

· 实验研究 ·

复方丹参注射液减轻缺氧/复氧性 HK-2 细胞损伤的作用及机制

李梦妮¹, 董文斌¹, 曹敏¹, 邓存良², 王明勇²

(泸州医学院附属医院 1. 新生儿科; 2. 传染与免疫研究室, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨丹参注射液减轻缺氧-复氧性人肾近曲小管上皮细胞(HK-2)细胞损伤的作用机制。**方法** 以人近曲肾小管上皮细胞为研究对象,采用液体石蜡覆盖法建立缺氧/复氧模型。实验分为3组:对照组、损伤组和丹参组,每个组均设立7个时间点:缺氧4,12,24 h和缺氧24 h后复氧4,12,24,48 h,其中丹参组设立4个浓度亚组(生药浓度):0.05%,0.10%,0.15%,0.20%。在倒置相差显微镜下观察细胞的形态学改变,MTT法进行活细胞计数,生化法检测培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量,放射免疫法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的含量。**结果** 缺氧处理后,损伤组在各时间点细胞数量均明显降低,在缺氧24 h达最低值;与损伤组比较,在丹参各组中,HK-2细胞数量较多,其中以0.10%丹参组细胞数量在各时间点均为最高。与对照组比较,损伤组LDH,TNF- α 水平升高,在缺氧24 h-复氧4 h达最高值;与损伤组相比,丹参组在缺氧/复氧过程各时间点中LDH,TNF- α 水平降低。**结论** 复方丹参注射液对HK-2细胞缺氧-复氧性损伤具有保护作用,作用机制可能与丹参注射液抑制炎症细胞因子的产生有关。

[中国当代儿科杂志,2007,9(6):559-562]

[关键词] 丹参;缺氧/复氧;HK-2细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)06-0559-04

Role and mechanism of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in alleviating injury induced by hypoxia/reoxygenation in HK-2 cells

LI Meng-Ni, DONG Wen-Bin, CAO Min, DENG Cun-Liang, WANG Ming-Yong. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China (Dong W-B, Email: dongwenbin2000@163.com)

Abstract: Objective *Salvia miltiorrhiza* Bunge (SMB) is a traditional Chinese herb, which is considered to promote blood flow and remove blood stasis. This study examined whether SMB can alleviate injury induced by hypoxia/reoxygenation (H/R) in human kidney proximal tubular cells-2 (HK-2 cells). **Methods** There were 3 experimental groups: control, H/R injury and SMB-treated H/R injury. H/R injury of HK-2 cells was induced by first covering the cells with and then removing liquid paraffin wax. Different concentrations of compound SMB solution (0.05%, 0.10%, 0.15% or 0.20%) were administered to the SMB-treated H/R injury group before the hypoxic injury. After 4, 12 and 24 hrs of hypoxia and 4, 12, 24 and 48 hrs of reoxygenation, morphologic changes of HK-2 cells were observed under an inverted microscope. Cell viability was measured by the MTT method. Lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture supernatants was assayed using biochemical methods; TNF- α levels were determined by radioimmunoassay (RIA). **Results** The number of HK-2 cells was significantly reduced in the H/R injury group after hypoxia, and reached a nadir 24 hrs after hypoxia treatment. Various concentrations of SMB-treated groups showed significantly greater number of HK-2 cells than the H/R injury group. SMB solution (0.10%) produced the best effect. The levels of LDH and TNF- α in the H/R injury group were significantly increased, and reached a peak between 24 hrs of hypoxia and 4 hrs of reoxygenation when compared to the control group. Pre-treating with 0.10% SMB resulted in significantly lower levels of LDH and TNF- α than in the untreated H/R injury group at various time points of H/R. **Conclusions** SMB has protective effects against H/R injury of HK-2 cells, possibly through inhibition of inflammatory cytokines.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6):559-562]

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; Hypoxia/reoxygenation; HK-2 cell

