

氧化苦参碱对 H₂O₂ 诱导的 L₆ 成肌细胞凋亡的影响*

朱道立** 王康乐 陈佩林 姜雅琼

(南通大学生命科学学院, 南通 226019)

摘要 研究氧化苦参碱对 L₆ 大鼠成肌细胞 H₂O₂ 凋亡的影响. 采用过氧化氢损伤 L₆ 大鼠成肌细胞的方法, 建立 L₆ 大鼠成肌细胞 H₂O₂ 凋亡模型. 使用剂量为 0.3, 0.15, 0.75 g/L 的氧化苦参碱处理细胞. 应用 MTT 法统计存活率和流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率, 用 DAPI 荧光染色、HE 染色以及 Bax 和 Bcl-2 抗体鉴定损伤程度, Western blot 检测蛋白质差异. 结果表明, H₂O₂ 损伤的成肌细胞存活率降低, 凋亡率增加. 各种剂量氧化苦参碱能提高成肌细胞的存活率, 促使 Bcl-2 增高, Bax 降低. 对成肌细胞的保护程度随氧化苦参碱剂量增加而增强, 在剂量为 0.3 g/L 时, 效果显著, 其次是 0.15、0.75 g/L 的氧化苦参碱. 其生理生化机制是氧化苦参碱保护 H₂O₂ 通过 NFκB 信号通路造成的大鼠成肌细胞凋亡模型. 结果显示, 氧化苦参碱具有作为新的抗氧化药物的潜力.

关键词 氧化苦参碱, H₂O₂ 诱导凋亡模型, L₆ 大鼠成肌细胞, Bcl-2, Bax

学科分类号 Q593+3, Q26

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00308

氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是从豆科槐属植物苦参(*Sophora flavescens* Ait)等中提取的生物碱, 具有四环的喹啉啶类结构(图 1). 近年来文献报道, OMT 具有调节血脂、抗氧化、抗肿瘤、抗肝炎病毒及肝损伤、抗心律失常、抗炎和增强免疫等多方面药理作用^[1-2].

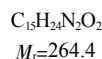
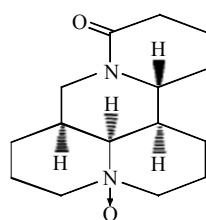


Fig. 1 Molecular structure of oxymatrine

L₆ 大鼠成肌细胞是骨骼肌发育分化研究中常用的细胞模型, 成肌过程是一个成肌细胞的诱导增殖和分化的过程, 包括成肌细胞内部控制的决定 - 多核细胞的产生 - 肌小管的形成以及分化为成熟的肌纤维细胞, 成肌细胞株在分化成肌小管的不

同阶段, 能够表达各种蛋白, 结蛋白(desmin)和肌动蛋白(actin)等细胞因子, 是骨骼肌细胞分化中最早出现的分子标记, 其中 desmin 为骨骼肌特异性的调节分子, 是成肌细胞末端分化过程中重要的标记分子^[3-4].

过氧化氢(H₂O₂)作为活性氧家族中的一员同时也是体内氧化代谢的中间产物, 氧化能力很强, 可由超氧阴离子自发歧化生成, 并能进一步生成羟自由基. H₂O₂ 很易穿透细胞膜到达细胞内位点, 也可直接作用于膜脂质, 形成脂质过氧化物, 导致细胞膜的损伤, 而且还能够通过脂质过氧化物分解代谢产物丙二醛(MDA), 促使蛋白质交联聚合反应引起细胞损伤^[5-6].

本实验旨在通过建立不同浓度 H₂O₂ 损伤的 L₆ 大鼠成肌细胞模型, 应用各种剂量氧化苦参碱对细胞的保护作用进行探讨.

* 南通大学博士点建设专项(05024276)和南通市科技局社会发展科技计划资助项目(S2008022).

** 通讯联系人.

Tel: 0513-85012821, E-mail: zhudaoli@ntu.edu.cn

收稿日期: 2011-07-06, 接受日期: 2012-03-22

1 材料和方法

1.1 实验材料

L₆ 大鼠成肌细胞株(L₆ rat myoblast cell)由中国科学院细胞库提供。

1.2 主要仪器和设备

SW-CJ-2C 超净工作台购自苏州安泰空气技术有限公司; MCO-17AIC CO₂ 培养箱购自 SANYO 生化电子有限公司; MLS-3020 系列不锈钢压力蒸汽灭菌锅(SANYO 生化电子有限公司); Nikon 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司); Bio-Tek ELX800 全自动酶标仪(美国宝特公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 主要试剂

氧化苦参碱(正大青春宝集团); BA0315 bax 抗体和 BA0412 Bcl-2 抗体(Boster 公司); DMEM 培养基(dulbecco's modified eagle medium, Gibco 公司); 青霉素 (penicillin G sodium salt)、链霉素 (streptomycin sulfate)及胰蛋白酶(trypsin 购自 Sigma 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、总蛋白提取试剂盒、 β -actin 抗体、Bcl-2 抗体(鼠抗)、Bax 抗体(鼠抗)、辣根过氧化物酶、标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)均购自碧云天生物技术研究所。

1.4 实验方法

1.4.1 L₆ 大鼠成肌细胞株体外传代培养. 待培养瓶内的细胞密度达 90%以上后, 弃原培养液, 用 PBS (0.01 mol/L)洗涤, 再用 0.25%胰酶溶液消化 90 s (37℃), 弃胰酶, 加入 10%FBS+DMEM+青霉素和链霉素各 100 U/ml, 生长培养基终止消化; 用吸管将贴壁的细胞吹打成为成肌细胞悬液, 分装为 3 瓶, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养, 3 天换液一次. 于倒置显微镜下观察细胞的生长情况。

