

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.21.012

抗纤益心方对去甲肾上腺素诱导 H9c2 心肌细胞凋亡及凋亡相关因子表达的影响

王振涛^{*}, 闫京京², 吴鸿², 常红波², 许姝雯², 李巧稚²

(1. 河南省中医院, 河南省郑州市东风路 6 号, 450002; 2. 河南中医药大学)

摘要 目的 探讨抗纤益心方对去甲肾上腺素 (NE) 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及可能作用机制。方法 采用 CCK-8 法筛选抗纤益心方最佳给药浓度。大鼠 H9c2 心肌细胞常规培养, 饥饿 8 h 后细胞进行分组, 正常组未做处理, 模型组加 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NE 100 μl , 抗纤益心方组加入筛选最佳浓度抗纤益心方溶液 2 μl + 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NE 100 μl 、卡托普利组加入 2×10^{-5} mol/L 卡托普利 5 μl + 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 NE 100 μl , 各组设 3 个复孔, 作用 24 h。流式细胞仪检测细胞凋亡率, 并检测凋亡相关因子 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达。结果 最终筛选以 0.25 mg/ml 的抗纤益心方为干预浓度进行实验。与正常组比较, 模型组细胞凋亡率升高, Bax、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达升高, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 抗纤益心方组和卡托普利组细胞凋亡率降低, Bax、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达降低, Bcl-2 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 抗纤益心方可抑制 NE 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡, 其作用机制可能与调节凋亡相关因子 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的表达有关。

关键词 扩张型心肌病; H9c2 心肌细胞; 抗纤益心方; 细胞凋亡; 去甲肾上腺素

扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy, DCM) 是临床中常见的心肌疾病之一, 多表现为进行性心力衰竭^[1-2]。越来越多的证据^[3-4]显示, 细胞凋亡在 DCM 的发生和发展中起着重要的作用, 而凋亡引起心肌细胞的丢失是其发生的重要环节, 过度的细胞凋亡可导致组织损伤和功能缺陷, 使心脏出现病理性的室室重构, 从而诱发心血管疾病。抗纤益心方是我们临床治疗 DCM 的经验方, 前期研究表明其能够减轻患者的症状, 改善血流动力学, 抑制心室重构, 改善心功能^[5-6], 但机制尚不明确。因此, 本实验利用去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡模型, 从细胞凋亡角度探讨抗纤益心方治疗 DCM 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

大鼠 H9c2 心肌细胞株, 购自中国科学院细胞库, 编号: ZQ0102。

1.2 药物

抗纤益心方组成: 红参 12 g, 黄芪 30 g, 茯苓

15 g, 白术 15 g, 丹参 15 g, 泽兰 15 g, 益母草 15 g, 升麻 9 g, 麦冬 10 g, 四川新绿药业科技发展有限公司提供中药免煎配方颗粒, 批号: 1706039。精确称取颗粒 8.9 g 溶于 DMEM 高糖培养基中, 充分溶解 24 h 后离心 (半径 27 cm, 4℃, 8000 r/min, 20 min), 取上清液继续离心直至药液无沉淀出现, 最终配置药物浓度为 250 mg/ml。NE (批号: B24713, 100 mg/瓶), 购自上海源叶生物科技有限公司, 精确称取 1.69 mg NE 粉末溶于无血清 DMEM 高糖培养基, 配成 10 mmol/L 的母液备用, 在使用药物诱导时稀释成终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。卡托普利原液 (批号: SQ-14534, 10 mmol/ml), 购自 Med Chem Express 公司, 原液中取 10 μl , 用无血清 DMEM 稀释至 1 mmol/L 的母液分装备用。

1.3 主要试剂和仪器

CCK-8 溶液 (日本同仁化学研究所, 批号: LH650); DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 (以色列 BI 公司, 批号: 06-1055-57-1 ACS、02-024-1 ACS、03-2006-74-1 ACS); 2% BSA (美国 Sigma, 批号: ZY385956); 细胞凋亡试剂盒 (美国 BD 公司, 货号: 556547b); Trizol (上海荔达

基金项目: 国家自然科学基金 (81573920)

* 通讯作者: 13803817796@139.com, 13803817796

生物科技有限公司, 批号: RNAA00250); 细胞裂解液 (批号: R0020)、ECL 发光液 (批号: PE0010), 北京 Solarbio 科技有限公司; Bax 多克隆兔抗体、Bcl-2 多克隆兔抗体、Caspase3 多克隆兔抗体、GAPDH 鼠抗体 (美国 Proteintech 公司, 批号: 50599-2-Ig、12789-1-AP、19677-1-AP、60008-1-Ig); mRNA 提取试剂盒 (上海生工生物有限公司, 编号: B518651); 流式双染试剂 (美国 BD 公司, 编号: 556547b)。