新生儿窒息作为围生期的一种急重症,可导致多器官损伤,其中,肾损伤的发生率很高。缺氧缺血

性肾损伤最为敏感、最早的部位即近曲小管。因此,本实验以人肾近曲小管上皮细胞(Human kidney

[收稿日期]2007-03-06;[修回日期]2007-04-04

[基金项目]四川省杰出青年学科带头人培养基金(NO.04ZQ026-033);四川省中医管理局重点科研基金资助(NO.200239)。

[作者简介]李梦妮,女,硕士,医师。主攻方向:新生儿疾病。

[通讯作者]董文斌,男,教授,硕士生导师,泸州医学院附属医院儿科,邮编:646000。

proximal tubular cells-2, HK-2)为研究对象,建立肾小管细胞的缺氧/复氧模型,从细胞水平探讨其发生机制。窒息后肾组织可有大量活性介质的产生,包括氧自由基和细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等,这些活性物质同时又会加重肾损伤,形成恶性循环^[1,2]。研究表明:丹参对缺氧/复氧具有显著的保护作用^[3],其疗效也得到了较为普遍的肯定,但其作用机制尚未完全阐明。本研究在前期建立HK-2 缺氧/复氧的损伤模型基础上^[4],研究了复方丹参注射液对HK-2 细胞缺氧/复氧性损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人近曲肾小管上皮细胞,引自 ATCC (American Type Culture Collection); 主要实验试剂(购自于 GIBCO 公司、Hyclone 公司、Sigma 公司等); 医用液体石蜡; DMEM 培养基, F-12; FBS 胎牛血清; 胰蛋白酶; 二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO); 噻唑蓝 (MTT); 丹参注射液(雅安三九制药厂生产的香丹注射液,批号:Z42020392)。

1.2 实验方法与分组

HK-2 细胞缺氧/复氧模型的建立参照本实验室建立的方法进行^[4],调整细胞密度后24孔培养板的每孔中置入40 000个细胞,或者在96孔培养板中置入10 000个细胞,在37℃,5% CO₂条件下培养12 h后,向实验组中每孔培养基表面滴加数滴经过高温消毒灭菌的液体石蜡至其被完全覆盖。缺氧组石蜡覆盖时间按预先设计分别为4,12,24 h。缺氧/复氧实验组在石蜡覆盖24 h后,去除表面的液体石蜡,再分别培养4,12,24,48 h,培养条件不变。实验分为对照组、损伤组和丹参组,其中丹参组是在缺氧处理前每组在培养体系中加入丹参注射液,一共4

个浓度组:0.05%,0.10%,0.15%,0.20%(生药浓度的含量)。

1.3 指标检测

①培养细胞的形态学观察:倒置相差显微镜下观察细胞生长状况,观察各组形态学改变并照相。②HK-2 细胞的 MTT 法活细胞计数检测细胞存活率:96孔培养板在各个时间点,按培养液量的10%(5 mg/mL)20 μ L加入 MTT 溶液,继续培养3~4 h,吸去培养液,加入150 μ L DMSO。然后振荡10 min,使结晶充分溶解后在酶联免疫检测仪上测定光吸收值,测定波长为490 nm,以只加培养液的孔为空白对照组。③生化指标的检测:24孔培养板分别吸取各孔上清液于-70℃低温冰箱保存备检。全自动生化分析仪检测培养上清液乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)含量,放射免疫分析法(radioimmunoassay, RIA)检测上清液 TNF- α 含量。

1.4 统计学处理

所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各实验组间进行单因素方差分析,组间进行 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著的统计学意义。采用 SPSS11.5 统计软件完成。

2 结果

2.1 丹参对 HK-2 细胞缺氧/复氧形态学的影响

倒置相差显微镜下示:对照组细胞贴壁较好,数量较多,呈扁平的多角形,折光性、分裂相增多,连接成片;损伤组随着缺氧时间的延长,细胞数量逐渐减少,贴壁率、折光性下降,细胞中颗粒增多,连接松散;缺氧24 h,改变达到高峰,镜下荒凉,复氧后细胞数量有所增加,其折光性减弱,形态改变不明显。丹参组在同一时间点细胞损伤明显得到改善,细胞数量逐渐增加,细胞分裂相增多,折光性增加。其中以0.10%为最好(见图1)。

