

附子与人参不同配伍对心肌细胞的减毒作用

王晓丽, 李丽静, 李玉梅, 李超英, 张大方*

(长春中医药大学药学院, 长春 130117)

[摘要] **目的:**探讨附子配伍不同比例人参的减毒作用。**方法:**将原代培养6 d的心肌细胞分为空白(NC)组,不同比例的附子人参(AG)组,空白血清(BS)组。AG组加入含有不同配伍比例的附子人参的载药血清,观察药物对原代培养心肌细胞的自发搏动的影响,检测心肌细胞的细胞活力,测定原代心肌细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)含量,测定上清液中一氧化氮(NO)分泌量和乳酸脱氢酶(LDH)释放率,利用分光光度法检测半胱氨酸蛋白酶(Caspases-3)活性,Western blot法检测Bcl-2和Bax的蛋白表达,RT-PCR检测Bcl-2和Caspases-3 mRNA的表达。**结果:**与附子-人参按1:0配伍的载药血清(AG_{1:0})组比较,加入附子配伍不同比例人参载药血清后,心肌细胞自发搏动频率显著降低,心肌细胞内SOD活性显著升高,MDA含量,NO分泌量和LDH释放率显著降低,Caspases-3活性,Bax蛋白表达和Caspases-3 mRNA表达显著降低,Bcl-2蛋白表达和Bcl-2 mRNA表达显著升高,细胞活力在作用2~4 h显著升高,均为显著性差异($P < 0.05$)。AG_{1:0.5}组对心肌细胞以上各项检测指标的影响与BS组比较不具有显著性差异。**结论:**附子配伍不同比例的人参可抑制附子对心肌细胞的毒性作用,其中附子-人参配比为1:0.5时,人参可有效地抑制附子的毒性作用。

[关键词] 附子; 人参; 不同配伍; 减毒作用; 心肌细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0153-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110153

Toxicity-reducing Effect of Compatibility of Aconiti Lateralis Radix Praeparata with Different Proportion of Panax Ginseng in Neonatal Rat Cardiomyocytes WANG Xiao-li, LI Li-jing, LI Yu-mei, LI Chao-ying, ZHANG Da-fang* (Pharmacy College, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** In order to evaluate the inducing toxicity effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and different compatibility proportion of Ginseng Radix et Rhizoma in neonatal rats cardiomyocytes. **Method:** The primary culture cardiac cells (6 d) were randomly divided into normal (NC) group, Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Ginseng Radix et Rhizoma (AG) group, blood serum (BS) group. The inducing toxicity effect of blood serum of different compatibility proportion of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Ginseng Radix et Rhizoma on spontaneous imp frequency, cell viability, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), Nitric oxide (NO) and lactate dehydrogenase (LDH) was investigated *in vitro* in neonatal rat cardiomyocytes. The activity of Caspases-3, the expression of Bcl-2 and Bax protein, the expression of Bcl-2 and Caspases-3 mRNA was assayed by spectrophotometry, western blot and real-time PCR respectively. **Result:** Compared with AG_{1:0} group, the content of SOD increased obviously, spontaneous imp frequency, the content of MDA, the secretory volume of NO and the release rate of LDH decreased obviously, the activity of Caspases-3, the expression of Bax protein and Caspases-3 mRNA decreased obviously, the expression of Bcl-2 protein and Bcl-2 mRNA increased gradually, cell viability increased in 2-4 h significantly ($P < 0.05$) in other AG groups. Compared with BS group, there was no significant difference in AG_{1:0.5} group in the above indexes. **Conclusion:** There was a significant inducing toxicity effect of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and different compatibility

[收稿日期] 20141125(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173597)

[第一作者] 王晓丽,在读博士,讲师,从事中药复方药效作用物质基础研究,E-mail:ccwxl@126.com

[通讯作者] *张大方,博士生导师,教授,从事中药复方药效作用物质基础及机制研究,Tel:0431-86172205,E-mail:zdf0431@126.com

proportion of Ginseng Radix et Rhizoma in neonatal rats cardiomyocytes, the optimization compatibility proportion in AG_{1:0.5}.

