

加味丹参饮预处理诱导大鼠心肌细胞 HSP70 mRNA 的表达

王庆高 李成林 卢健棋 潘朝铎 肖健 刘靖 祝美珍 黄政德

【摘要】 目的 观察加味丹参饮预处理诱导大鼠缺氧/复氧心肌细胞热休克蛋白 70 (HSP70) mRNA 的表达。方法 将培养 72 小时的乳鼠心肌细胞随机分 6 组,空白组正常培养;血清对照组加 50% 大鼠血清培养;含药血清组加 50% 含加味丹参饮的药物血清培养;缺氧/复氧组予缺氧再给氧。缺氧预处理组、加味丹参饮预处理组先给予缺氧预处理和加味丹参饮预处理,24 小时后再予缺氧再给氧。结果 加味丹参饮预处理和缺氧预处理 24 小时后心肌细胞存活率显著高于缺氧/复氧组 ($P < 0.01$),乳酸脱氢酶 (LDH) 及肌酸激酶 (CK) 显著低于缺氧/复氧组 ($P < 0.01$), HSP70 mRNA 表达显著高于缺氧/复氧组 ($P < 0.01$)。结论 加味丹参饮预处理具有延迟保护作用,其机理与诱导细胞内 HSP70 mRNA 合成有关。

【关键词】 加味丹参饮; 预处理; 延迟保护; 心肌细胞; HSP70 mRNA

【中图分类号】 R285.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-1749(2009)02-0102-04

The HSP70mRNA expression of the precondition of Jiawei Danshen decoction induce the rat's Hypoxic/reoxygenation myocardial cell WANG Qin-gao, LI Cheng-lin, LU Jian-qi, et al. Cardiovascular Division, the first affiliated hospital to Guangxi traditional Chinese medicine university, Nanning 530023, China

【Abstract】 Objective To observe the Heat shock protein70 (HSP70) mRNA expression of the precondition of Jiawei Danshen decoction to the rat's Hypoxic/reoxygenation (H/R) myocardial cell. **Methods** Rat myocardial cell which had been cultured for 72 hours, was divided at random into 6 groups. The normal group was cultured in a usual way; the serum contrast group with 50% rat serum; and the medicine-serum group with 50% medicine serum containing Jiawei Danshen decoction. The H/R group was made to have three-hour's hypoxia and then reoxygenated for an hour. The Hypoxic preconditioning (HPC) group and the Jiawei Danshen decoction preconditioning group were given HPC and Jiawei Danshen decoction precondition separately. After 24 hours, both of them were made to have three-hour's hypoxia and then reoxygenated for an hour. **Results** The cell survival rate of the Jiawei Danshen decoction preconditioning group and HPC group are obviously higher than the H/R group ($P < 0.01$), while LDH and CK lower than H/R group ($P < 0.01$). The HSP70mRNA expression of the Jiawei Danshen decoction preconditioning group and HPC group are obviously higher than H/R group ($P < 0.01$). **Conclusion** The precondition of Jiawei Danshen decoction could delayed protective function. Its mechanism and relevant Jiawei Danshen decoction induce HSP70mRNA synthesis by intracellular.

【Key words】 Jiawei Danshen decoction; Precondition; Delayed protection; Myocardial cell; HSP70mRNA

基金项目:广西中医学院院级课题(P2006021)

作者单位:530023 南宁,广西中医学院第一附属医院心血管内科(王庆高、李成林、卢健棋、潘朝铎),广西中医学院(肖健、刘靖、祝美珍);湖南中医药大学(黄政德)

作者简介:王庆高(1971-),主治医师,医学博士,主要从事心血管疾病预防的临床与基础工作。E-mail:wangqinggao888@163.com

热休克蛋白(HSP)是一类在进化上高度保守,因高温、病原体或理化等有害因素的刺激所诱导产生的一组应激蛋白,广泛存在于原核及真核细胞内。HSP按其分子量的大小主要分为HSP90, HSP70, HSP60及小分子HSP四个家族。据报道HSP70的主要功能是维持细胞蛋白自稳,提高细胞

对刺激原的耐受性,使细胞维持正常的生理功能^[1]。前期临床与实验研究已表明加味丹参饮对冠心病有较好降脂作用,对家兔食饵性动脉粥样硬化具有显著的防治作用,并具有模拟缺血预处理样的心肌保护作用^[2-3]。本实验以 HSP70mRNA 为指标,观察加味丹参饮预处理对大鼠缺氧/复氧心肌细胞的延迟保护作用的机理。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 出生 72 小时的 Wistar 大鼠 30 只,成年大鼠 10 只,体重(200 ± 20)g,雌雄各半,均由广西医科大学医学实验动物中心提供,合格证号:SCXK 桂 2003-0003。

