

空间环境中丹参酚酸 B 镁对人主动脉内皮细胞的保护作用

徐梅¹, 向青¹, 耿传营¹, 徐波¹, 李红艳¹, 李克明², 房青¹, 夏启胜¹, 陈志华¹, 陈朋民¹, 唐劲天³

1. 中日友好临床医学研究所生物化学-分子生物化学研究室, 北京 100029

2. 中日友好临床医学研究所药物药理室, 北京 100029

3. 清华大学工程物理系医学物理与工程研究所, 北京 100084

[摘要] 探讨中药丹参酚酸 B 镁在空间环境下对接种低温细胞生存系统中人主动脉内皮细胞的作用, 为预防空间环境对宇航员心血管功能的损伤提供依据。将人主动脉内皮细胞加入丹参酚酸 B 镁接种于低温细胞生存系统中, 搭载于第 22 颗返回式卫星。经过 18 d 空间飞行, 将回收卫星返回后的细胞进行第 17, 24, 30 d 光镜照相, Giemsa 染色及细胞计数。结果显示: 加药组的细胞在形态上及增殖数目上均优于对照组, 表明丹参酚酸 B 镁能够改善空间环境中人主动脉内皮细胞的生存状况, 减轻宇宙射线、微重力、微磁场对细胞的损伤程度。

[关键词] 丹参酚酸 B 镁; 主动脉内皮细胞; 空间环境

[中图分类号] R85

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)01-0028-04

Protection of Magnesium Lithospermate B on Aortic Endothelial Cells of Human Beings in Spaceflight

XU Mei¹, XIANG Qing¹, GENG Chuanying¹, XU Bo¹, LI Hongyan¹, LI Keming², FANG Qing¹, XIA Qisheng¹, CHEN Zhihua¹, CHEN Pengmin¹, TANG Jintian³

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, China-Japan Friendship Institute of Clinical Medical Sciences, Beijing 100029, China

2. Department of Material Medicine and Pharmacology, China-Japan Friendship Institute of Clinical Medical Sciences, Beijing 100029, China

3. Institute of Medical Physics and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: This paper studies the protecting effects of Magnesium Lithospermate B (MLB) on aortic endothelial cells of human beings in a low temperature cell system in space. Aortic endothelial cells cultured in the low temperature cell system were on board of the No. 22 recoverable satellite. After 18-day's flight, cells were harvested, counted and stained by Giemsa. Comparing with the control group, the cells treated with Magnesium Lithospermate B are found to be in better conditions in morphology and proliferation. Magnesium Lithospermate B can improve the living condition of endothelial cells in spaceflight and reduce the damage to the cells from space radiation, micro-gravity and magnetic microfield.

Key Words: MLB; HAEC; space environment

CLC Number: R85

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)01-0028-04

丹参酚酸 B 镁是从中药丹参中提取出的水溶性成分, 具有清除氧自由基、保护细胞线粒体、改善能量代谢、调控基因表达等功能^[1-2]。低温细胞生存系统可用于

哺乳动物细胞的空间无源搭载^[3]。血管内皮细胞是覆盖在血管内腔表面的连续单层扁平细胞, 其完整及其功能的正常对于维持血流的通畅具有重要意义, 其结构改变

收稿日期: 2006-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371324), 科学技术部 973 计划前期项目[2003(CA04200)]

作者简介: 徐梅, 女, 北京市朝阳区樱花园东街中日友好临床医学研究所生物化学-分子生物化学研究室, 副主任技师, 主要研究方向为分子生物学; E-mail: shenghuashi313@sina.com

或功能受损可导致心血管功能异常。本研究将人主动脉内皮细胞(Human Aortic Endothelial Cell, HAEC)接种于低温细胞生存系统中,同时加入丹参酚酸 B 镁,搭载于第 22 颗返回式卫星,探讨在空间环境中中药丹参酚酸 B 镁对内皮细胞的作用,为预防空间环境损伤宇航员的心血管功能提供线索。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人主动脉内皮细胞 HAEC(由北京清源生物公司购自美国 Cascade 公司)和丹参酚酸 B 镁(由中药丹参中提取分离得到的单一成分,经 HPLC 分析测定,其纯度>98.10%,实验前用生理盐水配制成 10 mg/ml 水溶液,4℃保存备用)由本研究所药理室提供;胎牛血清(Sigma)、培养基 200(Cascade Biologics™)、Giemsa 染液、倒置显微镜(Olympus IMT-2)、低温细胞生存系统^[4]的详细情况见专利^[4]。