1.4.2 各剂量氧化苦参碱对 L₆ 大鼠成肌细胞的保护. 分别将各剂量 3.0、1.5、0.75 g/L 的氧化苦参碱添加到培养的细胞内. 置于 5% CO₂, 37℃ 培养箱培养 24 h。

1.4.3 不同浓度 H₂O₂ 损伤的 L₆ 大鼠成肌细胞模型的建立. 大鼠成肌细胞株在 10% FBS+DMEM+青、链霉素生长培养基内按常规方法培养, 待其呈对数生长期后加入各剂量氧化苦参碱, 继续在 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 然后加入终浓度为 1、0.5、0.1 mmol/L 的 H₂O₂ 继续培养 1 h, 诱导损伤成 L₆ 大鼠成肌细胞凋亡模型。

1.4.4 甲基四唑蓝(MTT)检测. 将对数生长期的成肌细胞悬液用台盼蓝染色, 拒染率在 95%以上, 调整细胞数为 2×10⁵ 个/ml, 取每孔 100 μ l 接种于 96 孔板(2×10⁴ 个/孔), 每种设置 3 个复孔. ①正常对照组: 未做处理的成肌细胞; ②损伤模型组: 0.1 mmol/L 的 H₂O₂ 氧化损伤; ③0.75 g/L+0.1 mmol/L H₂O₂ 损伤细胞的氧化苦参碱组; ④ 1.5 g/L + 0.1 mmol/L H₂O₂ 损伤细胞的氧化苦参碱组; ⑤ 3 g/L+0.1 mmol/L H₂O₂ 损伤细胞的氧化苦参碱组. 分别常规培养 24 h 后实施化学损伤 1 h, 再添加 5 g/L MTT 20 μ l/孔, 继续培养 4~6 h 后弃上清液, 加 DMSO 150 μ l/孔, 于微板振荡器上充分振荡, 待蓝色晶体完全溶解后, 在酶标仪(波长为 570 nm)检测每孔的吸光度值(A)并按照公式计算成肌细胞的存活率^[7].

$$\text{存活率(\%)} = (A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

1.4.5 DAPI 细胞核荧光染色和 HE 染色的病理学鉴定. 分别作 0.02% DAPI 细胞核荧光染色和 HE 染色后在 Nikon 荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.4.6 流式细胞仪检测细胞凋亡. 收集并调整 L₆ 成肌细胞浓度至 1×10⁶ 于 6 孔板中培养, 0.25%胰酶消化 90 s, 去除胰酶后用 1 ml 0.01 mol/L PBS 制成细胞悬液, 移入 1.5 ml 离心管离心(4 000 r/min, 5 min), 去上清; PBS 洗涤 2 次, 形成 0.1 ml L₆ 成肌细胞株悬液. 加预冷的无水冰乙醇 1 ml, 4℃ 固定 30 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 RNAase(500 mg/L) 37℃ 孵育 40 min, PI(碘化丙锭, 125 mg/L)均匀染色, 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率。

1.4.7 免疫荧光细胞化学染色法检测 Bcl-2 和 Bax 抗体. 4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定 30 min, 蒸馏水洗 2 min×3 次; 滴加 PBS 1:10 稀释正常血清封闭液室温 10 min, 甩去多余液体; 加入一抗稀释液(1:200), 37℃, 孵育 1~2 h, 用 PBS 洗 2 min×3 次; 滴加 PBS 稀释的二抗(1:100)孵育 30 min, PBS 洗 2 min×3 次; 滴加 PBS 稀释的 SABC-Cy3 (1:100), 孵育 30 min, PBS 洗 5 min×4 次. 荧光镜检, 拍照。

1.4.8 Western blot 检测 L₆ 成肌细胞蛋白. 收集细胞, 细胞总蛋白抽提及蛋白质浓度测定参照试剂盒说明. 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 蛋白质转至聚偏二氟乙烯(PDFV)膜, 4℃ 封闭 1 h, 加一抗, 4℃ 过夜, PBS 漂洗 2 次, 1 min/次, 再用 TBST 缓冲液洗 1 min, 二抗孵育 1 h, PBS 漂洗 2 次, 1 min/次, 再用

TBST 缓冲液洗 1 min, 化学发光, 显影, 定影. 以 β -actin 为内参, 每个样本重复 3 次. 一抗工作液浓度: 抗 Bax, 1 : 250, 抗 Bcl-2, 1 : 250, 抗 β -actin, 1 : 250. Western 条带应用图像凝胶成像系统, 灰度分析软件进行吸光度分析计算. 目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值作为相应目的蛋白的表达量.

1.4.9 统计学处理. 应用 SPSS17.0 统计软件处理相关科研数据. 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验. $P < 0.05$, 统计学上有显著意义.

2 结 果

2.1 不同浓度的 H₂O₂ 凋亡模型

正常培养的大鼠成肌细胞呈梭形或纺锤形, 细胞密度较大(图 2a). 而凋亡模型组细胞形态发生明显的变化, 随着 H₂O₂ 浓度的增加, 凋亡的成肌细胞数目增加并有大量细胞死亡(图 2).

