

参芎葡萄糖注射液对H₂O₂诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用

杨洋¹, 刘亭¹, 王文华¹, 何彬², 吴琼¹, 刘兰¹, 王永林^{1*}

(1. 贵阳医学院药学院贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;
2. 贵阳医学院民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**探讨参芎葡萄糖注射液(Shenxiang glucose injection, SGI)对过氧化氢(H₂O₂)诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用及其机制。**方法:**体外培养 H9c2 心肌细胞,用 H₂O₂(300 μmol·L⁻¹)处理 0.5 h,建立 H9c2 心肌细胞 H₂O₂ 氧化损伤模型,SGI 组:H9c2 细胞用(100,200,400 μmol·L⁻¹)SGI 处理 6 h 后,另设空白组与模型组,再用 H₂O₂ 处理 0.5 h。利用流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位(MMP);用 MTS 法检测细胞存活率;用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测乳酸脱氢酶(LDH)漏出量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;用蛋白质免疫印迹(Western blot)技术检测凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶(Caspase-3)的表达情况。**结果:**在 300 μmol·L⁻¹H₂O₂ 作用细胞 0.5 h 的情况下,细胞存活率降低至 50% 左右,降低的程度合适,且实验结果重复性好,因此后续实验用该条件建立氧化损伤模型。与模型组比较,SGI 预处理 6 h 能显著升高细胞存活率($P < 0.05$, $P < 0.01$),减少 LDH 的外漏和 MDA 的生成($P < 0.05$, $P < 0.01$),显著增加 SOD, GSH-Px 和 CAT 的活性($P < 0.01$),明显减少 H9c2 细胞内 ROS 含量($P < 0.01$),并使 MMP 丢失减少($P < 0.01$),Western blot 表明,SGI 能显著上调 Bcl-2 的表达,下调 Caspase-3 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**参芎葡萄糖注射液能保护 H9c2 心肌细胞对抗 H₂O₂ 诱导的氧化损伤,其作用机制可能与其提高细胞清除 ROS 能力和抑制细胞凋亡有关。

[关键词] H9c2 心肌细胞; 氧化损伤; 细胞凋亡; 参芎葡萄糖注射液

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0153-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080153

Protective Effect of Shenxiang Glucose Injection on H₂O₂-induced Oxidative Damage of H9c2 Cells

YANG Yang¹, LIU Ting¹, WANG Wen-hua¹, HE Bin², WU Qiong¹, LIU Lan¹, WANG Yong-lin^{1*}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy,
Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China;

2. Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and
Traditional Chinese Medicine under Ministry of Education, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Shenxiang Glucose Injection (SGI) on H₂O₂-induced oxidative damage of H9c2 cells. **Method:** The *in vitro* oxidative stress damage model was established by treating H9c2 cells with H₂O₂ (300 μmol·mL⁻¹) for 0.5 h. SGI-pretreated group: pretreated H9c2 cells with SGI (100, 200, 400 μmol·mL⁻¹) for 6 h. Blank group and model group were treated additionally with H₂O₂ for 0.5 h. The intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) were detected by flow cytometry. The cell viability was detected by MTS assay; ELISA methods was used

[收稿日期] 20150729(011)

[基金项目] 贵阳市科技局重大专项([2011401]社 6-2 号);贵州省科技厅重大专项(黔科合重大专项字[2011]6019 号)

[第一作者] 杨洋, 硕士, 从事中药药理学研究, Tel:15761600422, E-mail:102168747@qq.com

[通讯作者] *王永林, 教授, 博士生导师, 从事中药新药研究, Tel:0851-86908899, E-mail:gywyl@gmcl.edu.cn

to determine LDH release, MDA content, SOD, CAT, GSH-PX activity. The expression of apoptosis-related genes Caspase-3, Bax and Bcl-2 was detected by western blotting technology. **Result:** After H9C2 cells was treated with H_2O_2 ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 0.5 h, the survival rate of the cells decreased to about 50%. The experimental results were so appropriate and repeatable that the subsequent oxidative damage model was established under the conditions. Compared with the control group, the cells survival was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) by pretreating with SGI for 6 h. SGI not only decreased the release of LDH ($P < 0.05$, $P < 0.01$), MDA ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but also increased the activity of SOD, GSH-PX, CAT ($P < 0.01$). In addition, the content of ROS significantly decreased ($P < 0.01$), and MMP was increased ($P < 0.01$). Western blot showed SGI can significantly enhance the expression of Bcl-2 and weaken the expression of Caspase-3 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** SGI shows the protective effect on H_2O_2 -induced oxidative damage of H9c2 cells. Its mechanism may be correlated with increase in ROS removal ability and inhibition of apoptosis.

