

## 复方银杏叶颗粒对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 H9c2 细胞损伤的保护作用

李玉洁<sup>1</sup>, 鲍天冬<sup>2</sup>, 李琦<sup>1</sup>, 陈熹<sup>1</sup>, 王娅杰<sup>1</sup>, 杨庆<sup>1</sup>, 翁小刚<sup>1</sup>, 陈颖<sup>1</sup>, 蔡维艳<sup>1</sup>, 杜艳龙<sup>2</sup>, 刘栩岑<sup>1</sup>, 朱晓新<sup>1\*</sup>

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 江西济民可信医药有限公司, 江西 南昌 330096

**摘要:** 目的 观察复方银杏叶颗粒(YXY)对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9c2 心肌细胞损伤的影响。方法 采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立心肌损伤模型, 给予 YXY 25、50、100、200 μg/mL 预处理 24 h, MTT 法测定细胞生存率, 相差显微镜观察细胞形态学改变; 试剂盒法检测细胞培养上清中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶-MB(CK-MB)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)水平; 共聚焦显微镜检测细胞内活性氧(ROS)、钙离子浓度及线粒体膜电位。结果 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μmol/L 作用 6 h 可显著降低 H9c2 细胞生存率, 诱导氧化应激损伤; YXY 预处理可提高细胞生存率, 改善损伤细胞形态学改变, 减轻 LDH、CK 外漏, 降低细胞上清中 MDA、NO 水平, 增加 SOD 活性, 减少 H9c2 细胞内 ROS 生成, 降低细胞内钙离子浓度、减轻线粒体膜电位的下降。结论 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9c2 心肌细胞损伤有保护作用。

**关键词:** 复方银杏叶颗粒; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 心肌保护; H9c2 心肌细胞; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0459-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.018

## Protection of Compound Granules of Yinxingye on H9c2 myocardial cells injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

LI Yu-jie<sup>1</sup>, BAO Tian-dong<sup>2</sup>, LI Qi<sup>1</sup>, CHEN Xi<sup>1</sup>, WANG Ya-jie<sup>1</sup>, YANG Qing<sup>1</sup>, WENG Xiao-gang<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>1</sup>, CAI Wei-yan<sup>1</sup>, DU Yan-long<sup>2</sup>, LIU Xu-cen<sup>1</sup>, ZHU Xiao-xin<sup>1</sup>

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Jiangxi Jiminkexin Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330096, China

**Abstract: Objective** To study the effects of Compound Granules of Yinxingye (Ginkgo leaf) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cellular injury in H9c2 myocardial cells of rats. **Methods** H9c2 cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to establish a myocardial injury model, and then pretreated by Compound Granules of Yinxingye at the concentration of 25, 50, 100, and 200 μg/mL for 24 h. Cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Morphological changes were observed by phase contrast microscope. Lactic dehydrogenase (LDH), creatine kinase-MB (CK-MB), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and nitric oxide (NO) levels were detected by biochemical kits. Intracellular reactive oxygen species and calcium ion concentration and mitochondrial membrane potential were measured by laser confocal microscopy. **Results** The exposure of H9c2 cells to 500 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 h could reduce cell viability significantly and induce oxidative stress injury. The Compound Granules of Yinxingye pretreatment could improve the cell viability, improve the damage cell morphology change, reduce LDH, CK, MDA, and NO levels in the cell supernatant, increase SOD activity. ROS generation and concentration of intracellular calcium could be reduced and the in mitochondrial membrane potential declined. **Conclusion** The Compound Granules of Yinxingye has the protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cellular injury in H9c2 myocardial cells.

