

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.06.015

蒙药苏格木勒-3 汤对异丙肾上腺素诱导 HL-1 心肌细胞钙超载损伤的影响

王羽, 李凌儿, 于丽君, 刘明洁, 郭欣, 付瑶, 魏成喜*

内蒙古民族大学, 内蒙古自治区通辽市科尔沁区西拉木伦大街 996 号, 028000

摘要 目的 探讨苏格木勒-3 汤治疗心力衰竭的可能作用机制。方法 HL-1 心肌细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板, 常规培养 24 h 后进行分组: 空白对照组的不加任何处理的正常心肌细胞; 模型组加入终浓度为 $25 \mu\text{g/ml}$ 的异丙肾上腺素每孔 $100 \mu\text{l}$ 处理 24 h; 苏格木勒-3 汤高、中、低剂量组加入终浓度为 $25 \mu\text{g/ml}$ 异丙肾上腺素每孔 $100 \mu\text{l}$ 处理 24 h 后分别加入 75、50、 $25 \mu\text{g/ml}$ 苏格木勒-3 汤水提液每孔 $100 \mu\text{l}$ 处理 24 h; 苏格木勒-3 汤对照组加入 $75 \mu\text{g/ml}$ 苏格木勒-3 汤水提液每孔 $100 \mu\text{l}$ 处理 24 h。每组 5 个复孔。MTT 法检测各组 HL-1 心肌细胞存活率, 荧光显微镜检测细胞中钙离子浓度, Western blotting 法检测 HL-1 心肌细胞中肌浆网钙 ATP 酶 2a (SERCA2a) 蛋白表达。结果 与空白对照组比较, 模型组 HL-1 心肌细胞存活率、SERCA2a 蛋白表达下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 苏格木勒-3 汤高、中剂量组 HL-1 心肌细胞存活率增高, 苏格木勒-3 汤高、中、低剂量组 HL-1 心肌细胞 SERCA2a 蛋白表达量均增加 ($P < 0.01$)。荧光显微镜下显示, 模型组 HL-1 心肌细胞内钙离子浓度的荧光强度增加; 与模型组比较, 苏格木勒-3 汤中、高剂量组对 HL-1 心肌细胞内钙离子浓度的荧光强度逐渐下降。结论 蒙药苏格木勒-3 汤对 HL-1 心肌细胞钙超载具有抑制作用, 其机制可能与提高心肌细胞中 SERCA2a 蛋白表达有关。

关键词 心力衰竭; 苏格木勒-3 汤; 心肌细胞; 钙超载; 肌浆网钙 ATP 酶 2a

随着当今社会生活节奏加快, 慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 的发病率和死亡率逐年增高, 据估计我国患病人数高达 450 万^[1]。虽然医学发展改善了心力衰竭患者的预后, 但确诊为心力衰竭的患者中 30%~40% 在 1 年内死亡, 60%~70% 的患者在 5 年内死亡^[2]。苏格木勒-3 汤又名豆蔻三味汤, 是内蒙古民族大学附属医院自制的蒙药制剂, 由白豆蔻、白芨、芫花组成, 为赫依病之专方 (赫依相当于中医理论中的“气”), 尤其对心赫依病效果更佳^[3]。前期研究^[4]表明, 苏格木勒-3 汤可以有效对抗心肌肥厚, 缓解心肌细胞损伤。CHF 最基础的病理改变是心肌收缩/舒张功能受损, 心肌细胞兴奋-收缩偶联障碍, 其中肌浆网钙 ATP 酶 2a (SERCA2a) 对心肌细胞兴奋-收缩偶联起到关键性作用^[5]。本研究利用异丙肾上腺

素诱发 HL-1 心肌细胞钙超载模型并用苏格木勒-3 汤干预, 观察苏格木勒-3 汤对 SERCA2a 蛋白表达的影响, 为苏格木勒-3 汤临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

