

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.15.016

附子、甘草有效成分不同配伍比例对 H9c2 心肌细胞缺氧缺糖损伤的影响

王利勤, 张宇燕, 何昱, 万海同, 周惠芬, 杨洁红*

(浙江中医药大学, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053)

摘要 目的 研究附子有效成分次乌头碱和甘草有效成分甘草次酸不同比例配伍对 H9c2 心肌细胞缺氧缺糖损伤的影响及可能作用机制。方法 取长成致密单层的 H9c2 心肌细胞分成正常组、模型组、地高辛组 (80 $\mu\text{mol/L}$)、次乌头碱组 (120 $\mu\text{mol/L}$) 及 1:0.5 组、1:1 组、1:2 组 (次乌头碱为 120 $\mu\text{mol/L}$, 甘草次酸分别为 60、120、240 $\mu\text{mol/L}$), 每组 6 个复孔。正常组加入完全培养基 1 ml, 模型组加入无糖 Earle's 液 1 ml, 地高辛组、次乌头碱组和各配伍组分别加相应药时加入无糖 Earle's 液稀释成相应浓度, 加入 1 ml, 除正常组外其余各组加药后构建缺氧缺糖模型培养 4 h。观察各组 H9c2 心肌细胞的形态学变化, 检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β), 肌酸肌酶 (CK) 的含量及 Caspase-3、Fas-L、Fas 蛋白表达。结果 正常组心肌细胞呈贴壁生长, 多为梭形, 形成不规则的星形, 并形成呈放射状排列的细胞簇; 模型组心肌细胞胞体折光性下降, 胞浆皱缩, 可见折光性强的脱壁死亡细胞; 各配伍组的细胞形态较模型组均有明显改善, 并以配伍组 1:1 组最明显。与正常组比较, 模型组 TNF- α 、IL-1 β 、CK 含量及 Caspase-3、Fas-L、Fas 的蛋白表达均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 次乌头碱组各组指标均无明显改变 ($P > 0.05$); 而地高辛组和各配伍组不同程度降低 TNF- α 、IL-1 β 、CK 含量及 Caspase-3、Fas-L、Fas 蛋白表达, 并且以 1:1 组效果最好 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 次乌头碱配伍甘草次酸对心肌细胞缺氧缺糖损伤有保护作用, 并以 1:1 配伍最佳, 其作用机制可能与抗炎及抑制细胞凋亡有关。

关键词 附子; 甘草; 次乌头碱; 甘草次酸; 药物配伍; 缺氧缺糖; 炎症因子; 细胞凋亡

附子与甘草配伍是中医经典药对, 源于张仲景的《伤寒论》。陶弘景《神农本草经集注》曰: “俗方每用附子, 皆须甘草、人参、生姜相配者, 正制其毒故也。”现代研究表明, 附子的主要活性成分为二萜类生物碱, 其中双酯型生物碱毒性最大, 主要包括乌头碱、新乌头碱以及次乌头碱^[1]。有研究通过监测四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的含量变化, 发现次乌头碱在水中的热稳定性较乌头碱、中乌头碱均更高^[2]。甘草次酸为甘草中的主要有效成分, 研究表明, 甘草中甘草酸等有效成分在体内转化为甘草次酸后才被吸收, 故可推测甘草次酸在甘草产生作用的过程中较其他有效成分更稳定^[3]。对于次乌头碱与甘草次酸的配伍比例的选

择, 本实验通过搜集整理《中医方剂大辞典》^[4]中关于附子和甘草最常用的配伍比例以及预实验结果, 选择了 1:0.5、1:1 及 1:2 三种配伍比例, 观察其对心肌细胞缺氧缺糖模型的影响, 以探讨该药对对心功能衰竭作用的最佳配伍比例。

1 材料

1.1 细胞

H9c2 大鼠心肌细胞株第 18 代购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.2 药品与试剂

次乌头碱 (批号 6900-87-4)、甘草次酸 (批号 471-53-4) 均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司 (纯度 $\geq 98\%$); 地高辛片 (批号 020140206) 购于上海信谊药厂有限公司; DMEM 高糖培养基 (批号 21063-029) 购于美国 Gibco 公司; 新生胎牛血清 (批号 140130) 购于上海圣纳堡生物科技开发有限公司; 双抗 (100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素 + 100 $\mu\text{g/ml}$

基金项目: 国家自然科学基金 (81473412); 浙江省中医药 (中西医结合) 重点学科 (2012-XK-A06); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目