1.2 实验方法

将常温培养的第 7 代 HAEC 接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 5×10^3 个细胞,加丹参酚酸 B 镁使各孔终浓度分别为 0.01 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.04 mg/ml 和 0.08 mg/ml,每个浓度平行 6 孔。7 d 后用 MTT 法测 OD 值,观察细胞增殖情况,选取有效的药物浓度。

按照低温细胞生存系统要求的实验程序,将第 10 代 HAEC 按 1.5×10^3 /ml 微载体接种于生存系统中,置于孵箱 5% CO₂, 37℃ 培养,7 d 后换成改良培养基^[4],分为 4 组。其中,2 个加药组加入丹参酚酸 B 镁,浓度为 0.04 mg/ml,另外 2 个组为对照组,密封系统。将 1 个加药组和 1 个对照组无源搭载于第 22 颗返回式卫星配重舱内 26 d(舱内条件为 1.01×10^5 Pa, 温度 4~40℃,在卫星发射基地搭载前后共滞留 8 d,绕地球飞行 18 d)。另外 2 个组与返回式卫星同步,不换液,室温(20~22℃)放置 26 d。卫星返回后,收集 4 个组的细胞,各取 200 μl,平行 2 孔于 96 孔细胞培养板中,换完全培养基置于 5% CO₂, 37℃ 孵箱中培养,换液,分别于 2, 3, 4 周后微载体染色,光镜照相,观察细胞存活状态,4 周后胰酶消化细胞并计数。

2 结果

2.1 细胞增殖

丹参酚酸 B 镁浓度为 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08 mg/ml 时, OD 值分别为 0.257, 0.344, 0.493, 0.517, 0.453, 与对照组相比均有 $P < 0.01$, 如图 1 所示。丹参酚酸 B 镁可以促进 HAEC 的增殖,以 0.04 mg/ml 效果最为显著。

2.2 细胞形态与存活状态

回收卫星搭载的加药组与地面对照组细胞的 Giemsa 染色后可见细胞胞膜完整、胞核清晰。置于 96

孔板中,第 17 d,光镜下可见各组细胞从微载体内爬出,如图 2 所示;第 24 d,空间加药组与地面加药组相比,细胞密度增大,如图 3 所示;第 30 d 后,各组细胞传代,空间与地面对照组的细胞、胞核、胞体变大,细胞浆颗粒明显,但加丹参酚酸 B 镁组的活细胞比对照组的细胞密度大,细胞呈梭型,胞核清晰,存活状态好,如图 4 所示。

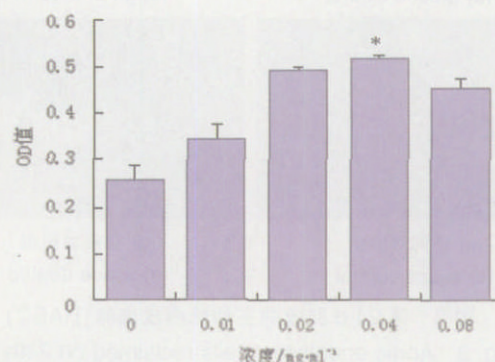


图 1 丹参酚酸 B 镁对 HAEC 细胞增殖的影响 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Effect of magnesium lithospermate B on proliferation in aortic endothelial cells ($P < 0.05$)