流式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号: FACS-Jazz); CO₂ 培养箱 (型号: 3110 系列)、酶标仪 (型号: FC 型), 赛默飞世尔仪器有限公司。

1.4 CCK-8 法筛选抗纤益心方最佳给药浓度

将 H9c2 心肌细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 孵育 24 h。向培养板加入不同浓度的抗纤益心方药液即 0、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0 mg/ml, 每个浓度设 6 个复孔, 作用 24 h。每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 孵育 4 h, 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度值。

1.5 H9c2 大鼠心肌细胞培养及分组

1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中常规培养, 用 10% FBS + DMEM 高糖培养基 (含双抗), 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h, 饥饿 8 h。细胞进行分组: 正常组 (未做处理)、模型组 (加 100 μ mol/L 的 NE 100 μ l)、抗纤益心方组 (筛选最佳浓度抗纤益心方溶液 2 μ l + 100 μ mol/L 的 NE 100 μ l)、卡托普利组 (2×10^{-5} mol/L 卡托普利 5 μ l + 100 μ mol/L 的 NE 100 μ l), 各组设 3 个复孔, 作用 24 h。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 心肌细胞凋亡率 H9c2 大鼠心肌细胞用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化, 用 2% BSA 终止消化, 2000 r/min 室温离心 (离心半径 13.5 cm) 5 ~ 10 min, 收集细胞。按说明书进行操作, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6.2 RT-PCR 检测凋亡相关基因 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 表达 运用 Trizol 一步提取法提取 RNA, 以 1 μ g RNA 合成 cDNA, GAPDH 作为内参基因, 分别扩增 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 基因。RT-PCR 反应体系为 20 μ g, 反应条件为: 95℃ 预变性 90 s 后进行 PCR 循环, 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 共 40 个循环; 在扩增反应结束时, 从 65℃ 缓慢加热至 95℃, 并建立 PCR 产物的溶解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法计算各组基因表达情况并进行结果分析。引物由上海生工生物有限公司

合成, 引物序列: Bcl-2 上游: GGGATGACT-TCTCTCGTCGC, 下游: TGACATCTCCCTGTT-GACGC, 片段长度 223 bp; Bax 上游: AAGAAGCT-GAGCGAGTGTC, 下游: AGTAGAAAGGGAACCAC-CC, 片段长度 195 bp; Caspase-3 上游: CGGACCT-GTGGACCTGAAAA; 下游: TAACCGGGTGCGG-TAGAGTA, 片段长度 247 bp; GAPDH 上游: CT-TCTCTTGTGACAAAGTGGACAT, 下游: TTGAACCT-GCCGTGGGTAGAG, 片段长度 182 bp。

1.6.3 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达 细胞裂解液裂解后, 4℃、12000 r/min 离心 (离心半径 27 cm) 15 min, 提取蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度, 将提取的蛋白加入 $5 \times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸变性后放入 -20℃ 存放。上样, 经过 SDS-PAGE 电泳跑胶分离, 半干转模法转模, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入相应的一抗, 4℃ 过夜, TBST 洗膜, 加入二抗 β -actin, 37℃ 恒温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 发光液暗室曝光, 用 Image J pro plus 6.0 软件分析蛋白条带, 测定其灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行分析, 计量资料均符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗纤益心方用药浓度筛选结果

表 1 示, 抗纤益心方浓度在 0.125 ~ 0.5 mg/ml 时无明显毒性, 与 0 mg/ml 浓度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着其浓度的增加, 抗纤益心方浓度在 1.0 ~ 4.0 mg/ml 时细胞活力逐渐下降, 与 0 mg/ml 浓度比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 说明抗纤益心方已经产生毒性作用。由于在 0.25 mg/ml 浓度干预下细胞活性最好, 故

表 1 抗纤益心方不同浓度干预 H9c2 心肌细胞后细胞活性比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度 (mg/ml)	样本数	细胞活性
0	6	100
0.125	6	94.0 $\pm$ 1.7
0.25	6	110.0 $\pm$ 7.9
0.5	6	91.7 $\pm$ 8.0
1.0	6	74.7 $\pm$ 2.9*
2.0	6	59.0 $\pm$ 7.9**
4.0	6	47.0 $\pm$ 5.0**

