

【药效学评价】

注射用益气复脉(冻干)对H₂O₂所致H9C2细胞损伤的保护作用模型的建立及初步验证

李晓凡¹, 王秀丹², 万梅绪^{3,4}, 李智^{3,4}, 李德坤^{3,4}, 张彦文^{5*}, 鞠爱春^{3,4*}

1. 天津医科大学 药学院, 天津 300070
2. 天津中医药大学 研究生院, 天津 300193
3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410
4. 天津市中药注射剂安全评价企业重点实验室, 天津 300410
5. 天津医学高等专科学校, 天津 300222

摘要:目的 建立注射用益气复脉(冻干)(YQFM)对H9C2心肌细胞损伤的保护作用,并对30批样品进行测定。方法 筛选H₂O₂对H9C2心肌细胞损伤的造模时间(0.5、1.0、1.5 h)、造模剂量(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol/L),确定最佳造模方式;并进行线性、精密度和耐用性方法学考察;以YQFM随行样品作为对照,以细胞存活率作为衡量其保护作用的指标。结果 造模时间为0.5 h, H₂O₂造模剂量为0.2 mmol/L时,细胞存活率为60%左右,造模效果相对稳定;浓度为5 mg/mL的30批YQFM,使H₂O₂所致的损伤H9C2细胞的存活率为84.4%~96.8%,具有较好的细胞保护作用。结论 所建方法适用于YQFM对H9C2细胞损伤的保护作用研究,可作为初步评价YQFM生物学质量标准。

关键词:注射用益气复脉(冻干);H9C2心肌细胞;H₂O₂;生物学质量标准;抗氧化

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2020)08-1510-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.08.007

Establishment and preliminary verification of protective model of H9C2 cell injury induced by H₂O₂ by Yiqi Fumai Lyophilized Injection

LI Xiaofan¹, WANG Xiudan², WAN Meixu^{3,4}, LI Zhi^{3,4}, LI Dekun^{3,4}, ZHANG Yanwen⁵, JU Aichun^{3,4}

1. Tianjin Medical University, Pharmacy, Tianjin 300070, China
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Graduate School, Tianjin 300193, China
3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China
4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation of TCM Injections, Tianjin 300410, China
5. Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China

Abstract: Objective Establish a protective effect of YiqiFumai Lyophilized Injection for injection on H9C2 cardiomyocyte injury. Determine the protective effect of 30 batches of samples on myocardial cell injury. **Methods** Study the modeling time (0.5, 1.0, and 1.5 h) and the modeling dosage (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 0.6 mmol/L) of H₂O₂ on H9C2 cardiomyocyte injury. Determine the best modeling method, and carry out linear, reproducible, precision and stability methodological investigation. Use the accompanying sample as a control. Use the percentage of CCK-8 cell viability as an index to measure its relative protection. **Results** When the modeling time was 0.5 h, the dose of H₂O₂ was 0.2mM, the degree of cell damage was about 60%, and the modeling effect was relatively stable. The concentration of YiqiFumai (lyophilized) in 30 batches was 5 mg/mL. Its protective effect on H9C2 cardiomyocyte injury induced by H₂O₂ is between 84.4% — 96.8%, which has a good cytoprotective effect. **Conclusion** The established method is suitable for the protective effect of YiqiFumai Lyophilized Injection for injection on H9C2 cell injury. It can be

收稿日期: 2019-12-24

基金项目: 天津市科技计划项目(18YFCZZC00430)

第一作者: 李晓凡(1994—),女,硕士研究生,研究方向为中药药理。Tel:15128766680 E-mail:lixiaofan2017@163.com

*通信作者: 张彦文(1966—),教授,研究方向为药物化学。Tel:18526335569 E-mail:zyw19661968@126.com

鞠爱春(1973—),高级工程师,研究方向为中药药理及中药注射剂工艺及质量控制。Tel:(022)86342096 E-mail:juach@tasly.com

used as a preliminary evaluation of the biological quality standard of YiqiFumai Lyophilized Injection for injection.

