

# 加参方浸膏对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的H9c2心肌细胞凋亡的干预作用研究<sup>△</sup>

郝轩轩<sup>1,2\*</sup>, 王新陆<sup>1,2</sup>, 崔琳<sup>2</sup>, 王幼平<sup>2</sup>, 李彬<sup>2</sup>, 谢世阳<sup>2</sup>, 高原<sup>2</sup>, 朱明军<sup>1,2#</sup> (1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1898-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.07

**摘要** 目的:观察加参方浸膏对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的H9c2心肌细胞凋亡的干预作用,并探讨其作用机制。方法:采用MTT法,考察400、200、100、50、25 μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与3.0、1.8、0.9、0.3、0.1 mg/mL加参方浸膏对H9c2心肌细胞活性的影响。将H9c2心肌细胞分为正常组、模型组、加参方组,除正常组细胞加入相应培养基外,模型组、加参方组细胞均采用50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理以诱导细胞发生氧化应激损伤,加参方组在模型组基础上加入0.3 mg/mL加参方浸膏干预处理。采用DAPI染色法,在荧光显微镜下观察细胞形态学变化;采用流式细胞仪检测细胞凋亡率;采用荧光定量逆转录-聚合酶链式反应法测定细胞中胱天蛋白酶3(Caspase-3)、Bax、Bcl-2 mRNA表达水平,Western Blot法测定Caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达水平。结果:50 μmol/L为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>最适造模浓度,0.3 mg/mL为加参方浸膏最适药物干预浓度。与模型组比较,加参方组细胞的形态改善,细胞凋亡率显著降低( $P < 0.05$ );Caspase-3、Bax mRNA及蛋白表达水平显著降低,Bcl-2 mRNA及蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。结论:加参方浸膏对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的H9c2心肌细胞凋亡有显著的抑制作用,其机制可能与下调细胞中Caspase-3、Bax表达,上调Bcl-2表达有关。

**关键词** 加参方;浸膏;过氧化氢;H9c2心肌细胞;凋亡;胱天蛋白酶3;Bax;Bcl-2

## Study on Intervention Effects of Jiashen Formula Extractum on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Apoptosis of H9c2 Cardiomyocytes

HAO Xuanxuan<sup>1,2</sup>, WANG Xinlu<sup>1,2</sup>, CUI Lin<sup>2</sup>, WANG Youping<sup>2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>, XIE Shiyang<sup>2</sup>, GAO Yuan<sup>2</sup>, ZHU Mingjun<sup>1,2</sup> (1. Henan University of TCM, Zhengzhou 450046, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

制药品费用的需求;而用药干预则是基于医院费用控制需求,即在医保超额的压力下,多销售药品不仅不会创造收入反而带来损失,在这种需求的推动下,用药干预才能发挥有效的作用。

综上所述,在费用控制需求的推动下,A区用药干预行动有效控制了药品费用,减少了临床用药品种数,并通过降低处方中辅助用药的费用比例而优化了用药结构。医院费用控制需求对提高A区用药干预的有效性起到重要的促进作用。但由于本研究主要从药品消耗角度分析干预的效果,没有涉及其他医疗指标(包括疾病的转归、平均住院日等)的变化情况,因而所得结果仍存在一定的局限性。

### 参考文献

- [1] 蒋建华. 药品费用的影响因素分析:基于省级数据的实证研究[J]. 卫生经济研究, 2015, 33(8): 30-33.
- [2] 袁姣, 左克源, 周健丘, 等. 公立医院基本药物集中采购

政策实施效果评价[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(9): 783-786.

- [3] 韩玉珍, 赵金楼, 齐英, 等. 医药利益链视角下过度医疗的成因与对策[J]. 中华医院管理杂志, 2009, 25(1): 60-63.
- [4] CHEN B, FAN VY. Global budget payment: proposing the CAP framework[J]. *Inquiry J Health Car*, 2016. DOI: 10.1177/0046958016669016.
- [5] 卫生部. 关于印发《医院处方点评管理规范(试行)》的通知[S]. 2010.
- [6] 唐露露, 丁宏, 何振仿, 等. 皖北某县基本药物“零差率”后乡镇卫生院医疗费用的分析[J]. 安徽医学, 2013, 34(6): 851-852.
- [7] 陈昭英. 我院门诊处方合理用药指标指导回顾[J]. 海南医学, 2009, 20(6): 286-287.
- [8] 于立江, 陈敬阳, 李泓. 处方负面清单管理下神经内科辅助用药合理使用效果分析[J]. 中国现代医师, 2017, 55(1): 77-79.
- [9] 张增珠, 李刚, 张静, 等. 临床药师对1 860例不合理用药医嘱的干预和分析[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(13): 1237-1239.

