

三七总皂苷对L₆大鼠成肌细胞抗化学损伤模型的保护作用**

杨燕华, 朱道立, 陈佩林, 余春梅, 杨玉芹

Protective effect of panax notoginseng saponin against chemical damage of myoblasts in L₆ rats

Yang Yan-hua, Zhu Dao-li, Chen Pei-lin, Yu Chun-mei, Yang Yu-qin

School of Life Science, Nantong University, Nantong 226109, Jiangsu Province, China

Yang Yan-hua, School of Life Science, Nantong University, Nantong 226109, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Zhu Dao-li, Professor, School of Life Science, Nantong University, Nantong 226109, Jiangsu Province, China
zhudaoli@ntu.edu.cn

Supported by: Innovative Training Project for Students of Nantong University, No. 2010038*; Special Foundation for Doctor Station of Nantong University, No. 05024276*

Received: 2011-09-15
Accepted: 2011-12-20

南通大学生命科学学院, 江苏省南通市 226019

杨燕华, 女, 1990年生, 江苏省苏州市人, 汉族, 南通大学本科在读。

通讯作者: 朱道立, 教授, 南通大学生命科学学院, 江苏省南通市 226019
zhudaoli@ntu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)15-02720-04

收稿日期: 2011-09-15
修回日期: 2011-12-20
(20110915012/M · L)

Abstract

BACKGROUND: Panax notoginseng saponin has multiple pharmacological effects such as stasis and clearing and activating the channels and collaterals, but the mechanisms are unclear.

OBJECTIVE: To observe the protective effect of panax notoginseng saponin against H₂O₂ damage of L₆ rat myoblasts and its effect on the expression of Bax and bcl-2.

METHODS: H₂O₂ damaged model of L₆ rat myoblasts was built. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay, 4,6-diamino-2-phenyl indole chemical fluorescence and flow cytometry were applied to detect the survival rates of L₆ rat myoblasts treated with different doses of panax notoginseng saponin (0.5, 0.1 and 0.02 g/L). The effects of different doses of panax notoginseng saponin (0.5, 0.1 and 0.02 g/L) on Bax and Bcl-2 protein expression levels of L₆ rat myoblasts were analyzed by immunofluorescence cytochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: The L₆ rat myoblasts had low survival rate and high apoptosis rate after injury of H₂O₂, while panax notoginseng saponin could obviously increase the survival rate and reduce the apoptosis rate. Immunofluorescence cytochemistry results showed that panax notoginseng saponin could enhance the Bcl-2 expression and inhibit the Bax expression. Panax notoginseng saponin can protect L₆ rat myoblasts from H₂O₂ damage, and the protective effects are in order of sequence of 0.1 g/L > 0.02 g/L > 0.5 g/L. The mechanism may be related to the enhancement of Bcl-2 expression and inhibition of Bax expression.

Yang YH, Zhu DL, Chen PL, Yu CM, Yang YQ. Protective effect of panax notoginseng saponin against chemical damage of myoblasts in L₆ rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2720-2723.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 三七总皂苷具有活血祛瘀, 通脉活络等多重药理作用, 但其具体机制尚不明确。

目的: 观察三七总皂苷对 L₆ 大鼠成肌细胞 H₂O₂ 损伤的保护作用及其对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响。

方法: 建立 L₆ 大鼠成肌细胞 H₂O₂ 损伤模型, 应用 MTT 法、DAPI 化学荧光法和流式细胞仪分析检测各种剂量三七总皂苷(0.5, 0.1, 0.02 g/L)对 L₆ 大鼠成肌细胞存活率的影响; 通过免疫荧光抗体细胞化学法研究各种剂量三七总皂苷(0.5, 0.1, 0.02 g/L)对 L₆ 大鼠成肌细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响。

结果与结论: L₆ 大鼠成肌细胞经 H₂O₂ 损伤后细胞存活率降低、凋亡率增加, 三七总皂苷能明显提高经 H₂O₂ 损伤后细胞的存活率, 降低凋亡率; 免疫荧光抗体细胞化学法表明三七总皂苷能促进 Bcl-2 表达, 抑制 Bax 表达。结果可见三七总皂苷对 L₆ 大鼠成肌细胞 H₂O₂ 损伤具有保护作用, 依次为 0.1 g/L > 0.02 g/L > 0.5 g/L, 其作用可能与上调 Bcl-2 蛋白的表达、抑制 Bax 蛋白的表达有关。