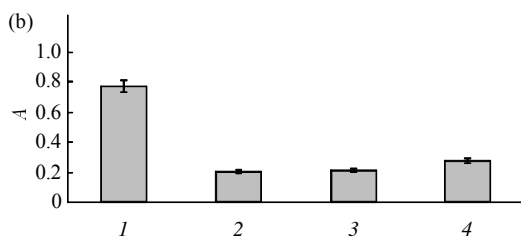
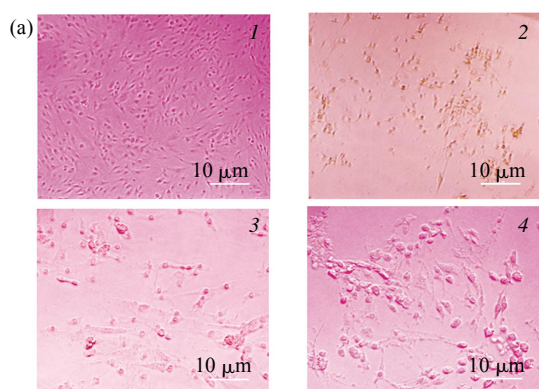


Fig. 2 The L₆ rat myoblast cell apoptosis model induced by different concentration of H₂O₂

(a) Observation under microscope. (b) A histogram from quantitative detection. 1: Normal culture cell; 2: 1 mmol H₂O₂ injured cell; 3: 0.5 mmol/L H₂O₂ injured cell; 4: 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$, there is significance meaning on statistics.

2.2 各种剂量氧化苦参碱对 L₆ 大鼠成肌细胞的增殖作用

与正常培养的大鼠成肌细胞相比, 加入氧化苦

参碱后细胞数量明显增多. 说明氧化苦参碱对成肌细胞有增殖作用, 且随着氧化苦参碱剂量提高而呈现逐渐增加的趋势(图 3).

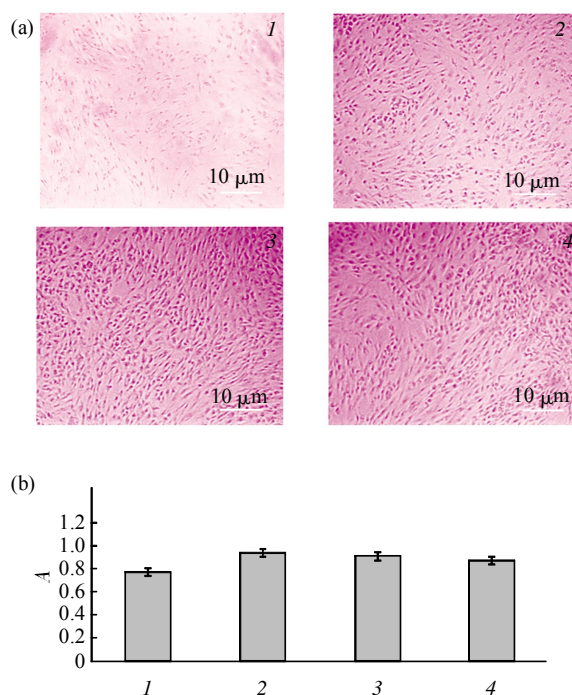


Fig. 3 The L₆ rat myoblast cell proliferated by various dose of oxymatrine

(a) Observation under microscope. (b) A histogram from quantitative detection. 1: Normal culture cell; 2: 3 g/L oxymatrine culture cell; 3: 1.5 g/L oxymatrine culture cell; 4: 0.75 g/L oxymatrine culture cell. $\bar{x} \pm s$, $P < 0.05$, there is significance meaning on statistics.

2.3 药物对 H₂O₂ 凋亡模型的保护作用

与凋亡模型组(图 2)比较, 加入氧化苦参碱实施药物保护后(图 4), 细胞存活率显著提高.

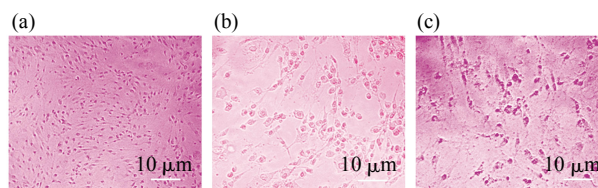


Fig. 4 Protective effect of various dose of oxymatrine on L₆ rat myoblast cell damaged by 0.1 mmol/L H₂O₂

(a) 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injury. (b) 1.5 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injury. (c) 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injury.

2.4 DAPI 标记 L_6 大鼠成肌细胞

用 DAPI 荧光标记后在荧光倒置显微镜下观察。未经药物保护的 H_2O_2 损伤 1 h 成肌细胞大量死亡(图 5), 且损伤程度随 H_2O_2 浓度的提高而增加。加入氧化苦参碱保护后存在大量未损伤细胞(图 6), 经过氧化苦参碱保护后细胞存活率显著提高。

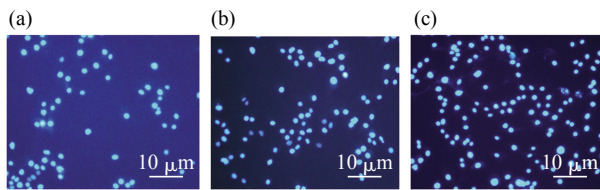


Fig. 5 DAPI fluorescent sign of L_6 rat myoblast cell apoptosis model induced by different concentration of H_2O_2

(a) 0.5 mmol/L H_2O_2 injured cell. (b) 0.2 mmol/L H_2O_2 injured cell. (c) 0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell.

