

维生素 C 对体外培养的 H₉C₂ 心肌细胞系的影响

任晨霞 麻丽霞 郭 萍 郭 颖 曹文君

【摘要】 目的:探讨维生素 C 对大鼠 H₉C₂ 心肌细胞抗氧化能力与细胞活力的影响。方法:以体外培养的大鼠 H₉C₂ 心肌细胞为研究对象,在培养过程中,分别加入不同浓度的维生素 C,观察细胞形态,MTT 法检测心肌细胞活力,DCFH-DA 荧光探针法测定维生素 C 对 H₂O₂ 处理的心肌细胞活性氧(ROS)生成的影响,用比色法检测半胱天冬酶(caspase)-3 和 caspase-9 活性。结果:0.05 mg/mL 维生素 C 处理后,H₉C₂ 心肌细胞形态发生变化,细胞质中颗粒状物质增多,排列紊乱,间隙增宽;0.05 mg/mL 维生素 C 可有效抑制 H₂O₂ 导致的 ROS 积累;但随着培养基中维生素 C 浓度的升高,心肌细胞存活率明显降低,且维生素 C 处理后 caspase-3 和 caspase-9 活性明显升高。结论:H₉C₂ 心肌细胞培养中添加维生素 C 可产生明显的抗氧化作用,但维生素 C 对 H₉C₂ 心肌细胞生长具有抑制作用。

【关键词】 维生素 C;H₉C₂ 心肌细胞;细胞活力

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2016.04.012

Effect of vitamin C on cultured H₉C₂ myocardial cells REN Chenxia, MA Lixia, GUO Ping, GUO Ying, CAO Wenjun. *Institute of Cardiovascular Diseases, Changzhi Medical College, Shanxi 046000, China*

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of vitamin C on the antioxidant capacity and cell viability of H₉C₂ cell lines. **Methods:** The cultured H₉C₂ cells were treated with vitamin C of different concentrations, and cell morphology was observed under inverted microscope. MTT assay was used to test the cell viability. Fluorescent probe DCFH-DA was used to determinate the effect of vitamin C on the intracellular ROS induced by H₂O₂. The activity of caspase-3 and caspase-9 were tested by colorimetric method. **Results:** The morphological changes of H₉C₂ cardiomyocytes were observed after treatment of 0.05 mg/mL vitamin C, including the increase of granular substance in the cytoplasm, arranged disorder and widened intercellular gap. 0.05 mg/mL vitamin C could inhibit the accumulation of ROS caused by H₂O₂, but with the increase of vitamin C concentration, the survival rate of cardiomyocytes decreased significantly and the activity of caspase-3 and caspase-9 increased significantly. **Conclusion:** Vitamin C has a significant antioxidant effect on the H₉C₂ cardiomyocytes, but it can significantly inhibit the cell growth.

【Key words】 Vitamin C; H₉C₂ cardiomyocytes; Cell viability

心脏病是由于心室结构改变和心肌受损引起心脏功能障碍的病变。研究发现,在心肌损伤区出现大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积

累^[1]。心肌缺血再灌注过程中,大量氧自由基的产生可引起心律失常以及心肌梗死面积扩大等现象^[2]。早期酒精性心脏病大鼠模型的心肌组织中,过氧化物产物丙二醛水平显著升高,而清除氧化物和自由基的过氧化物酶体和金属硫蛋白水平降低^[3]。心肌细胞氧化应激是导致心肌功能紊乱的一个重要因素。减少 ROS 产生、消除心肌细胞的氧化应激可减轻心肌损伤^[4-7]。因此,抗氧化药物是心血

基金项目:山西省基础研究计划项目(2015021185);长治医学院科技创新团队项目(CX201507);长治医学院普及项目(QDZ201503)

