

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.21.010

参附益心方对血管紧张素 II 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡及线粒体含量、膜电位的影响

王新陆¹, 崔琳¹, 王幼平¹, 李彬¹, 于瑞¹, 郝轩轩², 王永霞¹, 朱明军^{1*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南省郑州市金水区人民路 19 号, 136300; 2. 河南中医药大学)

摘要 目的 探讨参附益心方对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的干预作用及相关机制。方法 采用 CCK-8 法筛选参附益心方、辅酶 Q10、氯沙坦钾实验药物浓度, MTT 法筛选 Ang II 实验药物浓度。以 H9c2 心肌细胞为研究对象, 以 Ang II 诱导 H9c2 心肌细胞损伤为模型, 将细胞分为正常对照组、模型组、辅酶 Q10 组、氯沙坦组和参附益心方低、高剂量组。正常对照组正常培养 24 h; 模型组用含筛选浓度的 Ang II 的培养基培养 24 h; 参附益心方低、高剂量组及氯沙坦组、辅酶 Q10 组用含筛选出相应药物浓度及 Ang II 的培养基培养 24 h。检测各组 H9c2 心肌细胞活性、线粒体含量及膜电位、活性氧簇 (ROS) 含量、细胞凋亡率, 凋亡相关因子 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bax、Bcl-2 基因表达, Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白活性。结果 最终选择参附益心方低、高浓度为 0.25、0.5 mg/ml, 辅酶 Q10 研究浓度为 1×10^{-4} mol/L, 氯沙坦钾研究浓度为 1×10^{-4} mol/L, Ang II 建立实验模型浓度为 1×10^{-5} mol/L。与正常对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞活性、线粒体数量及膜电位、Bcl-2 基因表达降低, ROS 含量、细胞凋亡率及 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bax 基因表达升高, Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白活性亦升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 参附益心方高剂量组和氯沙坦组、辅酶 Q10 组细胞活性、线粒体数量及膜电位升高, ROS 含量、细胞凋亡率、Caspase-3、Caspase-9、Bax 基因表达降低, Caspase-3、Caspase-9 蛋白活性亦降低 ($P < 0.05$)。结论 参附益心方可能通过改善心肌细胞线粒体功能, 降低 ROS 含量, 从而减少 Ang II 诱导的 H9c2 心肌细胞发生凋亡。

关键词 心力衰竭; H9c2 心肌细胞; 参附益心方; 线粒体; 血管紧张素 II; 细胞凋亡

心力衰竭是各种心脏疾病的严重和终末阶段, 病死率高, 是全球慢性心血管疾病防治的重要内容。心室重构是心力衰竭发生、发展的重要病理过程, 肾素-血管紧张素-醛固酮 (RAAS) 系统和交感神经系统的激活, 线粒体形态和功能的受损, 代谢底物利用的改变, 引起细胞内钙失衡、大量有毒物质堆积, 最终导致心肌细胞肥大、凋亡、自噬, 以及细胞间质纤维化, 加速心力衰竭的进程^[1]。参附益心方原名心衰康冲剂, 前期研究^[2-3]表明其能通过不同途径发挥抗心力衰竭的作用。本实验以血管紧张素 II (Ang II) 诱导 H9c2 心肌细胞损伤为模型, 通过观察参附益心方对 H9c2 心肌细胞活

性、活性氧簇 (ROS) 含量、线粒体含量、线粒体膜电位以及相关凋亡因子活性的影响, 探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

大鼠 H9c2 心肌细胞株购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 来源于大鼠胚胎期心脏组织。

1.2 药物及配置

参附益心方由人参、炮附片、桂枝、丹参、赤芍、益母草、泽泻、猪苓、车前子、葶苈子、砂仁、大腹皮、大枣按 1 : 1.67 : 2 : 5 : 2.5 : 5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 : 2.5 : 1.67 : 2.5 : 2 的比例组成, 由山东步长制药有限公司制备参附益心方浸膏, 批号: 131101, 1 g 浸膏相当于 9.5 g 生药, 参附益心方浸膏得率 10.5%。实验时称取 0.25 g 参

基金项目: 国家自然科学基金(81373853, 81503419, 81703897); 国家重点基础研究发展计划“973”计划(2015CB554401); 河南省创新型科技团队(C20130050)

