

基于TRPV1通道分析诃子制草乌减轻H9c2心肌细胞毒性的作用机制

韩舒, 包丽媛, 刘凯洋, 韩喜桃, 唐雅楠, 刘子琴, 王宏月, 范盎然, 李飞, 杜红*
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:探究瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)通道在诃子制草乌减轻心肌细胞毒性中的作用机制。方法:以体外培养的H9c2心肌细胞为模型,采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞活力;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测心肌细胞中TRPV1 mRNA的表达水平;酶联免疫吸附测定试验(ELISA)检测细胞中乳酸脱氢酶(LDH)漏出率,细胞核,活性氧(ROS),线粒体膜电位及钙离子(Ca²⁺)含量的变化。结果:与空白组比较,当质量浓度≥0.5 g·L⁻¹时,生草乌、诃子制草乌均可显著降低细胞活力($P<0.01$),细胞中LDH漏出率,ROS及Ca²⁺释放量增加,线粒体膜电位降低,细胞核固缩甚至是破碎。当质量浓度≥0.5 g·L⁻¹时,与同质量浓度生草乌组相比,诃子制草乌组细胞活力显著上升($P<0.01$),细胞中LDH漏出率,ROS及Ca²⁺释放量减少,线粒体膜电位升高,细胞核形态有所改善。与作用于未经处理的H9c2心肌细胞比较,同质量浓度的生草乌作用于TRPV1抑制剂BCTC预处理后的H9c2心肌细胞后,其细胞活力明显上升,细胞中LDH漏出率,ROS及Ca²⁺释放量减少,线粒体膜电位升高,细胞核固缩程度得到改善;而同质量浓度的诃子制草乌作用于BCTC预处理后的H9c2心肌细胞,其细胞活力下降,细胞中LDH漏出率,ROS及Ca²⁺释放量增加,线粒体膜电位降低。Real-time PCR结果表明,草乌和辅料诃子汤均能使心肌细胞中TRPV1 mRNA表达量增多,且呈现浓度依赖性。结论:生草乌可通过激活TRPV1通道诱导心肌细胞凋亡,引发心脏毒性;而诃子制草乌可通过TRPV1通道介导起到减毒作用,其减毒作用的发挥可能与诃子中的酸性成分和草乌中的生物碱协同作用于TRPV1通道有关。

[关键词] 生草乌; 诃子制草乌; 瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1); H9c2心肌细胞; 炮制减毒; 聚合酶链式反应(PCR); 乳酸脱氢酶(LDH)

[中图分类号] R22;R943.1;R28;R96 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)01-0173-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211748

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210526.1416.002.html>

[网络出版日期] 2021-05-26 18:15

Mechanism of Aconiti Kusnezoffii Radix Processed with Chebulae Fructus Against H9c2 Cardiomyocyte Toxicity Based on TRPV1 Channel

HAN Shu, BAO Li-yuan, LIU Kai-yang, HAN Xi-tao, TANG Ya-nan, LIU Zi-qin,
WANG Hong-yue, FAN Ang-ran, LI Fei, DU Hong*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel in reducing cardiomyocyte toxicity of Aconiti Kusnezoffii Radix processed with Chebulae Fructus. **Method:** H9c2 cardiomyocytes cultured *in vitro* were used as a model to assess cell viability by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, the expression of TRPV1 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the leakage rate of lactate dehydrogenase (LDH), the changes of nucleus, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential and Ca²⁺ contents were detected

[收稿日期] 20210318(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774004);国家重点研发计划项目(2018YFC1706303)

[第一作者] 韩舒,在读硕士,从事中药炮制机制研究,E-mail:hs361015@163.com

[通信作者] *杜红,教授,博士生导师,从事中药炮制机制研究,Tel:010-53912125,E-mail:duhong@vip.163.com

by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the blank group, when the concentration was $\geq 0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the cell viability was significantly decreased ($P<0.01$), the leakage rate of LDH, the release of ROS and Ca^{2+} were increased, the mitochondrial membrane potential was decreased, and the nucleus was pyknosis or even broken in raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus* groups. When the concentration was $\geq 0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, compared with the same mass concentration of raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* group, the cell viability increased significantly ($P<0.01$), the leakage rate of LDH, the release of ROS and Ca^{2+} decreased, the mitochondrial membrane potential increased, and the nuclear morphology improved in *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus* group. Application of the same mass concentration of raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* to H9c2 cardiomyocytes pretreated with the TRPV1 inhibitor BCTC significantly increased cell viability, decreased leakage rate of LDH, ROS and Ca^{2+} release, increased mitochondrial membrane potential and improved nuclear pyknosis compared with untreated H9c2 cardiomyocytes. Application of the same mass concentration of *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus* to H9c2 cardiomyocytes pretreated with BCTC decreased cell viability, increased LDH leakage rate, ROS and Ca^{2+} release, reduced mitochondrial membrane potential compared with untreated H9c2 cardiomyocytes. Real-time PCR results showed that both raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Chebulae Fructus* decoction could increase the expression of TRPV1 mRNA in cardiomyocytes in a concentration dependent manner. **Conclusion:** Raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* can induce cardiomyocyte apoptosis and cardiotoxicity by activating TRPV1 channel, while *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus* can attenuate the toxicity through TRPV1 channel, which may be related to the synergistic effect of acid components in *Chebulae Fructus* and alkaloids in *Aconiti Kusnezoffii Radix* on TRPV1 channel.

