

南葶苈子抑制氧化应激与自噬通路抗 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤作用研究

郑晓珂^{1,2}, 杨方方¹, 张莉^{1,2}, 白志尧¹, 曾梦楠^{1,2}, 樊慧¹, 冯卫生^{1,2*}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 探究南葶苈子水提物 (DS) 对 H₂O₂ 诱导的心肌 H9c2 细胞损伤的保护作用及潜在机制。方法 使用高效液相色谱与质谱联用方法分析鉴定 DS 中主要成分峰。采用 H₂O₂ 处理制备 H9c2 细胞损伤模型, 分为对照组、模型组、普罗布考组及 DS 100、200、400 μg/mL 组, MTT 法检测 H9c2 细胞活力; 流式细胞仪检测细胞凋亡率、细胞自噬水平、线粒体膜电位; 试剂盒检测细胞氧化应激相关指标; Incell-Western 法检测凋亡通路关键蛋白和自噬标志性蛋白表达水平。结果 共分析鉴定了 DS 中含量最高的 7 种成分。与模型组比较, DS 可以提高 H9c2 细胞活力 ($P < 0.05, 0.01$) 与细胞存活率 ($P < 0.01$), 改善线粒体膜电位水平 ($P < 0.01$), 调节凋亡通路关键蛋白 Caspase-3 和 Bax/Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 抑制心肌细胞凋亡; 并能极显著降低细胞自噬水平 ($P < 0.01$), 升高自噬标志性蛋白自噬微管相关蛋白轻链 3B (LC3B)、p62 表达水平 ($P < 0.01$), 抑制心肌细胞自噬; 降低心肌活性氧 (ROS) 水平 ($P < 0.01$), 调节细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性及乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 水平 ($P < 0.01$), 改善心肌细胞氧化应激。结论 DS 可以有效保护由 H₂O₂ 引起的 H9c2 细胞损伤, 其机制可能与改善细胞的氧化应激、抑制细胞凋亡和自噬有关, 其物质基础可能与所含的黄酮苷类成分有关。

关键词: 南葶苈子; 心脏疾病; 氧化应激; 自噬; 线粒体凋亡途径

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0157-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.024

Effect of *Descurainia sophia* on H₂O₂-induced myocardial injury via suppressing oxidative stress and autophagy pathway

ZHENG Xiao-ke^{1,2}, YANG Fang-fang¹, ZHANG Li^{1,2}, BAI Zhi-yao¹, ZENG Meng-nan^{1,2}, FAN Hui¹, FENG Wei-sheng^{1,2}

1. Pharmacy Faculty, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To study the protective effect of aqueous extract from *Descurainia Sophia* (DS) on H₂O₂-induced H9c2 cardiomyocyte injury and to initially explore the potential mechanism. **Methods** The peaks of main components in DS were analyzed and identified by HPLC-MS. H9c2 cell injury model was established by H₂O₂. H9c2 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, model group, probucol group, and DS at 100, 200, 400 μg/mL groups. In order to reveal the possible molecular mechanisms, the viability of H9c2 cells was measured by MTT assay; The apoptosis rate, autophagy rate, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species (ROS) level were detected by flow cytometry; The relative indicators of cell oxidative stress were determined by biochemical kit; The expression levels of apoptosis-related protein and the autophagy-related protein were evaluated by Incell-western method. **Results** Seven components with the highest content were identified in DS through the results of mass spectrometry. Compared with the model group, DS can improve the cell viability ($P < 0.05, 0.01$) and survival rate of H9c2 cells ($P < 0.01$); At the same time, apoptosis was attenuated ($P < 0.01$), mitochondrial membrane potential was upregulated ($P < 0.01$), apoptosis related proteins Caspase-3, Bax/Bcl-2 were obviously downregulated ($P < 0.01$), autophagy phenomenon was attenuated ($P < 0.01$), autophagy related proteins LC3B and p62 were upregulated ($P < 0.01$). In addition, ROS level was decreased ($P < 0.01$), T-SOD and GSH-PX were upregulated and the levels of LDH and MDA were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** This

收稿日期: 2018-05-14

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 项目 (2013CB531802); 河南中医药大学 2018 年度博士科研基金 (BSJJ2018-04)

作者简介: 郑晓珂, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药活性成分及作用机制研究。E-mail: zhengxk.2006@163.com

*通信作者 冯卫生, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中草药活性成分研究及新药开发。Tel: (0371)60190296 E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

study suggests that DS can effectively protect H₂O₂-induced H9c2 cells injury, and the mechanism may be associated with improving oxidative stress in cells, inhibiting cell apoptosis and autophagy, which may be related to flavonoid glycosides.

Key words: *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl.; heart failure; oxidative stress; autophagy; mitochondrial apoptosis

