

番茄红素对大鼠乳鼠心肌细胞缺氧复氧的保护作用及其机制*

戴鸣翔 张荣庆 李聪叶 王海昌[△]

(第四军医大学西京医院心血管内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨番茄红素对心肌细胞缺氧复氧的保护作用以及其分子机制。方法 采用原代培养心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型,实验分8组:正常对照组,H/R组,H/R+番茄红素(1,2,4,8,16,32 μ mol/L)剂量组。观察各组细胞经H/R损伤后,细胞内天冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量的变化情况,选择正常对照组,H/R组,最佳番茄红素剂量组做MTT分析细胞凋亡,Western检测TRL4以及NF- κ B的表达。结果:番茄红素(16,8,4,2 μ mol/L)剂量组可显著降低缺氧/复氧损伤心肌细胞内AST、CK、LDH释放量及MDA的生成,并能提高SOD活性。此外番茄红素可减少心肌细胞缺氧/复氧损伤后的心肌凋亡,减少TRL4受体以及NF- κ B的表达。结论 番茄红素具有抗缺氧/复氧损伤,保护心肌细胞的作用,其机制可能是通过抑制TRL4通路来实现的。

关键词 番茄红素 心肌细胞 缺氧/复氧 保护作用

中图分类号 Q95-3, R54 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 06-1106-04

Protective Effect of Lycopene on Hypoxia/Reoxygenation Injury in Rat Cardiomyocytes and Its Mechanism*

DAI Ming-xiang, ZHANG Rong-qing, LI Cong-ye, WANG Hai-chang[△]

(Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Department of Cardiology, Xi'an, Shaanxi, 710032)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effects of Lycopene on neonatal rat cardiomyocytes injury induced by hypoxia/reoxygenation (H/R) and to explore the mechanism. **Methods:** The H/R injury model of primary cultured neonatal rat cardiomyocytes was established. The cultured cardiomyocytes were divided into eight groups: normal control group, H/R group, H/R+Lycopene (1,2,4,8,16,32 μ mol/L) group. The activities of aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) were determined. The numbers of apoptotic cardiomyocyte was determined by MTT. The expression of TLR-4 protein and NF- κ B were detected by Western blot. **Results:** Lycopene groups (16,8,4,2 μ mol/L) decreased the activities of AST, CK, LDH and the production of MDA, and significantly increased the activity of SOD. Compared with H/R group, Cardiomyocyte apoptosis in Lycopene group was significantly lower than that in H/R group but it was higher than that in the normal control group ($P < 0.05$). The expression of TLR-4 protein and NF- κ B protein in Lycopene group was significantly lower than that in the H/R group but it was higher than that in the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Lycopene has the effect of anti-hypoxia/reoxygenation injury and protection of myocardial cells, which may be achieved by inhibiting the pathway to TLR4.

Key words: Lycopene; Cardiomyocytes Hypoxia/reoxygenation; Protective effects

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1106-04

前言

番茄红素是近年来发现的一种纯天然的抗氧化剂,研究表明,番茄红素是天然类胡萝卜素中最强的抗氧化剂,其抗氧活性能远胜于 β -胡萝卜素和维生素E,可有效阻断体内的脂类过氧化反应^[1],增强各种抗氧化酶类的活性,从而提高机体的抗氧化能力^[2,3],保持细胞正常代谢,延缓机体衰老^[4]。番茄红素对于血脂也有很强的调节作用,其可以保护LDL不受氧化^[5],调节血浆胆固醇浓度,还可修复被氧化的细胞,促进细胞间胶质形成,增强血管柔韧性,减缓心脑血管疾病的发展^[6,7]。近来更有研

究推测,番茄红素可以影响Toll样受体下游通路NF- κ B的表达来影响炎症反应^[8]。本研究采用体外培养原代心肌细胞,排除神经、体液、冠状动脉血管差异等因素的影响,通过缺氧/复氧的方法,建立大鼠乳鼠心肌细胞缺氧/复氧的模型,进一步探讨番茄红素对其的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

