

## · 中(蒙)医药论坛 ·

## 蒙药当贡-3对H9C2细胞缺氧/复氧后细胞保护作用的研究

苏日娜<sup>1</sup>,张瑞芬<sup>2</sup>,苏和<sup>3\*</sup>

- (1.内蒙古自治区人民医院 医疗保险管理处,内蒙古 呼和浩特 010017;
- 2.内蒙古自治区中医院 重症医学科,内蒙古 呼和浩特 010013;
- 3.内蒙古自治区中医院 中医科,内蒙古 呼和浩特 010013)

**【摘要】**目的研究蒙药当贡-3对心肌缺血/再灌注损伤后的细胞保护作用。方法H9C2细胞缺氧低糖孵育3h,然后复氧复糖孵育6h,模拟心肌细胞缺血/再灌注损伤;3种剂量的蒙药当贡-3预处理,ELISA法检测细胞培养液内的天冬氨酸转氨酶(AST)的释放、细胞内超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性。结果H9C2细胞缺氧/复氧后:SOD活性下降为12.40 U/mg.prot,低于对照组的21.71 U/mg.prot,而高、中、低3种剂量的药物预处理均可增加SOD的活性,分别为19.66、17.17、15.14 U/mg.prot;细胞AST释放增加达68.32 U/mL,高于空白对照组的34.78 U/mL,3种剂量的当贡-3预处理均可降低AST,分别为50.33、56.18、60.37 U/mL;细胞GSH-Px活性降低,为71.58 μmol/L,低于空白对照组的118.51 μmol/L,高、中、低3种剂量的当贡-3预处理均可增加GSH-Px活性,分别为104.13、93.06、80.30 μmol/L,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论当贡-3预处理能够降低缺氧/复氧损伤的H9C2细胞AST的释放、增加SOD和GSH-Px的活性,对细胞具有保护作用。

**【关键词】**蒙药当贡-3;心肌缺血/再灌注;ELISA法;H9C2细胞;缺氧/复氧

中图分类号: R477

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)05-0454-04

心血管疾病在中国乃至全球均是导致居民死亡的主要原因,其发病率和病死率高,且呈逐年上升趋势,造成了严重的经济负担和家庭负担<sup>[1,2]</sup>。其中,急性心肌梗死发病凶险,病死率高,必须积极干预治疗。对于急性心肌梗死来说,最佳治疗方案是及时开通闭塞血管从而恢复心肌灌注。但是,并不是所有恢复心肌灌注的患者都取得了良好的预后,这可能与再灌注后心肌的额外损伤有关,即心肌缺血/再灌注损伤,该反应过程明显降低了心肌再灌注的获益<sup>[3,4]</sup>。所以如何能够在保证急性心肌缺血后恢复灌注的前提下减少再灌注损伤,一直是广大医务工作者关注的问题。

蒙药因不良反应小、使用安全、疗效显著的特点发挥着重要作用。当贡-3具有融化凝冻之楚斯、行楚斯、清心热、清楚斯热调赫依等功效,应用蒙药当贡-3治疗冠心病心绞痛,取得了显著的临床疗效<sup>[5,6]</sup>。但是在体外细胞酶学代谢方面尚未进行系统研究。本研究利用H9C2细胞缺氧/复氧损伤模拟

心肌缺血/再灌注损伤模型,研究蒙药当贡-3的细胞保护作用,为临床西医常规治疗冠心病心肌梗死提供一种新的药物选择和理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

H9C2(大鼠)心肌细胞株:购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

蒙药当贡-3粗提物:采用水提醇沉法,当贡、索门-毛都、乌兰-赞旦3味药按1:1:1配比。

相关器材及试剂:酶标仪(意大利Bio-PAD公司);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司);青霉素-链霉素溶液(100x)(美国Hyclone公司);MTT试剂盒(上海晶抗生物工程公司);SOD检测试剂盒(中国上海酶联生物技术公司);GSH-Px检测试剂盒(中国上海酶联生物技术公司);AST检测试剂盒(中国上海酶联生物技术公司);胎牛血清(FBS,美

收稿日期: 2021-11-03; 修回日期: 2022-09-28

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08074)