近年来, 心脏疾病一直是世界范围内人类死亡的重要原因。心脏疾病由于发病率高、致残率高、复发率高、死亡率高、并发症多等多种原因, 已经成为威胁我国城乡居民健康的头号杀手^[1], 《中国心血管病报告 2016 (概要)》数据显示, 我国心血管病患者人数为 2.9 亿, 占居民疾病死亡人数的 40% 以上, 心血管疾病死亡率已居首位^[2]。而心力衰竭是心脏病的最后阶段, 也是心血管疾病治疗最棘手的问题。中医古籍中并无“心力衰竭”之名称的记载, 但根据临床表现可归属于“喘证、水饮、痰饮”的范畴, 其核心病机为气、阴、阳虚为本, 血瘀水停为标, 病位在心, 且与肺、脾、肾密切相关, 因此, 中医治疗以益气为根本, 以温阳、利水、健脾、化痰、活血为总原则^[3]。传统中药葶苈子因疗效显著、副作用小, 临床已应用于多种心血管疾病的治疗^[4-5]。葶苈子始载于《神农本草经》, 为十字花科植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 或者独行菜 *Lepidium apetalum* Willd. 的干燥成熟种子, 前者称为南葶苈子, 后者称为北葶苈子^[6]。《本草经疏》言葶苈子为“手太阳经正药, 亦入足太阳经”, 上可宣肺气之壅塞, 下可开窍以利小便, 乃泻肺强心之佳药。葶苈子复方制剂芪苈强心胶囊、十枣汤合葶苈子方、生脉强心汤等已经在临床广泛应用于强心治疗^[7-9]。葶苈子对心脏疾病的治疗作用已经得到临床医师的认可^[8,10-11]。有研究表明, 葶苈子可以改善心力衰竭兔的血流动力学指标, 改善心脏收缩功能, 延缓心衰发展^[12]; 葶苈子水提物可以抑制心室重构大鼠心肌细胞纤维化从而保护大鼠心脏^[13]; 同时, 葶苈子水提物具有对猫心与蛙心的强心作用^[14], 并已从葶苈子中分离得到了多种强心苷^[15]。本实验室前期研究葶苈子对阿霉素诱导的心衰大鼠的心脏保护作用, 发现葶苈子可以有效抑制神经内分泌系统, 减轻心衰水肿, 保护心脏^[16]。为了进一步探讨葶苈子心脏保护作用的具体机制, 本研究利用 H₂O₂ 诱导的心肌 H9c2 细胞损伤模型, 探索南葶苈子水提物 (DS) 对 H9c2 细胞损伤的保护作用及潜在机制。

1 材料

1.1 细胞

大鼠 H9c2 细胞购于中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

南葶苈子购于河南省郑州市药材批发市场, 经河南中医药大学陈随清教授鉴定为十字花科植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 的干燥成熟种子, 凭证标本 (20160509) 保存于河南中医药大学中药化学实验室。

DMEM 培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程研究所); 胰酶、MTT 试剂盒 (Biosharp 公司); H₂O₂ 溶液 (天津恒兴化学试剂公司); 普罗布考 (批号 MKBQ8447V, 质量分数 > 98%, Sigma 公司); AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电位试剂盒 (BD 公司); 活性氧 (ROS) 检测试剂盒、MDC 自噬检测试剂盒 (Solarbio 公司); 乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 一抗 Caspase-3 (Cell Signaling 公司), Bax、Bcl-2、自噬微管相关蛋白轻链 3B (LC3B)、p62、 β -actin 抗体 (Abcam 公司); 羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗 (Odyssey 公司)。

1.3 仪器

ELIE II 细胞培养箱 (美国 Revco 公司); NIKON ECLIPSE TS100 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); SW-CJ-1F 型净化工作台 (苏州净化设备有限公司); Arium 611VF 型超纯水仪 (德国 Sartorius 公司); TDZ5-WS 型离心机 (上海卢湘仪器公司); iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); BioMate*3S 分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BD FACSAria III 流式细胞仪、Aria 电脑工作站 (美国 BD 公司); Odyssey CLx 双色红外激光成像系统 (美国 Li-Cor 公司); maXis HD 四极杆-飞行时间质谱 (德国 Bruker 公司); Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国 Dionex 公司)。

2 方法

2.1 DS 制备

取 1 kg 南葶苈子原药材与 10 倍量水, 每次煎煮 1 h, 共煎煮 3 次, 纱布滤过, 收集合并滤液, 进行减压浓缩干燥。以槲皮素和槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖基-7-O- β -龙胆双糖苷作为 DS 质控标准, 经

HPLC法^[17]测定,水提物中含槲皮素 1.324 7 mg/g,槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-7-*O*- β -龙胆双糖苷 1.046 8 mg/g。

2.2 供试品溶液制备

精密量取 DS,用 70%乙醇定容成 0.01 g/mL,超声处理 10 min,取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.3 色谱与质谱条件

2.3.1 液相色谱条件 AcclaimTM RSLC 120 C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 2.2 μ m);柱温 20 $^{\circ}$ C;体积流量 0.30 mL/min;进样量 2 μ L;流动相 A 为 0.1% 乙酸水溶液, B 为乙腈,洗脱梯度:0~15 min, 5%~10% B; 15~20 min, 10%~50% B; 20~25 min, 50%~90% B。

2.3.2 质谱条件 检测模式为正、负离子同时监测;毛细管喷雾电压 3.2 kV;毛细管电压 3.2 kV,雾化气:800 kPa,去溶剂气体积流量 8 L/min,去溶剂气温度 230 $^{\circ}$ C,离子源能量 3.0 eV,孔电压 45 V,撞能量 8.0 eV。

2.4 细胞培养、模型制备与分组

使用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度培养 H9c2 细胞。实验取对数生长期的细胞接种于 96 孔板,细胞密度 5×10^4 个/mL,每孔 200 μ L;或接种于 6 孔板,每孔 3 mL。培养 24 h 后,按照以下分组给药处理:对照组换用新鲜培养基培养;模型组换用含 200 μ mol/L H₂O₂ 的培养基;普罗布考组在细胞培养基中加入终浓度为 10 μ g/mL 普罗布考和 200 μ mol/L H₂O₂ 的培养基;DS 不同质量浓度组分别在细胞培养基中加入终质量浓度为 50、100、200、400 μ g/mL DS 和 200 μ mol/L H₂O₂ 的培养基。药物作用 6 h 后进行后续实验。

2.5 MTT 法检测 H9c2 细胞活力

使用 96 孔板接种 H9c2 细胞,按照“2.4”项下方法进行分组及处理后,换用含 10% MTT 的培养基培养 4 h,弃去原培养液,每孔使用 150 μ L DMSO 终止实验,振荡混匀 10 min,酶标仪检测波长 490 nm 处各组吸光度 (A) 值。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.6 流式细胞仪检测 H9c2 细胞 ROS、线粒体膜电位、细胞凋亡率、自噬空泡