**Key words:** Compound Granules of Yinxingye; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; myocardial protection; H9c2 myocardial cells; oxidative stress

心绞痛(angina pectoris)属于冠心病中最常见的类型,是冠状动脉供血不足、心肌急剧且暂时的缺血与缺氧所引起的临床综合征<sup>[1]</sup>。心肌缺血后再灌注过程中会产生大量活性氧自由基(reactive

收稿日期: 2015-07-11

基金项目: 国家国际科技合作项目(S2011ZR0193); 科技部第二十次中泰科技合作联委会长期合作项目(20-602J)

\*通信作者 朱晓新, 博士, 研究员, 博士生导师。Tel: (010)64056154 E-mail: zhuxx59@163.com

oxygen species, ROS), 可导致心肌细胞氧化损伤, 是心绞痛后心肌细胞死亡的主要因素之一<sup>[2-3]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种重要的 ROS 来源, 可直接氧化细胞膜上的脂质、蛋白质, 并能穿过细胞膜和细胞内的铁离子反应生成·OH 等活性更强的自由基, 通过多种途径诱导细胞凋亡或坏死, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化应激反应是心肌细胞发生凋亡重要原因之一<sup>[4]</sup>。

心绞痛中医归于“胸痹”“心痛”“厥心痛”等范畴。复方银杏叶颗粒(YXY)是已上市中药品种, 主要由银杏叶、红参、刺五加组成, 具有益气、活血、通络作用, 主要用于气虚血瘀型心绞痛, 临床已广泛应用于心绞痛治疗及辅助治疗, 取得良好的疗效, 但其作用机制并不清楚。

本研究采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9c2 大鼠心肌细胞氧化损伤, 观察 YXY 对心肌细胞损伤的保护作用及其作用机制, 为 YXY 临床治疗心血管疾病提供进一步的实验资料和数据支持, 也为已上市中药品种深度开发及提升科技竞争力奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

YXY, 主要成分为由槲皮素、山柰素、异鼠李素等组成的银杏叶总黄酮, 其质量分数在 2 mg/g 以上; 实验用 YXY 干浸膏为棕黄色粉末, 相当于生药 6.5 g/g, 由江西济民可信药业有限公司提供, 批号 20140124。用 DMSO 配制成为 1 mg/mL 储备液, 分装后冻存。实验前用培养基稀释至所需质量浓度。

DMEM 培养基(Gibco 公司); 胎牛血清(Hycione 公司); 胰蛋白酶、碘化丙啶(PI)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO), 均购自 Sigma 公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1(北京美科美生物技术开发有限公司); Fluo-4 AM 荧光探针、DCFH-DA 探针, 均购自同仁化学研究所; 乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、肌酸激酶-MB(CK-MB)、丙二醛(MDA)检测试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; 一氧化氮(NO)检测试剂盒(北京康佳宏原生物科技有限公司); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(3%, 北京海德润制药有限公司)。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 细胞株

H9c2 大鼠心肌细胞株, 购自中国医学科学院基础医学研究所协和细胞资源中心。

### 1.3 仪器

ELX800 酶标仪, BIO-TEX Instruments 公司; FV1000 激光扫描共聚焦显微镜, 日本 OLYMPUS

公司; XSZ-D<sub>2</sub> 倒置显微镜, 重庆光学仪器厂; IC 1000 自动细胞计数仪, 美国 Countstar 公司; 5424R 低温离心机, 德国 Eppendorf 公司; MCO-15AC CO<sub>2</sub> 培养箱, 日本 SANYO 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

H9c2 细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温细胞培养箱中培养, 待细胞铺满瓶底的 80% 左右时用 0.05% 胰蛋白酶消化, 并以 1:3 进行传代或用于后续实验。

### 2.2 细胞活力测定及形态学观察

将存活率 90% 以上 H9c2 细胞制成细胞悬液, 调整细胞悬液密度为  $1 \times 10^5$ /mL, 100  $\mu$ L/孔接种于 96 孔板中。待细胞贴壁 80% 以上, 加入浓度梯度为 2 000、1 000、500、200、100  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 24 h, 或以 YXY 600、400、200、100、50、25  $\mu$ g/mL 作用 24 h, 对照组加入终浓度为 0.1% 的 DMSO, 另设无细胞培养液孔为调零孔。作用完毕后, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 10  $\mu$ L 继续培养 4 h 后, 弃去上清液, 加入 100  $\mu$ L DMSO, 置于摇床上低速震荡 10 min 使结晶充分溶解。使用酶联免疫检测仪检测 490 nm 处各孔吸光度(A)值。细胞抑制率 =  $1 - A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$ 。同时倒置显微镜观察各组细胞生长及损伤情况。