新生3天龄内SD大鼠乳鼠,雌雄兼用,由第四军医大学动物实验中心提供,动物合格证号SYXK(军)2007-020。

* 基金项目 国家自然科学基金(30770784)

作者简介 戴鸣翔(1985-),男,硕士研究生,主要从事冠心病机制与治疗的研究

Tel 029-87884406, Email daimingxiang@163.com

△通讯作者 王海昌,教授,主要从事冠心病机制与治疗的研究 Email wanghc@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2010-12-20 接受日期 2011-01-13)

1.2 药物与试剂

DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品。胎牛血清 (FBS) 为 HYCLONE 公司产品。II 型胶原酶、胰蛋白酶及乙二胺四乙酸 (EDTA) 均为 Sigma 公司产品。山羊抗大鼠 TLR-4 抗体为 e-Bioscience 公司产品。鼠抗大鼠 β -actin 抗体为 abcam 公司产品。HRP 标记的兔抗羊 IgG 以及羊抗兔 IgG 均为中山金桥公司产品。NF- κ B 多克隆抗体由武汉天源生物有限公司产品。AST、CK、LDH 检测试剂盒为中生北控生物科技股份有限公司产品。MDA、SOD 检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 仪器

倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司)、三气孵箱(HER-ACEE1150 德国 HERAEUS 公司)、超净台(苏州安泰空气技术公司)、酶标仪(Spectra-MAX M2e)。

1.4 方法

1.4.1 乳鼠心肌培养方法 取 3 天龄内的 Sprague-Dawley 大鼠, 无菌操作下取出心脏放入预冷的 DMEM 液中漂洗 3 次, 修剪去心房及血管, 剩余心室肌在 DMEM 液中剪碎至 1 mm^3 左右的小块, 移入离心管, 用 PBS 冲洗 2 次去除血细胞等杂质, 吸出上清。加入适量的 0.125 % 的胰蛋白酶 (PBS 溶解), 轻柔吹打消化 5min, 自然沉淀后, 弃上清。心肌组织块中再加入适量消化液, 同前消化 5 min 后, 重复此步骤 3 次, 将消化液上清置于无菌试管内转入离心管中, 加入与消化液等量的 10 % 血清培养基终止消化, 并且以 1000 r/min, 离心 8min, 弃上清, 细胞沉淀加入培养基吹打混悬, 制成细胞悬液, 并移入培养瓶中于 37°C , 5 % CO_2 培养箱中差速贴壁 2 h 后, 制成浓度 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 接种至 25ml 培养瓶中培养, 培养过程中观察细胞是否贴壁、形态、折光性及自律性搏动的幅度及频率等。取原代培养 72 h 的心肌细胞进行实验。

1.4.2 实验分组 初步实验分为 8 个组, 每组 10 个平行孔, 分组分别为空白对照组, 缺氧 / 复氧 (H/R) 处理组, H/R+ 番茄红素组 (1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$), 药物处理 24 小时予缺氧 / 复氧损伤。第二部实验分为 3 组, 分别为空白对照组, 缺氧 / 复氧 (H/R) 处理组, H/R+ 番茄红素组 (初步实验得出的最佳番茄红素剂量组), 药物处理 24 小时予缺氧 / 复氧损伤。

1.4.3 缺氧 / 复氧模型的建立 为了模拟心肌缺血再灌注损伤, 采用 Koyama T 等的方法建立心肌细胞缺氧复氧损伤模型^[9]。配制缺氧液 (缺血液) 和复氧液 (再灌液), 缺氧液 (NaH_2PO_4 0.9mmol/L、 NaHCO_3 60mmol/L、 CaCl_2 1.0mmol/L、 MgSO_4 12mmol/L、乳酸钠 40mmol/L、HEPES 20mmol/L、 NaCl 98.5mmol/L、 KCl 10.0mmol/L、pH 6.8, 37°C), 以高浓度氮气饱和 (1L/min $\times$ 30min),