使用 6 孔板接种 H9c2 细胞,按照“2.4”项下方法进行分组及处理后,收集细胞培养上清, PBS 缓冲液洗涤 1 遍,合并细胞培养上清与洗涤液,

0.25%胰蛋白酶消化贴壁细胞,800 r/min 离心 5 min,收集所有上清液、洗涤液中的细胞及消化后的细胞。分别遵照说明书进行 AnnexinV-FITC/PI 双染、DCFH-DA 探针孵育、JC-1 探针孵育、MDC 染料孵育及其余染色操作。利用流式细胞仪进行各项检测分析。

2.7 H9c2 细胞 LDH、MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性检测

使用 6 孔板接种 H9c2 细胞,按照“2.4”项下方法进行分组及处理后,收集上清液,按试剂盒说明书检测细胞培养上清液中 LDH 水平;收集细胞,-20 $^{\circ}$ C 与室温进行反复冻融 3 次,按照试剂盒说明书检测细胞中 MDA 水平及 SOD、GSH-Px 活性。

2.8 Incell-Western 法检测 H9c2 细胞凋亡相关蛋白与自噬标志性蛋白表达

使用 96 孔板接种 H9c2 细胞,按照“2.4”项下方法进行分组及处理后,弃去细胞培养上清,以 150 μ L 10%甲醛固定 20 min。固定后以 0.1% Triton-x-100 进行洗涤,每次 5 min,共洗涤 5 次。150 μ L 封闭液室温封闭 1.5 h。封闭结束后进行 Caspase-3、Bax、Bcl-2、LC3B、p62、 β -actin 一抗孵育,每孔 50 μ L,一抗稀释比 1:100,4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h。PBST 洗涤,每次 5 min,共洗涤 5 次。每孔加 50 μ L 二抗稀释液 (1:500) 室温孵育 1 h。PBST 洗涤,每次 5 min,共洗涤 5 次。完全吸除洗涤液后,进行双色红外激光成像系统 700、800 nm 双通道检测与分析。

2.9 统计学分析

数据使用 SPSS 19.0 统计软件分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析进行差异比较。

3 结果

3.1 DS 主要成分鉴定

根据质谱信息并结合文献资料,共分析鉴定出 DS 中含量最高的 7 种成分,即槲皮素^[18] (1)、山柰酚-3,7-二-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷^[19] (2)、东莨菪苷^[20] (3)、补骨脂素^[20] (4)、山柰酚-3-*O*- β -龙胆双糖基-7-*O*- β -龙胆双糖苷^[19] (5)、槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-7-*O*- β -龙胆双糖苷^[21] (6)、异鼠李素-3- β -*D*-吡喃葡萄糖苷^[21] (7),正、负离子流图及化合物具体信息见图 1 和表 1。

3.2 DS 对 H₂O₂ 诱导损伤的 H9c2 细胞活力的影响

MTT 检测结果显示,与对照组比较,模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,DS 各质量浓度组细胞活力均显著提高 ($P < 0.05$ 、0.01),

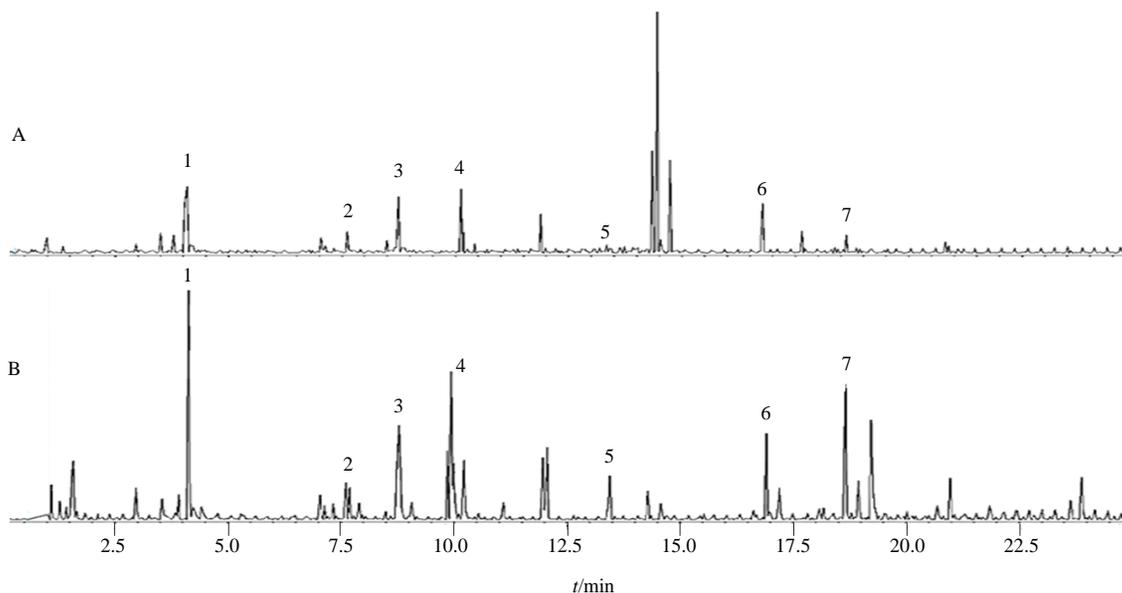


图 1 DS 在正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatograms of positive ions (A) and negative ions (B) in aqueous extract from DS