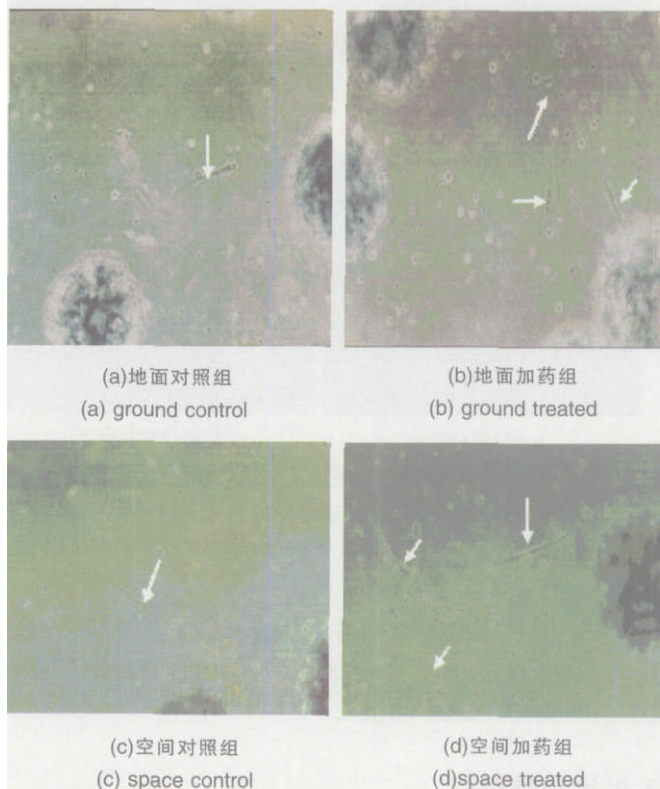


图 2 第 17 d 回收的主动脉内皮细胞 (HAEC)

(箭头所示为从微载体内爬出的 HAEC)

Fig. 2 Aortic endothelial cells reclaimed on 17th day, arrow: HAEC

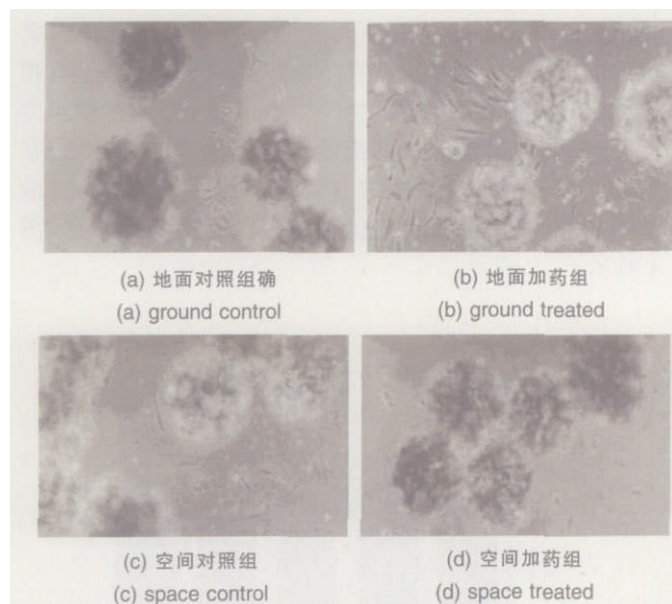


图3 第24 d回收的主动脉内皮细胞(HAEC)

Fig. 3 Aortic endothelial cells reclaimed on 24th day

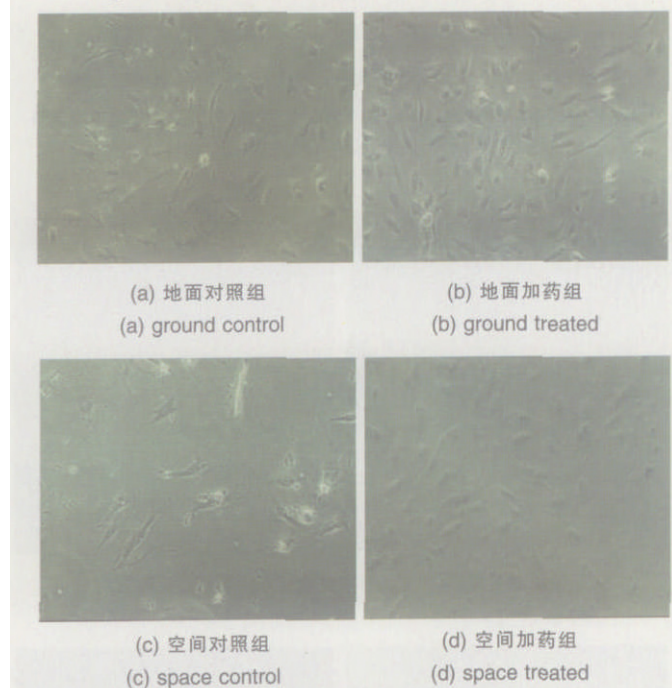


图4 第31 d回收的主动脉内皮细胞(HAEC)

Fig. 4 Aortic endothelial cells reclaimed on 31st day

2.3 细胞计数

第30 d, 胰酶消化所有细胞计数, 地面对照组、地面加药组、空间对照组和空间加药组的细胞数分别为 2.5×10^5 , 6×10^5 , 5×10^4 和 10^5 。

3 讨论与结论

丹参水溶部分具有抗氧化、抗凝、抗血栓、抗心脑血管缺血的作用, 对多种动物心、肝、肺等组织损伤均有保护作用。在低氧状态下, 复方丹参注射液可以对抗低氧所致家兔肺动脉高压, 降低肺血管阻力, 使心排血量和每搏

