

北五味子乙素抗 AngII 诱导的心肌成纤维细胞增殖及作用机制

孙红霞, 陈建光*
(北华大学药学院 药理教研室, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:**探讨北五味子木脂素(schisandra lignin, SCL)中的活性成分之一五味子乙素(schisandrin B, Sch B)对血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)诱导心肌成纤维细胞(cardiac fibroblast, CFb)增殖的作用及作用机制。**方法:**以培养的新生 Wistar 大鼠乳鼠 CFb 为实验模型,实验分为对照组、Ang Ⅱ模型($10^{-1} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组、Sch B 1, 10, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个剂量组。采用胰酶消化、差速贴壁法培养 CFb, MTT 法测定 CFb 增殖活力;分光光度计测定 CFb 中超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量;流式细胞仪检测线粒体膜电位水平(mitochondrial membrane potential, MMP) $\Delta\Psi\text{m}$;激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子水平。**结果:**Ang Ⅱ组 SOD 活力(122.72 ± 21.59) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低于对照组(135.81 ± 26.62) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$, MDA 水平(2.82 ± 0.14) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高于对照组(1.17 ± 0.06) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $P < 0.01$ 。Sch B 1 ~ 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能显著提高 CFb 中 SOD 活力, 降低 MDA 含量, 与 Ang Ⅱ相比($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Ang Ⅱ组线粒体膜电位明显下降(587.6 ± 55.2) $\Delta\Psi\text{m}$, 钙离子水平升高(335.6 ± 28.3), 与对照组比较($3\ 069.2 \pm 282.4$) $\Delta\Psi\text{m}$, (50.7 ± 4.6), $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 给予 Sch B 处理后 $\Delta\Psi\text{m}$ 升高(Sch B 10, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 钙离子水平下降(Sch B 1 ~ 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 与 Ang Ⅱ组比较($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**Sch B 通过提高 CFb SOD 活力、降低 MDA 水平、增加清除自由基能力抑制 CFb 增殖,其作用与其升高线性膜电位水平,抑制细胞内钙离子浓度,减少促进 CFb 增殖的氧化物质生成有关。

[关键词] 北五味子乙素; 心肌成纤维细胞; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 线粒体膜电位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0203-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090203

Antiproliferative Effect of Schisandrin B on Cardiac Fibroblast via Oxidation Mechanism in Rats

SUN Hong-xia, CHEN Jian-guang*
(Pharmacological Teaching and Research Section of Pharmaceutical College,
Beihua University, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To probe the oxidative mechanism of schisandrin B (Sch B) on antiproliferation of neonatal rat cardiac fibroblast induced by AngII. **Method:** Cultured neonatal cardiac fibroblast (CFb) cells were randomly divided into control, Angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ), $10^{-1} \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and three doses of Sch B groups (Sch B 1, 10, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Trypsin digestion and spectrophotometer method were used to measure superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level. Flow cytometry was adopted to test mitochondrial membrane potential level. Laser confocal microscope technology was applied to measure intracellular calcium level. **Result:** SOD activity and MDA level in AngII group was lower and higher than that of control respectively ($P < 0.01$), Sch B (1-30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) elevated SOD activity and drop MDA level of CFb ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) respectively. mitochondrial membrane potential (MMP, $\Delta\Psi\text{m}$) was increased (Sch B 10, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and calcium intensity was declined (1, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) after Sch B treatment and have dramatic difference compared with that in Ang Ⅱ group. **Conclusion:** Sch B can elevate the free radical scavenging ability via enhancing SOD

[收稿日期] 20131011(007)
[基金项目] 吉林省教育厅课题(2012147)
[第一作者] 孙红霞, 博士, 教授, 从事心血管分子药理学研究, Tel:0432-64608281, E-mail:sunhongxiajl@126.com
[通讯作者] * 陈建光, 博士, 教授, 从事中药开发及药理学研究, Tel:0432-64608075, E-mail:chenjg118@sohu.com

activity and decrease MDA level in CFb, these effects are related to increasing MMP levels and inhibiting the intracellular calcium concentration, therefore suppressing the generation of oxidized substances related to CFb proliferation.