表 1 通过 UPLC-MS 鉴定的色谱峰

Table 1 Identification of chromatographic peaks by HPLC-MS

编号	t_R/min	实测值 $[M-H]^-$	分子式 (相对分子质量)	化合物
1	4.14	301.031 8	$C_{15}H_{10}O_7$ (302.24)	槲皮素
2	7.63	609.137 9	$C_{27}H_{30}O_{16}$ (610.52)	山柰酚-3,7-二- O - β -D-吡喃葡萄糖苷
3	8.79	353.086 7	$C_{16}H_{18}O_9$ (354.31)	东莨菪苷
4	9.95	185.023 3	$C_{11}H_6O_3$ (186.16)	补骨脂素
5	13.46	771.190 3	$C_{33}H_{40}O_{21}$ (772.66)	山柰酚-3- O - β -龙胆双糖基-7- O - β -龙胆双糖苷
6	16.91	787.186 1	$C_{33}H_{40}O_{22}$ (788.66)	槲皮素-3- O - β -D-吡喃葡萄糖基-7- O - β -龙胆双糖苷
7	18.66	477.097 3	$C_{22}H_{22}O_{12}$ (478.40)	异鼠李素-3- β -D-吡喃葡萄糖苷

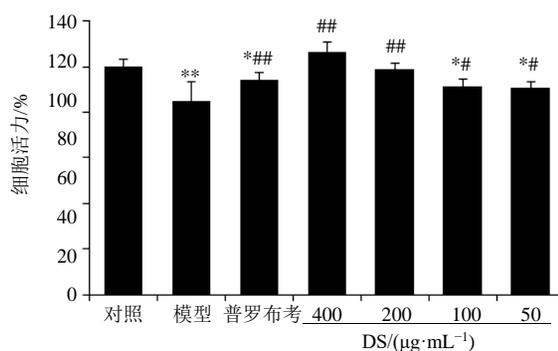
表明 DS 对经 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞活力具有明显的提升作用, 见图 2。同时发现, DS 对未进行 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞活力无明显影响 (数据未列出)。

3.3 DS 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞死亡率的影响

根据 MTT 结果, 选择了 DS 200 $\mu g/mL$ 进行后续实验。以 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, 结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DS 200 $\mu g/mL$ 有效提高了细胞的存活率, 并降低了凋亡率 ($P < 0.01$), 见图 3。

3.4 DS 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞自噬空泡水平的影响

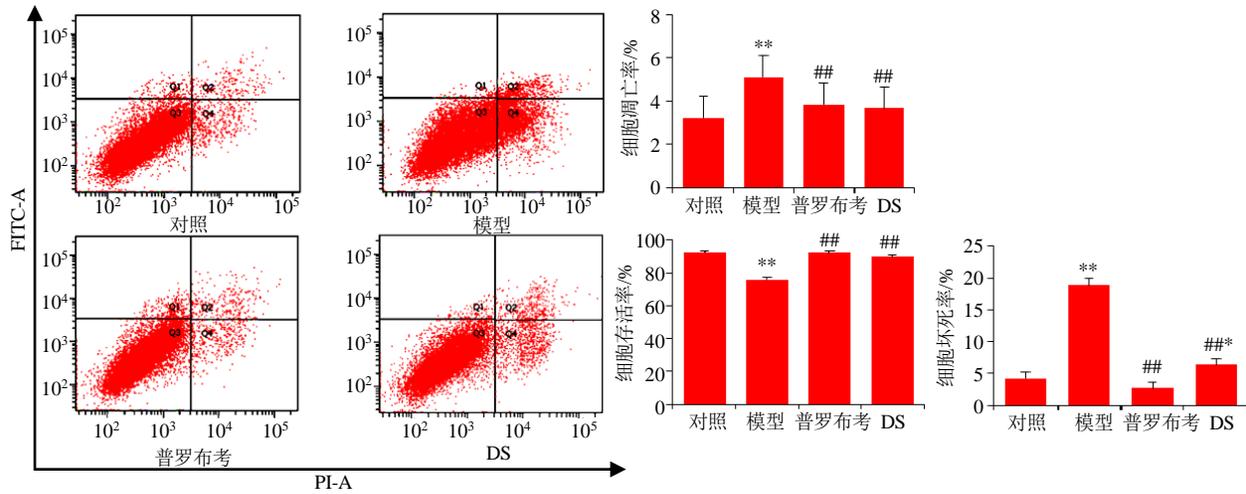
使用 MDC 染料进行检测, 以荧光水平的比值代表自噬水平。结果 (图 4) 显示, 与对照组比较, 模型组细胞自噬水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 2 DS 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of DS on cell viability of H_2O_2 -induced H9c2 cell injury model ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$, 下同
 $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 3 DS 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of DS on apoptosis of H_2O_2 -induced H9c2 cell injury model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