HL-1 心肌细胞, 由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 药物

苏格木勒-3 汤 (批准文号: 哲卫准字 9604-27) 由内蒙古民族大学第一临床医学院蒙药制剂室生产, 由白豆蔻、白芨、芫花按照 3 : 2 : 1 比例磨成粉末混合组成。苏格木勒-3 汤水提液制备: 将蒸馏水煮沸溶解药物粉末, 封口膜密封瓶口搅拌 24 h, 随后使用十层纱布多次过滤直至溶液能够顺利通过纱布为止以去除渣滓, 过滤后的溶液在超净台中使用孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤器进行过滤由此制成浓度为 2 mg/ml 的母液, 随后使用培养基将母液稀释成所需的 3 个浓度即 75、50、 $25 \mu\text{g/ml}$, 前期研究^[4]结果显示, 此 3 个浓度的苏格木勒-3 汤对心肌细胞损伤有效性最显著, 故本研究设为高、

基金项目: 国家自然科学基金 (81760780, 81560590, 8186140942); 内蒙古自治区自然科学基金博士基金 (2016BS0806); 内蒙古自治区高等学校“青年科技英才”支持计划 (NJYT49-B14)

* 通讯作者: weichengxi1224@163.com

中、低浓度。

1.3 主要试剂及仪器

异丙肾上腺素 (批号: 51309), 美国 Sigma 公司; DMSO (批号: 67685), 天津市大茂化学试剂厂; 荧光钙指示剂 Fluo-4 (批号: F8501), Solarbio 公司; Hank's 平衡盐溶液 (批号: 14025076), Thermo Fisher Scientific 公司; SERCA2a 抗体 (批号: ab3625), Abcam 公司; 胎牛血清 (批号: 1809249), 美国 Biological Industries 公司; DMEM 高糖培养基 (批号: SH30022.01), 美国 Hyclone 公司; MTT 溶液 (批号: 298931)、RIPA 裂解液 (批号: R21233), 源叶生物科技有限公司; ECL 发光液 (货号: WBKLS0550), Millipore 公司。

酶标仪 (FC 型, Thermo 公司); 荧光显微镜 (IX53 型, Olympus 公司)。

1.4 心肌细胞钙超载模型的建立^[4]及干预方法

HL-1 心肌细胞按每孔 1×10^5 个细胞接种于 96 孔板, 常规培养 24 h 后分为 6 组。空白对照组: 不加任何处理的正常心肌细胞; 模型组: 终浓度为 25 $\mu\text{g/ml}$ 异丙肾上腺素每孔 100 μl 处理 24 h; 苏格木勒-3 汤高、中、低剂量组: 终浓度为 25 $\mu\text{g/ml}$ 异丙肾上腺素每孔 100 μl 处理 24 h 后分别加入 75、50、25 $\mu\text{g/ml}$ 苏格木勒-3 汤水提液每孔 100 μl , 处理 24 h; 苏格木勒-3 汤对照组: 75 $\mu\text{g/ml}$ 苏格木勒-3 汤水提液每孔 100 μl , 处理 24 h。每组 5 个复孔。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 心肌细胞存活率 采用 MTT 法检测。每孔中加入 10 μl 5 mg/ml 浓度的 MTT 溶液, 在 CO_2 培养箱中孵育 3.5 ~ 4 h 后吸去培养液, 每孔加入 150 μl DMSO 溶解细胞中产生的甲臞结晶, 震荡 10 min 后, 酶标仪在 570 nm 处检测 OD 值, 计算心肌细胞存活率 = $(\text{OD}_{\text{给药}} - \text{OD}_{\text{空白}}) / (\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.5.2 心肌细胞中钙离子浓度 荧光钙指示剂 Fluo-4 配制于无水 DMSO 中的储存母液, 浓度为 2 mmol/L。将 Fluo-4 浓度使用培养基稀释为 0.5 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞铺板长至 70% ~ 80% 时使用 Hank's 平衡盐溶液清洗 3 次, 将适当溶液完全覆盖于细胞, 37℃ 细胞培养箱孵育 10 ~ 60 min 进行荧光钙指示剂 Fluo-4 装载, 随后使用 Hank's 平衡盐溶液洗涤 3 次, 洗涤后再孵育 20 ~ 30 min。荧光显微镜 100 倍下观察。