关键词: 三七总皂苷; L₆ 大鼠; 成肌细胞; 过氧化氢; Bcl-2; Bax
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.013

杨燕华, 朱道立, 陈佩林, 余春梅, 杨玉芹. 三七总皂苷对 L₆ 大鼠成肌细胞抗化学损伤模型的保护作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2720-2723. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

三七[Panax notoginseng]为五加科人参属的一个种, 传统药用其块根, 主要应用于人体内外各种出血之症及跌打损伤、淤滞肿痛。本实验通过H₂O₂建立L₆大鼠成肌细胞的化学损伤模型, 探讨三七总皂苷对L₆大鼠成肌细胞化学损伤的保护机能及其作用机制, 能够为其临床应用提供有益参考。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察实验。

时间及地点: 实验于2011-07/12在南通大学生命科学学院细胞生物学实验室完成。

材料:

主要仪器:

主要仪器	来源
SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台	苏州净化设备有限公司
CO ₂ 培养箱、高压灭菌锅	日本 SANYO 公司
荧光倒置显微镜	日本 Nikon 公司
2K15C 台式高速离心机	德国 SIGMA 公司
Model 680 型酶标仪	美国 Bio-RAD 公司
流式细胞仪	美国 Becton-Dickinson 公司
细胞培养板	COSTAT 公司

细胞株、试剂、药品:

细胞株、试剂、药品	来源
L ₆ 大鼠成肌细胞株	中国科学院上海细胞库
三七总皂苷(Panax notoginseng saponin, PNS)	哈尔滨珍宝制药有限公司
DMEM 培养基、胰蛋白酶	美国 GIBCO 公司
无支原体胎牛血清(批号: 090607)	杭州四季青生物工程材料有限公司
碘化丙啶(propidium iodide, PI)、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜、青霉素、链霉素	Sigma 公司
SABC 免疫荧光试剂盒	武汉 BOSTER 生物工程有限公司
乙二胺四乙酸二钠盐、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾、氯化钠和氢氧化钠	广东汕头西陇化工厂
H ₂ O ₂	上海化学试剂采购供应站

方法:

H₂O₂损伤L₆大鼠成肌细胞模型的建立及三七总皂苷的干预: L₆大鼠成肌细胞用体积分数为10%胎牛血清+DMEM培养液常规培养,待细胞长到50%后加入各种剂量(0.5, 0.1, 0.02 g/L)的三七总皂苷在37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱继续培养24 h,然后加入终浓度为0.1 mmol/L的H₂O₂继续培养80 min,建立损伤模型^[1]。模型对照组用不含有三七总皂苷的培养液培养,其余同三七总皂苷组。正常对照组L₆成肌细胞用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液常规培养。

苏木精-伊红染色: L₆大鼠成肌细胞用24孔板培养,苏木精-伊红染色,倒置显微镜下观察细胞形态特征。

MTT法: L₆大鼠成肌细胞接种于96孔板过夜,完全贴壁后,除去培养液,正常对照组和模型对照组加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液200 μL,三七总皂苷组加入各种剂量三七总皂苷(0.5, 0.1, 0.02 g/L)培养液(含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液配制)。孵育24 h后,将模型对照组和三七总皂苷组孔内培养液换成新鲜配制的H₂O₂溶液(浓度0.1 mmol/L,无菌双蒸水配制)100 μL,再化学损伤60 min,然后吸去H₂O₂,PBS洗2次,加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液200 μL,再加入MTT(0.5 g/L)20 μL继续培养4 h,吸去培养液和MTT混合液,加入DMSO 150 μL/孔,用摇床振荡10 min,酶联免疫检测仪(波长570 nm)检测每孔的吸光度值,计算活细胞的比例。设阴性对照组为含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液200 μL。

$$\text{存活率} = \frac{(\text{实验组吸光度值} - \text{阴性对照组吸光度值})}{(\text{模型对照组吸光度值} - \text{阴性对照组吸光度值})} \times 100\%$$