测其血气 $\text{PO}_2 \leq 4.0\text{ kPa}$, 含有高浓度 K^+ , H^+ 和乳酸, 低氧浓度, 不含葡萄糖; 复氧液 (NaH_2PO_4 0.9 mmol/L、 NaHCO_3 20mmol/L、 CaCl_2 1.0mmol/L、 MgSO_4 1.2mmol/L、葡萄糖 5.5mmol/L、HEPES 20mmol/L、 NaCl 129.5mmol/L、 KCl 5.0mmol/L、pH 7.4, 37°C), 预先用纯氧饱和。用缺氧液置换正常培养液为(缺血)缺氧, 再用复氧液置换缺氧液即为(再灌注)复氧。空白对照组不予任何干预。缺氧时间为 30min, 复氧时间为 2h。

1.4.4 观测指标 CK、AST、LDH、MDA、SOD 的检测 分别按各自检测试剂盒操作说明书步骤, 取培养液上清, 用酶标仪于 340 nm 处测定 CK、AST 和 LDH 活力(释放量), 于 532 nm 处测 MDA 含量。将经过缺氧 / 复氧的心肌细胞经 -80°C 低温冰箱反复冻溶 3 次, 使细胞破碎, 按 SOD 检测试剂盒操作说明书要求, 用酶标仪于 550 nm 处测定心肌细胞内 SOD 活性。MTT 法检测心肌细胞凋亡 取同一批的心肌细胞, 将细胞的密度调至 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔。待细胞生长至 70% 汇合后, 按 1.4.3 的叙述进行造模。复氧结束后, 加 MTT $10\text{ }\mu\text{l}$ 培养 4 h, 弃去上清, 每孔加入 $150\text{ }\mu\text{l}$ 的二甲基亚砷(DMSO)震荡 5min。待结晶物充分溶解后, 用酶标仪于波长 490nm 处测吸光度(A)值。western blot 法检测 TLR 4 受体以及 NF- κ B 的表达 心肌细胞经过 H/R 处理后, 参照文献介绍的方法提取心肌细胞核蛋白, 蛋白定量采用 Lowry 法^[10]。用 SDS-PAGE 电泳分离并电转移至醋酸纤维膜上, 进行 TLR 4 以及 NF- κ B p65 蛋白的免疫印迹。NBT/BCIP 显色剂显色, 实验中以 β -actin 为内参照。western blot 的结果采用 vision works LS, version 6.7.1 软件进行灰度分析。

1.5 统计方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌三酶释放、SOD 活性及 MDA 含量的检测结果

经 H/R 损伤后, 心肌细胞 CK、AST 和 LDH 的释放量明显增多, 过氧化脂质代谢产物 MDA 含量显著升高, 超氧阴离子自由基清除酶 SOD 活性却明显下降。与正常对照组比较有显著性差异 ($P < 0.001$)。番茄红素在 2-16 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围, 能剂量依赖性增强缺氧 / 再给氧损伤时心肌细胞内 SOD 活性, 降低心肌细胞 MDA 产生, 减少 CK 释放量。在 2-16 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围, 能剂量依赖性减少缺氧 / 再给氧损伤时心肌细胞 AST 和 LDH 释放, 从而有效地减轻细胞内脂质过氧化反应, 见表 1。

表 1 心肌细胞缺氧 / 复氧损伤时心肌三酶释放、SOD 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table1 Myocardial hypoxia / reoxygenation injury to cardiac enzyme release (LDH, CK, AST), SOD activity and MDA content ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别 (Groups)	剂量 (Dose) ($\mu\text{g/ml}$)	LDH (U/L)	CK (U/L)	AST (U/L)	SOD (U/L)	MDA (nmol/ml)
空白对照组 (Control Group)	-	158.73 $\pm$ 46.22**	101.20 $\pm$ 43.65**	70.32 $\pm$ 16.37**	61.05 $\pm$ 7.46**	12.31 $\pm$ 1.75**
H/R 组 (Hypoxia/reoxy- genation group)	-	580.6 $\pm$ 109.63	523.57 $\pm$ 95.22	314.37 $\pm$ 17.38	29.44 $\pm$ 8.47	24.66 $\pm$ 9.44

