

● 实验研究 ●

引用:汤润,张娟,马悦,梁盼,任维,杨思进. 蛭龙活血通瘀胶囊对 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤的保护作用研究[J]. 湖南中医杂志,2021,37(4):150-153.

蛭龙活血通瘀胶囊对 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤的保护作用研究

汤 润¹,张 娟¹,马 悦²,梁 盼²,任 维^{1,2},杨思进^{1,2}

(1. 西南医科大学,四川 泸州,646000;

2. 西南医科大学附属中医医院,四川 泸州,646000)

[摘要] 目的:探讨蛭龙活血通瘀胶囊(以下简称“ZL”)对 H_2O_2 诱导细胞氧化损伤的保护作用。方法:以正常 H9C2 心肌细胞、PC12 细胞作为对照,分别以不同浓度的 H_2O_2 处理细胞 4 h,建立氧化损伤模型;在 H_2O_2 处理细胞前用 ZL 预处理 24 h,作为 ZL 药物组,采用 CCK-8 法检测以上各组细胞存活率。结果:与未经 H_2O_2 处理的细胞比较,400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理的 H9C2 心肌细胞存活率下降至 $(47.25 \pm 4.14)\%$ ($P < 0.01$);600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理的 PC12 细胞存活率下降至 $(52.53 \pm 4.31)\%$ ($P < 0.01$);经 10~320 mg/ml 的 ZL 预处理后,H9C2 心肌细胞、PC12 细胞的存活率均高于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论:ZL 对 H_2O_2 诱导的 H9C2 心肌细胞、PC12 细胞氧化损伤有保护效果。

[关键词] 蛭龙活血通瘀胶囊; H_2O_2 诱导的氧化损伤;H9C2 心肌细胞;PC12 细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.04.056

Protective effect of Zhilong Huoxue Tongyu capsules against H_2O_2 -induced oxidative injury in cells

TANG Run¹,ZHANG Juan¹,MA Yue²,LIANG Pan²,REN Wei^{1,2},YANG Sijin^{1,2}

(1. Southwest Medical University,Luzhou 646000,Sichuan,China;

2. The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University,Luzhou 646000,Sichuan,China)

[Abstract] Objective:To investigate the protective effect of Zhilong Huoxue Tongyu capsules (hereinafter referred to as ZL) against H_2O_2 -induced oxidative injury in cells. Methods:With normal H9C2 cardiomyocytes and PC12 cells as a control,the cells were treated with different concentrations of H_2O_2 for 4 hours to establish a model of oxidative injury. The cells pretreated with ZL for 24 hours before H_2O_2 treatment were established as ZL group, and CCK-8 assay was used to measure cell viability in each group. Results:Compared with the cells not treated by H_2O_2 ,H9C2 cardiomyocytes treated with 400 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 had the cell viability reduced to $47.25\% \pm 4.14\%$ ($P < 0.01$),and PC12 cells treated with 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 had the cell viability reduced to $52.53\% \pm 4.31\%$ ($P < 0.01$). The H9C2 cardiomyocytes and PC12 cells pretreated with 10~320 mg/ml ZL had significantly higher cell viability than the model group ($P < 0.05$). Conclusion:ZL exerts a protective effect against H_2O_2 -induced oxidative injury in H9C2 cardiomyocytes and PC12 cells.

[Keywords] Zhilong Huoxue Tongyu capsules; H_2O_2 -induced oxidative injury;H9C2 cardiomyocyte;PC12 cell

心脑血管疾病已经成为危害人类健康的重大疾病之一。《<中国心血管病报告 2018>概要》^[1]指出,心血管病

病死率居我国居民死因排名的首位,高于肿瘤及其他疾病,推算心血管病现患人数 2.9 亿,其中脑卒中 1300 万,冠

基金项目:四川省科技厅项目(2018SZ0060);四川大学-泸州市人民政府战略合作项目(2018CDLZ-12);西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合项目(2018XYLE-005);四川省泸州市科技局项目(2019YFS0543)

第一作者:汤润,女,2018 级硕士研究生,研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病

通讯作者:杨思进,男,教授,主任中医师,博士研究生导师,研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病,E-mail:ysjimm@sina.com

心病1100万,心力衰竭450万。心脑血管疾病发病机制复杂,而氧化应激导致的细胞损伤及凋亡是多种心脑血管疾病发生的共同病理生理机制^[2-3]。其中过氧化氢(H₂O₂)是活性氧(ROS)家族中的一员,可催化氧化还原反应,并能与超氧自由基结合形成分子氧和羟基自由基,是介导氧化应激的重要因素^[4]。中医药作为天然的抗氧化剂,可通过清除氧自由基、介导抗氧化相关酶的激活等方式发挥作用^[5-6]。