(收稿日期:2017-08-19 修回日期:2018-01-14)

(编辑:张静)

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81173410)

\* 博士研究生。研究方向:中医药防治心血管疾病。电话:0371-66233478。E-mail:haoxuanxuan0601@163.com

# 通信作者:主任医师,教授,博士生导师。研究方向:中医药防治心血管疾病。电话:0371-66233478。E-mail:zhumingjun317@163.com

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To observe the intervention effects of Jiashen formula extractum on hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes, and to investigate its mechanism. METHODS: MTT assay was used to investigate the effects of 400, 200, 100, 50, 25  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  and 3.0, 1.8, 0.9, 0.3, 0.1 mg/mL Jiashen formula extractum on the activity of H9c2 cardiomyocytes. H9c2 cardiomyocytes were divided into normal group, model group and Jiashen formula group. Model group and Jiashen formula group were given 50  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  to induce oxidative stress injury except that normal group was cultured with corresponding culture medium. Jiashen formula group was given 0.3 mg/mL Jiashen formula extractum for intervention on the basis of model group. Cell morphology was observed by fluorescence microscope through DAPI dye. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. Fluorescence quantitative RT-PCR was used to detect mRNA expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in cells; Western Blot assay was used to determine the protein expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2. RESULTS: 50  $\mu\text{mol/L}$  was the most suitable modeling concentration of  $H_2O_2$ ; 0.3 mg/mL was the most suitable intervention concentration of Jiashen formula extractum. Compared with model group, cells in Jiashen formula extractum group were significantly improved in morphology and reduced in apoptosis rate; mRNA and protein expression levels of Caspase-3 and Bax were significantly reduced, and those of Bcl-2 were significantly increased ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: Jiashen formula extractum shows significant inhibitory effect on  $H_2O_2$ -induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes, the mechanism of which may be associated with down-regulation of Caspase-3 and Bax expression and up-regulation of Bcl-2 expression in cardiomyocytes.

**KEYWORDS** Jiashen formula; Extractum; Hydrogen peroxide; H9c2 cardiomyocytes; Apoptosis; Caspase-3; Bax; Bcl-2

心力衰竭是各种病因的心脏病的终末阶段,是心脏病患者死亡的重要原因,而心肌细胞凋亡在心力衰竭发生发展过程中起到了非常重要的作用<sup>[1]</sup>。多种因素都可能引起细胞凋亡,其中活性氧(ROS)诱导在心肌细胞凋亡研究领域越来越受关注。正常情况下,心肌细胞在代谢过程中产生的少量ROS会被机体有效清除,但在氧化应激状态下会发生ROS的过度积累,这可能引起细胞能量代谢紊乱,导致细胞凋亡和坏死,进而引起心功能的下降和失代偿,最终发生心力衰竭<sup>[2-4]</sup>。因此,如何清除心肌细胞内产生的过量ROS,减少其对细胞的损害作用,成为心力衰竭治疗领域的研究热点。研究表明,中医药在抑制心肌细胞凋亡方面具有独特功效,如补阳还五汤<sup>[5]</sup>、通塞脉汤<sup>[6]</sup>等。加参方是张伯礼院士临床实践证明能有效治疗慢性心力衰竭的经验方。本课题组前期研究发现,加参方浸膏可减少心肌梗死模型大鼠的梗死面积,改善心功能,保护心肌细胞<sup>[7]</sup>;可通过TGF- $\beta$ /Smad信号通路抑制血管紧张素II诱导的心肌成纤维细胞增殖<sup>[8]</sup>。另有研究表明,加参方浸膏可调节慢性心力衰竭模型大鼠的内分泌系统并改善其微循环<sup>[9]</sup>。基于此,本实验采用过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导H9c2大鼠心肌细胞氧化应激损伤建立细胞凋亡模型,考察加参方浸膏对 $H_2O_2$ 致心肌细胞凋亡的干预作用及其作用机制,以期为加参方相关制剂的后续研发及临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ROC-3000TVBB型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Revco公司);LDZ5-2型低速自动平衡离心机(北京雷勃尔医疗器械有限公司);Biofuge Stratos型台式高速冷冻离心机(美国Thermo Scientific公司);XK96-3型微量振荡器(姜堰市新康医疗器械有限公司);WD-9405B型水平摇床(北京市六一仪器厂);SpectraMax M3型酶标仪(美国Molecular Devices公司);FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司);DMI3006型倒置荧光显微镜(德国Leica公

