

# 人参四逆汤及其有效成分对戊巴比妥钠所致心肌细胞损伤模型的保护作用

李硕<sup>1</sup>, 苏萍<sup>2</sup>, 张广平<sup>2</sup>, 陈腾飞<sup>2</sup>, 马丽娜<sup>2</sup>, 李晗<sup>2</sup>, 侯红平<sup>2</sup>,  
张钟秀<sup>2</sup>, 杨依靠<sup>2</sup>, 高云航<sup>2</sup>, 宋玲<sup>2</sup>, 叶祖光<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116000;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100075)

**[摘要]** 目的:探讨人参四逆汤及其有效成分对戊巴比妥钠所致心肌细胞损伤的保护作用及其机制。方法:H9C2 细胞经传代培养后,分别给予人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 0.01,0.1,1 μmol·L<sup>-1</sup>,Re 0.01,0.1,1 μmol·L<sup>-1</sup>,异甘草素(isoliquiritigenin, ISL)20,40,80 μmol·L<sup>-1</sup>,甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)10,20,40 μmol·L<sup>-1</sup>,人参四逆汤 10,100,400 mg·L<sup>-1</sup>,作用 4 h,经 0.1% 的戊巴比妥钠作用 30 min 后,检测细胞存活率,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH),脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde, MDA),Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-三磷酸腺苷(ATP)酶,Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性,同时采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测过氧化物酶体增殖活化受体共激活因子-1α(peroxisome proliferative activated receptor, PGC-1α),B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3) mRNA 的表达情况。结果:人参四逆汤及其有效成分对心衰细胞模型有保护作用,与正常组比较,模型组细胞存活率显著下降,LDH,MDA 含量显著升高,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性升高,Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性显著降低,PGC-1α mRNA 表达下调,Bax,Caspase-3 mRNA 表达(P<0.01),证明模型成立。与模型组比较,各给药组显著升高细胞存活率,降低 LDH,MDA 含量,抑制 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性,提高 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性,上调 PGC-1α mRNA 表达,抑制 Bax,Caspase-3 mRNA 表达(P<0.05, P<0.01)。结论:人参四逆汤及其有效成分对心衰细胞模型有显著保护作用,且其作用机制与抗氧化,改善线粒体能量代谢,抑制线粒体凋亡途径有关。

**[关键词]** 心力衰竭; 人参四逆汤; 丙二醛(MDA); Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-三磷酸腺苷(ATP)酶; Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶; B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)01-0090-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190124

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181015.1719.007.html>

**[网络出版时间]** 2018-10-19 10:49

## Protective Effect of Renshen Sinitang and Its Active Ingredients on Myocardial Cell Injury Induced by Pentobarbital Sodium

LI Shuo<sup>1</sup>, SU Ping<sup>2</sup>, ZHANG Guang-ping<sup>2</sup>, CHEN Teng-fei<sup>2</sup>, MA Li-na<sup>2</sup>, LI Han<sup>2</sup>,  
HOU Hong-ping<sup>2</sup>, ZHANG Zhong-xiu<sup>2</sup>, YANG Yi-fei<sup>2</sup>, GAO Yun-hang<sup>2</sup>, SONG Ling<sup>2</sup>, YE Zu-guang<sup>2\*</sup>

(1. School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100075, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protective effect and mechanisms of Renshen Sinitang and its active ingredients on cardiomyocyte injury induced by pentobarbital sodium. **Method:** H9C2 cells were sub-cultured with

