

## 【实验研究】

## 茅苍术对 H9c2 心肌细胞氧化损伤的保护作用

杨嘉永 刘碧丽

**摘要:**目的 茅苍术水煎液和它的含药血清对 H9c2 该细胞的保护效果的研究。方法 采用双氧水制造 H9c2 大鼠心肌细胞的氧化损伤模型,以 Vc 为阳性对照,通过对受损心肌细胞形态学观测、SOD 活力检测及细胞相对凋亡情况的检测,测定茅苍术水煎液和它的含药血清对 H9c2 细胞的保护效果。结果 不同浓度的茅苍术水煎液均使细胞生长状态得以改善,外部形态明显好转。高剂量组细胞生长较好,中剂量组次之,低剂量组较差;茅苍术水煎液组 LDH 释放量和 MDA 含量明显低于 Vc 对照组,SOD 活力明显高于损伤组;细胞的相对存活率随着茅苍术水提液的浓度升高而明显增大,分别为 72.37%、66.19%、55.44%,低剂量组的茅苍术水提液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 H9c2 心肌细胞的保护作用不明显。结论 茅苍术水提液的保护作用机制与增强细胞抗氧化能力、减少自由基和脂质过氧化物导致的细胞膜损伤有关。

**关键词:**茅苍术;H9c2 心肌细胞;保护作用

doi: 10.3969/j.issn.1003-8914.2016.09.021 文章编号:1003-8914(2016)-09-1248-03

Protective Effect of *Atractylodes lancea* on Oxidative Injury of H9c2 Myocardial Cells

YANG Jiayong LIU Bili

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Fujian, Xiamen 361003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective activity of *Atractylodes lancea* decoction and its medicated serum on H9c2 cell. **Methods**

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based oxidative injury model was established by cultivating rat cardiomyocytes of H9c2 in vitro, and the antioxidant activity was evaluated by cell morphology, apoptosis and the effect on SOD. **Results** The growth state of the cells could be improved by the decoction of the different concentrations of *Atractylodes lancea*, and the external form was significantly improved. The high dose group cells grew well, and the low dose group was poor. The release amount of LDH and MDA of *Atractylodes lancea* group were significantly lower than those of the Vc control group, SOD activity was significantly higher than that in the injury group, the relative survival rate of cells with the concentration of aqueous extract of *Atractylodes lancea* obviously increased, it was 72.37%, 66.19% and 55.44%, respectively. The protective effect of the aqueous extract of the low dose group on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damage of H9c2 myocardial cells was not significant. **Conclusion** The mechanism of protective effect of water extract of *Atractylodes lancea* liquid is related to enhancing cellular antioxidant capacity and cell membrane damage caused by reducing free radicals and lipid peroxide.

**Key words:** *Atractylodes lancea*; H9c2 myocardial cells; Protective effect

茅苍术 *Atractylodes lancea* 为常用中药,在我国有悠久的临床应用历史,因其主要成分挥发油过量对人体有明显的不良作用,因此研究其水溶性成分是当务之急。本研究采用双氧水制造 H9c2 大鼠心肌细胞的氧化损伤模型,以 Vc 为阳性对照,测定茅苍术水煎液和它的含药血清对 H9c2 细胞的保护效果,以期达到评价其抗氧化作用的效果,找出发挥抗氧化的药效物质,为茅苍术进一步药效物质基础的阐明提供理论依据。

## 1 材料与设备

**1.1 实验仪器** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱: MCO-20AIC 型,日本三洋 SANYO; 倒置显微镜: CKX31 型,日本奥林巴斯 OLYMPUS; 全自动灭菌锅: ES315 型,日本 TOMY; 高速

冷冻离心机: 5811U 型,德国 Eppendorf 公司; 超纯水制备系统: Synergy 型,美国密理博 Millipore; 水浴锅: HR-06 型,Guohua 公司; 10,100,1000 μL 微量加样器: Eppendorf, Germany; 酶标仪: ELX800, BioTek, USA; H9c2 大鼠心肌细胞株 购自中科院上海细胞库。

