粉防己碱对阴茎海绵体平滑肌细胞抗氧化能力的影响

陈 俊[1], 张 滨[1*], 林 慧[1], 刘继红[2], 王 涛[2], 蔡柳洪[1], 齐 涛[1], 藏志军[1]
(1. 中山大学附属第三医院不育与性医学科, 广东 广州 510630;
2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科, 湖北 武汉 430030)

摘 要:【目的】研究粉防己碱(Tet)对过氧化氢(H_2O_2)致新西兰白兔阴茎海绵体平滑肌细胞损伤的保护作用。【方法】体外培养新西兰白兔阴茎海绵体平滑肌细胞,随机分为3组:对照组、H_2O_2组和Tet + H_2O_2组。①四甲基偶氮唑盐还原实验观察Tet对H_2O_2诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞的存活率;②化学比色法观察Tet对H_2O_2诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞的乳酸脱氢酶(LDH)的释放、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量的影响。【结果】H_2O_2诱导阴茎海绵体平滑肌细胞4 h,①细胞存活率由100%降至(48.57 ± 4.1)% (n = 8; P < 0.01); ②LDH释放由对照组的(487.3 ± 78.6) U/L增加到(1105.5 ± 65.8) U/L (n = 8; P < 0.01);③MDA含量由对照组的(3.8 ± 1.4) nmol · L^{-1} · mg^{-1}增加到(77.3 ± 8.6) nmol · L^{-1} · mg^{-1}(n = 8; P < 0.01);④SOD活性由对照组的(51.8 ± 5.9) U/mL降为(30.7 ± 4.5)/mL (n = 8; P < 0.01)。粉防己碱可浓度依赖性地提高细胞存活率;降低LDH释放和MDA含量,提高SOD活性。【结论】粉防己碱对H_2O_2致阴茎海绵体平滑肌细胞损伤具有保护作用,其作用机制可能与增强细胞抗氧化能力,减少脂质过氧化物导致的细胞膜损伤有关。

关键词: 粉防己碱; 阴茎海绵体; 平滑肌细胞; 过氧化氢
中图分类号: R392.4 **文献标识码**: A **文章编号**: 1672-3554(2009)05-0543-04

Antioxidant Effect of Tetrandrine on Cultured Rabbit Corpus Cavernosum Smooth Muscle Cells Injured by Hydrogen Peroxide

CHEN Jun[1], ZHANG Bin[1*], LIN Hui[1], LIU Ji-hong[2], WANG Tao[2], CAI Liu-hong[1], QI Tao[1], ZANG Zhi-jun[1]
(1. Department of Infertility & Sexual Medicine, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract:【Objective】To investigate the antioxidant effects of tetradrine (Tet) on cultured corpus cavenosum smooth muscle cells (CCSMC) injured by hydrogen peroxide (H_2O_2). 【Methods】The CCSMC were cultured in vitro and divided randomly into three groups: contrast group, H_2O_2 group, and Tet + H_2O_2 group. The effects of Tet on the viability of cell injured by H_2O_2 were assessed by 4,5-simethylthiazaoly colorimetric assay. The level of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) activity and lactate dehydrogenase (LDH) release of CCSMC injured by H_2O_2 were detected by chemical colorimetry. 【Results】After treatment with 1 mmol/L H_2O_2 for 4 h, the cell viability dropped from 100% to (48.57 ± 4.1)% (n = 8; P < 0.01). While LDH release increased from (487.3 ± 78.6) U/L to (1105.5 ± 65.8) U/L (n = 8; P < 0.01). The level of MDA increased from 3.8 ± 1.4 nmol·L^{-1}·mg^{-1} to (77.3 ± 8.6) nmol·L^{-1}·mg^{-1} (n = 8; P < 0.01) and the SOD activity dropped to (30.7 ± 4.5) U/mL from (51.8 ± 5.9) U/mL that in contrast group (n = 8; P < 0.01). However, treatment with different concentration of Tet (10^{-7}–10^{-4} mol/L) could inhibit the damaging effects of H_2O_2, with increased cell viability and SOD activity (P < 0.01), and decreased LDH release and MDA content (P < 0.05 or P < 0.01), respectively. 【Conclusion】Tet has protective effect on CCSMC injured by H_2O_2, which might be related to enhancing the antioxidant abilities of CCSMC, and decreasing the injury of cell membrane by lipid peroxidation.

