

天麻素对大鼠骨骼肌细胞化学损伤的保护**

杨玉芹, 朱道立, 陈佩林, 余春梅, 杨燕华

Protection effect of Gastrodin on chemical damage of skeletal muscle cells in rats

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

Abstract

BACKGROUND: Modern pharmacological studies have showed that Gastrodin can restore the imbalance between excitability and inhibition of cerebral cortex, produce sedation, sleep, analgesia and other central inhibition.

OBJECTIVE: To investigate the protective effect of Gastrodin on chemical damage of skeletal muscle cells in L₆ rats.

METHODS: A chemical myoblast damage rat model of L₆ was established by using H₂O₂. Samples of pre-protective group were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing different concentrations of Gastrodin (1.562 500, 0.781 250, 0.390 625 g/L) for a 24-hour pretreatment, followed by the incubation of H₂O₂ (0.1 mmol/L) for 80 minutes. At the same time, the proliferation group (different concentrations of Gastrodin for a 24-hour pretreatment, but not followed by the incubation of H₂O₂), model group (only the incubation of H₂O₂), positive control group (only L₆ rat myoblast suspension), negative control group (only DMEM medium) and control group (without Gastrodin pretreatment and H₂O₂ incubation) were established.

RESULTS AND CONCLUSION: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay showed that the survival rate of the proliferation and pre-protective groups was significantly higher than that of the model group. Cell nuclei were labeled by DAPI turned blue, while the fluorescent intensity of DAPI in the model group was obviously much lower than that in the pre-protective group and so was the quantity of cells labeled by DAPI. Cell nuclei were more regularly shaped, more compact cytoplasm and clearer cell outline in the pre-protective group from hematoxylin-eosin staining. However, cells with structural damages were obviously observed in the model group. Bax and Bcl-2 immunofluorescent cytochemical technique demonstrated that the expression of bax in the model group was evidently higher than that in the pre-protective group, while the expression of bcl-2 was the exact opposite. According to the results of flow cytometry, the rate of apoptosis in the pre-protective group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). It is indicated that Gastrodin has remarkable effect on injury of skeletal muscle cells in rats induced by chemicals.

Yang YQ, Zhu DL, Chen PL, Yu CM, Yang YH. Protection effect of Gastrodin on chemical damage of skeletal muscle cells in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(20): 3735-3738. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 现代药理学研究表明, 天麻的主要成分天麻素可以恢复大脑皮质兴奋与抑制过程间的平衡失调, 产生镇静、安眠和镇痛等中枢抑制作用。

目的: 观察天麻素对 L₆ 大鼠成肌细胞化学损伤的保护作用。

方法: 用 H₂O₂ 建立 L₆ 大鼠成肌细胞的化学损伤模型。DMEM 培养液制备不同浓度的天麻素(1.562 500, 0.781 250, 0.390 625 g/L)预处理保护组的 L₆ 大鼠成肌细胞 24 h, 然后用 0.1 mmol/L H₂O₂ 孵育 80 min, 同时设置增殖组(用不同浓度的天麻素预处理, 但不经 H₂O₂ 处理), 模型组(仅用 H₂O₂ 处理), 阳性对照组(仅有 L₆ 细胞悬液), 阴性对照组(只有 DMEM 培养液), 对照组既不用天麻素预处理, 也不用 H₂O₂ 孵育。

结果与结论: MTT 检测显示, 增殖组和保护组 L₆ 大鼠成肌细胞存活率明显高于模型组; DAPI 荧光标记细胞核为蓝色, 模型组细胞荧光度较弱, 且数目显著少于保护组; 苏木精-伊红染色显示保护组的细胞核形状较规则, 细胞轮廓较清晰, 而模型组破损细胞较多; Bax 和 Bcl-2 免疫荧光细胞化学结果表明, 模型组促凋亡基因 bax 表达明显高于保护组, 而抑制凋亡基因 bcl-2 的表达量完全相反; 流式细胞仪检测显示保护组的凋亡率显著低于模型组($P < 0.05$)。提示天麻素对保护大鼠骨骼肌细胞化学损伤有显著效果。