Key words: YiqiFumai Lyophilized Injection; H9C2 cardiomyocytes; H₂O₂; biological quality standard; antioxidant

注射用益气复脉(冻干)(YQFM)是由红参、麦冬、五味子3味药按照一定比例配伍,再经由一系列现代工艺加工制备而成的冻干粉,含有多种有效成分^[1],具有益气复脉、养阴生津等功效,临床上主要用于冠心病劳累性心绞痛的气阴两虚证,以及冠心病所致慢性左心功能不全II、III级气阴两虚证,疗效显著。蒋寅^[2]阐述了鞠爱春、孙兰军等多名学者的临床研究成果,证实了YQFM对心衰和心绞痛的治疗作用;刁艳菲^[3]研究了86例慢性心衰患者,并给予YQFM和西药联合使用后,证实YQFM有增强心肌收缩力的功效;马振国^[4]研究了86例缺血性心脏病合并心力衰竭的患者,给予YQFM治疗后,治疗有效率提高;张崇荣等^[5]研究了62例气阴两虚型心绞痛患者,发现给予YQFM治疗后能够改善冠心病心绞痛的临床症状;袁长玲等^[6]研究了YQFM对冠心病心力衰竭联合心绞痛的治疗作用,发现与仅给予常规治疗相比,YQFM联合治疗后,心功能提高,活动耐量提高;孙静等^[7]利用静脉滴注的方式研究了YQFM对136例冠心病心绞痛患者的治疗作用,证明了YQFM在治疗冠心病心绞痛方面安全有效。

有研究证实,心血管疾病的发生和体内氧自由基有密切联系^[8-14]。体内氧自由基的增多会导致退行性疾病如帕金森氏症和阿尔茨海默症等^[15-16]。氧化应激是指机体氧化和抗氧化能力失衡,导致体内氧自由基大量堆积的现象^[17]。人体中存在清除氧自由基的物质和酶,但当氧自由基的数量超过人体自身清除能力时,会造成许多不可逆的损伤,如脂质过氧化、DNA和RNA的损伤、蛋白质变性、氧化酶的破坏等^[18]。因此,考察心血管药物的抗氧化活性成为评价心血管药物的一个重要指标。

氧化应激模型的造模方式有很多,主要分为动物模型和细胞模型^[19-20],与动物模型相比,细胞模型克服了动物模型的个体差异性大,模型结果不稳定的特点,并且细胞模型操作严格规范,结果更加严谨,更能从微观反映药物的特点。氧化应激源有很多种,如化学源H₂O₂、阿霉素、溴化苯等,物理源紫外照射、辐照等^[21]。H₂O₂作为一种常见的氧自由基,易穿透细胞膜,性质相对稳定^[22],因此在文献报道中最为常见。

生物学质控是指采用生物学手段,评价产品产生的特定生物学效应,从而拟定产品的质量标准化

围,完成对产品的质量控制的过程。各国药典对生物学质控方法有一些具体规定,例如美国药典规定,生物学质控应该由体外或体内检测组成,或两者兼有。本课题组前期工作已证实,YQFM对H9C2大鼠心肌细胞有一定的保护作用^[23],其他学者也通过实验证明YQFM对心肌具有一定的保护作用^[24-27]。考虑到要考察YQFM对氧化应激所造成的心肌损伤,最后选择H9C2大鼠心肌细胞作为实验细胞^[28]。

1 材料

1.1 细胞株

大鼠H9C2心肌细胞株,购自ATCC官方网站。细胞的复苏、培养与传代参照文献^[29]进行,用含10%的FBS与1% PBS的DMEM高糖培养基,放置在37℃、5% CO₂培养箱中培养,2~3 d换1次液。

1.2 药物与主要试剂

YQFM(天津天士力之骄药业有限公司,规格0.65 g/瓶,批号为20170311);随行对照样品(即10批连续生产的YQFM的均匀混合品,天津天士力之骄药业有限公司,批号分别为20190201、20190202、20190203、20190204、20190205、20190206、20190207、20190301、20190302、20190303);DMEM高糖培养基、青霉素、链霉素(PS)、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、PBS(Gibco公司);CCK-8试剂盒(DOJINDO公司);细胞增殖/毒性检测试剂(CCK-8)(日本同仁化学研究所);3% H₂O₂(天津市东方广诚医药化工有限公司)。