[**Key words**] H9c2 cell; oxidative damage; apoptosis; Shenxiong glucose injection

参芎葡萄糖注射液是由丹参和盐酸川芎嗪配伍组成的中药注射剂^[1],具有活血化瘀、通心养脉的功效,临床上主要用于冠心病、心绞痛、脑梗死及其他缺血性心血管疾病的治疗^[2-5]。临床应用多年,无明显毒副作用,疗效确切,具有坚实的临床基础。但迄今为止,参芎葡萄糖注射液治疗心脑血管疾病的药理作用尚未深入开展,特别是细胞分子水平的作用机制研究尚属空白,不利于产品进一步开发。近年来,越来越多的研究表明^[6],氧化应激损伤是导致心脑血管系统功能异常的重要原因之一。鉴于参芎葡萄糖注射液的处方组分丹参和川芎嗪具有抗氧化损伤作用^[7],本实验拟建立 H9c2 心肌细胞过氧化氢(H_2O_2)氧化损伤模型,考察细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)漏出率、细胞内丙二醛(MDA)和活性氧(ROS)含量,胞内超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)以及线粒体膜电位(MMP)等指标,并检测凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶(Caspase-3)的表达情况,来探究参芎葡萄糖注射液抗氧化损伤作用及其机制,从抗氧化损伤角度来阐释其心血管治疗作用。

1 材料

1.1 细胞 H9c2 大鼠心肌细胞株(中科院上海细胞库)。

1.2 药物及试剂 参芎葡萄糖注射液(SGI,批号 H52020703,贵州景峰注射剂有限公司), H_2O_2 (GR,国药集团化学试剂有限公司,批号 20150108);DMEM 高糖培养基(批号 8114031),胎牛血清(FBS,批号 1227694),胰蛋白酶(批号 J130049)均购自美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素(批号 15140-122),RIPA 细胞裂解液(批号 20141219),磷酸盐缓

冲液(PBS,自配),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 20140722)均购自美国 Solarbio 公司;ROS 检测试剂盒(批号 20150313),JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(批号 20150315),MDA 试剂盒(批号 20141113),SOD 试剂盒(批号 20141113),GSH-Px 试剂盒(批号 20150321),CAT 试剂盒(批号 20150321),LDH 试剂盒(批号 20141113)均购自南京建成生物工程研究所;单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS,普洛麦格生物技术有限公司),蛋白质免疫印迹(Western blot)高灵敏度化学发光检测试剂盒(批号 AC21141,北京康为世纪生物科技有限公司),PVDF 膜(批号 K4SA1716L,美国 Millipore 公司);兔抗 Bcl-2 多抗(批号 AA65121),兔抗 Bax 多抗(CA36131),兔抗 Caspase-3 多抗(批号 CH27141),鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)单抗(批号 AB66132),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(批号 AB01151)和抗鼠 IgG 抗体(批号 G3114)均购自巴傲得生物科技有限公司。

1.3 仪器 3111 型 CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),TS100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司),BD FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司),YXQ-LS-75SII 型数显立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司公司医疗仪器厂),Allegra 64R 型冷冻高速离心机(美国 Beckman 公司);Model 680 型酶标仪,PowerPac Basic 型电泳仪,Mini-PROTEAN Tetra C 型垂直电泳槽和 ChemiDoc XRS 型凝胶成像仪均为美国 Bio-Rad 公司产品。