1.1.2 药物 加味丹参饮(JDD)(由丹参 20 g,檀香 6 g,赤芍 10 g,川芎 6 g,当归 6 g,红花 6 g,生地 12 g 等组成)。由湖南中医药大学第一附属医院药房提供,经干燥、称重、浸泡、煎煮 3 次,浓缩至含生药 2g/ml。

1.1.3 仪器及试剂 凝胶成像分析系统(BIORAD 公司)、U-2001 紫外分光光度计(日立公司)、低温高速离心机(Sigma 公司)、基因扩增仪(HYBAID 公司)、One Step RNA PCR Kit(AMV)(TakaRa BIOTECH 公司)、Trizol 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)、乳酸脱氢酶(LDH)(南京建成生物工程研究所)、肌酸激酶(CK)(南京建成生物工程研究所)、DMEM(Gibco 公司)、胎牛血清(杭州四季清生物工程材料有限公司)、牛血清白蛋白(BSA)(Sigma 公司)。

1.1.4 引物设计 引物序列由上海生物工程公司合成。热休克蛋白 70(HSP70)引物序列 472bp,β-actin 引物序列 750bp。

HSP70 引物序列

上游引物 5'-TGACCTTCAGTCCCCACGTG-3',

下游引物 3'-ATCGATCGTATCTAAGTACC-5',

β-actin 引物序列

上游引物 5'-TGTACCTTCAACACCCCAGTC-3'

下游引物 3'-AACGTCACGCACGATTTTCCT-3'

1.2 方 法

1.2.1 体外大鼠心肌细胞的培养 参照《药理实验方法学》^[4]中新生大鼠心脏细胞的培养方法,将出生 72 小时的 30 只 Wistar 大鼠,无菌条件下剪取心室。剪下的心脏用 PBS(磷酸缓冲液)洗涤后,剪

去心房,将心室剪成 1 mm³ 碎块,用 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 水浴中消化 10 分钟,弃上清,再加入胰蛋白酶消化 10 分钟,将上清液及沉淀物分别处理。上清液移至另一无菌离心管中,加入 PBS 离心,弃上清液。重复 1~3 次,充分洗去胰蛋白酶。消化处理之后,将心肌细胞加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中制成细胞悬液。前述之沉淀组织块再加胰蛋白酶消化,沉淀,其上清液重复前述步骤,反复消化 3~8 次,制成心肌细胞悬液。将所有细胞悬液移到细胞培养瓶中,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中放置 1.5 小时,除去已贴壁的成纤维细胞。收集未贴壁的细胞悬于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,调细胞浓度为 3 × 10⁶ 个/ml,接种于 25cm² 的培养瓶中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。每 2 天更换培养液,取培养 3 天的细胞单层进行实验。

1.2.2 心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤实验法 参照《药理实验方法学》^[4]进行。DMEM 培养液用高纯氮气饱和 30 分钟,使培养液氧分压低于 4.00kPa(30mmHg)。心肌细胞单层换用缺氧培养液后,培养液内立即冲入氮气(1L/min 流量)30 秒以驱除瓶内氧气,然后塞紧瓶塞密闭培养。缺氧不同的时间后可造成心肌细胞不同程度的损害。按此方法造成心肌细胞缺氧,缺氧 3 小时后换用正常 DMEM 培养液培养 1 小时,造成再给氧损伤。

1.2.3 药物血清制备 参照《药理实验方法学-新技术与新方法》^[5]中药物血清的制备方法。取 10 只 Wistar 大鼠按区组随机法分为血清对照组和药物血清组,分别制备对照血清和药物血清。药物血清组灌胃加味丹参饮药液,剂量是根据成人每日临床用量按人与动物之间药物剂量换算而成(利用“mg/kg 折算 mg/m² 转换因子”进行计算)^[6],大鼠每日药量为 6.42 g/kg,每日 2 次,连续 3 天。血清对照组灌以等量生理盐水。于最后 1 次给药后 1 小时,无菌条件下,颈总动脉取血,分离血清;56℃、30 分钟灭活补体 φ0.2μm 微孔滤膜过滤除菌,分装,-20℃ 保存备用。

1.2.4 分组及给药 将培养 3 天的乳鼠心室肌细胞随机分为 6 组,每组 6 个样本。空白组:继续培养 24 小时,更换培养液再培养 24 小时。空白血清对照组:培养液中加入 50% 大鼠血清培养 24 小时,然后更换培养液继续培养 24 小时。含药血清对照组:培养液中加入 50% 含 JDD 的药物血清培养 24 小时,然后更换培养液继续培养 24 小时。缺氧/复