作者单位:046000 长治医学院心血管病研究所

通信作者:曹文君,Email:wjcao16@hotmail.com

管疾病治疗中的重要部分。

维生素 C(即抗坏血酸)具有多种生物学功能,是细胞中氧自由基的清除剂,参与体内氧化还原反应及羟化反应。风湿性心脏病患者血清中维生素 C 水平显著高于健康人,其分子机制仍不明确^[8]。本文主要探讨维生素 C 对体外培养的 H₉C₂ 心肌细胞系的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠 H₉C₂ 心肌细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院。DCFH-DA 荧光探针法 ROS 检测试剂盒购于江苏碧云天生物技术有限公司,半胱天冬酶(caspase)-3、caspase-9 活性检测试剂盒购于南京建成生物技术有限公司;DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)购于赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 向细胞培养瓶中添加含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基,置于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中培养。待细胞生长至 70%~80% 融合状态时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,培养 6~7 代后进行后续实验。

1.2.2 MTT 实验 取对数生长期的心肌细胞,胰蛋白酶消化后进行细胞计数,按 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L 细胞悬液。将 96 孔板放置在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,待细胞贴壁后,换用无血清培养液 200 μ L/孔饥饿培养 24 h,使细胞生长同步化至 G₀ 期。吸弃上清液,分别加入含不同浓度维生素 C 的培养液,培养至测定时间。每孔加入 20 μ L 的 5 mg/mL MTT,避光孵育 4 h 后终止培养,吸弃上清,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO),将培养板置于水平摇床上 37℃ 轻摇 10 min。采用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔吸光度值。

细胞存活率 = 处理组吸光度/对照组吸光度 $\times 100\%$

1.2.3 心肌细胞内 ROS 水平的检测 将心肌细胞以 2×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,无血清培养液同步化饥饿培养 24 h 后,分为对照组、过氧化氢(H₂O₂)组(加入 50 μ mol/L H₂O₂)、H₂O₂ + 维生素 C 组(加入 50 μ mol/L H₂O₂ 和 0.05 mg/mL 维生素 C)、维生素 C 组(加入 0.05 mg/mL 维生素 C),分别培养 24 h。用无血清 DMEM 按 1 : 1 000 比例稀释 DCFH-DA 探针,使其终浓度为 10 μ mol/L,吸弃 6 孔板中的培养液,每孔加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA,37℃ 避光孵育 30 min 后,用无血清 DMEM 培养液洗

涤细胞 3 次。将 6 孔板置于荧光倒置显微镜下观察细胞内的荧光强度,采集图像。

1.2.4 凋亡活性检测 采用比色法测定心肌细胞中 caspase-3、caspase-9 的活性。0.05 mg/mL 维生素 C 处理 H₉C₂ 细胞 24 h 后,经胰蛋白酶消化收集细胞,用 PBS 洗涤 1 次后吸去上清,加入 50 μ L 细胞裂解液,反复冻融 3 次后,12 000 转/min、4℃ 离心 15 min,吸取上清液按照试剂盒说明书进行操作,在 405 nm 波长下测定吸光度值。

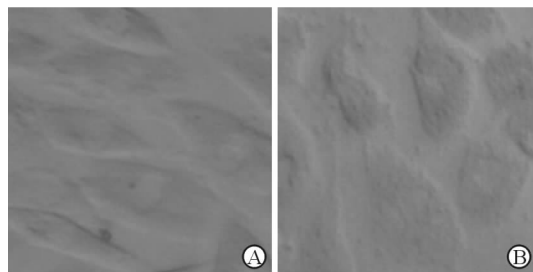
1.3 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差表示,每项实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。两组间差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞形态

正常心肌细胞呈梭形,细胞界限清晰,排列规整;0.05 mg/mL 维生素 C 组 H₉C₂ 心肌细胞形态不规整,细胞质中颗粒状物质增多,排列紊乱,间隙增宽(见图 1)。

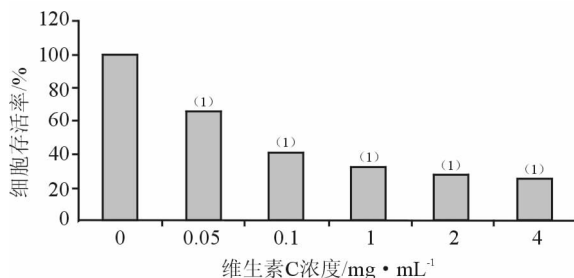


注: A 为对照组;B 为维生素 C 组

图 1 H₉C₂ 心肌细胞形态的变化

2.2 心肌细胞存活率

维生素 C 处理后 24 h 后心肌细胞活力显著下降,0.05 mg/mL 维生素 C 干预导致细胞存活率降至 66.06%,随着浓度增高细胞存活率降低至 50% 以下(见图 2)。在 0.05 mg/mL 维生素 C 作用下,心肌细胞存活率不随培养时间的延长而变化(见表 1)。



