

木豆叶提取物对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用及机制研究

孙 琳¹, 柴 智^{1*}, 张 涛²

1. 山西中医学院, 山西 晋中 030619

2. 山西省肿瘤医院, 山西 太原 030000

摘 要: 目的 研究木豆叶提取物 (ECCL) 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制。方法 建立 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤模型, 于 H₂O₂ 刺激前加入 PI3K 信号通路阻断剂 LY294002 (LY) 预处理 10 min, 加入 20、50 μg/mL ECCL 预处理 24 h。MTT 法检测细胞存活率, 比色法测定上清液中乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 水平和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, Western blotting 检测细胞内 p-Akt、p-eNOS 蛋白表达。结果 与模型组比较, ECCL 可明显增加 H9c2 细胞 H₂O₂ 损伤后细胞存活率 ($P < 0.01$), 增加 SOD 活力, 降低 MDA、LDH 水平, 增加 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), LY 可阻断 ECCL 对 H9c2 的上述作用。结论 ECCL 能够减轻 H₂O₂ 所致的 H9c2 细胞损伤, 可能是通过激活 PI3K 通路促进其下游因子 Akt 和 eNOS 磷酸化发挥作用。

关键词: 木豆叶提取物; H₂O₂; H9c2 细胞; 氧化应激损伤; PI3K

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)02-0297-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.02.019

Protective effects and mechanism of extract from *Cajanus cajan* leaves against H₂O₂-induced oxidative injury on H9c2 cardiomyoblasts

SUN Lin¹, CHAI Zhi¹, ZHANG Tao²

1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Shanxi Tumor Hospital, Taiyuan 030000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects and mechanism of the extract from *Cajanus cajan* leaves (ECCL) against H₂O₂-induced oxidative injury in H9c2 cardiomyoblasts. **Methods** A model of H₂O₂-induced injury in H9c2 cardiomyoblasts was established. Cell viability was determined colorimetrically by MTT assay. The supernates and cells were collected, respectively, after the different treatments for measuring the LDH, MDA, and SOD levels with the corresponding detection kit according to the manufacturer's instructions. Western blotting was performed to exam the expression of p-Akt and p-eNOS in H9c2 cells respectively. **Results** Compared with H₂O₂ group, the cell viability was increased significantly in ECCL + H₂O₂ groups ($P < 0.01$). The activity of LDH in the culture medium was decreased significantly ($P < 0.05$). The content of MDA in the culture medium was decreased significantly ($P < 0.05$). The activity of SOD was increased significantly ($P < 0.01$). Treated with ECCL, the expressions of p-Akt and p-eNOS in H9c2 cells injured from H₂O₂ were increased significantly ($P < 0.01$). When LY294002 (inhibitor of PI3K) was added, the effects of ECCL were cancelled. **Conclusion** ECCL protects H9c2 cells against H₂O₂-induced oxidative injury partly through PI3K signaling pathway.

Key words: extract from *Cajanus cajan* leaves; H₂O₂; H9c2 cell; oxidative stress injury; PI3K

木豆 *Cajanus cajan* (Linn.) Millsp 系豆科木豆属植物, 木豆叶是海南省民间一种常用中药, 具有清热解毒、消肿止痛的功效, 民间用于治疗外伤、烧伤感染和褥疮等^[1]。木豆叶中含有牡荆苷、异牡荆

苷、木犀草素等多种黄酮类成分^[2]。有研究证实, 木豆叶中的主要成分牡荆苷能明显增强心肌细胞活性, 显著抑制由心肌缺血再灌注损伤引起的乳酸脱氢酶 (LDH) 和肌酸激酶 (CK) 的释放^[3], 改善缺

收稿日期: 2015-07-11

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81303262); 山西中医学院博士科研启动基金; 山西中医学院方药药效及其作用机制研究重点科技创新团队 (20150401)

作者简介: 孙 琳 (1984—), 女, 博士, 讲师。Tel: (0351)3179903 E-mail: sunlin115@aliyun.com

*通信作者 柴 智 (1979—), 男, 博士, 副教授。E-mail: chaizhi008@126.com

血心肌病理性损伤,对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[4-5]。本实验利用 H₂O₂ 诱导 H9c2 细胞,建立氧化损伤模型,应用木豆叶提取物(extract from *Cajanus cajan* leaves, ECCL)进行干预治疗,并选用 PI3K 途径作为研究对象,利用 PI3K 通路特异性阻断剂 LY294002(LY),研究 AECCL 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

