

通脉养心丸对缺氧诱导心肌细胞损伤炎症因子及氧化应激的影响

王 怡^{1*} 张 玲² 肖 扬² 张 莉³ 邢永发²

(1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津市南开区玉泉路 88 号, 300193; 2. 天津中医药大学中医药研究院硕士研究生; 3. 天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂)
基金项目: 2009 年度教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助(IRT0973)

* 通讯作者: vip-wangyi@126.com, (022) 59596163

[摘要] **目的** 从氧化应激以及炎症角度观察通脉养心丸对缺氧损伤的心肌细胞的影响, 并探讨其可能的作用机制。 **方法** 采用大鼠心肌细胞原代培养技术并建立心肌细胞缺氧损伤模型, 取成功培养的单层心肌细胞培养 48h 后分为空白对照组、缺氧损伤组、通脉养心丸组, 通脉养心丸组分别给予通脉养心丸含药血清 1g/kg、2g/kg、4g/kg、8g/kg, 每组 9 孔。检测细胞上清液中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽酶(GSH)活性以及丙二醛(MDA)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)含量。 **结果** 与缺氧损伤组比较, 通脉养心丸含药血清各剂量组能够显著升高 SOD、GSH 活性, 降低 MDA 浓度($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 通脉养心丸含药血清 4g/kg 组能降低缺氧损伤引起的心肌细胞炎症因子 IL-6、IL-1 β 浓度($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 通脉养心丸具有抗心肌细胞缺氧损伤作用, 抗氧化、抗炎可能是其作用机制之一。 **[关键词]** 通脉养心丸; 心肌细胞; 缺氧损伤; 氧自由基; 炎症因子; 氧化应激

Effect of Tongmai Yangxin Pills on Inflammatory Factors and Oxidative Stress of Cardiomyocyte Injury Induced by Hypoxia
WANG Yi¹, ZHANG Ling², XIAO Yang², ZHANG Li³, XING Yongfa²

(1. Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. Students of Master Degree, Tianjin University of Chinese Medicine; 3. Lerentang Pharmaceutical, Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd.)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Tongmai Yangxin Pills (Pills for removing obstruction of meridians and nourishing the heart) on cardiomyocytes with anoxic injury and study its mechanism on oxidative stress and inflammation. **Methods** A cardiomyocyte primary culture technique was applied to establish the anoxic injury models. After 48-hour culture, the successfully cultured monolayer myocardial cells were divided into control group, anoxic injury group, and Tongmai Yangxin Pills group. The Tongmai Yangxin Pill group were given medicine-contained serum of 1g/kg, 2g/kg, 4g/kg and 8g/kg, with 9 samples in each group. Subsequently, SOD and GSH activity and MDA content were measured, and IL-6 and IL-1 β concentration was measured. **Results** Compared with the anoxic injury group, all Tongmai Yangxin Pills groups could increase the SOD and GSH activity, and decrease the MDA content ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The Tongmai Yangxin Pills 4g/kg group could decrease the cardiomyocyte inflammatory factors IL-6 and IL-1 β concentration due to anoxic injury ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Tongmai Yangxin Pills functions to protect the cardiomyocytes from hypoxia injury. One of its mechanisms is anti-oxidation and anti-inflammation.

Key Words Tongmai Yangxin Pills (Pills for removing obstruction of meridians and nourishing the heart); cardiomyocytes; Anoxic injury; oxygen free radical; inflammatory factor; oxidative stress

通脉养心丸是一种治疗缺血性心脏病的中成药, 由生脉散与炙甘草汤加减而成, 有养心补血、通脉止痛的功效。临床主要用于治疗胸痹心痛、心悸怔忡等证, 治疗气阴两虚型冠心病疗效显著^[1], 其药理作用机制尚不明确。研究证实, 心肌细胞长时间缺氧可引起心肌组织损伤和坏死, 受损的心肌细胞炎症因子过度表达, 其中白介素 1 β (IL-1 β)可刺激细胞产生应激性氧分子, 使心肌细胞膜通透性增加, 产生脂

质过氧化物使三磷酸腺苷(ATP)合成受阻, 从而直接损害心脏的电生理功能和泵血功能, 最终使心肌细胞变性、坏死。因此本研究将从氧化应激以及炎症因子的表达两个方面对其可能的作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 Wistar 大鼠 50 只, 体重(300 $\pm$ 20)g, 雄

性,购于中国医学科学院协和动物研究所,实验动物许可证号:SCXK(京)2005-0013。

1.2 主要药品与试剂

通脉养心丸(天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂提供,每10丸重1g,批号:C107074);DMEM/F12培养液(Hyclone);胰蛋白酶(1:250, Sigma);Ⅱ型胶原酶(Gibco公司);5'-溴脱氧尿苷(brdu, Sigma公司);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽酶(GSH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);大鼠IL-1β、白细胞介素6(IL-6)试剂盒(R&D)。