司);荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司);小型蛋白垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 药品与试剂

加参方浸膏(组方为香加皮、黄芪、三七、丹参、桂枝、益母草、桑白皮、泽泻、葶苈子等,1 g浸膏相当于9.515 g生药)由天津中医药大学中医药研究中心提供。

胎牛血清(FBS,以色列BI公司,批号:04-001-1A);DMEM高糖培养基(含双抗),0.25%胰蛋白酶、MTT粉末、即用型DAPI(4',6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐)溶液(北京索莱宝科技有限公司,批号:12100-500、T1320、B0016K012500、c0065); $H_2O_2$ 溶液(10 mol/L)、GAPDH内参抗体(美国Sigma公司,批号:MKBS8306V、G8795);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(内含1 $\times$  binding buffer、Annexin V、碘化丙啶等,美国BD公司,批号:6119909);Trizol试剂(美国Ambion Life Technologies公司,批号:103105);逆转录试剂盒、PCR扩增试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:c28025-032、c11744-100);胱天蛋白酶3(Caspase-3)兔多克隆抗体、Bax兔多克隆抗体、Bcl-2兔多克隆抗体(美国Cell Signaling公司,批号:9662、2772、2876);牛抗兔免疫球蛋白G(IgG)-辣根过氧化物酶标记物(HRP)、牛抗鼠IgG-HRP(美国Santa Cruz公司,批号:sc-2370、sc-2380);RIPA细胞裂解液(美国Thermo公司,批号:OC183166);磷酸盐缓冲液(PBS,本实验室自制,pH 7.2~7.4);其他试剂均为市售分析纯,水为双蒸水。

### 1.3 细胞

H9c2大鼠心肌细胞由中国科学院上海细胞资源中心提供。

## 2 方法

### 2.1 溶液制备

2.1.1 加参方浸膏药液 根据文献[10],称取加参方浸膏干粉0.1 g,加入二甲基亚砜(DMSO)100  $\mu\text{L}$ 助溶,再加



入含有10%FBS的DMEM高糖培养基(以下简称“培养液”)10 mL混匀,经0.22 μm滤器滤过除菌,制成10 mg/mL的药物原液,4℃保存。临用时,以培养液稀释制成3.0、1.8、0.9、0.3、0.1 mg/mL系列质量浓度的药液。

2.1.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液 取H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液(10 mol/L)适量,以培养液稀释制成400、200、100、50、25 μmol/L系列浓度的溶液,即用即配。

2.1.3 MTT溶液 称取MTT粉末50 mg,加入PBS 10 mL溶解,经0.22 μm滤器滤过,于4℃下避光保存。临用时,以DMEM高糖培养基稀释制成0.5 mg/mL的溶液。

## 2.2 造模浓度/给药浓度筛选

根据文献[11],采用MTT法筛选H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(模型诱导剂)的造模浓度和加参方浸膏(干预药物)的给药浓度。

2.2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>造模浓度筛选 (1)细胞培养:取H9c2心肌细胞,以培养液在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下(以下同)常规培养,0.25%胰蛋白酶消化传代。选取对数生长期细胞,以1×10<sup>5</sup>个/孔接种于96孔板中,共接种6组,每组6个复孔,分别加入培养液100 μL,常规培养至细胞密度达90%后弃上清液。(2)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>造模浓度筛选:上述各组孔中分别加入400、200、100、50、25、0(空白)μmol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液100 μL[加入0(空白)μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液者作为空白对照组],常规培养6 h以建立心肌细胞凋亡模型;弃上清液,加入MTT溶液100 μL,常规培养2 h;弃上清液,加入DMSO 100 μL,室温震荡10 min后,采用酶标仪于490 nm波长处测定吸光度(OD)值,以考察细胞活性。