Key words: tetradrine; corpus cavernosum; smooth muscle; hydrogen peroxide
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2009,30(5):543-546]

收稿日期: 2009-04-21
基金项目: 中国博士后科学基金(20070410176);2008 Asia Pacific Society for Sexual Medicine Research Grant (2008-2)
作者简介: 陈俊,博士,主治医师,研究方向:男科学,E-mail:jchen121@126.com; * 通信作者,张滨,硕士生导师,E-mail: doc305 @163.com

粉防己碱(tetrandrine, Tet),又名汉防己甲素,是从防己科千金藤属植物粉防己(Stephania tetrandra S. Moore)干燥根块中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱。在开发治疗勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)新药的前期研究过程中,我们发现Tet具有松弛离体新西兰白兔阴茎海绵体的作用[1-4],并初步证实其作用机制与Tet通过以下途径降低阴茎海绵体平滑肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平有关。①通过阻滞电压依赖性钙通道和 α_1 受体依赖性钙通道,而抑制细胞外钙内流;②抑制细胞内钙库释放;③抑制磷酸二酯酶活性而增加阴茎海绵体组织中cAMP的含量。而与一氧化氮、前列腺素类的释放或钾通道激活等介导的途径无关。研究发现,ED的发生和发展与体内抗氧化功能减弱以及自由基的增多密切相关[5-7]。抗氧化治疗有助于改善ED[5-7]。已有研究证实Tet具有良好的清除自由基、抗氧化作用[8],但Tet是否具有通过抗氧化达到治疗ED的作用,尚未见报道。本文通过体外培养新西兰白兔阴茎海绵体平滑肌细胞,观察Tet对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞的存活率、乳酸脱氢酶(LDH)的释放、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量的影响,探讨Tet对 H_2O_2 致新西兰白兔阴茎海绵体平滑肌细胞损伤的保护作用,为开发新的、可能治疗ED有效的药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

4 ~ 6个月龄的雄性成年新西兰白兔(2.5 ~ 3.0 kg),购于华中科技大学同济医学院实验动物中心。粉防己碱(Tet)由华中科技大学同济医学院药理学系王嘉陵教授馈赠,纯度 > 98%。用0.1 mol/L HCl溶解后,以0.1 mol/L NaOH调节pH至5.5 ~ 6。Dulbecco改进的Eagle培养基(DMEM)和胶原酶Ⅰ(Collagenase Type Ⅰ)购于Gibco公司。胰蛋白酶(trypsin)(1:250)购于Amresco公司(Solon, Ohio, USA);噻唑蓝(MTT)购于Duchefa公司(The Netherlands);过氧化氢(30%,AR级)购于上海桃浦化工厂;LDH测定试剂盒、SOD测定试剂盒、MDA测定试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 阴茎海绵体平滑肌细胞的分离和培养

新西兰白兔耳缘静脉空气栓塞致死后,迅速完整的割取阴茎,在含有新鲜双抗(青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L)的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)中仔细分离出阴茎海绵体。然后将海绵体组织剪成小块,移入含双抗PBS的青霉素小瓶中剪成1 ~ 3 mm的小块,用含双抗PBS液漂洗2次。在含有1 g/L胶原酶Ⅰ、200 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中37 ℃下消化12 ~ 18 h。海绵体平滑肌细胞经离心收集,用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)液离心洗涤。细胞用含200 mL/L胎牛血清、10^5 U/L青-链霉素和2 mmol/L谷氨酰胺的DMEM培养液进行原代培养,细胞培养24 h后更换培养液,以后每2 d更换培养液1次。使用培养3 ~ 4代的平滑肌细胞进行实验[2,9]。