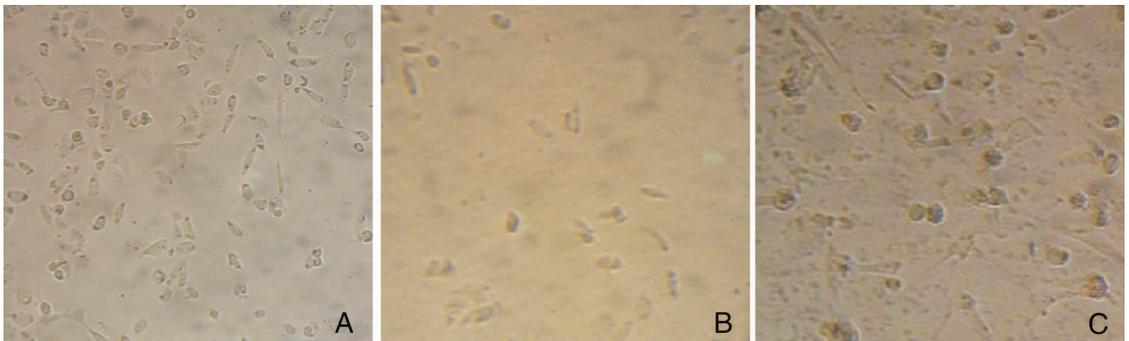


图1 丹参对HK-2细胞缺氧/复氧形态学的保护作用(相差显微镜, $\times 100$)。A:对照组:细胞贴壁好,数量多,呈扁平多角形;B:损伤组:贴壁差,数量减少;C:0.10%丹参组:给予丹参后细胞损伤明显改善,细胞数量增加,分裂相增多。

2.2 丹参对缺氧/复氧 HK-2 细胞活力的影响

MTT 法检测各组 HK-2 细胞活力提示丹参组活细胞数量总体上多于损伤组,其中以 0.10% 丹参组在各时间点为最高,差异具有显著性 ($P < 0.05$)。各组细胞生长情况曲线见图 2。

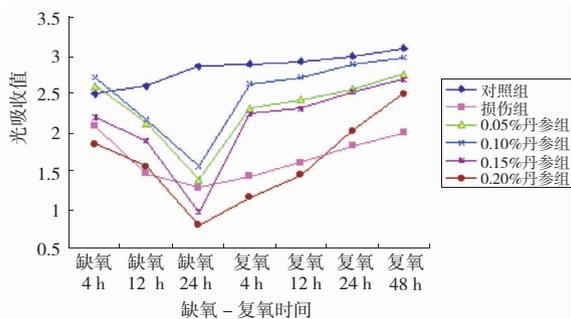


图 2 丹参对缺氧及复氧条件下 HK-2 细胞生长的影响曲线图

2.3 丹参对 HK-2 细胞缺氧/复氧 LDH 的影响

在 MTT 法基础上,筛选出 0.10% 丹参组对细胞的保护作用最强(以下简称丹参组)。故选择正常组、损伤组、丹参组做 LDH 测定。结果:与对照组比较,损伤组 LDH 活性升高,最高值在缺氧 24 h-复氧 4 h,达 (42.20 ± 1.13) IU/L 和 (44.25 ± 5.44) IU/L;与损伤组相比,丹参组 LDH 活性下降,在缺氧 4, 12, 24 h, 复氧 24 h 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 0.01)。见图 3。

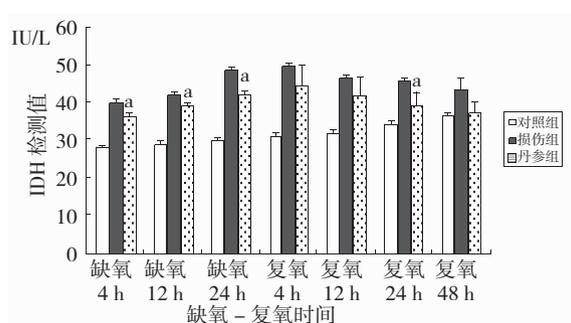


图 3 丹参对缺氧及复氧条件下 HK-2 细胞培养液中 LDH 活性的影响 (a: $P < 0.05$)。

2.4 丹参对 HK-2 细胞缺氧/复氧 TNF- α 的影响

选择正常组、损伤组、0.10% 丹参组做 TNF- α 测定。与对照组比较,损伤组水平升高,在缺氧 24 h-复氧 4 h,达最高值;与损伤组相比,丹参组在缺氧/复氧过程各时间点中 TNF- α 水平降低,在缺氧 4, 12, 24 h, 复氧 24, 48 h 差异具有显著性(均 $P < 0.05$)。见图 4。