**1.2 实验试剂** 澳洲胎牛血清: 批号 1431602, Gibco; DMEM 高糖培养液: 批号 NYH0948, Gibco; 青链霉素混合液(100X): 批号 20140417, Solarbio; 0.25% 胰蛋白酶(1:250, 25 g), 批号 20140216, Gibco; PBS 磷酸盐缓冲液: 0.01 mol·L<sup>-1</sup>, PH 7.2~7.4, 批号 509E024, Solarbio; MTT: 批号 1028D005, Solarbio; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、SOD 试剂盒、MDA 试剂盒: 批号分别为 20140416、20140332、20140423, 上海基免实业有限公司。

作者单位: 厦门大学附属第一医院药学部(厦门 361003)

## 2 实验方法与结果

**2.1 茅苍术提取物的制备** 茅苍术药材采自江苏茅山,阴干备用。准确称取粉碎过筛的茅苍术,以重蒸水提前浸泡 1 h,加水回流提取 1 h,纱布过滤,药渣继续提取 1 h,合并两次的滤液并浓缩成浸膏状,于 65℃ 烘干,得茅苍术提取物(每克相当于生药约 3.5 g)。称取以上项已制备好的茅苍术提取物约 0.2 g,精密称定,置于小烧杯中,缓慢加入 95% 乙醇,慢加快搅,至不再有絮状物析出为止。

### 2.2 分析方法

**2.2.1 溶液配制** PBS 缓冲液(PH = 7.2)的配制:将一包 PBS 粉末溶于 2 L 的三蒸水里,溶解,121℃ 灭 30 min,备用。DMEM 双抗培养液:DMEM 500 mL + 双抗 5.5 mL,4℃ 存放。10% 胎牛血清的 DMEM 培养液:胎牛血清 10 mL + DMEM 90 mL,混匀,4℃ 存放。

**2.2.2 实验分组** 将 96 孔板中已经培育 24 h 的 H9c2 细胞更换新的培养液,根据预实验的情况,分组处理:①正常对照组:用培养液正常培养;②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组:加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使其终浓度为 100 μmol·L<sup>-1</sup>,作用细胞 2 h;③阳性 Vc 组:注入 Vc 液使其最后浓度是 500 μg·mL<sup>-1</sup>;④空白。血清组:培养液中加入空白血清;⑤含药血清组:培养液中加入含药血清;⑥高剂量茅苍术水提液作用组:加入 2.1 项下茅苍术水煎液使其最后浓度为 500 μg·mL<sup>-1</sup>;⑦中剂量茅苍术水提液作用组:加入茅苍术水提液使其终浓度为 250 μg·mL<sup>-1</sup>;⑧低剂量茅苍术水提液作用组:加入茅苍术水提液使其终浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup>。各处理组均为先加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 2 h,再加入药物作用 24 h。观察细胞的形态,并收集各组培养液,检测 LDH 释放量,SOD 活力,MDA 含量及细胞活力。

### 2.2.3 观测指标

#### 2.2.3.1 细胞形态学观测

**2.2.3.2 乳酸脱氢酶(LDH)活力测定** 分别收集每个实验组的上层培养液,采用试剂盒说明书的方法测定,血清中 LDH 的活性以 U·L<sup>-1</sup> 表示。

乳酸脱氢酶(LDH) 丙酮酸 (公式 1)

将测得的值带入以下公式,求出 LDH 的活性值。

LDH 的活性(U·L<sup>-1</sup>) = (A 测定值 - A 对照值) / (A 标准值 - A 空白值) × 标准品浓度(2 mmol·L<sup>-1</sup>) × 测试前样本稀释倍数 × 1000 (公式 2)

**2.2.3.3 MDA 含量检测** 分别收集各实验组的细胞培养液,采用试剂盒说明书的方法测定。

MDA 含量(nmol·mL<sup>-1</sup>) = (A 测定值 - A 对照值) / (A 标准值 - A 空白值) × 标准品浓度(10 nmol·mL<sup>-1</sup>) × 样本稀释倍数 (公式 3)

**2.2.3.4 SOD 活力检测** 分别收集各实验组的细胞培养液,采用试剂盒说明书的方法测定。

SOD 活力(U·mL<sup>-1</sup>) = (A 对照值 - A 测定值) / A 对照值 ÷ 50% × 反应体系的稀释倍数 × 样本测试前的稀释倍数 (公式 4)