[**Key words**] schisandra B; cardiac fibroblast; superoxidase dismutase; malonaldehyde; MMP

研究表明,循环和心脏局部产生的生物活性物质是诱发心肌纤维化(MF)主要因素。活性物质血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)还可作为一种内在的氧化剂促进氧化应激的发生,在高血压、糖尿病、心肌纤维化等疾病中发挥重要作用^[1]。近年来研究表明,MF的发生发展与氧化应激有着密切的联系,氧化应激通过激活细胞内钙超载,损害线粒体膜电位(MMP),参与MF发生过程,而抗氧化治疗能减轻或抑制MF的发生。本课题组前期研究发现,北五味子木脂素具有改善异丙肾上腺素诱导的心室重构作用,但作用机制尚未完全清楚。五味子乙素(Sch B)作为五味子木脂素的主要活性成分之一,伴随着人们对木脂素的研究而备受关注^[2]。本实验从细胞水平上观察Sch B对AngⅡ刺激心肌成纤维细胞增殖的作用并探讨其作用的初步机制。

1 材料

1.1 试验药物 五味子样品于2010年10月采于吉林省通化县,由北华大学林学院食品科学教研室高晓旭副教授鉴定为Schisandrachinensis(Turcz.)Baill;五味子乙素对照品纯度 $\geq 98\%$,批号20120412,由北华大学林学院食品科学与工程实验室优选新品种(采于沈阳农业大学沃林中草药研究所北五味子实验基地)。

1.2 动物 出生1~3 d的Wistar大鼠乳鼠,雌雄不限,吉林大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号SCXK(吉):2010-0005,动物批号2012-0037。

1.3 试剂 胰蛋白酶(宝泰克生物试剂,批号2011056),AngⅡ(Sigma公司,批号01541),羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物公司,批号20110375),IMDM培养基(HyClone Utah公司,SH30228.01B),胎牛血清(FCS):常州四季青(批号050124),SOD,MDA试剂盒(南京建成生物试剂公司,批号分别为2010012,2010027)。

1.4 仪器 Heraeus型CO₂培养箱(德国Heraeus公司),酶标仪(德国BMG公司),6010型紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),EPICS-Profile II型流式细胞分析仪(美国Coulter公司,Elite),日本Olympus倒置显微镜,超净工作台(苏州

安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 CFb原代培养 无菌取出生后1~3 d的Wistar大鼠乳鼠心室,用冷PBS溶液洗净心腔内残血,剪碎,1.25 g·L⁻¹胰酶在37℃下分散细胞,每隔8 min收集一次细胞,1 000 r·min⁻¹离心8 min,2次,将所得全部细胞置于含100 mL·L⁻¹ FCS的IMDM培养液中,在50 mL·L⁻¹ CO₂、37℃、饱和湿度条件下培养60~90 min,根据CFb较心肌细胞贴壁速度快的原理,采用差速贴壁法,倾去上清液,剩下的细胞即为CFb,加入含100 mL·L⁻¹ FCS的IMDM继续培养。经倒置显微镜、透射电镜、免疫组化纤维粘连蛋白染色阳性和平滑肌肌动蛋白染色阴性鉴定为所需的CFb,纯度达98%,生长近融合时按1:3传代,实验采用2~4代细胞。将纯化后的CFb悬液接种于24孔板,每孔1 mL,培养48 h后换无血清培养基继续培养12 h,分组进行实验。

2.2 实验分组和给药 实验分为5组,对照组:含有IMDM的培养液;AngⅡ组:培养液中加入终浓度为0.1 μmol·L⁻¹的AngⅡ;Sch B(1 μmol·L⁻¹)组:培养液中同时加入终浓度为1 μmol·L⁻¹ Sch B和0.1 μmol·L⁻¹ AngⅡ;Sch B(10 μmol·L⁻¹)组:培养液中同时加入10 μmol·L⁻¹ Sch B和0.1 μmol·L⁻¹ AngⅡ;Sch B(30 μmol·L⁻¹)组:培养液中同时加入30 μmol·L⁻¹ Sch B和0.1 μmol·L⁻¹ AngⅡ,每组设6复孔。