注:与未加维生素 C 组相比,(1) $P < 0.01$

图 2 不同浓度维生素 C 对 H₉C₂ 心肌细胞活力的影响

2.3 维生素 C 的抗氧化作用

与对照组相比,H₂O₂ 组心肌细胞内 ROS 荧光明显增强,而 H₂O₂ + 维生素 C 组 ROS 荧光强度明显低于 H₂O₂ 组(见图 3)。

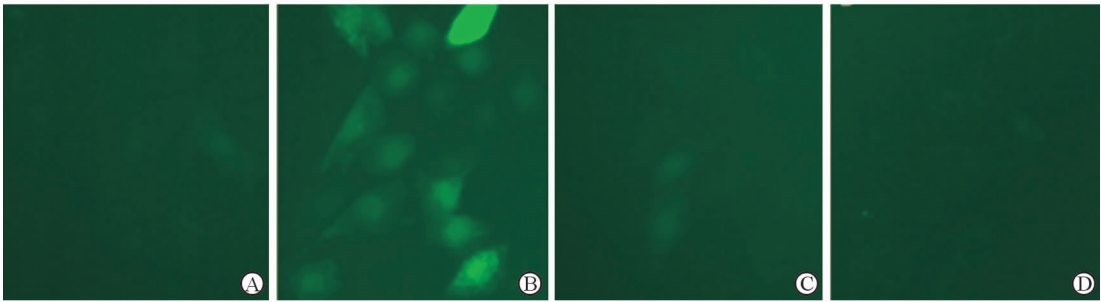
2.4 caspase-3 和 caspase-9 活性

与对照组相比,维生素 C 组 H₂O₂ 心肌细胞内的 caspase-3 和 caspase-9 的活性均显著上升($P<0.01$,见图 4)。

表 1 不同时间点 0.05 mg/mL 维生素 C 处理对 H₂O₂ 心肌细胞活力的影响

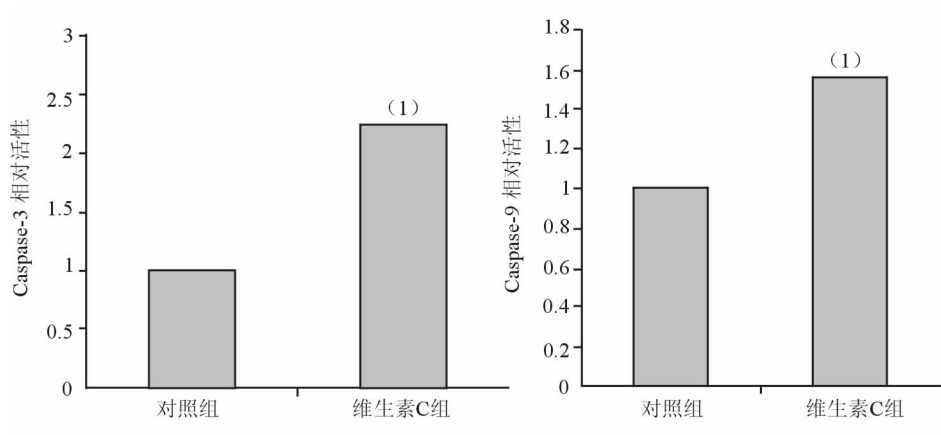
| 组别 | 培养时间 | | | |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
| 对照组 | 0.34 ± 0.03 | 0.42 ± 0.02 | 0.49 ± 0.03 | 0.53 ± 0.04 |
| 维生素 C 组 | 0.21 ± 0.04 ⁽¹⁾ | 0.24 ± 0.01 ⁽¹⁾ | 0.20 ± 0.02 ⁽¹⁾ | 0.17 ± 0.02 ⁽¹⁾ |

注:与对照组相比,⁽¹⁾ $P<0.01$



注: A 为对照组;B 为 H₂O₂ 组;C 为 H₂O₂ + 维生素 C 组;D 为维生素 C 组

图 3 维生素 C 对 H₂O₂ 介导的 H₂O₂ 心肌细胞内 ROS 荧光强度的影响(×400)



