

复方龙脉宁不同提取液对 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤的保护作用

宋 逍^{1*}, 王昌利¹, 段 玺², 张文娟¹, 董林娟¹

¹陕西中医药大学药学院; ²陕西中医药大学附属医院检验科, 咸阳 712046

摘要: 采用不同浓度 H₂O₂ 处理 H9c2 心肌细胞, MTT 法检测复方龙脉宁 (Compound Longmaining, CLMN) 水提液和醇提液含药血清 (5%、10%、20% 组) 对氧化损伤的 H9c2 心肌细胞活性的影响, 研究 CLMN 提取液对 H₂O₂ 导致 H9c2 心肌细胞氧化损伤的修复作用。结果显示, 当 H₂O₂ 浓度为 100 μM, 作用时间 24 h, 可建立稳定的 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型; 与对照组相比, 经 H₂O₂ 处理后的细胞活性明显下降, SOD 活性显著降低, 而 LDH 活性、MDA 含量则显著增加, 而用 CLMN 水提液和醇提液含药血清 (10%、20% 组) 处理氧化损伤的 H9c2 心肌细胞, 可显著提高细胞存活率及 SOD 活性, 降低 LDH 活性和 MDA 含量。说明 CLMN 水提液和醇提液均对 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤具有很好的保护作用。

关键词: 复方龙脉宁提取液; H9c2 心肌细胞; MTT 法; 心肌氧化损伤

中图分类号: R542.22

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.1.014

Protective Effect of Compound Longmaining Extracts on H₂O₂-Induced H9c2 Cardiomyocytes Injury

SONG Xiao^{1*}, WANG Chang-li¹, DUAN Xi², ZHANG Wen-juan¹, DONG Lin-juan¹

¹School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine; ²Clinical Laboratory, Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China

Abstract: H9c2 cardiomyocytes were treated with different concentrations of H₂O₂. The effect of Compound Longmaining (CLMN) water extract and alcohol extract (5%, 10%, 20% group) on H9c2 cardiomyocytes injured by H₂O₂ was detected by MTT assay. The results showed that a stable H9c2 cardiomyocytes injury model can be established when the concentration of H₂O₂ was 100 μM and the action time was 24 h. Compared with the control group, the activity of the cells decreased obviously after treatment with H₂O₂, and the activity of SOD decreased significantly, but the activity of LDH and the content of MDA increased significantly. While CLMN water extract and ethanol extract serum containing drugs (10%, 20% groups) can significantly improve cell viability and SOD activity, as well as reduce LDH activity and MDA content. The results indicated that CLMN water extract and ethanol extract can protect H9c2 cells from oxidative injury induced by H₂O₂.

Key words: CLMN extract; H9c2 cardiomyocytes; MTT method; myocardial oxidative injury

缺血性心脏病具有较高致死率, 严重危害着人类健康。而心肌细胞氧化损伤是引起缺血性心脏病的重要病理因素之一^[1]。复方龙脉宁是陕西中医药大学附属医院多年使用的治疗缺血性心脏病的良好临床经验方, 对心脑血管疾病有显著疗效。经过前期实验证实, 复方龙脉宁对小鼠缺血缺氧性心肌

损伤有明显改善作用^[2]。本研究采用 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型, 通过血清药理学方法来观察 CLMN 不同提取液的含药血清对 H9c2 心肌细胞氧化损伤增殖的影响。进一步从细胞水平上为 CLMN 改善缺血性心脏病提供一定的理论支持。

1 材料与仪器

1.1 实验药物

CLMN 水提液和 CLMN 醇提液, 该提取液制备于陕西省中药新药与基础研究重点实验室 (国家中管局中药制剂三级实验室)。

收稿日期: 2017-04-26 接受日期: 2017-08-16

基金项目: 国家自然科学基金资助 (81373944, 81373978); 陕西省科学技术厅课题 (2012KTCQ03-13); 陕西省中药制药重点学科专项

* 通信作者 E-mail: song-xiaoyao@163.com

1.2 实验动物

昆明小白鼠,清洁级,雄性,30只,体重 20 ± 2 g,购于第四军医大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK-(军)2012-0007。

1.3 细胞株

H9c2大鼠心肌细胞(购于博士德生物,CX0125)。

1.4 试剂

DMEM培养基(HyClone, NZL1254),胎牛血清(TransSerum™ HQ Fetal Bovine Serum, I20121),胰蛋白酶(HyClone, 0.25%),双抗(CORNING, 30002255),磷酸盐缓冲液(HyClone, NZJ1227),二甲基亚砜(Sigma公司)。