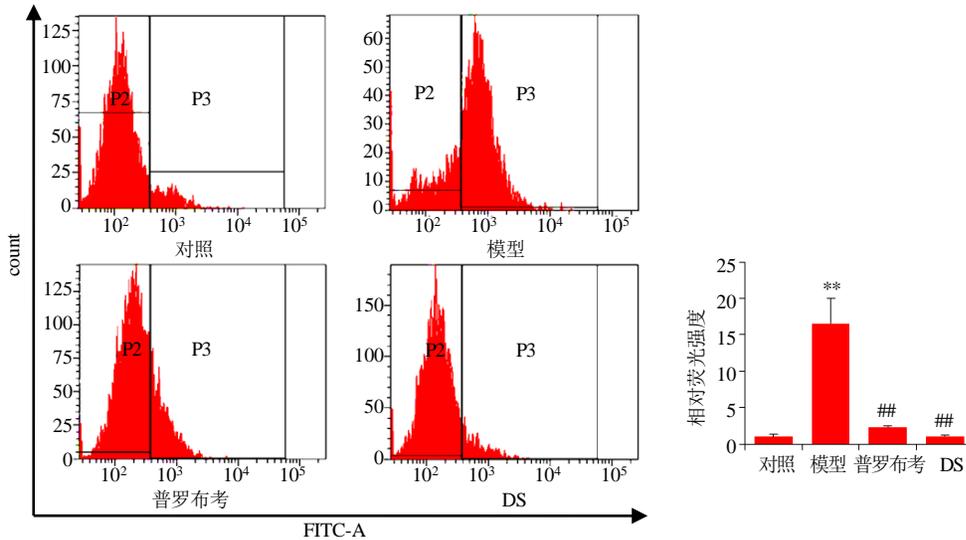


图 4 DS 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞自噬空泡水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of DS on autophagy in H9c2 cell injury model induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组比较, DS 200 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞自噬水平显著降低 ($P < 0.01$), 并恢复到正常水平。

3.5 DS 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞线粒体膜电位水平的影响

使用 JC-1 探针进行检测, 以红、绿荧光水平的比值代表线粒体膜电位水平。结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞线粒体膜电位水平显著降低 ($P < 0.01$), 与模型组比较, DS 200 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞线粒体膜电位水平显著提高 ($P < 0.01$), 见图 5。

3.6 DS 对 H_2O_2 诱导损伤的 H9c2 细胞 Caspase-3、Bax、Bcl-2、LC3B、p62 蛋白表达水平的影响

与对照组比较, 模型组细胞凋亡相关蛋白

Caspase-3 表达水平和 Bax/Bcl-2 显著升高 ($P < 0.01$), 自噬标志性蛋白 LC3B、p62 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DS 200 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 Caspase-3 蛋白表达水平和 Bax/Bcl-2 显著降低 ($P < 0.01$), LC3B、p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 见图 6。

3.7 DS 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞 ROS 水平的影响

使用 DCFH-DA 探针进行检测, 以荧光水平代表细胞内 ROS 水平。结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DS 200 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 7。

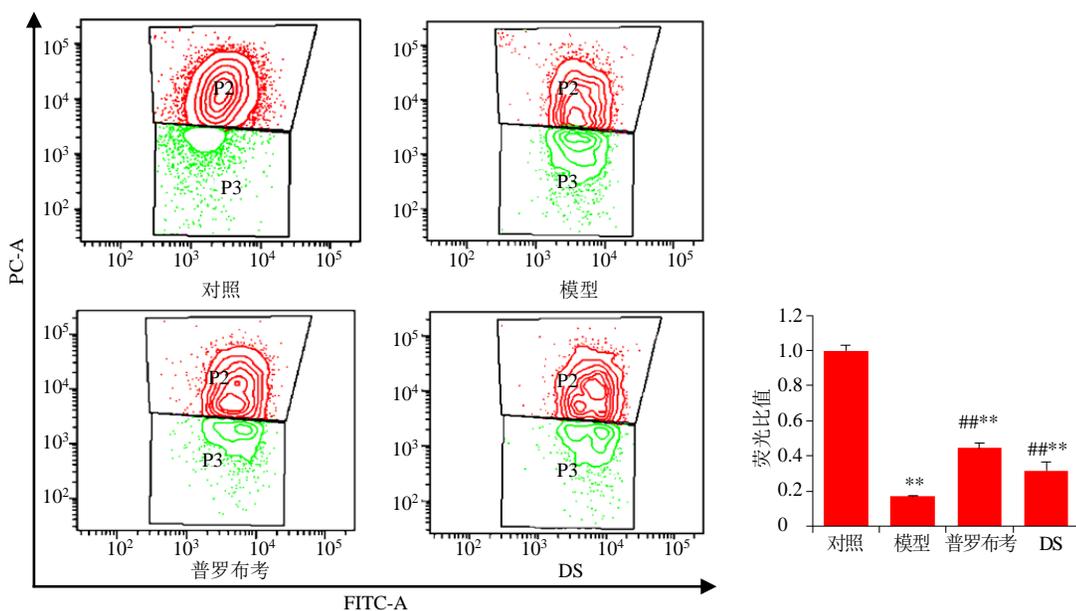


图 5 DS 对 H₂O₂ 诱导损伤的 H9c2 细胞线粒体膜电位水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of DS on mitochondrial membrane potential in H9c2 cell injury model induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