注: 与 0 mg/ml 浓度比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

本研究选择 0.25 mg/ml 的抗纤益心方为干预浓度进行实验。

2.2 各组 H9c2 心肌细胞凋亡率比较

表 2 示,与正常组比较,模型组细胞凋亡率明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较,抗纤益心方组、卡托普利组细胞凋亡率明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。抗纤益心方组与卡托普利组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组 H9c2 心肌细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞凋亡率
正常组	3	6.53 ± 1.16
模型组	3	37.40 ± 3.38*
抗纤益心方组	3	19.80 ± 1.05 [△]
卡托普利组	3	15.73 ± 1.85 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组 H9c2 心肌细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达比较

表 3 示,与正常组比较,模型组细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 表达均明显升高, Bcl-2 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,抗纤益心方组、卡托普利组 Bax、Caspase-3 mRNA 表达降低, Bcl-2 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。抗纤益心方组与卡托普利组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 各组 H9c2 心肌细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Bcl-2	Bax	Caspase-3
正常组	3	1	1	1
模型组	3	0.49 ± 0.03*	1.35 ± 0.06*	1.57 ± 0.04*
抗纤益心方组	3	0.73 ± 0.04 [△]	1.09 ± 0.04 [△]	1.12 ± 0.05 [△]
卡托普利组	3	0.80 ± 0.06 [△]	1.17 ± 0.03 [△]	1.22 ± 0.04 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.4 各组 H9c2 心肌细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达比较

表 4 示,与正常组比较,模型组心肌细胞 Bax、Caspase-3 蛋白表达均明显升高, Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,抗纤益心方组、卡托普利组 Bax、Caspase-3 蛋白表达降低, Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。抗纤益心方组与卡托普利组比较, Bax、Bcl-2 蛋白表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Caspase-3 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组心肌细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白电泳图见图 1。

3 讨论

DCM 根据其临床表现可归属于中医学“心悸”

表 4 各组 H9c2 心肌细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Bcl-2	Bax	Caspase-3
正常组	3	0.93 ± 0.10	0.87 ± 0.04	0.82 ± 0.07
模型组	3	0.46 ± 0.05*	1.73 ± 0.10*	1.64 ± 0.35*
抗纤益心方组	3	0.65 ± 0.04 [△]	1.20 ± 0.09 [△]	0.91 ± 0.20 [△]
卡托普利组	3	0.77 ± 0.15 [△]	1.11 ± 0.05 [△]	0.70 ± 0.15 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; 与卡托普利组比较, $\Delta P < 0.05$

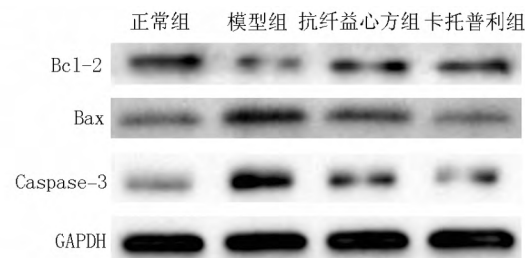


图 1 各组 H9c2 心肌细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白电泳图

“怔忡”“水肿”“喘证”“胸痹”等范畴。中医学认为,本病发病多因先天禀赋不足、素体虚弱,或后天失养,或过度劳倦,或感受毒邪,内舍于心,致心气亏虚。我们根据心气亏虚是 DCM 的根本,气虚之极则气陷,甚而损及心阳,导致心阳不振的病因病机,提出以益气举陷治其本。根据此法拟定了具有益气升陷活血作用的方药——抗纤益心方。方中红参大补元气,补脾益肺,且能益血生津,安神增智,黄芪具有补气升阳、利水消肿之功效,二者合用共为君药,补益心气并能补气生血、补气行血。丹参既活血祛瘀,又能养血补心,麦冬味甘微寒,养阴润肺,清心除烦,且制约红参、黄芪、白术温燥之性,共为佐药。益母草、泽兰活血祛瘀,利水消肿,茯苓健脾渗湿,益心安神,白术补气健脾燥湿。升麻入脾胃经,善引脾胃清阳之气上升,与黄芪共用对气虚下陷之证其效显著。

有研究^[8]显示,细胞凋亡在 DCM 发生和发展中起着重要的作用,过度的细胞凋亡导致细胞大量丢失,当细胞数量减少到一定程度时,可显著降低心肌收缩力,进而导致 DCM 的发生发展。促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 在调节细胞凋亡中起关键作用, Bcl-2 和 Bax 可以形成自身同源二聚体或异源二聚体,调节细胞的存活或凋亡^[9]。一旦细胞中促凋亡的 Bax 升高,抑制凋亡的 Bcl-2 降低,就会激活其下游的 Caspase-3,诱发细胞凋亡^[9]。因此,调节 Bcl-2/Bax 平衡以抑制细胞凋亡的发生与发展,可起到保护心肌细胞的作用。卡托

