

牛磺酸对大乳鼠心肌细胞抗氧化作用的荧光免疫化学分析

张星光¹ 依桂艳² 吕肖锋^{* 1} 刘汉菊³ 许秀萍¹ 焦秀敏¹

(北京军区总医院内分泌科¹ 心血管内科², 北京 100700)

³(吉化集团公司总医院磁共振科, 吉林 132000)

摘要 应用免疫和化学分析方法探讨牛磺酸(Taurine, Tau)对原代培养的新生大乳鼠心肌细胞的保护作用,为心血管疾病的治疗提供理论依据。将原代培养的乳鼠心肌细胞随机分为对照组、过氧化氢(H₂O₂)损伤模型组以及H₂O₂损伤加药物治疗组。预先12 h给予Tau治疗药物后,使用H₂O₂损伤心肌细胞4 h,在倒置显微镜观察Tau对心肌细胞形态学的影响。β-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5)-Dimethylthiazazo(-z-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)化学分析法测定心肌细胞的存活率,化学试剂盒检测心肌细胞内超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量的变化,利用荧光探针DCFH-DA分析检测心肌细胞中活性氧的水平。结果表明,H₂O₂损伤心肌细胞4 h后,Tau可使吸光度升高,并增加心肌细胞SOD活性、降低MDA含量及活性氧水平下降。由此可见,采用荧光免疫分析方法可证实Tau能减轻自由基对心肌细胞的损伤,从而达到保护心脏的作用。

关键词 牛磺酸; 心肌细胞; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 过氧化氢

1 引言

心血管疾病是危害人类健康的严重疾病,是造成死亡的主要原因之一。在我国,心血管疾病已经成为仅次于恶性肿瘤的第二号杀手,并且每年还有数以万计的人因患该病导致残疾,防止心血管疾病发生发展及降低其致死致残率已是非常严峻的问题。心血管疾病的防治已成为我国21世纪提高人民健康水平的重中之重。各种心脏病,如缺血性心脏病、心肌炎、心肌病、慢性充血性心力衰竭等疾病引起心功能下降,心肌组织变化主要是心肌细胞(Myocardial cell, MC)数量减少或功能降低,由此导致心脏顺应性降低,心脏舒缩功能障碍,以上改变最终均会导致心功能衰竭、心律失常、心脏猝死的发生。所以,开发能保护心肌细胞的药物具有重要的现实意义。研究表明,牛磺酸对病毒性心肌炎、心肌缺血的疾病具有治疗作用^[1,2],但从细胞水平研究牛磺酸对氧化应激造成的心肌细胞损伤的报道较少^[3]。本研究应用荧光免疫分析方法,分析Tau对体外培养的MC的影响,初步探讨其对心脏的保护作用及机制,为防治心血管疾病提供思路及理论基础。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂及动物

半自动生化测定仪(澳大利亚 Sunrise 公司);荧光共聚焦显微镜和 CKX41 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);UV-5300 紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);9602A 酶标仪(北京艾普生物设备有限公司);CO₂ 培养箱 HERAEUS(中国苏净集团安泰公司)。超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成试剂公司);活性氧检测试剂盒(Reactive oxygen species assay kit,碧云天生物技术研究);Tau(中国医药集团上海化学试剂公司,批号 20061109);Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IM-DM)培养基(Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青公司);胰蛋白酶(Dfco 公司);β-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, Sigma 公司);Wistar 乳鼠(清洁级,由北京大学动物部提供)。

2011-12-23 收稿;2012-02-29 接受

* E-mail: nfmk@126.com

2.2 实验过程

2.2.1 心肌细胞原代培养 出生1~3 d的Wistar乳鼠,无菌取出心脏后用凉磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗心腔内残余血液,剪碎心脏组织,用0.045%胰蛋白酶在37℃水浴分次消化,收集上清液,并用小牛血清终止消化,以1000 r/min离心10 min,将离心后所得细胞用含10%小牛血清的IMDM悬浮,接种于大小适宜的培养瓶中,贴壁90 min后,轻轻振荡吸出尚未贴壁的细胞,即MC。将纯化后MC悬液(5×10^5 /mL)分别接种于96孔板,每孔200 μ L; 24孔板,每孔1 mL。培养48 h后,更换无血清IMDM继续培养12 h,分组进行实验。