### 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用不同时间上清中 LDH 的水平

H9c2 细胞以密度  $5 \times 10^5$ /mL、每孔 500  $\mu$ L 接种于 24 孔板中。细胞贴壁后 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100、200、300、400、500  $\mu$ mol/L 作用 4、6、24 h, 检测上清中 LDH 的水平, 检测方法严格按照试剂盒说明书操作。

### 2.4 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞形态及存活率的影响

细胞接种方法同“2.2”项, 分为对照组, 模型组, YXY 25、50、100、200  $\mu$ g/mL 剂量组。对照组加入终浓度为 0.1% 的 DMSO, 模型组加入 500  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 6 h, YXY 组以 YXY 25、50、100、200  $\mu$ g/mL 预处理 24 h 后, 500  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 6 h; 细胞活力测定及形态学观察同“2.2”项。

### 2.5 对细胞上清中 LDH、CK、SOD、MDA 和 NO 水平的影响

细胞接种方法同“2.3”项, 分组及药物干预方法同“2.4”项。处置完毕收集细胞上清, 检测 LDH、CK-MB、MDA、SOD、NO 水平, 检测方法严格按照试剂盒说明书操作。

### 2.6 对细胞内 ROS 水平的影响

以  $1 \times 10^5$ /mL 细胞悬液接种于激光共聚焦显微

镜专用培养皿, 每皿 2 mL。分为对照组, 模型组, YXY 100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量组。YXY 组细胞贴壁后加入 YXY 200、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 培养 24 h 后, YXY 组和模型组加入 500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 1 h (根据预试验选择最佳接种密度和观测时间,  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激时, 细胞内 ROS 和膜电位等指标变化出现较早, 1 h 组间即有明显差异)。吸弃培养基, 加入 1 mL 浓度为 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 DCFH-DA 探针, 继续孵育 30 min。磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次后, 运用激光共聚焦显微镜观察细胞内 ROS 染色 (激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm)。

### 2.7 对细胞浆游离钙的影响

细胞接种、 $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激和药物干预方法同“2.6”项。作用完毕后吸弃培养液, HEPES 缓冲液洗涤细胞 1 次, 加入 Fluo-4 AM 工作液, 37  $^\circ\text{C}$  孵育 20 min。HEPES 缓冲液洗涤细胞 3 次, 激光共聚焦显微镜下观察。激发波长 494 nm, 发射波长 516 nm。

### 2.8 对线粒体膜电位的影响

细胞接种、 $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激和药物干预方法同“2.6”项。作用完毕后吸弃培养液, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀。细胞培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  孵育 20 min。吸除上清, JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$ ) 洗涤 2 次, 加入 2 mL 细胞培养液, 激光共聚焦显微镜下观察, 激发波长 490/525 nm, 发射波长 530/590 nm。线粒体膜电位以红、绿荧光强度的比值表示。

### 2.9 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计检验使用 GraphPad Prism 软件进行, 多组数据间差异比较采用单因素方差分析和 Dunnett  $t$  检验。

## 3 结果

### 3.1 $\text{H}_2\text{O}_2$ 致 H9c2 细胞损伤模型成功

**3.1.1 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用后 H9c2 细胞抑制率** 不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 24 h, 与对照组比较, 随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增加, H9c2 细胞生存率呈剂量依赖性下降,  $\text{H}_2\text{O}_2$  100、200、500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  抑制率分别为 10.54%、11.71%、33.39% ( $n=6$ ,  $P<0.05$ 、0.01),  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 000、2 000  $\mu\text{mol}/\text{L}$  抑制率达 60.19%、68.67% ( $n=6$ ,  $P<0.01$ )。