关键词: 天麻素; L₆ 成肌细胞; 化学损伤; 过氧化氢; 细胞凋亡
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.20.028

杨玉芹, 朱道立, 陈佩林, 余春梅, 杨燕华. 天麻素对大鼠骨骼肌细胞化学损伤的保护[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(20): 3735-3738. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

天麻为兰科天麻属植物天麻的干燥块茎, 又名赤箭芝、独摇芝等, 以干燥块茎入药。其气微, 性平, 味甘, 微辛, 归肝经, 功效为平肝, 息风止痉, 用于头痛眩晕, 肢体麻木等症^[1]。现代药理学研究表明, 天麻的主要成分天麻素(Gastrodin, 也叫天麻苷, 化学名称: 4-羟甲基苯-β-D-吡喃葡萄糖苷半水合物)可以恢复大脑

皮质兴奋与抑制过程间的平衡失调, 产生镇静、安眠和镇痛等中枢抑制作用。

实验通过H₂O₂(0.1 mmol/L)建立L₆大鼠成肌细胞的化学损伤模型, 探讨天麻素注射液对L₆大鼠成肌细胞化学损伤是否有保护作用及可能的生理生化机制。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计, 对比观察。

School of Life Science, Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu Province, China

Yang Yu-qin, School of Life Science, Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Zhu Dao-li, Professor, School of Life Science, Nantong University, Nantong 226019, Jiangsu Province, China
zhudaoli@ntu.edu.cn

Supported by: College Students Innovative Training Program Fund Project of Nantong University, No. 2010038*; Doctoral Special Construction of Nantong University, No. 05024276*

Received: 2011-10-15
Accepted: 2011-12-26

南通大学生命科学学院, 江苏省南通市 226019

杨玉芹, 女, 1989年生, 江苏省徐州市人, 汉族, 南通大学本科在读, 主要从事动物细胞培养的研究。

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: B
文章编号: 1673-8225 (2012)20-03735-04

收稿日期: 2011-10-15
修回日期: 2011-12-26
(20110915011/WL · G)

时间及地点: 实验于2010-07/2011-01在南通大学生命科学学院细胞培养室完成。

材料: L₆大鼠成肌细胞株(L₆ Rat Myoblast Cell Lines), 系中国科学研究院上海细胞库提供。

药品、试剂及仪器:

药品、试剂及仪器	来源
天麻素	重庆西南药业股份有限公司
DMEM 培养基	Gibco™, Invitrogen Corporation
胎牛血清	杭州四季青生物技术有限公司
胰蛋白酶、青霉素、链霉素、噻唑蓝、4, 6-二脒基-2-苯基	Sigma 公司
吖啶(DAPI)、碘化丙啶	
SABC-Cy3 试剂盒	武汉 BOSTER 生物工程有限公司
SW-CJ-2F 型净化工作台	苏州净化设备有限公司
荧光倒置显微镜	日本 Nikon 公司
CO ₂ 培养箱、高压蒸汽灭菌锅	日本 SANYO 公司
TY-80 s 脱色摇床	南京新校园生物技术研究所
Enspire2300 微孔板检测仪	芬兰 Perkin Elmer 公司
BD FACSCalibur 流式细胞仪	美国 Becton-Dickinson 公司

实验方法:

L₆大鼠成肌细胞的培养: 待细胞长到对数生长期时, 弃培养液, 用0.25%胰蛋白酶溶液5 mL消化90 s, 弃胰酶, 加入含体积分数为10%胎牛血清+DMEM培养液终止消化, 并用5 mL玻璃吸管将贴壁的细胞轻轻吹打成细胞悬液, 分到新的瓶中, 每隔两三天换液1次并传代。