* 通讯作者: zhumingjun317@163.com

附益心方浸膏干粉加入 10 ml DMEM 高糖培养基, 混匀后用 0.2 μm 滤器过滤除菌, 制成 25 mg/ml 的药物原液, 4℃ 储存, 使用时用 DMEM 高糖培养基稀释成不同浓度。辅酶 Q10 片 (能气朗), 卫材 (中国) 药业有限公司, 批号: H10930021, 规格: 10 mg/片; 氯沙坦钾片 (科素亚), 杭州默沙东制药有限公司, 批号: J20180006, 规格: 50 mg/片。Ang II 冻干粉, 美国 Sigma 公司, 货号: A9525。

1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清 (FBS, 以色列 Biological Industries 公司, 货号: 04-001-4A); Annexin V /PI 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司, 批号: 6119909); 逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 批号: c28025-032、c11744-100); Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 试剂盒 (美国 Promega 公司, 货号: G8090、G8200、G8210); JC-1 试剂盒 (美国 Sigma 公司, 货号: T4069); Mito-Tracker 荧光探针试剂盒 (美国 Sigma 公司, 货号: 53271); DMEM 高糖培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)、DCFH-DA ROS 荧光探针试剂盒、CCK-8 试剂盒、MTT 粉末 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 12100、P1020、CA1410、CA1210、B0016K012500); Trizol 试剂 (美国 Ambion Life Technologies 公司, 批号: 103105); Hank's 液 (Hyclone 公司, 货号: SH30030.02B); DMSO (Sigma 公司, 货号: D4540)。

RCO-3000TVBB 型 CO₂ 培养箱, 美国 REVC0 公司; CK40 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Airtech 型生物超净工作台, 江苏苏净集团安泰公司; JA203 型电子分析天平, 上海海康电子仪器厂; MK3 型酶标仪, 德国 Thermo Fisher Scientific 公司; DMI3006 型倒置荧光显微镜, 德国 Leica 公司; ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪, 美国 AB 公司; FACSCalibur 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; MK3 型荧光分光光度计, Mokuar Devices 公司。

2 方法

2.1 H9c2 心肌细胞培养

37℃ 恒温水中快速复苏 H9c2 心肌细胞株, 含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养中和, 1000 r/min 离心 (半径 15 cm), 吹打混匀, 接种于 25 cm² 培养瓶, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 胰酶消化传代, 选取对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 CCK-8 法筛选参附益心方、辅酶 Q10、氯沙坦钾实验药物浓度

参附益心方浓度设为 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.5 mg/ml, 辅酶 Q10 浓度设为 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} mol/L, 氯沙坦钾浓度设为 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L, 另设正常对照组。将 H9c2 心肌细胞用不同浓度的参附益心方、辅酶 Q10、氯沙坦钾 2 ml 处理 24 h。CCK-8 比色法检测细胞活性 (以 OD 值表示), 酶标仪检测, 检测波长为 450 nm, 依据结果筛选参附益心方、辅酶 Q10、氯沙坦钾的实验适宜浓度。

2.3 MTT 法筛选 Ang II 实验药物浓度

Ang II 浓度设为 1×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 1×10^{-7} 、 5×10^{-8} 、 1×10^{-8} mol/L, 另设正常对照组。将 H9c2 心肌细胞用不同浓度的 Ang II 处理 24 h。吸弃上清, 稀释 MTT 浓度为 5 mg/ml, 各孔依次加入 2 ml, 37℃ 孵育 4 h, 吸弃上清, 各孔加入 DMSO 溶解, 震荡, 酶标仪检测吸光度值, 检测波长为 490 nm, 依据结果筛选 Ang II 诱导 H9c2 细胞损伤的适宜浓度。

2.4 实验分组及干预方法

将细胞分为正常对照组、模型组、辅酶 Q10 组、氯沙坦组和参附益心方低、高剂量组, 每组 6 个复孔。正常对照组正常培养 24 h; 模型组用含筛选浓度的 Ang II 的培养基培养 24 h 诱导细胞损伤模型; 参附益心方低、高剂量组分别用含筛选浓度的参附益心方及筛选浓度的 Ang II 的培养基培养 24 h; 氯沙坦组用含筛选浓度的氯沙坦钾片及 Ang II 的培养基培养 24 h; 辅酶 Q10 组用含筛选浓度的辅酶 Q10 片及 Ang II 的培养基培养 24 h。

2.5 观察指标及方法

2.5.1 心肌细胞活性 采用 CCK-8 法检测, 按 CCK-8 试剂盒说明书步骤进行, 酶标仪检测, 细胞活性以 OD 值表示, 检测波长为 450 nm。