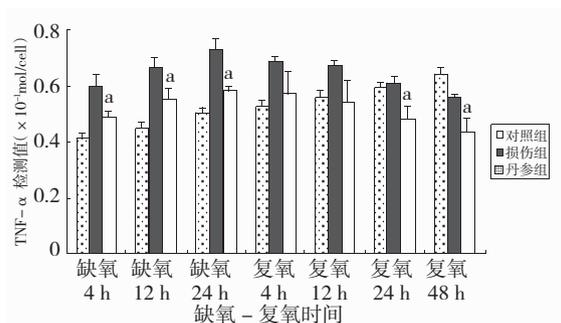


图 4 丹参对缺氧及复氧条件下 HK-2 细胞培养液中 TNF- α 水平的影响 (a: $P < 0.05$)

3 讨论

缺氧-复氧所致肾损伤是围生期新生儿窒息、肺炎、休克,以及肾移植、切肾取石等临床共同面临的问题。从缺氧-炎症反应的角度研究其损伤的机制已成为国内外研究的热点。研究^[1,2,5]显示, TNF- α 是激活细胞因子级联反应的始动因子,也是缺氧缺血性组织损伤中的重要介质,可引起肾小球和间质的损伤。可进一步激活磷脂酶 A2,诱发白细胞介素-1、白细胞介素-8 等多种细胞因子和炎症介质的释放,导致组织细胞的一系列炎症改变,如破坏脱氧核糖核酸(DNA)结构及抑制细胞呼吸和 DNA 复制有关酶的活性,而直接造成肾细胞的损伤。研究发现^[1],围生期窒息的新生儿和新生鼠液体中 TNF- α 等炎症细胞因子的浓度升高,且与肾小管损伤的程度相关。本研究显示,肾小管上皮细胞在缺氧及复氧条件下可产生 TNF- α ,且与肾小管的缺氧性损伤呈正相关,提示缺氧后 HK-2 细胞可遭到损伤,同时也可被活化产生炎症细胞因子,参与缺氧性损伤的过程。

丹参系唇形科多年生草本植物,具有活血化瘀、凉血消火、宁心安神之功效。其已知的脂溶性成分有丹参酮 I、丹参酮 IIA、丹参酮 IIB 等;水溶性成分有儿茶酚、丹参酚和丹参素等。临床上有复方丹参注射液、丹参注射液、复方丹参滴丸等制剂^[3]。本研究选用复方丹参注射液,通过观察细胞形态、活细胞计数和检测细胞培养上清液中 LDH, TNF- α 发现,当丹参浓度(生药浓度) $< 0.20\%$ 时,对体外培养 HK-2 细胞的缺氧-复氧性损伤具有显著的保护作用,0.10% 时最为明显。

丹参可能通过以下几种途径来发挥保护作用^[3,6-8]:①抑制促炎细胞因子的作用。本研究结果显示:丹参组 TNF- α 水平显著低于损伤组,证明了上述作用的存在;②可改善能量代谢。能量代谢障

碍是缺氧/复氧损伤发病的基础;③减轻钙超载。缺血再灌注时细胞内外 Ca^{2+} 通过钙通道、钙泵、 Na^+ - Ca^{2+} 和 Ca^{2+} - H^+ 交换平衡紊乱,引起细胞及细胞器内钙超载。丹参作为一种钙拮抗剂,通过降低膜通透性、阻断细胞膜钙通道、提高细胞色素 P-450 或促进细胞色素 P-450 依赖性混合功能氧化酶合成,恢复微粒体主动转运钙的功能以及保护 Na^+ / K^+ -ATP 酶, Ca^{2+} -ATP 酶活性等作用,阻断钙内流,促进钙泵出细胞外^[9,10]。本研究丹参组活细胞数量增多、LDH 活性明显低于损伤组,可能与上述机制有关。

[参 考 文 献]

[1] 董文斌,唐章华,陈红英,陈书琴,王兴勇,王胜会,等. 窒息新生儿尿中炎症细胞因子改变与肾小管损伤的关系[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(2):94-96.
[2] Combe C, Burton CJ, Dufourco P, Weston S, Horsburgh T, Walls J, Harris KP, et al. Hypoxia induces intercellular adhesion molecule - 1 on cultured human tubular cells [J]. Kidney Int, 1997, 51 (6): 1703-1709.