1.5 仪器

细胞培养箱(ESCO, CCL-170B-8),倒置显微镜(重庆奥特光学, BDS200), Lx808酶标仪(美国BioTek公司),生物安全柜(ESCO)。

2 实验方法

2.1 CLMN不同提取液的制备

2.1.1 CLMN醇提取液的制备

取葛根、穿山龙、川芎、蜂胶共96 g粉碎,加8倍量70%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,合并提取液,提取液抽滤除杂,回收乙醇至无醇味,水浴浓缩至稠膏状,调至浓度为2 g/mL生药材,4℃保存备用,用前以生理盐水配制使用。

2.1.2 CLMN水提取液的制备

取葛根、穿山龙、川芎、蜂胶共96 g粉碎,加8倍量水煎煮3次,每次0.5 h,合并煎煮液,水浴浓缩至稠膏状,调至浓度为2 g/mL生药材,4℃保存备用,用前以生理盐水配制使用。

2.2 含药血清的制备及分组

小鼠30只随机分为5组:空白组,CLMN水提液组(24 g/kg),CLMN醇提液组(24 g/kg),地奥心血康阳性对照组(0.166 g/kg),空白组给予生理盐水^[2]。上述各组灌胃体积为0.02 mL/g/d,连续5 d,末次给药后1 h(末次灌药前禁食不禁水12 h),摘眼球取血,3000 × g离心15 min分离血清,经0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,分装,-20℃冰箱冻存备用。细胞给药组可分为CLMN水提液含药血清5%、10%、20%组及CLMN醇提液含药血清5%、10%、20%组。

2.3 H9c2心肌细胞的培养

H9c2心肌细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液,置于37℃,5%CO₂的培养箱中培养,当细胞长至约85%时,弃旧培养液,PBS液冲洗2次,0.25%胰蛋白酶消化至细胞变圆,DMEM完全培养液中和,细胞液移至离心管,1000 × g离心5 min,弃上清液,加入新鲜培养液吹打成单细胞悬液,调细胞浓度为 1×10^4 个/mL,接种于96孔板中,每组复5孔,培养24 h至细胞贴壁,即可进行实验。

2.4 MTT法筛选H₂O₂诱发H9c2心肌细胞氧化损伤模型

取指数生长期的H9c2细胞以 1×10^4 个/mL的细胞浓度接种于96孔板中,培养箱中培养24 h后,加入不同浓度H₂O₂(50、100、200、400、800 μmol/L)于96孔板中,每个浓度复5孔。分别在培养2、4、6、24 h后弃旧培养液加入同体积的无血清培养液,再加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL)培养4 h,弃上清后加入150 μL DMSO,振荡15 min,于酶标仪上490 nm处检测细胞OD值,计算细胞抑制率。细胞抑制率(%) = $1 - (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$,实验平行重复3次。

2.5 CLMN不同提取液对正常H9c2心肌细胞的增殖

将浓度为 1×10^4 个/mL的细胞悬液接种于96孔板上,培养24 h至细胞贴壁,进行各组处理,共8组分别为空白组、对照组、空白血清组、CLMN水提液含药血清5%、10%、20%组、CLMN醇提液含药血清5%、10%、20%组。分别按各组要求进行处理,继续培养24 h后,应用MTT法检测细胞OD值。计算各组细胞活力,细胞活力(%) = $(A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

2.6 CLMN不同提取液对H9c2心肌细胞氧化损伤的增殖

取指数生长期的H9c2心肌细胞以 1×10^4 个/mL的细胞浓度接种于96孔板中,培养24 h后进行处理,共10组,空白组,空白血清组,模型组,CLMN水提液含药血清20%、10%、5%组,CLMN醇提液含药血清20%、10%、5%组。弃上清液加入同体积的无血清培养液,各组进行含药血清处理,继续培养6、12、24 h后进行氧化损伤处理,应用MTT法测定细胞OD值,计算各组细胞存活率。

2.7 超氧化物歧化酶、乳酸脱氢酶等指标测定

采用试剂盒测定SOD活力,LDH活性,MDA含

量,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

2.8 数据统计分析

采用 SPSS19.0 处理软件,组间的差异性用 Ttest 检验,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达。

3 实验结果

3.1 MTT 法测定不同浓度 H9c2 心肌细胞的生长曲线

根据三个不同细胞浓度检测其每天 OD 值的趋势。如图 1 所示,细胞浓度为 5×10^4 个/mL 和细胞浓度为 1×10^4 个/mL 在生长第 3d 时,其 OD 值达到最高,第 4 d 开始进入平台期。根据实验可操作性,细胞浓度为 1×10^4 个/mL 时,细胞生长曲线走势更符合实验条件。