1.5.3 心肌细胞中 SERCA2a 蛋白表达 采用 Western blotting 法检测。RIPA 裂解液提取 HL-1 心

肌细胞蛋白后, 依次进行配胶、加样并跑胶、转膜、封闭、孵一抗、孵二抗、ECL 显色。采用 Image J 软件 (V1.8.0 版) 进行蛋白条带分析, GAPDH 为内参, 结果用解析度 (DPI) 表示。实验重复 3 次, 取平均值。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件处理, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较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 各组 HL-1 心肌细胞存活率比较

表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组 HL-1 心肌细胞存活率明显下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 苏格木勒-3 汤对照组和苏格木勒-3 汤高、中剂量组 HL-1 心肌细胞存活率增高 ($P < 0.01$), 而苏格木勒-3 汤低剂量组的 HL-1 心肌细胞存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。苏格木勒-3 汤低、中剂量组 HL-1 心肌细胞存活率明显低于苏格木勒-3 汤高剂量组和苏格木勒-3 汤对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组 HL-1 心肌细胞存活率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	存活率
空白对照组	5	99 $\pm$ 5
模型组	5	51 $\pm$ 3*
苏格木勒-3 汤对照组	5	98 $\pm$ 3 Δ
苏格木勒-3 汤高剂量组	5	81 $\pm$ 6 Δ
苏格木勒-3 汤中剂量组	5	62 $\pm$ 2 Δ Δ [#]
苏格木勒-3 汤低剂量组	5	55 $\pm$ 1 Δ [#]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; 与苏格木勒-3 汤对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与苏格木勒-3 汤高剂量组比较, # $P < 0.05$

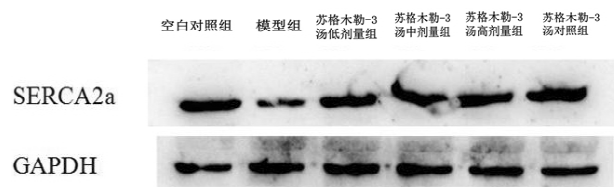
2.2 各组 HL-1 心肌细胞中钙离子表达比较

荧光显微镜下显示, 与空白对照组比较, 模型组 HL-1 心肌细胞内钙离子浓度的荧光强度增加; 与模型组比较, 苏格木勒-3 汤低剂量组对 HL-1 心肌细胞内钙离子浓度的荧光强度无明显影响, 但随着苏格木勒-3 汤浓度增加, 细胞内钙离子荧光强度逐渐下降。苏格木勒-3 汤对照组液对 HL-1 心肌细胞中钙离子浓度无影响。

2.3 各组心肌细胞中 SERCA2a 蛋白表达比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型组 SERCA2a 蛋白表达下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 苏格木勒-3 汤各剂量组 HL-1 心肌细胞 SERCA2a 蛋白表达量均升高 ($P < 0.01$), 而苏格木勒-3 汤对照

组心肌细胞中 SERCA2a 蛋白差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。苏格木勒-3 汤高、中剂量组心肌细胞 SERCA2a 蛋白表达量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；苏格木勒-3 汤低剂量组 SERCA2a 蛋白表达量低于苏格木勒-3 汤高剂量组和苏格木勒-3 汤对照组 ($P < 0.05$)。各组 HL-1 心肌细胞 SERCA2a 蛋白表达电泳图见图 1。



注：SERCA2a，肌浆网钙 ATP 酶 2a

图 1 各组 HL-1 心肌细胞 SERCA2a 蛋白电泳图

表 2 各组 HL-1 心肌细胞中 SERCA2a 蛋白表达比较 (DPI, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	SERCA2a 蛋白
空白对照组	3	24583 ± 4123
模型组	3	11494 ± 2378*
苏格木勒-3 汤对照组	3	21470 ± 3248▲
苏格木勒-3 汤高剂量组	3	22798 ± 4194▲
苏格木勒-3 汤中剂量组	3	21679 ± 3278△
苏格木勒-3 汤低剂量组	3	19373 ± 3769△