[Key words] Aconiti Lateralis Radix Praeparata; Ginseng Radix et Rhizoma; different compatibility proportion; inducing toxicity effect; cardiomyocytes

附子为毛茛科植物乌头子根的加工品,主要用于亡阳虚脱及阳虚诸证,被誉为“回阳救逆之第一要药”^[1-2],然而,因其有大毒,在临床应用受到一定局限。人参为五加科植物人参的干燥根,主要用于元气虚脱、心力衰竭等证,为“补气之圣药”^[3]。参附汤是临床常用的经典名方,依据中医配伍特色,将附子与人参药对配伍应用,可起到减毒增效的作用。但在实际的临床应用中,参附汤附子、人参配伍比例却不尽相同^[4],人参对附子发挥减毒作用尚需利用现代药理学研究方法科学地深入研究,而关于此问题的文献报道也相对较少。因此,笔者在已研究附子-人参配伍具有强心作用的基础上^[5-7],选用原代培养的大鼠心肌细胞为模型,进一步观察附子与人参不同配伍对心肌细胞的减毒作用。

1 材料

1.1 动物 Wistar 健康大鼠,清洁级,体重 240 ~ 260 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2007-0001。洁净实验室喂养:温度(22 ± 2) °C,相对湿度(50 ± 10)%,12 h 昼夜交替光照,大鼠自由摄食、饮水。

1.2 药物及试剂 附子(黑顺片)、人参饮片均购于吉林省长春市宏检药业,经长春中医药大学药学院中药鉴定教研室姜大成教授鉴定,附子为毛茛科植物乌头 *Aconatum curmichaeli* 子根的加工品;人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根。噻唑蓝(MTT,美国 Solarbio 公司,批号 410C0515),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、一氧化氮(NO)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(批号分别为 20140409, 20131221, 20140331, 20140402),均购于南京建成生物工程研究所;Caspase-3 活性分光光度法检测试剂盒(南京碧波生物科技公司),BCA 蛋白定量试剂盒(上海申能博彩生物科技公司,批号 00011403),Bcl-2 抗体和 Bax 抗体(美国 Newmarkers 公司),TRIzol Reagent(美国 Gibcobl 公司),Bcl-2 和 Caspase-3 引物由上海生工生物工程公司设计及合成。

1.3 仪器 TS100 型倒置荧光显微镜(日本尼康公司),RF-5301PC 型荧光分光光度计(日本岛津公司),safir2 型酶标仪(奥地利 Tecan 公司),Countess

C10227 型细胞计数器(美国 Invitrogen 公司),ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),JY-ZY2 型转移电泳槽和 JY-CZ1 型单垂直电泳槽(北京君意东方公司),SmartChemi II 型一体式化学发光图像分析系统(北京赛智公司)。

2 方法

2.1 心肌细胞的提取及培养 将清洁级 Wistar 大鼠,于洁净实验室雌雄合笼,获得子代新生大鼠。选取 24 h 内新出生大鼠,参照文献[8]报道的方法并做少许改良,75% 乙醇溶液消毒,无菌台内取乳鼠心肌组织剪碎,加入 0.125% 胰蛋白酶与 1% II 型胶原酶混合液于 37 °C 水浴振荡器中消化 10 min,用含 10% FBS 的 DMEM 终止消化,吸弃混合液。重复消化 5 次,收集该 5 次混合消化液,200 目筛过滤,1 000 r·min⁻¹离心 5 min 弃上清,再用含 10% FBS 的 DMEM 重悬细胞,于培养瓶内差速贴壁 90 min,收集细胞悬液,以 5 × 10⁵ 个/mL 密度接种于培养板中,培养前 48 h 加入 5-BrdU,放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 载药血清的制备 取附子、人参药材饮片,按 1:0,1:0.25,1:0.5,1:1 和 1:2 共 5 种配伍比例混合,制备水煎液,置于 4 °C 冰箱存储备用。参照文献[9]报道的方法,选取 48 只清洁级 Wistar 雄性大鼠,随机分成 6 组,其中 5 组大鼠 ig 不同配伍比例的水煎液(附子含量相当于附子生药 2 g·kg⁻¹),第 6 组大鼠给予同体积生理盐水,每日给药 1 次,连续 1 周,于末次给药 2 h 后,经股动脉取血,室温放置、离心、分离血清,于无菌工作台内 0.22 μm 滤膜过滤,56 °C 水浴灭活 0.5 h,置入 -20 °C 冰箱中储存待用。