**2.2.3.5 细胞相对凋亡情况的检测** 采用 MTT 比色法,用 PBS 配制 MTT,浓度为 5 mg·mL<sup>-1</sup>,在对细胞完成各种干预实验后,每孔加入 MTT 20 μL,连续培育 4 h,最后停止;轻轻的吸走孔里的上清,分别加 DMSO 液 150 μL,振荡 10 min,彻底溶解甲瓩;在酶标仪的 490 nm 波长下,检测每孔的 A 值,将各组所测得的吸光度值带入细胞活力计算公式,求出各实验组的细胞活力<sup>[149]</sup>。

细胞活力(%) = A<sub>实验</sub> / A<sub>参照</sub> × 100% (公式 5)

## 2.3 实验结果

**2.3.1 对细胞形态的影响** 用不同的药物处理完细胞之后,将其放在倒置显微镜下观测:未处理组的细胞继续生长,成梭形或者无规则形状,核是扁圆形或者紧贴细胞壁;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组和空白血清组细胞均体积变小,为圆形或者椭圆,细胞核浓缩,细胞边缘模糊,部分发生溶解;阳性 Vc 作用组细胞与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组的相比,贴壁细胞数量较多,生长状态较好;相对于损伤组而言,不同浓度的茅苍术水煎液作用组贴壁细胞数量较多,且外部形态明显好转,说明其生长状态得到了改善;不同剂量茅苍术水提液作用组细胞的生长状态不同,高剂量组细胞的生长较好,中剂量组的次之,低剂量组的较差。

**2.3.2 茅苍术及其含药血清对心肌细胞 MDA 含量、SOD 活力及 LDH 释放量的影响** LDH 释放量、SOD 的活力测定结果及 MDA 含量的变化情况见表 1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞的 LDH 释放量和 MDA 含量明显增高,分别是正常对照组的 1.38 倍、4.31 倍,SOD 活性显明下降,为未处理组的 34%;而高、中、低剂量茅苍术水提液作用组的 LDH 释放量和 MDA 含量都有所降低,LDH 释放量与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组相比分别降低了 16.01%、14.80%、8.14%,MDA 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组相比分别降低了 28.52%、60.70%、56.36%;高、中、低剂量茅苍术水提液作用组的 SOD 活力都有所升高,SOD 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组相比分别升高了 60.27%、48.55%、6.96%;而阳性 Vc 对照组 LDH 释放量和 MDA 含量明显低于损伤组,高于茅苍术水提液作用组,SOD 活力也是明显比损伤组高。

**2.3.3 细胞相对凋亡情况** 每个处理组细胞的相对凋亡率如图 1,以未处理组的相对存活率为标准,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组的损伤率很明显的升高,为 44.34%;茅苍术水提液保护组细胞的存活率与茅苍术水提液成浓度剂量

关系,即细胞的相对存活率随着茅苍术水提液的浓度升高而明显增大,分别为 72.37%、66.19%、55.44%,低剂量组的茅苍术水提液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 H9c2 心肌细胞的保护作用不明显;跟空白参照组比对,含药血清组

细胞的生活率也较高,为 67.08%;与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较,正常对照组、阳性 Vc 组和茅苍术水提液高浓度组成极显著性差异,含药血清组和茅苍术水提液中剂量组成显著性差异,其余组差异性不明显。

表 1 含药血清对损伤后细胞 LDH 释放量、SOD 活力及 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	LDH/ U · L <sup>-1</sup>	MDA/nmol · mL <sup>-1</sup>	SOD/U · mL <sup>-1</sup>
正常对照组	280.63 ± 9.06	9.14 ± 0.10	46.54 ± 0.18
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 模型组	388.09 ± 8.11 <sup>1)3)</sup>	39.44 ± 0.08 <sup>2)4)</sup>	15.64 ± 0.18 <sup>2)4)</sup>
阳性 Vc 对照组	307.29 ± 5.85 <sup>6)</sup>	13.73 ± 0.11 <sup>6)</sup>	41.45 ± 0.19 <sup>6)</sup>
空白血清组	350.37 ± 5.93 <sup>1)</sup>	36.54 ± 0.15 <sup>1)3)</sup>	29.75 ± 0.49 <sup>1)3)</sup>
含药血清组	327.11 ± 4.53 <sup>5)</sup>	23.26 ± 0.14 <sup>5)</sup>	36.69 ± 0.25 <sup>5)</sup>
水提液高剂量组	325.97 ± 8.22 <sup>5)</sup>	28.19 ± 0.16 <sup>1)3)</sup>	39.36 ± 0.13 <sup>6)</sup>
水提液中剂量组	330.65 ± 7.30 <sup>5)</sup>	15.50 ± 0.15 <sup>1)6)</sup>	30.40 ± 0.21 <sup>1)3)</sup>
水提液低剂量组	356.51 ± 10.47 <sup>1)</sup>	17.21 ± 0.16 <sup>1)6)</sup>	16.81 ± 0.85 <sup>2)4)</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>1)</sup> P < 0.05,<sup>2)</sup> P < 0.01;与阳性 Vc 组比较,<sup>3)</sup> P < 0.05,<sup>4)</sup> P < 0.01;与模型组比较,<sup>5)</sup> P < 0.05,<sup>6)</sup> P < 0.01