2.2.2 加参方浸膏给药浓度筛选 按照“2.2.1”项下方法培养细胞并分组。在各孔中分别加入3.0、1.8、0.9、0.3、0.1、0(空白)mg/mL的加参方浸膏药液各100 μL[加入0(空白)mg/mL加参方浸膏药液者作为空白对照组],常规培养24 h;然后按“2.2.1”项下“弃上清液……于490 nm波长处测定OD值”步骤操作,以考察细胞活性。

## 2.3 加参方浸膏对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>致凋亡模型细胞的干预作用考察

2.3.1 加参方浸膏对心肌细胞形态学的影响 由于凋亡细胞的膜通透性增加,DAPI对其穿透力增强,因此在凋亡细胞中DAPI会产生亮蓝色荧光,有别于正常细胞的微弱蓝色荧光<sup>[12]</sup>。基于此,本试验采用DAPI染色法观察细胞形态学变化:按照“2.2.1”项下方法接种细胞于6孔板,培养至细胞密度达90%后弃上清液,分别设为正常组、模型组、加参方组。其中,正常组加入培养液100 μL,常规培养6 h,弃上清液,加入新鲜培养液100 μL;模型组加入50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液100 μL,常规培养6 h,弃上清液,加入新鲜培养液100 μL;加参方组加入50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液100 μL,常规培养6 h,弃上清液,加入0.3 mg/mL加参方浸膏药液100 μL。3组细胞均继续常规培养24 h后,在室温下以PBS冲洗2次,加入4%多聚甲醛1 mL固定10 min;洗去多聚甲醛,加入少量DAPI溶液覆盖样品,室温下染色10 min;以水洗净,晾干,荧光显微镜下(激发波长:360 nm)观察,镜下亮蓝色细胞即为凋

亡细胞。

2.3.2 加参方浸膏对心肌细胞凋亡的影响 按“2.3.1”项下方法进行细胞接种、培养、分组及给药处理;收集细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,制备细胞悬液;1 000 r/min离心5 min,弃上清液,PBS洗涤,收集细胞;加入1×binding buffer、Annexin V(10 g/mL)和碘化丙啶(10 g/mL)后培养15 min。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,以FlowJo 7.6软件分析凋亡细胞的分布情况。

2.3.3 加参方浸膏对心肌细胞中Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA表达的影响 采用荧光定量逆转录(RT)-PCR法。按“2.3.1”项下方法进行细胞接种、培养、分组及给药处理;参照文献[8],用Trizol试剂提取细胞总RNA用于合成cDNA;以GAPDH为内参基因,分别对Caspase-3、Bax、Bcl-2进行扩增。RT-PCR反应体积为20 μL,反应条件:95℃预变性90 s;95℃变性10 s,60℃退火30 s,共40个循环。扩增反应结束后,建立PCR产物的熔解曲线(65~95℃),采用2<sup>-ΔΔCT</sup>相对定量法<sup>[13]</sup>计算mRNA表达水平。RT-PCR引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列

Tab 1 RT-PCR primer sequence

引物	上游序列	下游序列
GAPDH	5'-ACAGCAACAGGGTGGTGCAC-3'	5'-TTTGAGGGTGCAGCGAAGTT-3'
Bcl-2	5'-CTTTGAGTTCGGTGGGTCA-3'	5'-AGTTCACATACGGCATCCAG-3'
Bax	5'-GCTCAAGGCCCTGTGCACTAA-3'	5'-GAAGCCTCAGCCATCTTCTT-3'
Caspase-3	5'-GAGCTGGACTGCGGTATTAG-3'	5'-GGAATAGTAACCGGGTCCGG-3'

2.3.4 加参方浸膏对心肌细胞中Caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响 采用Western Blot法。按“2.3.1”项下方法进行细胞接种、培养、分组及给药处理;参照文献[8]方法裂解细胞后,4℃下12 000 r/min离心15 min,提取蛋白,经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜、封闭,分别加入一抗GAPDH抗体(1:3 000)、Caspase-3兔多克隆抗体(1:1 000)、Bax兔多克隆抗体(1:1 000)、Bcl-2兔多克隆抗体(1:1 000),4℃冷藏过夜;TBST缓冲液洗膜,分别加入二抗牛抗兔IgG-HRP(1:2 000)、牛抗鼠IgG-HRP(1:3 000),37℃恒温摇床孵育1 h,TBST缓冲液洗膜;采用化学发光法曝光,以ImageJ 1.8.0软件测得蛋白条带相对灰度值,用以表示蛋白表达水平。