2.3 分组及药物处理 将原代培养 6 d 的心肌细胞分为空白(NC)组、不同比例的附子-人参(AG)组、空白血清(BS)组。参照文献[10]报道的方法,其中 AG 组分别加入含有不同配伍比例附子-人参的载药血清,BS 组加入空白血清,NC 组则正常更换液培养原代心肌细胞,各组心肌细胞培养液中血清质量分数均为 10%。

2.4 检测指标

2.4.1 观察自发搏动 取出种植各组细胞的培养

皿,置于倒置显微镜下,每孔随机选择 5 个不同视野,记录心肌细胞的搏动频率,计算平均心肌细胞搏动频率(以空白组心肌细胞搏动频率为 100% 作为基准)。

2.4.2 心肌细胞的活力测定 取出种植各组细胞的培养皿,加入 MTT 溶液,37 °C 孵育 4 h,加 DMSO 溶液,待蓝色颗粒溶解,酶标仪 490 nm 测定吸光度 A,计算细胞存活率(以空白组存活率为 100% 作为基准)。

2.4.3 生化指标的检测 利用黄嘌呤氧化酶法,测定原代心肌细胞中 SOD 活性;采用分光光度法检测各组心肌细胞的 LDH 释放率;采用硝酸还原酶法测定 NO 分泌量;利用硫代巴比妥酸比色法,测定 MDA 含量,操作步骤按试剂盒说明书进行。

2.4.4 Caspases-3 活性的检测 收集各组培养皿中的心肌细胞,按照 Caspase-3 活性检测按试剂盒说明书操作,检测心肌细胞 Caspases-3 活性(以空白组心肌细胞 Caspases-3 活性为 100% 作为基准)。

2.4.5 Bcl-2, Bax 蛋白表达的检测 收集各组培养皿中的心肌细胞,利用 BCA 法测定蛋白含量,SDS-PAGE 电泳法进行蛋白分离。再将蛋白电转移至醋酸纤维膜上,置入 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中 4 °C 封闭过夜。与抗 Bcl-2, Bax 和 GAPGH 等多克隆抗体 25 °C 孵育 4 h, TBST 溶液洗膜 3 × 10 min,生物素标记的 II 抗孵育 2 h, TBST 溶液洗膜 3 × 10 min。加入 Western blot 荧光检测试剂激发荧光,置入一体式化学发光图像分析系统扫描、分析各蛋白质条带的积分吸光度 IA。

2.4.6 Bcl-2, Bax mRNA 表达的检测 收集各组培养皿中的心肌细胞,利用 TRIzol 试剂提取总 RNA,

按 Exscript™ RT reagent kit 说明书操作,将 RNA 反转录成 cDNA,再按照 PCR Amplification kit 说明书进行 PCR 扩增反应。引物序列如下: GAPDH 上游引物: 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3', 下游引物: 5'-AATGTCACGCACGATTTCCC-3'; Bcl-2 上游引物: 5'-TGAACCGGATCTGCACAC-3', 下游引物: 5'-CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG-3'; Caspase-3 上游引物: 5'-GCAGCAGCCTCAAATTGTTGACTA-3', 下游引物: 5'-TGCTCCGGCTCAAACCATC-3'。数据分析用 2^{-ΔΔC_t}法。

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{实验}} - (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{对照}}$$

2.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件分析试验结果,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较用 SNK 检验,多组间差异的显著性分析采用方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对自发搏动的影响 培养的原代心肌细胞经药物处理后,在 0 ~ 4 h 内,与 BS 组比较,AG_{1:0} 组心肌细胞搏动频率显著增加 (P < 0.05),表明附子对原代培养的心肌细胞自发搏动频率具有的增加作用。而附子配伍不同比例人参的载药血清心肌细胞处理组,与 AG_{1:0} 组相比较,心肌细胞自发搏动频率明显降低 (P < 0.05),表明人参对附子载药血清引起的心肌细胞搏动频率增加有缓解作用。其中 AG_{1:0.25} 组在 0 ~ 4 h 内呈时效依赖关系,而 AG_{1:0.5} 组对心肌细胞自发搏动的影响与 AG_{1:0.25} 组比较具有明显差异 (P < 0.05),与 AG_{1:1} 组, AG_{1:2} 组和 BS 组比较不具有显著性差异,表明附子-人参配伍,人参比例达到 0.5 倍时,心肌细胞搏动频率趋近 BS 组水平。见表 1。