[Keywords] raw *Aconiti Kusnezoffii Radix*; *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus*; transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1); H9c2 cardiomyocytes; detoxification by processing; polymerase chain reaction (PCR); lactate dehydrogenase (LDH)

草乌为毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* 的干燥块根,具有良好的药用价值,但因其生品毒性强烈,故临床上常常以炮制品或者与其他药物相配伍后使用^[1]。蒙古族医学(简称“蒙医学”)常采用诃子汤浸泡草乌,且认为诃子可解草乌毒^[2],但具体的炮制减毒机制仍未明确。

瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)通道是一种热敏性的非选择性阳离子通道,对钙离子(Ca^{2+})有高度渗透性,该通道被激活后可引起细胞凋亡等的发生^[3-4]。近期研究表明,TRPV1通道可被川乌及乌头碱激活^[5-6],草乌与川乌基原相近,所含化学成分相似,推测TRPV1通道可能是草乌发挥作用的通道,但需研究证实^[5,7-8]。此外,本课题组前期研究发现,诃子制草乌炮制后可降低毒性,但减毒原理与降低双酯型生物碱含量无关^[9-11]。生草乌经诃子汤浸泡后,引入大量诃子的酸性成分,酸性环境($\text{pH}<5.9$)亦可激活TRPV1通道^[12]。当TRPV1通道长期暴露于2种或2种以上激动剂,或者低剂量反复多次持续刺激时,可诱导TRPV1通道进入“脱敏”状态,脱敏作为一种保护机制可抑制 Ca^{2+} 的大量内流,

从而降低细胞毒性的发生^[13],提示诃子制草乌减毒作用的发挥是否与两者共同作用于TRPV1通道有关值得进一步探究。基于此,本研究以TRPV1通道为研究对象,选用TRPV1通道特异性阻断剂BCTC,从线粒体膜电位、细胞凋亡及 Ca^{2+} 等方面来探究诃子制草乌的炮制减毒机制。

1 材料

3111型二氧化碳培养箱和NanoDrop OneC型超微量紫外-可见分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司),SPECTROstar Nano型全波长酶标仪(上海微百科技发展有限公司),BT125D型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],MVS-1型旋涡混合器(北京东方开物科学器材有限公司),Eclipse Ts2R-FL型荧光倒置显微镜(日本Nikon公司),AG 22331型梯度聚合酶链式反应(PCR)仪(德国艾本德公司),CFX96型荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

生草乌(北京华邈中药工程技术开发中心,批号311271),诃子肉(北京鹤延龄药业发展有限公司,批号180231),均经北京中医药大学中药资源与

鉴定系王晶娟教授鉴定,分别为毛茛科植物北乌头 *A. kusnezoffii* 的干燥块根和使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* 的干燥成熟果实的去核品;辣椒素(CAP,上海源叶生物科技有限公司,批号B20693,纯度 $\geq 98\%$),BCTC(美国AbMole公司,批号393514-24-4),二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号WXBD2695V),DMEM培养基(北京兰博利德生物技术有限公司,批号0032019),三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号AG11012);噻唑蓝(MTT),乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒,Hoechst 33258染色液,活性氧(ROS)检测试剂盒,线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1),Ca²⁺染色试剂盒(Fluo-3AM)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为ST316,C0017,C1018,S003M,C2006,S1056);Evo M-MLV基因组去除型反转录试剂盒,SteadyPure通用型RNA试剂盒,SYBR Green预混型试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号分别为AG11711,AG21017,AG11701)。大鼠心肌细胞H9c2购自于北京协和细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2心肌细胞活力的影响

2.1.1 诃子制草乌的制备^[14-15] 称取诃子肉适量,加12倍量水浸泡1 h,煎煮1 h,待冷却后用4层纱布过滤至烧杯中,得诃子汤。将大小分档的生草乌加入诃子汤中,浸泡3 d,至口尝微有麻舌感时取出,晾至六成干,切厚片,干燥,即得诃子制草乌饮片。生草乌和诃子的质量比为2:1。

2.1.2 生草乌、诃子制草乌样品溶液的制备 取生草乌、诃子制草乌饮片适量,粉碎,过50目筛,称取粉末2 g,加入甲醇50 mL,置于100 mL具塞锥形瓶中,称定质量,超声(300 W,40 kHz)处理1 h,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,缓慢倒入过滤漏斗,过滤。将滤液均匀分装至1.5 mL无菌离心管中,置于40 °C烘箱中挥干,置于4 °C冰箱保存。临用前用DMEM培养基溶解并稀释至相应浓度。

2.1.3 MTT法测定大鼠H9c2心肌细胞活力 将对数生长期的大鼠H9c2心肌细胞用完全培养基配制成细胞悬液,以 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,置于5% CO₂,37 °C培养箱中孵育。24 h后依次加入含不同质量浓度(0.05~5 g·L⁻¹,以生药量计,下同)生草乌、诃子制草乌的DMEM培养基各100 μL,24 h后弃去DMEM培养基,加入含0.5 g·L⁻¹ MTT的

DMEM培养基100 μL,置于5% CO₂,37 °C培养箱中避光孵育4 h。弃去DMEM培养基后每孔加入DMSO 150 μL,置于摇床上震荡10 min,于490 nm处测定各孔的吸光度A,按公式存活率=(A_{药物组}/A_{空白组})×100%计算存活率,见表1。结果发现当质量浓度 ≥ 0.25 g·L⁻¹时,生草乌、诃子制草乌的毒性与质量浓度呈显著正相关($P < 0.01$),但当质量浓度 ≥ 0.5 g·L⁻¹,相同剂量诃子制草乌的毒性显著弱于生草乌($P < 0.01$)。为了探究诃子制草乌的减毒机制,选取生草乌、诃子制草乌存活率介于60%~85%的剂量(即0.5,0.75,1 g·L⁻¹)考察药物对TRPV1通道阻断前后H9c2心肌细胞毒性的影响。