2.5.2 心肌细胞线粒体含量 采用 Mito-Tracker 荧光探针检测, 根据试剂盒说明书进行, 并在荧光显微镜下观察。

2.5.3 心肌细胞线粒体膜电位 吸弃上清, 室温下 Hank's 液洗 2 或 3 次, 每次 1 min, 加入终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ JC-1 染料, 37℃ 温箱中避光孵育 10 min, 室温下 Hank's 液洗 2 次, 酶标仪检测, 激发光波长 525 nm, 结果以 OD 值表示。

2.5.4 心肌细胞 ROS 含量 采用 DCFH-DA ROS 荧光探针检测,用不含 FBS 的 DMEM 培养清洗,加入终浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 的荧光探针, 37°C 温箱中避光孵育 30 min, 荧光显微镜下观察或酶标仪检测。激发波长: 488 nm, 发射波长: 525 nm。

2.5.5 心肌细胞凋亡率 按照 Annexin V/PI 双染说明书, 洗涤、消化收集细胞, $1 \times \text{binding buffer}$ 细胞密度为 5×10^6 个/ml, 依次加入 Annexin V ($10\ \mu\text{g/ml}$) 孵育 3 min 后, 再加入 PI ($10\ \mu\text{g/ml}$) 暗室孵育 15 min, 补加 $1 \times \text{binding buffer}$ 至 500 μl , 流式细胞仪检测。FlowJo 7.6 软件分析凋亡细胞的分布情况。

2.5.6 凋亡相关因子基因表达 采用 RT-PCR 方法检测。Trizol 试剂提取心肌细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, GAPDH 作为内参基因, 分别扩增能量代谢及凋亡相关基因。RT-PCR 反应体系为 20 μl , 反应条件: 95°C 预变性 90 s 后进行 PCR 循环, 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 30 s, 共 40 个循环; 待扩增反应结束, 由 65°C 缓慢加热到 95°C , 并建立 PCR 产物的溶解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量法计算各组基因表达情况并进行统计分析。引物由江苏金唯智生物科技有限公司合成, 具体引物见表 1。

表 1 H9c2 细胞凋亡相关因子 mRNA 表达 RT-PCR 扩增基因引物序列

基因	上游引物	下游引物	扩增长度
GAPDH	ACA GCA ACA T GAG GGT GCA	GGG TGG TGG AC GCG AAC TT	252 bp
Bcl-2	CTT TGA GTT CGG	AGT TCC ACA AAG	153 bp
	TGG GGT CA	GCA TCC CAG	
Bax	GCT CAA GGC CCT	GAA GCC TCA GCC	223 bp
	GTG CAC TAA	CAT CTT CTT	
Caspase-3	GAG CTG GAC TGC	AGG AAT AGT AAC	118 bp
	GGT ATT GA	CGG GTG CG	
Caspase-8	GAC CAC ATC CCG	GAT CCC GCC GAC	139 bp
	CAG AAG AA	TGA TAT GG	
Caspase-9	CAT CTT CAA TGG	GGT CTT TCT GCT	86 bp
	GAC CGG CT	CAC CAC CA	

2.5.7 凋亡相关因子蛋白活性 参照试剂盒说明书, 采用分光光度计检测心肌细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白的活性。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件分析数据。计量资料均符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参附益心方、Ang II、氯沙坦钾、辅酶 Q10 实验用药浓度筛选结果

表 2 示, 与正常对照组比较, 1×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-6} mol/L 浓度的 Ang II 组细胞活性明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。表 3 示, 与正常对照组比较, 0.1、0.25、0.5、0.75 mg/ml 浓度的参附益心方组细胞活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 1.0、1.5 mg/ml 浓度的参附益心方组细胞活性明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。表 4 示, 与正常对照比较, 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L 浓度的氯沙坦组细胞活力差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 1×10^{-3} mol/L 浓度的氯沙坦组细胞活性明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。表 5 示, 与正常对照组比较, 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 浓度的辅酶 Q10 组细胞活性明显升高 ($P < 0.05$), 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} mol/L 浓度辅酶 Q10 组细胞活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。根据以上结果, 最终选择参附益心方低、高浓度为 0.25、0.5 mg/ml, 辅酶 Q10 研究浓度为 1×10^{-4} mol/L, 氯沙坦钾研究浓度为 1×10^{-4} mol/L, Ang II 建立实验模型浓度为 1×10^{-5} mol/L。