2.2.2 实验分组和给药 将无血清培养后的MC随机分为对照组、 H_2O_2 损伤组及Tau大剂量(120 mmol/L) + H_2O_2 组、Tau中剂量(60 mmol/L) + H_2O_2 组、Tau小剂量(30 mmol/L) + H_2O_2 组,每组设8个复孔,对照组和模型组采用无血清IMDM。各给药组先用含药无血清IMDM预先与MC共孵育12 h,再用终浓度为300 μ mol/L H_2O_2 损伤MC 4 h后,进行以下各项指标的检测。

2.2.3 MTT比色法测定细胞存活力 MTT即3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5)-Dimethylthiaziazolo(-z-yl)-3,5-diphenyltetrazoliumbromide),是一种黄色的颜料。MTT比色法是一种检测细胞存活和生长的方法。本实验中各组细胞经处理后,加入终浓度为5 mg/mL的MTT,在37℃的 CO_2 孵箱中孵育4 h后,去掉MTT,每孔加入150 μ L二甲基亚砷,在摇床上振荡15 min,使蓝紫色结晶甲瓩完全溶解,采用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定各组光吸收值^[3]。

2.2.4 超氧化物歧化酶和丙二醛的测定 24孔板培养的MC使用 H_2O_2 损伤4 h后,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每孔加0.5 mL PBS溶液;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缓冲液;离心取上清液,按照化学试剂盒说明测定超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛含量^[4]。

2.2.5 活性氧的测定 24孔板培养的MC使用 H_2O_2 损伤4 h后,以PBS溶液冲洗3次,去除细胞培养液;加入终浓度为10 μ mol/L的DCFH-DA,在37℃细胞培养箱内孵育20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA,直接用荧光共聚焦显微镜观察MC内活性氧(ROS)的水平^[5,6]。

3 结果与讨论

3.1 细胞形态学观察

观察Tau对 H_2O_2 损伤的MC的保护作用。 H_2O_2 是一种活性氧的提供者,是体内氧化代谢的中间产物,大量积聚时会对细胞产生毒性,导致人体正常细胞和组织的损坏,从而引起多种疾病^[4]。本实验中, H_2O_2 损伤MC 4 h后,在倒置显微镜下观察细胞形态学变化,并计数搏动节律。结果表明,对照组MC细胞核折光性好,伪足饱满且相互连接,呈半融合状态生长,搏动节律一致,50~70次/min; H_2O_2 损伤组MC细胞核暗淡,伪足萎缩且细胞间连接减少,搏动节律减慢,20~30次/min; Tau(60 mmol/L) + H_2O_2 组MC细胞核折光性强于 H_2O_2 损伤组,伪足略变细,搏动节律为40~50次/min(图1)。由此可见,Tau对 H_2O_2 损伤的MC具有保护作用。

3.2 Tau对 H_2O_2 损伤的MC存活力的影响

采用Tau对MC预先给药24 h,经300 μ mol/L H_2O_2 损伤4 h后,MTT法测定A值, H_2O_2 组A值为 0.348 ± 0.045 ,与对照组 0.618 ± 0.007 比较,差异显著($p < 0.001$),说明 H_2O_2 损伤模型成立; Tau大、中、小剂量 + H_2O_2 组的A值分别为 0.583 ± 0.045 , 0.537 ± 0.053 和 0.526 ± 0.042 ,与 H_2O_2 组比较,差异均显著(表1)。MTT法检测MC的存活力的原理:活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶能将外源性MTT还原为不溶性的蓝紫色结晶甲瓩,并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砷能溶解细胞中的甲瓩,用酶联免疫检测仪在490 nm波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数量范围内,MTT结晶的形成量与细胞数量成正比。实验表明,Tau大、中、小剂量组对 H_2O_2 损伤的MC均具有保护作用。MTT法在活的细胞内形成的甲瓩结晶量可间接反映活细胞的数量,进一步说明了Tau对 H_2O_2 损伤的MC具有保护性作用。