表1 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2心肌细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus* on cell viability of H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	存活率/%
空白		100.00±0.80
生草乌	0.05	103.11±1.20
	0.10	99.96±1.21
	0.25	91.95±0.82 ¹⁾
	0.50	79.35±1.14 ¹⁾
	0.75	65.57±0.81 ¹⁾
	1.00	60.43±0.91 ¹⁾
	2.50	40.35±1.02 ¹⁾
诃子制草乌	5.00	29.68±0.25 ¹⁾
	0.05	102.71±1.82
	0.10	99.95±1.80
	0.25	93.40±0.71 ¹⁾
	0.50	84.87±1.45 ^{1,2)}
	0.75	77.77±0.94 ^{1,2)}
	1.00	69.50±1.51 ^{1,2)}
2.50	54.07±1.35 ^{1,2)}	
5.00	34.39±0.88 ^{1,2)}	

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与同质量浓度生草乌组比较²⁾ $P < 0.01$ (表2~4同)。

2.2 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2心肌细胞存活率及LDH漏出率的影响

2.2.1 分组及药物处理 将大鼠H9c2心肌细胞随机进行分组,包括空白组,不作任何处理,正常培养24 h;生草乌组,加入含0.5,0.75,1 g·L⁻¹生草乌的DMEM培养基培养24 h;诃子制草乌组,加入含0.5,0.75,1 g·L⁻¹诃子制草乌的DMEM培养基培养

24 h; BCTC+生草乌组, 先加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BCTC 孵育 30 min, 再加入含 0.5, 0.75, 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 生草乌的 DMEM 培养基培养 24 h; BCTC+诃子制草乌组: 先加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BCTC 孵育 30 min, 再加入 0.5, 0.75, 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 诃子制草乌的 DMEM 培养基培养 24 h。
2.2.2 细胞活力和 LDH 漏出率的测定 按 2.1.3 项下方法测定 H9c2 心肌细胞存活率, 见表 2。24 h 后取细胞上清液按照试剂盒说明书进行操作。按公式漏出率 = $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{最大酶活性孔}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 计算 LDH 漏出率, 见表 2。结果发现与空白组比较,

不同质量浓度的生草乌、诃子制草乌均可显著降低大鼠 H9c2 心肌细胞活力 ($P < 0.01$), 促进 LDH 的漏出, 而同质量浓度诃子制草乌的作用显著弱于生草乌 ($P < 0.01$)。TRPV1 通道阻断后, 与阻断前比较, 生草乌组大鼠 H9c2 心肌细胞存活率提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), LDH 漏出减少; 诃子制草乌组与阻断前比较, 存活率显著降低 ($P < 0.01$), LDH 漏出增多; 但对于质量浓度为 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生草乌和诃子制草乌而言, 两者在 TRPV1 通道阻断前后对 LDH 漏出率的影响均不明显。

表 2 生草乌、诃子制草乌对大鼠 H9c2 心肌细胞存活率和 LDH 漏出率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of raw Aconiti Kusnezoffii Radix and Aconiti Kusnezoffii Radix processed with Chebulae Fructus on cell viability and LDH leakage rate of H9c2 cardiomyocytes before and after TRPV1 channel blockade ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%		LDH 漏出率/%	
		阻断前	阻断后	阻断前	阻断后
空白		100.00±0.69	100.00±0.69	-	-
生草乌	0.50	78.53±1.22 ¹⁾	80.63±0.65 ^{1,4)}	20.60±1.19	17.08±1.53
	0.75	64.29±0.84 ¹⁾	70.96±0.80 ^{1,4)}	36.10±2.64	29.14±2.08 ⁴⁾
	1.00	59.40±0.96 ¹⁾	62.19±1.62 ^{1,3)}	52.05±2.55	45.59±2.37 ⁴⁾
诃子制草乌	0.50	87.01±1.46 ^{1,2)}	84.23±0.77 ^{1,6)}	12.42±0.62 ²⁾	14.39±0.51
	0.75	77.81±1.05 ^{1,2)}	74.02±1.22 ^{1,6)}	19.98±0.74 ²⁾	24.44±0.72 ⁵⁾
	1.00	69.47±1.45 ^{1,2)}	64.48±0.49 ^{1,6)}	33.51±0.97 ²⁾	38.93±1.31 ⁶⁾

注: 与同质量浓度生草乌组阻断前比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与同质量浓度诃子制草乌组阻断前比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 生草乌、诃子制草乌对大鼠 H9c2 心肌细胞细胞核、线粒体膜电位的影响 取对数生长期的大鼠 H9c2 心肌细胞用完全培养基配制成细胞悬液, 以 1×10^5 个/mL, 每孔 500 μL 接种于 24 孔板中, 放置于 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h。实验分组及药物处理同 2.2.1 项, 24 h 后分别按照试剂盒说明书进行检测, 见表 3 和图 1, 2。结果发现与空白组比较, 质量浓度为 0.5, 0.75, 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生草乌、诃子制草乌可使细胞核呈现致密浓染的亮蓝色荧光, 线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$), 且荧光强度、线粒体膜电位的改变与药物质量浓度呈现依赖性, 而同质量浓度诃子制草乌的作用显著弱于生草乌 ($P < 0.01$)。TRPV1 通道阻断后, 与阻断前比较, 生草乌组的细胞核亮蓝色荧光强度显著减弱 ($P < 0.01$), 线粒体膜电位显著升高 ($P < 0.01$); 而诃子制草乌组与阻断前比较, 细胞核亮蓝色荧光强度增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$)。

2.4 生草乌、诃子制草乌对大鼠 H9c2 心肌细胞 ROS 和 Ca^{2+} 水平的影响 取对数生长期的大鼠 H9c2 心肌细胞, 用完全培养基配制成细胞悬液, 以