H9c2 (2-1) 大鼠成肌细胞系,由香港浸会大学中医药学院惠赠。

1.2 药物与试剂

木豆叶提取物(购于广州中医药大学第一附属医院,批号 091103,为木豆叶药材经蒸馏水回流提取 1 h 所得浸膏,主要含牡荆苷、异牡荆苷、木犀草素等黄酮类成分,制成片剂,每片 0.25 g,每片含牡荆苷 0.08 mg); H₂O₂ (分析纯,天津市江天化学试剂厂); 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(Gibco 公司); MTT (Sigma 公司, D-Hank's 液配制成 5 mg/mL 溶液,4 ℃ 避光保存); LDH、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所); p-Akt、p-eNOS Polyclonal Antibody、PI3K inhibitor (LY)、RIPA Buffer (CST 公司)。

1.3 仪器

CO₂ 恒温培养箱(SANYO); 倒置显微镜(OLYMPUS); 酶标仪、电泳仪、凝胶成像系统(Bio-rad); 电泳槽、电转槽(上海天能科技有限公司); 转移脱色摇床(江苏海门麒麟医用仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养、分组及药物处理

H9c2 细胞采用高糖 DMEM 培养基加 10% 的胎牛血清,置于 37 ℃ 的 CO₂ 培养箱中培养。将 H9c2 细胞随机分为 5 组:对照组,不加干预措施,正常培养;模型组,培养液中加入终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂ 培养 4 h; ECCL 高、低剂量组,于 H₂O₂ 刺激前加入 20、50 μg/mL ECCL 培养 24 h; LY 组,于 H₂O₂ 刺激前加入 LY (10 μmol/L) 培养 10 min; LY+ECCL 组,于 H₂O₂ 刺激前加入 LY (10 μmol/L) 培养 10 min,再加入 50 μg/mL ECCL 培养 24 h。

2.2 MTT 法测定细胞存活率

细胞以(密度 1×10^5 个/mL)接种于 96 孔板,培养于 5% CO₂、37 ℃ 条件下培养 24 h。分组及药物处理同“2.1”项,吸弃培养基,加入 MTT 溶液

20 μL 继续孵育 4 h,吸弃上清,加入 150 μL DMSO 溶解紫色结晶。每组设 5 个复孔,平行设不加细胞只加培养液的空白孔,比色时以空白孔调零,心肌细胞存活率以 492 nm 处吸光度(A)值表示。

2.3 MDA 水平及 LDH、SOD 活性的测定

细胞以(密度 1×10^5 个/mL)接种于 96 孔板,培养 24 h。实验分为 5 组:对照组、模型组、ECCL (50 μg/mL) 组、LY (10 μmol/L) 组、LY+ECCL 组,药物处理方法同“2.1”项。收集上清液,试剂盒检测各组细胞培养液中 MDA、LDH 及 SOD 水平。

2.4 Western blotting 检测心肌细胞内 p-Akt、p-eNOS 蛋白表达

细胞以(密度 1×10^5 个/mL)接种于 96 孔板,培养 24 h。分组及药物处理同“2.3”项。收集细胞,在裂解缓冲液中裂解,冰浴下超声匀浆,冰上孵育 20 min,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定蛋白浓度,制成浓度相等的样品,取 20 μL 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转印至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h 后分别滴加兔抗鼠 p-Akt、p-eNOS 抗体(1:1 000)、GAPDH 鼠抗鼠单克隆抗体(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜。洗膜后以相应辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,显色,于凝胶自动成像分析系统下成像,用 Quantity One 分析软件、以 GAPDH 为内参对 p-Akt、p-eNOS 进行灰度值半定量分析。

2.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,正态性及方差齐性检验,各组采用单因素方差(one-way ANOVA)分析。