化学损伤模型的建立及各组干预: 实验分为5组, 天麻素保护组: 天麻素(1.562 500, 0.781 250, 0.390 625 g/L)预处理24 h, 然后用0.1 mmol/L H₂O₂化学损伤80 min; 模型组: 用0.1 mmol/L H₂O₂化学损伤80 min; 增殖组: 用含体积分数为10%胎牛血清+DMEM培养液制备得到不同浓度的天麻素预处理24 h; 阳性对照组: 用含体积分数为10%胎牛血清+DMEM培养液培养L₆大鼠成肌细胞; 阴性对照组: 只有含体积分数为10%胎牛血清+DMEM培养液, 不含L₆大鼠成肌细胞。

MTT法检测细胞存活率: 在96孔板中, 各组经相应处理后, 弃上清液, 先用0.01 mol/L的PBS 200 μL/孔润洗2遍, 然后加DMEM培养液200 μL/孔和5 g/L的MTT 20 μL/孔, 反应4 h后弃液体, 加DMSO 150 μL/孔, 在脱色摇床上振荡10 min, 最后在酶标仪上570 nm处检测吸光度(A)值, 计算存活率, 并进行统计学分析。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{(\text{实验组 A 值} - \text{阴性对照组 A 值})}{(\text{阳性对照组 A 值} - \text{阴性对照组 A 值})} \times 100\%$$

DAPI荧光标记和苏木精-伊红染色观察细胞形态变化: DAPI常用于细胞核染色。苏木精-伊红染色是病理组织学鉴定最常用的染色方法, 各组进行苏木精-伊红染色。

免疫荧光细胞化学SABC法检测抗体Bax和Bcl-2蛋白: bcl-2基因可抑制各种刺激下多种细胞的凋亡, 而bax基

因属于bcl-2基因家族, 其编码的Bax蛋白可与Bcl-2形成异二聚体, 对Bcl-2产生阻抑作用, 促进细胞凋亡。实验使用SABC-Cy3试剂盒检测L₆大鼠成肌细胞中Bax和Bcl-2抗体蛋白。

流式细胞仪检测L₆大鼠成肌细胞的凋亡率: 细胞经冰乙醇固定后37 °C条件下用RNAase孵育, 在4 °C条件下用碘化丙啶染色, 半小时后过尼龙筛, 进行流式细胞仪检测。

主要观察指标: MTT法检测各组细胞的存活率; DAPI荧光标记细胞核、苏木精-伊红染色观察细胞的形态变化; 免疫荧光细胞化学SABC法检测Bax和Bcl-2蛋白; 流式细胞仪检测L₆大鼠成肌细胞凋亡率。

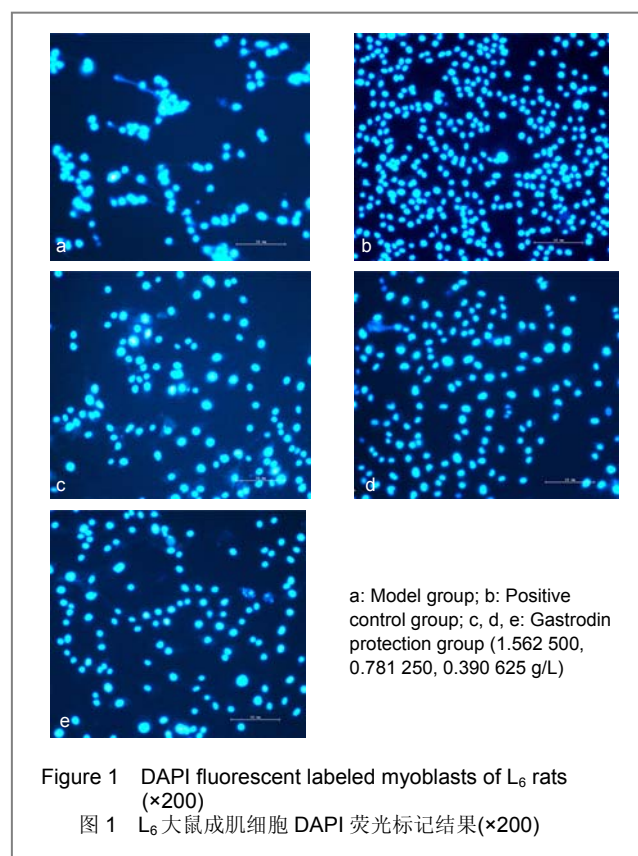
统计学分析: 由第一作者采用SPSS 15.0软件进行单因素方差分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组L₆大鼠成肌细胞的生长情况 增殖组的细胞数量显著高于模型组, 细胞核完整, 细胞膜边缘清晰。模型组的L₆大鼠成肌细胞在各方面都不如增殖组。