表 2 不同浓度 Ang II 对 H9c2 细胞活性的影响 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mol/L)	孔数	细胞活性
正常对照组	—	6	0.75 ± 0.03
Ang II 组	1×10^{-4}	6	$0.45 \pm 0.03^*$
	5×10^{-5}	6	$0.54 \pm 0.01^*$
	1×10^{-5}	6	$0.56 \pm 0.01^*$
	5×10^{-6}	6	$0.64 \pm 0.01^*$
	1×10^{-6}	6	0.68 ± 0.02
	5×10^{-7}	6	0.71 ± 0.03
	1×10^{-7}	6	0.75 ± 0.02
	5×10^{-8}	6	0.72 ± 0.02
	1×10^{-8}	6	0.71 ± 0.01

注: Ang II, 血管紧张素 2; 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

表 3 不同浓度参附益心方对 H9c2 细胞活性的影响 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mg/ml)	孔数	细胞活性
正常对照组	—	6	1.98 ± 0.09
参附益心方组	0.1	6	1.99 ± 0.10
	0.25	6	1.95 ± 0.01
	0.5	6	1.94 ± 0.03
	0.75	6	1.76 ± 0.04
	1.0	6	$1.61 \pm 0.07^*$
	1.5	6	$0.98 \pm 0.10^*$

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

表 4 不同浓度氯沙坦钾对 H9c2 细胞活性的影响 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mol/L)	孔数	细胞活性
正常对照组	—	6	1.87 ± 0.05
氯沙坦组	1 × 10 ⁻³	6	1.47 ± 0.03*
	1 × 10 ⁻⁴	6	1.98 ± 0.13
	1 × 10 ⁻⁵	6	2.04 ± 0.11
	1 × 10 ⁻⁶	6	1.91 ± 0.08
	1 × 10 ⁻⁷	6	1.87 ± 0.05

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

表 5 不同浓度辅酶 Q10 对 H9c2 细胞活性的影响 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mol/L)	孔数	细胞活性
正常对照组	—	6	1.73 ± 0.01
辅酶 Q10 组	1 × 10 ⁻³	6	1.92 ± 0.04*
	1 × 10 ⁻⁴	6	1.90 ± 0.02*
	1 × 10 ⁻⁵	6	2.02 ± 0.04*
	1 × 10 ⁻⁶	6	2.01 ± 0.07*
	1 × 10 ⁻⁷	6	1.74 ± 0.02
	1 × 10 ⁻⁸	6	1.72 ± 0.01

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

3.2 各组 H9c2 心肌细胞活性比较

表 6 示, 模型组大鼠心肌细胞活性与正常对照组比较明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 参附益心方低、高剂量组和氯沙坦组、辅酶 Q10 组均能够提高 Ang II 诱导的心肌细胞的活性, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而各药物干预组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 6 各组 H9c2 细胞活性比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	细胞活性
正常对照组	6	2.36 ± 0.10
模型组	6	1.60 ± 0.03*
参附益心方低剂量组	6	1.79 ± 0.01 [△]
参附益心方高剂量组	6	2.02 ± 0.05 [△]
氯沙坦组	6	2.12 ± 0.04 [△]
辅酶 Q10 组	6	1.93 ± 0.03 [△]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3.3 各组 H9c2 心肌细胞线粒体含量比较

Mito-Tracker 为一种氧化型的红色染料, 可被动运输穿过细胞膜并直接聚集在活性线粒体上, 依据荧光强弱, 可判定线粒体活性及数量。结果表明, 模型组大鼠心肌细胞 Mito-Tracker 荧光与正常对照组比较明显减弱, 线粒体含量减少; 而参附益心方高、低剂量组和氯沙坦组、辅酶 Q10 组均能够提高心肌细胞 Mito-Tracker 荧光强度及线粒体含量。

3.4 各组 H9c2 心肌细胞线粒体膜电位、ROS 含量、细胞凋亡率比较

表 7 示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞线粒体膜电位降低, ROS 含量及细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 参附益心方低、高剂量组及氯沙坦组、辅酶 Q10 组均能够提高心肌细胞线粒体膜电位, 降低细胞凋亡率 ($P < 0.05$), 除参附益心方低剂量组外其余各给药组亦能降低 ROS 含量 ($P < 0.05$)。与氯沙坦组比较, 参附益心方低、高剂量组和辅酶 Q10 组细胞膜电位均降低, 参附益心方低剂量组和辅酶 Q10 组细胞凋亡率均升高 ($P < 0.05$)。与辅酶 Q10 组比较, 参附益心方高剂量组和氯沙坦组 ROS 含量均降低 ($P < 0.05$)。