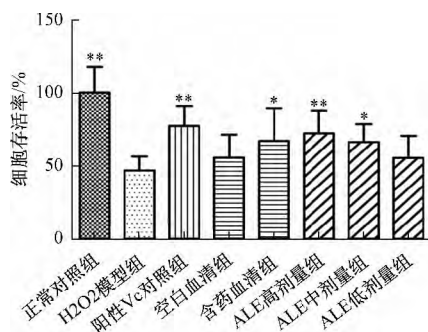


图 1 不同处理组细胞的存活率

(与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组比对, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01)

### 3 讨论

本研究利用 H9c2 细胞株建立 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型,从细胞形态、乳酸脱氢酶、抗氧化以及细胞凋亡等方面探讨茅苍术水提液的保护作用,结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的损伤作用能使 H9c2 细胞皱缩变圆、数目减少;细胞膜的透过性变大,导致心肌酶向胞外漏出,培养液中 LDH 的量明显变大;同时发生的脂质过氧化作用产生了大量自由基,培养液中 SOD 活力降低,MDA 含量增大。本实验以 Vc 作为保护心肌细胞的阳性对照药物,旨在对比观察不同剂量茅苍术水提液的保护作用。这部分的研究显示,Vc 对被损坏的心肌细胞显现出很好的保护效果,但本试验中的 Vc 浓度尚不能完全阻断 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对心肌细胞的损伤作用。而 3 种剂量茅苍术水提液预处理,均能不同程度的改善细胞形态,提高细胞存活率,降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 LDH 的释放量、提高 SOD 活力、减少 MDA 含量以及细胞的凋亡率;并且呈现剂量依赖关系,低剂量茅苍术水提液可使脂质过氧化物的产生与积累减少,中剂量茅苍术水提液进而提高自由基清除能力,尤其对 MDA 的含量有明显的降低作用,高

剂量茅苍术水提液同时具有增强抗氧化酶活性的作用。提示茅苍术水提液的保护作用机制与增强细胞抗氧化能力、减少自由基和脂质过氧化物导致的细胞膜损伤有关。

本研究建立的细胞模型比较可靠、简单,可用于心肌细胞的损伤机制和抗氧化的药效机理方面的研究;同时也初步证实了茅苍术水提液及其含药血清对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致心肌细胞的损伤具有保护作用,推测茅苍术含药血清中的入血成分可能是其发挥抗氧化作用的重要物质之一,提示茅苍术含药血清中的入血成分可能是其药效物质。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社 2010: 150.
- [2] C. Chen, Q. Zhou, S. Liu, et al. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks[J]. *Chemosphere*, 2011, 83(8): 1147-1154.
- [3] S. Liu, Q. Zhou, Y. Wang. Ecotoxicological responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with HHCB[J]. *Chemosphere*, 2011, 83(8): 1080-1086.
- [4] S. Liu, Q. Zhou, C. Chen. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in earthworm *Eisenia fetida* exposed to 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,7,8-hexamethyl-cyclo-enta" Y-2-benzopyran[J]. *Environmental Toxicology*, 2012, 27: 472-479.
- [5] 史志明. 菲在蚯蚓体内的分布及其对蚯蚓抗氧化防御体系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [6] 桑琛, 李明学. 衰老自由基学说和运动对抗自由基损伤的作用[J]. *吉林体育学院学报*, 2007, 23(1): 80-81, 140.
- [7] 桑琛. 不同时间的有氧运动对抗衰老影响的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2007.
- [8] Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise [J]. *Sport Med*, 1988(5): 156-170.

( 本文校对: 刘言言 收稿日期: 2015 - 09 - 17)