DAPI染色: 将细胞接种在24孔板内,各组分别进行相应的处理,同时放入2 μL DAPI(0.1 g/L)过夜(避光操作),第2天在荧光倒置显微镜下观察并拍照。

荧光抗体检测: 使用武汉BOSTER生物工程有限公司的SABC-Cy3试剂盒检测L₆大鼠成肌细胞中Bax和Bcl-2蛋白的表达。在荧光倒置显微镜下观察并拍照。

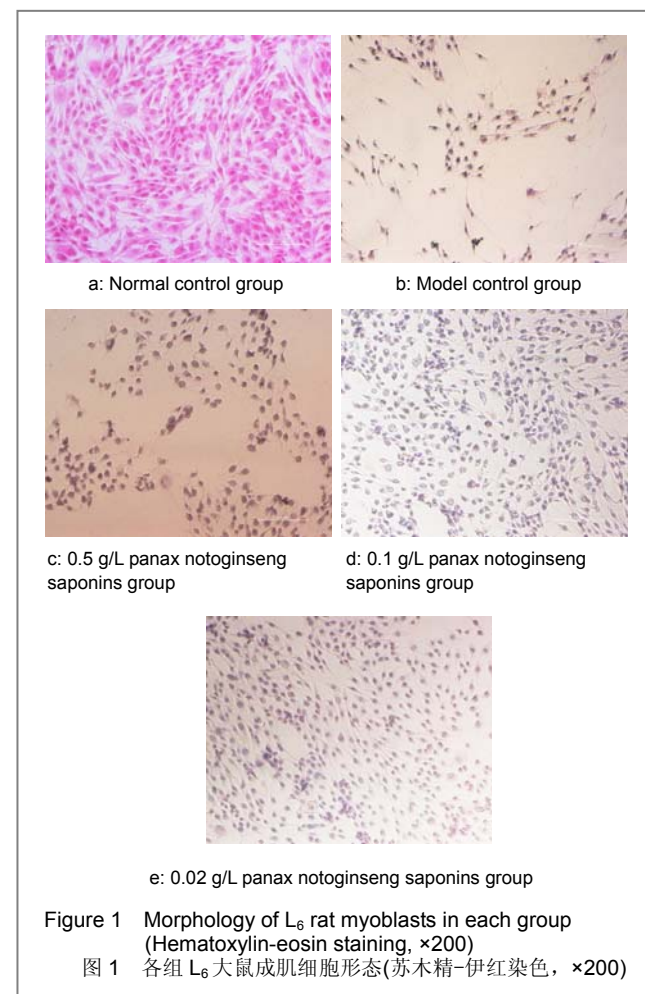
流式细胞仪检测: 冰乙醇固定细胞30 min后,在37 °C条件下用RNase孵育40 min,然后4 °C条件下用碘化丙啶染色,30 min后过尼龙筛,流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率。

主要观察指标: 细胞存活率、细胞形态特征、细胞荧光度(DAPI染色法)、细胞周期和凋亡率、Bax和Bcl-2的表达(细胞化学免疫荧光抗体鉴定法)。

统计学分析: 所有数据经SPSS 15.0软件处理并进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色检测L₆大鼠成肌细胞形态 0.1 mmol/L H₂O₂ 作用1 h,造成细胞形态发生改变,部分细胞的细胞核损坏,出现凋亡小体,细胞轮廓不清晰、细胞膜破损,细胞大片脱落。三七总皂苷组的细胞数量显著高于模型组,且细胞核更加完整,细胞膜边缘也更加清晰,见图1。



2.2 MTT法、DAPI染色及流式细胞仪检测 通过MTT

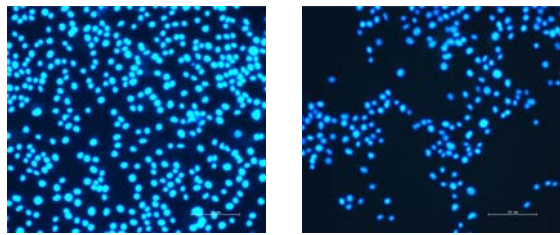
法、DAPI染色及流式细胞仪检测发现, L₆大鼠成肌细胞经H₂O₂损伤后细胞存活率明显降低, 凋亡率升高, 三七总皂苷能提高L₆大鼠成肌细胞的存活率, 减少凋亡率。MTT法检测结果见表1。