同期在倒置显微镜下观察: 正常 H9c2 细胞呈梭形, 排列规整, 大小均匀, 胞核、胞质边缘界限清楚, 贴壁较牢, 细胞间连接紧密。不同浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组呈不同程度的细胞收缩、细胞体积明显缩小、变圆, 突起消失。细胞间隙增宽, 细胞边界不清,

胞膜不完整, 出现明显损伤形态。 $\text{H}_2\text{O}_2$  1 000  $\mu\text{mol}/\text{L}$  以上组有较多细胞脱落, 并形成大片脱失区。

**3.1.2  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用不同时间上清中 LDH 的水平** 选择  $\text{H}_2\text{O}_2$  100~500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  作用 4、6、24 h, 检测上清中 LDH 的水平以进一步优化作用时间。结果显示,  $\text{H}_2\text{O}_2$  400、500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  作用 6 h 后 LDH 释放量高于对照组, 差异显著 ( $n=6$ ,  $P<0.05$ 、0.01), 结果见图 1。综合上述实验结果, 选择  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  作为模型组刺激浓度进行后续实验。

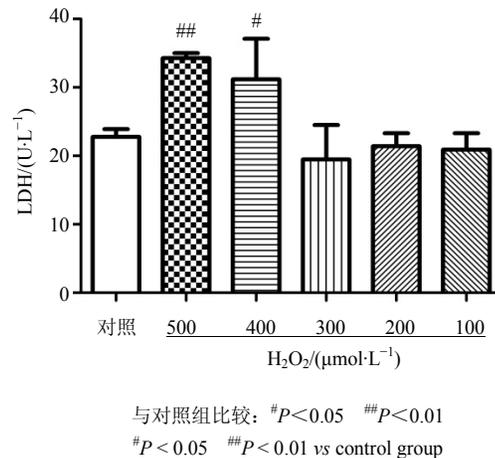


图 1  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 6 h H9c2 细胞上清中 LDH 水平 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  
Fig. 1 LDH level in supernatant of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -injured H9c2 cells after 6 h ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

### 3.2 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 致细胞损伤的保护作用

**3.2.1 对 H9c2 细胞生长的影响** 结果表明, YXY 25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用 24 h 细胞存活率分别为 92.72%、94.08%、95.57%, 与对照组差异不显著。YXY 200、400、600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  呈促进细胞增长趋势, 存活率分别为 103%、112%、118% ( $n=6$ ,  $P<0.01$ 、0.001)。选择对细胞生长无明显影响的 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以下质量浓度后续给药。

**3.2.2 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤 H9c2 细胞形态及存活率的影响**  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤组细胞体积明显缩小, 突起消失, 细胞脱落较多, 细胞间隙增宽, 细胞胞膜不完整, 损伤形态明显, 细胞存活率下降。YXY 25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  预处理 24 h 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  致细胞损伤有明显保护作用, 改善细胞形态, 显著提高细胞存活率 ( $P<0.05$ 、0.01)。结果见图 2、3。

**3.2.3 对细胞上清中 LDH、CK、SOD、MDA 和 NO 水平的影响** LDH 和 CK 在心肌细胞膜受到损伤时可由细胞中漏出, 可作为细胞损伤的标志。结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 LDH 和 CK 的水平升高, LDH 差异显著 ( $P<0.001$ )。