1×10^5 个/mL, 每孔 500 μL 接种于 24 孔板中, 放置于 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h。实验分组及药物处理同 2.2.1 项, 24 h 后分别按照试剂盒说明书进行检测, 见表 4 和图 3, 4。结果发现与空白组比较, 质量浓度为 0.5, 0.75, 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生草乌、诃子制草乌可使细胞内 ROS, Ca^{2+} 释放明显增加 ($P < 0.01$), 且荧光强度随质量浓度的增加而增加, 而同质量浓度下诃子制草乌的作用明显弱于生草乌 ($P < 0.01$)。TRPV1 通道阻断后, 与阻断前比较, 生草乌组的 ROS, Ca^{2+} 释放显著减少 ($P < 0.01$), 荧光强度减弱; 而诃子制草乌组与阻断前比较, 细胞内 ROS, Ca^{2+} 释放明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 荧光强度增强。

2.5 对 H9c2 细胞中 TRPV1 mRNA 表达的影响

2.5.1 样品的制备 取诃子汤, 置于水浴锅 40 $^\circ\text{C}$ 烘干, 得诃子汤浸膏, 称取浸膏 2 g, 按 2.1.2 项下方法制备, 得诃子汤。生草乌样品溶液的制备同 2.1.2 项。

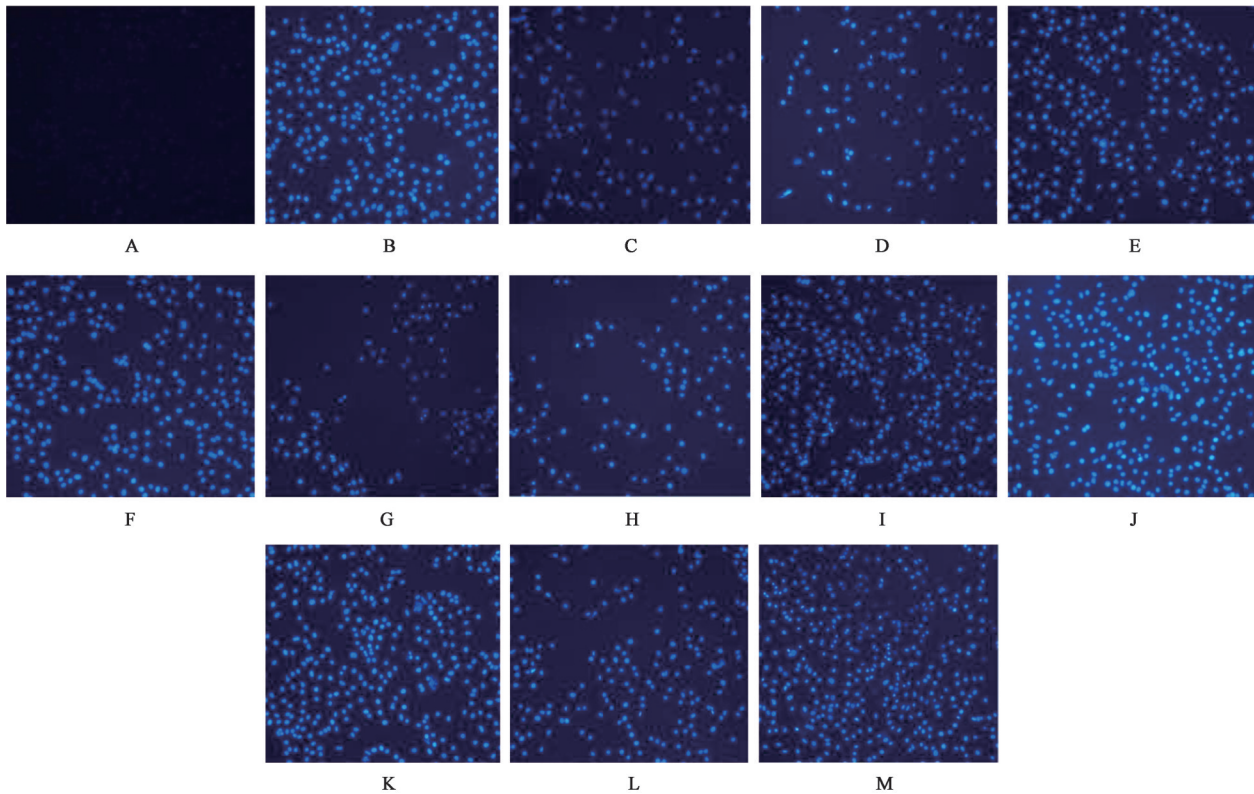
2.5.2 TRPV1 mRNA 表达的检测 将对数生长期的 H9c2 细胞用完全培养基配制成细胞悬液, 以密度 1.5×10^5 个/mL, 每孔 2 mL 接种于 6 孔板中, 放置于

表3 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2心肌细胞核和线粒体膜电位的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of raw Aconiti Kusnezoffii Radix and Aconiti Kusnezoffii Radix Processed with Chebulae Fructus on average fluorescence intensity and mitochondrial membrane potential of H9c2 cardiomyocytes before and after TRPV1 channel blockade ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞核平均荧光强度		线粒体膜电位	
		阻断前	阻断后	阻断前	阻断后
空白		59.55±1.55	-	2.91±0.03	-
生草乌	0.50	95.72±0.46 ¹⁾	84.28±0.92 ^{1,3)}	2.02±0.07 ¹⁾	2.34±0.04 ^{1,3)}
	0.75	97.40±0.48 ¹⁾	92.62±0.63 ^{1,3)}	1.61±0.07 ¹⁾	1.91±0.06 ^{1,3)}
	1.00	105.79±0.68 ¹⁾	99.03±0.46 ^{1,3)}	1.13±0.07 ¹⁾	1.37±0.07 ^{1,3)}
诃子制草乌	0.50	89.57±1.14 ^{1,2)}	93.91±0.51 ^{1,5)}	2.77±0.03 ^{1,2)}	2.46±0.05 ^{1,5)}
	0.75	93.58±0.78 ^{1,2)}	97.51±0.38 ^{1,4)}	2.34±0.02 ^{1,2)}	2.05±0.02 ^{1,5)}
	1.00	101.26±1.09 ^{1,2)}	101.56±0.96 ^{1,4)}	1.84±0.03 ^{1,2)}	1.50±0.04 ^{1,5)}