第一作者: 苏日娜(1981-),女,硕士,副主任医师。研究方向: 心血管疾病的中医治疗。E-mail:1336740070@qq.com

\*通信作者: 苏和,男,硕士,主任医师。研究方向: 心血管疾病的中医蒙医治疗。E-mail:Suhehuangyan@163.com

国格林德艾兰 GiBCO 公司);改良杜氏伊格尔培养基(DMEM,美国格林德艾兰 GiBCO 公司)。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 H9C2 细胞培养** H9C2 细胞复苏后,培养在 pH 7.2 的 DMEM 培养基中,添加 10% 胎牛血清、4.5 g/100 mL 的葡萄糖,在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 湿化环境细胞培养箱中培养<sup>[7]</sup>。2~3 d 更换一次培养基,传代培养。待细胞单层铺满培养皿底的 80% 以上融合度时,0.25% 胰酶消化传代;取传代 2~3 代的对数生长期细胞,更换培养液,接种到 96 孔板上密度为 5 × 10<sup>4</sup>/mL 孵育 24 h 后,当细胞整体呈梭性,即可作为实验细胞,进行后续一系列实验。

**2.2.2 H9C2 细胞缺氧/复氧损伤模型<sup>[7]</sup>** 无 FBS 的无葡萄糖 DMEM 培养基放入含有 95% N<sub>2</sub> 的培养箱内 1 h 以充分去除培养基内的氧气,然后将正常培养 48 h 的 H9C2 细胞用无葡萄糖的厄尔平衡盐溶液洗涤两次,加入上述培养基中,置入含有 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 组成的混合气体的培养箱内,37 °C 湿化环境持续培养 3 h,为缺氧模型;无菌条件下培养基中加入葡萄糖 4.5 g/100 mL 及 10% FBS,转移到含有 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、37 °C 湿化环境的培养箱内 6 h,为复氧过程。空白对照组不接受 H/R 处理,继续在常规条件下孵育。

**2.2.3 细胞分组** 成功培养 H9C2 细胞后,随机分为 5 组,每组 4 个样本,其中当贡-3 浸膏提取物加适量 DMSO 溶解:(1)对照组(control):H9C2 心肌细胞不做任何处理,正常条件培养;(2)H/R 组(model):缺氧/复氧方式设计 H9C2 细胞 H/R 模型;(3)H/R + 当贡-3 高剂量组:缺氧同时加入含有 0.2 mg/mL 的当贡-3 浸膏提取物培养 3 h,复氧培养 6 h;(4)H/R + 当贡-3 中剂量组:缺氧同时加入含有 0.1 mg/mL 的当贡-3 浸膏提取物培养 3 h,复氧培养 6 h;(5)H/R + 当贡-3 低剂量组:缺氧同时加入含有 0.05 mg/mL 的当贡-3 浸膏提取物培养 3 h,复氧培养 6 h。

**2.2.4 天冬氨酸转氨酶检测** 当 H9C2 细胞受到缺氧/复氧损伤时,细胞内天冬氨酸转氨酶迅速释放到培养上清液中。ELISA 法测定上清液 AST,评估细胞损伤情况。按试剂盒说明操作:(1)离心——在 H9C2 细胞终止培养后,收获培养的上清液,离心 3000 rpm × 10 min;(2)包被抗体——用调制的包被缓冲液,稀释特异性抗体球蛋白至最适浓度(1~10 μg/mL),每凹孔加 0.3 mL,37 °C 水浴 3 h,4 °C 冰箱储存;(3)洗涤——移去包被液,凹孔用洗涤缓冲液(含 0.05% 吐温-20)洗 3 次,每次 5 min,拍

干;(4)封闭、洗涤——每凹孔加入封闭液 0.2 mL,37 °C 1~2 h,洗涤方法同上;(5)加一抗、洗涤——4 μL 一抗加入 1 mL 封闭剂中充分混匀,加 200 μL 到聚乙烯板中,37 °C 1 h;洗涤方法同上;(6)加二抗——二抗加入封闭剂中(1: 800)混匀,加 200 μL 到聚乙烯板中,37 °C 1 h;洗涤方法同上;(7)显色——加入显色底物(TMB)100 μL/孔,避光 37 °C 孵育 15 min;(8)终止——每凹孔加终止液 0.05 mL;(9)OD 值测定——置于酶标仪下,在 505 nm 波长处测定各孔的 OD 值;数据以国际单位每升计算。