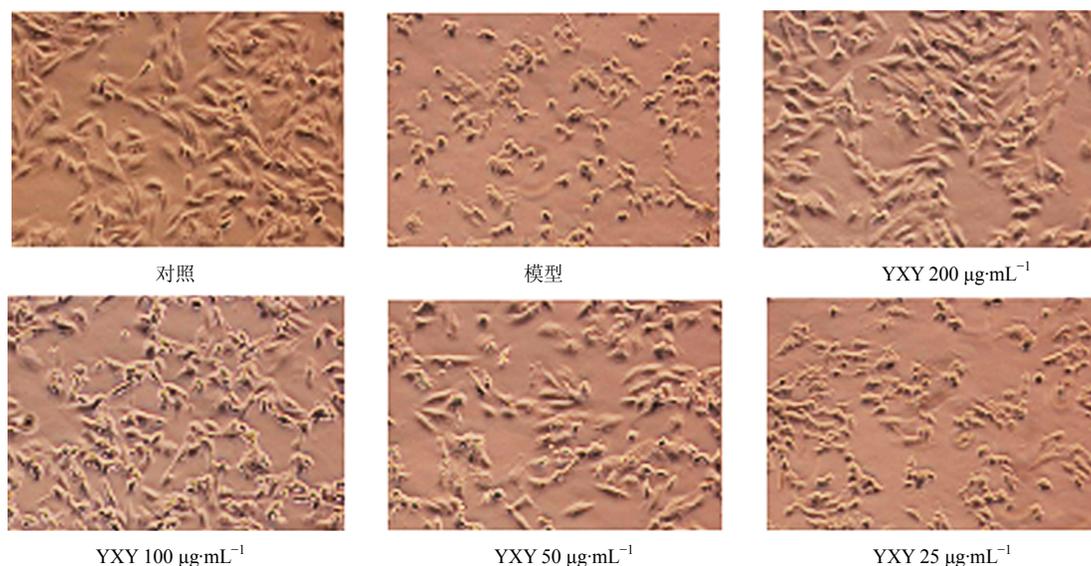
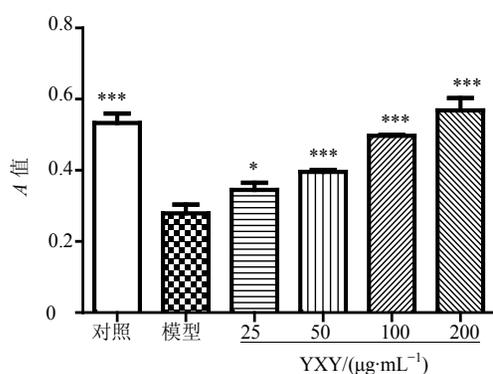


图 2 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of YXY on cells morphology of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured H9c2 cells



与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下同  
\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, below as same

图 3 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 3 Effect of YXY on cell viability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  YXY 预处理组细胞上清液中 LDH 和 CK 的水平均有所降低, 其中 LDH 差异显著 ( $P < 0.01, 0.001$ )。与对照组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组细胞上清中 SOD 活力明显降低, MDA、NO 水平明显增加 ( $P < 0.01, 0.001$ )。经 YXY 处理后, 25、50、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量组 SOD 活力显著增高, 差异显著 ( $P < 0.001$ ), YXY 25、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量组 MDA 水平有所降低, 差异显著 ( $P < 0.05, 0.01$ )。YXY 25、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量组 NO 水平均有所降低, YXY 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果见图 4。

### 3.3 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致细胞损伤的保护作用机制研究

#### 3.3.1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞浆中 ROS 的影响

DCFH-DA 探针可穿过细胞膜, 被细胞内酯酶水解的产物可与细胞内 ROS 结合生成荧光物质。500  $\mu\text{mol}/\text{L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理细胞 1 h 后, H9c2 细胞内 DCFH-DA 平均荧光强度显著升高。YXY 200、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  预处理可对抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞内 ROS 增多, 其中 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组荧光强度降低 30% 以上。结果见图 5。