注:与同质量浓度生草乌组阻断前比较³⁾ $P<0.01$;与同质量浓度诃子制草乌组阻断前比较⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$ (表4同)。



A. 空白组;B. 0.5 g·L⁻¹生草乌组;C. 0.5 g·L⁻¹诃子制草乌组;D. BCTC+0.5 g·L⁻¹生草乌组;E. BCTC+0.5 g·L⁻¹诃子制草乌组;F. 0.75 g·L⁻¹生草乌组;G. 0.75 g·L⁻¹诃子制草乌组;H. BCTC+0.75 g·L⁻¹生草乌组;I. BCTC+0.75 g·L⁻¹诃子制草乌组;J. 1 g·L⁻¹生草乌组;K. 1 g·L⁻¹诃子制草乌组;L. BCTC+1 g·L⁻¹生草乌组;M. BCTC+1 g·L⁻¹诃子制草乌组(图2~4同)

图1 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2心肌细胞细胞核的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 1 Effect of raw Aconiti Kusnezoffii Radix and Aconiti Kusnezoffii Radix processed with Chebulae Fructus on nuclei of H9c2 cardiomyocytes before and after TRPV1 channel blockade (IF, ×100)

5% CO₂, 37 °C培养箱中孵育。24 h后弃去旧培养基,依次加入含 10 μmol·L⁻¹ BCTC, 10 μmol·L⁻¹ CAP,不同浓度生草乌和诃子汤的DMEM培养基各 2 mL,24 h后弃去旧培养基,收集细胞。TRPV1引物序列见表5。按试剂盒说明书进行实验操作,见表6。结果发现与空白组比较,质量浓度为0.5, 0.75, 1 g·L⁻¹的生草乌和0.1, 0.25, 0.5 g·L⁻¹的诃子汤

均可促进大鼠H9c2心肌细胞中TRPV1 mRNA的表达($P<0.01$),表明生草乌和辅料诃子汤均可激活TRPV1通道。

2.6 数据分析 数据用 GraphPad Prism 8.0 和 ImageJ 1.8.0 软件处理,以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,组间比较采用 ANOVA 方差分析, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异有统计学差异。

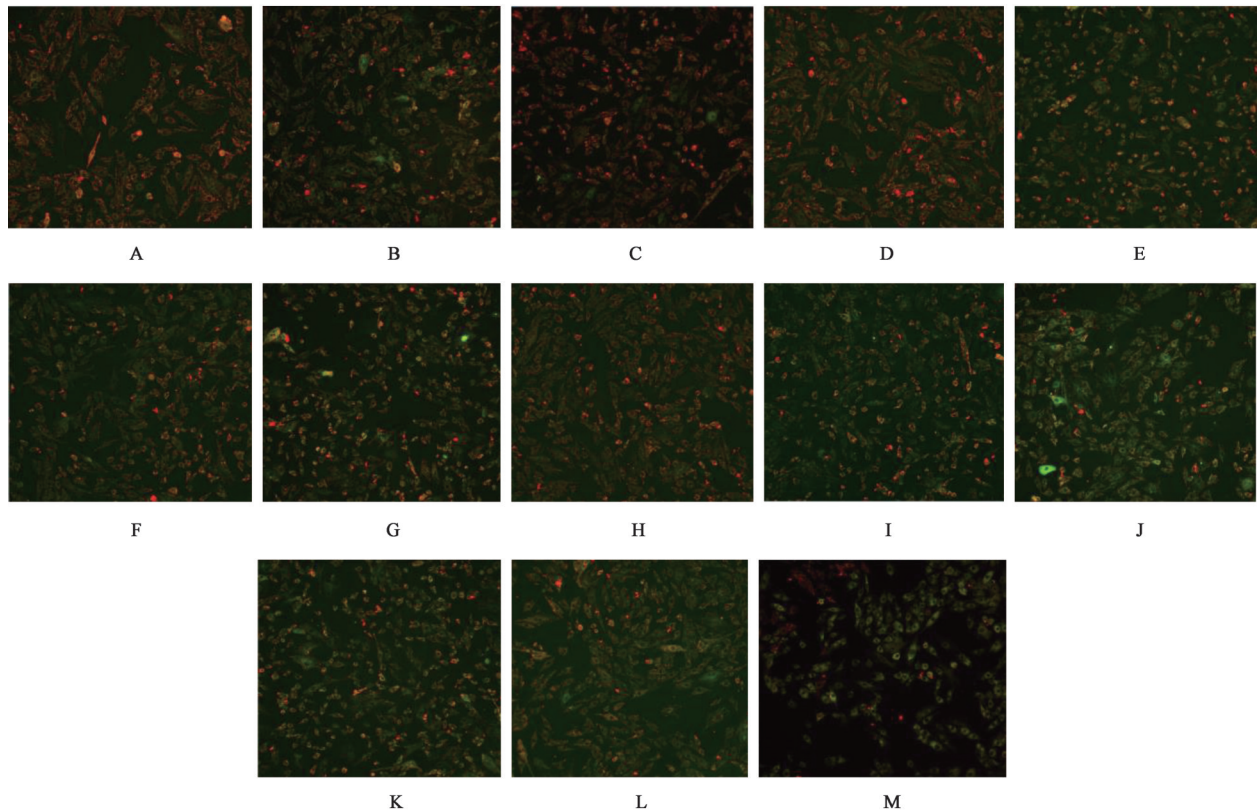


图2 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2心肌细胞线粒体膜电位的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 2 Effect of raw Aconiti Kusnezoffii Radix and Aconiti Kusnezoffii Radix Processed with Chebulae Fructus on mitochondrial membrane potential of H9c2 cardiomyocytes before and after TRPV1 channel blockade (IF, ×100)