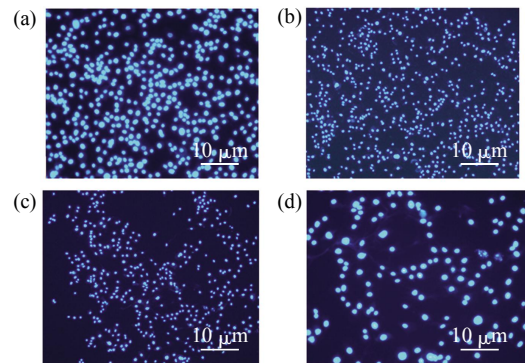


Fig. 6 DAPI fluorescent sign of protective effect of various dose of oxymatrine on L_6 rat myoblast cell damaged by H_2O_2

(a) Normal contrast group. (b) 3.0 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (c) 1.5 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (d) 0.75 g/L oxymatrine protection+0.1mmol H_2O_2 injured cell.

2.5 苏木精-伊红(HE)染色 L_6 大鼠成肌细胞

1.0、0.5、0.1 mmol/L H_2O_2 损伤 1 h 的 L_6 大鼠成肌细胞模型组 HE 染色, 和各种剂量氧化苦参碱保护后细胞存活率明显提高的 HE 染色, 均与 DAPI 标记结果相吻合(图 7)。

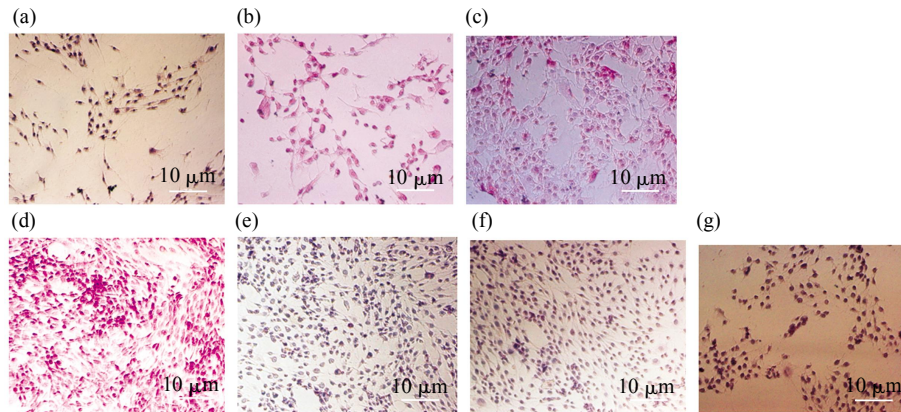


Fig. 7 Protective effect of various dose of oxymatrine on L_6 rat myoblast cell damaged by H_2O_2 detected by HE Staining

(a) 1.0 mmol/L H_2O_2 injured cell. (b) 0.5 mmol/L H_2O_2 injured cell. (c) 0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (d) Normal contrast group. (e) 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (f) 1.5 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (g) 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell.

2.6 氧化苦参碱对 H_2O_2 处理的成肌细胞存活率和凋亡率影响

通过 MTT 法及流式细胞仪检测发现, L_6 大鼠成肌细胞经 H_2O_2 损伤后细胞存活率明显降低, 凋

亡率增加。氧化苦参碱能提高 L_6 成肌细胞的存活率, 减少凋亡的发生, 其保护程度随氧化苦参碱剂量的增加而加强(表 1 和图 8)。

Table 1 The A value and apoptosis rate of L₆ rat myoblast cell damaged by 0.1 mmol/L H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Groups	Drug concentration/(g·L ⁻¹)	A	Apoptosis rate/%
Contrast group	Equal volume	0.78±0.031	0
Model group	Equal volume	0.28±0.023 ^b	32.5±2.91 ^b
Oxymatrine	0.75	0.39±0.023 ^c	26.7±2.83 ^c
Oxymatrine	1.5	0.41±0.021 ^c	23.3±2.62 ^c
Oxymatrine	3	0.47±0.032 ^c	21.1±2.54 ^c

^bCompare with contrast group, P<0.05; ^cCompare with model group, P<0.05.

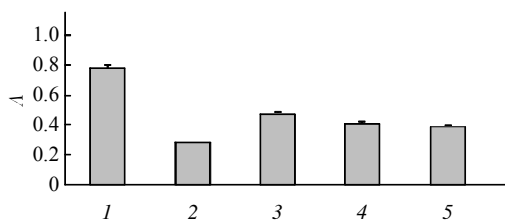


Fig. 8 Quantitative detection on protective effect of various dose of oxymatrine on L₆ rat myoblast cell damaged by H₂O₂

1: Normal contrast group; 2: 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell; 3: 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell; 4: 1.5 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell; 5: 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. $\bar{x} \pm s$, P<0.05, There is significance meaning on statistics.

流式细胞仪检测发现, L₆ 大鼠成肌细胞经 H₂O₂ 损伤 1 h 后凋亡率明显增加, 而氧化苦参碱能减少凋亡的发生, 在剂量为 3 g/L 时效果显著, 结果见表 1 和图 9.

2.7 免疫细胞化学荧光抗体染色

2.7.1 免疫细胞化学染色法检测 desmin 抗体. 通过免疫细胞化学染色法检测 desmin 抗体, 排除上皮、内皮细胞, 证明是肌细胞(图 10). 以氧化苦参碱剂量为 3 g/L 时保护效果最好. Desmin 是细胞内结构和胞外基质联结系统中的一个重要的中间丝蛋白, 可能是离心收缩引起肌小节紊乱的重要机制. Desmin 是位于 Z 盘周围, 连接于 Z 盘与 Z 盘之间. 同时将 Z 盘和肌细胞膜联结到一起的结构蛋白, 在稳定肌节结构和沿肌纤维各个方向传递张力的过程发挥重要作用.