1.3 主要仪器

CO₂培养箱(Thermo, Forma 3111型,美国);倒置相差显微镜(Leica DMIL,德国);酶标仪(Multiskan Ascent, Thermo Labsystems,美国);300型半自动生化分析仪(荷兰威图仪器公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 含药血清的制备 将50只Wistar大鼠按随机数字表法分为空白对照组、通脉养心丸1g/kg、2g/kg、4g/kg、8g/kg(日给药量)剂量组,每组10只,空白对照组灌服等量蒸馏水,给药组临用前用蒸馏水配制成0.05、0.1、0.2、0.4g/ml药液,供大鼠灌胃,给药体积为1ml/100g灌服给药,每日2次,连续给药3天。末次给药1h后,腹主动脉取血,3000r/min离心15min后取血清,56℃水浴箱中孵育30min灭活补体,无菌条件下过滤分装入冻存管中,-20℃冰箱保存备用。

1.4.2 体外培养心肌细胞缺氧损伤模型的制备

心肌细胞原代培养参照文献[2]方法加以改良进行心肌细胞的原代培养:无菌条件下取出心室组织,用37℃预温的0.1%胶原酶和0.06%胰蛋白酶1:1混合液消化4~5次,每次5min,取消化液上清部分滤过200目网筛,离心收集除第1次以外各次消化所得细胞,悬于含10%胎牛血清的DMEM/F12

培养液中(内含100μg/ml青霉素,100μg/ml链霉素),接种于75cm²培养瓶中,差速贴壁培养1h后收集未贴壁的心肌细胞重新悬于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液中,调整细胞浓度至(3×10⁵~5×10⁵)/ml,接种于96孔板中,每孔100μl,隔天换液,前3天加用0.1mmol/LBrdU以抑制非心肌细胞生长。

第4天取成功培养的单层心肌细胞,用无血清DMEM/F12培养液培养48h,使细胞生长同步化。实验分6组:①空白对照组:心肌细胞中加入10%空白对照组大鼠血清(DMEM/F12培养液90μl+空白对照组大鼠血清10μl),置于37℃,5%CO₂培养箱内孵育24h。②缺氧损伤组:心肌细胞中加入10%空白对照组大鼠血清(DMEM/F12培养液90μl+空白对照组大鼠血清10μl)后,将细胞置于缺氧环境中(37℃,94%N₂,1%O₂,5%CO₂)孵育24h。③通脉养心丸组:心肌细胞中分别加1g/kg、2g/kg、4g/kg、8g/kg各剂量含药血清(DMEM/F12培养液90μl+通脉养心丸各剂量组含药血清10μl),其余操作同缺氧损伤组。

1.4.3 ELISA法测定SOD、MDA、GSH、IL-6、IL-1β的浓度 取细胞培养上清液,按照试剂盒说明书操作,酶标仪上于450nm处读取吸光值,测定SOD、MDA、GSH、IL-6、IL-1β浓度。

1.5 统计学方法

采用SPSS 11.0软件进行统计分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 通脉养心丸含药血清对缺氧损伤心肌细胞SOD、MDA、GSH的影响

表1示,缺氧损伤组细胞上清液中SOD含量明显降低($P < 0.01$),MDA含量明显升高($P < 0.01$);通脉养心丸各剂量组能够不同程度提高SOD和

表1 各组大鼠炎症因子及氧化应激比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	鼠数	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)	GSH(kg/L)	IL-6(pg/ml)	IL-1β(pg/ml)
空白对照组	—	9	25.5±0.2	0.6±0.2	7.8±0.3	160.6±27.5	78.2±17.8
缺氧损伤组	—	9	24.2±0.7△	1.3±0.1△	6.7±0.7△	244.0±44.1△	197.1±49.9△
通脉养心丸组	1	9	24.7±1.2	1.1±0.1*	7.4±0.5*	279.5±36.4	256.8±83.2
	2	9	25.4±0.5**	1.1±0.2	7.4±0.6*	261.9±48.7	226.4±39.7
	4	9	25.9±0.4**	0.7±0.2**	8.2±0.4**	149.6±20.3**	141.5±43.4*

注:与缺氧损伤组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与空白对照组比较,△ $P < 0.01$

GSH 活性、降低MDA 含量,与缺氧损伤组比较有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 通脉养心丸含药血清对缺氧损伤心肌细胞IL-6、IL-1 β 浓度的影响