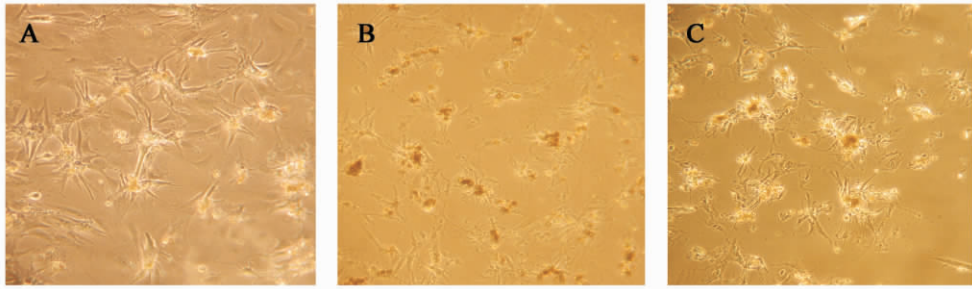


图1 倒置显微镜下观察 Tau 对 H₂O₂ 损伤的原代培养的心肌细胞的形态学变化的影响

Fig. 1 Morphology change of primary cultured neonatal rat myocardial cell damaged by 0.3 mmol/L H₂O₂ under inverted microscope (×100)

A: 对照组 (Control group); B: H₂O₂ 损伤组 (H₂O₂ damaged group); C: Tau 组 (Taurine (Tau) group), 60 mmol/L。

表1 Tau 对 H₂O₂ 损伤的 MC 存活力的影响

Table 1 Effect of Tau on survival ability of myocardial cell damaged by H₂O₂

分组 Group	剂量 Dose (mmol/L)	吸光度 Absorbance (490 nm)	分组 Group	剂量 Dose (mmol/L)	吸光度 Absorbance (490 nm)
对照组 Control group	0	0.618±0.049	牛磺酸+H ₂ O ₂ 组	120	0.583±0.045 ^b
H ₂ O ₂ 组	0.3	0.348±0.045 ^a	Tau+H ₂ O ₂	60	0.537±0.053 ^c
H ₂ O ₂ group				30	0.526±0.042 ^c

^a. $p < 0.001$ vs control group; ^b. $p < 0.001$, ^c. $p < 0.01$ vs H₂O₂ group.

3.3 Tau 对 H₂O₂ 损伤后的心肌细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响

人体内的氧可通过多种途径产生自由基,如超氧阴离子($\cdot O_2^{\cdot -}$)、羟自由基($\cdot OH$)、还原性一氧化氮($NO\cdot$)等^[5],但由于细胞内存在超氧化物歧化酶(SOD)可迅速清除自由基,使自由基的生成和清除处于平衡状态;但在 MC 缺血等条件下,可产生大量自由基,而 SOD 的清除能力有限,使自由基的生成与清除平衡失控,积累大量自由基,细胞膜脂质氧化生成丙二醛(MDA),MC 严重损伤,引起心脏迟发性功能障碍。本实验采用黄嘌呤氧化酶法测定 MC 中 SOD 活性,硫代巴比妥酸显色法测定 MC 中 MDA 含量。SOD 是机体清除自由基的主要酶,MC 内 SOD 活性高低间接反映 MC 清除自由基的能力,而 MDA 的含量的变化间接反映了 MC 中氧自由基含量的变化,反映 MC 损伤程度。实验结果表明,大、中和小剂量 Tau 组使 MC 内 SOD 活性增加,与 H₂O₂ 损伤组比较差异显著 ($p < 0.05$);大、中剂量 Tau 组使 MDA 生成量减少,与 H₂O₂ 损伤组比较,差异显著 ($p < 0.01$) (见表 2)。

表2 Tau 对 H₂O₂ 损伤后的心肌细胞 SOD 活性和丙二醛含量的影响

Table 2 Effect of Tau on the content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) of myocardial cell damaged by H₂O₂

组 Group	剂量 Dose (mmol/L)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mL)	丙二醛 MDA (μ mol/L)	组 Group	剂量 Dose (mmol/L)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mL)	丙二醛 MDA (μ mol/L)
对照组 Control	0	38.9±1.04	0.14±0.11	牛磺酸+H ₂ O ₂ 组	120	35.8±0.82 ^b	0.34±0.03 ^b
H ₂ O ₂ 组	0.3	18.7±1.63 ^a	0.95±0.05 ^a	Tau+H ₂ O ₂	60	27.3±1.38 ^c	0.24±0.18 ^c
H ₂ O ₂ group					30	23.5±1.28 ^d	0.54±0.09

^a. $p < 0.05$ vs control group; ^b. $p < 0.001$, ^c. $p < 0.01$, ^d. $p < 0.05$ vs H₂O₂ group.