3.2 MTT 法筛选 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型

在倒置显微镜下观察细胞状态,正常生长细胞

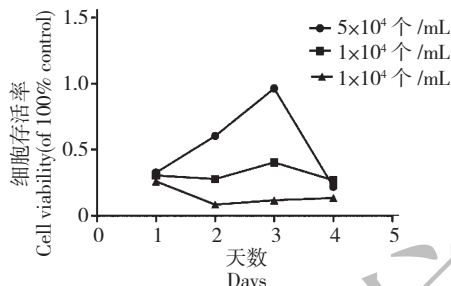


图 1 不同浓度的 H9c2 心肌细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of different concentrations of H9c2 cell

呈梭形,不同损伤组有不同程度的细胞损伤,出现细胞回缩及死细胞。如表 1 所示,当 H₂O₂ 浓度为 100 μmol/L,细胞损伤时间为 24 h 时,H9c2 心肌细胞活力为 89%,此条件下的细胞损伤模型稳定,且能更好反应出 CLMN 不同提取液对 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用。

表 1 不同时间下不同浓度的 H₂O₂ 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of H₂O₂ on cell viability in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

C(H ₂ O ₂) (μmol/L)	细胞存活率 Cell viability (% of control)			
	2 h	4 h	6 h	24 h
0	100.00 ± 0.24	100.00 ± 0.33	100.00 ± 0.26	100.00 ± 0.31
50	92.22 ± 0.13	92.89 ± 0.33	91.59 ± 0.21	95.36 ± 0.32
100	81.28 ± 0.32	86.01 ± 0.08 **	82.91 ± 0.28 **	89.02 ± 0.22 **
200	77.16 ± 0.23	78.85 ± 0.10 **	76.53 ± 0.10 **	80.30 ± 0.13 **
400	53.29 ± 0.08	26.70 ± 0.21 **	27.73 ± 0.07 **	51.42 ± 0.20 **
800	49.18 ± 0.25	19.95 ± 0.07 **	15.12 ± 0.07 **	39.77 ± 0.12 **

注:与正常组比较,**P<0.01。

Note:compared with normal group,**P<0.01.

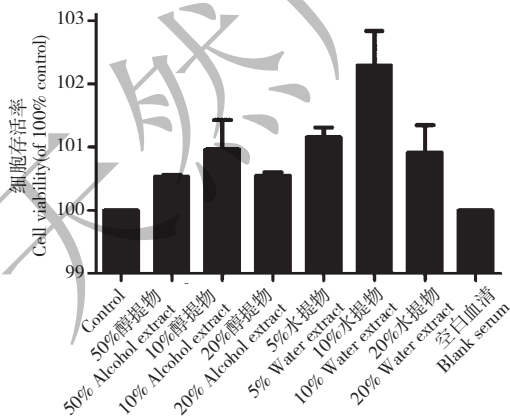


图 2 CLMN 两种提取液含药血清对正常 H9c2 心肌细胞的增殖作用

Fig. 2 Effect of CLMN extracts on proliferation of normal H9c2 cells

3.3 CLMN 不同提取液对正常 H9c2 心肌细胞增殖的影响

结果如图 2 所示,H9c2 心肌细胞在作用下,细胞增殖无明显变化,与对照组相比无显著差异(P>0.05),因此说明 CLMN 不同提取液对 H9c2 心肌细胞增殖无影响。

3.4 MTT 法检测 CLMN 不同提取液对 H₂O₂ 损伤 H9c2 心肌细胞的影响

结果见表 2,与正常组比较,模型组的细胞存活率显著降低(P<0.01);与模型组相比,CLMN 水提液含药血清 20%、10% 组和 CLMN 醇提液含药血清 20%、10% 组所作用的细胞均能改善 H9c2 心肌细胞损伤(P<0.05,P<0.01)。CLMN 水提液含药血清 5% 组和 CLMN 醇提液含药血清 5% 组对细胞存活率均无明显影响(P>0.05)。