表 1 各组细胞存活率、LDH 及 CK 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞存活率(%)	LDH(U/L)	CK(U/L)
空白组	6	95.17 ± 1.17* [△]	580.78 ± 79.83* [△]	5.87 ± 1.10* [△]
空白血清对照组	6	94.50 ± 1.38* [△]	596.00 ± 84.88* [△]	5.98 ± 1.05* [△]
含药血清对照组	6	94.67 ± 1.03* [△]	600.02 ± 44.30* [△]	6.05 ± 1.09* [△]
H/R 组	6	57.00 ± 2.97	5692.68 ± 252.73	92.67 ± 1.31
HPC 组	6	92.67 ± 1.21* [△]	585.20 ± 51.24* [△]	6.18 ± 1.12* [△]
JDDPC 组	6	92.83 ± 1.94* [△]	593.95 ± 32.04* [△]	6.28 ± 1.22* [△]

注:与 H/R 组比较,* $P < 0.01$,空白组、空白血清对照组、含药血清对照组、H/R 组、HPC 组组间比较,[△] $P > 0.05$

氧(H/R)组:继续培养 24 小时,更换培养液再继续培养 24 小时,然后缺氧 3 小时,再给氧 1 小时。缺氧预处理(HPC)组:继续培养 24 小时,然后缺氧 30 分钟,复氧 30 分钟,更换培养液再继续培养 24 小时,然后缺氧 3 小时,再给氧 1 小时。加味丹参饮预处理(JDDPC)组:给 50% 含 JDD 的药物血清培养 24 小时,然后更换培养液继续培养 24 小时后予缺氧 3 小时,再给氧 1 小时。

1.2.5 细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)及血清肌酸激酶(CK)活性测定 以台盼蓝染色法测定细胞存活率,取培养细胞上清液以比色法测定 LDH、CK 活性。

1.2.6 RT-PCR 检测

1.2.6.1 细胞内总 RNA 提取 按 Trizol 试剂盒使用说明进行。取提取的 Total RNA 6 μ l,稀释后紫外分光光度计检测, A260/A280 值在 1.6 ~ 1.8 之间。

1.2.6.2 HSP70mRNA 的扩增 使用 TakaRa BIOTECH 公司的一步法 RT-PCR 试剂盒检测。反应体系为 50 μ l,每一反应体系中含总 RNA 1 μ g,上游引物和下游引物终浓度为 1 μ M,具体方案如下:

10 X one Step RNA PCR Buffer	5 μ l
Rnase Inhibitor (40units/uL)	1 μ l
AMVRTaseXL(5units/uL)	1 μ l
25mM MgCl ₂	10 μ l
10mM dNTP	5 μ l
Specific upstream PCR primer(25uM)	1 μ l
Specific downstream PCR primer(25uM)	1 μ l
RNA	2 μ l
Taq	1 μ l
Rnase free distilLed H ₂ O	23 μ l
Total Volume	50 μ l

PCR 条件:50℃ 逆转录 5 分钟;94℃ 预变性 2 分钟;94℃ 变性 30 秒;55℃ 退火 30 秒;72℃ 延伸 1.5 分钟;共 30 个循环。72℃ 延伸加时 8 分钟。4℃ 保存备用。各组取 5 μ l PCR 产物,用 2.0% 的琼脂糖凝

胶进行电泳,结果拍照,采用图像分析系统进行光密度扫描。

β -actin 退火温度 60℃,其余扩增条件与上相同。

2 结果

2.1 各组细胞存活率、LDH 及 CK 活性比较 H/R 组细胞存活率、LDH 及 CK 活性最低,与其余各组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。空白组、空白血清对照组、含药血清对照组、HPC 组、JDDPC 组组间比较,细胞存活率、LDH 及 CK 活性无显著性差异($P > 0.05$),见表 1。

2.2 各组 HSP70mRNA 表达比较 以各组 HSP 条带 OD 值和相应 β -actin 条带的 OD 值之比来表示 HSP70mRNA 表达的强弱。含药血清对照组、血清对照组 HSP70mRNA 表达与空白组比较,无显著性差异($P > 0.05$)。HPC 组、JDDPC 组 HSP70mRNA 表达最高,与其余各组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),见表 2。

表 2 各组 HSP70mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HSP70mRNAOD 比值
空白组	6	0.260 ± 0.057*
空白血清对照组	6	0.263 ± 0.080*
含药血清对照组	6	0.261 ± 0.075*
H/R 组	6	0.606 ± 0.072
HPC 组	6	1.140 ± 0.088* [△]
JDDPC 组	6	1.150 ± 0.060* [△]

注:与 H/R 组比较,* $P < 0.01$;与空白组、空白血清对照组、含药血清对照组比较,[△] $P < 0.01$

3 讨论

心肌预先反复短暂缺血后,可增强对后续较长时间缺血的耐受性,称缺血预处理,是一种内源性机体保护机制。缺血预处理对心肌的保护作用分为两个时期。早期保护作用(EPC)于缺血预处理