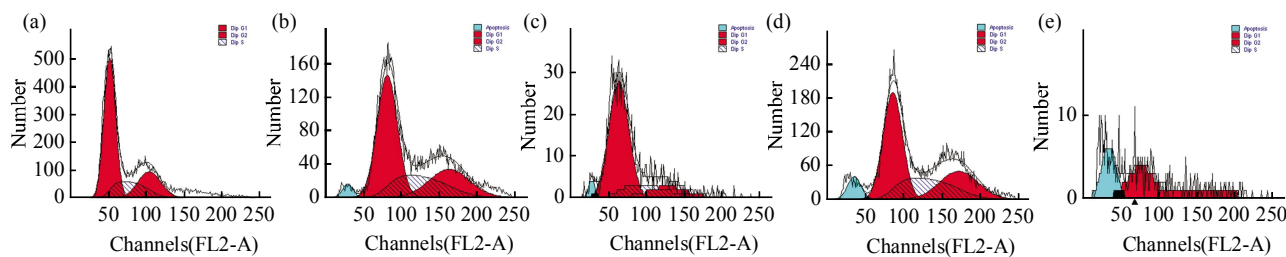


Fig. 9 Effect of various dose of oxymatrine on the proliferation period of L₆ rat myoblast cells damaged by 0.1 mmol/L H₂O₂

(a) The normal contrast group of L₆ rat myoblast cells: G1(Peak 2)=58.50%, G2(Peak 3)=22.11%, S=19.39%, AP=0. (b) 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injury: G1(Peak 2)=55.02%, G2(Peak 3)=16.36%, S=28.62%, AP(Peak 1)=21.06%. (c) 1.5 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injury: G1(Peak 2)=64.44%, G2(Peak 3)=11.73%, S=23.83%, AP(Peak 1)=23.32%. (d) 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injury: G1(Peak 2)=68.69%, G2(Peak 3)=17.14%, S=14.17%, AP(Peak 1)=26.67%. (e) 0.1 mmol/L H₂O₂ injury: G1(Peak 2)=56.47%, G2(Peak 3)=41.89%, S=1.63%, AP(Peak 1)=32.45%. Peak 1 appear after DNA break: subdiploid peak; Peak 2: DNA peak during G1 mean diploid peak; Peak 3: G2 peak.

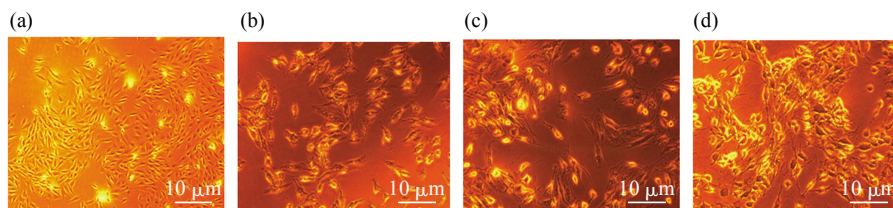


Fig. 10 The desmin antibody of L₆ rat myoblast cell tested by immunocytochemistry staining

(a) Normal contrast group. (b) 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (c) 1.5 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (d) 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell.

2.7.2 免疫细胞化学染色法检测 α -actin 抗体. 通过免疫细胞化学染色法检测 α -actin 抗体, 排除平滑肌细胞, 证明是骨骼肌、心肌细胞(图 11). 以氧化苦参碱剂量为 3 g/L 时保护效果最好. α -actin-2 和 -3 的血影蛋白重复区域与蛋白 FATZ (一种定位在 Z 带区的 γ -filamin/ABP-L- α -actin 和 telethonin 的结合蛋白)、ALP(α -actin 偶联的 LIM 蛋白)、myotilin 及踝蛋白(talin)相互作用, 定位在横纹肌肌节的 Z 带. 肌联蛋白(titin)也可通过它的可变剪接产生的 Z 重复片段与 α -actin 的 C 端结构域作用, 调节肌动蛋白丝束中 α -actin 的交联数目, 从而调节 Z 带厚度.

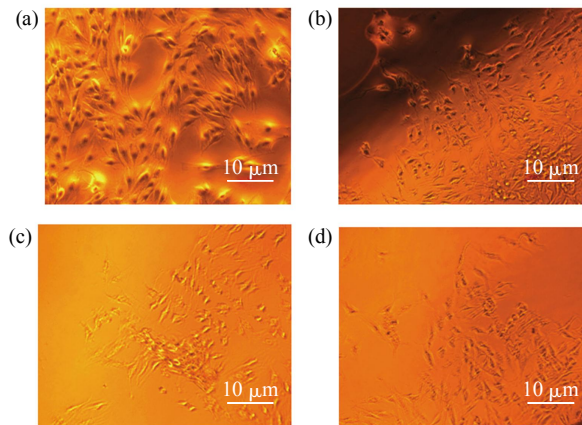


Fig. 11 The α -actin antibody of L_6 rat myoblast cell tested by immunocytochemistry staining

(a) Normal contrast group. (b) 3.0 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (c) 1.5 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (d) 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell.

2.7.3 免疫细胞化学染色法检测肌球蛋白抗体. 通过免疫细胞化学染色法检测发现肌球蛋白抗体, 证实是骨骼肌细胞(图 12). 以氧化苦参碱剂量为 3 g/L 时保护效果最好. 肌球蛋白作为一种线性分子马达

蛋白参与构成粗肌丝, 在骨骼肌细胞内是骨骼肌肌球蛋白 II, 主要功能是为肌肉收缩提供驱动力, 它能够把 ATP 水解释放出来的化学能转化为驱动肌肉收缩的机械能; 同时, 肌球蛋白 II 参与细胞有丝分裂的主动大变形过程, 涉及到细胞膜、细胞质、细胞骨架的相互作用, 细胞骨架的重分布和聚合骨架变形中肌球蛋白收缩是细胞主动变形的关键因素.