1.3 实验分组

用2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞,将平滑肌细胞 2×10^4 个/孔接种96孔培养板,在正常条件下用含100 mL/L胎牛血清的培养液中培养2 ~ 3 d。改用含50 mL/L胎牛血清的培养液中培养24 h后,随机分为3组:对照组、H_2O_2 组和Tet + H_2O_2 组。同时设立空白对照组(仅有培养液,而无平滑肌细胞)。首先,Tet + H_2O_2 组给予终浓度分别为 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}、10^{-4} mol/L的Tet,而对照组、H_2O_2 组分别给予等体积的培养液,预孵育24 h。然后,H_2O_2 组和Tet + H_2O_2 组各加入终浓度为1 mmol/L H_2O_2,而对照组给予等体积的培养液,继续孵育4 h。随后,进行如下各项指标检测。

1.4 Tet对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞存活率的影响

细胞经1.3方法处理后,每孔加20 μL MTT(终浓度为5 mg/mL),37 ℃孵育4 h,待蓝紫色的结晶形成后,小心吸弃上清液,每孔加二甲亚砜(DMSO)150 μL,振荡10 min,使细胞中的蓝紫色结晶物充分溶解,在全自动酶标仪上测定各孔吸光度 D(490 nm),计算细胞存活率:$r=(D_{试验}-D_{空白})/(D_{对照}-D_{空白})\times 100\%$。

1.5 Tet对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞释放LDH的影响

细胞经1.3方法处理后,分别收集各组每孔细胞上清液。用LDH试剂盒于440 nm处测定培养液中的LDH含量。

1.6　Tet 对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞的 SOD 活性的影响

细胞经 1.3 方法处理后,分别收集各组每孔细胞上清液。用 SOD 试剂盒于 550 nm 处测定培养液中 SOD 的活性。

1.7　Tet 对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞释放 MDA 的影响

细胞经 1.3 方法处理后,吸出各组每孔培养液,用 PBS 洗 2 遍,每孔加入 0.1 mol/L PBS、0.05 mmol/L EDTA(pH 8.0) 1 mL,再加入 50 μL 1% Triton-X 100,充分吹打培养板里的细胞,使细胞溶解。用 MDA 测定试剂盒于 532 nm 处测定细胞层中的 MDA 含量。用考马斯亮兰蛋白测定试剂盒于 595 nm 测定蛋白含量。

1.8　统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 软件进行单因素方差分析、Dunnett-t 检验和两独立样本的 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　Tet 对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞存活率的影响

1 mmol/L H_2O_2 可使平滑肌细胞存活率由 100%降至 (48.57 ± 4.1)% (n = 8; $P<0.01$)。10^{-7} 和 10^{-6} mol/L Tet 对 H_2O_2 预处理的平滑肌细胞存活率没有影响 (n = 8; $P>0.05$),而 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L Tet 能浓度依赖性地抑制 H_2O_2 引起的平滑肌细胞存活率降低(n = 8; $P<0.01$;表 1)。

2.2　Tet 对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞释放 LDH 的影响

1 mmol/L H_2O_2 可使平滑肌细胞释放 LDH 增加,由对照组的 487.3 ± 78.6 U/L 增加到 1 105.5 ± 65.8 U/L (n = 8; $P<0.01$)。Tet (10^{-7} ~ 10^{-4}mol/L) 可剂量依赖性地减少 H_2O_2 引起的 LDH 释放 (n = 8; $P<0.05$ or $P<0.01$;表 1)。

2.3　Tet 对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞的 SOD 活性的影响

1 mmol/L H_2O_2 使平滑肌细胞中 SOD 的活性明显降低,由对照组的(51.8 ± 5.9) U/mL 降为 (30.7 ± 4.5) U/mL (n = 8; $P<0.01$)。10^{-7} mol/L Tet 对 H_2O_2 预处理的平滑肌细胞中 SOD 活性没有影响 (n = 8; $P>0.05$),而 10^{-6}、10^{-5} 和 10^{-4} mol/L Tet 能浓度依赖性地恢复 SOD 活力 (n = 8; $P<0.05$ or $P<0.01$;表 1)。