* 通讯作者: yannoo7376@126.com

链霉素,批号 L0022-400) 购于上海斯信生物技术有限公司;四噻唑蓝 (MTT,批号 08/2016) 及 0.25% EDTA 胰酶 (批号 08/2015) 均购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,批号 201506)、白细胞介素 1β (IL- 1β ,批号 201506) 及肌酸肌酶 (CK,批号 201506) Elisa 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;兔抗 Caspase-3 (批号 ab32351)、Fas-L (批号 ab21233) 及 Fas 蛋白多克隆抗体 (批号 ab133419) 均购于美国 Abcam 公司;山羊抗鼠 IgG 抗体 (批号 sc-2005) 及 β 肌动蛋白 (β -actin,批号 sc-47778) 均购于美国 Santa Cruze 生物技术公司;牛血清白蛋白 (批号 ST023) 购自碧云天生物技术公司;ECL 试剂 (批号 34079) 购自美国 Thermo 公司。

1.3 主要仪器

TE2000-U 型倒置相差荧光显微镜 (日本 Nikon 公司);SWCF-4FD 型超净工作台 (上海博讯设备有限公司);3111 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司);LD25-2 型低温离心机 (北京医用离心机厂);Molecular Devices SpectraMAX Plus 384 型酶标仪 (美国 MD 公司);ChemiDoc XRS + 型凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 H9c2 大鼠心肌细胞的培养

取对数生长期的 H9c2 心肌细胞,弃旧培养基,用 PBS 缓冲液洗 3 遍后,把 0.25% EDTA 胰酶用 PBS 稀释成浓度为 0.125% EDTA 胰酶,加入 1 ml 0.125% EDTA 胰酶进行消化 1~2 min,在显微镜下观察细胞大部分变圆,即加入含 20% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基终止消化,巴氏管轻轻吹打培养瓶底,2~3 min 成细胞悬液,800 r/min 离心 3 min,去上清,加入含 20% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基轻柔吹打 1~2 min 成细胞悬液,按 1×10^6 个/ml 密度接种于细胞培养瓶,放于 37℃、5% CO₂ 培养箱内,继续传代培养,每 2 天换液 1 次,3~4 天后可用以实验或进行下一次传代。

1.5 H9c2 大鼠心肌细胞缺氧缺糖模型的构建

取对数生长期的心肌细胞按照 1×10^6 个/ml 密度接种于 6 孔板,每孔终体积为 1 ml,培养 2~3 天,至细胞铺满孔板,加药前 12 h 更换无血清的 DMEM 液;加药前去原培养基,用预温的 PBS 缓冲液清洗 2 遍,用自配无糖 Earle's 液^[9] 置换原培养基。将培养板放入缺氧装置中,通入 95% N₂ 和

5% CO₂ 混合气体充满缺氧盒后,用封口膜密封缺氧装置,将缺氧盒放置于 37℃ 细胞培养箱中培养 4 h,构建心肌细胞缺氧缺糖模型^[9]。

1.6 次乌头碱、甘草次酸及地高辛细胞毒性剂量测定

用 DMEM 培养基配制次乌头碱、甘草次酸及地高辛成 1 mmol/L 的储备液,将 H9c2 心肌细胞接种到 96 孔板中长成致密单层后,依次加入各浓度的药物 1 ml 孵育 4 h,同时设定对照孔、空白对照孔,采用 MTT 法,于酶标仪测定 490 nm 处 OD 值,根据公式细胞存活率 (%) = $(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白对照组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 测得各药物的非细胞毒性浓度范围。

1.7 细胞分组及给药

取长成致密单层的 H9c2 心肌细胞,分成正常组、模型组、地高辛组、次乌头碱组、1:0.5 组、1:1 组、1:2 组,每组 6 个复孔。正常组加入完全培养基 1 ml,模型组加入无糖 Earle's 液 1 ml,次乌头碱、甘草次酸及地高辛分别用无糖 Earle's 液配成 1 mmol/L 的储备液,加药时用无糖 Earle's 液稀释成相应浓度,加入 1 ml。正常组仍放回于 37℃、5% CO₂ 培养箱静置培养 4 h,其他组加药后构建缺氧缺糖模型培养 4 h。

1.8 观察指标及方法

1.8.1 细胞形态学观察 造模 4 h 后,于倒置显微镜下观察各组细胞形态,并拍照记录。

1.8.2 炎症因子 TNF- α 、IL- 1β 及 CK 含量测定 提取各组细胞培养上清液,分装入 1.5 ml 预冷的 EP 管内,按照 TNF- α 、IL- 1β 及 CK Elisa 试剂盒的说明书操作,测得各指标的含量。