蛭龙活血通瘀胶囊(以下简称“ZL”)是基于中医玄府理论“清心开玄,息风通络”的治疗原则,自主创新研发的纯中药复方制剂(国家发明专利号:200810147774.1)^[7]。临床上该药对心绞痛、心力衰竭、冠心病、脑卒中、血管认知障碍等心脑血管疾病的预防与治疗效果显著,年均治愈及好转患者20万余人,总受益患者300万余人^[8-12]。现代药理学研究表明,ZL可增强血管性痴呆大鼠模型,氧自由基清除剂超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性,减少脂质过氧化损伤中间代谢产物丙二醛(MDA)形成,抑制氧化应激对海马神经元的损伤及其诱导神经元的凋亡,具有抗氧化损伤作用^[13]。

本研究采用H9C2心肌细胞和PC12细胞为研究对象,以H₂O₂为诱导损伤因素,建立体外模拟H₂O₂损伤诱导的细胞氧化应激模型,探讨ZL对受损H9C2心肌细胞、PC12细胞的保护作用,为ZL临床治疗心脑血管疾病提供理论依据。

1 实验材料

1.1 药物 蛭龙活血通瘀胶囊处方药材:桂枝、黄芪、水蛭、地龙(成都仁济宏药业有限公司,批号:190801、190802、190401、19030),大血藤(四川金方生物医药科技有限公司,批号:190402)。

1.2 细胞 H9C2心肌细胞(上海中国科学院细胞库);PC12细胞(西南医科大学中西医结合中心实验室馈赠)。

1.3 试剂 新生胎牛血清(美国Gibco公司);胰酶(以色列Biological Industries公司);DMEM高糖培养基、青链霉素双抗液(科阳生物科技有限公司);CCK-8试剂(重庆健柏生物技术有限公司);H₂O₂等其他试剂均为国产分析纯。

2 实验方法

2.1 药液制备 水蛭、桂枝粉碎成细粉;黄芪、大血藤、地龙加12倍水,浸泡30 min,煎煮3次,每次30 min;滤过,合并滤液,浓缩,80℃烘干;加入水蛭、桂枝细粉,粉碎混匀得ZL粉末备用。依次分别取10、20、40、80、160、320 mg ZL粉末,分别加入1 ml DMSO作为母液备用。10、20、40、80、160、320 mg/L ZL药液配制:依次取10 μl母液,分别加入9.99 ml培养基,混匀,0.22 μm滤膜滤过即得。

2.2 H₂O₂溶液配制 取9.99 ml培养基加入10 μl 0.88 mol/L H₂O₂溶液,充分混匀,得到0.88 mmol/L母液,备用。取0.99、0.68、0.45、0.23、0.11、0.057 ml的H₂O₂母液,分别加入0.01、0.32、0.55、0.77、0.89、0.943 ml的培养

液(不含胎牛血清和青链霉素双抗),充分混匀,得到800、600、400、200、100、50 μmol/L H₂O₂溶液,0.22 μm滤膜滤过,即用即配。

2.3 H9C2、PC12细胞培养 细胞常规培养于含DMEM、10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的完全培养基中,于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,当细胞密度达80%~90%时,以0.25%胰酶消化传代。

2.4 CCK-8法筛选H9C2、PC12细胞给药浓度 选对数生长期细胞刺激分化后,以每孔7×10³个细胞接种于96孔培养板中,培养24 h后,弃去原培养基,在96孔板中依次加入100 μl浓度为10、20、40、80、160、320 mg/L的ZL溶液,另设不加ZL药液的对照组、不加细胞悬液空白组,各组设6个副孔,培养24 h后,加入10 μl CCK-8试剂,孵育2 h,用全自动酶标仪于450 nm检测波长处检测吸光度A。计算细胞存活率。细胞存活率=(A_{药物组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%。

2.5 H₂O₂损伤H9C2、PC12细胞模型的建立 调整细胞浓度至8×10³个/L种入96孔板,培养24 h后,吸去原培养基,加入不同浓度的H₂O₂(0、50、100、200、400、600、800 μmol/L)溶液进行损伤造模,设6个副孔,4 h后加入10 μl CCK-8试剂,培养箱内继续孵育2 h,用酶标仪检测波长450 nm时的吸光度A值,计算细胞的存活率。