2.3 检测心肌成纤维细胞的增殖活力 各组细胞接种于96孔培养板,每组细胞8复孔,于培养结束前4 h,加入5 g·L⁻¹ MTT 10 μL,待形成蓝紫色的结晶沉淀后加入DMSO 150 μL使沉淀降解,在酶联免疫检测仪上490 nm波长处测定吸光度(A),用只加培养液不加细胞的空白孔调零。

2.4 上清液中MDA,SOD的测定 将24孔板各孔内贴壁的CFb用PBS溶液冲洗3次后,每孔加PBS溶液0.5 mL,将培养板放于-80℃低温冰箱反复冻融3次,破碎细胞,收集每孔内PBS液,离心取上清液测定SOD,MDA。

2.5 激光共聚焦显微镜检测CFb游离的钙离子浓度变化 以24孔板CFb细胞按 3×10^4 /mL密度接种,每孔1 mL,经上述因素处理后,向每孔加入Fluo-

3/AM($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)负载液,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光摇动孵育 40 min ,用Hepes液冲洗细胞3次后,向孔板内依次加入各处理组,在激光共聚焦显微镜下观察。标记后,首先测定细胞内荧光强度作为 0 时刻荧光强度并开始计时, 50 s 时加入 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Ang II,连续扫描共 500 s ,各处理组同上, 250 s 时检测各组细胞荧光强度比值。激光扫描 50 s 前,首先得对照组细胞内钙荧光强度,然后模型组和治疗组分别加入 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Ang II和不同浓度的Sch B,连续观察 10 min 内荧光强度的变化。结果用相对荧光强度 $(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0$ (FI_0 ,FI分别表示给药前后荧光强度)表示细胞内游离的钙浓度。

2.6 线粒体膜电位的测定 将处理过的CFb用 0.25% 胰蛋白酶从培养瓶壁消化后收集于离心管中,用PBS洗涤两次,离心去除细胞碎片,加入 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Rhodamine 123 $50\text{ }\mu\text{L}$,轻轻弹匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min (隔 10 min 振摇1次),PBS洗涤, $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ,弃去染液,加入Triton-X100 $80\text{ }\mu\text{L}$,

轻轻弹匀后, 400 目尼龙网过滤,EILITE型流式细胞仪检测线粒体膜电位,激发光波长为 488 nm ,发射光波长为 534 nm ,每个样本至少收集 $10\text{ }000$ 个细胞,数据采集分析应用Cellquest软件处理。

2.7 统计学处理 所有实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用SPSS 17.0统计软件分析,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 有统计学显著差异。

3 结果

3.1 检测 CFb 的增殖活力 Ang II可显著提高心肌成纤维细胞对MTT的代谢率,MTT A明显升高,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),可证实Ang II对心肌成纤维细胞的促增殖作用。加入不同浓度的Sch B后,A显著低于Ang II组,且呈剂量依赖性,与Ang II组相比有显著性差异($P<0.01$); 24 h 组和 48 h 组的A与Ang II组相比有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 72 h 组Sch B $10,30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比差异有显著性意义($P<0.01$)。见表1。

表1 Sch B对CFb增殖活力的影响($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	0.265 ± 0.040	0.254 ± 0.065	0.115 ± 0.011
Ang II 模型	0.1	$0.300\pm0.038^{1)}$	$0.345\pm0.020^{2)}$	$0.182\pm0.021^{1)}$
五味子乙素	1	$0.231\pm0.064^{3)}$	$0.329\pm0.030^{3)}$	0.171 ± 0.015
	10	$0.230\pm0.037^{3)}$	$0.287\pm0.025^{3)}$	$0.157\pm0.010^{3)}$
	30	$0.228\pm0.043^{4)}$	$0.221\pm0.056^{4)}$	$0.140\pm0.015^{4)}$

注:与对照组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与Ang II模型组相比³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~3同)。

