2O_2 浓度依赖性(见图 1)。其中 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导下,细胞损伤明显,存活率降至约 60%,而 800 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导时,细胞氧化损伤严重,存活率降至 40% 以下,不宜进行后续实验。因此,本实验选用 400 $\mu\text{mol/L}$ 作为 H_2O_2 的有效损伤浓度。



注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, ⁽¹⁾ $P < 0.01$

图 1 不同浓度 H_2O_2 处理对大鼠心肌细胞存活率的影响

2.2 丹参酮ⅡA 对大鼠心肌细胞氧化损伤的保护作用

与空白对照组相比, H_2O_2 模型组细胞存活率显著降低($P < 0.01$);与 H_2O_2 模型组相比,用高剂量丹参酮ⅡA 处理后,心肌细胞存活率显著增高($P < 0.01$);但低、中剂量组保护效应不明显(见图 2)。

与空白对照组相比, H_2O_2 模型组培养上清中 LDH 和 MDA 水平显著升高,SOD 水平显著降低($P < 0.01$)。与 H_2O_2 模型组相比,高剂量丹参酮ⅡA 组培养上清中 LDH 和 MDA 水平显著降低,SOD 水平显著升高($P < 0.01$)。与 H_2O_2 模型组相

比,中、低剂量丹参酮ⅡA 处理后,培养上清中 LDH 和 MDA 水平无显著差异,SOD 水平升高($P<0.01$,见表 1)。

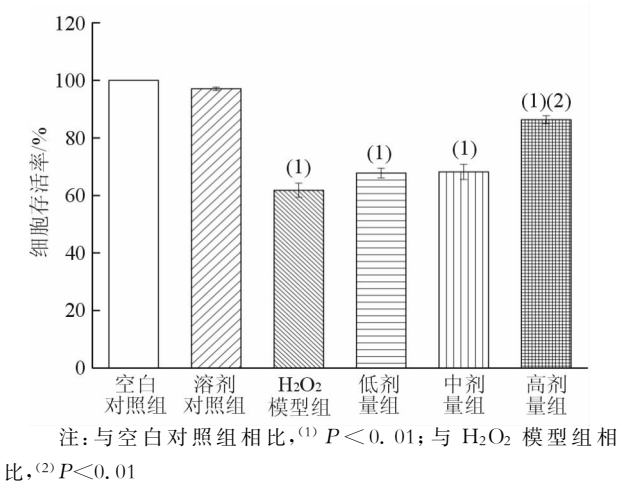


图 2 不同剂量丹参酮ⅡA 对 H₂O₂ 诱导大鼠心肌细胞氧化损伤的影响

表 1 丹参酮ⅡA 对 H₂O₂ 诱导的心肌细胞氧化损伤的影响

组别	LDH/U · L ⁻¹	SOD/U · L ⁻¹	MDA/nmol · L ⁻¹
空白对照组	186.35 ± 35.69	13.33 ± 0.64	11.97 ± 0.35
溶剂对照组	287.89 ± 42.03	13.07 ± 0.72	12.69 ± 0.34
H ₂ O ₂ 模型组	648.93 ± 67.57 ⁽¹⁾	6.71 ± 0.72 ⁽¹⁾	14.76 ± 0.26 ⁽¹⁾
低剂量组	595.93 ± 43.48 ⁽¹⁾	10.11 ± 0.24 ⁽¹⁾⁽²⁾	14.03 ± 0.34 ⁽¹⁾
中剂量组	575.68 ± 40.65 ⁽¹⁾	11.36 ± 0.60 ⁽¹⁾⁽²⁾	13.80 ± 0.40 ⁽¹⁾
高剂量组	420.47 ± 43.54 ⁽¹⁾⁽²⁾	12.96 ± 0.41 ⁽²⁾	12.80 ± 0.24 ⁽²⁾

注:与空白对照组比较,(1) $P<0.01$;与 H₂O₂ 模型组比较,(2) $P<0.01$

本研究用 400 μ mol/L H₂O₂ 诱导心肌细胞损伤,诱导后培养上清中 LDH 和 MDA 水平显著升高,SOD 水平显著降低,细胞存活率降至约 60%,说明心肌细胞氧化损伤严重。

抗氧化剂治疗法是预防缺血-再灌注损伤的可行途径之一^[9-10]。活性氧(ROS)过量产生和心肌细胞凋亡在缺血-再灌注损伤过程中起重要作用^[11]。胞内 ROS 异常快速积累,导致细胞中脂质、蛋白质和 DNA 发生过氧化反应,直接损伤心肌细胞,引发细胞凋亡^[12]。自由基清除剂和内源性抗氧化剂能够保护心肌细胞,抑制缺血-再灌注引发的心肌细胞损伤,对心血管系统具有保护作用^[13]。