#### 3.3.2 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞胞浆内钙的影响

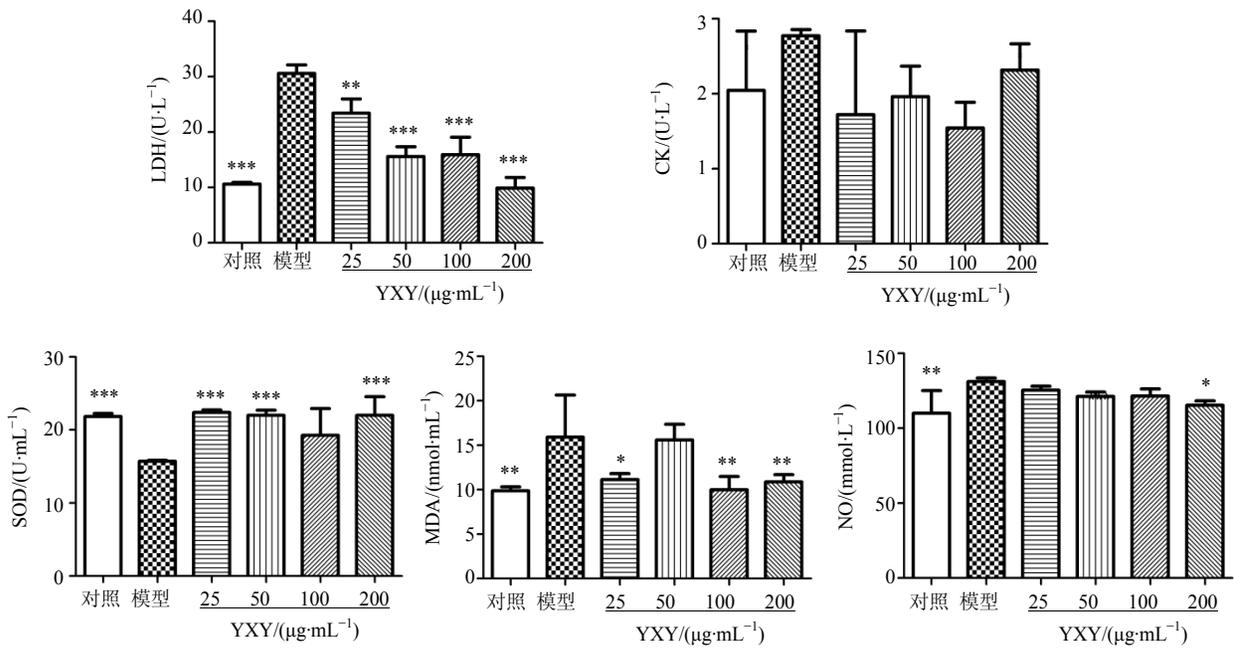
正常细胞胞浆中游离钙离子浓度较低, 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后游离钙表达阳性率及表达强度均明显增高, 主要富集在细胞膜及细胞浆内。100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  YXY 预处理能减少胞浆游离钙的异常改变, 和模型组比较差异显著。结果见图 6。

#### 3.3.3 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响

共聚焦显微镜下观察, 正常细胞的表面大多呈均匀的橙红色, 显示绿色荧光的细胞较少。经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理显示绿色荧光细胞数明显增多, 荧光强度显著增强, 表明细胞受损, 其线粒体膜电位明显降低。加入 100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  YXY 预处理能减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后的细胞线粒体膜电位的下降 (红/绿荧光强度), 和模型组比较显著差异 ( $P < 0.05, 0.01$ )。结果见图 7。

## 4 讨论

氧化应激是机体遭受各种有害刺激时, 机体氧化系统和抗氧化系统持续失衡而导致的组织损伤, 在心脏病发生、发展过程中发挥重要作用。研究发现, 心肌缺血再灌注过程中, 由于 ROS 产生过多和抗氧化能力的减弱所致氧化应激可引起心肌细胞功能障碍及结构破坏, 凋亡、坏死, 心肌细胞大量缺失<sup>[5-6]</sup>。



与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ , 下同  
 \*\* $P < 0.01$  vs model group, same as below