**[收稿日期]** 20180810(003)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004-003-002)

**[第一作者]** 李硕,在读硕士,从事中药药理毒理研究,E-mail:1137229804@qq.com

**[通信作者]** \*叶祖光,博士生导师,研究员,从事中药药理毒理研究,Tel: 010-84252805, E-mail:zgye@icmm.ac.cn

ginsenoside Rb<sub>2</sub> 0.01, 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 0.01, 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, isoliquiritigenin 20, 40, 80 μmol·L<sup>-1</sup>, glycyrrhetic acid 10, 20, 40 μmol·L<sup>-1</sup>, Renshen Sinitang, 10, 100, 400 mg·L<sup>-1</sup>, for 4 h. After treatment with 0.1% of sodium pentobarbital for 30 min, cell viability, lactate dehydrogenase (LDH), lipid peroxide malondialdehyde (MDA), Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-adenosine triphosphate (ATP) ase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the expressions of peroxisome proliferative activated receptor-1α (PGC-1α), B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax) and cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) mRNA. **Result:** Renshen Sinitang and its active ingredients have a protective effect on heart failure cell model. Compared with the normal group, the cell survival rate of the model group decreased significantly, while the LDH and MDA contents increased significantly, and the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity increased. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity was significantly decreased, PGC-1α mRNA expression was down-regulated, Bax and Caspase-3 mRNA expressions indicates the modeling (*P* < 0.01). Compared with the model group, each administration group showed a significantly increased cell viability, decreased LDH, MDA content, inhibited Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity, increased Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, up-regulated PGC-1α mRNA expression, and inhibited Bax and Caspase-3 mRNA expression (*P* < 0.05, *P* < 0.01). **Conclusion:** Renshen Sinitang and its active ingredients have a significant protective effect on heart failure cell model, and its mechanisms of action are related to anti-oxidation, improvement of mitochondrial energy metabolism and inhibition of mitochondrial apoptosis pathway.

[**Key words**] heart failure, Renshen Sinitang, malondialdehyde (MDA), Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-adenosine triphosphate (ATP) ase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax)

心力衰竭是一个多因素相互作用的复杂病理过程,其高发病、高致死率,对卫生组织造成了严重的临床经济负担<sup>[1]</sup>。近年来,国际上用于治疗心力衰竭的药物,大多以西药为主,但其有明显的不良反应<sup>[2]</sup>。而中医药着眼于整体辨证<sup>[3]</sup>,能够促进各脏器之间的功能恢复,调整内环境紊乱,降低不良反应,对心血管病的防治发挥了重要作用<sup>[4]</sup>。人参四逆汤源于医圣张仲景所著《伤寒论》,由人参、附子、干姜和炙甘草 4 味药材组成,具有回阳救逆,益气生津之功效。在现代临床上主要用于治疗心力衰竭、冠心病和休克<sup>[5]</sup>。

目前对于人参四逆汤的研究仍停留在探索中,已有研究报道四逆汤<sup>[6-8]</sup>和参附汤<sup>[9]</sup>可改善阿霉素所致心衰大鼠<sup>[10]</sup>的血流动力学,在体外实验中发现人参皂苷类单体成分 Rg<sub>1</sub>, Re, Rb<sub>1</sub> 可以通过调节 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-磷酸腺苷(ATP)酶, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性,进而保护戊巴比妥钠所致心衰细胞模型<sup>[11-12]</sup>。本课题组前期曾研究论证四逆汤及其组分配伍对心衰大鼠的影响,然而人参四逆汤保护心衰的物质基础和作用机制仍不明确。因此本文在现有的基础上,探求人参四逆汤及其主要药效物质对戊巴比妥钠所致心衰细胞保护作用的机制。

## 1 材料

1.1 细胞 心肌细胞 H9C2 来自本实验室贮存。

1.2 药物与试剂 人参四逆汤粉末(由淡附片 300 g,干姜 200 g,炙甘草 300 g,人参 150 g 组成,由中国中医科学院中药研究所化学室提供,批号 20171010),所有药材由中国中医科学院中药研究所叶祖光研究员鉴定为正品;人参皂苷 Rb<sub>2</sub>,人参皂苷 Re,异甘草素,甘草次酸(宝鸡市辰光生物科技有限公司,批号分别为 027160198, 027169198, 042235198, 042903198);MTS(美国 Promega 公司,批号 0000214826);乳酸脱氢酶(LDH),丙二醛(MDA),超微量 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶,超微量 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为 A020-2, A003-4, A070-2, A070-4);BCA 蛋白测定试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 SI126196);总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号为 R6408];逆转录试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为 L21011, M40517)。

1.3 仪器 FCH-1300 B 型负压超净工作台(亚泰科隆仪器技术有限公司),HERACELL 240i 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司),MF53 型相差倒置显微镜(德国 Leica 公司),SpectraMax iD5 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),480 II 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测仪(瑞士 Roche 公司),Centrifuge 5424 R 型低温冷冻离心机