表4 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2心肌细胞中ROS和Ca²⁺水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of raw Aconiti Kusnezoffii Radix and Aconiti Kusnezoffii Radix Processed with Chebulae Fructus on levels of ROS and Ca²⁺ in H9c2 cardiomyocytes before and after TRPV1 channel blockade ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物浓度/g·L ⁻¹	ROS水平		Ca ²⁺ 水平	
		阻断前	阻断后	阻断前	阻断后
空白		39.89±0.70	-	15.78±0.09	-
生草乌	0.50	54.94±0.61 ¹⁾	50.35±0.81 ^{1,3)}	31.29±0.23 ¹⁾	27.80±0.51 ^{1,3)}
	0.75	58.32±0.98 ¹⁾	53.37±0.88 ^{1,3)}	36.16±0.57 ¹⁾	32.81±0.84 ^{1,3)}
	1.00	66.17±1.48 ¹⁾	61.01±0.44 ^{1,3)}	40.72±0.53 ¹⁾	36.94±0.76 ^{1,3)}
诃子制草乌	0.50	43.97±0.76 ^{1,2)}	48.03±1.23 ^{1,5)}	22.73±0.97 ^{1,2)}	25.10±0.78 ^{1,5)}
	0.75	47.66±0.24 ^{1,2)}	50.02±1.01 ^{1,4)}	27.62±0.33 ^{1,2)}	30.76±0.43 ^{1,5)}
	1.00	54.64±0.87 ^{1,2)}	58.90±0.90 ^{1,5)}	33.78±0.06 ^{1,2)}	35.67±0.06 ^{1,5)}

3 讨论

草乌为常用中药材之一,具有明显的心脏毒性,稍有不慎即可引起中毒甚至是死亡,故常通过炮制或者配伍以降低其毒性^[16]。中医常通过降低毒性成分双酯型生物碱的含量以达到减毒目的^[17],而经诃子汤炮制后得到的诃子制草乌其所含的双酯型生物碱含量不降低,甚至与生品相当^[11,18],说明蒙古族药(以下简称“蒙药”)诃子制草乌的炮制减毒途径有别于制草乌,但具体的炮制减毒机制仍不

清楚。本课题组前期研究发现,诃子制草乌中引入了许多辅料诃子中的化学成分^[14],加之蒙药中诃子与草乌配伍,或草乌中毒后灌服诃子汤解毒的用法,均提示可从辅料成分与草乌成分相互作用的角度探讨诃子制草乌减毒原理。

TRPV1通道是各种细胞系氧化应激和细胞增殖的重要调节因素,可被吴茱萸、生姜、川乌等辛温中药及CAP,乌头碱等成分所激活^[5-6,19],在酸性环境下也可被激活^[12],进而会诱导细胞凋亡和Ca²⁺

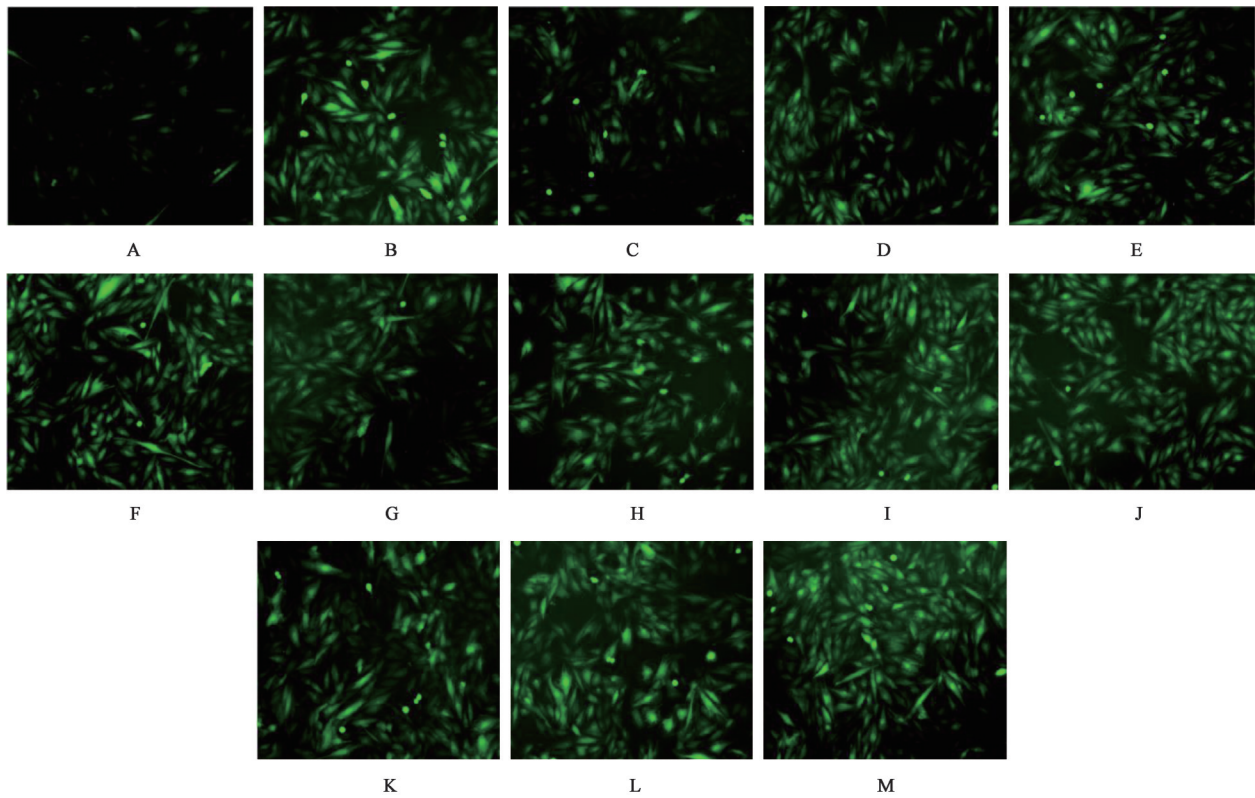


图3 生草乌、诃子制草乌对H9c2细胞中ROS释放的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 3 Effect of raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus* on ROS release of H9c2 cardiomyocytes (IF, ×100)