3.2 对 CFb 上清液中 SOD 和 MDA 影响 Ang II组中SOD活性明显降低,MDA水平明显升高,与对照组比较,有显著性差异($P<0.01$),Sch B高、中剂量组均不同程度地增加了SOD含量,减少了MDA生成,与Ang II组比较,具有显著性差异($P<0.05,P<0.01$)。见表2。

表2 五味子乙素对CFb中SOD和MDA水平的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
对照	-	135.81 ± 26.62	1.17 ± 0.06
Ang II 模型	0.1	$122.72\pm21.59^{2)}$	$2.82\pm0.14^{2)}$
五味子乙素	1	$128.79\pm23.54^{3)}$	$1.42\pm0.15^{3)}$
	10	$130.47\pm11.73^{3)}$	$1.30\pm0.12^{4)}$
	30	$132.65\pm27.36^{4)}$	$1.25\pm0.07^{4)}$

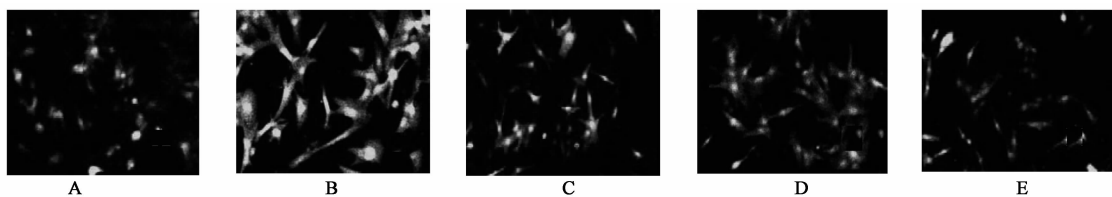
3.3 对线粒体膜电位的影响 Ang II可以明显降低CFb中MMP,与对照组比较,差异极其显著($P<$

0.001),Sch B $10,30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量用药组不同程度的提高了MMP水平,与Ang II组相比,具有显著性差异(分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$)。见表3。

3.4 对细胞内钙离子浓度变化 Ang II作用 500 s 后,细胞内钙瞬时增加,持续 1 min 左右,然后维持平稳状态。Ang II组细胞内钙明显增加,与对照组比较有显著性差异($P<0.01$),Sch B $10,30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能分别抑制Ang II引起的细胞内钙超载,与Ang II组比较,具有显著性差异($P<0.01$)。见表3。

表3 五味子乙素对线粒体膜电位和钙离子荧光强度的影响($\bar{x}\pm s,n=7$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP/ $\Delta\Psi\text{m}$	$[\text{Ca}^{2+}]_i$
对照	-	$3\text{ }069.2\pm282.4$	50.7 ± 4.6
Ang II 模型	0.1	$587.6\pm55.2^{2)}$	$335.6\pm28.3^{2)}$
五味子乙素	1	628.8 ± 59.1	$198.3\pm15.2^{3)}$
	10	$697.4\pm72.3^{3)}$	$178.3\pm14.2^{4)}$
	30	$998.2\pm82.6^{4)}$	$149.1\pm10.1^{4)}$



A. 对照; B. Ang II 模型; C. Sch B $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D. Sch B $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; E. Sch B $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 1 五味子乙素对 Ca^{2+} 荧光强度的影响 (Fluo-3/AM 染色, 激光共聚焦显微镜 $\times 200$)

4 讨论

机体存在一个完整的抗氧化防御系统,各种抗氧化剂之间相互协同依赖,防止氧自由基反应及阻断脂质过氧化链式反应。研究资料表明,少量的活性氧对心肌细胞的正常生理功能具有调节作用^[4]。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 作为一种氧化剂能导致该系统紊乱,使氧自由基生成过多^[1],氧自由基与多种心血管疾病有关,近年有文献报道其通过多种途径诱导了心肌纤维化的发生^[3]。Ang II 通过作用于心肌成纤维细胞上的 I 型受体 ($\text{AT}_1\text{-R}$),异常激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 氧化酶,产生过量的活性氧,通过氧化应激途径引起心肌纤维化的发生,这种作用可被其 $\text{AT}_1\text{-R}$ 阻断剂所阻断。