1.8.3 Caspase-3、Fas 及 Fas-L 表达 采用 Western Blotting 法检测,各组细胞给药造模 4 h 后,收集细胞,用蛋白裂解液充分裂解,离心后收集上清,提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,取 50 μ g 总蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后,电转至二氟乙烯 (PVDF) 膜,5% 牛血清白蛋白室温 4℃ 封闭 1 h,一抗用兔抗蛋白多克隆抗体 (1:1000) 4℃ 过夜,洗膜后与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体室温孵育 1 h,用保鲜膜包被后转至 X 线片曝光 3 min。实验以 β -actin 为内参。独立重复 3 次,凝胶成像分析系统分析目的蛋白表达情况。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量资料数据

均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用方差分析; 方差齐性时, 两组间的差异采用 *LSD* 检验进行分析; 否则, 采用 *Tamhane* 检验进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 H9c2 心肌细胞形态学观察结果

正常组心肌细胞呈贴壁生长, 正常细胞多为梭形, 也可见棱形和多角形; 伸出伪足, 形成不规则的星形, 并形成呈放射状排列的细胞簇。用药 4 h 后镜下可见各组心肌细胞不同程度的胞体折光性下降, 胞浆皱缩, 伪足减少, 甚至细胞突起缩短; 细胞表面可形成类似“菜花状”的大泡; 胞浆内黑褐色的沉着斑点增多, 可见折光性强的胞壁死亡细胞。其中次乌头碱组细胞形态较模型组没有明显改变, 而各配伍组的细胞形态较模型组均有明显改变, 并以配伍组 1 : 1 组最明显。

2.2 次乌头碱、甘草次酸及地高辛对 H9c2 心肌细胞毒性实验结果

表 1 示, 根据细胞存活率大于 90%, 确定各药物的非细胞毒性剂量为次乌头碱 0 ~ 120 $\mu\text{mol/L}$, 甘草次酸 0 ~ 240 $\mu\text{mol/L}$, 地高辛 0 ~ 80 $\mu\text{mol/L}$ 。选取次乌头碱 120 $\mu\text{mol/L}$, 甘草次酸 60、120、240 $\mu\text{mol/L}$, 地高辛 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进行实验。

2.3 各组 H9c2 心肌细胞 TNF- α 、IL-1 β 及 CK 含量比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 TNF- α 、IL-1 β 及 CK 含量显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地高辛组、1 : 0.5 组、1 : 1 组及 1 : 2 组 TNF- α 、IL-1 β 及 CK 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与地高辛组比较, 次乌头碱组、1 : 0.5 组、1 : 1 组及 1 : 2 组 TNF- α 、IL-1 β 含量升高, 次乌头碱组及 1 : 0.5 组、1 : 2 组 CK 含量亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 1 : 1 组比较, 次乌头碱组和 1 : 0.5 组 IL-1 β 、CK 含量明显升高, 1 : 2

表 1 不同浓度次乌头碱、甘草次酸及地高辛干预 H9c2 心肌细胞后细胞存活率比较 ($\bar{x} \pm s$)

药物	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	样本数	细胞存活率
次乌头碱	30	6	99.22 $\pm$ 0.45
	60	6	95.86 $\pm$ 0.71
	120	6	90.17 $\pm$ 0.06
	240	6	78.97 $\pm$ 1.24
	480	6	70.55 $\pm$ 1.70
甘草次酸	30	6	99.32 $\pm$ 0.45
	60	6	96.25 $\pm$ 1.13
	120	6	92.08 $\pm$ 1.61
	240	6	90.61 $\pm$ 0.37
	480	6	86.63 $\pm$ 1.10
地高辛	10	6	99.30 $\pm$ 0.37
	20	6	97.14 $\pm$ 0.34
	40	6	95.10 $\pm$ 0.17
	80	6	90.26 $\pm$ 0.96
	160	6	81.21 $\pm$ 1.04