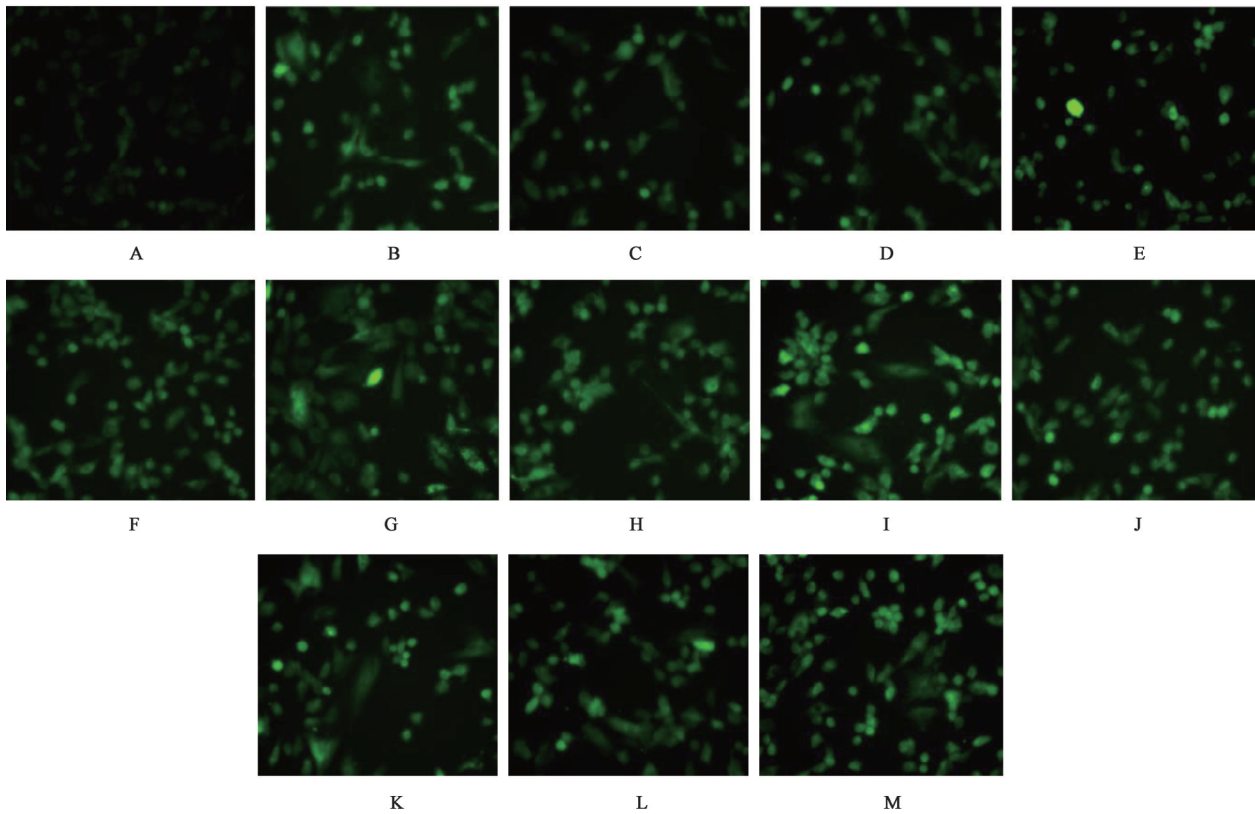


图4 生草乌、诃子制草乌对大鼠H9c2细胞中Ca²⁺释放的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 4 Effect of raw *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Aconiti Kusnezoffii Radix* processed with *Chebulae Fructus* on Ca²⁺ release of H9c2 cardiomyocytes (IF, ×100)

表5 TRPV1引物序列

Table 5 Primer sequence of TRPV1

名称	序列(5'→3')	长度/bp
TRPV1 上游	GGCTGTCTTCATCATCTGCTGCT	118
下游	GTTCTTGCTCTCCTGTGCGATCTTGT	
GAPDH 上游	GGCAAGTTCAACGGCACAG	143
下游	CGCCAGTAGACTCCACGACA	

表6 生草乌、诃子汤对大鼠H9c2心肌细胞中TRPV1 mRNA相对表达量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of raw Aconiti Kusnezoffii Radix and Chebulae Fructus decoction on relative expression of TRPV1 mRNA in H9c2 cardiomyocytes ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	TRPV1/GAPDH相对表达量
空白		1.00±0.04
BCTC	10 μmol·L ⁻¹	0.52±0.02 ¹⁾
CAP	10 μmol·L ⁻¹	1.43±0.05 ¹⁾
生草乌	0.10 g·L ⁻¹	0.97±0.01
	0.25 g·L ⁻¹	1.00±0.01
	0.50 g·L ⁻¹	1.34±0.05 ¹⁾
	0.75 g·L ⁻¹	1.42±0.03 ¹⁾
	1.00 g·L ⁻¹	1.57±0.02 ¹⁾
诃子汤	0.05 g·L ⁻¹	0.96±0.01
	0.10 g·L ⁻¹	1.10±0.02 ¹⁾
	0.25 g·L ⁻¹	1.08±0.02 ¹⁾
	0.50 g·L ⁻¹	1.16±0.01 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.01。