表2 CLMN 两种提取液的含药血清对氧化损伤的 H9c2 心肌细胞的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Effect of CLMN extracts on cell viability in damaged H9c2 cells($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Group	Cell viability (% of control)		
	6 h	12 h	24 h
对照组 Control	100.00 ± 0.02	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.01
模型组 Model	53.12 ± 0.01 [▲]	45.07 ± 0.02 [▲]	49.01 ± 0.07 [▲]
CLMN 水提液 20% 组 CLMN aqueous extract-20%	93.71 ± 0.03 [*]	85.21 ± 0.01 ^{**}	81.46 ± 0.02 [*]
CLMN 水提液 10% 组 CLMN aqueous extract-10%	85.31 ± 0.03 [*]	69.72 ± 0.01 ^{**}	74.17 ± 0.02 [*]
CLMN 水提液 5% 组 CLMN aqueous extract-5%	68.53 ± 0.01	58.45 ± 0.01	60.93 ± 0.01
CLMN 醇提液 20% 组 CLMN ethanol extract-20%	90.91 ± 0.02 [*]	98.59 ± 0.02 ^{**}	117.88 ± 0.04 ^{**}
CLMN 醇提液 10% 组 CLMN ethanol extract-10%	86.01 ± 0.03	92.96 ± 0.02 ^{**}	103.97 ± 0.04 [*]
CLMN 醇提液 5% 组 CLMN ethanol extract-5%	65.73 ± 0.01	65.49 ± 0.01	67.55 ± 0.02
地奥心血康含药血清组 Di'aoXinxuekang	96.5 ± 0.03 [*]	98.81 ± 0.02 [*]	123.84 ± 0.02 ^{**}

注:与正常组比,[▲] $P < 0.01$;与模型组比,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

Note:compared with normal group,[▲] $P < 0.01$;compared with model group,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

3.5 CLMN 不同提取物对 H₂O₂ 损伤 H9c2 心肌细胞的 SOD、LDH 及 MDA 的影响

与正常组相比,H₂O₂ 模型组中 LDH 从细胞膜内漏出显著增加($P < 0.01$),超氧化物歧化酶 SOD 活性显著降低($P < 0.01$),MDA 含量明显升高($P < 0.05$)。与 H₂O₂ 模型组相比,CLMN 水提含药血清 20%、10% 组和醇提含药血清 20%、10% 组能有效降低 LDH 活性($P < 0.01$, $P < 0.05$);CLMN 水提含

药血清 20%、10% 组和醇提含药血清 20%、10% 组的 SOD 活性均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),CLMN 水提含药血清 20% 组和醇提含药血清 20% 组使 MDA 含量均显著降低($P < 0.05$)。CLMN 不同提取物可有效提高 SOD 活性及降低 MDA 含量和 LDH 活性,呈一定浓度依赖性,浓度越高,作用越明显。结果如表 3 所示。

表3 CLMN 不同提取物对损伤 H9c2 心肌细胞的 LDH、SOD 及 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 3 Effect of CLMN different extracts on LDH, SOD and MDA of injured H9c2 myocardial cell($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Group	LDH (U/L)	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)
正常组 Normal	151.22 ± 11.01	7.90 ± 1.04	1.44 ± 0.20
模型组 Model	228.85 ± 8.15 ^{▲▲}	2.44 ± 0.69 ^{▲▲}	1.94 ± 0.20 [▲]
CLMN 水提 20% 组 CLMN aqueous extract-20%	164.13 ± 10.50 ^{**}	6.38 ± 0.24 ^{**}	1.51 ± 0.18 [*]
CLMN 水提 10% 组 CLMN aqueous extract-10%	183.24 ± 13.55 ^{**}	6.60 ± 2.02 [*]	1.69 ± 0.14
CLMN 水提 5% 组 CLMN aqueous extract-5%	215.20 ± 8.20	5.91 ± 1.93	1.90 ± 0.19
CLMN 醇提 20% 组 CLMN ethanol extract-20%	169.98 ± 8.09 ^{**}	6.33 ± 0.81 ^{**}	1.53 ± 0.15 [*]
CLMN 醇提 10% 组 CLMN ethanol extract-10%	185.19 ± 14.35 [*]	5.63 ± 1.51 [*]	1.63 ± 0.20
CLMN 醇提 5% 组 CLMN ethanol extract-5%	219.10 ± 10.90	4.43 ± 1.65	1.69 ± 0.17

注:与正常组比较,^{▲▲} $P < 0.01$,[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

Note:compared with normal group,^{▲▲} $P < 0.01$,[▲] $P < 0.05$;compared with model group,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

4 讨论

大鼠 H9c2 心肌细胞是来源于胚胎期 BD1X 大鼠心脏组织的亚克隆细胞株^[3]。该细胞株易培养、实验稳定、批间差异小;因此近年来,该细胞株广泛

常被应用于心血管领域的研究,成为一种有力的研究工具^[4]。心肌缺血是引起冠心病的重要病理因素之一,而氧化应激是引起心肌缺血损伤的重要因素之一。H₂O₂ 为常见的活性氧可在一定条件下生成氧自由基,而过多的氧自由基可以造成机体细胞