番茄红素+H/R 组

(Lycopene+H/R group)	1	512.37± 68.46	436.42± 107.43	294.85± 18.03	29.44± 8.47	25.83± 5.32
	2	463.92± 90.72	440.57± 112.35	271.26± 19.38**	33.79± 8.48	24.23± 4.91
	4	408.05± 103.38*	387.46± 101.95*	268.44± 23.05**	34.58± 7.02*	21.39± 5.12**
	8	375.29± 88.58**	329.59± 108.33**	253.61± 25.01**	36.62± 7.22**	18.94± 4.77**
	16	306.50± 100.16**	307.41± 90.98**	241.76± 22.11**	41.93± 8.67**	15.96± 3.17**
	32	523.63± 110.17	506.83± 113.42	298.58± 23.89	32.11± 7.87	25.04± 4.06

注 与 H/R 组比较 *P<0.05 **P<0.01

Note 与 H/R 组比较 *P<0.05 **P<0.01

2.2 H/R 过程中 TLR-4 以及 NF-κ B p65 蛋白表达的变化 western blot 法检测

缺氧 30 min 复氧 2 h 处理后,H/R 组 TLR-4 以及 NF-κ B p65 蛋白表达均显著高于 H/R+ 番茄红素组(P<0.05),结果见图 1,图 2。

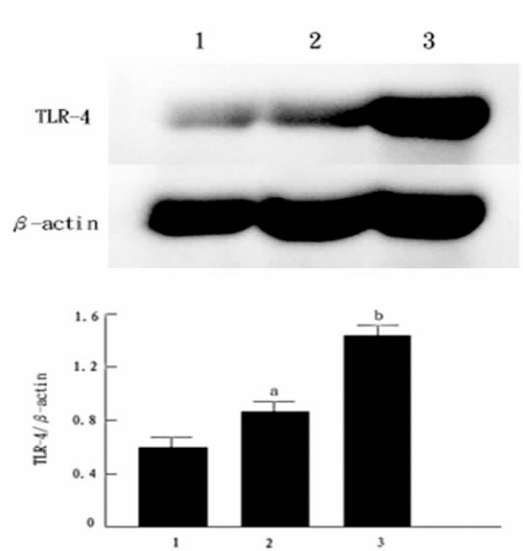


图 1 TLR-4 蛋白表达的 Western blot 测定和半定量灰度值 1.空白对照组 2.H/R+ 番茄红素组 3.H/R 组。与 H/R+ 番茄红素组比较,bP<0.05

Figure 1 TLR-4 protein expression in Western blot and semi-quantitative determination of gray value 1. Control group; 2. H/R + lycopene group; 3. H/R group. Compared with H/R + lycopene group, bP<0.05

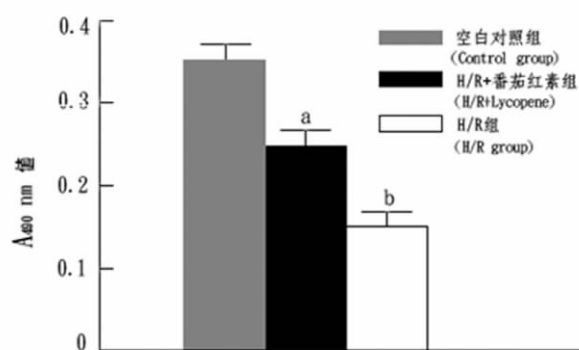


图 3 MTT 比色法检测细胞凋亡 与 H/R+ 番茄红素组比较,bP<0.05。

Figure 3 MTT results of apoptosis 与 H/R + lycopene group, bP<0.05

2.3 MTT 法检测细胞凋亡

MTT 比色法检测的结果显示,缺氧 30 min 复氧 2 h 后,H/R+ 番茄红素组与 H/R 组相比,细胞存活率明显增加 37.6% (P<0.05)。见图 3。