(德国 Eppendorf 公司), AR 3130 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 H9C2 细胞培养** 通过前期药物及相应剂量的大量筛选,选取药物及浓度分别为 Rb<sub>2</sub> 0.01, 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 0.01, 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 异甘草素 20, 40, 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 甘草次酸 10, 20, 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参四逆汤 10, 100, 400 mg·L<sup>-1</sup>。使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养 H9C2 细胞,待细胞长至 90% 时使用无血清 DMEM 培养基饥饿培养 12 h,实验分为 3 组,空白组、模型组和给药组,其中空白和模型组加入无血清的 DMEM 培养基,给药组加入用无血清 DMEM 培养基配制的药物,在 CO<sub>2</sub> 恒温箱中孵育 4 h 后造模。

**2.2 戊巴比妥钠诱导 H9C2 细胞心衰模型建立** 根据文献[11]的方法加以改进,称取戊巴比妥钠粉末溶于无血清的 DMEM 培养基中,使其浓度为 0.1%,滤膜过滤后使用(现用现配)。将孵育好的 H9C2 细胞用 PBS 清洗 1 次,洗去残留药物后,除空白组外,其余各组均加入等体积的 0.1% 的戊巴比妥钠溶液,CO<sub>2</sub> 恒温箱中孵育 30 min,在显微镜下观察细胞核突兀,梭形心肌纤维变细或消失,部分心肌细胞逐渐缩成圆球状,少部分已成为漂浮死细胞,由此判定造模成功。

**2.3 对细胞损伤的保护作用** 以 8 × 10<sup>4</sup> 个/mL 密度接种于 96 孔板,待细胞长至 90% 时加入无血清 DMEM 培养基饥饿培养 12 h,实验分为 4 组,分别为调零孔(不加细胞其他操作同于空白组)、空白组、模型组、给药组,加入相应培养基/药物孵育 4 h,加入 0.1% 戊巴比妥钠溶液,每孔 100 μL,孵育 30 min,后快速吸取各孔上清液 20 μL 至新的 96 孔板中并严格按照试剂盒说明书测定 LDH。同时弃去原 96 孔板剩余的上清液后每孔加入 100 μL 无血清培养基,每孔再加入 MTS 溶液 20 μL(此过程避光操作),CO<sub>2</sub> 恒温箱中孵育 4 h 后,酶标仪 490 nm 测定吸光度 A 并计算细胞相对存活率。

**2.4 抗氧化实验** 以 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 密度接种于 6 孔板中,待细胞长至 90% 时加入无血清 DMEM 培养基饥饿培养 12 h,实验分为 3 组,调零孔(不加细胞其他操作同空白组)、空白组、模型组、给药组,加入相应培养基/药物孵育 4 h 后加入 0.1% 戊巴比妥钠溶液,每孔 2 mL,孵育 30 min。造模成功后弃去上清液,加入 1% 的 Triton-X100 溶液,每孔 400 μL,混匀静置 1 min,使用细胞刮将各孔细胞收集至

1.5 mL 离心管中,严格按照试剂盒说明书所述方法测定蛋白浓度及 MDA 含量。

**2.5 对心肌细胞能量代谢的影响** 操作过程同上述 2.4 项,此过程所用的 1% 的 Triton-X100 溶液使用生理盐水配制,严禁磷污染,严格按照试剂盒说明书所述方法测定蛋白浓度,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性。

**2.6 Real-time PCR 检测过氧化物酶体增殖活化受体共激活因子 1α (PGC-1α), Bax, Caspase-3 mRNA 的表达** 经过上述实验的结果分析筛选出最佳给药浓度进行 PCR 测定,分别为 Rb<sub>2</sub> 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 异甘草素 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 甘草次酸 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参四逆汤 400 mg·L<sup>-1</sup>。PCR 引物采用 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照,各引物序列见表 1。以 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 密度接种于 6 cm<sup>2</sup> 皿,细胞长至 90% 时,无血清 DMEM 培养基饥饿培养 12 h,设置组别为空白组、模型组、给药组,孵育 4 h 后造模 30 min,弃去上清液,加入 PBS 2 mL 后置于冰板上,通过总 RNA 提取,逆转录 cDNA,将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,逆转录条件为 42 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 20 min, PCR 扩增条件为 94 °C 30 s, 94 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。读取数值并计算,测定产物 ΔC<sub>t</sub> 值及 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 进行数据计算。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