1.3 仪器设备

CO₂培养箱、ST16R台式高速冷冻离心机(Thermo公司);细胞计数仪(Merck Milipore公司);TECAN INFINITE 200酶标仪(TECAN公司);倒置显微镜(Olympus公司);XP205电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 不同浓度的YQFM对H9C2心肌细胞活力的影响

YQFM药物配方符合安全性要求,但药液浓度过高,可能会影响细胞的渗透压,因此设置药液浓度梯度来考察安全范围。取对数生长期的细胞,用培养液稀释并吹打成细胞浓度为8 000/孔的悬液,接种于96孔板中,每孔100 μL,于37℃、5%CO₂、饱

和湿度培养箱内培养24 h后,向各孔加入终质量浓度分别为0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000 mg/mL的YQFM,并设置对照组(不加药)和空白组(不接种细胞),每组6个复孔,培养48 h,培养结束后,每孔加入CCK-8溶液20 μ L,继续培养1 h,培养结束后,酶标仪450 nm下测定吸光度(A)值,并扣除空白孔的A值,计算细胞存活率。

细胞存活率=(给药组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)

结果显示,YQFM(批号20170311)在0.625~10.000 mg/mL质量浓度下对H9C2细胞活力均没有抑制作用,与对照组比较,YQFM 20 mg/mL组H9C2细胞存活率显著升高($P<0.05$)。结果见图1。

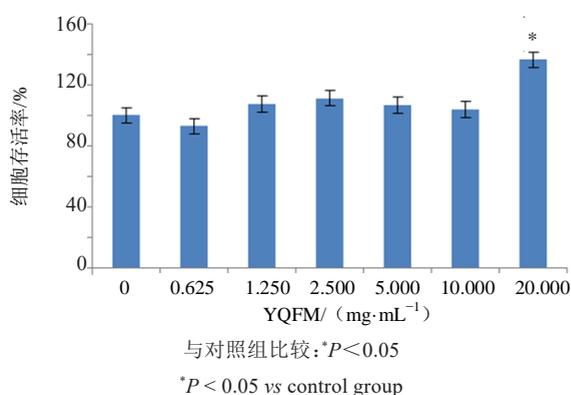


图1 YQFM对H9C2细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of YQFM on H9C2 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2 H₂O₂对H9C2细胞损伤模型方法学考察

2.2.1 H₂O₂造模浓度和时间对H9C2细胞损伤模型的影响 细胞接种操作同“2.1”项,细胞进入对数生长期后,将原细胞培养液弃去,加入无FBS的DMEM培养基,于正常条件下培养1 h后,每孔加入含0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol/L H₂O₂的培养液,考察不同浓度的H₂O₂对H9C2细胞的损伤作用;在加入H₂O₂后0.5、1.0、1.5 h后分别检测细胞存活率(CCK-8),考察3个造模时间对H9C2细胞的损伤作用。

如图2所示,H₂O₂在0.2 mmol/L浓度下,造模时间为0.5 h,细胞存活率为60%~65%,较能体现药效差异,便于进一步研究,且多次造模结果稳定;在0.1 mmol/L浓度下,造模时间为1 h,细胞存活率也为60%左右,但造模时间较长,损伤程度变化较大、结果不稳定,结合实验的易行性等因素,最终选择H₂O₂ 0.2 mmol/L、造模时间为0.5 h作为最终造模条件。