后即刻出现,1~3 小时逐渐消失,延迟保护作用(DPC)于缺血预适应后十几小时开始出现,于 24 小时后达到高峰,往往持续 72~96 小时。虽然 EPC 也有心脏保护作用,但其作用时间窗较窄,必须在缺血再灌注损伤前短时间内给予,故临床可操作性不强;相反,DPC 作用时间跨度较大,在临床运用时更有可行性和便利性,因此更具实用价值和开发意义。^[7]缺血预处理是一种强有力的心肌保护因素,但它毕竟是一种损伤性的过程,且由于缺血时最佳时间、安全时限及体质差异等问题使其临床应用受限制。因此,探讨药物预处理对缺血再灌注损伤心肌的保护已成为研究的热点之一。由于中药效果明显、毒副作用较小等优点,更具有良好的临床应用前景。

加味丹参饮在丹参饮基础上化裁而成。因加味丹参饮主要用治缺血性心脏疾病,病位在心不在胃,故去原方之砂仁,加川芎、赤芍、当归等药。前期临床与实验研究已表明加味丹参饮对冠心病人有较好降脂作用,对家兔缺血性动脉粥样硬化具有显著的防治作用,并具有模拟缺血预处理样的心肌保护作用^[5-6]。由于在细胞培养中缺氧/复氧更具有可操作性,且缺氧/复氧的效果与缺血再灌注相似,因此在细胞培养中常用缺氧/复氧模型来代替缺血再灌注^[4]。心肌缺血损伤时,细胞膜完整性受破坏,CK、LDH 外漏。因此检测 CK、LDH 活性可反映心肌细胞受损程度。本实验结果表明缺氧/复氧可导致心肌细胞损伤,LDH、CK 大量外漏,加味丹参饮预处理有延迟保护作用,能防止缺氧/复氧心肌细胞存活率降低,减少心肌细胞 LDH、CK 外漏。

研究表明预先给心肌一个温和刺激诱导 HSP70 表达增加,可使心肌细胞能抵抗随后更严重

的应激,同时通过转基因使心肌细胞过度表达 HSP70 也可起到细胞保护作用^[8]。HPC 可诱导 HSP70 的 mRNA 表达增加,从而诱导 HSP 的合成^[9]。另一方面,HPC 产生的 ROS 积累亦可能诱导 HSP^[10]。本实验表明加味丹参饮预处理和 HPC 均可使 HSP70mRNA 表达增强,说明加味丹参饮预处理可以通过诱导 HSP70 的合成而发挥延迟保护作用。

参 考 文 献

[1] Latchman DS. Heat shock proteins and cardioprotection [J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(4):637.
 [2] 黄政德,张玉生,葛金文. 加味丹参饮对家兔动脉粥样硬化形成影响的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2002, 22(4):14-20.
 [3] 黄政德,葛金文,张玉生. 加味丹参饮对家兔缺血再灌注损伤心肌延迟保护作用的研究[J]. 湖南中医杂志, 2003, 19(6):52-53.
 [4] 徐叔云,卞如濂. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:45.
 [5] 刘建文. 药理实验方法学-新技术与新方法[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:258.
 [6] 潘启超,胥彬. 肿瘤药理学与化学治疗学[M]. 郑州:河南医科大学出版社, 2000:783.
 [7] 朱方. 缺血预处理保护心肌作用的分子生物学机制[J]. 心血管病学进展, 1998, 19(4):214.
 [8] Latchman DS. Heat shock protein and cardiac protection[J]. Cardiovasc - Res, 2001, 51(4):637.
 [9] Engel man DT, Chen CZ, Watanabe M, et al. Improved 4-and 6-hour myocardial preservation by hypoxic preconditioning[J]. Circulation, 1995, 92(9Suppl):417.
 [10] Knowlton AA, Bercher P, Apstein CS. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia[J]. J Clin Invest, 1991, 87(10):139.

(收稿日期:2008-12-12)

(本文编辑:张磊)

· 信息之窗 ·

征订启事

环球中医药杂志标准刊号:CN 11-5652/R, 国际刊号:ISSN 1647-1749。国内邮发代号:80-726, 国际邮发代号:BM8788, 每本定价 10 元, 全年价格 60 元。

各地邮政局(所)均可订阅,漏订客户可直接与该刊发行部联系邮购。

地 址:北京市东城区东四西大街 46 号红楼 596 室, 环球中医药杂志社 邮 编:100711

联系人:范焕云、吴巍 电 话:010-65133322 转 1595/1596/1597

传 真:010-65269860 邮 件:hqzyy@126.com