组 IL-1 β 含量亦高于 1 : 1 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。次乌头碱组和各配比组 TNF- α 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组 H9c2 心肌细胞 Caspase-3、Fas 及 Fas-L 蛋白表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组 Caspase-3、Fas 及 Fas-L 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地高辛组、1 : 0.5 组、1 : 1 组和 1 : 2 组 Caspase-3、Fas 及 Fas-L 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)。与地高辛组比较, 次乌头碱组、1 : 0.5 组、1 : 2 组 Caspase-3、Fas 及 Fas-L 蛋白表达明显升高, 1 : 1 组仅 Caspase-3、Fas 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 1 : 0.5 组比较, 1 : 1 组及 1 : 2 组的 Caspase-3 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 1 : 1 组 Fas 蛋白表达降低、1 : 2 组 Fas 蛋白表达升高, 1 : 1 组和 1 : 2 组 Fas-L 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 1 : 1 组比较, 1 : 2 组 Fas 及 Fas-L 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组 H9c2 心肌细胞 TNF- α 、IL-1 β 及 CK 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	CK (U/L)
正常组	6	178.8 $\pm$ 4.3	18.8 $\pm$ 1.6	70.8 $\pm$ 3.9
模型组	6	271.0 $\pm$ 10.6*	37.9 $\pm$ 1.6*	83.8 $\pm$ 2.0*
地高辛组	6	184.5 $\pm$ 5.4 ^{##}	22.8 $\pm$ 2.4 ^{##}	73.8 $\pm$ 2.7 ^{##}
次乌头碱组	6	235.9 $\pm$ 15.4 $\Delta\Delta$	36.3 $\pm$ 2.7 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	80.7 $\pm$ 1.5 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
1 : 0.5 组	6	218.3 $\pm$ 5.8 ^{#$\Delta\Delta$}	34.3 $\pm$ 2.0 ^{#$\Delta\Delta\Delta\Delta$}	79.7 $\pm$ 3.5 ^{#$\Delta\Delta\Delta$}
1 : 1 组	6	218.9 $\pm$ 7.3 ^{##$\Delta\Delta$}	28.1 $\pm$ 3.8 ^{##$\Delta\Delta$}	75.4 $\pm$ 1.6 ^{##}
1 : 2 组	6	221.3 $\pm$ 13.0 ^{#$\Delta\Delta$}	32.7 $\pm$ 2.7 ^{##$\Delta\Delta\Delta\Delta$}	77.9 $\pm$ 2.2 ^{##Δ}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; CK, 肌酸肌酶; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与地高辛组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; 与 1 : 1 组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$

表 3 各组 H9c2 心肌细胞 Caspase-3、Fas 及 Fas-L 蛋白表达比较 ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Caspase-3	Fas	Fas-L
正常组	6	0.006349 $\pm$ 0.0004572	0.167135 $\pm$ 0.0020911	0.052412 $\pm$ 0.0040315
模型组	6	0.068542 $\pm$ 0.0002203 [*]	0.305915 $\pm$ 0.0118171 [*]	0.180353 $\pm$ 0.0072098 [*]
地高辛组	6	0.013365 $\pm$ 0.0010296 [#]	0.189946 $\pm$ 0.0064680 [#]	0.071945 $\pm$ 0.0063542 [#]
次乌头碱组	6	0.067378 $\pm$ 0.0039015 ^{△△}	0.303448 $\pm$ 0.0029782 ^{△△}	0.179058 $\pm$ 0.0061623 ^{△△}
1 : 0.5 组	6	0.048601 $\pm$ 0.0034304 ^{#△△}	0.266351 $\pm$ 0.0111368 ^{#△△}	0.125253 $\pm$ 0.0052131 ^{#△△}
1 : 1 组	6	0.027910 $\pm$ 0.0008768 ^{#△}	0.226614 $\pm$ 0.0028741 ^{#△△▲▲}	0.079236 $\pm$ 0.0035082 ^{#▲▲}
1 : 2 组	6	0.032596 $\pm$ 0.0014139 ^{#△}	0.283337 $\pm$ 0.0101708 ^{#△△▲▲▽}	0.101395 $\pm$ 0.0029326 ^{#△△▲▲▽}

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.01$ ；与地高辛组比较，△ $P < 0.05$ ，△△ $P < 0.01$ ；与 1 : 0.5 组比较，▲ $P < 0.05$ ，▲▲ $P < 0.01$ ；与 1 : 1 组比较，▽ $P < 0.01$