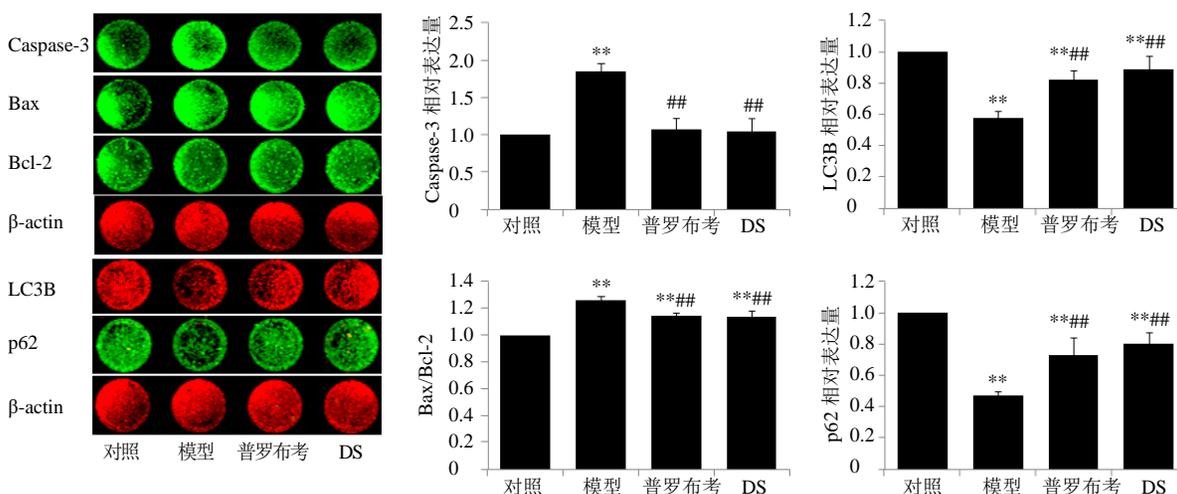


图 6 DS 对 H₂O₂ 诱导损伤的 H9c2 细胞 Caspase-3、Bax、Bcl-2、LC3B、p62 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of DS on expressions of Caspase-3, Bax, Bcl-2, LC3B, and p62 proteins in H₂O₂-induced H9c2 cell injury model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 DS 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、LDH 水平的影响

与对照组比较, 模型组细胞 SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$), LDH 水平显著升高 ($P < 0.01$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$), GSH-Px 活性显著下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, DS 200 μg/mL 组细胞 SOD、GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$), LDH、MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), 且数据显示, 各项氧化还原相关指标恢复到接近对照组水平, 结果见表 2。

4 讨论

本实验室前期研究已在动物水平上验证了南葶苈子的抗心衰效果^[16]。因此, 本研究的主要目的是探明南葶苈子抗心衰的主要作用机制。首先检测了 DS 对 H9c2 细胞活力的影响, 结果发现 DS 50~400 μg/mL 能有效提高 H₂O₂ 诱导损伤后 H9c2 细胞的活力。进一步研究 DS 的主要成分。根据文献资料与质谱信息, 分析 DS 主要含有以槲皮素、山柰酚及异鼠李素为基本苷元的系列黄酮苷类成分, 与文献报道中的结论相一致^[18]。其中, 槲皮素含量最高,

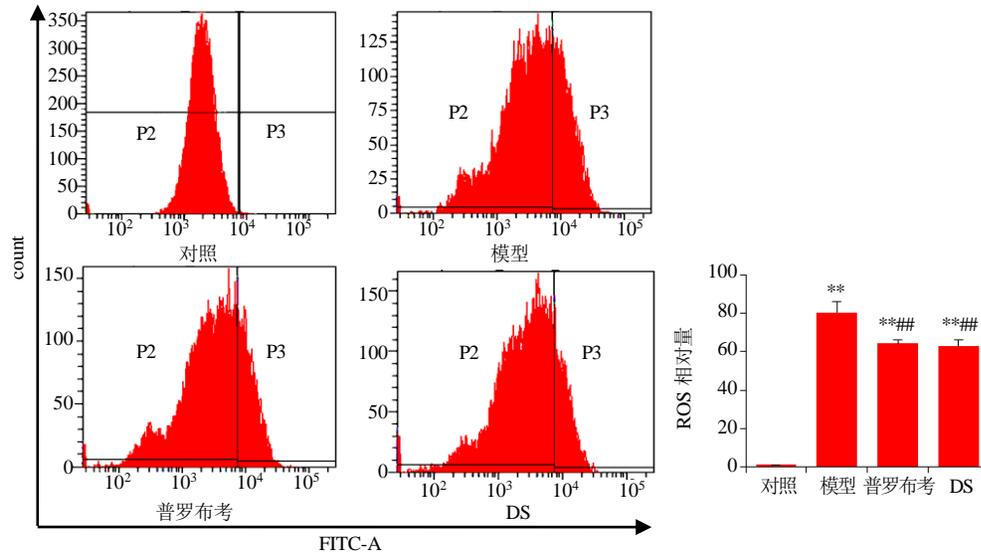


图 7 DS 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of DS on ROS fluorescence level in H₂O₂-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 DS 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、LDH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of DS on the level of SOD, LDH, MDA, GSH-Px in H₂O₂-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SOD ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	LDH ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	MDA ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	GSH-Px ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)
对照	—	31.58 ± 3.56	117.94 ± 20.20	1.16 ± 0.16	21.79 ± 1.13
模型	—	11.99 ± 1.68**	263.80 ± 21.26**	5.27 ± 0.48**	8.02 ± 1.31**
普罗布考	10	21.38 ± 5.36**##	177.69 ± 23.94**##	2.17 ± 0.52**##	18.08 ± 3.46**##
DS	200	26.40 ± 2.72##	144.61 ± 17.03##	1.88 ± 0.59##	17.04 ± 1.96**##

山柰酚-3-O-β-龙胆双糖基-7-O-β-龙胆双糖苷和槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-7-O-β-龙胆双糖苷为南葶苈子中含量较高而其他植物中极少存在的化合物，可视为南葶苈子的特征性成分^[18]。推测 DS 保护心肌细胞免受 H₂O₂ 损伤的物质基础可能与上述几种成分有关。

为了阐明 DS 抗 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤的作用机制，从其对 H9c2 细胞凋亡和自噬 2 方面的影响进行进一步探索。细胞凋亡是一种受到一系列级联式通路严格控制的细胞程序性自杀过程，是通过细胞内的遗传机制有序地使细胞走向死亡，最终整个细胞的成分被消化降解的过程^[22]，正常情况下，细胞凋亡负责清除老化受损或突变的细胞，从而保护个体的健康^[23]，但大量和急性的心肌细胞凋亡会导致心功能损伤^[24-25]。细胞自噬是一种保守的细胞自我降解方式，指细胞将多余或受损的蛋白及细胞器清理掉^[26]，具有双重调节作用：温和的自噬能保护细胞免受有害因素影响，严重或快速的自噬将诱导细胞发生程序性死亡^[27]。有报道指出，心肌细胞的基础自噬在其抵抗外界损伤和维护自身完整