名称	序列	片段长度 /bp
PGC-1α	上游 5'-ACGAAAGGCTCAAGAGGGACGAAT-3'	108
	下游 5'-CACGGCGCTCTTCAATTGCTTCT-3'	
Bax	上游 5'-GCAGACGGCAACTTCAACTG-3'	158
	下游 5'-TGGATCCAGACAACAGCCG-3'	
Caspase-3	上游 5'-TCAGAGCGGACTACTGCCGGA-3'	141
	下游 5'-CCACCGGTATCTTCTGGCAAGCC-3'	
β-actin	上游 5'-CATCTGCGCTCTGGACCTGG-3'	116
	下游 5'-TAATGTCACGCACGATTTC-3'	

**2.7 统计学方法** 所有数据采用 Graphpad prism 6.0 软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用 One-way ANOVA Tukey's 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 对心肌细胞损伤的保护、抗氧化作用** 与空白组比较,模型组心肌细胞存活率明显降低,LDH,MDA 水平显著升高(P < 0.01)。与模型组比较,

人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 各剂量组, 异甘草素 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 以及甘草次酸 20, 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参四逆汤各剂量组均能明显提高细胞存活率 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 各剂量组, 异甘草素 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 以及甘草次酸 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参四逆汤 10, 400 mg·L<sup>-1</sup> 组明显降低 LDH 含量, 对心衰细胞具有一定的保护作用 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 异甘草素 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 以及甘草次酸 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参四逆汤 10, 400 mg·L<sup>-1</sup> 组明显降低 MDA, 抗氧化作用明显 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 人参四逆汤及其有效成分对心衰细胞的保护、抗氧化作用的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Renshen Sinitang and its active ingredients on expressions of protection and antioxidant effects on model cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 /μmol·L <sup>-1</sup>	细胞存活率 /%	LDH /U·L <sup>-1</sup>	MDA /μmol·g <sup>-1</sup>
空白	-	100.00	14.60 ± 2.19	0.43 ± 0.17
模型	-	69.07 ± 4.97 <sup>1)</sup>	94.41 ± 15.09 <sup>1)</sup>	1.21 ± 0.31 <sup>1)</sup>
人参皂苷 Rb <sub>2</sub>	0.01	82.72 ± 17.38	77.43 ± 21.31	1.07 ± 0.20
	0.1	90.45 ± 16.79 <sup>2)</sup>	59.98 ± 13.97 <sup>2)</sup>	0.96 ± 0.26
	1	92.15 ± 21.23 <sup>3)</sup>	50.92 ± 10.32 <sup>3)</sup>	0.66 ± 0.38 <sup>2)</sup>
人参皂苷 Re	0.01	93.27 ± 9.01 <sup>3)</sup>	73.67 ± 24.21	1.03 ± 0.27
	0.1	95.08 ± 7.86 <sup>3)</sup>	65.57 ± 11.94	0.74 ± 0.20
	1	103.45 ± 6.85 <sup>3)</sup>	55.06 ± 7.80 <sup>3)</sup>	0.68 ± 0.01 <sup>2)</sup>
异甘草素	20	84.71 ± 10.25	51.27 ± 18.74 <sup>3)</sup>	1.14 ± 0.02
	40	86.64 ± 4.36	45.71 ± 6.54 <sup>3)</sup>	0.90 ± 0.53
	80	89.67 ± 5.34 <sup>2)</sup>	37.14 ± 12.71 <sup>3)</sup>	0.58 ± 0.30 <sup>2)</sup>
甘草次酸	10	79.92 ± 5.57	75.25 ± 17.33	1.08 ± 0.42
	20	94.59 ± 8.86 <sup>3)</sup>	62.00 ± 11.77 <sup>2)</sup>	0.85 ± 0.61
	40	95.72 ± 7.89 <sup>3)</sup>	54.37 ± 7.91 <sup>3)</sup>	0.55 ± 0.07 <sup>2)</sup>
人参四逆汤	10 <sup>4)</sup>	108.15 ± 12.72 <sup>3)</sup>	36.39 ± 15.07 <sup>3)</sup>	0.50 ± 0.20 <sup>2)</sup>
	100 <sup>4)</sup>	108.95 ± 13.36 <sup>3)</sup>	88.56 ± 12.36	0.62 ± 0.08
	400 <sup>4)</sup>	112.02 ± 11.90 <sup>3)</sup>	29.48 ± 6.34 <sup>3)</sup>	0.49 ± 0.08 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;<sup>4)</sup>表示单位 mg·L<sup>-1</sup>(表 3,4 同)。