3 讨论

心肌缺血缺氧可引起心肌细胞代谢紊乱，随着能量物质的生成减少，心肌细胞出现凋亡，心肌细胞的收缩功能也逐渐出现退化，引起正常心功能的难以维持，进而造成心室重构和心力衰竭^[1]。附子、甘草作为临床具有代表性的治疗心功能衰竭的中药配伍，配伍甘草后可以使附子毒性降低四倍之多^[2]。已经有研究通过观察附子、甘草不同比例的水提液对小鼠半数致死量及半数中毒剂量的影响，得出甘草能够通过提高附子的中毒剂量来发挥减毒的作用^[3]。从本实验次乌头碱和甘草次酸不同配伍比例对心肌细胞形态学的改变中，可见各配伍组的细胞形态均比次乌头碱组好，其中以 1 : 1 配伍组细胞形态最好。

有研究表明，炎症因子的产生贯穿在心肌细胞损伤的全过程^[10-12]。在心肌坏死的早期即能产生 TNF- α 、IL-1 β 等因子，其中 TNF- α 对炎症反应有重要的介导作用，可以刺激细胞进一步分泌白细胞介素类的炎症因子，促进其与细胞黏附因子结合，加剧细胞缺血区内皮细胞的损伤，引起心肌细胞的坏死，诱导心肌细胞凋亡。CK 是心肌细胞内重要的能量代谢酶，为急性心肌损伤的血清标记物^[13]。有研究提出，心肌缺血也会使细胞膜、线粒体受损伤，导致膜通透性增加，CK 等心肌酶释放至血液中^[14]，故心肌酶的活性大小也可反映心肌细胞的损伤程度。本研究结果显示，次乌头碱组对细胞炎症因子的影响并不明显，而地高辛组和各配伍组通过不同程度降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平，减少 CK 的释放，来保护心肌细胞在缺血缺氧模型中的损伤，特别是 1 : 1 配伍组效果最佳。

心肌缺血缺氧时，细胞会发生坏死和凋亡，并且该损伤程度决定心功能受损程度^[15]。Fas/Fas-L 系统是体内直接启动细胞凋亡的细胞死亡信号系统，其中 Fas 为死亡受体，Fas-L 为死亡因子，是前者的天然配体，属于肿瘤坏死因子家族成员；细

胞可以通过两者之间的相互特异结合来调控其增殖和分化^[16]。在心肌细胞凋亡过程中，通过激活神经内分泌系统，引起 Fas/Fas-L 系统基因的表达增加，激活细胞凋亡蛋白酶 Caspase-3，进一步引起细胞凋亡^[17-18]。本实验中地高辛组和各配伍组与模型组相比，各蛋白水平均有不同程度下降，证实次乌头碱配伍甘草次酸可能通过调控 Fas/Fas-L 而有效降低心肌细胞的凋亡，特别是 1 : 1 配伍组改善程度最大。

综上所述，附子、甘草中主要有效成分次乌头碱配伍甘草次酸对心肌细胞缺氧缺血损伤有保护作用，其中以 1 : 1 配伍组效果最佳，其作用机制可能是通过抗炎和抗凋亡途径产生。

参考文献

- [1] 续海训,徐康雅. 参附注射液附子成分分析 [J]. 中医杂志, 2003, 44(9): 677.
- [2] 王勇,石磊,金东明,等. 四逆汤煎煮过程中乌头类生物碱的溶出和水解平衡 [J]. 中草药, 2003, 43(4): 311-314.
- [3] 刘卉,陈乐天,恽菲,等. 甘草吸收代谢特征与机制及其配伍用药相互影响研究与思考 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1443-1447.
- [4] 彭怀仁. 中医方剂大辞典: 第一册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [5] 廖章萍,刘瑶丹,王淑霞,等. AE3 通过 NO 通路参与心肌细胞缺氧预适应的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1): 39-43.
- [6] RIZVI M, JAWAD N, LI Y, et al. Effect of noble gases on oxygen and glucose deprived injury in human tubular kidney cells [J]. Exp Bio Medicine (Maywood), 2010, 235(7): 886-891.
- [7] 王彩歌,王永霞. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 8(7): 734-736.
- [8] 李波,吴美兰,周昕欣,等. 中药毒性产生的原因及减毒方法 [J]. 中医杂志, 2006, 47(10): 788.
- [9] 解素花,张广平,孙桂波,等. 附子与甘草不同配伍比例配伍减毒的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2210-2214.
- [10] 唐丹丽,刘寨华,隋宇,等. 中药防治心肌缺血再灌注

损伤炎症反应作用机制研究概况 [J]. 中医杂志, 2014, 55(11): 980-983.