2.2 L₆大鼠成肌细胞的存活率 天麻素保护组和增殖组均用不同浓度的天麻素预处理24 h, 故相比于模型组存活率更高, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 DAPI荧光标记和苏木精-伊红染色结果 见图1。



DAPI荧光标记结果显示, 天麻素保护组细胞荧光强

度比模型组高, 细胞核相对更加完整; 而模型组细胞核频繁出现破损、边缘模糊等现象。

苏木精-伊红染色结果显示, 模型组细胞普遍出现凋亡细胞的典型形态特征: 细胞呈圆形, 胞核深染, 染色质成团块状, 胞质浓缩, 而保护组破损细胞相对较少, 见图2。

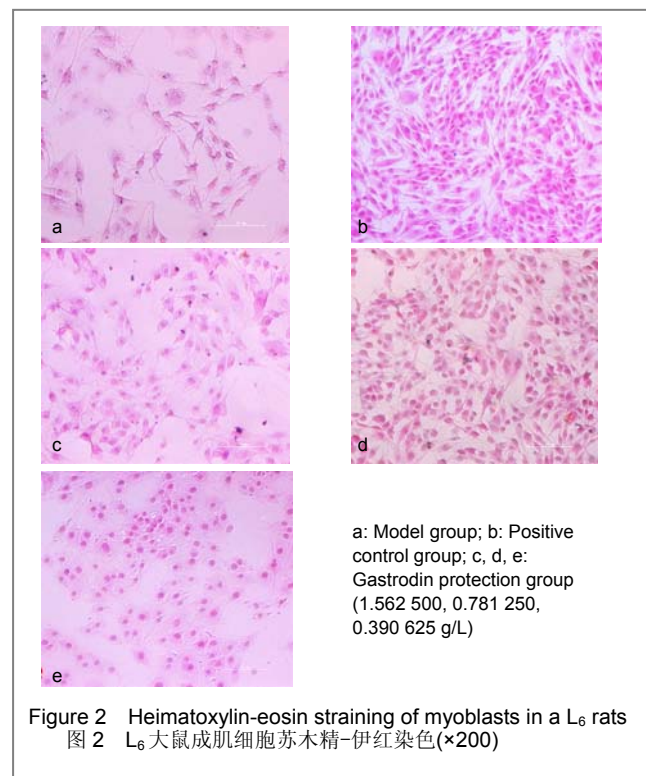


Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of myoblasts in a L₆ rats
图2 L₆大鼠成肌细胞苏木精-伊红染色(×200)