2 方法

2.1 H9c2 细胞的培养 取冻存于液氮中的 H9c2 细胞,置 37°C 水浴中迅速解冻。将细胞转移至离心管,加入含 10% FBS 高糖的 DMEM 完全培养基 4

mL,充分混合,1 000 r·min⁻¹离心 5 min。沉淀用完全培养基 5 mL 重悬于 37 ℃,5% CO₂ 的条件下静置培养,第 2 天 24 h 后换液。细胞达到 80% 融合时,用胰蛋白酶消化传代。

2.2 建立 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型 取对数生长期的细胞,用完全培养基调整细胞密度至 8 × 10⁴ 个/mL,以每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板中,于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后,设空白组:加入空白 DMEM 培养基;不同浓度 H₂O₂ 模型组分别加入终浓度为 100,200,300,350,400 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂。H₂O₂ 作用 H9c2 心肌细胞 0.5 h 后,每孔加入 5 μL MTS 溶液孵育 3 h,然后用酶标仪检测 490 nm 波长处吸光度 A,并依据下式计算细胞存活率。每组设置 5 个复孔。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{样品组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.3 SGI 预处理对细胞存活率的影响 H9c2 心肌细胞按 2.2 项方法铺板,培养 24 h 后,设不同浓度的 SGI 组,以主要成分川芎嗪表征浓度,分别设 100,150,200,300,400,500 μmol·L⁻¹ 组,空白组和模型组(300 μmol·L⁻¹ H₂O₂)。各组培养 6 h 后,吸出药液,并用 100 μL DMEM 培养基洗涤细胞 2 次。给药组和模型组中每孔加入 100 μL H₂O₂。孵育 0.5 h 后,各组细胞均加 5 μL MTS 继续孵育 3 h。孵育完毕后于 490 nm 处检测吸光度 A。每组设置 5 个复孔,实验重复 3 次。

2.4 细胞形态观察 取对数生长期的细胞,调整细胞密度至 8 × 10⁴ 个/mL,以每孔 2 mL 接种于 6 孔培养板中,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后,设置低、中、高给药组(100,200,400 μmol·L⁻¹),空白组和模型组,以 2.3 项方法给药处理细胞;然后在倒置显微镜下观察细胞形态,并照相记录。

2.5 LDH 活性,MDA 含量及 SOD,GSH-Px,CAT 活力的测定 H9c2 心肌细胞按 2.2 项方法 96 孔细胞铺板,药物处理结束后,取培养基上清,按照 LDH 试剂盒说明书检测各组心肌细胞上清液中 LDH 的活性;取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,接种于 6 孔培养板中,培养 24 h 后加药处理。然后用含 0.5% 细胞裂解液的 PBS 缓冲液 600 μL 裂解细胞。分别取 200,200,50,100 μL 裂解物,用于 MDA,SOD,GSH-Px,CAT 和蛋白质的检测。MDA 含量及 SOD,GSH-Px,CAT 活性和蛋白质含量分别用 MDA,SOD,GSH-Px,CAT 和 BCA 试剂盒检测,按照说明书进行操作。

2.6 细胞内 ROS 含量和 MMP 的测定 取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,用完全培养基调整细胞密

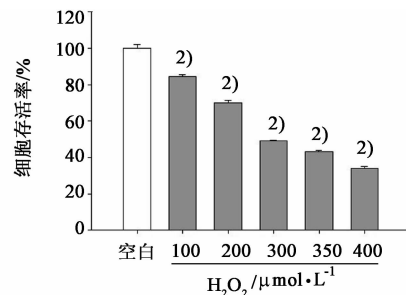
度至 7 × 10⁴ 个/mL,取 10 mL 接种于 100 mm 培养皿中,于 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 40 h。加药处理后,吸出液体,取 PBS 缓冲液 4 mL 润洗 2 遍,加胰酶消化液 1 mL 消化 100 s,再加入完全培养基 5 mL 重悬细胞,收集细胞待用,按照荧光探针 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)和 JC-1 检测试剂盒说明书,利用流式细胞术检测 ROS 含量和 MMP 水平。