表 1 0.1 mmol/L H₂O₂ 损伤 L₆ 大鼠成肌细胞存活率和凋亡率
Table 1 The survival and apoptosis rates of L₆ rat myoblasts damaged by 0.1 mmol/L H₂O₂ (x±s, n=6, %)

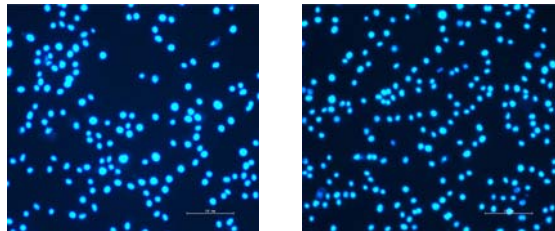
Group	Drug concentration (g/L)	Survival rate	Apoptosis rate
Normal control		96.5±6.9	0
Model control		32.1±3.8 ^a	9.67±2.9 ^a
Panax notoginseng saponins	0.5	48.9±4.2 ^b	2.01±1.3 ^b
	0.1	77.4±5.5 ^b	1.55±1.1 ^b
	0.02	62.7±6.7 ^b	4.05±1.5 ^b

^aP < 0.05, vs. normal control group; ^bP < 0.05, vs. model control group

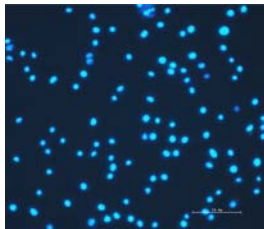
DAPI荧光标记结果显示, 三七总皂苷(0.1 g/L)作用细胞的荧光强度比模型对照组要高很多, 且数量更多, 见图2。



a: Normal control group b: Model control group



c: 0.5 g/L panax notoginseng saponins group d: 0.1 g/L panax notoginseng saponins group



e: 0.02 g/L panax notoginseng saponins group

Figure 2 DAPI fluorescence labeling of L₆ rat myoblasts damaged by H₂O₂ after protection of various doses of panax notoginseng saponin (×200)

图 2 各种剂量三七总皂苷对 H₂O₂ 损伤 L₆ 大鼠成肌细胞保护的 DAPI 荧光标记(×200)

流式细胞仪检测细胞各组的凋亡率表明, 模型对照组凋亡率最高, 正常对照组最低, 各种剂量药物保护组介于两者之间。这些数据证明, 三七总皂苷能有效抵抗 H₂O₂ 化学损伤, 且保护效果依次为 0.1 g/L >

0.02 g/L > 0.5 g/L, 见图3。

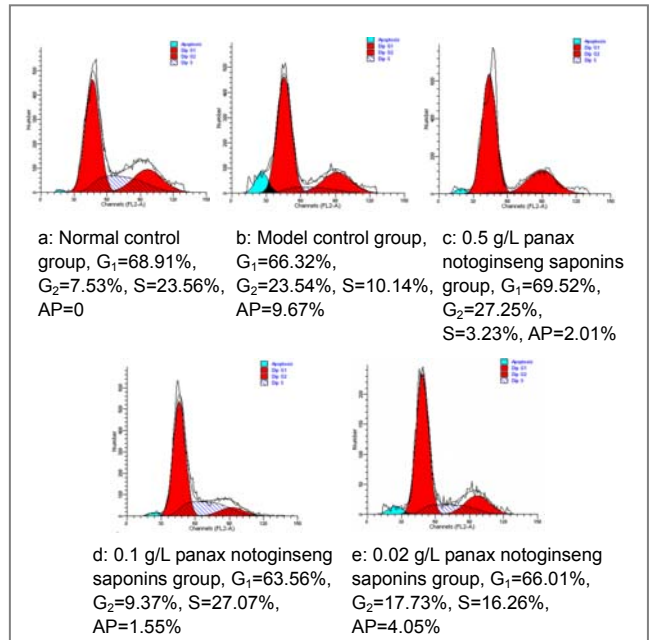
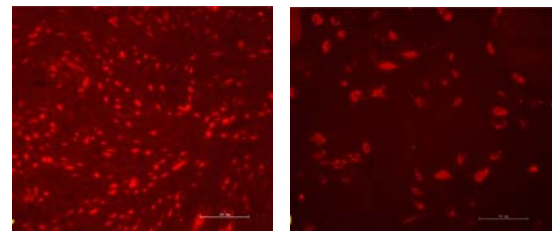