## 2.4 统计学方法

各项试验均平行操作3次。试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0统计软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>造模浓度筛选结果

结果显示,随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度升高,细胞活性逐渐下降并呈浓度依赖性。与空白对照组比较,当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为50~400 μmol/L时,细胞OD值显著下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明其对细胞的毒性显著增强、细胞活性显著下降。综合考虑,选择对细胞损伤程度适中的50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>建立细胞凋亡模型(该浓度组细胞活性约为空白对照组的一半)。

### 3.2 加参方浸膏给药浓度筛选结果

结果显示,随着加参方浸膏质量浓度升高,细胞活性逐渐下降并呈浓度依赖性。与空白对照组比较,当加参方浸膏质量浓度为0.1~0.3 mg/mL时,细胞OD值差异无统计学意义( $P>0.05$ ),表明其对细胞无明显毒性;当加参方浸膏质量浓度为0.9~3.0 mg/mL时,细胞OD值显著下降,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),表明其对细胞已经产生明显的毒性作用。考虑到药物浓度过高也会对细胞造成损伤,因此选择无细胞毒性的最高质量浓度的0.3 mg/mL加参方浸膏进行后续试验。

### 3.3 加参方浸膏对心肌细胞形态学的影响结果

荧光显微镜下可见,正常组细胞核形态呈圆形或椭圆形,边缘清晰,染色均匀,呈现较弱的蓝色荧光;模型组有大量呈现亮蓝色荧光的凋亡细胞,细胞边缘不平整;加参方组的凋亡细胞数量较模型组少,大部分细胞呈现较弱的蓝色荧光,详见图1(图中,细箭头所指为正常细胞,粗箭头所指为凋亡细胞)。

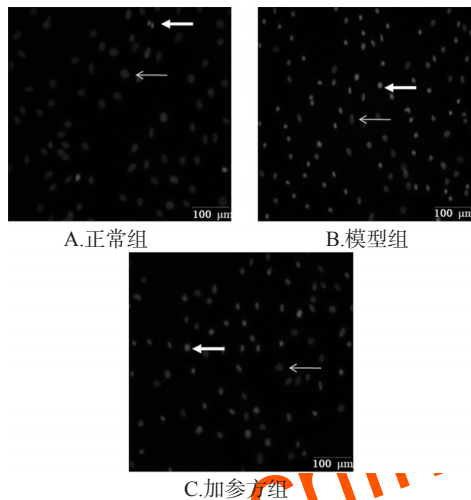


图1 各组细胞荧光显微照片( $\times 200$ , DAPI 染色)

Fig 1 Fluorescence micrograph of cells in each group ( $\times 200$ , DAPI dye)

### 3.4 加参方浸膏对心肌细胞凋亡的影响结果

流式细胞仪检测结果显示,与正常组比较,模型组细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,加参方组细胞凋亡率显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。各组细胞流式细胞图见图2,凋亡率比较见图3。

### 3.5 加参方浸膏对心肌细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响结果

结果显示,与正常组比较,模型组细胞中 Caspase-3、Bax mRNA 表达水平平均显著升高, Bcl-2 mRNA 表达水平显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,加参方组细胞中 Caspase-3、Bax mRNA 表达水平均显著降低, Bcl-2 mRNA 表达水平显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结果表明,加参方浸膏可通过下调 Caspase-3、Bax,上调 Bcl-2 的 mRNA 表达水平起到

保护心肌细胞的作用。各组细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达水平比较见图4。

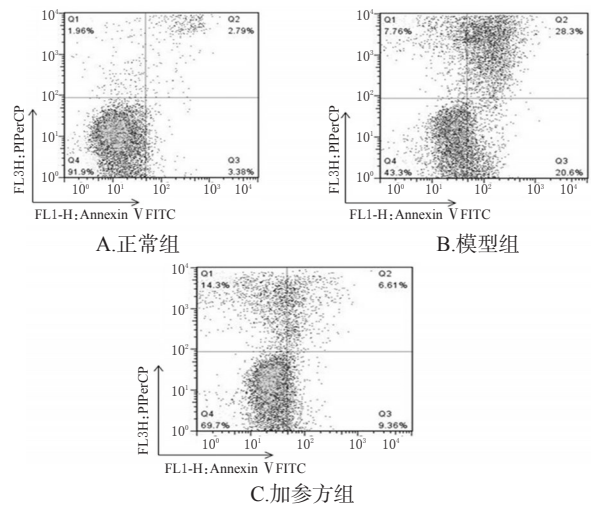
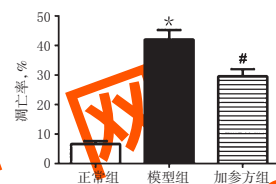