2.2.2 线性考察 应用随行对照药品进行线性考

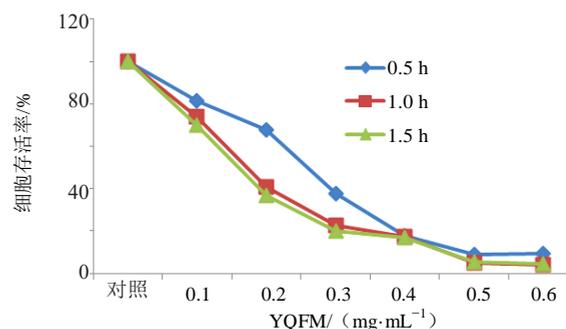


图2 不同造模时间对H9C2细胞的损伤作用

Fig. 2 Damage of H9C2 cells in different modeling time

察,细胞接种及造模方法同“2.2.1”项,0.2 mmol/L H₂O₂作用0.5 h后,向各孔加入终质量浓度分别为2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 mg/mL的YQFM,并设置对照组(不加药不造模)、模型(不加药)组和空白组(不接种细胞),培养48 h,培养结束后,CCK-8法检测A值,计算细胞存活率。以细胞存活率为纵坐标,以YQFM浓度为横坐标,进行线性回归。YQFM随行对照在2.5~12.5 mg/mL范围内线性良好,线性方程为 $y = 0.0373x + 0.586$, $R^2 = 0.9338$ 。

2.2.3 精密度考察 细胞接种及造模方法同“2.2.2”项,考察YQFM随行对照(5 mg/mL)在H₂O₂ 0.2 mmol/L、造模时间为0.5 h的条件下的6孔重复试验,考察其A值RSD值范围。

6孔A值分别为0.6098、0.3585、0.4875、0.5660、0.4934、0.5020,RSD为17.01%。由于缺乏相关领域规范标准,结合预实验数据,初定RSD小于20%即符合相关要求。

2.2.4 耐用性考察 使用相邻代数的H9C2细胞,考察YQFM随行对照(2.5、5、10 mg/mL)在H₂O₂ 0.2 mmol/L、造模时间为0.5 h的条件下的3次重复试验,考察不同代数的细胞对实验结果的影响。

3次实验所制作的标准曲线求得的 R^2 分别为0.9820、0.9781、0.9257,皆大于0.9,RSD为3.27%,根据实验结果初步判断,该方案的耐用性满足要求。

2.3 数据统计分析

实验数据采用SPSS 17.0软件进行处理,单因素方法分析进行统计学分析。

2.4 YQFM 30批样品的检测

选取2016—2019年30批YQFM,分别测定了5 mg/mL的随行对照药品和样品对H₂O₂(浓度为0.2 mmol/L、造模时间为0.5 h)所致的H9C2细胞损伤的保护作用,每批设6个孔,所得结果为6次测定的平均值。

如图3所示,30批次YQFM对H₂O₂所致的心肌

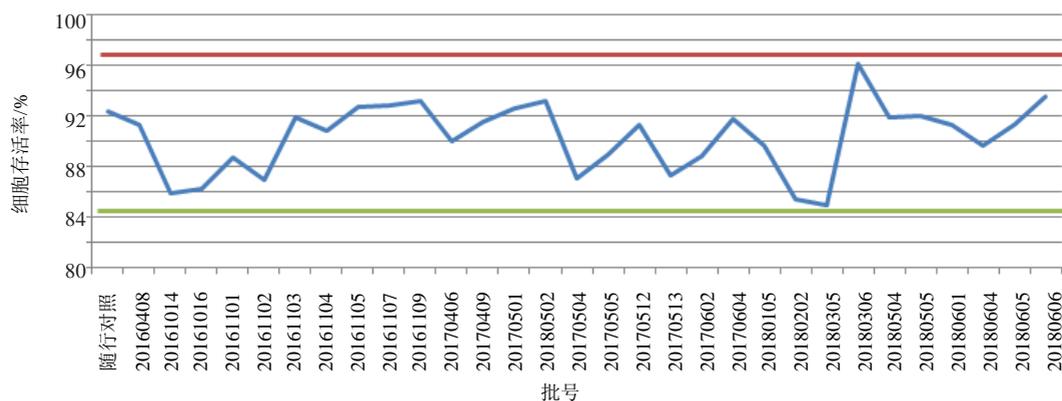


图3 30批YQFM细胞存活率
Fig. 3 Survival rate of YQFM cells in 30 batches

细胞损伤(细胞存活率为60%~65%)的保护作用在84.97%~93.5%(细胞存活率)之间,由于缺乏领域内权威规范,因此将质量合格标准定至测定批数所得数据上下极值各放宽范围跨度的5%,自定初步范围为84.4%~96.8%(下图中的绿线和红线表示)。