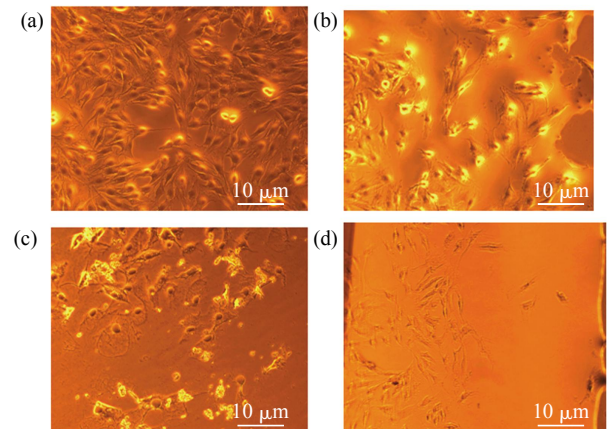


Fig. 12 The myosin antibody of L_6 rat myoblast cell tested by immunocytochemistry staining

(a) Normal contrast group. (b) 3.0 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (c) 1.5 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell. (d) 0.75 g/L oxymatrine protection+0.1 mmol/L H_2O_2 injured cell.

2.7.4 氧化苦参碱对 H_2O_2 损伤大鼠成肌细胞 Bcl-2 和 Bax 抗体的影响. 通过免疫荧光细胞化学抗体检测发现 L_6 成肌细胞经 H_2O_2 损伤后凋亡抑制因子 Bcl-2 抗体降低, 凋亡促进因子 Bax 抗体增高, 即凋亡增加, 这与流式细胞仪检测结果相符. 氧化苦参碱能阻遏 H_2O_2 致 L_6 成肌细胞凋亡抑制因子 Bcl-2 抗体的降低和凋亡促进因子 Bax 抗体的升高, 进而减少凋亡的发生. 结果见表 2 和图 13、14.

Table 2 The Bcl-2 and Bax antibody of L_6 rat myoblast cells damaged by H_2O_2

Groups	Drug concentration/(g·L ⁻¹)	Bcl-2 positive cells	Bax positive cells
Contrast group	Equal volume	174±8.9 ^a	105±4.9 ^a
Model group	Equal volume	99±5.7 ^b	178±9.5 ^b
Oxymatrine	0.75	123±6.1 ^c	154±8.6 ^c
Oxymatrine	1.5	145±7.3 ^c	136±7.4 ^c
Oxymatrine	3.0	161±8.4 ^c	113±6.5 ^c

The positive cells calculated. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ^aContrast group; ^bCompare with contrast group, $P < 0.05$; ^cCompare with model group, $P < 0.05$.

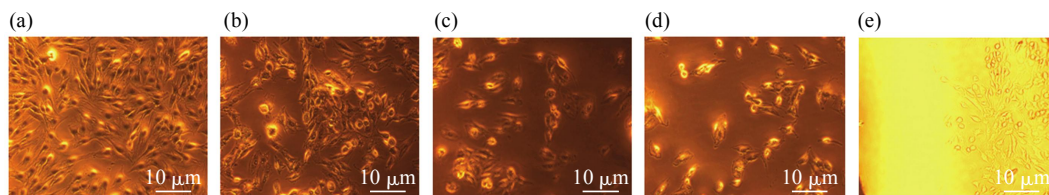


Fig. 13 The Bcl-2 antibody of L₆ rat myoblast cell tested by immunocytochemistry staining

(a) Normal contrast group. (b) 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (c) 1.5 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (d) 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (e) 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell.

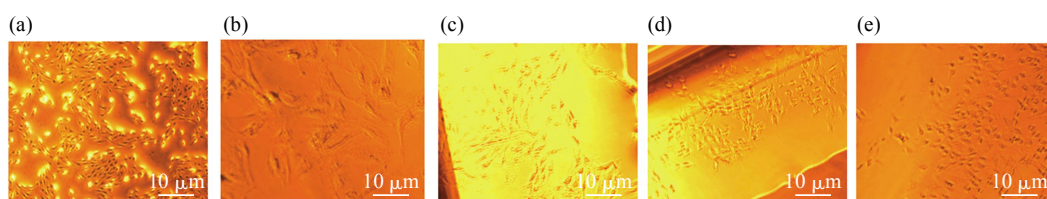


Fig. 14 The Bax antibody of L₆ rat myoblast cell tested by immunocytochemistry staining

(a) Normal contrast group. (b) 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (c) 1.5 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (d) 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell. (e) 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell.

2.8 Western blot 检测

分别检测氧化苦参碱作用后细胞和对照组细胞中的 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白，结果如图 17 所示。从图 17 可以看出，相对于未经任何处理的正常对照组细胞，经不同剂量的氧化苦参碱作用后，Bax 蛋白表达受到明显抑制；Bcl-2 蛋白表达受到激活，并且与作用剂量呈正相关。

一抗液工作液浓度：抗 Bcl-2，1：250；抗 Bax，1：250；抗 β-actin，1：250。

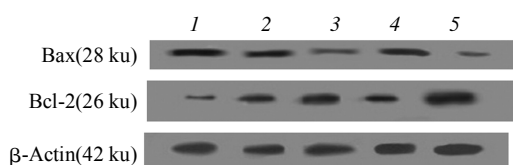


Fig. 15 The action of Bax and Bcl-2 protein induced by different density of oxymatrine

1: Model group (0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell); 2: 3.0 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell; 3: 1.5 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell; 4: 0.75 g/L oxymatrine protection + 0.1 mmol/L H₂O₂ injured cell; 5: Normal contrast group.