图2 各组细胞流式细胞图

Fig 2 Flow cytometry of cells in each group

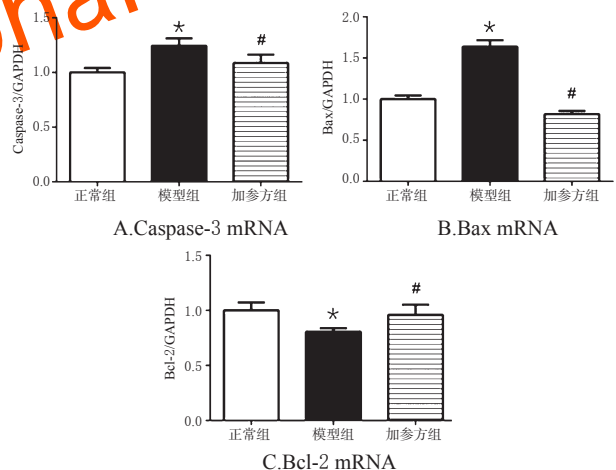


注:与正常组比较,  $*P<0.05$ ; 与模型组比较,  $\#P<0.05$

Note: vs. normal group,  $*P<0.05$ ; vs. model group,  $\#P<0.05$

图3 各组细胞凋亡率比较

Fig 3 Comparison of cell apoptosis rate in each group



注:与正常组比较,  $*P<0.05$ ; 与模型组比较,  $\#P<0.05$

Note: vs. normal group,  $*P<0.05$ ; vs. model group,  $\#P<0.05$

图4 各组细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 mRNA 表达水平的比较

Fig 4 Comparison of mRNA expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 of cells in each group

### 3.6 加参方浸膏对心肌细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响结果

结果显示,与正常组比较,模型组细胞中 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平均显著升高, Bcl-2 蛋白表达水平显著



降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,加参方组细胞中 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平均显著降低,Bcl-2 蛋白表达水平显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结果表明,加参方浸膏可通过下调 Caspase-3、Bax,上调 Bcl-2 的蛋白表达水平起到保护心肌细胞的作用。各组细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白电泳图见图 5,蛋白表达水平比较见图 6。

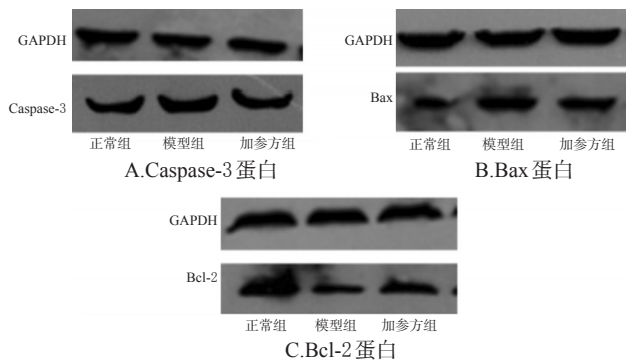
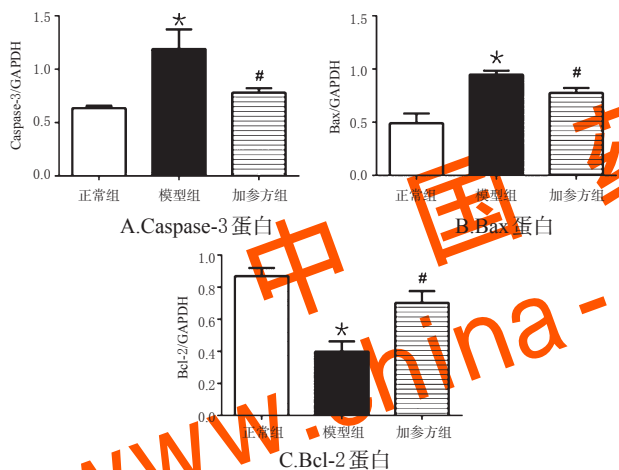