表 7 各组 H9c2 心肌细胞线粒体膜电位、ROS 含量、细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	膜电位 (OD 值)	ROS 含量 (FLU 值)	细胞凋亡率 (%)
正常对照组	3	8.00 ± 0.51	54.65 ± 3.48	11.47 ± 0.60
模型组	3	2.29 ± 0.27*	140.83 ± 4.74*	22.77 ± 1.00*
参附益心方低剂量组	3	3.40 ± 0.25 [△]	123.40 ± 6.56	16.70 ± 1.05 [△]
参附益心方高剂量组	3	4.11 ± 0.29 [△]	92.83 ± 8.51 [△]	15.23 ± 0.35 [△]
氯沙坦组	3	5.07 ± 0.20 [△]	88.33 ± 3.18 [△]	14.90 ± 0.70 [△]
辅酶 Q10 组	3	4.71 ± 0.18 [△]	110.15 ± 3.08 [△]	16.17 ± 0.31 [△]

注: ROS, 活性氧簇; 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与氯沙坦组比较, $\Delta P < 0.05$; 与辅酶 Q10 组比较, $\#P < 0.05$

3.5 各组 H9c2 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 基因表达比较

表 8 示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠心肌细胞 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 基因表达升高, Bcl-2 基因表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 参附益心方低剂量组仅 Caspase-9 基因表达降低, 而参附益心方高剂量组 Caspase-3、Caspase-9、Bax 基因降低, Bcl-2 基因表达升高 ($P < 0.05$); 氯沙坦组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bax 基因表达降低, Bcl-2 基因含量升高 ($P < 0.05$); 辅酶 Q10 组 Caspase-3、Caspase-9、Bax 基因表达降低 ($P < 0.05$)。与氯沙坦组比较, 参附益心方低、高剂量组和辅酶 Q10 组 Caspase-8、Caspase-9 基因表达升高 ($P < 0.05$)。与辅酶 Q10 组比较, 参附益心方高剂量组 Caspase-9 基因表达降低 ($P < 0.05$)。

表 8 各组 H9c2 细胞凋亡相关因子基因表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9	Bax	Bcl-2
正常对照组	3	1.02 ± 0.03	0.99 ± 0.01	1.02 ± 0.04	1.01 ± 0.02	0.99 ± 0.02
模型组	3	1.44 ± 0.03*	1.31 ± 0.10*	2.28 ± 0.20*	1.52 ± 0.04*	0.76 ± 0.02*
参附益心方低剂量组	3	1.34 ± 0.00	1.26 ± 0.05 [▲]	1.41 ± 0.19 ^{▲▲}	1.46 ± 0.03	0.74 ± 0.01
参附益心方高剂量组	3	1.22 ± 0.01 [△]	1.22 ± 0.09 [▲]	0.76 ± 0.06 ^{△▲#}	1.24 ± 0.04 [△]	0.91 ± 0.03 [△]
氯沙坦组	3	1.11 ± 0.02 [△]	0.94 ± 0.02 [△]	0.54 ± 0.09 [△]	1.11 ± 0.13 [△]	0.99 ± 0.03 [△]
辅酶 Q10 组	3	1.29 ± 0.03 [△]	1.20 ± 0.11 [▲]	1.51 ± 0.08 ^{△▲}	1.17 ± 0.01 [△]	0.86 ± 0.03

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与氯沙坦组比较, $\Delta P < 0.05$; 与辅酶 Q10 组比较, $\#P < 0.05$

表 9 各组 H9c2 细胞凋亡相关因子蛋白活性比较 (FLU, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
正常对照组	3	223.83 ± 8.51	1127.59 ± 116.74	328.35 ± 11.08
模型组	3	909.29 ± 68.90*	3211.84 ± 124.02*	1537.09 ± 60.42*
参附益心方低剂量组	3	525.18 ± 56.90 [△]	2960.01 ± 56.11 [▲]	819.03 ± 72.72 ^{△#}
参附益心方高剂量组	3	404.32 ± 25.73 [△]	2867.65 ± 96.86 [▲]	458.98 ± 30.94 ^{△#}
氯沙坦组	3	336.44 ± 28.00 [△]	1840.79 ± 96.89 [△]	527.13 ± 64.86 ^{△#}
辅酶 Q10 组	3	395.42 ± 16.60 [△]	2056.13 ± 145.32 [▲]	358.39 ± 18.04 [△]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与氯沙坦组比较, $\Delta P < 0.05$; 与辅酶 Q10 组比较, $\#P < 0.05$