输出量增加, 改善由于低氧引起的心肺功能变化^[9]。丹参可以扩张冠状动脉, 增加冠状动脉血流量, 降低其阻力, 使血液重新分布, 缩短实验性心肌缺血的持续时间, 缩小心肌梗塞的范围, 对于脑垂体后叶素引起的大鼠缺血性心电变化及24 h后心肌梗塞范围有显著的保护作用^[7]。丹参酚酸B镁能够增加冠状动脉血流量, 降低心肌耗氧量, 对抗心肌缺血, 抑制JNK3mRNA的活性, 从而在缺血、再灌注损伤中对心脏起到保护作用^[8]。丹参酚酸B镁还能够减少因缺氧所导致的细胞损伤, 抑制因缺氧诱导的细胞内 Ca^{2+} 增加^[9], 从而保护细胞的结构和功能。

在空间环境下, 血容量、心脏、血管及其神经调节系统将发生一些适应性变化。例如, 宇航员心率加快, 心脏每搏输出量降低, 血压下降。短期空间飞行后, 心脏功能保持正常, 射血分数和心输出量不变; 但经历长期空间飞行后, 心脏射血分数和射血时间百分比降低, 左室收缩末容积增加, 心脏功能减弱^[10]。长期处于空间环境中, 动脉平滑肌会出现萎缩, 官腔变大, 颈静脉和股静脉官腔也明显增加, 毛细血管内皮细胞向官腔突出^[11]。这些变化也是动物体长期处于空间环境中的适应性变化, 注意这些变化是不可逆的, 当其脱离空间环境后, 不可能在短期内恢复。

空间环境射线损伤血管内皮细胞, 使血管内腔闭塞, 微循环障碍, 导致心肌缺血性损伤, 心功能障碍。本研究发现, 丹参酚酸B镁在0.01~0.08 mg/ml浓度下, 均能使血管内皮细胞增殖, 其中0.04 mg/ml对 endothelial cell 增殖效果最显著。形态学研究发现, 丹参组细胞经卫星搭载后, 细胞形态完整, 存活状态良好, 且细胞计数增加。丹参酚酸B镁能够改善血管内皮细胞的功能, 可能与丹参酚酸B镁能够保护细胞的线粒体、改善能量代谢有关。低温细胞生存系统可使一些细胞在低温(10~22℃)、无CO₂、不换液条件下存活33 d, 但低温、缺氧、代谢产物堆积会影响到内皮细胞的存活。经丹参酚酸B镁处理过的内皮细胞, 放置低温系统26 d后与对照组相比, 从细胞状态到存活细胞数都得到改善。我们推测, 丹参酚酸B镁能够清除黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子及抗拒线粒体产生的脂质自由基, 提高超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶的活性, 且能上调Bcl-2和下调Bax的表达, 减少内皮细胞凋亡的发生, 从而保护了血管内皮细胞的结构和功能。

综上所述, 理论上丹参酚酸B镁能够改善宇航员在太空中的心、肺功能; 实验中丹参酚酸B镁对低温细胞生存系统中内皮细胞有保护作用, 能够改善空间环境中人主动脉内皮细胞的生存状况, 减轻宇宙射线、微重力、微磁场等对细胞的损伤程度。本文的研究, 为预防空间环境损伤宇航员的心血管功能提供了初步的实验依据, 进一步的实验正在进行中。

参考文献(References)