图 5 各组细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白电泳图  
Fig 5 Electropherogram of protein of Caspase-3, Bax and Bcl-2 of cells in each group



注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$   
Note:vs. normal group,\* $P<0.05$ ; vs. model group,\* $P<0.05$

图 6 各组细胞中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平比较

Fig 6 Comparison of protein expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 of cells in each group

#### 4 讨论

心力衰竭是一种常见的心血管疾病,是各种心血管疾病发展的终末阶段。发生心力衰竭时,心肌细胞凋亡导致心脏电活动和心肌收缩功能严重紊乱,促使心力衰竭进一步发展<sup>[1]</sup>。因此,减少心肌细胞凋亡是治疗心力衰竭的重要策略。加参方是经张伯礼院士临床验证治疗慢性心力衰竭有效的经验方,方中以香加皮、黄芪补益心气,丹参、三七活血化瘀,桂枝温通心脉,泽泻、葶苈子、益母草、桑白皮化湿利水,诸药配合以达益气活血、温阳利水之效<sup>[14-15]</sup>。本课题组采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立 H9c2 心肌

细胞凋亡模型,考察加参方浸膏对细胞凋亡的干预作用及其可能的作用机制。

H9c2 心肌细胞属于永生大鼠心肌细胞系,已被证明其形态特征与原代心肌细胞相似,且仍保留成年大鼠心肌细胞信号转导特征<sup>[16]</sup>,因此被广泛用于试验研究。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为细胞系或原代细胞凋亡诱导剂,其使用剂量在不同研究中各有差异<sup>[17-18]</sup>。本课题组考察了不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对心肌细胞活性的影响,结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度越高,心肌细胞活性越低;当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度在 50~400 μmol/L 时,细胞活性较正常组细胞显著降低,表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞的毒性呈明显的浓度依赖性。综合考虑,选择对细胞损伤程度适中的 50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立细胞凋亡模型。

对加参方浸膏给药浓度的筛选结果显示,与正常组细胞比较,加参方浸膏质量浓度为 0.1~0.3 mg/mL 时细胞活性未见显著下降,表明这一质量浓度范围的加参方浸膏无明显细胞毒性作用;而随着加参方浸膏质量浓度的进一步增加(0.9~3.0 mg/mL),细胞活性显著下降,呈现出明显的细胞毒性。为避免药物本身对细胞造成的损伤,同时也为确保药效足够,故选择无细胞毒性的最高质量浓度的 0.3 mg/mL 加参方浸膏进行后续试验。

对正常细胞、经 50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的细胞以及经 0.3 mg/mL 加参方浸膏+50 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同处理的细胞进行形态学观察和凋亡率测定,结果显示,加参方浸膏能显著抑制细胞凋亡,具有心肌细胞保护作用。

Bcl-2 家族蛋白在调节细胞凋亡中起着关键作用。Bcl-2 家族包含 20 余种 Bcl-2 的同源蛋白,可分为抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白:典型的抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1、Bcl-W 等主要存在于线粒体外膜,具有抗细胞凋亡活性;典型的促凋亡蛋白如 Bax,其与 Bcl-2 具有高度的氨基酸序列同源性,在正常细胞中以单体形式存在于细胞质,当受到相关的凋亡信号刺激时会转移到线粒体上,改变线粒体膜电位与线粒体通透性,促进凋亡活性物质细胞色素 C 释放<sup>[19]</sup>。Bcl-2 能与 Bax 结合形成异源二聚体,阻止 Bax 释放,从而发挥抑制细胞凋亡、保护细胞的作用;Bcl-2 过表达可以减少氧自由基的产生、抑制 ROS 的脂质过氧化作用<sup>[20]</sup>。Caspase 属于半胱氨酸蛋白酶,一旦被信号转导途径激活,就能降解细胞内蛋白,使细胞不可逆地发生凋亡<sup>[20]</sup>。Caspase-3 属于 Caspase 家族的“执行者”,可以直接降解细胞内结构蛋白和功能蛋白,参与线粒体通路的细胞凋亡<sup>[20]</sup>。存在于线粒体膜上的 Bcl-2 过表达时可以抑制线粒体通透性的改变,减少细胞色素 C 的释放,抑制 Caspase 激活,从而抑制细胞凋亡;Bcl-2 过表达可引起细胞核谷胱甘肽(GSH)的积聚,导致核内氧化还原平衡的改变,从而降低 Caspase 的活性。当细胞发生氧化应激时,ROS 与 Caspase 相互影响,共同促进细胞凋亡<sup>[20]</sup>。本研究发现,经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用后的心