2.4　Tet 对 H_2O_2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞形成 MDA 的影响

1 mmol/L H_2O_2 使平滑肌细胞形成 MDA 显著增多,由对照组的(3.8 ± 1.4)nmol·L^{-1}·mg^{-1} 增加到(77.3 ± 8.6)nmol·L^{-1}·mg^{-1}(n = 8; $P<0.01$)。Tet (10^{-7} ~ 10^{-4} mol/L) 可剂量依赖性地抑制 H_2O_2 损伤导致的 MDA 形成增多(n = 8; $P<0.01$;表 1)。

表 1　粉防己碱对 H2O2 诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞的存活率、释放 LDH、SOD 活性和形成 MDA 的影响

Table 1　Effect of tetradrine on cell viability, LDH release, SOD activities and MDA content of corpus cavernosum smooth muscle injured by H_2O_2　($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Cell viability (100%)	LDH (U·L^{-1})	SOD (U·mL^{-1})	MDA (nmol·L^{-1}·mg^{-1})
Control	8	100 ± 0	487.3 ± 78.6	51.8 ± 5.9	3.8 ± 1.4
H_2O_2	8	47.58 ± 8.2 1)	1105.5 ± 65.8 1)	30.7 ± 4.5 1)	77.3 ± 8.6 1)
H_2O_2 + 10^{-7} mol·L^{-1} Tet	8	48.52 ± 7.6	927.7 ± 64.1 2)	29.8 ± 4.6	49.7 ± 5.4 3)
H_2O_2 + 10^{-6} mol·L^{-1} Tet	8	47.63 ± 5.9	783.8 ± 49.6 3)	33.1 ± 5.2 2)	41.8 ± 7.1 3)
H_2O_2 + 10^{-5} mol·L^{-1} Tet	8	61. 68 ± 8.7 3)	751.5 ± 36.6 3)	38.9 ± 6.3 3)	18.1 ± 8.5 3)
H_2O_2 + 10^{-4} mol·L^{-1} Tet	8	76.5 ± 10.3 3)	659.7 ± 73.8 3)	42.3 ± 5.9 3)	8.6 ± 3.2 3)

Compared with control group, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$; Compared with H_2O_2 group, 3) $P<0.01$

3　讨　论

阴茎海绵体平滑肌是调节阴茎勃起的重要因素之一。各种诱发勃起的神经递质、激素或其它影响因素,最终均通过松弛平滑肌,导致阴茎血流量增加而诱发和维持阴茎勃起。体内代谢过程中产生的自由基通过攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸

而引发脂质过氧化作用[10]。正常情况下,机体通过抗氧化系统的作用,使得自由基和脂质过氧化物的产生与清除保持动态平衡;而当机体的抗氧化系统受到损伤时,过量的自由基可通过攻击生物膜中多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,从而使细胞膜稳定性和通透性发生改变,诱导平滑肌细胞凋亡,而导致勃起功能障碍的发生和发展。因此,从治疗角度来讲,具有抗氧化功效的药物,就有可能治疗ED[1-3]。

外源性H_2O_2极易通过细胞膜进入细胞,在细胞内转变成高活性自由基,从而造成细胞损伤。由于H_2O_2损伤模型操作简单,容易控制,被广泛用于体外实验模拟细胞的过氧化损伤[10]。因此,本研究通过建立体外H_2O_2诱导阴茎海绵体平滑肌细胞损伤的实验模型,观察Tet对H_2O_2致新西兰白兔阴茎海绵体平滑肌细胞损伤的保护作用。MTT结果显示,1 mmol/L H_2O_2可使阴茎海绵体平滑肌细胞的存活率显著降低,而Tet对这种降低具有浓度依赖性地抑制作用。