Ca^{2+} 参与调节细胞的多种功能, Ca^{2+} 通道活化后通过激活胞核基因,增加胞质蛋白质合成,促进心肌纤维化的发生,同时 Ca^{2+} 超负荷与氧自由基的产生之间有一定的关系^[1]。 Ca^{2+} 与其胞浆受体结合后,促进氧自由基的生成。氧自由基可使膜脂质过氧化,膜通透性增加,导致更多的钙离子进入胞内,胞浆超负荷的钙又促进氧自由基的产生, Ca^{2+} 超载在心肌肥厚发展中起着非常重要的作用^[5],而氧自由基可通过多种途径使 Ca^{2+} 浓度升高,进一步加重钙超载,由此形成恶性循环^[3]。

线粒体是细胞内的钙库,对 Ca^{2+} 的释放主要通过 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交换和通透性转换孔 (permeability transition pore, PTP) 实现。心肌纤维化时大量 Ca^{2+} 进入线粒体后,生成大量不溶性的磷酸钙沉积于线粒体内膜,使电子传递链功能障碍,自由基生成增多。高 Ca^{2+} 使线粒体 PTP 呈通透性持久开放状态, Ca^{2+} 释放增加,线粒体肿胀破坏,膜电位降低甚至完全消失,细胞外钙离子内流增加、ATP 生成减少、钙泵转运能力下降,导致胞内钙超负荷^[6]。

超氧化物歧化酶 (SOD) 对清除自由基、维护细胞膜完整性和线粒体超微结构及其正常功能起重要作用。文献报道五味子提取液对大鼠急性心肌缺血具有明显的保护作用,加强和调节心肌细胞和心脏小动脉的能量代谢,改善心肌营养和功能^[7-8],与其保护细胞膜系统免受氧自由基损害提高心肌超氧化物歧化酶活性,降低过氧化脂质 (LPO) 的含量,从而增强心肌清除自由基的能力有关^[9]。本实验结果显示,Ang II 组 MDA 含量显著升高, SOD 活性明显降低,表明纤维化心肌存在氧化与抗氧化失衡,脂质过氧化反应增强,抗氧化酶的保护功能减弱。给予 Sch B 后,各组超氧化物歧化酶活力升高、丙二醛水平降低,说明依 Sch B 可通过提高心肌成纤维细胞的抗氧化能力减少自由基的产生,稳定细胞膜和提高线粒体膜电位,减少钙超载阻止心肌纤维化的发生。

因此 Sch B 通过清除氧自由基提高抗氧化能力,降低胞内钙离子浓度,提高线粒体膜电位从而防止心肌纤维化的发生。但其作用的详细机制尚有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 顾玉梅, 吴扬. 氧化应激在心肌肥厚中的作用及其机制[J]. 南通大学学报:医学版, 2005, 25(3): 233.

[2] Lumdubwong M, Serib P A. Low and medium-DE maltodextrins from waxy wheat starch: preparation and properties[J]. Starch, 2001, 53(10): 605.

[3] Munzel T, Harrison D G. Increased superoxide in heart failure[J]. Circulation, 1999, 100(3): 216.

[4] 王禹川, 丁燕生, 刘梅林, 等. 不同因子致心肌纤维化分子学机制[J]. 医学综述, 2012, 18(17): 2736.

[5] Giordano F J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 500.

[6] 孙学刚, 贾玉华, 张丽华, 等. 丹参酮 II A 对大鼠缺氧及正常心肌细胞内钙、膜电位和线粒体膜电位的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(9): 21.

[7] 王文燕, 陈建光. 五味子的药理作用及开发研究[J]. 北华大学学报:自然科学版, 2007, 8(2): 128.

[8] 高思海, 潘铁成, 李平. 五味子酚对大鼠心脏移植供心的保护作用研究[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 123.

[9] Chen S Z, Fu Y P, Wu R S, et al. Effects of schisanhenol on respiratory burst of rat peritonea. neutrophils [J]. Acta Pharmaceutica Sinica (in Chinese), 2000, 35(8): 571.

[责任编辑 聂淑琴]