[3] 李梦妮,董文斌. 丹参在缺血再灌注中的保护机制[J]. 中国急救医学, 2005, 25(5):351-352.
[4] 杜逸亭,董文斌,王明勇,航永伦. 人近曲小管上皮细胞缺氧/复氧损伤模型的建立[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17 (10):619-622.
[5] Bona E, Andersson AL, Blomgren K, Gilland E, Puka-Sundvall M, Gustafson K, et al. Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats[J]. Pediatr Res, 1999, 45 (4 Pt 1): 500-509.
[6] 姚汝琳,田琳,刘保连. 丹参脂质体对染石英尘巨噬细胞脂质过氧化及钙稳态的影响[J]. 中国公共卫生, 1999, 15 (12): 1059-1060.
[7] 王腾,李庚山,唐其住. 丹参注射液对离体家兔浦肯野氏纤维钙通道的抑制作用[J]. 湖北医科大学学报, 1996, 17 (2): 134-137.
[8] 黄道勤,赖建生,夏强,赵国平,许胜利,郑东升. 复方丹参注射液保护肾缺血-再灌注损伤的实验研究[J]. 海南医学, 2004, 15(7):114-116.
[9] 赵洁,童笑梅. 丹参对幼年大鼠应激性溃疡预防作用的实验研究[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(6):523-525.
[10] 王亚利,张式暖,姜萍,刘景邦,吕爱敏. 复方丹参注射液对小鼠心肌保护作用的研究[J]. 中国当代儿科杂志,1999,1(4): 211-213.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

2008 年上海交通大学医学院附属 上海儿童医学中心儿科高级研修班招生简章

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心是上海市人民政府与美国世界健康基金会 (Project HOPE) 的合作建设项目。是一所集医疗、科研、教学于一体的儿科综合性医院,核定病床 358 张,拥有一流的楼宇自动化设备和完备的医疗保障设施,医院技术力量雄厚,设施齐全,拥有目前国内最先进的诊断、治疗设备,医院不但以精湛的技术为患儿服务、回报社会,同时自开院以来上海儿童医学中心始终秉承“培训→培训者”(Traning-Trainer)理念,为全国各地尤其是贫困和欠发达地区培训了大批儿科方面的骨干型人才,并通过他们又培养了一大批儿科专业人士,从而为提高和推动当地的儿童医疗健康事业提供了最有力的支持,而本次设立的儿科高级研修班,就是这一理念的继续和延伸。

招生地区:不限

要 求:①进修医生;本科毕业;二级医院,工作 5 年以上;三级医院,工作 4 年以上。

②进修护士;中专以上学历;二级医院,工作 5 年以上;三级医院,工作 3 年以上。

培训科目:招生专业;急救与 PICU 科、新生儿与 NICU 科、儿内科(包括消化、呼吸、肾脏、风湿免疫、神经、内分泌)、血液肿瘤科、小儿外科、小儿骨科、麻醉科。

培训时间:2008 年 3 月——2009 年 2 月(1 年)

奖 学 金:一俟被录取,均属获得奖学金者,将享有免收进修费、住宿费并给予生活津贴(医生 10000 元/年,护士 8000 元/年)。

报名办法:请报名者将个人简历、进修科目、一位正高级职称医师推荐信、盖有单位公章的介绍信于 2008 年 1 月 15 日前寄联系人。面试时间和面试地点另行通知。

联系地址:上海东方路 1678 号,上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心。邮编:200127

电话:021-38626161 ×3081/3080 传真:021-50904612

请从医院网站索取申请表,网址:www.somo.com.cn

联系人:金燕梁 包文婕

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心