2.4 SABC法检测Bax和Bcl-2蛋白的表达 见图3, 4。

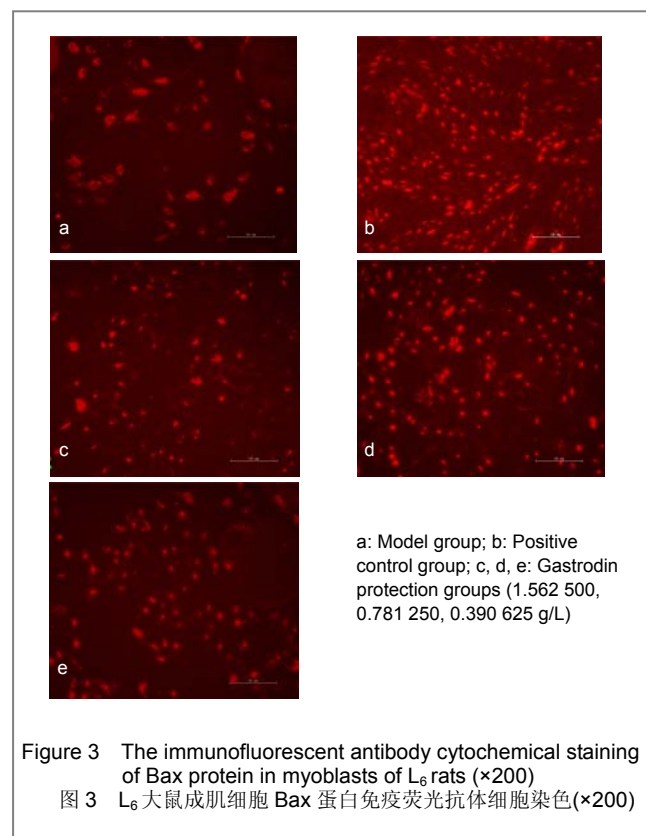


Figure 3 The immunofluorescent antibody cytochemical staining of Bax protein in myoblasts of L₆ rats (×200)
图3 L₆大鼠成肌细胞 Bax 蛋白免疫荧光抗体细胞染色(×200)

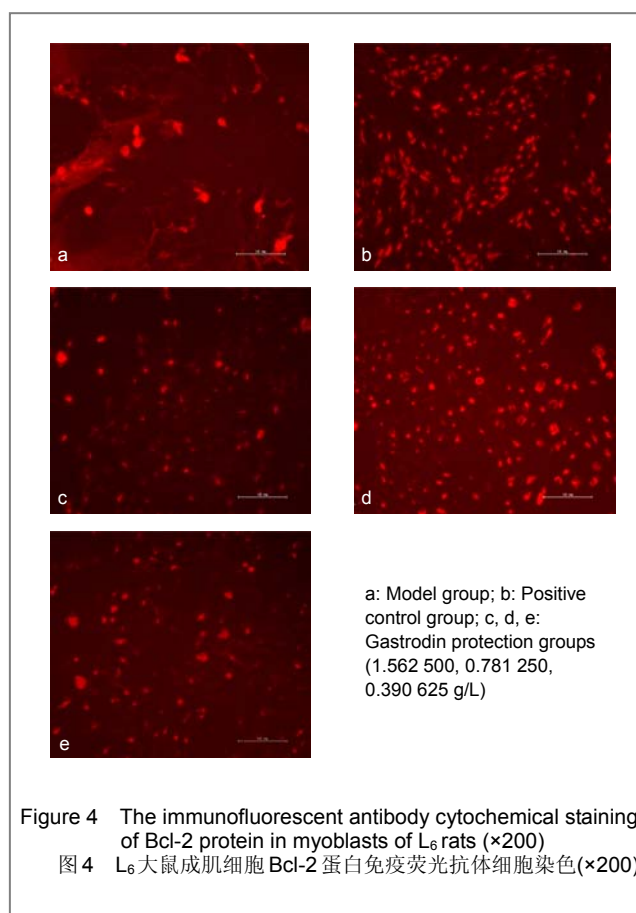


Figure 4 The immunofluorescent antibody cytochemical staining of Bcl-2 protein in myoblasts of L₆ rats (×200)
图4 L₆大鼠成肌细胞 Bcl-2 蛋白免疫荧光抗体细胞染色(×200)