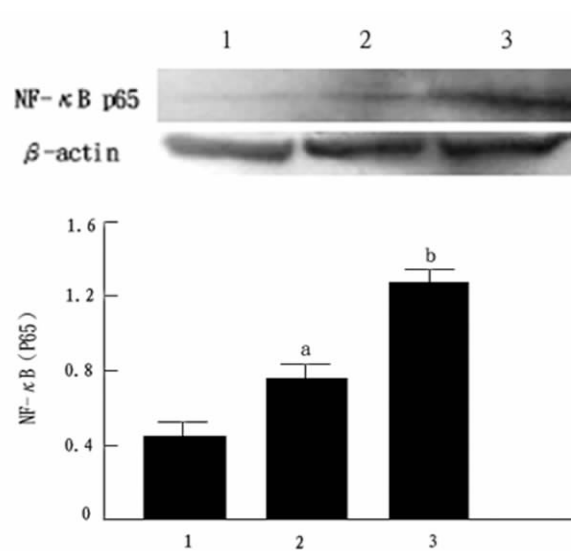


图 2 NF-κ B(P65)蛋白表达的 Western blot 测定和半定量灰度值 1.空白对照组 2.H/R+ 番茄红素组 3.H/R 组。与 H/R+ 番茄红素组比较,bP<0.05

Figure 2 NF-κ B (P65) protein expression in Western blot and semi-quantitative determination of gray value 1. Control group; 2. H/R + lycopene group; 3. H/R group. Compared with H/R + lycopene group, bP<0.05

3 讨论

本研究通过体外培养 SD 大鼠乳鼠心肌细胞,通过缺氧/复氧损伤造模,从细胞水平上研究了番茄红素对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。氧自由基损伤与钙超载是比较公认的两个因素^[11,12]。自由基损伤的特点是破坏防御酶系统,大量 SOD 被消耗,使 SOD 活性下降。SOD 是机体清除自由基的重要抗氧化酶,是自由基损害的主要防御酶。脂质过氧化作用参与了心肌缺血缺氧的过程。因此,冠心病患者血清中 SOD 活性下降及过氧化脂质代谢产物 MDA 含量显著升高是反映心肌缺血缺氧程度的重要标志。此外,心肌细胞缺氧损伤引起细胞浆酶释

放,细胞酶学变化可反映细胞损伤程度。缺氧缺糖可造成新生大鼠心肌细胞损伤,导致 CK、AST 和 LDH 释放增加。不同程度心肌细胞损伤与心肌酶释放成正比,故测定培养基中心肌酶活性是反映心肌细胞损伤程度的一种敏感且较为简便的指标。TLR 是一个高度保守的模式识别受体超家族,在人体免疫系统中发挥重要作用,参与各种炎症反应过程。研究表明 TLR-4 信号通路参与了 MIRI 的炎症反应^[13-17]。TLR-4 信号在炎症细胞中转导通路包括髓样分子 88 (MyD88) 依赖性与 MyD88 非依赖性两条通路。前者通过 TLR-4 下游分子 Toll/IL-1 受体结构域 (TIR) 、MyD88 等一系列信号通路激活 NF- κ B,促进 IL-6 以及 TNF- α 分泌,这些炎症因子加速细胞炎症反应,降低细胞 SOD 活性以及增加 MDA 的含量^[18,19],加速细胞死亡。本实验通过对 H/R 过程中 TLR-4/NF- κ B 信号通路表达的检测,发现番茄红素在分子水平上能明显降低心肌细胞 H/R 损伤后 TLR-4 以及 NF- κ B 的表达,从而减少心肌细胞受损以及死亡。