3.2 对心肌细胞能量代谢的影响 与空白组比较, 模型组 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 0.01, 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 异甘草素 40, 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 甘草次酸各剂量组, 人参四逆汤 100, 400 mg·L<sup>-1</sup> 均能使 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性明显降低

( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与空白组比较, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 0.01, 0.1, 1 μmol·L<sup>-1</sup>, Re 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 异甘草素 40, 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 甘草次酸 20, 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参四逆汤 100, 400 mg·L<sup>-1</sup> 均能升高 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 人参四逆汤及其有效成分对心肌细胞损伤细胞 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Renshen Sinitang and its active ingredients on expressions of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 /μmol·L <sup>-1</sup>	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶	Ca <sup>2+</sup> -ATP 酶
空白	-	4.49 ± 0.34	1.45 ± 0.23
模型	-	6.07 ± 0.15 <sup>1)</sup>	1.07 ± 0.16 <sup>1)</sup>
人参皂苷 Rb <sub>2</sub>	0.01	5.18 ± 0.23 <sup>2)</sup>	1.33 ± 0.01 <sup>2)</sup>
	0.1	3.86 ± 0.09 <sup>3)</sup>	1.36 ± 0.02 <sup>3)</sup>
	1	3.69 ± 0.83 <sup>3)</sup>	1.33 ± 0.11 <sup>2)</sup>
人参皂苷 Re	0.01	5.49 ± 0.12	1.23 ± 0.04
	0.1	4.49 ± 0.85 <sup>3)</sup>	1.29 ± 0.09
异甘草素	20	3.79 ± 0.21 <sup>3)</sup>	1.30 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	40	5.39 ± 0.36	1.10 ± 0.07
	80	5.14 ± 0.42 <sup>2)</sup>	1.33 ± 0.10 <sup>2)</sup>
甘草次酸	10	4.75 ± 0.69 <sup>3)</sup>	1.39 ± 0.05 <sup>3)</sup>
	20	5.18 ± 0.35 <sup>2)</sup>	1.24 ± 0.12
	40	5.14 ± 0.32 <sup>2)</sup>	1.31 ± 0.06 <sup>2)</sup>
人参四逆汤	10 <sup>4)</sup>	5.01 ± 0.03 <sup>3)</sup>	1.54 ± 0.07 <sup>3)</sup>
	100 <sup>4)</sup>	5.87 ± 0.39	1.18 ± 0.01
	400 <sup>4)</sup>	5.11 ± 0.19 <sup>3)</sup>	1.48 ± 0.10 <sup>3)</sup>
		5.11 ± 0.03 <sup>3)</sup>	1.51 ± 0.02 <sup>3)</sup>

3.3 对心肌细胞损伤细胞 PGC-1α, Bax, Caspase-3 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 模型组 PGC-1α 表达显著减少, Bax 和 Caspase-3 表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 人参皂苷 Rb<sub>2</sub> 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参皂苷 Re 1 μmol·L<sup>-1</sup>, 异甘草素 80 μmol·L<sup>-1</sup>, 甘草次酸 40 μmol·L<sup>-1</sup>, 人参四逆汤 400 μg·mL<sup>-1</sup> 均能使 PGC-1α 表达增加, Bax 和 Caspase-3 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 4。

#### 4 讨论

中药对疾病的治疗作用, 主要依赖于其中的活性物质所表现出来的多靶点、多途径整合作用, 即对机体中多个代谢通路同时进行调节以发挥综合治疗作用<sup>[13-15]</sup>。人参四逆汤有效成分复杂, 徐雅娟等<sup>[16]</sup>