超载等的发生,从而产生一定毒性。草乌性辛,味苦,有大毒,其主要化学成分为乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等双酯型生物碱,炮制草乌的诃子汤pH约3.2^[11,14],均符合TRPV1通道激动剂的特性。本文研究结果显示,生草乌和辅料诃子汤均可激活TRPV1通道,可作为TRPV1通道的激动剂。

据报道,当激动剂单独作用于TRPV1通道时,可使TRPV1通道致敏,若TRPV1通道同时受到2种或2种以上激动剂作用时可使其脱敏,减少Ca²⁺的释放从而降低细胞毒性的发生^[13]。本文研究结果表明生草乌可通过降低细胞活力,促进细胞中LDH, ROS, Ca²⁺的释放,降低线粒体膜电位等来产生一定的心脏毒性,而诃子制草乌毒性则可明显减弱这一毒性。TRPV1通道阻断后,可明显降低生草乌毒性,但对于诃子制草乌而言其毒性升高,这说明TRPV1通道是诃子制草乌发挥减毒作用的关键通道之一,而生草乌和辅料诃子汤均可激活TRPV1通道,故推测诃子制草乌减毒原理可能是由于诃子

中的酸性成分和生草乌中的双酯型生物碱协同作用使TRPV1通道部分脱敏来发挥减毒作用。

生草乌诱导的心脏毒性机制非常复杂,尤其是对离子通道的影响如Na⁺, K⁺通道等^[20],乌头碱可通过促进心肌细胞中心脏钠通道基因SCN5A mRNA表达使心肌细胞中Na⁺持续内流,从而在一定程度上诱发心律失常的发生^[21]。WANG等^[22]发现乌头碱以浓度、时间依赖性方式阻断超速激活延迟整流钾电流,并延长动作电位时长,诱发心律失常的发生。另有研究表明缝隙连接通道在维持心肌细胞兴奋、收缩耦联过程中发挥着重要作用,章诗伟等^[23]研究发现不同浓度乌头碱会引起Cx43磷酸化出现异常进而诱发心脏毒性。本实验结果发现生草乌和诃子制草乌在TRPV1通道阻断后仍存在一定的毒性,这说明TRPV1通道可能是生草乌诱导心脏毒性及诃子制草乌减毒的通道之一,而其他离子通道对诃子制草乌减毒的影响,以及诃子汤对H9c2心肌细胞毒性的影响仍需进一步探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:247.

[2] 史瑞仙,董振宇,张东. 蒙药诃子药理作用研究[J]. 中国民族医药杂志,2020,26(5):33-35.

[3] 张莉莉,马丽群,祝之明. 瞬时受体电位香草酸亚型1 (TRPV1)在心血管系统中的作用[J]. 中国分子心脏病学杂志,2007,7(1):51-53.

[4] 江夏,陈小玫,张敏. TRPV1在皮肤中的分布及其介导的生理病理活动[J]. 中国皮肤性病学杂志,2018,32(6):702-706.

[5] 孙丹妮. 制川乌对慢性炎症性疼痛小鼠的镇痛作用及机制研究[D]. 广州:广州中医药大学,2016.

[6] 周海玉,戴丽,王德凤,等. 基于荧光定量PCR评测热性中药成分对TRPV1通道功能的影响[J]. 中国药理学通报,2016,32(10):1395-1398.

[7] 李世杰. 川乌与草乌的鉴别以及相关研究进展[J]. 光明中医,2020,35(16):2608-2610.

[8] 叶协滔,钟凌云,杨明,等. 不同炮制方法对川乌抗痛风性关节炎及心脏毒性作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(18):121-127.

[9] 支美妆,顾欣如,韩舒,等. 应用UPLC-Orbitrap-MS分析草乌及其不同炮制品化学成分差异[J]. 中国中药杂志,2020,45(5):1082-1089.

[10] 刘帅,刘晓艳,李妍,等. 草乌及其炮制品的急性毒性实验研究[J]. 中国药物警戒,2015,12(9):513-

- 516, 521.
- [11] 杨畅,李飞,侯跃飞,等. 诃子草乌配伍与诃子制草乌水煎液中生物碱含量的比较——诃子制草乌炮制原理探讨Ⅱ[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 130-132.
- [12] CATERINA M J, SCHUMACHER M A, TOMINAGA M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain channel [J]. *Nature*, 1997, 389(6653):816-824.
- [13] 杨楨. 基于热敏通道 TRPV1 的理中丸标志性成分之间的配伍研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2015.
- [14] 刘帅. 辅料因素对蒙药诃子制草乌化学成分的影响及炮制减毒原理研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [15] 支美汝,韩舒,刘凯洋,等. 生草乌和诃子制草乌细胞毒性及抗炎作用的比较研究[J]. 中国药房, 2020, 31(22):2701-2705.
- [16] 图雅,张贵君,王淑敏,等. 草乌在中医和蒙医中应用概述[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(1):113-116.
- [17] 吴皓,胡昌江. 中药炮制学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012:320.
- [18] 韩志强,那生桑. 蒙药草乌炮制方法的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(1):150-154.
- [19] 王星,张燕玲,王耘,等. TRPV1 离子通道与中药辛味药性的关系研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(13): 2422-2427.
- [20] 刘艳,章诗伟,周兰,等. 乌头类生物碱对心肌的毒性作用及分子毒理学研究进展[J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(6):398-401.
- [21] 刘岩. 乌头类生物碱心肌毒性作用的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2007.
- [22] WANG Y J, CHEN B S, LIN M W, et al. Time-dependent block of ultrarapid-delayed rectifier K⁺ currents by aconitine, a potent cardiotoxin, in heart-derived H9c2 myoblasts and in neonatal rat ventricular myocytes[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 106(2):454-463.
- [23] 章诗伟,任杰林,张黎,等. 乌头碱对培养新生大鼠心室肌细胞 Connexin43 蛋白磷酸化的影响[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(2):92-95, 146.

[责任编辑 刘德文]