表1示,缺氧损伤组细胞上清液中IL-1 β 及IL-6浓度升高($P < 0.05$),IL-6浓度显著升高($P < 0.01$);通脉养心丸4g/kg剂量组含药血清能降低细胞上清液中IL-6及IL-1 β 浓度($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

氧化应激和炎症反应贯穿于心肌缺血发生发展的全过程。缺氧过程中,中性粒细胞与心肌细胞黏附分子结合,释放许多有趋化作用的炎性介质,出现一系列炎症反应^[3]。炎症介质在心肌细胞缺氧损伤的过程中发挥着重要的作用。心肌缺氧时,IL-1 β 通过多种机制参与了心肌损伤的全过程:①促进缺血一再灌注心肌的细胞凋亡^[4]。②直接激活中性粒细胞。③ICAM-1、ELAM-1通过阻塞微血管、释放氧自由基等机制导致心肌细胞损伤,使损伤过程加剧^[5]。IL-6是慢性炎症的关键介质,被称为白介素家族的核心成员,参与了炎症反应的调节^[6]。通过对缺氧损伤心肌细胞模型IL-1 β 、IL-6表达进行研究,结果表明缺氧可造成心肌细胞炎性因子过表达,加剧了心肌损伤。通脉养心丸可抑制其表达,发挥抗炎作用,达到缺氧条件下的心肌保护作用。

缺氧条件下,细胞内自由基的产生系统和自由基清除系统的平衡遭到破坏,如体内自由基的主要清除酶SOD、GSH、过氧化氢酶(CAT)等数量减少、活性降低,从而引起体内的过氧化物不断增多,产生大量多余的自由基,使细胞膜流动性和通透性发生变化^[7]。本研究对氧自由基清除剂SOD、GSH以及细胞内脂质过氧化物分解产物MDA进行考察,结果表明,缺氧损伤后心肌细胞上清液中SOD、GSH活性显著降低而MDA含量显著增加;通脉养心丸显示出了较好的氧自由基的清除能力,对缺氧心肌细胞具有保护作用。

心肌缺血属中医“胸痹”范畴,《中医内科学》将胸痹分为6种证型,分别为心血瘀阻、痰浊壅塞、阴寒凝滞、气肾阴虚、气阴两虚和阳气虚衰^[8]。通脉养心丸针对胸痹本虚标实的病理状态重用生地黄滋阴养血为君,《名医别录》谓地黄“补五脏内伤不足,通血脉,益气力”。方中炙甘草、党参、大枣益气健脾,生地黄、阿胶、麦冬甘润滋补心阴心血;桂枝、鸡血藤温

通血脉,与益气养阴药相配,亦可使气血流通,脉道通利。诸药相合可达阴血足而血脉充,阳气复而心脉通,气血充沛,血脉畅通则悸可定,脉可复。现代药理学研究证实,地黄水提液具有降压、抗炎等作用;其浸膏具有强心、利尿等作用。党参具有抗氧化作用。麦冬、桂枝具有改善心肌收缩力的作用。鸡血藤具有抗动脉粥样硬化等药理作用。以上研究结果提示,通脉养心丸可能通过抗炎、抗氧化发挥心肌保护作用。但该方能否通过其他途径达到保护心肌的作用有待于进一步研究。

参考文献

- [1]李珂,孙兰军,高克俭,等.通脉养心丸治疗冠心病室性早搏(气阴两虚证)多中心临床研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(4):401-403.
- [2]Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(1):31-47.
- [3]Saba AA, Godziachvili V, Mavani AK, et al. Surem levels of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha correlate with peritoneal adhesion grades in humans after major abdominal surgery[J]. Am Surg, 1998, 64(8):734-736.
- [4]Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, et al. Interleukin1 ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window[J]. Stroke, 2005, 36(10):238-243.
- [5]Saitch M, Osanai T, Kamada T, et al. High Plasma Level of Asymmetric Dimethylarginine in Patients with Acutely Exacerbate Congestive Heart Failure; Role in Induction of Plasma Nitric Oxide Level[J]. Heart Vessels, 2003, 18(6):177-182.
- [6]王涛,浦奎,孔德领,等.辛伐他汀对大鼠心肌梗死后TNF- α 、IL-6表达及心室重构的干预研究[J].天津医药, 2009, 37(7):585-588.
- [7]杨旭辉,马建慧,章乐,等.乙酰水杨酸抗心肌缺血家兔氧自由基和脂质过氧化作用[J].中国药理学通报,2006,22(9):1058-1061.
- [8]张伯臾.中医内科学[M].4版.上海:上海科学技术出版社,1985:108.

(收稿日期:2010-05-11;修回日期:2010-11-06)

[编辑:行之]

欢迎投稿 欢迎订阅