表 4 参四逆汤及其有效成分对心肌细胞损伤细胞 PGC-1 $\alpha$ , Bax, Caspase-3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of Renshen Sinitang and its active ingredients on expressions of PGC-1 $\alpha$ , Bax, Caspase-3 mRNA ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PGC-1 $\alpha$	Bax	Caspase-3
空白	-	1.00 $\pm$ 0.04	1.02 $\pm$ 0.51	1.01 $\pm$ 0.32
模型	-	0.42 $\pm$ 0.23 <sup>1)</sup>	2.05 $\pm$ 0.57 <sup>1)</sup>	2.91 $\pm$ 1.78 <sup>1)</sup>
人参皂苷 Rb <sub>2</sub>	1	0.81 $\pm$ 0.47 <sup>2)</sup>	1.32 $\pm$ 0.51 <sup>2)</sup>	1.36 $\pm$ 0.55 <sup>2)</sup>
人参皂苷 Re	1	0.89 $\pm$ 0.22 <sup>3)</sup>	1.08 $\pm$ 0.42 <sup>3)</sup>	1.22 $\pm$ 0.46 <sup>3)</sup>
异甘草素	80	0.77 $\pm$ 0.35 <sup>2)</sup>	1.34 $\pm$ 0.41 <sup>2)</sup>	1.51 $\pm$ 0.24
甘草次酸	40	0.82 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	1.27 $\pm$ 0.38 <sup>3)</sup>	1.37 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>
人参四逆汤	400 <sup>4)</sup>	0.74 $\pm$ 0.20 <sup>2)</sup>	1.31 $\pm$ 0.44 <sup>3)</sup>	1.47 $\pm$ 0.43 <sup>2)</sup>

利用 ESI/MS、MALDI-TOF/MS 等技术,结合硅胶色谱柱对人参四逆汤进行了提取分离,鉴定出多种药效成分,为其机制研究提供了科学依据。通过前期对复方及其有效组分单体的大批量筛选,选取提高心衰细胞存活率相对较大的几组药物进行后续机制实验。故最终选取的药物有人参四逆汤以及人参皂苷 Rb<sub>2</sub>, Re, 异甘草素, 甘草次酸。

根据对心力衰竭的机制研究,有研究者认为心力衰竭可能与线粒体能量代谢异常有关。心脏仅占体重的 0.5% 左右,然而却占 ATP 消耗量的 8%<sup>[17]</sup>。本实验测量的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶是线粒体维持细胞内外离子平衡的重要酶。Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶位于细胞膜上,功能是把排出细胞内的 Na<sup>+</sup>, 吸收细胞外的 K<sup>+</sup>, 维持细胞内外 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 浓度平衡<sup>[18-19]</sup>。Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶是组成心肌肌浆网的主要蛋白成分,作用是调节细胞内 Ca<sup>2+</sup> 平衡,可将胞浆内游离的 Ca<sup>2+</sup> 主动转出细胞外或转入细胞内肌浆网 Ca<sup>2+</sup> 贮库,防止细胞 Ca<sup>2+</sup> 超载<sup>[20]</sup>。本实验通过戊巴比妥钠刺激细胞造成心衰模型,使细胞内 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性升高, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性降低,破坏细胞内外离子平衡,从而导致心肌能量代谢异常。人参四逆汤以及其组分人参皂苷 Rb<sub>2</sub>, Re, 异甘草素, 甘草次酸均能调节 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶,改善异常的能量代谢。

细胞凋亡在心力衰竭和心肌梗死等心血管疾病中发挥着关键作用,少量的心肌细胞凋亡都对心肌产生显著影响<sup>[21]</sup>。Bcl-2 家族成员在细胞凋亡中起重要调控作用,其中 Bax 是主要的促进凋亡因子。细胞凋亡后期的共同途径一般都是激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteinyl aspartate specific

proteinase, Caspase), 其中 Caspase-3 在细胞凋亡的过程中起着关键性的作用。PGC-1 $\alpha$  在能量代谢平衡中发挥至关重要的作用<sup>[22]</sup>, 具有调控线粒体生物功能和代谢的能力<sup>[23]</sup>。本实验中心衰细胞的 PGC-1 $\alpha$  下调, Bax, Caspase-3 均上调, 说明心衰细胞线粒体能量代谢异常且发生凋亡, 给药后, 人参四逆汤, 人参皂苷 Rb<sub>2</sub>, Re, 异甘草素, 甘草次酸组均不同程度上调 PGC-1 $\alpha$ , 下调 Bax, Caspase-3, 从而增加线粒体产能, 抑制凋亡。

本实验结果证明人参四逆汤复方及其有效成分人参皂苷 Rb<sub>2</sub>, Re, 异甘草素, 甘草次酸对戊巴比妥钠所致心衰细胞均有保护作用, 其保护作用机制主要有降低心衰细胞内脂质过氧化物丙二醛含量, 增强抗氧化作用; 降低心衰细胞 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性同时升高 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性, 调节细胞内外离子稳态; 上调 PGC-1 $\alpha$  表达, 增加线粒体产能, 改善能量代谢异常; 下调 Bax, Caspase-3 表达, 抑制心衰细胞凋亡。

[参考文献]

[1] Brown D A, Perry J B, Allen M E, et al. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(4): 238-250.