表 1 AG 对原代心肌细胞自发搏动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of AG on cardiomyocytes spontaneous imp frequency ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物比例	心肌细胞自发搏动频率/%				
		0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h
空白	-	100.00 ± 2.34 ²⁾	100.00 ± 2.76 ²⁾	100.00 ± 2.87 ²⁾	100.00 ± 1.62 ²⁾	100.00 ± 1.96 ²⁾
附子-人参	1:0	124.09 ± 4.37 ¹⁾	126.62 ± 4.89 ¹⁾	125.54 ± 4.62 ¹⁾	122.99 ± 3.66 ¹⁾	122.26 ± 4.83 ¹⁾
	1:0.25	116.34 ± 3.80 ^{1,2,3)}	115.54 ± 3.90 ^{1,2,3)}	113.59 ± 3.02 ^{1,2,3)}	112.15 ± 3.02 ^{1,2,3)}	112.13 ± 3.44 ^{1,2,3)}
	1:0.5	104.95 ± 3.60 ²⁾	104.47 ± 3.12 ²⁾	104.75 ± 3.44 ²⁾	104.60 ± 3.49 ²⁾	104.16 ± 2.73 ²⁾
	1:1	103.96 ± 3.49 ²⁾	103.97 ± 3.28 ²⁾	103.93 ± 3.48 ²⁾	104.43 ± 2.33 ²⁾	104.82 ± 3.42 ²⁾
	1:2	102.81 ± 3.28 ²⁾	104.14 ± 3.07 ²⁾	103.44 ± 3.08 ²⁾	104.27 ± 3.02 ²⁾	104.99 ± 3.19 ²⁾
	空白血清	-	100.33 ± 2.31	100.17 ± 2.43	99.18 ± 3.17	100.00 ± 2.63

注:与空白血清组比较¹⁾ P < 0.05;与 AG_{1:0} 组比较²⁾ P < 0.05;与 AG_{1:0.5} 组比较³⁾ P < 0.05 (表 2 ~ 5 同)。

3.2 对心肌细胞活力的影响 培养的原代心肌细胞经药物处理后,在 1~4 h 内,与 BS 组比较,AG_{1:0} 组细胞活力显著下降 ($P < 0.05$),表明附子对原代培养的心肌细胞具有损伤作用。而附子配伍不同比例人参的载药血清心肌细胞处理组,与 AG_{1:0} 组相比,心肌细胞活力逐渐升高,在 2~4 h 内,具有显著性差异 ($P < 0.05$),表明人参对附子载药血清引起

的心肌细胞活力降低具有抑制作用。其中 AG_{1:0.25} 组在 0~4 h 内呈时效依赖关系,而 AG_{1:0.5} 组对心肌细胞的细胞活力的影响与 AG_{1:1} 组、AG_{1:2} 组和 BS 组比较不具有显著性差异,在 3~4 h 与 AG_{1:0.25} 组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$),表明附子-人参配伍,人参比例达到 0.5 倍时,心肌细胞活力趋近 BS 组水平。见表 2。

表 2 AG 对原代心肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of AG on cardiomyocytes viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物比例	心肌细胞存活率/%				
		0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h
空白	-	100.00 ± 1.80	100.00 ± 1.04 ²⁾	100.00 ± 1.58 ²⁾	100.00 ± 1.56 ²⁾	100.00 ± 1.40 ²⁾
附子-人参	1:0	93.90 ± 4.49	93.44 ± 4.93 ¹⁾	91.22 ± 4.86 ¹⁾	89.25 ± 3.19 ¹⁾	88.83 ± 3.41 ¹⁾
	1:0.25	95.39 ± 3.94	94.90 ± 3.92	93.42 ± 2.70 ¹⁾	92.70 ± 2.44 ^{1,3)}	91.93 ± 2.45 ^{1,3)}
	1:0.5	98.32 ± 3.41	98.11 ± 3.25	97.98 ± 2.44 ²⁾	97.76 ± 2.96 ²⁾	97.23 ± 2.78 ²⁾
	1:1	98.83 ± 3.67	98.80 ± 4.07	98.47 ± 2.51 ²⁾	98.57 ± 2.70 ²⁾	97.93 ± 2.80 ²⁾
	1:2	99.02 ± 2.76	98.86 ± 3.39	98.68 ± 3.13 ²⁾	99.18 ± 2.67 ²⁾	98.62 ± 2.37 ²⁾
空白血清	-	98.40 ± 1.86	99.88 ± 1.65	100.12 ± 2.16	99.59 ± 1.61	98.73 ± 1.68