2.7 Western blot 测定 Bcl-2,Bax 和 Caspase-3 蛋白 取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,接种于 100 mm 培养皿中,培养 40 h,加药处理。然后用预冷的 PBS 洗涤 3 次,RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30 min,离心取上清,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量总蛋白上样,SDS-PAGE 分离后,将蛋白转印至 PVDF 膜。用 5% 的 BSA 封闭 2 h,加入相应一抗,室温孵育 3 h。TBST 洗膜 3 次后,用相应二抗室温孵育 2 h。用 TBST 洗涤 3 次后,增强型化学发光试剂(ECL)显色。ChemiDoc XRS + 系统成像,Quantity One 软件灰度分析。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 H₂O₂ 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响 高浓度的 H₂O₂ 可引起 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤并降低心肌细胞的存活率。实验结果显示 100 ~ 400 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 作用 H9c2 细胞 0.5 h 后,可浓度依赖性地降低细胞存活率。300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 能使 H9c2 心肌细胞的存活率降低 45% ~ 50% ($P < 0.01$),细胞存活率降低程度适中,实验结果重复性好,因此选择 300 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 来建立氧化应激损伤模型。见图 1。



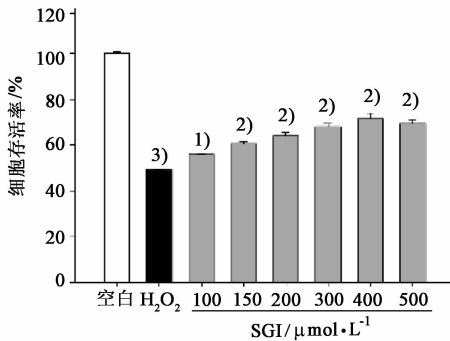
与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 1 H₂O₂ 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effect of H₂O₂ on survival of H9c2 cells ($\bar{x} \pm s$)

3.2 SGI 预处理对氧化损伤细胞存活率的影响 与模型组比较,100 ~ 500 μmol·L⁻¹ SGI 预处理

后,细胞存活率显著上升($P < 0.05, P < 0.01$)。由于在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下,细胞存活率较 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 根据有所下降,故给药组的低、中、高剂量分别为 $100, 200, 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图 2。



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与空白组比较³⁾ $P < 0.01$

图 2 SGI 预培养对 H_2O_2 诱导 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用影响

Fig. 2 Protective effect of SGI on H9c2 cells treated with H_2O_2

3.3 SGI 预处理对 H9c2 细胞形态的影响 空白组正常 H9c2 细胞呈梭形,排列规整,大小均一。 H_2O_2 ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 模型组细胞大小不规则,胞体皱缩,胞核增大。SGI (低、中、高) 预处理组细胞形态趋向正常,细胞皱缩变形减少。

3.4 SGI 预处理对 MDA 含量及上清液中 LDH 活性的影响 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用 H9c2 细胞 0.5 h 后,胞内脂质过氧化产物 MDA 显著增加($P < 0.01$),而 SGI 低、中、高剂量能明显降低胞内 MDA 的含量($P < 0.05, P < 0.01$),模型组的心肌细胞上清液中 LDH 活性明显升高($P < 0.01$),而 SGI 低、

中、高剂量能不同程度的降低氧化损伤后 H9c2 细胞上清液中 LDH 活性($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 SGI 预处理对氧化损伤 H9c2 细胞中 MDA 含量及上清液中 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of SGI pretreatment on contents of MDA and LDH activity in H9c2 cells treated with H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	1.31 ± 0.02	82.31 ± 3.40
模型	-	$2.08 \pm 0.03^{3)}$	$172.23 \pm 4.32^{3)}$
SGI	100	$1.89 \pm 0.04^{1)}$	$151.18 \pm 0.87^{1)}$
	200	$1.75 \pm 0.08^{2)}$	$142.25 \pm 0.95^{2)}$
	400	$1.54 \pm 0.02^{2)}$	$130.38 \pm 2.42^{2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与空白组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.5 SGI 预处理对 H9c2 细胞内 GSH-Px, CAT, SOD 活性, ROS 含量和 MMP 水平的影响 内源性的抗氧化酶 (CAT, GSH-Px, SOD) 通过清除过量的 ROS 使机体处于平衡状态,检测其酶活力及对应的 ROS 荧光强度反映对氧化损伤细胞的保护程度。由表 2 可知, H_2O_2 ($300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导 0.5 h 后,细胞内 ROS 含量明显升高($P < 0.01$), CAT, GSH-Px, SOD 的活性 ($P < 0.01$) 和 MMP 水平明显降低 ($5298 \pm 485, P < 0.01$)。而 SGI 低、中、高剂量能不同程度的升高胞浆内 CAT, GSH-Px, SOD 的活力 ($P < 0.05, P < 0.01$) 和 MMP 水平 ($P < 0.01$), 并降低 ROS 含量 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 SGI 预处理对氧化损伤 H9c2 细胞中 GSH-Px, CAT, SOD 活力 ROS 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of SGI pretreatment on activities of GSH-Px, SOD, CAT and content of ROS in H9c2 cells treated with H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