注：SERCA2a，肌浆网钙 ATP 酶 2a；与空白对照组比较，

* $P < 0.01$ ；与模型组比较，△ $P < 0.01$ ；与苏格木勒-3 汤低剂量组比较，▲ $P < 0.05$

3 讨论

根据心力衰竭的临床症状将其归纳为蒙医中“阿格萨”和“赫依”。《蒙医临床学》中记载阿格萨病为呼吸困难，胸闷，发病时张口，端坐，呼吸憋闷或停止，尤其是活动或快速步行、爬坡、饱食等可致胸闷，呼吸困难加重。心赫依病译为“吉如很赫依”，由赫依、希拉、巴达干失调相搏而引起的一种病症。蒙医认为，心为具有意识、司血行功能的脏器，居于巴达干之位置，在五元中属火。然而心为病变赫依主要串行之道，故临床上心病属赫依性者常见。由于赫依失衡后串行心脏，与巴达干相搏，影响希拉，遂成此病。治宜以镇赫依、安心为原则。蒙药苏格木勒-3 汤是蒙药传统复方，在蒙医著作《四部医典》《蒙医方剂学》《蒙医百科全书》中均有记载，为蒙医理论中抑赫依病之良方。方中君药白豆蔻味辛、性温；臣药白苣胜微甘、性平，葶苈味辛、性温，三药联用具有抑赫依、解热、镇痛作用。前期研究^[8]表明，苏

格木勒-3 汤含药血清明显减少异丙肾上腺素诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞损伤现象。本研究结果表明，苏格木勒-3 汤可以明显提高 HL-1 心肌细胞存活率并呈剂量依赖性。

钙离子作为细胞第二信使，在心肌细胞兴奋-收缩偶联中发挥着重要作用，各种心血管疾病如心力衰竭等与心肌细胞中钙离子超载密切相关^[9]。本实验采用 Fluo-4 AM 染色发现异丙肾上腺素可导致心肌细胞内钙离子超载现象，而给予苏格木勒-3 汤后，钙离子超载现象有所缓解，并呈剂量依赖性。推测苏格木勒-3 汤是通过减低钙离子超载从而提高 HL-1 心肌细胞存活率。钙离子主要储存在肌质网，当心肌细胞兴奋时肌质网释放钙离子到胞质中，而心肌细胞兴奋后，钙离子通过 SERCA2a 回到肌质网中储存^[10]。有研究^[11]发现，心血管疾病发生过程中，SERCA2a mRNA 的表达水平下降。异丙肾上腺素是诱发 SERCA 表达下调的重要原因^[11-12]。本实验发现，异丙肾上腺素可导致 HL-1 心肌细胞中 SERCA2a 蛋白表达下调，而给予苏格木勒-3 汤各剂量干预后，SERCA2a 蛋白表达提高，并且以高剂量提高最明显。

综上所述，苏格木勒-3 汤可有效缓解异丙肾上腺素诱导的 HL-1 心肌细胞损伤，其机制可能与提高心肌细胞 SERCA2a 蛋白表达，从而维持 SERCA2a 摄取静息期钙离子的能力，缓解 HL-1 心肌细胞内钙离子超载有关。

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] MANN DL. Getting pumped about heart failure [J]. Cell Metab, 2014, 19(6): 896-897.
- [3] 白春明. 蒙药苏格木勒-3 汤的心肌保护作用及临床疗效 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(49): 156, 162.
- [4] 王羽, 刘明洁, 付瑶, 等. 苏格木勒-3 汤对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚后 Caspase3/9 表达的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(5): 390-392, 397.
- [5] 吴锦波, 叶小汉, 冼绍祥, 等. 比索洛尔对心力衰竭大鼠心肌肌浆网钙 ATP 酶 2A 活性的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(1): 86-91.
- [6] 郭欣. 蒙药苏格木勒-3 汤通过抑制内质网应激改善大鼠心肌肥厚的作用研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2019.
- [7] MEDZIKOVIC L, SCHUMACHER CA, VERKERK AO, et al. Orphan nuclear receptor Nur77 affects cardiomyocyte