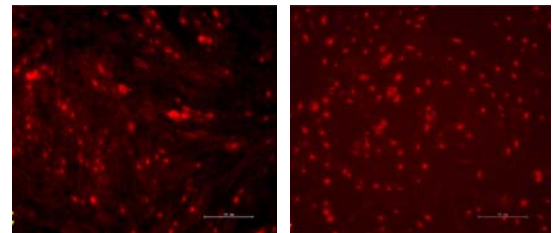
Figure 3 Effect of Panax notoginseng saponin in various doses on proliferation cycle of L₆ rat myoblasts damaged by H₂O₂

图 3 各种剂量三七总皂苷对 H₂O₂ 损伤后 L₆ 大鼠成肌细胞增殖周期影响

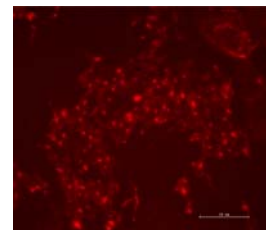
2.3 细胞化学免疫荧光抗体鉴定 见图4, 5, 表2。



a: Normal control group b: Model control group



c: 0.5 g/L panax notoginseng saponins group d: 0.1 g/L panax notoginseng saponins group



e: 0.02 g/L panax notoginseng saponins group

Figure 4 The expression of Bax antibody in L₆ rat myoblasts tested by immunocytochemical staining (×200)

图 4 免疫细胞化学染色法检测各组 L₆ 大鼠成肌细胞 Bax 抗体表达(×200)

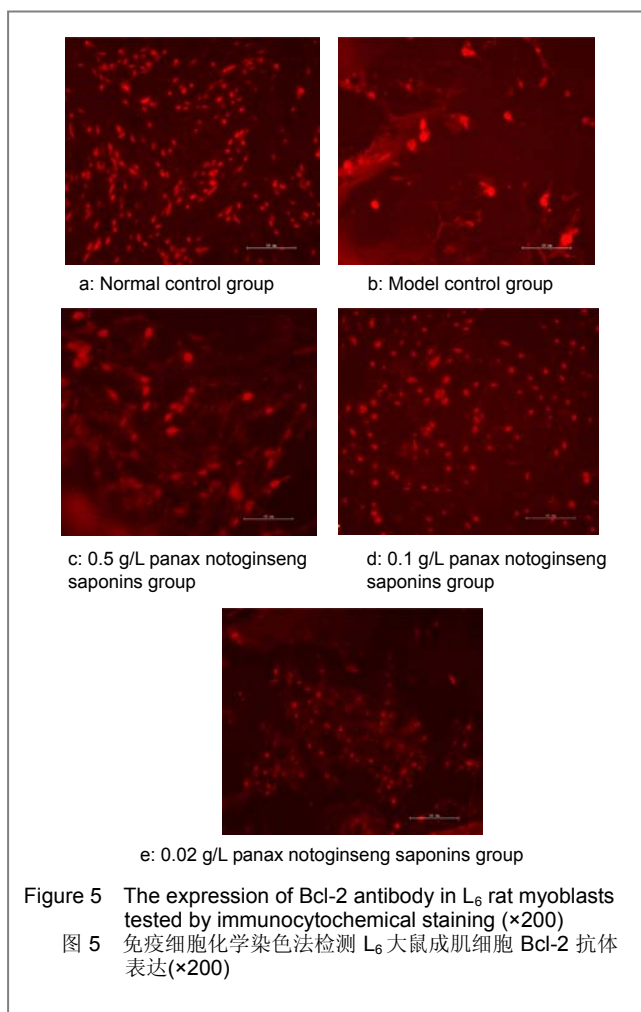


Figure 5 The expression of Bcl-2 antibody in L₆ rat myoblasts tested by immunocytochemical staining (×200)
图 5 免疫细胞化学染色法检测 L₆ 大鼠成肌细胞 Bcl-2 抗体表达(×200)