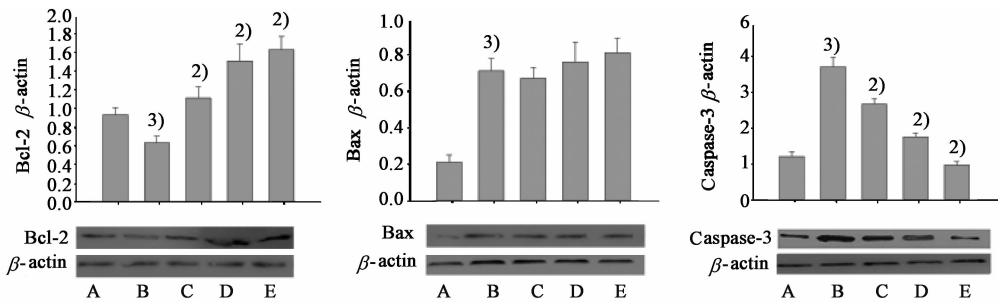
组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	荧光强度	
					ROS	MMP
空白	-	53.38 ± 4.41	45.45 ± 4.40	39.46 ± 2.40	989 ± 125	5298 ± 485
模型	-	$25.08 \pm 3.27^{3)}$	$21.21 \pm 2.51^{3)}$	$25.75 \pm 1.51^{3)}$	$26326 \pm 3134^{3)}$	$21059 \pm 2110^{3)}$
SGI	100	$28.89 \pm 2.54^{2)}$	$24.12 \pm 2.47^{2)}$	$27.10 \pm 1.27^{2)}$	$23234 \pm 3045^{2)}$	$18680 \pm 1762^{2)}$
	200	$35.75 \pm 2.68^{2)}$	$31.71 \pm 3.54^{2)}$	$28.51 \pm 1.54^{2)}$	$20347 \pm 2940^{2)}$	$14962 \pm 1556^{2)}$
	400	$45.54 \pm 2.72^{2)}$	$41.16 \pm 3.32^{2)}$	$30.08 \pm 1.42^{2)}$	$9439 \pm 1537^{2)}$	$10087 \pm 1368^{2)}$

3.6 SGI 预处理对 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 H_2O_2 能明显下调 Bcl-2 的表达,上调 Bax 和 Caspase-3 的表达。SGI 预处理后, H9c2 细胞中 Bcl-2 表达量明显高于 H_2O_2 组细胞 ($P < 0.01$)。Bax 的表达量在 SGI 组和 H_2O_2 组之间没有显著性差异,而 SGI 组的 Caspase-3 表达量明显低于 H_2O_2

组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3。

4 讨论

ROS 主要包括超氧阴离子 (O_2^-), H_2O_2 , 羟自由基 ($\text{OH} \cdot$) 等。 H_2O_2 可由体内氧化代谢反应产生,当 H_2O_2 浓度积累到一定程度,会造成细胞损伤^[8],在细胞培养基中添加 H_2O_2 ,所造成的损伤过程类似于



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与空白组比较³⁾ $P < 0.01$; A. 空白组; B. 模型组; C. SGI 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. SGI 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. SGI 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 3 SGI 预处理对氧化损伤 H9c2 细胞中 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of SGI pretreatment on expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 protein in H9c2 cells treated with H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