**2.2.5 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶检测** 首先制备细胞匀浆液:收集细胞,用 4 °C 冰浴预冷的 PBS 洗涤 1~2 次,沉淀用预冷的 PBS 冰浴进行匀浆,随后匀浆液 4 °C 离心,取上清液作为待测样品。采用上述 ELISA 法,按试剂盒说明酶标仪下,测定波长 450 nm 时的 OD 值(超氧化物歧化酶),测定波长 422 nm 时的 OD 值。

## 2.3 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件对数据进统计学分析。所有数据以均数 ± 标准差(SD)X 表示,多组间的统计学比较,采用方差分析(ANOVA),两组间进行比较,采用 *t* 检验,检验水准为 α = 0.05, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 当贡-3 安全性检测

5 种浓度的药物分别为:0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mg/mL,等溶对照组 0.1% 的 DMSO。结果显示空白对照组细胞存活率为 100%,等溶对照组为 97.83%,两组差异无统计学意义(*P* > 0.05)。加入不同剂量的药物后,0.8、0.4 mg/mL 两种剂量的细胞存活率为 60.52%、74.17%,与对照组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),随着药物剂量的降低细胞存活率逐渐恢复正常,分别为 97.46%、99.7%、101.54%,但 0.2、0.1、0.05 mg/mL 3 种浓度与对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)(见图 1)。

### 3.2 当贡-3 对 H9C2 细胞 H/R 损伤后 SOD 活性的影响

在 H/R 后,H9C2 细胞 SOD 活性明显下降为 12.40 U/mg.prot,低于对照组的 21.71 U/mg.prot,组间差异有统计学意义(*P* < 0.05),而 3 种剂量的当贡-3 预处理后 SOD 的活性分别为 19.66、17.17、15.14 U/mg.prot,均较模型组增加,组间差异有统计学意义。

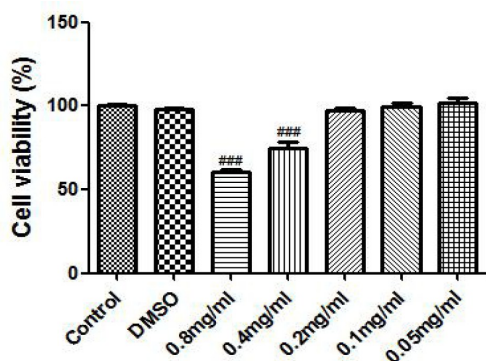


图1 当贡-3的安全性及有效剂量比较  
###与空白对照组比较,  $P < 0.05$ 。

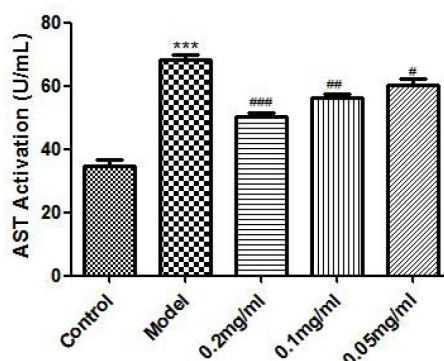


图3 当贡-3对H9C2细胞H/R损伤细胞AST的影响  
\*\*\*与对照组比较,  $P < 0.001$ ; ###与模型组比较,  $P < 0.001$ ;  
##与模型组比较,  $P < 0.01$ , #与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

义( $P < 0.05$ ),高剂量组作用明显,但3组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与空白对照组比较仍低,说明当贡-3不能完全逆转H/R后H9C2细胞的损害(见图2)。

3种剂量的当贡-3预处理均可增加GSH-Px活性,分别为104.13、93.06、80.30  $\mu\text{mol/L}$ ,均较模型组升高,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),高剂量组作用明显,但3组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(见图4)。

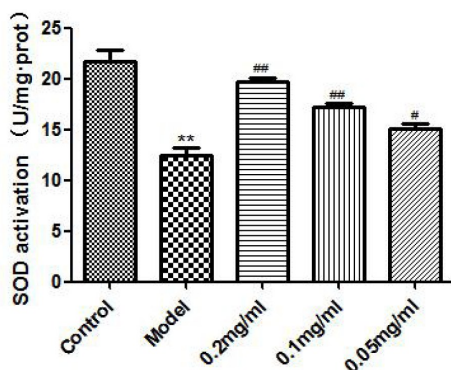


图2 当贡-3对H9C2细胞H/R损伤后细胞SOD活性的影响  
\*\*与对照组比较,  $P < 0.01$ ; ##与模型组比较,  $P < 0.01$ ,  
#与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