肌细胞中 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平均显著降低, Caspase-3、Bax mRNA 及蛋白表达水平均显著上升, 表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞凋亡模型成功建立; 而这一作用均可被加参方浸膏逆转。本研究结果表明, 加参方浸膏抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致心肌细胞凋亡的作用可能与其参与调节 Caspase-3、Bax、Bcl-2 的表达相关。

综上所述, 加参方浸膏可能通过下调 Caspase-3、Bax 和上调 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达, 发挥抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激损伤、抑制细胞凋亡的作用, 从而保护心肌细胞。本研究可为加参方相关制剂研发及临床治疗心力衰竭提供理论基础和试验依据。

## 参考文献

[1] 陈兆善. 心肌细胞凋亡与心力衰竭研究进展[J]. 医学综述, 2002, 8(8): 458-462.

[2] WEI CD, LI Y, ZHENG HY, et al. Palmitate induces H9c2 cell apoptosis by increasing reactive oxygen species generation and activation of the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(3): 855-861.

[3] PANERA N, GNANI D, PIERMARINI E, et al. High concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trigger hypertrophic cascade and phosphatase and tensin homologue (PTEN) glutathionylation in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 100(1): 199-206.

[4] CRISPO JA, PICHÉ M, ANSELL DR, et al. Protective effects of methyl gallate on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(3): 773-778.

[5] LIU X, MIN Y, GU W, et al. Buyanghuanwu Tang therapy for neonatal rats with hypoxic ischemic encephalopathy[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18448-18454.

[6] LEE MK, LU Y, DI HQ, et al. Protection of Tong-sai-mai decoction against apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PC12 cells: mechanisms via Bcl-2-mitochondria ROS-iNOS pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014. DOI:10.1155/2014/371419.

[7] ZHU MJ, WANG YP, XIE SY, et al. Protective effects of Jiashen prescription on myocardial infarction in rats[J]. *Chin J Integr Med*, 2015, 21(6): 417-422.

[8] CUI L, WANG Y, YU R, et al. Jia-Shen decoction mediated serum inhibits angiotensin- II induced cardiac fibroblast proliferation via the TGF-β1/Smad signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1610-1616.

[9] 郭志军, 高秀梅, 王保和, 等. 加参方对 CHF 大鼠缩血管保钠和扩血管排钠因素的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(11): 196-197.

[10] ZHOU J, JIANG K, DING X, et al. Qiliqiangxin inhibits angiotensin II -induced transdifferentiation of rat cardiac fibroblasts through suppressing interleukin-6[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(5): 1114-1121.

[11] WANG T, SUN P, CHEN L, et al. Cinnamtannin D-1 protects pancreatic β-cells from palmitic acid-induced apoptosis by attenuating oxidative stress[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(22): 5038-5045.

[12] BONAVITA F, STEFANELLI C, GIORDANO E, et al. H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA[J]. *FEBS Lett*, 2003, 536(1/2/3): 85-91.

[13] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.

[14] 于瑞, 崔琳, 王幼平, 等. 加参方对 TGF-β1 诱导的大鼠心肌成纤维细胞的细胞增殖、胶原分泌及分化的实验研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(11): 2260-2266.

[15] 王新陆, 崔琳, 王幼平, 等. 加参方对 Ang II 诱导的 H9c2 大鼠心肌细胞凋亡的干预作用研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2210-2215.

[16] HESCHELER J, MEYER R, PLANT S, et al. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart[J]. *Circ Res*, 1991, 69(6): 1476-1486.

[17] XIANG J, WAN C, GUO R, et al. Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types?[J]. *Biomed Res Int*, 2016. DOI: 10.1155/2016/7343965.

[18] CHANG H, LI C, HUO K, et al. Luteolin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in H9C2 cells through modulating Akt-P53/Mdm2 signaling pathway[J]. *Biomed Res Int* 2016. DOI: 10.1155/2016/5125836.

[19] MARTINOUC JC, YOULE RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101.

[20] 成军. 现代细胞凋亡分子生物学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2012: 24-169.

(收稿日期: 2018-02-28 修回日期: 2018-06-05)

(编辑: 段思怡)