表 2 各组 L₆ 大鼠成肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达(以阳性细胞数计算)
Table 2 The expression of Bcl-2 and Bax proteins in L₆ rat myoblasts in each group (the number of positive cells was calculated) (x±s, n=6)

Group	Drug concentration (g/L)	Bcl-2 ⁺ cells	Bax ⁺ cells
Normal control		87.1±4.2	52.8±3.7
Model control		51.6±3.4 ^a	86.4±4.7 ^a
Panax notoginseng saponins	0.5	66.8±6.7 ^b	73.7±5.4 ^b
	0.1	79.3±5.9 ^b	59.5±4.2 ^b
	0.02	72.4±4.8 ^b	66.9±5.3 ^b

^aP < 0.05, vs. normal control group; ^bP < 0.05, vs. model control group

由表2可见, 免疫荧光细胞化学抗体染色发现, 模型对照组Bax表达量高于其他组, 三七总皂苷各组具有较低的Bax表达量; 而Bcl-2表达结果恰好相反。

3 讨论

现代药理学表明三七总皂苷具有活血化淤、止血定痛的效果, 对心肌缺血具有保护作用。通过体外三七总皂苷对L₆大鼠成肌细胞化学损伤模型保护的MTT法、DAPI荧光染色及流式细胞仪检测结果, 发现化学损伤模

型组的细胞成活率(32.1±3.8)%, 正常对照组细胞成活率为(96.5±6.9)%, 而三七总皂苷的三组剂量保护细胞成活率效果依次为(48.9±4.2)%, (62.7±6.7)%, (77.4±5.5)%。以0.1 g/L剂量为最佳, 0.02 g/L剂量为其次, 0.5 g/L剂量为较差。

自由基能造成多种组织细胞的损伤^[2], 还能够使蛋白质、核酸等大分子交联, 影响其正常功能^[3]。三七总皂苷具有清除氧自由基的作用^[1], 流式细胞仪结果表明三七总皂苷能够抑制骨骼肌成肌细胞发生凋亡, H₂O₂化学损伤模型组的凋亡率9.67%, 正常对照组的细胞凋亡率为0%, 而0.1, 0.5, 0.02 g/L三七总皂苷药物保护组的凋亡率分别为1.55%, 2.01%, 4.05%。显然0.1 g/L三七总皂苷组细胞抗凋亡能力最强^[4]。

ERK信号传导途径是目前研究最为彻底的MAPK通路^[5]。激活的JNK还能通过激活内源性通路, 使促凋亡分子释放, 从而导致蛋白酶Caspase的激活和细胞凋亡; 特异地阻断JNK激活则可抑制细胞凋亡^[6]。本文结果显示0.1 g/L三七总皂苷组保护成肌细胞抗化学损伤的功能最强。

4 参考文献

- [1] Luo HY, Cheng TJ. Zhongguo Linchuang Yaolixue yu Zhilixue. 2009;14(9):1036-1039. 罗慧英, 程体娟. 甘西鼠尾草注射液与丹参注射液对PC12细胞H₂O₂损伤保护作用比较研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(9): 1036-1039.
- [2] Rusconi F, Mancinelli E, Colombo G, et al. Proteome profile in Myotonic Dystrophy type 2 myotubes reveals dysfunction in protein processing and mitochondrial pathways. Neurobiol Dis. 2010;38(2):273-280.
- [3] Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. Science. 2001; 293(5531):864-867.
- [4] Li W, Zhang J, An W. The conserved CXXC motif of hepatic stimulator substance is essential for its role in mitochondrial protection in H₂O₂-induced cell apoptosis. FEBS Lett. 2010;584 (18):3929-3935.
- [5] Jiang MD, Ma HD, Xie FW, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2003; 11(7):1037-1039. 蒋明德, 马洪德, 解方为. ERK信号传导通路与肝星状细胞周期调控[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(7):1037-1039.
- [6] Bonni A, Brunet A, West AE, et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. Science. 1999;286(5443):1358-1362.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 南通大学大学生创新训练计划资助项目 (2010038), 南通大学博士点建设专项(05024276)。

作者贡献: 实验设计为杨燕华、朱道立, 实验实施为杨燕华、杨玉芹, 实验评估为陈佩林、余春梅, 资料收集为杨燕华。杨燕华成文, 朱道立审核, 朱道立对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。