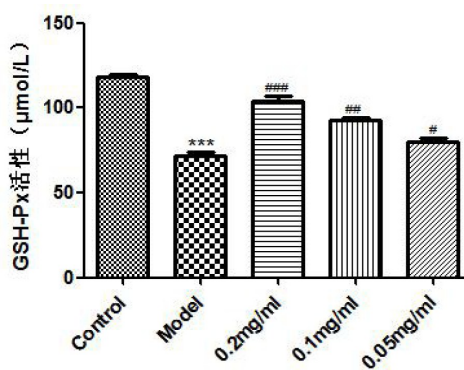


图4 当贡-3对H9C2细胞H/R损伤后细胞GSH-Px活性的影响  
\*\*\*与对照组比较,  $P < 0.001$ ; ###与模型组比较,  $P < 0.001$ ;  
##与模型组比较,  $P < 0.01$ , #与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3.3 当贡-3对H9C2细胞H/R损伤后细胞AST活性的影响

在H/R后,H9C2细胞AST释放增加达68.32 U/mL,高于空白对照组的34.78 U/mL( $P < 0.05$ ),而3种剂量的当贡-3预处理后AST分别为50.33、56.18、60.37 U/mL,均较模型组降低,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),高剂量组作用明显,但3组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(见图3)。

### 3.4 当贡-3对H9C2细胞H/R损伤后细胞GSH-Px活性的影响

在H/R后,H9C2细胞GSH-Px活性降低,达71.58  $\mu\text{mol/L}$ ,低于空白对照组的118.51  $\mu\text{mol/L}$ ,组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而0.2、0.1、0.05 mg/mL

## 4 讨论

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后开通闭塞血管、恢复血供,形成血液再灌注从而供血供氧得到恢复,这对维持心肌细胞存活、保持功能起到了关键作用。然而,并不是所有缺血心肌组织恢复血液灌注都能得到良好的预后,原因认为可能与恢复血流灌注后心肌缺血/再灌注损伤(MI/RI)有关。因而如何保证心肌缺血后恢复血流并且减轻再灌注损伤一直是临床医生研究的热点问题。

既往研究发现,蒙药当贡-3治疗冠心病心绞痛取得良好的疗效,其中当贡中的当归多糖具有造

血、免疫调节、抗氧化、防辐射、降血糖等多种重要生物活性,在心脑血管系统广泛应用<sup>[8]</sup>,索门-毛都具有抗氧化、抗炎、降血糖、血管舒张<sup>[9-11]</sup>等作用,用于治疗高血压、心脏病等;乌兰-赞旦对来自肺部和心脏的任何类型的胸痛都具有止痛作用,还具有强心、抗氧化、抗炎的作用<sup>[12,13]</sup>。本研究发现,蒙药当贡-3(为以上3种药物按1:1:1配比)粗提浸膏在0.2 mg/mL以内的浓度剂量时对缺氧/复氧损伤的H9C2细胞具有保护作用,且呈一定的浓度剂量依赖性。

MI/RI后伴随一系列酶的变化,因而检测酶学可以代表细胞的损伤。

天冬氨酸转氨酶(AST)是氨基酸代谢的重要酶,在心肌细胞中含量最高,细胞损伤后释放到细胞外,检测细胞外AST可明确H9C2细胞损伤情况。本实验中H9C2细胞H/R后,细胞培养上清液中AST增加,给予药物预处理后明显下降。提示当贡-3可以减轻细胞损伤,增加H/R后H9C2细胞的存活率。

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的抗氧化蛋白酶,可催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢,是生物体内清除自由基的首要物质,可对抗与阻断因氧自由基造成的细胞损害,并及时修复受损细胞,监测SOD水平可判断细胞损伤后氧化应激的情况<sup>[14,15]</sup>。本研究中,H/R后,H9C2细胞SOD活性明显下降,给予当贡-3预处理可增加SOD活性,提示当贡-3具有清除氧自由基的作用。