3.6 各组 H9c2 细胞 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白活性比较

表 9 示, 与正常对照组比较, 模型组 H9c2 心肌细胞 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白活性升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 参附益心方低、高剂量组和氯沙坦组、辅酶 Q10 组 Caspase-3、Caspase-9 活性明显降低, 氯沙坦组心肌细胞 Caspase-8 活性降低 ($P < 0.05$)。与氯沙坦组比较, 参附益心方高、低剂量组和辅酶 Q10 组细胞 Caspase-8 活性升高 ($P < 0.05$)。与辅酶 Q10 组比较, 参附益心方低、高剂量组及氯沙坦组细胞 Caspase-9 活性均升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

中医学对心力衰竭基本病机的认识已逐渐达成共识, 即以虚证为本, 包括气虚、阴虚、阳虚; 实证为标, 包括痰浊、血瘀、水饮^[7]。本研究所用参附益心方中人参益气; 附子、桂枝温肾阳、通心脉; 丹参、赤芍、益母草活血化瘀利水; 泽泻、猪苓、车前子、葶苈子、大腹皮化湿利水、泻肺逐饮; 砂仁、大枣健脾利湿、温补中焦。全方标本兼顾, 扶正不滞邪, 利水不伤阴, 共奏益气温阳、活血利水之功。

心室重构是心力衰竭发生、发展的重要环节, 研究^[8]表明, 无论何种原因导致的心力衰竭, 心肌细胞凋亡都是导致心脏功能失调的重要机制。心肌细胞凋亡主要有线粒体途径、内质网途径和死亡受体途径^[9]。其中, 死亡受体介导又称外源性途

径, 线粒体介导为内源性途径, 二者均通过激活 Caspase-3 执行细胞凋亡。死亡受体介导主要通过激活 Caspase-8 进而活化 Caspase-3; 线粒体介导主要通过激活 Caspase-9 前体活化激活 Caspase-3^[10]。Bcl-2 家族包括促凋亡蛋白 Bax 以及抗凋亡蛋白如 Bcl-2、Bcl-xl, 正常情况下 Bcl-2、Bax 处于平衡状态, Bcl-2 能够抑制 Bax 活性并能与外膜依赖型阴离子通道直接结合, 导致外膜依赖型阴离子通道关闭, 阻止线粒体内容物外流, 抑制凋亡发生; 当氧化应激发生, 或者 ROS 大量堆积时, 可引起 Bax 分子构象改变, 以及 Bcl-2 活性降低, 促使线粒体通透孔开放, 膜电位发生变化, 线粒体内的细胞色素 C、凋亡诱导因子等释放入胞质, 引起 Caspase 家族活化及级联反应, 进而引起细胞凋亡^[11-12]。

RAAS 系统在心室重构的发生、发展过程中起着重要作用, 氯沙坦是血管紧张素 II 受体拮抗剂, 以 β 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素受体拮抗剂、醛固酮受体拮抗剂为主的“金三角”药物在临床的规范应用, 可以降低急性心肌梗死后心肌重构以及心力衰竭的发生, 改善预后^[13]。辅酶 Q10 通过改善能量代谢, 进而延缓心室重构, 改善心功能, 也广泛应用于临床^[14]。因此, 本研究以临床应用较广泛的氯沙坦钾片、辅酶 Q10 片为阳性对照药物。本研究先对各药物实验浓度进行了筛选, 最终选择参附益心方低、高浓度为 0.25、0.5 mg/ml, 辅酶 Q10 研究浓度为 1×10^{-4} mol/L, 氯沙坦研究浓度为 1×10^{-4} mol/L, Ang II 建立实验模型浓度为 1×10^{-5} mol/L。研究结果显

示, 各药物干预组均能不同程度使 H9c2 心肌细胞线粒体数量明显增加, 膜电位升高, ROS 含量降低, 细胞活性增高; 并且在降低细胞凋亡率方面参附益心方高剂量组优于参附益心方低剂量组, 但氯沙坦组在改善线粒体膜电位和细胞凋亡率方面优于参附益心方高剂量组; 在降低 ROS 含量方面参附益心方高剂量组和氯沙坦组优于辅酶 Q10 组。同时各药物干预组均不同程度降低凋亡相关因子 Caspase-3、Caspase-9、Bax 基因表达, 升高 Bcl-2 基因表达, 降低 Caspase-3、Caspase-9 蛋白活性, 说明参附益心方与氯沙坦钾片、辅酶 Q10 片干预 Ang II 诱导的 H9c2 细胞凋亡的作用机制具有相同之处。然而, 中药复方成分复杂, 多途径、多靶点干预疾病, 因此阐明参附益心方干预心力衰竭的科学内涵需进一步研究。