注:与对照组相比,⁽¹⁾ $P<0.01$

图 4 caspase-3 和 caspase-9 的活性测定

3 讨论

心肌细胞的氧化应激状态与心肌损伤密切相关^[9],ROS 可作为信号分子激活致心肌细胞肥大或细胞凋亡的信号通路^[10]。高水平 ROS 会破坏生物大分子、线粒体和细胞膜的结构,导致心律失常或心肌功能障碍^[11]。减少病理情况下细胞内氧自由基的产生,防止细胞膜损伤和脂质过氧化,对减轻或防止心功能障碍具有重要意义。

正常生理状态下,心肌细胞通过抗氧化酶或维

生素等抗氧化剂来维持 ROS 的低水平状态。维生素 C 是一种广泛应用的抗氧化剂,已有研究表明维生素 C 可有效减轻肾和骨骼肌的氧化损伤,但是其对心肌的保护作用及机制的研究较少^[12-13]。本研究发现,H₂O₂ 可引起心肌细胞内产生大量 ROS,而维生素 C 可有效抑制 ROS 的积累,说明维生素 C 在抗氧化方面具有明显效果,能够改善氧化应激状态,对心血管疾病的预防和治疗有一定的积极作用。

然而,正如机体内环境中的葡萄糖、脂类物质

积累过多会导致细胞毒性一样,维生素 C 过多积累也会产生细胞毒性。本研究发现,维生素 C 可降低 H_2O_2 引起的心肌细胞中 ROS 产生,但同时可显著抑制心肌细胞的生长,并提高凋亡相关蛋白 caspase-3 和 caspase-9 的活性。这说明维生素 C 在发挥抗氧化作用之外,还存在其他信号调控通路,有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈 凯,景在平,欧阳尧明,等. 血管疾病的代谢组学研究进展[J]. 国际心血管病杂志, 2015, 42(4):238-240.
- [2] 赵潇然,张凤如. 心肌再灌注损伤的机制与治疗策略[J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(3):158-160.
- [3] 程 燕,孙 尧,张浩良,等. 慢性大鼠酒精性心脏病氧化应激的影响[J]. 华西医学, 2010, 25(4): 664-666.
- [4] Panera N, Gnani D, Piermarini E, et al. High concentrations of H_2O_2 trigger hypertrophic cascade and phosphatase and tensin homologue (PTEN) glutathionylation in H_9C_2 cardiomyocytes [J]. Exp Mol Pathol, 2016, 100 (1): 199-206.
- [5] Chen W, Druhan LJ, Chen CA, et al. Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition[J]. Biochemistry, 2010, 49 (14): 3129-3137.
- [6] Djurić D, Vusanović A, Jakovljević V. The effects of folic acid and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and

oxidative stress markers in isolated rat heart[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 300(1-2): 177-183.

- [7] Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, et al. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25 (8): 977-985.
- [8] 葛淑清,刘洪武,李英慈,等. 568 例心血管患者血清维生素 A、E、C 水平的初步观察[J]. 心肺血管病杂志, 1992, 11(2): 4-5.
- [9] Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, et al. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(4):379-388.
- [10] Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, et al. $H(2)O(2)$ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(6):615-621.
- [11] Bhatt DL, Pashkow FJ. Introduction. Oxidative stress and heart disease[J]. Am J Cardiol, 2008, 101(10A):1D-2D.
- [12] 陈 晖,周 力. 维生素 C 预防冠心病合并肾功能不全患者发生对比剂肾病的临床研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(3):176-178.
- [13] Kearns SR, Moneley D, Murray P, et al. Oral vitamin C attenuates acute ischaemia-reperfusion injury in skeletal muscle[J]. J Bone Joint Surg Br, 2001, 83(8):1202-1206.

(收稿:2016-03-03 修回:2016-06-02)

(本文编辑:梁英超)

**To cure sometimes,
to relieve often,
to comfort always.**

—Edward Livingston Trudeau

有时, 去治愈,
常常, 去帮助,
总是, 去安慰。

—爱德华·利文斯顿·特鲁多