3.3 对 SOD 活性,MDA 含量,NO 分泌量和 LDH 释放率的影响 与 BS 组比较,AG_{1:0} 组心肌细胞 SOD 活性明显降低,MDA 含量,NO 分泌量和 LDH 释放率明显增加 ($P < 0.05$),表明附子对原代培养的心肌细胞具有损伤作用。与 AG_{1:0} 组相比,附子配伍不同比例人参的载药血清心肌细胞处理组,心肌细胞 SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$),MDA 含量,NO 分泌

量和 LDH 释放率明显降低 ($P < 0.05$),表明人参对附子载药血清引起的原代心肌细胞损伤具有抑制作用。其中 AG_{1:0.5} 组对心肌细胞 SOD,MDA,NO 和 LDH 指标的影响与 BS 组比较不具有明显差异,与 AG_{1:0.25} 组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$),表明人参比例为附子 0.5 倍时,即可抑制附子载药血清对原代心肌细胞的损伤作用。见表 3。

表 3 AG 对心肌细胞 SOD,MDA,NO,LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of AG on SOD,MDA,NO,LDH ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物比例	SOD/%	MDA/%	NO/%	LDH/%
空白	-	100.00 ± 1.31 ²⁾	100.00 ± 2.12 ²⁾	100.00 ± 1.63 ²⁾	100.00 ± 1.74 ²⁾
附子-人参	1:0	73.38 ± 2.78 ¹⁾	118.56 ± 3.42 ¹⁾	124.52 ± 3.73 ¹⁾	113.53 ± 4.98 ¹⁾
	1:0.25	88.58 ± 2.68 ^{1,2,3)}	107.19 ± 2.55 ^{1,2,3)}	114.40 ± 3.47 ^{1,2,3)}	105.32 ± 3.36 ^{2,3)}
	1:0.5	97.47 ± 2.36 ²⁾	102.31 ± 2.98 ²⁾	103.12 ± 2.40 ²⁾	102.75 ± 2.37 ²⁾
空白血清	-	100.69 ± 1.87	99.91 ± 1.74	100.77 ± 1.92	100.80 ± 1.28

3.4 对 Caspases-3 活性及 Bcl-2 和 Caspases-3 mRNA 表达的影响 培养的原代心肌细胞经药物处理后,与 BS 组比较,AG_{1:0} 组心肌细胞 Caspases-3 活性明显升高,Bcl-2 mRNA 表达明显下调,Caspases-3 mRNA 表达明显上调,均具有明显差异 ($P < 0.05$),表明附子对原代培养的心肌细胞具有损伤作用。而附子配伍不同比例人参的载药血清心肌细胞处理组,与 AG_{1:0} 组比较。心肌细胞 Caspases-3 活性明显

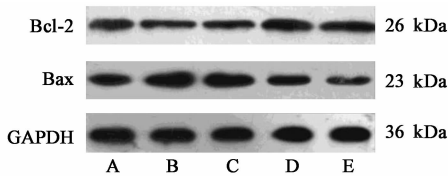
降低,Bcl-2 mRNA 表达明显上调,Caspases-3 mRNA 表达明显下调,均为明显差异 ($P < 0.05$),表明人参对附子载药血清引起的心肌细胞损伤具有抑制作用。AG_{1:0.5} 组对心肌细胞 Caspases-3 活性,Caspases-3 mRNA 表达的影响与 AG_{1:0.25} 组比较具有明显差异 ($P < 0.05$),与 BS 组比较不具有显著性差异,表明人参比例为附子 0.5 倍时,即可抑制附子载药血清对原代心肌细胞的损伤作用。见表 4。

表 4 AG 对心肌细胞 Caspases-3 活性及 Bcl-2, Caspases-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of AG on activity of Caspases-3 and expression of Bcl-2, Caspases-3 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物比例	Caspases-3/%	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
			Bcl-2	Caspases-3
空白	-	100.00 ± 1.95 ²⁾	1.00 ± 0.02 ²⁾	1.00 ± 0.016 ²⁾
附子-人参	1:0	143.26 ± 5.13 ¹⁾	0.78 ± 0.04 ¹⁾	1.28 ± 0.04 ¹⁾
	1:0.25	115.74 ± 4.76 ^{1,2,3)}	0.90 ± 0.03 ^{1,2)}	1.16 ± 0.04 ^{1,2,3)}
	1:0.5	103.38 ± 3.81 ²⁾	0.95 ± 0.04 ²⁾	1.04 ± 0.02 ²⁾
空白血清	-	102.09 ± 3.32	0.99 ± 0.03	1.02 ± 0.02