膜透性增加及细胞膜结构破坏,最终导致细胞凋亡。因此,寻找抗脂质过氧化能力的中药及复方,对防治心血管疾病起积极作用。心肌细胞释放 LDH 的量常被作为基础性指标用来评价心肌细胞损伤程度。可反应心肌细胞膜的受损程度。丙二醛 MDA 为一种脂质过氧化产物,检测 MDA 含量的变化可反映体内脂质过氧化程度,能间接提示心肌细胞受自由基攻击的损伤程度。常将 MDA 与 SOD 的测定相互配合以用于抗氧化机制的研究,而 SOD 为体内重要的抗氧化酶,SOD 活性的多少可间接反应细胞清除氧自由基的能力。

本研究从细胞水平上证明了复方龙脉宁对心肌细胞的保护作用。采用 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型,研究了 CLMN 两种提取物的含药血清对氧化损伤的 H9c2 心肌细胞的保护作用。对 H₂O₂ 的浓度及损伤时间进行确定,实验结果表明,100 μmol/L H₂O₂ 损伤 24 h 可得到稳定的心肌细胞氧化损伤模型。CLMN 两种提取物的含药血清在 H9c2 心肌细胞损伤前给予预保护处理,用 MTT 法检测结果;实验结果表明,不同浓度的 CLMN 两种提取物的含药血清在不同时间点使氧化损伤的 H9c2 心肌细胞的存活率不同程度地增加,具有量效及时效相关性。其中 CLMN 两种提取物的含药血清 20% 且作用 24 h,可显著增加损伤细胞的存活率,而 CLMN 两种提取物的含药血清 5% 对损伤细胞的存活率无影响。本实验发现,H₂O₂ 模型组与正常组相比,能显著升高心肌细胞的 LDH 活性和

MDA 含量($P < 0.01$, $P < 0.05$);CLMN 不同提取物含药血清组与 H₂O₂ 模型组相比,水提和醇提含药血清的 10%、20% 组能显著降低心肌细胞的 LDH 活性和 MDA 含量及增加细胞 SOD 活性($P < 0.01$, $P < 0.05$),并呈一定的浓度依赖性。

综上所述,不同浓度的 CLMN 两种提取物的含药血清组,对氧化损伤的 H9c2 心肌细胞有不同程度的保护作用,以 CLMN 两种提取物的含药血清的 20% 组效果最为显著。其作用机制可能与增加内源性抗氧化酶活性、保护细胞膜、减少自由基、降低细胞凋亡率等有关。本研究从细胞研究表明复方龙脉宁两种提取物均具临床有效性。为进一步研究复方龙脉宁改善心肌缺血的药效物质基础以及作用机制奠定基础。

参考文献

- 1 Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, et al. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85:413-423.
- 2 Zhang WJ(张文娟), Dong LJ(董林娟), Song X(宋逍), et al. Protective effect of Compound Longmainingextract on acute myocardial ischemia hypoxia injury in rats[J]. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol*, 2015, 26:618-621.
- 3 Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart[J]. *Exp Cell Res*, 1976, 98:367-381.
- 4 Agnetti G. Activation of glucose transport during simulated ischemia in H9c2 cardiac myoblasts is mediated by protein kinase C isoforms[J]. *Life Sci*, 2005, 78:264-270.
- 15 Qiao H(乔华), Xue YB(薛燕斌), Ge L(葛林), et al. Spectroscopic analysis of interaction between galangin and bovine serum albumin[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:903-908.
- 16 Guo QL(郭清莲), He H(何欢), Pan LL(潘凌立), et al. Thermodynamics of the interaction of BCBP with bovine serum albumin[J]. *Acta Phys-Chim Sin* (物理化学学报), 2016, 32:1383-1390.
- 17 Shi J H, Chen J, Wang J, et al. Binding interaction of sorafenib with bovine serum albumin: spectroscopic methodologies and molecular docking. *Spectrochim [J]. Acta A*, 2015, 149:630-637.
- 18 Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20:3096-3102.
- 19 Gao YX(高义霞), Liu ZW(刘增文), Zhou XJ(周向军), et al. The interaction between Gardenoside and bovine serum albumin[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发). 2014, 26:1375-1375.
- 20 Yu XY, Jiang BF, Liao ZX, et al. Study on the interaction between Besifloxacin and bovine serum albumin by spectroscopic techniques[J]. *Spectrochim. Acta A*, 2015, 149:116-121.
- 21 Li JH, Zhang YL, Hu L, et al. Binding of carbendazim to bovine serum albumin: Insights from experimental and molecular modeling studies[J]. *J Mol Struct*, 2017, 1139:303-307.
- 22 Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, et al, OTAGIRI M, CURRY S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin[J]. *J Mol Biol*, 2005, 353:38-52.

(上接第 40 页)