的过程中发挥重要作用^[28]。但是多种心血管疾病的发生也与过度的自噬相关^[29-30]。在心力衰竭过程中，调节自噬提供了一个预防和治疗心衰的新途径。一些临床研究也表明，多种药物可通过调节自噬达到治疗心力衰竭的目的^[31-33]。

本实验通过检测 H9c2 细胞的凋亡水平，发现 DS 可以有效提升细胞的存活水平，降低细胞的凋亡水平。细胞凋亡主要通过 2 种信号转导途径实现：内在途径和外在途径。典型的细胞凋亡内在途径即线粒体凋亡途径，是由于细胞内在调控信号紊乱，引起调控线粒体膜电位的 Bcl-2 家族蛋白成员表达异常，其中促凋亡蛋白 Bax 活化转运到线粒体外膜，造成其与抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达比例失调，致使线粒体膜电位下降，细胞色素 C 释放，造成 Caspase-3 级联通路激活，细胞凋亡^[34]。本研究检测了 H9c2 细胞 Caspase-3 蛋白、促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 后发现，DS 可以减少 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞 Caspase-3 蛋白的表达，下调 Bax 与 Bcl-2 的比值。同时，在检测线粒体膜电位水平之后发现，DS 可以有效提高 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞线粒体膜电位

水平。因此,可以推测葶苈子能够降低 H_2O_2 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡率,其机制可能与抑制线粒体通路的细胞凋亡有关。

另一方面,通过检测发现 DS 可以有效降低 H_2O_2 诱导的 H9c2 心肌细胞的自噬水平。进一步检测了自噬溶酶体膜上的自噬标记蛋白 LC3B 和自噬体膜受体蛋白 p62 的表达情况。LC3 参与调节细胞自噬过程,当自噬发生时,LC3 家族中的 LC3B 蛋白活化表达,被招募到自噬体膜上,因此它是目前公认的用来检测自噬发生的分子标志物^[35]。然而,自噬体数量的增加可能是自噬被激活,也可能是溶酶体量减少的结果。由于自噬体膜受体蛋白 p62 蛋白能被自噬溶酶体选择性降解,所以 p62 的总水平与真正的自噬活性呈负相关^[36]。因此,LC3B 的增加与 p62 的减少相结合表明自噬通量激活,而 LC3B 和 p62 的积累表示自噬通量的中断^[37-39]。本实验结果进一步表明,DS 可以不同程度提高细胞内 LC3B 与 p62 水平,因此可以推测 DS 具有中断自噬通量的作用。

氧化应激与心力衰竭^[40]、心肌缺血/再灌注损伤^[41]、急性心肌梗死^[42]等疾病的发生有密切的关系。过量 ROS 与细胞内脂质反应产生 MDA,进而破坏细胞膜完整性及流动性,引起细胞损伤^[43]。研究发现氧化应激损伤进一步造成的严重影响之一就是导致线粒体渗透性转换孔(mPTP)开放,mPTP 的开放程度改变会引起线粒体膜电位去极化,激活 Caspase-3 级联通路,产生细胞凋亡^[44]。同时,氧化应激过程中产生的大量 ROS 可以诱导自噬的发生^[45]。另外,LDH 是临床心脏损伤的生物标志物,与细胞膜受损程度相关,细胞膜完整性被破坏时,游离 LDH 水平上升^[46]。本研究发现 DS 可以有效降低细胞内 ROS、MDA 与 LDH 水平,同时可以提高细胞内抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 的活性,且 DS 的作用与阳性药效果相当,甚至可将 MDA、SOD 和 LDH 水平恢复至与正常细胞无明显差异。由此推测,DS 保护心肌细胞免受 H_2O_2 损伤的机制可能与其恢复细胞内氧化还原稳态,进而恢复细胞活力有关。

综上所述,DS 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞损伤具有显著保护作用,其机制可能与改善细胞内氧化还原稳态,抑制线粒体凋亡途径和自噬通路有关。DS 抗 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞损伤的物质基础可能与其所含的黄酮苷类成分有关,但还需进一步研究加以确认。

参考文献

- [1] 国家心血管疾病中心. 中国心血管病报告 2016 [M]. 北京: 中国百科全书出版社, 2016
- [2] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2016》概要 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32(6): 521-530.
- [3] 张文, 张艳, 礼海. 葶苈子在慢性心衰治疗中的应用 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(4): 349.
- [4] 潘九英, 金芝贵, 吴飞华. 葶苈子及其复方治疗心血管系统疾病的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(12): 83-85.
- [5] 石衍梅, 李洁, 张庆蕊, 等. 基于中医传承辅助平台的治疗慢性心力衰竭方剂组方规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016: 22(2): 191-194.
- [6] 冯志毅, 王小兰, 郑晓珂. 葶苈子的本草考证 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(9): 1938-1941.
- [7] 孙利, 谷春华, 高学东, 等. 芪苈强心胶囊对不同病因所致慢性心力衰竭患者心功能的影响 [J]. 河北中医, 2013, 35(6): 904-905.
- [8] 王萧. 十枣汤合葶苈子方治疗心力衰竭的临床与实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2000.
- [9] 李克忠. 生脉强心汤治疗慢性心衰 40 例 [J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(1): 88.
- [10] 王志军, 曹佳佳, 刁增利, 等. 芪苈强心胶囊改善心肌梗死后心力衰竭患者的临床症状 [J]. 中成药, 2015, 37(1): 44-48.
- [11] 颜蕾, 薛文海, 尹立俊. 益心汤对慢性心功能不全患者心功能影响的临床研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(12): 1-2.
- [12] 沈淑静, 冼绍祥, 黄衍寿, 等. 益气温阳活血利水中药对心力衰竭兔的血流动力学影响和配伍研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 195-199.
- [13] 郭娟, 陈长勋. 葶苈子对压力负荷性大鼠心室重构及神经内分泌因子和心肌 I、III 型胶原的影响 [J]. 中药材, 2007, 30(8): 963-967.
- [14] 王晴川, 刘广芬, 李常春. 播娘蒿种子(华东葶苈子)的强心作用、生物活性、吸收、蓄积及毒性反应 [J]. 福建医学院学报, 1964(Z1): 27-33.
- [15] 周喜丹, 唐力英, 周国洪, 等. 南北葶苈子的最新研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4699-4708.
- [16] 张国顺, 白义萍, 郑晓珂, 等. 葶苈子抗心衰有效组分筛选及其作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(4): 118-125.
- [17] 姜艳, 尹学艳, 李晋, 等. 高效液相色谱法同时测定南葶苈子中 6 种成分含量 [J]. 天津中医药, 2016, 33(12): 750-755.
- [18] 孙凯. 南葶苈子的化学成分及其生物活性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [19] 王爱芹, 王秀坤, 赵海誉, 等. 南葶苈子化学成分与质