本研究发现,高浓度丹参酮ⅡA 预处理心肌细胞后,可减轻 H₂O₂ 诱导的心肌细胞损伤,细胞存活率升高,培养上清中 LDH 和 MDA 水平降低,并能逆转 H₂O₂ 诱导的 SOD 水平降低。这说明,丹参酮

3 讨论

研究发现,缺血-再灌注损伤会加重器官结构损伤和功能障碍^[5]。缺血-再灌注损伤能够激活凋亡信号通路,启动下游凋亡相关基因表达,从而诱导心肌细胞发生凋亡^[6]。抑制心肌细胞凋亡能够减弱缺血-再灌注引起的心肌损伤,减缓心肌顿抑和心力衰竭的发生^[7]。

在一定浓度 H₂O₂ 孵育下,心肌细胞会产生大量氧自由基。氧自由基使脂质等生物大分子发生过氧化反应、交联或断裂,破坏细胞结构,使心肌细胞功能下降或丧失。其中,脂质过氧化反应是导致心肌细胞生物膜损伤的主要原因。LDH 是一种胞内酶,细胞培养基中 LDH 的水平反映了其漏出量,间接反映出心肌细胞生物膜完整性。SOD 是一种抗氧化酶,其数值高低间接反映出氧自由基清除能力。MDA 是生物膜中不饱和脂肪酸发生氧化反应的产物,其生成量反映氧自由基损伤细胞的程度^[8]。

ⅡA 可维持 SOD 水平,减少 MDA 等脂质过氧化产物的生成,进一步抑制脂质过氧化反应对生物膜结构与功能的损伤,减轻心肌细胞受到的氧化损伤。因此,在缺血-再灌注或恢复供氧早期给予丹参能够减轻心肌细胞损伤。本研究在细胞水平上为研究丹参酮ⅡA 的临床药理学作用提供了实验依据,但其作用机制仍需更多基础研究阐明。

参 考 文 献

[1] Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction [J]. Am J Med Sci, 2007, 334 (3): 197-205.
[2] 杨 萍, 贾钰华. 丹参酮ⅡA 抗心肌细胞氧化应激作用及抗增殖蛋白功能研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 145-149.

- Ther, 2008, 22(6): 479-485.
- [11] Greener ID, Sasano T, Wan X, et al. Connexin43 gene transfer reduces ventricular tachycardia susceptibility after myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(12): 1103-1110.
- [12] Doi M, Nosaka K, Miyoshi T, et al. Early eicosapentaenoic acid treatment after percutaneous coronary intervention reduces acute inflammatory responses and ventricular arrhythmias in patients with acute myocardial infarction; a randomized, controlled study [J]. Int J Cardiol, 2014, 176(3): 577-582.
- [13] Baum JR, Long B, Cabo C, et al. Myofibroblasts cause heterogeneous Cx43 reduction and are unlikely to be coupled to myocytes in the healing canine infarct [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302(3): H790-H800.
- [14] Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, et al. Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction [J]. Circulation, 2006, 113(25): 2919-2928.
- (收稿:2014-12-29 修回:2015-06-05)
(本文编辑:梁英超)
- ~~~~~
- (上接第 263 页)
- [3] Chen YL, Wu XM, Yu SS, et al. Neuroprotective capabilities of Tanshinone II A against cerebral ischemia/reperfusion injury via anti-apoptotic pathway in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(2):164-170.
- [4] Yan MY, Chien SY, Kuo SJ, et al. Tanshinone II A inhibits BT-20 human breast cancer cell proliferation through increasing caspase 12, GADD153 and phospho-p38 protein expression[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(5):855-863.
- [5] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 298: 229-317.
- [6] 李上海, 梁伟钧, 孙炎华, 等. 缺血预处理对心肌缺血再灌注诱发凋亡的保护机制[J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(1): 48-50.
- [7] Wu B, Lin R, Dai RZ, et al. Valsartan attenuates oxidative stress and NF- κ B activation and reduces myocardial apoptosis after ischemia and reperfusion[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 705(1-3):140-147.
- [8] Sehrlirli O, Tozan A, Omurtag GZ, et al. Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2008, 71(1):301-308.
- [9] Aldakkak M, Camara AK, Heisner JS, et al. Ranolazine reduces Ca^{2+} overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts[J]. Pharmacol Res, 2011, 64(4): 381-392.
- [10] Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, et al. Single administration of the CXC chemokine-binding protein Evasin-3 during ischemia prevents myocardial reperfusion injury in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(7):1371-1377.
- [11] Inafuku H, Kuniyoshi Y, Yamashiro S, et al. Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts [J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 19(3): 186-194.
- [12] Guan WW, Wang Z, Liu YK, et al. Protective effects of tirofiban on ischemia/reperfusion-induced renal injury in vivo and in vitro[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 761:144-152.
- [13] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(6):H2181-H2190.
- (收稿:2015-01-19 修回:2015-06-05)
(本文编辑:梁英超)