3.4 Tau 对 H₂O₂ 损伤后心肌细胞内活性氧水平的影响

超氧阴离子自由基、羟自由基、脂氧自由基、二氧化氮、一氧化氮、过氧化氢、单线态氧和臭氧,统称活性氧(Reactive oxygen species, ROS)。体内活性氧自由基具有一定的功能,如参与人体免疫和细胞信号传导。但活性氧自由基过多就会有破坏作用,从而引起多种疾病^[6,7]。研究表明,ROS 参与了心肌细胞损伤过程^[8]。因而寻求测定 MC 内 ROS 的方法,验证抗氧化剂能减轻 ROS 对心肌的损伤尤为重要和迫切。

活性氧检测试剂盒(Reactive oxygen species assay kit)是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的试剂盒。DCFH-DA 本身无荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。由于 MC 是贴壁培养细胞,因而采用原位装载探针方法,即按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$,去除细胞培养液,于 24 孔板的一个孔至少加入 $300 \mu\text{L}$ 已稀释的 DCFH-DA。在 37°C 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。采用激光共聚焦显微镜直接观察 MC 内 ROS 的变化(含量),绿色光的强弱与 ROS 含量正相关(图 2)。A 图片即对照组,MC 内的 ROS 含量较少;B 图片即 H_2O_2 损伤组,MC 内的 ROS 含量较多;C、D 和 E 图片分别是 Tau 大、中和小剂量组,MC 内的 ROS 含量剂量依赖性减少;F 图片是 ROS 阳性对照组,MC 内的 ROS 含量很高。Tau 大、中和小剂量组使 MC 内 ROS 含量减少,与 H_2O_2 损伤组比较差异显著 ($p < 0.05$)。可见应用荧光化学分析知 Tau 通过减少 MC 内 ROS 来保护 H_2O_2 对心肌细胞的损伤。

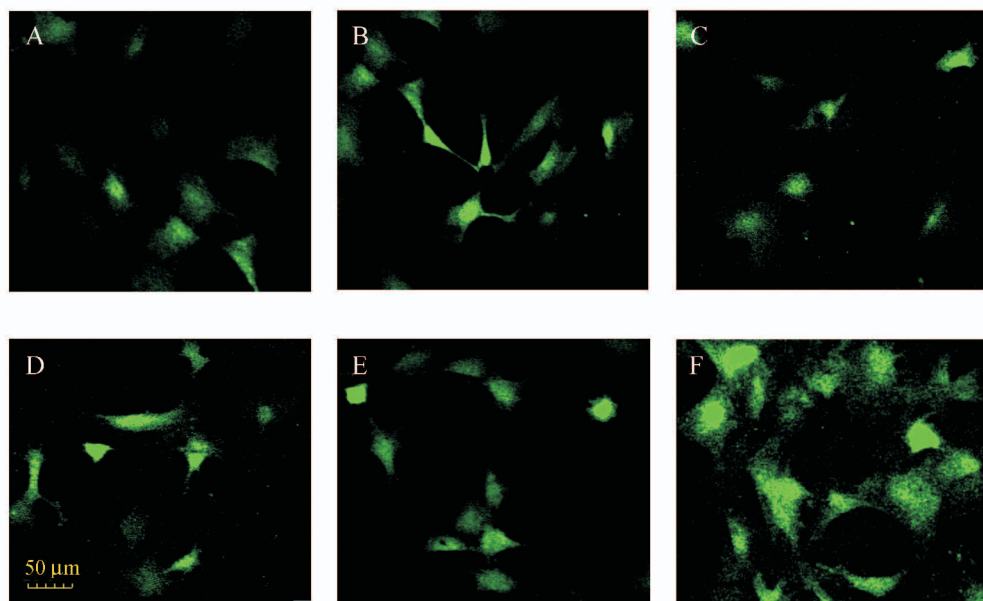


图 2 荧光共聚焦显微镜观察 Tau 对 H_2O_2 损伤后心肌细胞内活性氧水平的影响

Fig. 2 Reactive oxygen species change of primary cultured neonatal rat myocardial cell damaged by 0.3 mmol/L H_2O_2 under laser confocal scanning microscope images ($\times 200$)

A: 对照组; B: H_2O_2 损伤组; C: 牛磺酸组 (120 mmol/L); D: 牛磺酸组 (60 mmol/L); E: 牛磺酸组 (30 mmol/L); F: 阳性药组 (50 mg/mL)。A: Control group; B: H_2O_2 damaged group; C: Tau group (120 mmol/L); D: Tau group (60 mmol/L); E: Tau group (30 mmol/L); F: Rosup group (50 g/L) .