番茄红素对培养心肌细胞缺氧 / 复氧损伤的保护作用,可能与其降低心肌细胞 TLR-4 以及 NF- κ B 的表达,从而通过炎症因子的调节减少 MDA 含量,提高 SOD 活性有关。本实验结果提示:番茄红素在离体条件下具有对抗缺氧 / 复氧损伤、保护心肌细胞的作用,可能与其降低心肌细胞 TLR-4 以及 NF- κ B 的表达、抗氧化、抗脂质过氧化反应有关。并且,在一定的浓度(剂量)范围内呈现良好的量效关系,当药物超过或低于某一剂量时,其对缺氧 / 复氧损伤心肌细胞的保护作用则不明显,说明控制好给药剂量对药物疗效的发挥是至关重要的。

参考文献 (References)

- [1] Upritchard JE, Sutherland WH, Mann JI. Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2000,23(6):733-8
- [2] Hsu YM, Lai CH, Chang CY, et al.. Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008,72(3):677-85
- [3] Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage [J]. J Nutr, 2003, 133(3):727-32
- [4] Maiani G, Caston MJ, Catasta G, et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans [J]. Mol Nutr Food Res, 2009,53 (Suppl 2): S194-218
- [5] Ried K, Fakler P. Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials[J]. Maturitas, 2010, 14:5481-12
- [6] Kohlmeier L, Kark JD, Gomez GE, et al. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study [J]. Am J Epidemiol, 1997,146 (8):618-26
- [7] Rissanen TH, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al. Low serum lycopene concentration is associated with an excess incidence of acute coronary events and stroke: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study[J]. Br J Nutr, 2001,85(6):749-54
- [8] Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, et al. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women[J]. Osteoporos Int, 2007, 18(1):109-115
- [9] Koyama T, Temma K, Akera T, et al. Reperfusion induced contracture develops with a decreasing $[Ca^{2+}]_i$ in single heart cells [J]. Am J Physiol, 1991,261(4):159
- [10] 吴婧,王焱林,王成天,等.氯胺酮对心肌缺血 / 再灌注大鼠心计和血清白细胞介素 6 的影响[J].中华麻醉学杂志,2004,24:528-530
Wu Jing, Wang Yan-lin, Wang cheng-yao, et al. Effects of ketamine on myocardial NF-kappa B expression and serum IL-6 level following myocardial ischemia reperfusion in rat [J]. Chin J Anesthesiol, 2004,24:528-530
- [11] Shige matsu S, Arita M. Anoxia depresses sodium-calcium exchange currents in guinea-pig ventricular myocytes [J]. J MOL Cell Cardiol, 1999, 31(4):895-906
- [12] Salie R, Harper I, Cillie C, et al. Melatonin protects against ischemic/reperfusion myocardial damage [J]. J MOL Cell Cardiol[J], 2001,33(2):343-357
- [13] Chao W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(1):H1-H12
- [14] Zou N, Ao L, Cleveland JC Jr, et al. Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(6):H2805-H2813
- [15] Cha J, Wang Z, Ao L, et al. Cytokines link Toll-like receptor4 signaling to cardiac dysfunction after global myocardial ischemia[J]. Ann Thorac surg, 2008, 85(5):1678-1685
- [16] Oyama J, Blais C Jr, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice [J]. Circulation, 2004, 109(6):784-789
- [17] Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2006, 114: 1270-1274
- [18] Altavilla D, Marini H, Seminara P, et al. Protective effects of antioxidant raxofelast in alcohol-induced liver disease in mice [J]. Pharmacology, 2005,74(1):6-14
- [19] Yao XM, Chen H, Li Y. Protective effect of bicyclol on liver injury induced by hepatic warm ischemia/reperfusion in rats[J]. Hepatol Res, 2009,39(8):833-42