3 讨 论

在本研究中我们采用 MTT 法和流式细胞仪检测技术测定 L₆ 成肌细胞的 A 值与凋亡率，发现细胞经 H₂O₂ 损伤后 A 值明显降低，凋亡率增加，氧化苦参碱能提高 L₆ 成肌细胞的 A 值，减少凋亡的发生。骨骼肌细胞凋亡是骨骼肌损伤的主要形式之一，骨骼肌受到过氧化氢的化学损伤导致机体抗氧化能力下降，使氧自由基在体内积聚，一方面损伤细胞膜结构，使细胞膜通透性增加，另一方面可能损伤线粒体等膜结构和功能，引起细胞内钙稳态的失衡，从而激活了细胞凋亡机制，导致细胞凋亡的发生。本实验探索使用各种剂量氧化苦参碱保护过氧化氢化学损伤模型，由于过氧化氢化学损伤造成骨骼肌周围出现凋亡的骨骼肌细胞，促进骨骼肌细胞凋亡指数明显增多。我们采用的氧化苦参碱剂量在 0.75~3 g/L 之间，成肌细胞 A 值在 (0.39 ± 0.023)%~(0.47 ± 0.032)% 范围之内，高于过氧化氢凋亡模型组(0.28 ± 0.023)%。氧化苦参碱对 H₂O₂ 所诱导的肌细胞凋亡具有明显的抑制作用，

能明显降低肌细胞凋亡指数. 孙宏丽等^[2]用氧化苦参碱能使心肌梗死模型组(26.0 ± 7.0)%凋亡指数下降为(18.0 ± 6.0)%. 这提示氧化苦参碱对骨骼肌的保护作用可能部分是通过减少骨骼肌细胞凋亡来实现的. NFκB 信号通路可被许多外部刺激激活如过氧化氢、促炎因子(IL-1、IL-6、TNF)、LPS、佛波醇酯, 这些刺激可使 PKCζ 和 PKR 其中之一活化从而激活 IKK, NFκB 诱导激酶 NIK 和许多 MAPK 激酶类, MEKK 也是 IKK 的激活剂. IKK 可使 IκBα 中的 Ser-32 与 Ser-36 和 IκBβ 中的 Ser-19 与 Ser-23 等 2 个关键的丝氨酸残基磷酸化, 从而导致 IκB 被 26S 蛋白酶体的蛋白质水解作用降解和发生蛋白质化作用. NFκB 信号通路调控的基因表达 MAPK 也参与调节, 如最近证明在过氧化氢和 IL-1 诱导的 NFκB 活化临时调节中 ERK 和 p38 发挥重要作用^[8].

活性氧自由基损伤一直被认为是导致骨骼肌退行性病变的主要因素之一, 而 H₂O₂ 是细胞内主要的活性氧种类. 有研究表明, 大约有 50% 老人的骨骼肌出现退化性病变, 在衰老过程中, 成肌细胞转录调控因子表达下降, 成肌细胞分化效率降低是衰老相关性骨骼肌功能下降的始发事件. 在大多数退化性肌病患者中, 发现突变型和野生型线粒体 DNA 共同存在患者骨骼肌细胞中, 线粒体 DNA 的突变普遍存在于骨骼肌细胞中, 造成线粒体内呼吸链中的酶复合体活性下降, 而氧化应激损伤一直被认为是线粒体 DNA 损伤的主要原因. 自由基能造成多种组织细胞的损伤. 自由基上的活跃电子能与多种生物大分子发生反应, 如蛋白质(酶)、核酸大分子和生物膜上的不饱和脂肪酸, 结果导致大分子变性失活以及脂质过氧化反应造成的生物膜损伤, 对细胞产生毒性. 有机体的细胞内存在重要的防御机制, 如抗氧化性和自由基清除酶类. 抗氧化防御机制与自由基之间失去平衡, 就会产生氧化应激状态, 造成细胞损伤^[9]. H₂O₂ 累积到一定程度会造成细胞损伤, 我们实验模型组的凋亡率为(32.5 ± 2.91)%, 而氧化苦参碱保护促使凋亡率下降在(26.7 ± 2.83)%~(21.1 ± 2.54)%范围内. 不同浓度损伤的程度不同, 而低于 0.01 mmol/L 浓度的 H₂O₂ 则能够促进细胞的生长.

流式细胞仪检测结果显示, 经 0.1 mmol/L H₂O₂ 损伤处理后, DNA 合成前期(G₁)、S 期细胞减少, 其中 S 期从 19.39% 减少到 1.63%, 而 G₂+M 期细胞从 22.11% 增加到 41.89%, 大量细胞堆积在 G₂+M

期, 即促使大量细胞进入分裂期, 说明 H₂O₂ 对细胞有损伤作用, 促使其分裂趋向自我修复. 而经氧化苦参碱处理后 G₁ 期细胞为 55.02%~68.69%, S 期细胞增加至 14.17%~28.62%, 而 G₂+M 期细胞减少至 11.73%~17.14%, 说明药物对损伤的细胞有保护作用. 其中当氧化苦参碱浓度为 3.0 g/L 时, 处于 S 期的细胞达到 28.62%, 细胞内 DNA 合成增加, 保护作用最为明显.