4 结 论

本实验采用荧光免疫化学方法研究 Tau 对 H_2O_2 损伤的 MC 的作用,通过化学反应分析发现 Tau 能增强受损 MC 的存活力;使 SOD 活性增加及 MDA 生成减少;同时能降低 MC 内活性氧的水平,表明 Tau 对心脏的保护作用可能是与其具有较强的抗氧自由基损伤作用有关。Tau 对体外培养的大鼠乳鼠 MC 具有保护作用,表明 Tau 对心肌病变的近期疗效及预后有益,可能具有一定的应用前景。应用免疫荧光化学方法研究心血管疾病为其治疗提供参考。

References

1. LIU Hui, JIN Yu-Lan, XU Ying-Jun, ZHOU Rui-Hua. *Foreign Medical Sciences*, 2002, 13(1): 40~41
刘辉,金玉兰,徐应军,周瑞华. 国外医学, 2002, 13(1): 40~41

- 2 ZHENG Min , WU Ji-Liang , LI Li-Zhong , YIN Shi-Hua , BAO Cui-Yu. *Chinese Pharmacological Bulletin* , 2003 , 19(5) : 536 ~ 539
郑敏 , 吴基良 , 李立中 , 尹时华 , 鲍翠玉. 中国药理学通报 , 2003 , 19(5) : 536-539
- 3 WANG Yan-Chun , REN Kuang , GU Rao-Sheng , YANG Shi-Jie. *Herbal Medicine* 2009 , 40(8) : 1280 ~ 1283
王艳春 , 任旷 , 顾饶胜 , 杨世杰. 中草药 , 2009 , 40(8) : 1280 ~ 1283
- 4 LI Jing , ZHAO Li-Jing , LI Hong , YANG Shi-Jie. *Jurnal of Jilin University* , 2006 , 32(2) : 245 ~ 247
李晶 , 赵丽晶 , 李红 , 杨世杰. 吉林大学学报(医学版) , 2006 , 32(2) : 245 ~ 247
- 5 Cuzzocrea S , Riley D P , Caputi A P. *Pharmacol. Res.* , 2001 , 53(1) : 135 ~ 159
- 6 Chen Y R , Nie S D , Shan W , Jiang D J , Shi R Z , Zhou Z , Guo R , Zhang Z , Li Y J. *Eur. J. Pharmacol.* , 2007 , 571(1) : 44 ~ 50
- 7 Jiang B , Du J , Liu J H , Bao Y M , An L J. *Brain. Res.* , 2008 , 1188(1) : 139 ~ 147
- 8 Chen K , Chen J , Li D. *Hypertension* , 2004 , 44 (5) : 655 ~ 661

Fluorescence Immunoassay and Chemical Analysis of Effect of Taurine on Neonatal Rat Myocardial Cells Antioxidant Role

ZHANG Xin-Guang¹ , YI Gui-Yan² , LÜ Xiao-Feng^{*1} , LIU Han-Ju³ , XU Xiu-Ping¹ , JIAO Xiu-Min¹

¹(Endocrinology Department of General Hospital of Beijing Military Region , Beijing 100700 , China)

²(Cardiovascular Department of General Hospital of Beijing Military Region , Beijing 100700 , China)

³(Second Affiliated Hospital of Beihua University Department of Magnetic Resonance , Jilin 132000 , China)

Abstract The protective effect of taurine (Tau) on primary cultured neonatal rat myocardial cells was investigated by immune and chemical analysis methods to obtain the theoretical basis for the treatment of cardiovascular disease. The myocardial cells were randomly divided into below groups: control group , H₂O₂ damage group and taurine groups. The morphological changes of myocardial cells damaged for 4 h by 300 μm/L H₂O₂ under the inverted microscope were observed. Meanwhile , myocardial cell survival rate was measured by 3-(4,5)-dimethyl-thiazolyl-2-yl-5-diphenyl-tetrazoliumromide(MTT) chemical analysis method , superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content changes were detected by chemical reagent kit , the level of reactive oxygen species(ROS) in myocardial cell were measured by the way of fluorescence probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assays. The results showed that , after myocardial cells were injured for 4 h by H₂O₂ , Tau could increase the A value and SOD activity in myocardial cells , and reduce the content of MDA and decline reactive oxygen species levels. The fluorescence immunoassay method can prove that Tau could reduce free radical on myocardial cells injury to cardiac protective effect.

Keywords Taurine; Myocardial cells; Superoxide dismutase; Malondiadehyde; Hydrogen peroxide

(Received 23 December 2011; accepted 29 February 2012)