参考文献

- [1] VAN BILSEN M, SMEETS PJ, GILDE AJ, et al. Metabolic remodeling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(2) : 218-226.
- [2] 崔琳, 王幼平, 王新陆, 等. 参附益心颗粒对缺氧诱导的大鼠 H9C2 心肌细胞能量代谢的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(10) : 862-868.
- [3] 谢世阳, 王幼平, 王小晓, 等. 参附益心颗粒对心力衰竭大鼠心肌 ATP 含量及解偶联蛋白-2 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(10) : 4412-4415.
- [4] 王永霞, 李彬, 朱明军, 等. 参附益心颗粒对慢性心力衰竭大鼠心肌重塑的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10) : 2370-2372.

- [5] 韩丽华, 田力. 心衰康冲剂治疗充血性心衰的临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(9) : 27-36.
- [6] SUN B, HUO R, SHENG Y, et al. Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy [J]. Hypertension, 2013, 61(2) : 352-360.
- [7] 张伯礼, 范维琥, 王阶, 等. 慢性心力衰竭中医诊疗专家共识 [J]. 中医杂志, 2014, 55(14) : 1258-1260.
- [8] WANG JC, HU XR, JIANG H, et al. ER stress-induced apoptosis: A novel therapeutic target in heart failure [J]. Int J Cardiol, 2014, 177(2) : 564-565.
- [9] DING F, SHAO ZW, YANG SH, et al. Role of mitochondrial pathway in compression-induced apoptosis of nucleus pulposus cells [J]. Apoptosis, 2012, 17(6) : 579-590.
- [10] WALTERS JW, AMOS D, RAY K, et al. Mitochondrial redox status as a target for cardiovascular disease [J]. Curr Opin Pharmacol, 2016(27) : 50-55. doi: 10. 1016/j. coph. 2016. 01. 006.
- [11] 王建枝, 殷莲华. 病理生理学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 146-148.
- [12] 杨雪芹, 王伟, 杨爱东, 等. 中药干预线粒体途径抑制心肌细胞凋亡的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(5) : 98-101.
- [13] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10) : 760-789.
- [14] 罗秀英, 钟泽, 吴新东, 等. 曲美他嗪联合辅酶 Q10 治疗慢性心力衰竭患者血浆心肌营养素-1 水平及心功能的影响 [J]. 心电与循环, 2019, 38(4) : 304-308.

Effects of Shenfu Yixin Formula (参附益心方) on Angiotensin II-Induced H9c2 Cardiomyocytes Apoptosis, Mitochondrial Content and Membrane Potential

WANG Xinlu¹, CUI Lin¹, WANG Youping¹, LI Bin¹, YU Rui¹, HAO Xuanxuan², WANG Yongxia¹, ZHU Mingjun¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004; 2. Henan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the intervention effect and related mechanism of Shenfu Yixin Formula (参附益心方) on angiotensin II (Ang II)-induced H9c2 cardiomyocyte injury. **Methods** CCK-8 method was used to screen the concentration of Shenfu Yixin Formula, Coenzyme Q10 and Losartan potassium, and the concentration of Ang II was screened by MTT method. H9c2 cardiomyocytes were used as the research object, and the injury of H9c2 cardiomyocytes induced by Ang II was used as a model. The cells were divided into a normal control group, a model group, a coenzyme Q10 group, a losartan group and Shenfu Yixin Formula low and high dose groups. The normal control group was normally cultured for 24 hours. The model group was cultured for 24 hours with the culture medium containing the screening concentration of Ang II. The low-dose and high-dose groups of Shenfu Yixin Formula, the losartan group and the coenzyme Q10 group were cultured with the culture medium which were screened for the corresponding drug concentration and Ang II for 24 hours. The activity of H9c2 cardiomyocytes, mitochondrial content and membrane potential, reactive oxygen species (ROS) content, apoptosis rate, expression of apoptosis-related factors Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 protein activity were detected. **Results** Finally, the low-concentration and high-concentration of Shenfu Yixin Formula was 0.25 and 0.5 mg/ml