谷胱甘肽过氧化物酶检测(GSH-Px)是细胞内重要的过氧化物分解酶,主要分布在心脏和肝脏,可使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,同时促进H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的分解,保护细胞膜不受过氧化物损害<sup>[14,15]</sup>。本研究发现,H/R后,H9C2细胞GSH-Px活性明显下降,给予当贡-3浸膏预处理GSH-Px的活性增加,提示药物可增加细胞的抗氧化能力。

综合以上研究结果,我们发现:一定剂量的当贡-3浸膏预处理对由缺氧/复氧损伤的H9C2细胞具有保护作用,降低AST,同时增加SOD和GSH-Px的活性,增加细胞的抗氧化能力,通过多种途径发挥细胞保护作用。在0.2 mg/mL时效果最佳,但各项值未恢复接近正常的范围,说明当贡-3不能完全逆转H/R损伤后H9C2细胞的损害。这个结果与团队的前期研究(包括临床研究和动物实验)结果相符,分析原因可能与当贡-3中的当归多糖、檀香油、异黄酮等成分的抗氧化、抗炎、保护线粒体功能等

作用相关,至于3种药物之间是否有相互作用,还需要后续的进一步研究。

#### 参考文献

- [1]胡春松,吴清华,胡大一.中国心血管现状:挑战与对策[J].中华高血压杂志,2015,23(7):625-626
- [2]王冬菊.心脑血管疾病流行概况及主要影响因素[J].预防医学论坛,2016,22(1):71
- [3]Huang J, Zhou YY, Xue XY, et al. SRPIN340 protects heart muscle from oxidative damage via SRPK1/2 inhibition-mediated AKT activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019; 510(1):97-103
- [4]Farzaneh GT, Dianne LF, Shohreh A, et al. Mitochondrial quality control in cardiac cells: mechanisms and role in cardiac cell injury and disease[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6):8122-8133
- [5]苏和,咏梅,莫日根图,等.蒙医融楚斯法治疗不稳定性心绞痛的临床研究[J].中国民族医药杂志,2013,12:22-24
- [6]张瑞芬,苏和,咏梅,等.蒙药当贡-3对不稳定性心绞痛患者硝酸甘油使用频率的影响[J].中国民族医药杂志,2013,12:12-13
- [7]Ping Y, Yu PZ, Qing X, et al. Astragaloside IV regulates the PI3K/Akt/HO-1 signaling pathway and inhibits H9c2 cardiomyocyte injury induced by hypoxia-reoxygenation[J]. Biol Pharm Bull, 2019, 42(5):721-727
- [8]徐国钧,何宏贤,徐珞珊,等.中国药理学[M].北京:中国医药科技出版社,1996:332-338
- [9]Shi X, Tao G, Ji L, et al. Sappanone a alleviates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes injury through inhibition of mitochondrial apoptosis and activation of PI3K-Akt-Gsk-3 $\beta$  pathway[J]. Biosci Rep, 2020, 40(2):1486-1489
- [10]Shi X, Tao G, Ji L, et al. Sappanone a protects against myocardial ischemia reperfusion injury by modulation of Nrf2[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 149(1):61-71
- [11]Kang L, Zhao H, Chen C, et al. Sappanone a protects mice against cisplatin-induced kidney injury[J]. International Immunopharmacology, 2016, 38(2016):246-251
- [12]Jane JL, Kan CF, Qing LY, et al. Pterostilbene exerts an anti-inflammatory effect via regulating endoplasmic reticulum stress in endothelial cells[J]. Cytokine, 2016, 77(2016):88-97
- [13]秦明芳,谢金鲜,周红海,等.檀香茶叶水提醇沉液对心血管的作用及抗疲劳的实验研究[J].基因组学与应用生物学,2010,29(5):962-968
- [14]Mahesh BM, Narendra PB, Chandrashekhara M. Study of oxidants and antioxidants in patients of acute myocardial infarction[J]. Aiyar Adv Biomed Res, 2015, 22(4):241
- [15]Farzaneh GT, Dianne LF, Shohreh A, et al. Mitochondrial quality control in cardiac cells: mechanisms and role in cardiac cell injury and disease[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6):8122-8133