[2] 孟永梅, 王伟, 叶会玲. 慢性心力衰竭的中医研究概况 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(3): 670-674.

[3] 蒋梅先. 浅谈慢性心力衰竭防治中的中医药加载治疗 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(8): 1553-1555.

[4] LI X L, ZHANG J, HUANG J, et al. A multicenter randomized double-blind parallel-group placebo-controlled study of the effects of Qiliqiangxin capsules in patients with chronic heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(12): 1065-1072.

[5] 杨海润, 孙建宁, 张广平, 等. 四逆汤组方不同配伍毒效关系研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 266-269.

[6] 贺金, 方艳伟, 李永民. 四逆汤对大鼠心肌缺血损伤的保护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 2(7): 638-640.

[7] 翟建英, 靳冉, 朱晓光, 等. 四逆汤及其组分配伍对心力衰竭大鼠血流动力学的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(12): 1480-1482.

[8] 缪萍, 裘福荣, 曾金, 等. 四逆汤及其不同配伍方对心力衰竭大鼠的保护作用及机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 138-142.

[9] 王雪梅, 刘佳, 付殿斌, 等. 参附汤萃取液成分对阿霉素致心衰大鼠血流动力学、心肌自噬及凋亡的影响

- [J]. 陕西中医学院学报, 2014, 37(4): 75-78.
- [10] 李梦婷, 彭成, 谢晓芳. 心力衰竭小型动物模型研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 213-219.
- [11] 谢晓芳, 徐菲菲, 彭成, 等. 人参皂苷类成分对戊巴比妥钠损伤心肌细胞 ATP 酶及相关离子的影响 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 61-64.
- [12] 贺抒, 谢晓芳, 张雪, 等. 附子水溶性生物碱对心衰细胞模型的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 127-130.
- [13] LU X, XIONG Z, LI J, et al. Metabonomic study on 'Kidney-Yang deficiency syndrome and intervention effects of Rhizoma Drynariae extracts in rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. Talanta, 2011, 83(3): 700-708.
- [14] YANG M, CHEN J L, XU L W, et al. Navigating traditional Chinese medicine network pharmacology and computational tools [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, doi:10.1155/2013/731969.
- [15] CHEN R, Moriya J, Yamakawa J, et al. Traditional Chinese medicine for chronic fatigue syndrome [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2010, 7(1): 3-10.
- [16] 徐雅娟, 赵宏峰, 司云珊, 等. 人参四逆汤活性成分的分离和鉴定 [J]. 中草药, 2002, 33(3): 203-204.
- [17] Tornroth-Horsefield S, Neutze R. Opening and closing the metabolite gate [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(50): 19565-19566.
- [18] 沈放, 杨黎江, 路斌, 等. 海枫藤提取物对  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1959-1960.
- [19] 徐菲菲, 彭成, 谢晓芳, 等. 参附注射液对戊巴比妥钠致心衰模型心肌细胞膜 ATP 酶和相关离子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 196-199.
- [20] 胡元会, 车维新, 曹雪滨, 等. 心复康口服液对大鼠实验心衰模型心肌细胞  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$  酶及琥珀酸脱氢酶活性的影响 [J]. 中国医药学报, 2000, 15(2): 31.
- [21] 李超, 伏圣博, 刘华玲, 等. 细胞凋亡研究进展 [J]. 世界科技研究与发展, 2007, 29(3): 45-53.
- [22] 张晓华, 刘淑荣, 钱锋, 等. 强心康颗粒对慢性心衰大鼠心肌细胞病理形态学腺苷酸转位酶, PGC-1 $\alpha$  mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 121-126.
- [23] Arany Z, Novikov M, Chin S, et al. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(26): 10086-10091.

[责任编辑 周冰冰]