体内 ROS 导致细胞损伤的病例过程^[9], 具有细胞损伤形态学明显、可用药物对抗损伤且模型稳定等特点, 可较好地由细胞水平上研究药物抗氧化损伤的作用及相关机制。因此本实验采用 H_2O_2 建立 H9c2 细胞氧化损伤模型来探索 SGI 对抗氧化损伤作用及其相关机制。

MDA 是细胞或者机体内脂质过氧化的产物, 它能与蛋白质、氨基酸或者其他生物大分子作用, 最终改变磷脂结构, 使生物膜受到严重损害, 其含量可间接反映细胞脂质过氧化的程度。LDH 是一种糖酵解酶, 在正常生理条件下, 很少从正常细胞的胞浆中释放; 当细胞受到损伤时, LDH 便会从胞浆中释放出来, 其漏出量的多少间接的说明了细胞膜的损伤程度^[10]。实验结果表明, H9c2 细胞存活率与 H_2O_2 在一定范围内呈浓度依赖性, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 诱导氧化损伤使得 H9c2 细胞 MDA 含量的升高 (2.08 ± 0.03) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及上清液中的 LDH 活性明显增加 (172.23 ± 4.32) $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$, 其活性与 MDA 含量趋势一致, 表示细胞受到了一定程度的损伤。给予不同浓度的 SGI 预培养后, 损伤的细胞上清液中 LDH 活性明显降低, MDA 水平明显降低, 并且细胞存活率明显上升, 表明 SGI 能够明显降低 H_2O_2 导致的 H9c2 细胞氧化损伤的程度。

氧化应激是指机体氧化活性物质产生过多和 (或) 机体抗氧化能力减弱, ROS 清除不足, 导致 ROS 在体内增多, 破坏机体氧化/还原的正常平衡, 并引起细胞氧化损伤的过程^[11]。正常代谢过程中, ROS 可由外源和内源途径产生^[12], 导致 MMP 下降, 线粒体肿胀甚至崩解, 导致细胞能量代谢障碍, 细胞存活率下降^[13]。而越来越多的数据表明, 在心血管疾病的发生发展过程中, ROS 的生成和累积发挥了重要的作用^[9], 以至于过量的活性氧可直接发挥细

胞毒性作用损伤细胞。结果表明, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用 0.5 h 后, 与正常组比较, H9c2 细胞内 ROS 含量显著性上升 ($26\ 326 \pm 3\ 134$), 给予低、中、高 3 个浓度的 SGI 预处理后, ROS 含量减少并有显著性差异, 说明 SGI 预处理可拮抗 H_2O_2 导致的 ROS 含量升高。

通常情况下, 内源性抗氧化酶 (SOD, CAT, GSH-Px) 是防止氧化应激产生的心肌损伤的第一道防线, 这些内源性的抗氧化酶通过清除过量的 ROS 使机体处于平衡状态^[14], 其酶活性的高低反应了机体清除 ROS 的能力^[15-16]。本实验对 H9c2 细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 的活力进行了检测。实验结果表明, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用 0.5 h 后, H9c2 细胞内 SOD, GSH-Px, CAT 的活性明显下降, 说明 H9c2 细胞内清除 ROS 的能力受到显著抑制。给予不同浓度的 SGI 预培养后, 损伤的细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 的活性明显升高, 表明 SGI 能够明显的对抗 H_2O_2 对 H9c2 细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 活性的抑制, 提高细胞清除 ROS 的能力。实验结果提示, 增强内源性抗氧化酶的活性可能是 SGI 降低细胞内 ROS 含量的机制之一。

线粒体在心肌细胞凋亡中起着重要的作用^[17]。氧化应激等刺激因子能使线粒体膜完整性受到破坏, 导致凋亡诱导因子释放到细胞质, 引起 Caspase-3, Caspase-9 的活化, 引发细胞凋亡^[18]。Bcl-2 家族在线粒体膜的完整性的保持中扮演着重要的角色。Bcl-2 家族中的 Bax 蛋白能转位到线粒体表面, 增加线粒体通透性, 使得的 MMP 降低, 并导致促凋亡物质从线粒体释放到胞质中; 而 Bcl-2 可与 Bax 形成异二聚体, 阻止 Bax 转移到线粒体上, 从而拮抗 Bax 的促凋亡作用^[19]。实验结果发现, H_2O_2 模型组细胞的 MMP 显著下降, 并且 Bcl-2 表达下调, Bax 和