与阳性对照组相比, 模型组Bax蛋白表达上调, Bcl-2蛋白表达下调, 而保护组与之完全相反, 表明天麻素对L₆大鼠成肌细胞由H₂O₂(0.1 mmol/L)造成的化学损伤确实具有保护作用。而且, 检测结果显示0.781 250 g/L天麻素保护组具有最好的保护效果,

2.5 流式细胞仪检测L₆大鼠成肌细胞的凋亡 见图5。

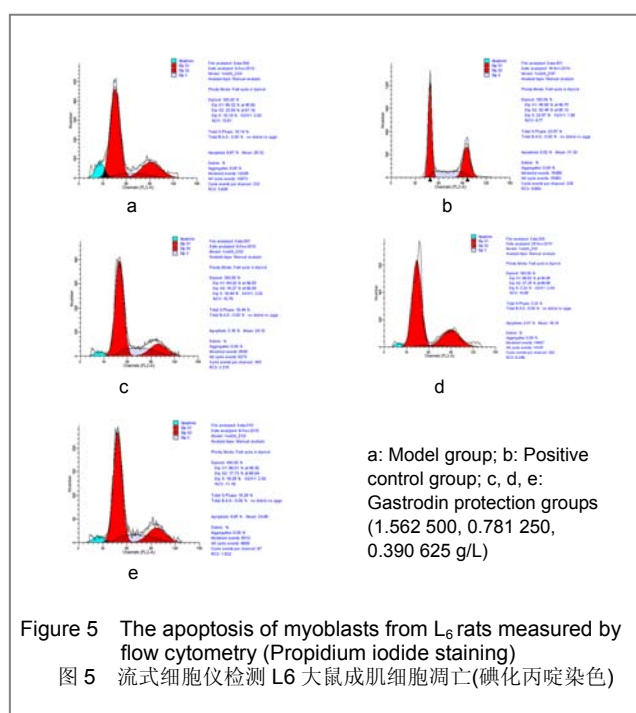


Figure 5 The apoptosis of myoblasts from L₆ rats measured by flow cytometry (Propidium iodide staining)
图5 流式细胞仪检测 L₆大鼠成肌细胞凋亡(碘化丙啶染色)

流式细胞仪检测结果显示, 模型组凋亡率最高(9.67%), 阳性对照组最低(0%), 保护组介于两者之间(3.16%, 2.01%, 4.05%), 表明天麻素能有效抵抗H₂O₂损伤, 且0.781 250 g/L天麻素保护组的保护效果最好。

3 讨论

3.1 天麻素的药理作用 天麻素是从名贵中药天麻中提取出来的活性成分含量最高的有效单体, 又称天麻苷。李海龙等^[2]研究发现天麻素对百草枯和代森锰诱导的小鼠脑黑质多巴胺能神经元损伤具有一定的保护作用。作者推测, 天麻素中的某些基团能与活性氧反应, 减小自由基对L₆大鼠成肌细胞的损伤作用。天麻素中等剂量增殖组0.781 250 g/L的成活率达(125.57±8.10)%, 而高剂量增殖组1.562 500 g/L与低剂量增殖组0.390 625 g/L的成活率分别达到(106.71±6.20)%和(99.67±5.90)%, 高于对照组的(96.50±6.90)%。对骨骼肌卫星细胞的增殖作用明显。

3.2 H₂O₂形成的氧化损伤模型 据报道, 人体内总自由基中约95%以上属氧自由基, 常见的有超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H₂O₂)、羟自由基(HO $\cdot$)等^[3-4]。正常情况下, 机体自身存在清除氧自由基的抗氧化防御系统。例如, 通过超氧化物歧化酶(SOD)或者通过维生素A、C、E等的作用。目前, 有很多学者都是通过H₂O₂建立损伤模型, 进行相关的研究, 并获得了一定的研究成果^[5-7]。实验通过MTT法检测结合DAPI荧光染色与苏木精-伊红染色, 结果显示, 模型组为(30.84±2.8)%, 天麻素保护组的效果依次是0.781 250, 1.562 500, 0.390 625 g/L, 其成活率分别为(75.66±5.50)%、(63.91±4.20)%、(48.70±2.70)%, 均高于模型组的(30.84±2.80)%。