- [1] YU M, WEN N, WENZHONG Z, et al. Effect of repeated ischaemic preconditioning on TLR4 and proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β in myocardial ischaemia-reperfusion injury in a rat model [J]. Arch Med Sci, 2010, 6(6): 843-847.
- [2] TAMIZHSELVI R, SUN J, KOH YH, et al. Effect of hydrogen sulfide on the phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B pathway and on caerulein-induced cytokine prothaction in isolated mouse pancreatic acinar cells [J]. JPET, 2009, 329(3): 1166-1177.
- [3] 赵晓丽, 李海东, 郭彦青, 等. 丹曲林对大鼠缺血再灌注心肌能量代谢的影响 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(2): 117-120.
- [4] MA Y, LI L, SHANG XM, et al. Analysis of factors related to short-term prognosis in patients undergoing percu-

taneous coronary intervention for acute myocardial infarction [J]. Exp Ther Med, 2013, 5(4): 1206-1210.

- [5] 张翠香, 刘建勋, 李丹, 等. 冠脉通片对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌酶及心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(20): 1760-1763.
- [6] 刘洪娟, 汲晨锋, 高世勇, 等. 死亡受体介导细胞凋亡的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 48-51.
- [7] XU H, YAO Y, SU Z, et al. Endogenous HMGB1 contributes to ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis by potentiating the effect of TNF- α /JNK [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(3): H913-H921.
- [8] WEILAND U, HAENDELER J, IHLING C, et al. Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway [J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 671-678.

Effect of Different Compatibility Proportion of Active Constituent of Fuzi (*Radix Aconiti Carmichaeli*) and Gancao (*Glycyrrhiza Uralensis*) on H9c2 Myocardial Cell with Oxygen-glucose Deprivation

WANG Liqin, ZHANG Yuyan, HE Yu, WAN Haitong, ZHOU Huifen, YANG Jiehong

(Zhejiang University Chinese Medical, Zhejiang, 310053)

ABSTRACT Objective To study the effect and possible mechanism of different compatibility proportion of hypanconitine, active constituent of Fuzi (*radix aconiti carmichaeli*) and glycyrrhetinic acid active constituent of Gancao (*glycyrrhiza uralensis*) on H9c2 myocardial cell with oxygen-glucose deprivation. **Methods** The researchers took H9c2 myocardial cell growing into compact monolayer to divide into a normal group, model group, digoxin group (80 μ mol/L), hypanconitine group (120 μ mol/L), proportion 1 : 0.5 group, 1 : 1 group and 1 : 2 group, i. e. hypanconitine 120 μ mol/L, glycyrrhetinic acid 60, 120 and 240 μ mol/L respectively, six holes in each group. The researchers put complete medium 1 ml into the normal group and sugar-free Earle's liquid 1 ml into the model group. Put the corresponding medicine into the digoxin group, the hypanconitine group and each compatibility group and used sugar-free Earle's liquid to dilute to the corresponding concentration, making the total amount of liquid to 1 ml. The other groups after putting into drug were modeled into oxygen-glucose deprivation to cultivate for 4h except the normal group. The researchers observed morphological changes of H9c2 myocardial cell in each group and detected the content of tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and creatine kinase (CK) and the expression of Caspase-3, Fas-L and Fas protein. **Results** Myocardial cells grew adhering to wall in the normal group and most of them were fusiform with irregular star and formed radiate cell clusters. In the model group, refractivity of myocardial cell body declined with the endochylema shrinking. The researchers found dying cells falling off from wall with strong refractivity. Compared with the model group, cellular form obviously improved in the each compatibility group and the most obviously in the 1 : 1 group. Compared with the normal group, the content of TNF- α , IL-1 β and CK and the expression of Caspase-3, Fas-L and Fas protein all increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, each index didn't change significantly in the hypanconitine group ($P > 0.05$); But the content of TNF- α , IL-1 β and CK and the expression of Caspase-3, Fas-L and Fas protein decreased in varying degrees in digoxin group and the each compatibility group and the best effect was in the 1 : 1 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Hypanconitine combined with glycyrrhetinic acid had a protective effect on myocardial cell with oxygen-glucose deprivation and 1 : 1 might be the optimum. The mechanism may be related to restraining inflammation and apoptosis.

Keywords Fuzi (*radix aconiti carmichaeli*); Gancao (*Glycyrrhiza uralensis*); hypanconitine; glycyrrhetinic acid; drug compatibility; oxygen-glucose deprivation; inflammatory factor; apoptosis

(收稿日期: 2015-11-19; 修回日期: 2016-03-20)

[编辑: 邓媛]