3.5 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 培养的原代心肌细胞经药物处理后,与 BS 组比较, AG_{1:0} 组心肌细胞 Bcl-2 的蛋白表达明显下调, Bax 的蛋白表达明显上调, 均具有明显差异 ($P < 0.05$), 表明附子对原代培养的心肌细胞具有损伤作用。而附子配伍不同比例人参的载药血清心肌细胞处理组, 与 AG_{1:0} 组相比, 心肌细胞 Bcl-2 的蛋白表达显著上调, Bax 的蛋白表达显著下调, 均为明显差异 ($P < 0.05$), 表明人参对附子载药血清引起的心肌细胞损伤具有抑制作用, AG_{1:0.5} 组对心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响与 AG_{1:0.25} 组比较具有明显差异 ($P < 0.05$), 与 BS 组比较不具有显著性差异, 表明人参比例为附子 0.5 倍时, 即可抑制附子载药血清对原代心肌细胞的损伤作用。见图 1, 表 5。



A. 空白组; B. AG_{1:0}组; C. AG_{1:0.25}组; D. AG_{1:0.5}组; E. 空白血清组

图 1 AG 对心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of AG on expression of Bcl-2 and Bax protein

表 5 AG 对心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects of AG on expression of Bcl-2 and Bax protein

($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物比例	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
空白	-	86.82 ± 2.87 ²⁾	54.88 ± 1.92 ²⁾
附子-人参	1:0	52.54 ± 5.23 ¹⁾	113.39 ± 2.95 ¹⁾
	1:0.25	72.52 ± 4.59 ^{1,2,3)}	96.14 ± 2.19 ^{1,2,3)}
	1:0.5	84.52 ± 4.08 ²⁾	57.15 ± 2.13 ²⁾
空白血清	-	85.35 ± 3.51	56.54 ± 1.96

4 讨论

SOD 是机体内一种重要的生物活性蛋白, 可清除氧自由基, 对维护生物体内自由基的产生与清除

的动态平衡发挥极为重要的作用^[11]。有研究显示, 附子中的次乌头碱可降低心肌细胞 SOD 的活性, 使体内氧自由基大量蓄积, 进而对心肌细胞产生毒性^[12]。MDA 是脂质过氧化反应的最终产物, 其含量的高低可反映氧自由基对心肌细胞攻击而受损伤的严重程度^[13]。氧自由基攻击生物膜, 致使受损心肌细胞的膜通透性增加, 细胞内大量的 LDH 释放至细胞间隙和上清液中, 检测 LDH 的释放率能较准确的掌握细胞受损伤的程度。NO 也是体内一种重要的生理因子, 具有抗自由基损伤、改善心脏血液供应、缩小心肌梗死范围、抑制心律失常以及抗血小板黏附和聚集等作用, 现代研究证实, NO 参与了心肌细胞的损伤过程, 其分泌量与梗死而积呈正相关^[14]。陈莉莉等研究表明^[15], 人参中的人参皂苷具有增加心肌细胞 SOD 的活性、降低 MDA 含量以及 LDH 释放率的作用。本文以原代培养大鼠心肌细胞的自发搏动频率, 细胞活力, SOD 活性, MDA 含量, NO 分泌量和 LDH 释放率为检测指标, 观察附子对心肌细胞的毒性作用和人参的减毒作用。

实验结果显示, 在原代培养的乳鼠心肌细胞中加入附子载药血清后, 心肌细胞自发搏动频率显著升高, 心肌细胞内 SOD 活性显著降低, 抗自由基损伤的能力下降, 细胞内脂质过氧化反应及其最终产物 MDA 含量, NO 分泌量和 LDH 释放率显著增加, 细胞活力在作用 1~4 h 显著降低, 对心肌细胞产生毒性作用。而加入附子配伍不同比例人参载药血清后, 心肌细胞自发搏动频率降低并趋于正常, 心肌细胞内 SOD 活性显著升高, MDA 含量, NO 分泌量和 LDH 释放率随之显著减少, 细胞活力在作用 2~4 h 显著升高, 说明附子配伍不同比例的人参减轻了附子对心肌细胞的毒性作用。