2.6 不同浓度药物对H₂O₂损伤H9C2、PC12细胞模型的保护作用 以每孔7×10³个/L种入96孔板,培养24 h后,吸去原培养基,在96孔板中加入100 μl不同浓度的ZL药液(10、20、40、80、160、320 mg/L),继续培养24 h后,加入H₂O₂损伤造模最佳浓度损伤,不加ZL药液组为模型组,不干预组作为空白及对照组,共8组,各组均设置6个副孔,4 h后每孔加入10 μl CCK-8试剂,2 h后用酶标仪检测波长为450 nm时的吸光度A值,计算细胞存活率。

3 实验结果

3.1 H9C2心肌细胞、PC12细胞的药物毒性检测 在0~320 mg/L浓度范围内,随着ZL药液浓度的增加,细胞活力无明显减弱,表明ZL对H9C2心肌细胞、PC12细胞无明显毒副作用。(见图1、2)

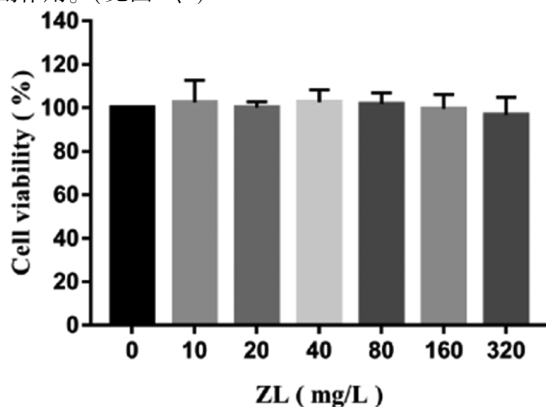


图1 不同浓度ZL溶液对H9C2细胞活力的影响

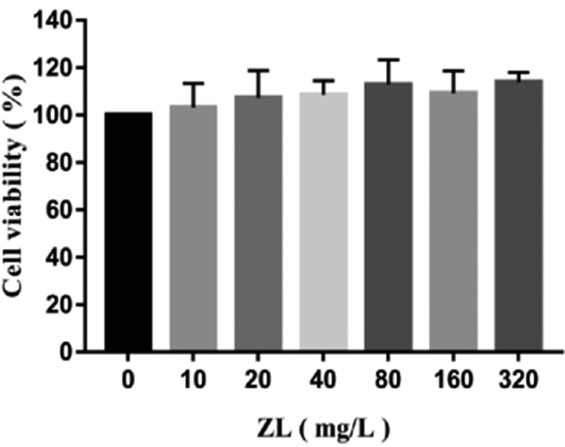


图 2 不同浓度 ZL 溶液对 PC12 细胞活力的影响

3.2 H₂O₂ 溶液损伤造模浓度的筛选 与不加 H₂O₂ 溶液的对照组比较,随着 H₂O₂ 处理浓度的增加,H9C2 心肌细胞与 PC12 细胞活力均逐渐降低;400 μmol/L H₂O₂ 处理 H9C2 心肌细胞时,细胞存活率为 47.25 %;600 μmol/L H₂O₂ 处理 PC12 细胞时,细胞存活率为 52.53 %。以上浓度能体现 H₂O₂ 的氧化应激损伤和适当的细胞死亡率,故分别选取 400、600 μmol/L 为造模浓度。(见表 1)

表 1 不同浓度 H₂O₂ 溶液对 H9C2、PC12 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别		H ₂ O ₂ 浓度 (μmol/L)	吸光度 A	细胞存活率 (%)
H9C2	空白组	-	0.156±0.031	-
	对照组	0	1.006±0.458	100.00
	H ₂ O ₂ 组	50	0.987±0.297	97.96±4.71
		100	0.911±0.457	88.85±3.02 ^a
		200	0.775±0.685	72.97±8.44 ^b
		400	0.557±0.317	47.25±4.14 ^a
		600	0.411±0.407	30.00±4.43 ^a
		800	0.243±0.009	10.29±1.51 ^a
PC12	空白组	-	0.146±0.006	-
	对照组	0	0.952±0.044	100.00
	H ₂ O ₂ 组	50	0.843±0.573	86.46±5.25 ^a
		100	0.817±0.657	83.20±5.84 ^a
		200	0.725±0.612	74.68±4.54 ^a
		400	0.626±0.341	61.75±5.67 ^a
		600	0.569±0.383	52.53±4.31 ^a
		800	0.347±0.715	25.50±6.59 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$ 。