respectively, the concentration of coenzyme Q10 was 1×10^{-4} mol/L, and the concentration of losartan potassium was 1×10^{-4} mol/L. The experiment of Ang II model was established with the concentration of 1×10^{-5} mol/L. Compared with the normal control group, myocardial cell activity, mitochondrial number, membrane potential, Bcl-2 gene expression decreased in the model group. ROS content, apoptosis rate and expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and Bax genes increased. The activities of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 also increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the cell activity, mitochondrial number and membrane potential of *Shenfu Yixin Formula* high-dose group, losartan group and coenzyme Q10 group increased, ROS content, apoptosis rate, gene expression of Caspase-3, Caspase-9, Bax were decreased, and the activities of Caspase-3 and Caspase-9 also decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Shenfu Yixin Formula* may reduce the mitochondrial function of cardiomyocytes and reduce the ROS content, thereby reducing the apoptosis of H9c2 cardiomyocytes induced by Ang II.

Keywords cardiac failure; H9c2 cardiomyocytes; *Shenfu Yixin Formula* (参附益心方); mitochondrion; Angiotensin II; apoptosis

(收稿日期: 2019-07-15; 修回日期: 2019-08-21)

编辑: 邓 媛

(上接第 1853 页)

Effect of *Liqi Huatan Huoxue Formula* (理气化痰活血方) on Vascular Endothelial Function in Coronary Artery Microcirculation Disorder Model Rats

WANG Xianliang, SU Lishuo, MAO Jingyuan, WANG Shuai, ZHAO Guoyuan, WANG Cong

(First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of action of *Liqi Huatan Huoxue Formula* (理气化痰活血方) in improving coronary microcirculation disturbance. **Methods** A total of 245 healthy male SD rats were randomly divided into a *Liqi Huatan Huoxue Formula* group, a valsartan group and a model group, with 80 rats in each group. In addition, a blank group was set with 5 rats. Except for the blank group, the other 3 groups were established a model of coronary microcirculation disorder by injecting sodium laurate into the left ventricle. The *Liqi Huatan Huoxue Formula* group and the valsartan group were given *Liqi Huatan Huoxue Formula* (concentration 2.25 g/ml) and valsartan suspension (concentration 8.89 mg/ml) 1 ml/100 g 1 day before operation and 4 weeks after operation. The model group and the blank group were given 1 ml/100 g of distilled water for gavage, once a day. During the experiment, the deaths of the rats in each group were observed. Five rats were randomly sacrificed at the time points of 1 h, 24 h, 1 w, 2 w, 3 w and 4 w after the operation in the *Liqi Huatan Huoxue Formula* group, the valsartan group and the model group. The rats were sacrificed at 4 w in the blank group. The concentrations of serum endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO), von Willebrand factor (vWF) and myocardial tissue fibrin (fgl 2) mRNA were detected. **Results** There were 44 deaths, 40 deaths, and 42 deaths respectively in the model group, *Liqi Huatan Huoxue Formula* group and the valsartan group. There was no statistically significant difference in the intraoperative and post-operative mortality among the 3 groups ($P > 0.05$). At 4 w after operation, the concentration of serum ET-1 in the model group was higher than that in the blank group, and the concentration of vWF was decreased ($P < 0.01$). There was no significant difference in serum NO concentration and fgl 2 mRNA expression between the 2 groups ($P > 0.05$). At the same time, compared with the model group, the serum ET-1 concentrations in the *Liqi Huatan Huoxue Formula* group and the valsartan group were decreased at 1 h, 24 h, 1 w, 2 w, 3 w, 4 w ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group and the valsartan group, the serum NO concentration increased and the vWF concentration decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of fgl 2 mRNA in myocardial tissue at 2 w, 3 w in the *Liqi Huatan Huoxue Formula* group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Liqi Huatan Huoxue Formula* may protect vascular endothelial function by reducing the concentration of ET-1 and vWF in serum and the expression of fgl 2 in myocardial tissue and increasing the concentration of NO in serum of rats with coronary microcirculation disturbance.

Keywords coronary artery microcirculation disorder; *Liqi Huatan Huoxue Formula* (理气化痰活血方); cardiac syndrome X; endothelin I; nitric oxide; von Willebrand factor; fibroblast

(收稿日期: 2019-07-15; 修回日期: 2019-08-26)

编辑: 邓 媛