- [1] SOUNG D Y, RHEE S H, KIN J S, et al. Peoxynitrit scavenging activity of lithospermate B from *Salvia miltionrrhia* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(10):1427- 1432.
- [2] LUO W B, WANG Y P. Magnesium Lithospermate B inhibits hypoxa- indued calcium influx and nitric oxide release in endothelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1135- 1142.
- [3] 徐梅, 房青, 向青, 等. 新型低温细胞生存系统用于太空无源搭载可行性分析[J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(8): 566- 569.
XU Mei, FANG Qing, XIANG Qing, et al. Study of hypothermia cell living system in spaceflight without power source[J]. *Chin J Rehab Med*, 2005, 20(8): 566- 569.
- [4] 房青, 唐劲天, 向青, 等. 基因工程细胞的太空搭载装置: 中国, ZL 03 1 20906.8[P]. 2005- 10- 26
FANG Qing, TANG Jintian, XIANG Qing, et al. The equipment for genetic engineering cells in outer space: China, ZL 03 1 20906.8[P]. 2005- 10- 26.
- [5] 郑先科, 王新均, 冯桂香, 等. 复方丹参注射液对家兔低氧性肺血管收缩反应的影响[J]. *中西医结合杂志*, 1991, 11(12): 733- 736.
ZHENG Xianke, WANG Xinjun, FENG Guixiang, et al. The effects of Dan Shen- Co injection liquid on hypoxic pulmonary vasoconstriction of rabbits[J]. *Chin J Integr Trad Western Med*, 1991, 11(12):733- 736.
- [6] ECHBERG D L. Neurolab Autonomic Nervous System Team. Bursting into space: Alterations of sympathetic control by space travel[J]. *Acta Physiol Scand*, 2003, 177(3):299- 311.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 522.
CHEN Qi. The study methodology of Chinese- medicine pharmacology [M]. 1st ed. Beijing: People's Sanitation Press, 1993: 522.
- [8] 杨丽敏, 肖耀龙, 欧阳家惠. 紫草酸镁 B 抑制缺血/再灌注心肌细胞 c- Jun N- 末端激酶 3 mRNA 的表达 [J]. *药学报*, 2003, 38(7): 487- 491.
YANG Limin, XIAO Yaolong, OUYANG Jiahui. Inhibition of magnesium lithospermate B on the c- Jun N- terminal kinase 3 mRNA expression in cardiomyocytes encountered ischemia/reperfusion injury[J]. *Acta Pharmaceutica Sin*, 2003, 38(7): 487- 491.
- [9] LUO W B, WANG Y P. Magnesium Lithospermate B inhibits hyoxia- indued calcium influx and nitri oxide release in endothelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1135- 1142.
- [10] MARTIN D S, SOUTH D A, WOOD M L, et al. Comparison of echocardiographic changes after short - and long- duration spaceflight[J]. *Aviat Space Env Med*, 2002, 73(6):532- 536.
- [11] PERHONEN M A, FRANCO F, LANE L D, et al. Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91(2): 645- 653.

(责任编辑 朱宇)

·科技智力游戏·

好玩的数学——3 枚骰子的点数

取 3 枚均匀的骰子, 每枚骰子的 6 个面都分别刻着 1~6 的点数。同时抛掷这 3 枚骰子, 然后考虑得到的 3 枚骰子点数之和, 显然有些和数出现的机会多些, 有些和数出现的机会少些。由此可引出一个骰子点数问题: 3 枚骰子点数之和等于 9 与等于 10 的机会是否相等? 许多玩骰子的人从经验中得出的结论是不相等。但这好像是讲不通的。因为 3 个骰子各面的点数构成总和为 9 的情况有 6 种: 1, 2, 6; 1, 3, 5; 1, 4, 4; 2, 2, 5; 2, 3, 4; 3, 3, 3。而总和等于 10 的情况也有 6 种: 1, 3, 6; 1, 4, 5; 2, 2, 6; 2, 3, 5; 2, 4, 4; 3, 3, 4。因此, 3 个骰子点数之和等于 9 与等于 10 的可能性应相同才对。17 世纪一位为此而困惑的意大利贵族就这一问题向伽利略 (1564- 1642) 请教。伽利略研究并解答了这个问题。

你也来回答一下这个骰子点数问题吧! 抛掷 3 枚均匀的骰子, 3 个骰子点数之和等于 9 的可能性与等于 10 的可能性是否相同? 如果不相同, 为什么?

上期“稳操胜券的策略”答案

利用图形具有的中心对称性, 后放者乙有稳操胜券的绝妙策略: 无论前者甲把矩形小片 (或围棋子) 放在什么位置, 乙只需把自己的矩形小片 (或围棋子) 放在与其中心对称的位置上就可以了。照这样, 只要前者甲有地方放下自己的矩形小片 (或围棋子), 那么对称的那个位置必定也空着, 乙完全可以放下自己的矩形小片 (或围棋子)。因而依此策略, 必定是甲先没有地方放, 即甲必输。

利用对称是解决数学问题的常用策略。下面再提出一个简单的问题留给读者思考: 一张圆形的桌子, 两个人轮流往桌子上摆放大小相同的硬币, 要求硬币平放在桌子上, 不准重叠, 不准移动。如果一方在桌子上放下一枚硬币后另一方无地方可放, 则他就是胜利者。问: 能否运用某种策略, 使其中一方稳操胜券?

(供稿 韩雪涛 责任编辑 黄永明)