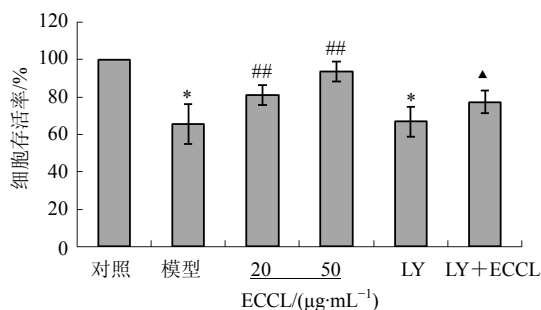
3 结果

3.1 对 H₂O₂ 损伤 H9c2 细胞存活率的影响

H₂O₂ 处理 H9c2 细胞后其存活率较对照组下降($P < 0.05$); ECCL 组 H9c2 细胞存活率较模型组显著升高($P < 0.01$); LY+ECCL 组存活率较 ECCL 50 μg/mL 组明显下降($P < 0.05$),说明 LY 减弱了 ECCL 的保护作用,结果见图 1。

3.2 对 MDA、LDH 水平及 SOD 活性的影响

H₂O₂ 处理 H9c2 细胞后其 SOD 活性较对照组显著下降,MDA、LDH 水平显著增高($P < 0.01$);与模型组比较,ECCL 组 SOD 活性显著增高($P < 0.05$),MDA、LDH 水平明显降低($P < 0.05$ 、0.01); LY+ECCL 组与 ECCL 组比较,SOD 活性显著下降,MDA、LDH 水平显著增高($P < 0.05$ 、0.01); LY 组 SOD、MDA、LDH 水平与模型组差异不显著,见表 1。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与 ECCL 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs ECCL 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group

图 1 LY 对 ECCL 增加 H_2O_2 损伤 H9c2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effects of ECCL and LY294002 on viability of H9c2 cells injured by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 1 各组 H9c2 细胞 SOD 活性和 MDA、LDH 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Comparison on activities of SOD, and levels of MDA and LDH in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	SOD/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	LDH/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	138.48±28.39	1.53±0.45	149.06±28.63
模型	84.19±19.03**	3.92±0.63**	370.58±27.04**
ECCL	119.82±23.55#	1.91±0.58##	298.49±30.51#
LY	81.62±21.44	3.81±0.72	374.25±23.46
LY+ECCL	83.12±21.95▲	3.55±0.54▲▲	368.85±24.37▲

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 ECCL 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs ECCL group, same as below

3.3 对 p-Akt、p-eNOS 蛋白表达变化的影响

Western blotting 检测显示, 与对照组比较, H_2O_2 处理使 p-Akt、p-eNOS 蛋白表达略有变化,

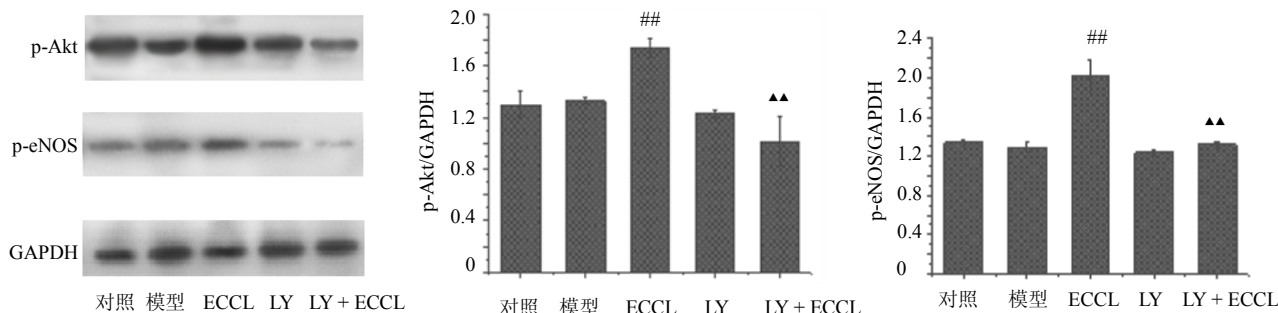


图 2 ECCL 对 H_2O_2 损伤的 H9c2 细胞 p-Akt、p-eNOS 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of ECCL on p-Akt and p-eNOS expression of H9c2 cells injured by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