Caspase-3 表达上调,这些指标说明线粒体凋亡途径被活化。而在 SGI 作用下,除了 Bax 以外,上述指标得到了逆转。这表明 SGI 可通过抑制线粒体凋亡途径的激活,来拮抗 H_2O_2 对心肌细胞的损伤。

综上所述,利用了 H_2O_2 诱导的 H9c2 心肌细胞氧化损伤模型考察参芎葡萄糖注射液的抗氧化损伤作用。结果表明,参芎葡萄糖注射液可拮抗 H_2O_2 诱导的氧化损伤,其机制可能是:通过提高 H9c2 细胞内 SOD, CAT, GSH-Px 的活性,清除过量 ROS; 调节 Bcl-2 和 Caspase-3 的表达,维持线粒体完整性,从而抑制细胞凋亡。因实验内容缺乏体内实验的论证,结果具有一定的局限性,但实验结果为参芎葡萄糖注射液的进一步开发提供了理论基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准. 第12册[S]. 北京: 化学工业出版社, 2002:118.

[2] 徐国良, 李继红, 秦玲. 参芎注射液治疗冠心病心绞痛有效性及安全性的 Meta 分析[J]. 中国中医急症, 2012, 21(8):1272-1273.

[3] 崔冬梅. 参芎葡萄糖注射液治疗冠心病心绞痛临床观察[J]. 光明中医, 2008, 23(4):484-485.

[4] 卢统庆, 杨杰, 游陆, 等. 参芎葡萄糖注射液联合静脉溶栓对急性心肌梗死的疗效观察[J]. 牡丹江医学院学报, 2009, 29(4):49-51.

[5] 王姗姗, 熊辉. 参芎葡萄糖注射液对急性不完全性脑缺血的保护作用[J]. 中南药学, 2014, 12(6):541-543.

[6] Cheng X R, Zhang L, Hu J J, et al. Neuroprotective effects of tetramethylpyrazine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(5):438-443.

[7] 赵丽霞, 郭秀丽, 刘新泳. 川芎嗪烟酰胺对神经细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(6):420-423.

[8] 郑延松, 李源, 张珊红, 等. 用低浓度过氧化氢建立心肌细胞氧化损伤模型[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(20):1849-1851, 1854.

[9] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and

necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats [J]. Lab Invest, 1996, 74(1):86-107.

[10] 陈月婷, 李靖, 肖婷婷, 等. 基于中药血清药物化学及血清药理学方法探讨菝葜保护心肌细胞氧化损伤的物质基础[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2):158-162.

[11] Sies H, Cadenas E. Oxidative stress; damage to intact cells and organs [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1985, 311(1152):617-631.

[12] 韩苗苗, 王文飞, 刘铭瑶, 等. FGF-21 对 H_2O_2 诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 氧化应激损伤的保护作用[J]. 药学学报, 2014, 49(4):470-475.

[13] 方芳, 陈晓春, 朱元贵. MMP⁺ 诱导 SHSY5Y 细胞凋亡的可能机制 [R]. 中国神经科学杂志, 2002, 18(2):522-526.

[14] He H B, Xu J, Xu Y Q, et al. Cardioprotective effects of saponins from Panax japonicus on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140(1):73-82.

[15] 张建武, 闵冬雨, 周云, 等. 番茄红素对 H_2O_2 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, 2014, 20(12):160-164.

[16] 贺海波, 徐媛青, 魏娜, 等. 竹节参总皂苷对 H_2O_2 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.

[17] 高蒙蒙, 孙桂波, 司建勇, 等. 红车轴草总黄酮对 H_2O_2 诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2):201-207.

[18] Fan L H, Dang X Q, Shi Z B, et al. Hydroxysafflor yellow A protects PC12 cells against the apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation [J]. Cell Mol Neurobiol, 2011, 31(8):1187-1194.

[19] Harris M H, Thompson C B. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability [J]. Cell Death Differ, 2000, 7:1182-1191.

[责任编辑 周冰冰]