对于心肌细胞的损伤, Bcl-2 家族蛋白是诸多凋亡调节因子之一, 它位于线粒体上游, 控制线粒体膜的通透性, 从而促进线粒体释放细胞色素 C, 最终激

活 Caspase 级联反应,活化 Caspases-3 蛋白酶,导致心肌细胞凋亡^[16]。为进一步说明人参能够抑制附子对心肌细胞的凋亡作用,本文又检测了药物对心肌细胞 Caspases-3 活性,Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达以及 Bcl-2 和 Caspases-3 mRNA 的表达干预情况。结果显示,附子载药血清能够增加心肌细胞 Caspases-3 活性,上调 Bax 蛋白与 Caspases-3 mRNA 的表达,降低 Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2 mRNA 的表达,提示附子载药血清对心肌细胞产生毒性作用。而加入附子配伍不同比例人参载药血清后,心肌细胞 Caspases-3 活性,Bax 蛋白表达以及 Caspases-3 mRNA 的表达均显著降低并趋于空白组,Bcl-2 蛋白表达与 Bcl-2 mRNA 的表达均显著升高并趋于空白组,进一步说明附子配伍不同比例的人参后,人参抑制了附子对心肌细胞产生的毒性作用。

从本实验还可以看出,附子-人参配伍使用,人参比例为附子 0~0.5 倍,随人参比例的增加,心肌细胞的各项指标越趋近于空白血清组水平。当附子-人参比例为 1:0.5 时,其载药血清对原代培养大鼠心肌细胞以上各项检测指标与空白血清组比较不具有显著性差异,与 AG_{1:0.25} 组比较多项指标具有显著性差异,表明在此配伍比例下,人参可有效地抑制附子对心肌细胞的毒性作用。

[参考文献]

[1] 温瑞卿,李东辉,赵昕,等. 基于化学分析的毒性中药附子炮制方法的合理性研究[J]. 药学学报, 2013, 48(2):286-290.

[2] 陈荣昌,孙桂波,张强,等. 附子炮制减毒的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 237-241.

[3] 徐丹,范颖. 参附汤方源考证及其配伍内涵探析[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(5):1062-1063.

[4] 刘敏. 人参药性及功效探析[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(2):110-112.

[5] 李玉梅,张超,王楚盈,等. 附子人参配伍抗心衰量效作用关系研究[J]. 吉林中医药, 2013, 33(10): 1046-1048.

[6] 李玉梅,张超,王楚盈,等. 附子与人参不同比例配伍对急性心衰大鼠神经一体液因子的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(6):963-964.

[7] 李超英,李玉梅,张大方,等. 附子与人参配伍对急性心衰大鼠血流动力学的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6):593-598.

[8] 贺海波,徐媛青,魏娜,等. 竹节参总皂苷对 H₂O₂ 致乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17):187-191.

[9] 孙艳,孙樱丹,徐厚谦. 当归补血汤含药血清对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 250-254.

[10] 解素花,张广平,孙桂波,等. 附子与甘草不同配伍比例配伍减毒的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15):2210-2214.

[11] Kong F, Luan Y, Zhang Z H, et al. Baicalin protects the myocardium from reperfusion-induced damage in isolated rat hearts via the antioxidant and paracrine effect [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(1):254-259.

[12] 刘巧云,张宇燕,万海同,等. 次乌头碱与甘草苷、甘草次酸配伍的减毒作用[J]. 中国中医药杂志, 2013, 28(9):2601-2604.

[13] Du X, Hu X, Wei J. Postconditioning with rosuvastatin reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein expression [J]. Exp Ther Med, 2014, 7(1):117-120.

[14] Gok S, Vatanserver S, Vural K, et al. The role of ATP sensitive K⁺ channels and of nitric oxide synthase on myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis[J]. Acta Histochem, 2006, 108(2):95-104.

[15] 陈莉莉,张晗,姜小庆,等. 人参皂苷 Rg3 拮抗阿霉素导致的心肌细胞损伤作用机制研究[J]. 南开大学学报, 2013, 46(5):106-111.

[16] Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes *in vitro* and rat cardiac ventricles *in vivo* [J]. J Pharmacol Sci, 2006, 101(2):151-158.

[责任编辑 周冰冰]