3.3 细胞凋亡的信号通路 细胞凋亡的信号通路研究已经成为热点。杨泽松等^[8]研究发现苦参碱(Mat)能够降低ERK的磷酸化水平, 增加JNK、p38的磷酸化水平, 从而抑制ERK活性, 提高JNK、p38活性, 引起人淋巴瘤细胞(U937)的凋亡。应用Bax和Bcl-2蛋白免疫荧光抗体细胞实验结合流式细胞仪检测证实, 模型组凋亡率最高为9.67%, 正常对照组最低是0, 而天麻素保护组凋亡率介于两者之间为2.01%, 3.16%, 4.05%, 表明天麻素能有效抵抗H₂O₂损伤的效果依次为0.781 250,

1.562 500, 0.390 625 g/L; 尤以0.781 250 g/L最好。

4 参考文献

- [1] GuoJia Yaodian Weiyuanhui. Beijing: Huaxue Gongye Chubanshe. 2005:39-40.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005:39-40.
- [2] Li HL, Su Y, Hou RR, et al. Chengdu Zhongyiyao Daxue Xuebao. 2010;33(1):57-59.
李海龙, 栗艳, 厚荣荣, 等. 天麻素对百草枯和代森锰诱导的小鼠脑黑质多巴胺能神经元损伤的保护作用[J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(1): 57-59.
- [3] Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, et al. Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH₄OH-induced gastric lesions of rats using a 300 MHz in vivo ESR technique. Free Radic Res. 2003;37(7):757-766.
- [4] Boonen KJ, Langelaan ML, Polak RB, et al. Effects of a combined mechanical stimulation protocol: Value for skeletal muscle tissue engineering. J Biomech. 2010;43(8):1514-1521.
- [5] Baldari CT, Lanzavecchia A, Telford JL. Immune subversion by Helicobacter pylori. Trends Immunol. 2005;26(4):199-207.
- [6] Ye JX, Wang L, Yang B, et al. Zhongguo Shiyang Fangjixue Zazhi. 2010;16(2):56-59.
叶锦霞, 王岚, 杨滨, 等. 红花水提物对乳鼠心肌细胞H₂O₂所致损伤的保护作用及ESR谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2):56-59.
- [7] Li CL, Liu DB, Yuan Y, et al. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2010; 32(15):1621-1624.
李春莉, 刘钉宾, 袁颖, 等. Apg-2对H₂O₂诱导的BaF3-P210细胞损伤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(15):1621-1624.
- [8] Yang ZS, Mu J, Chen JB, et al. Zhongguo Zhongyao Zazhi. 2009; 34(12):1553-1556.
杨泽松, 牟君, 陈建斌, 等. 苦参碱通过MAPK信号转导通路促进U937细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1553-1556.

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: 第一作者、通讯作者进行实验设计, 实验实施为第一、五作者, 实验评估为第三、四作者, 资料收集为第一作者、第一作者成文, 通讯作者审校, 第一作者对文章负责。

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符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 课题设计的创新之处: 方法创新: 采用苏木精-伊红染色结合 DAPI 染色作病理鉴定。技术创新: 应用 MTT 法检测成活率、流式细胞仪检测凋亡率, 以及运用天麻素对过氧化氢化学损伤 L₆ 大鼠成肌细胞模型的药物保护。理论创新: 通过 Bcl-2、Bax 等抗体定量分析证实 JNK/SAPK 被激活等, 因高、中、低剂量天麻素对大鼠成肌细胞的增殖和药物保护作用作为创新点得到相关基金资助。