- 量研究 [J]. 中国药物与临床, 2005, 5(1): 5-6.
- [20] Zhou X, Tang L, Wu H, *et al.* Chemometric analyses for the characterization of raw and processed seeds of *Descurainia sophia* (L.) based on HPLC fingerprints [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.03.010.
- [21] Meng Z H, Qiao L, Whang Z Q, *et al.* Analysis of the constituents in *Semen Descurainiae* by UPLC/Q-TOF-MS/MS [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2015, 24(5): 303-309.
- [22] Kukhta V K, Marozkina N V, Sokolchik I G, *et al.* Molecular mechanisms of apoptosis [J]. *Ukr Biokhim Zh* 2003, 75(6): 5-9.
- [23] Fan Y J, Zong W X. The cellular decision between apoptosis and autophagy [J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(3): 121-129.
- [24] Corbalan J J, Vatner D E, Vatner S F. Myocardial apoptosis in heart disease: Does the emperor have clothes? [J]. *Basic Res Cardiol*, 2016, doi: 10.1007/s00395-016-0549-2.
- [25] 鹿欣伦, 胡成云, 张雨梅. 心力衰竭机制的研究进展 [J]. 山西医药杂志, 2011, 40(8): 766-767.
- [26] Green D R, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate [J]. *Cell*, 2014, 157(1): 65-75.
- [27] Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: A double-edged sword [J]. *Science*, 2004, 306(5698): 990-995.
- [28] Ren S Y, Xu X. Role of autophagy in metabolic syndrome-associated heart disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 225-231.
- [29] Matsui Y, Kyo S, Takagi H, *et al.* Molecular mechanisms and physiological significance of autophagy during myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Autophagy*, 2008, 4(4): 409-415.
- [30] Xu X, Hua Y, Nair S, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor deletion exacerbates pressure overload-induced cardiac hypertrophy through mitigating autophagy [J]. *Hypertension*, 2014, 63(3): 490-499.
- [31] Song Y, Li W, Peng X, *et al.* Inhibition of autophagy results in a reversal of taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma by enhancing taxol-induced caspase-dependent apoptosis [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1934-1942.
- [32] Dutta D, Xu J, Dirain M L, *et al.* Calorie restriction combined with resveratrol induces autophagy and protects 26-month-old rat hearts from doxorubicin-induced toxicity [J]. *Free Rad Biol Med*, 2014, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.011.
- [33] Xie Z L, Lau K, Eby B, *et al.* Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice [J]. *Diabetes*, 2011, 60(6): 1770-1778.
- [34] Liu S, Pereira N A, Teo J J, *et al.* Mitochondrially targeted Bcl-2 and Bcl-X(L) chimeras elicit different apoptotic responses [J]. *Mol Cells*, 2007, 24(3): 378-387.
- [35] Saita S, Shirane M, Nakayama K I, *et al.* Selective escape of proteins from the mitochondria during mitophagy [J]. *Nat Commun*, 2013, doi: 10.1038/ncomms2400.
- [36] Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik A F, *et al.* Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: Role of autophagy [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(6): 1173-1191.
- [37] Xu X, Hua Y, Nair S, *et al.* Akt2 knockout preserves cardiac function in high-fat diet-induced obesity by rescuing cardiac autophagosome maturation [J]. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5(1): 61-63.
- [38] Xu X, Bucala R, Ren J. Macrophage migration inhibitory factor deficiency augments doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(6): e000439.
- [39] Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, *et al.* Deacetylation of FoxO by sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 2010, 107(12): 1470-1482.
- [40] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(6): H2181-H2190.
- [41] Martindale J J, Metzger J M. Uncoupling of increased cellular oxidative stress and myocardial ischemia reperfusion injury by directed sarcolemma stabilization [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.008.
- [42] Bhatt D L, Pashkow F J. Introduction. Oxidative stress and heart disease [J]. *Am J Cardiol*, 2008, doi: 10.1016/j.amjcard.2008.02.001.
- [43] Sokolova N, Pan S, Provazza S, *et al.* ADP protects cardiac mitochondria under severe oxidative stress [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83214.
- [44] Mokwatsi G G, Schutte A E, Kruger R. A biomarker of tissue damage, lactate dehydrogenase, is associated with fibulin-1 and oxidative stress in blacks: The SAfrEIC study [J]. *Biomarker*, 2016, 21(1): 48-55.
- [45] Filomeni G, de Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(3): 377-388.
- [46] Cai Q, Wei J, Zhao W, *et al.* Toxicity of evodiae fructus on rat liver mitochondria: The role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition [J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 21168-21182.