LDH水平升高是细胞受损的一个敏感指标,细胞释放LDH增加,通常反映细胞损伤、细胞膜通透性增加。本研究发现,H_2O_2诱导4 h,阴茎海绵体平滑肌细胞培养液中LDH含量较正常组明显升高,Tet能浓度依赖性的降低H_2O_2所致阴茎海绵体平滑肌细胞LDH的释放。提示Tet对H_2O_2所致的细胞损伤具有一定的保护作用。

SOD是机体内清除活性氧自由基的重要酶类,主要有CuZn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD三种同功酶。SOD活力的高低可以间接反应机体清除氧自由基的能力。而MDA是氧自由基攻击细胞膜中不饱和脂肪酸引发的脂质过氧化反应、形成的脂质过氧化终产物之一,是机体发生氧化应激的重要指示物。它可阻止胆固醇从细胞膜内侧向外侧的移动与交换,导致细胞膜内胆固醇增加,流动性下降,从而使细胞膜的稳定性和通透性发生改变。所以,MDA水平的高低能够较好地反映细胞氧化损伤的程度,是研究抗氧化功能的常用检测指标之一。本实验结果发现,阴茎海绵体平滑肌细胞氧化性损伤后,SOD活性受到抑制,MDA的生成明显增加;而Tet能浓度依赖性的恢复H_2O_2诱导损伤的阴茎海绵体平滑肌细胞的SOD活性,降低MDA含量。提示Tet的保护作用机制与提高细胞抗氧化能力,减少脂质过氧化物导致的细胞膜损伤有关。

综上所述,Tet对H_2O_2诱导新西兰白兔阴茎海绵体平滑肌细胞损伤具有明显的保护作用,其作用机制可能与增加SOD活性、减少MDA的生成和LDH释放有关。这提示Tet可能具有通过抗氧化达到治疗ED的作用。但Tet是否对过氧化导致的阴茎海绵体内皮细胞损伤具有保护作用及其机制,尚有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 陈 俊,刘继红,王 涛,等. 粉防己碱对新西兰白兔阴茎海绵体cAMP和cGMP水平的影响[J]. 中国男科学杂志,2006,20(3):73-76.

[2] Liu JH, Chen J, Wang T, et al. Effects of tetrandrine on cytosolic free calcium concentration in corpus cavernosum smooth muscle cells of rabbits [J]. Asian J Androl, 2006,8(4):405-409.

[3] 陈 俊,刘继红,王 涛,等. 六种中药提取物对离体新西兰白兔阴茎海绵体的松弛作用[J]. 中华男科学杂志,2005,11(10):793-795.

[4] 陈 俊,刘继红,肖恒军,等. 粉防己碱松弛离体新西兰白兔阴茎海绵体作用的研究[J]. 中华男科学,2003,9(3):234-236.

[5] Jones RW, Rees RW, Minhas S, et al. Oxygen free radicals and the penis [J]. Expert Opin Pharmacother, 2002,3(7):889-897.

[6] Jin L, Burnett AL. NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction [J]. Asian J Androl, 2008,10(1):6-13.

[7] Deng W, Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, et al. Gene and stem cell therapy for erectile dysfunction [J]. Int J Impot Res, 2005,17(suppl 1):S57-S63.

[8] 张 萌. 粉防己碱的抗氧化能力与心肌保护作用的相关性研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2008,10(3):21-26.

[9] Chen J, Liu JH, Jjiang ZJ, et al. Effects of neferine on cytosolic free calcium concentration in corpus cavernosum smooth muscle cells of rabbits [J]. Andrologia, 2007,39(4):141-145.

[10] Li WG, Miller FJ Jr, Zhang HJ, et al. H_2O_2-induced O_2^- production by a non-phagocytic NAD (P)H oxidase causes oxidant injury [J]. J Biol Chem, 2001,276(31):29251-29256.

(编辑 张恩健)