3 讨论

生物效价是根据药物的疗效做出的量化指标,应能直接或间接的代表或体现药物的全部或主要临床疗效,YQFM的药理药效主要体现在抗心衰、抗心肌缺血/缺氧损伤,另外也有对脑缺血和微循环及免疫功能的保护作用研究,一些动物模型如结扎冠状动脉左前降支造成的慢性心衰模型研究较多,也较为成熟,但动物模型造模相对困难,造模时间长,而且存在着整体动物模型造模不稳定的特点,容易受到体内神经、体液等因素的影响,尤其要开发成质控方法后,要进行的线性、重复性、精密度等方法学考察,难度较大,对于一般的操作者来说是一个很大的挑战。

体外细胞模型避免了动物造模的不稳定性,能够最大程度的保证模型的均一性,越来越成为各类抗心衰和心脏保护作用药物的首选模型。研究表明,YQFM能够提高心肌细胞H9C2的存活率,抑制凋亡蛋白caspase-3的表达,调节Bcl-2/Bax的表达比例,增加线粒体膜电位和ATP的含量进而纠正线粒体功能异常,从而发挥抗心肌缺血和缺氧损伤的保护作用^[33-34]。

本研究建立H₂O₂致H9C2细胞损伤的模型,紫外分光光度测量带颜色的体系都要求减掉受试物底色以求保持一致。本实验要求在加入检测剂之前换掉所有的药液,重新添加不含药物的培养液。对于细胞实验而言一般有3种常用试剂,分别为:培养液、生理盐水以及PBS。对于本实验而言,本过程

主要模拟的是缺血后再灌注的过程,检测过程中,血液重新流经心肌细胞,带来大量营养物质,因此选择完全培养液更能模拟真实的病理过程。采用线性、精密度和耐用性试验对该模型进行验证,进而评价30批次的YQFM对H₂O₂所致的H9C2心肌细胞损伤的保护作用,以30批样品的相对保护作用的均值上下浮动5%为上下限初步制定出其生物学质量标准。即YQFM对H₂O₂所致的H9C2心肌细胞损伤的相对保护作用应在84.4%~96.8%之间认为其有效性可控。

关于中药注射剂,乃至中药的生物学质控或生物效价的研究目前虽有较多人在研究,但可供参考的文献还较少,如何对中药注射剂有效性进行生物学质控的研究也是目前中药注射剂进行质量再评价的一项研究课题,本文以细胞为模型考察YQFM对H₂O₂所致的H9C2心肌细胞损伤的保护作用,初步建立其生物学质控方法,希望能为其他中药注射剂的生物学质控研究提供思路。

参考文献

- [1] 李德坤, 苏小琴, 李智, 等. 注射用益气复脉(冻干)的质量标志物研究[J]. 中草药, 2019, 50(2): 290-298.
- [2] 蒋寅, 商洪才. 注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心衰的临床证据及效应机制[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2018, 20(12): 2141-2144.
- [3] 刁艳菲. 益气复脉注射液联合西药治疗慢性心衰的效果评价[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(1): 163-164.
- [4] 马振国. 益气复脉注射液治疗缺血性心脏病心衰患者临床疗效[J]. 黑龙江医药科学, 2016, 39(5): 160-161.
- [5] 张崇荣, 牛昱光, 李欣, 等. 注射用益气复脉治疗气阴两虚型冠心病心绞痛的临床疗效观察[J]. 中国医药指南, 2016, 14(8): 211-212.
- [6] 袁长玲, 杜寿龙. 益气复脉治疗冠心病心力衰竭合并心