普利作为血管紧张素转化酶抑制剂类的经典代表药,治疗 DCM 主要是干预循环和肾素-血管紧张素-醛固酮系统,降低循环和血管中紧张素Ⅱ和醛固酮的含量等,抑制心肌细胞肥大,减少细胞凋亡,从而改善心室重构^[4],故本研究选其为对照药物。

本研究表明,与正常组比较,NE 使心肌细胞凋亡明显增加,用抗纤益心方和卡托普利干预后心肌细胞凋亡均减少,且二者作用相当。进一步从基因和蛋白层面研究结果显示,与正常组比较,模型组细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达明显上升,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达明显下降,表明 NE 可以影响凋亡相关因子的 mRNA 与蛋白的表达从而导致细胞凋亡。而经抗纤益心方及卡托普利干预后,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达均升高,Bax、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达降低,但在升高 Bcl-2 蛋白表达、降低 Bax 蛋白表达方面卡托普利优于抗纤益心方。总之,抗纤益心方能够抑制 H9c2 心肌细胞凋亡,其作用机制可能与上调 Bcl-2,下调 Bax、Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达有关。在后续实验中需进一步分析抗纤益心方各药物组分中有效成分与治疗靶点的对应关系,以深入探讨其作用机理。

参考文献

- [1] 葛均波,徐永健. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 261-262.
- [2] 赵蕾,杨新春. 扩张型心肌病致病基因及其筛查进展

[3]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(6): 499-501.

- [4] OKAMOTO T, SUZUKI T, KUSAKABE S, et al. Regulation of apoptosis during flavivirus infection [J]. Viruses, 2017, 9(9): 47-56.
- [5] PEREZ-CARIJO A, STELLER H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease [J]. Development, 2015, 142(19): 53-62.
- [6] 曾垂义,王振涛,陈磊. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病患者疗效观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 321-323.
- [7] 曾垂义,王振涛,陈磊. 抗纤益心方治疗扩张型心肌病患者心脏超声指标的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(1): 109-111.
- [8] DOMEN J, CHESHER SH, WEISSMAN IL. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential [J]. J Exp Med, 2000, 191(2): 253-264.
- [9] CHEN Q, XU H, XU A, et al. Inhibition of Bcl-2 sensitizes mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in ischemia-damaged mitochondria [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0118834.
- [10] CORY S, ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(9): 647-656.
- [11] 陶芳. 卡托普利治疗慢性心衰的临床效果分析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(92): 74.

Effects of Kangxian Yixin Formula (抗纤益心方) on Norepinephrine-induced H9c2 Cardiomyocytes Apoptosis and Expression of Apoptosis-related Factors

WANG Zhentao¹, YAN Jingjing², WU Hong², CHANG Hongbo², XU Shuwen², LI Qiaozhi²

(1. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002; 2. Henan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of Kangxian Yixin Formula (抗纤益心方) on norepinephrine (NE) -induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes and its possible mechanism. **Methods** The optimal concentration of Kangxian Yixin Formula was screened by CCK-8 method. Rat H9c2 cardiomyocytes were cultured routinely, and cells were grouped after starvation for 8 h. The normal group was not treated. The model group was supplemented with 100 $\mu\text{mol/L}$ NE 100 μl . The Kangxian Yixin Formula was added to the optimal concentration of Kangxian Yixin Formula solution 2 μl + 100 $\mu\text{mol/L}$ NE 100 μl , captopril group $2 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ captopril 5 μl + 100 $\mu\text{mol/L}$ NE 100 μl , each group had 3 duplicate wells for 24 h. The apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the expressions of apoptosis-related factors Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA and protein were detected. **Results** The final screening was performed at an intervention concentration of 0.25 mg/ml Kangxian Yixin Formula. Compared with the normal group, the apoptosis rate of the model group increased, the expression of Bax and Caspase-3 mRNA and protein increased, and the expression of Bcl-2 mRNA and protein decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the apoptosis rate of the Kangxian Yixin Formula group and the captopril group decreased, the expression of Bax and Caspase-3 mRNA and protein decreased, and the expression of Bcl-2 mRNA and protein increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Kangxian Yixin Formula can inhibit NE-induced H9c2 cardiomyocyte apoptosis, and its mechanism may be related to the regulation of apoptosis-related factors Bax, Bcl-2 and Caspase-3.

Keywords dilated cardiomyopathy; H9c2 cardiomyocytes; Kangxian Yixin Formula (抗纤益心方); apoptosis; norepinephrine

(收稿日期: 2019-07-16; 修回日期: 2019-08-22)

编辑: 邓 媛