3.3 ZL 对 H9C2 心肌细胞、PC12 细胞氧化损伤的保护作用 与空白组比较,模型组细胞活力明显减弱;与模型组比较,ZL 药物预处理组中的细胞活力明显增强,且结果表明 ZL 对氧化应激损伤的 H9C2 心肌细胞及 PC12 细胞具有剂量依赖性保护作用。(见表 2)

表 2 不同浓度 ZL 溶液对 H9C2 细胞、PC12 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别		ZL 浓度 (μmol/L)	吸光度 A	细胞存活率 (%)
H9C2	空白组	-	0.934±0.061	100.00
	模型组	0	0.506±0.045	44.23±4.00 ^a
	ZL 组	10	0.528±0.073	47.05±7.32 ^b
		20	0.616±0.046	58.89±6.28 ^b
		40	0.653±0.063	63.87±10.97 ^b
		80	0.675±0.085	66.95±15.50 ^b
		160	0.741±0.058	75.57±11.61 ^b
		320	0.799±0.053	83.27±12.48 ^b
PC12	空白组	-	1.015±0.050	100.00
	模型组	0	0.578±0.028	49.31±3.01 ^a
	ZL 组	10	0.618±0.023	53.93±1.95
		20	0.706±0.022	64.32±4.11 ^b
		40	0.716±0.035	65.26±2.99 ^b
		80	0.796±0.037	74.67±3.69 ^b
		160	0.860±0.070	81.95±4.42 ^b
		320	0.958±0.043	93.5±4.82 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

4 讨 论

炎症、氧化应激、缺血、缺氧等都是心血管疾病的发病机制,其中氧化应激是导致多种心血管疾病发展的主要危险因素之一^[4],外源性抗氧化剂治疗被建议为氧化应激和心血管疾病的治疗方法^[14]。ZL 已在临床上应用于治疗心血管疾病十余年,具有益气祛风、活血通络的功效,方中黄芪为君,重用补气,兼鼓舞阳气、推动气血运行;水蛭、地龙为臣,搜剔经络、筋骨之顽痰瘀血;辅以大血藤活血、祛风、通络;桂枝为佐药,温通经脉,兼引药入经。全方刚柔并济,调畅气血,化瘀通络,起到攻补兼施之效。药理学研究表明,黄芪含有黄芪多糖、黄芪皂苷、黄酮类等多种有效成分,在抗氧化应激方面具有明显作用,研究表明黄芪甲苷 IV 可显著降低 H₂O₂ 诱导的氧化损伤指数,调节 MDA、还原型辅酶 II(NADPH)氧化酶活性及线粒体活性氧(ROS)水平^[15],毛蕊异黄酮可增加抗氧化应激酶 SOD 的含量并减少脂类氧化应激标记物 MDA 的产生,减轻氧化应激反应^[16]。异鼠李素、黄芪多糖、黄芪甲苷均可降低 ROS 水平,抑制氧化损伤^[17-19]。

ROS 是参与多种细胞信号转导的重要二级信使,由抗氧化剂控制,ROS 的过量蓄积会导致氧化应激,从而引发细胞死亡和不可逆的组织损伤^[20]。在多种 ROS 中,H₂O₂ 因其较长的半衰期和扩散距离对氧化还原信号最为丰富和关键^[21],是导致细胞凋亡和组织损伤的关键致病机制。本研究结果显示,当 H₂O₂ 浓度分别在 400、600 μmol/L,损伤时间在 4 h 时,H9C2 心肌细胞、PC12 细胞存活率分别下降至 47%、52%左右,故分别选此浓度作为造模损伤浓度;与模型

组比较,ZL药物组 H9C2 心肌细胞、PC12 分化的神经细胞存活率明显升高,镜下观察细胞活力增加,表明 ZL 可以减轻心肌细胞及神经细胞的损伤,对 H₂O₂ 所致氧化损伤具有一定的保护作用。

综上所述,ZL 对 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞、PC12 细胞损伤具有一定的保护作用,需要进一步探讨作用机制,同时建立了不同浓度的 H₂O₂ 诱导 H9C2 心肌细胞、PC12 细胞氧化损伤的模型,希望为心脑血管疾病氧化损伤机制研究提供参考。