但变化不显著; 与模型组比较, ECCL 能够明显增加 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白水平 ($P < 0.01$); 与 ECCL 组比较, 加入 LY 后 p-Akt 和 p-eNOS 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 结果见图 2。

4 讨论

氧化应激 (oxidative stress) 是心肌损伤性疾病的重要病理反应过程^[6-7]。机体内主要的氧化剂是活性氧 (ROS), 正常生理条件下, 机体内 ROS 的产生和清除处于动态平衡状态。当机体处于氧化应激状态时, 细胞中的氧化还原平衡向氧化方向偏移, 导致体内组织细胞 ROS 量升高, 过量的 ROS 可直接发挥细胞毒性作用损伤细胞, 导致机体产生氧化应激损伤。 H_2O_2 是一种重要的 ROS, 极易透过细胞膜, 导致一系列反应, 由于其易于获得且性质相对稳定, 故已成为研究细胞氧化损伤的重要工具。

本实验通过 H_2O_2 损伤 H9c2 细胞建立氧化损伤模型, 结果表明, ECCL 可提高 H_2O_2 损伤的 H9c2 细胞的存活率; 降低 H_2O_2 损伤状态下 H9c2 细胞 MDA 水平; 使培养液中 LDH 的漏出量减少; 提高培养液中 SOD 的活力。研究结果显示, 对抗氧自由基损伤可能是木豆叶心肌保护作用的机制之一。

PI3K 信号转导途径是细胞内重要的信号转导通路, 是促进抗细胞凋亡作用的重要调节因子。Akt 是 PI3K 下游重要的靶蛋白, 可经 PI3K/Akt 信号途径的磷酸化作用生成 p-Akt 而被激活, 抵抗心肌细胞的缺氧/复氧损伤^[8], 而 PI3K 抑制剂 LY 能够抑制这种作用^[9]。

本研究应用 LY 阻断 PI3K 信号通路, 结果发现, AECCL 作用 24 h 后, 能够上调 p-Akt 和 p-eNOS 的表达, 合用 LY 组 p-Akt、p-eNOS 蛋白的生成量减少。以上结果说明木豆叶提取物的保护作用部分依赖于 PI3K/Akt 通路。

本实验制备 H9c2 细胞氧化应激模型, 选用 PI3K 途径作为研究对象, 应用特异性阻断剂 LY, 从细胞及分子水平观察木豆叶提取物的作用。研究发现 H_2O_2 诱导心肌细胞损伤, 木豆叶提取物逆转其损伤, 发挥保护作用; LY 可以部分阻断木豆叶提取物的保护作用, 即 PI3K 通路为木豆叶提取物发挥保护作用的途径之一, 其机制可能通过活化的 PI3K, 激活 Akt, 进而上调并激活依赖 Akt 的 eNOS 蛋白的表达, 产生保护作用。

参考文献

- [1] 孙绍美, 宋玉梅, 刘 俭, 等. 木豆素制剂药理作用研究 [J]. 中草药, 1995, 26(3): 147-148.
- [2] 刘亚旻, 姜保平, 沈胜楠, 等. 木豆叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 466-470.
- [3] Dong L Y, Chen Z W, Guo Y. Mechanisms of vitexin preconditioning effects on cultured neonatal rat cardiomyocytes with anoxia and reoxygenation [J]. *Chin Med*, 2008, 36(2): 385-397.
- [4] 董六一. 牡荆素对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及其作用机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007.
- [5] 孙 琳, 张 涛, 柴 智. 木豆叶提取物对心肌缺血再灌注损伤大鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3382-3385.
- [6] Gupta S, Wen J J, Garg N J. Oxidative stress in chagas disease [J]. *Inerdiscip Perspect Infect Dis*, 2009, 2009: 190354.
- [7] Lakshmi S V, Padmaja G, Kuppusamy P, *et al.* Oxidative stress in cardiovascular disease [J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2009, 46(6): 421-440.
- [8] Miyamoto S, Murphy A N, Brown J H. Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue [J]. *J Bioenerg Biomember*, 2009, 41(2):169-180.
- [9] 张 琦, 彭 洋, 宋君秋, 等. 黄芪苷IV通过 PI3K/Akt 信号通路抗 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 955-959.