bcl-2 家族现有研究表明, 结合于线粒体膜上的 bcl-2 基因表达蛋白能够发挥其对基因的调控作用, 而结合于细胞器上的 Bcl-2 蛋白则无此功能. Bcl-2 基因蛋白的抗凋亡作用主要是通过阻止线粒体通透性转换孔的开放, 阻止线粒体释放促凋亡蛋白、防止线粒体膜脂质过氧化以及线粒体基质 Ca²⁺ 释放实现的. 其家族中的促细胞凋亡蛋白如 Bax、Bcl-Xs、Bad、Bid 等, 通过与 Bcl-2 相关蛋白形成异源二聚体, 使其失去抑制细胞凋亡的活性; 另一方面可能也独立地参与细胞凋亡的调控. 如 Bax 同源二聚体能促进细胞凋亡, 其能在较为广泛的 pH 范围内形成离子通道, 允许一些离子和小分子如细胞色素 c 等穿过细胞膜进入细胞质, 从而引起细胞凋亡. Bcl-2 则通过与 Bax 竞争结合, 形成异源二聚体抑制细胞凋亡. bcl-2 和 bax 是一对细胞凋亡的正负调节基因, 因此, Bcl-2/Bax 抗体表达量的比值, 对细胞存活与凋亡起着十分重要的作用^[10]. 在本实验中, L₆ 大鼠成肌细胞经 H₂O₂ 损伤后 Bcl-2 抗体减弱, Bax 抗体增加, 氧化苦参碱虽然不能完全缓解这种变化, 但是细胞通过药物处理后, Bcl-2 抗体有所增加, 在(123 ± 6.1)%~(161 ± 8.4)%范围之内, 比模型组(99 ± 5.7)%的高; Bax 抗体有所减弱, 位于(113 ± 6.5)%~(154 ± 8.6)%之内, 低于模型组的(178 ± 9.5)%. 提示氧化苦参碱对骨骼肌细胞的保护作用可能与增强凋亡抑制因子 Bcl-2 抗体、抑制凋亡促进因子 Bax 抗体有关. 与造成抑制细胞凋亡相关的深刻内在机制还有待于进一步探讨.

致谢 对在论文实验技术上提供帮助的余春梅副教授表示谢意.

参 考 文 献

- [1] 廖丹丹, 赵晨光. 苦参碱衍生物的研究进展. 广州化工, 2009, 37(9): 32-35
Liao D D, Zhao C G. Guangzhou Chemical Industry, 2009, 37(9): 32-35

- [2] 孙宏丽, 商 蕾, 初文峰, 等. 氧化苦参碱心肌保护作用及其作用靶点的研究. 中草药, 2007, **38**(1): 69-72
Sun H L, Shang L, Chu W F, *et al.* Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, **38**(1): 69-72
- [3] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 2007, **39**(1): 44-84
- [4] Zhou H, Wertl I O, Rourke K, *et al.* Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of nemo. Nature, 2004, **427**(6970): 167-171
- [5] Scott F L, Stec B, Pop C, *et al.* The Fas fadd death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. Nature, 2009, **457**(7232): 1019-1022
- [6] Stern M M, Myers R L, Hammamb N, *et al.* The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells *ex vivo*. Biomaterials, 2009, **30**(12): 2393-2399
- [7] Li Q, Engelhardt J F. Interleukin-1 induction of NFκB is partially regulated by H₂O₂-mediated activation of NFκB-inducing kinase. J Biol Chem, 2006, **281**(15): 1495-1505
- [8] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell, 2002, **109**(Suppl): S81-S96
- [9] Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signaling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. Cell Signal, 2006, **18**(12): 2238-2251
- [10] Nierobisz L S, Felts J V, Mozdziak P E. Apoptosis and macrophage infiltration occur simultaneously and present a potential sign of muscle injury in skeletal muscle of nutritionally compromised, early post-hatch turkeys. Comp Biochem Physiol B, 2009, **153**(1): 61-65

Effect of Oxymatrine on H₂O₂ Resistance in L₆ Rat Myoblast Cells*

ZHU Dao-Li**, WANG Kang-Le, CHEN Pei-Lin, JIANG Ya-Qiong

(School of Life Science, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract Effect of oxymatrine on the H₂O₂ of L₆ rat myoblast cells was investigated in this study. The hydrogen peroxide(H₂O₂) was used to establish the H₂O₂-induced apoptosis model by L₆ rat myoblast cells that were treated with 0.3, 0.15, 0.75 g/L oxymatrine. The survival rate was measured by MTT method, cell cycles and apoptosis rate of L₆ rat myoblast cells were detected by flow cytometry, the injury degree was determined by apoptosis cytochemistry fluorescent antibody of Bcl-2 and Bax, DAPI staining and HE staining. The protein differences were examined by Western blot. Results showed that survival rate of L₆ myoblast cells was degraded and the apoptosis rate was increased by damaging H₂O₂. The survival rate of L₆ myoblast cells was heightened by oxymatrine of each dose. They could induce the increase in expression of Bcl-2 and the decrease in expression of Bax. Its degree of protection was increased with raising the dosage of oxymatrine and the protective effect of 0.3 g/L dosage is obvious. The protective effect of 0.15, 0.75 g/L oxymatrine were secondary. The main physiological and biochemical effects of oxymatrine was related to protect rat myoblast apoptosis model through NFκB signal transduction. These results implied that oxymatrine may have the potential as a new antioxidant treatment medicine.

Key words oxymatrine, H₂O₂-induced apoptosis model, L₆ rat myoblast cell, Bcl-2, Bax

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00308

*This work was supported by grants from The Building Special Project of Nantong University Doctor's Spot and The Social Development Science (05024276) and Technology Plan of Nantong City Science and Technology Bureau(S2008022).

**Corresponding author.

Tel: 86-513-85012821, E-mail: zhudaoli@ntu.edu.cn

Received: July 6, 2011 Accepted: March 22, 2012