参考文献

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] 刘翀,沈珈迪,韦铁民,等.睡眠呼吸暂停患者氧化应激与动脉粥样硬化及心脑血管事件的关系[J]. 中国慢性病预防与控制,2020,28(1):53-57.
- [3] 程小欢,袁佳仪,荣伽玲,等.老年心肺慢性疾病中氧化应激指标的变化差异分析[J]. 临床血液学杂志(输血与检验),2020,33(3):402-406.
- [4] TAVERNE YJHJ, BOGERS AJJC, DUNCKER DJ, et al. Reactive oxygen species and the cardiovascular system[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2013(2013):862423.
- [5] SAMADARSI R, DUTTA D. Anti-oxidative effect of mangiferin-chitosan nanoparticles on oxidative stress-induced renal cells[J]. J International Journal of Biological Macromolecules,2020,151(5):36-46.
- [6] 王晓燕,花宝金,李卫东.芍药汤激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路抗氧化损伤的体外效应机制[J]. 中华中医药学刊,2020,38(12):94-99.
- [7] 王明杰,黄淑芬.风药增效论[J]. 新中医,2006,38(1):1-4.
- [8] 李洋,刘炳,白雪,等.益气祛风通络法对冠心病 PCI 术后患者血管炎性反应和内皮功能的影响[J]. 广州中医药大学学报,2020,37(2):200-206.
- [9] 胡珊珊,董丽,白雪,等.蛭龙活血通瘀胶囊对心梗后心衰临床疗效的观察[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(24):118-119.
- [10] 江玉,王明杰,潘洪,等.蛭龙活血胶囊治疗不稳定型心绞痛的疗效及对血管内皮功能和血小板功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(24):305-309.
- [11] 张德绸,葛建华,白雪,等.蛭龙活血通瘀胶囊对 ICSVD 合并 VCI 临床疗效观察[J]. 西南医科大学学报,2019,42(6):542-545.
- [12] 李双阳,王凌雪,白雪.蛭龙活血通瘀胶囊对急性缺血性脑卒中患者血小板参数的影响[J]. 中国中医药现代远程教育,2019,17(7):68-71.
- [13] 李卫萍,尹思源,陈晓琴,等.蛭龙活血通瘀胶囊对血管性痴呆大鼠氧化应激损伤的保护[J]. 泸州医学院学报,2011,34(2):130-133.
- [14] BAE S, PARK M, KANG C, et al. Hydrogen peroxide-responsive

nanoparticle reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Journal of the American Heart Association,2016,5(11):e003697.

- [15] 陈宇琼,孙东岳,吴恒芳,等.黄芪甲苷改善过氧化氢诱导的人主动脉内皮细胞氧化应激损伤的研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2017,37(8):949-954.
- [16] LIM C, LEE B, LIM S, et al. Astragali radix reduces ischemia-induced brain injury by inhibiting edema and expression of Aquaporin-4 in mice[J]. Pharmacognosy Magazine,2019,15(61):335-341.
- [17] LI HF, SHI RN, DING F, et al. Astragalus polysaccharide suppresses 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in caenorhabditis elegans [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2016(2016):4856761.
- [18] LUO Y, SUN GB, DONG X, et al. Isorhamnetin attenuates atherosclerosis by inhibiting macrophage apoptosis via pi3k/akt activation and HO-1 induction[J]. Plos One,2015,10(3):e0120259.
- [19] YANG C, MO YS, XU EJ, et al. Astragaloside IV ameliorates motor deficits and dopaminergic neuron degeneration via inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in a Parkinson's disease mouse model [J]. International Immunopharmacology,2019,75(10):105651.
- [20] PARK C, SO HS, SHIN CH, et al. Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9C2 cardiomyoblast cells[J]. Biochemical pharmacology,2003,66(7):1287-1295.
- [21] SLEZAK J, TRIBULOVA N, PRISTACOVA J, et al. Hydrogen peroxide changes in ischemic and reperfused heart. Cytochemistry and biochemical and X-ray microanalysis[J]. The American journal of pathology,1995,147(3):772-781.

(收稿日期:2020-09-14)

天葵子治病验方(一)

痈疽肿毒:鲜天葵根适量,捣烂外敷。

瘰疬、乳癌:天葵根 1.5g,象贝 6~9g,煅牡蛎 9~12g,甘草 3g。同煎服数次。

蛇咬伤:天葵子 6g。捣烂敷,1日1换。

肺癆:天葵子 12g。放入猪肚内,煮烂去渣吃,连吃3只。

虚咳有痰:天葵子 9g。炖肉吃。

胃热气痛:天葵子 6g。捣烂,开水吞服。

羊痫风:天葵子约 3g。研成细末,发病前用烧酒吞服,连用3~5剂。

小儿盐吼(哮喘):天葵子 30g,用盐水浸泡一夜,研末。每次服 1.5g,姜开水吞服。(http://www.cntcm.com.cn/xueshu/2021-04/12/content_88577.htm)