- calcium homeostasis and adverse cardiac remodelling [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15404. doi: 10.1038/srep15404.
- [8] WANG Y, GONG GH, XU YN, et al. Sugemule-3 protects against ISO-induced cardiotoxicity in vitro [J]. Pharmacogn Mag, 2017, 13(51): 517-522.
- [9] 戴红良, 贾桂枝, 赵颂, 等. 黄芪多糖对异丙肾上腺素诱发的 SERCA2a 表达及活性降低的影响 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(3): 388-391.
- [10] 岳语喃, 杨水祥. 心力衰竭心肌细胞内钙离子转运及细胞重构 [J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(14): 4002-4004.
- [1] 李俊平, 郭丽丽, 陈中, 等. 钙超载与心肌缺血再灌注损伤及中药干预策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2168-2173.
- [2] LINCK B, BOKNIK P, BABA HA, et al. Long-term beta adrenoceptor-mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in mammalian ventricle [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 286(1): 531-538.

Effects of Mongolian Medicine *Sugemule-3 Decoction* (苏格木勒-3 汤) on Isoproterenol-induced Calcium Overload Injury in HL-1 Cardiomyocytes

WANG Yu, LI Ling'er, YU Lijun, LIU Mingjie, GUO Xin, FU Yao, WEI Chengxi

Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, 028000

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Sugemule-3 Decoction* (苏格木勒-3 汤) in the treatment of heart failure. **Methods** HL-1 cardiomyocytes were inoculated into 96-well plates at 1×10^5 cells per well, and they were grouped after 24 h of routine culture. In blank control group, there were normal cardiomyocytes without any treatment. Model group was added with 100 μ l isoproterenol per well with a final concentration of 25 μ g/ml to process for 24 h. After being added with 100 μ l isoproterenol per well with a final concentration of 25 μ g/ml to process for 24 h, *Sugemule-3 Decoction* groups of high, medium and low doses were added with 75, 50, and 25 μ g/ml water extract of *Sugemule-3 Decoction*, respectively, to process for 24 h, with 100 μ l per well. There were 5 double wells in each group. MTT method was used to detect the survival rate of HL-1 cardiomyocytes in each group. Calcium ion concentration was detected by fluorescence microscope. Western blotting method was used to detect protein expression of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2a (SERCA2a) in HL-1 cardiomyocytes. **Results** Compared with the blank control group, the survival rate of HL-1 cardiomyocytes and the expression of SERCA2a protein in the model group were decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the survival rates of HL-1 cardiomyocytes in the high and medium dose groups of *Sugemule-3 Decoction* were increased, and the expressions of SERCA2a protein in HL-1 cardiomyocytes of the high, medium and low dose groups of *Sugemule-3 Decoction* were increased ($P < 0.01$). Fluorescence microscope showed that the fluorescence intensity of calcium ion concentration in HL-1 cardiomyocytes of the model group was increased; compared with the model group, the fluorescence intensities of calcium ion concentration in HL-1 cardiomyocytes in the medium and high dose groups of *Sugemule-3 Decoction* were decreased. **Conclusion** Mongolian medicine *Sugemule-3 Decoction* can inhibit calcium overload of HL-1 cardiomyocytes, and its mechanism may be related to increasing SERCA2a protein expression in cardiomyocytes.

Keywords heart failure; *Sugemule-3 Decoction* (苏格木勒-3 汤); cardiomyocyte; calcium overload; sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2a

(收稿日期: 2019 - 07 - 01; 修回日期: 2019 - 09 - 09)

编辑: 邓 媛