- 绞痛的疗效观察 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(15): 1774-1777.
- [7] 孙静, 王凤, 刘影哲, 等. 注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心绞痛136例 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(9): 1034-1035.
- [8] 杨文娟, 洪泽, 严思敏, 等. 氧化应激对血管活性物质的影响及其机制研究进展 [J]. 药学研究, 2015, 34(12): 726-730.
- [9] 魏智民, 崔华, 范利. 慢性阻塞性肺疾病与心血管疾病相关性研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2011, 32(1): 85-89.
- [10] 蒋春海. 氧化应激与糖尿病心血管并发症 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(26): 12.
- [11] Higashi Y, Maruhashi T, Noma K, et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications [J]. Trends Cardiovasc Med, 2014, 24(4):165-169.
- [12] 王全伟, 凡文博, 王智昊, 等. 氧化应激与心血管疾病关系的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(1): 270-273.
- [13] 揭红波. 浅谈心血管疾病的发病机理与预防 [J]. 中外医疗, 2011, 30(12): 184.
- [14] 郭健, 刘义, 李延平, 等. 氧自由基与心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国心血管杂志, 2008, 13(5): 384-387.
- [15] Wang X L, Wang Z W, Li L, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimers disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(8): 1240-1247.
- [16] Pisoschi A M, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review [J]. Eur J Med Chem, 2015, 97: 55-74.
- [17] Petrou A L, Terzidaki A. A meta-analysis and review examining a possible role for oxidative stress and singlet oxygen in diverse diseases [J]. Biochem J, 2017, 474(16): 2713-2731.
- [18] 何方婷, 陈嘉熠, 徐佳伊, 等. 氧化应激细胞模型建立的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 341-345.
- [19] 张斌, 夏作理, 赵晓民, 等. 氧化应激模型的建立及其评价 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(44): 112-114.
- [20] 刘建, 聂广宁, 杨洪艳. 过氧化氢诱导人卵巢颗粒细胞氧化应激模型的建立 [J]. 广东医学, 2017, 38(7): 986-989.
- [21] 田军, 朱龙飞, 坚哲, 等. 过氧化氢诱导人黑素细胞氧化应激损伤模型的建立 [J]. 实用皮肤病学杂志, 2014, 7(6): 406-410.
- [22] 郑延松, 李源, 张珊红. 用低浓度H₂O₂建立心肌细胞氧化损伤模型 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(20): 1849-1851.
- [23] 曾永君, 赵新超, 万梅绪, 等. 注射用益气复脉(冻干)对阿霉素诱导H9C2(2-1)心肌细胞毒性的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 380-385.
- [24] 张秋月, 王保和, 刘伟爽, 等. 益气复脉方对慢性心衰大鼠基质金属蛋白酶活性调节作用的实验研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(8): 825-829.
- [25] 陈贝贝. 注射用益气复脉(冻干)防治蒽环类药物心脏毒性的临床研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [26] 郑显杰, 庞力智, 韩玉潇, 等. 注射用益气复脉(冻干)改善小鼠心肌缺血再灌注损伤的作用 [J]. 中成药, 2016, 38(3): 473-480.
- [27] 李广阔. 注射用益气复脉(冻干)治疗扩张型心肌病的疗效观察 [J]. 实用中西医结合临床, 2014, 14(3): 76-77.
- [28] 赵焕新, 李晓宇, 姚红, 等. 低氧后处理诱导的低氧诱导因子-1 α 表达上调减轻H9C2心肌细胞低氧/复氧损伤 [J]. 生理学报, 2013, 65(3): 293-300.
- [29] 马芳芳, 沈晓丽, 林立芳, 等. 新生大鼠心肌细胞的原代培养 [J]. 心血管康复医学杂志, 2009, 18(2): 125-128, 201.
- [30] 熊龔, 徐涛, 龚良国. CCK-8法测定纤维蛋白胶对人脂肪干细胞的细胞毒性 [J]. 中国当代医药, 2019, 26(18): 38-40.
- [31] 陈胜, 刘珂, 秦珊, 等. CCK-8法检测蓝光和白光对ARPE-19细胞增殖的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(8): 1385-1388.
- [32] 王瑾, 马肖容, 张王刚. CCK-8法在淋巴细胞增殖检测中最佳实验条件的筛选 [J]. 中国医药导报, 2018, 15(23): 13-16, 182.
- [33] 鞠爱春, 罗瑞芝, 秦袖平, 等. 注射用益气复脉(冻干)药理作用及临床研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 354-364.
- [34] Li F, Zheng X, Fan X, et al. YiQiFuMai Powder Injection attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis through AMPK activation [J]. Rejuven Res, 2016, 19(6):495-508.