图 4 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞上清中 LDH、CK、SOD、MDA、NO 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effect of YXY on LDH, CK, SOD, MDA, and NO levels in supernatant in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在体内可以调节多种重要的生理过程, 如转录因子的活化、细胞增殖等, 但过量的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可引起氧化应激导致组织损伤。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激是研究体外氧化应激损伤最常用的模型, 可模拟体内氧化损伤的病理过程<sup>[7-9]</sup>。本研究采用大鼠 H9c2 细胞建立 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导心肌损伤模型, 结果表明, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对心肌细胞损伤随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增加和时间的延长而显著增强, 其中 500 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 6 h 能使 H9c2 形态学细胞发生明显改变, 细胞存活率降至 30% 左右, 且细胞上清中 LDH 水平显著增高, 因此选用此浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立本实验室条件下的 H9c2 氧化应激模型。

本研究评价了 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 心肌损伤的保护作用。YXY 预处理可提高细胞生存率, 使细胞形态趋向正常, 心肌酶 LDH 和 CK 外漏减少。CK 是特异性心肌标志物, LDH 是细胞质中稳定存在的酶类, 心肌细胞受损时其漏出量可反映细胞膜损伤程度<sup>[10]</sup>。YXY 预处置减少了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞心肌酶漏出, 说明心肌细胞膜损伤有所减轻。

同时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使心肌细胞 ROS 指示剂 DCFH-DA 的荧光强度增强, MDA 水平升高。这一结果证实了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对细胞内 ROS 的直接诱导作用及继发的细胞内脂质过氧化反应激增现象。同时心肌细胞内主要抗氧化酶 SOD 活性降低, 表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不仅诱导了

活性氧生成和脂质过氧化, 还抑制了心肌细胞抗氧化酶活性, 破坏心肌细胞正常的氧化/抗氧化平衡。本研究发现, 此模型中 NO 水平也显著增高, 提示氧化应激增加了 NO 诱导性表达, 而 NO 与细胞内超氧阴离子自由基相互作用可形成强细胞毒性物质自由基硝酸盐阴离子 (ONOO<sup>-</sup>), 可进一步加重心肌损伤<sup>[11]</sup>。本实验结果显示, YXY 可使 H9c2 细胞 DCFH-DA 荧光强度、MDA、NO 水平降低, SOD 活性增高, 表明 YXY 一方面可清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱生的活性氧、活性氮, 减少脂质过氧化产物, 还可增强心肌抗氧化能力, 可通过恢复细胞内氧化/抗氧化平衡从而发挥对 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用。线粒体, 被称为细胞的能量工厂, 是自由基最重要的来源, 也是被 ROS 攻击最常见细胞靶器官<sup>[12]</sup>。同时线粒体作为心肌细胞内重要细胞器, 既是心肌细胞能量产生的主要场所, 又是细胞凋亡的启动处。在本模型出现了线粒体膜电位的明显变化, 表明大量 ROS 的产生直接攻击了心肌细胞线粒体。同时, 模型组可见 H9c2 细胞内钙明显增高。文献分析发现无论是分离的还是体内的线粒体都可以自发吸收和释放钙离子, 线粒体的钙吸收和释放在维持胞浆钙稳态中起到十分重要的作用<sup>[13-14]</sup>, 提示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致 H9c2 损伤可能对线粒体结构和功能都产生一定产

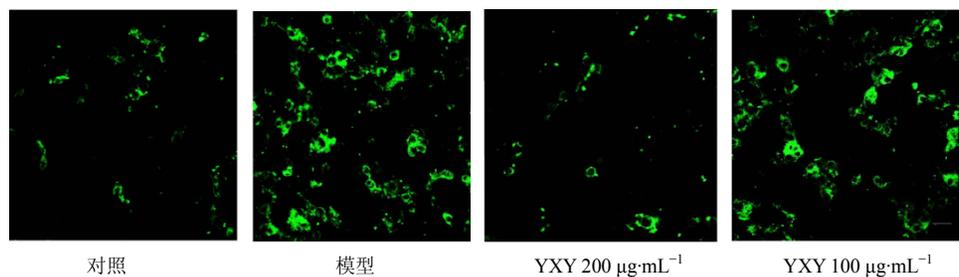


图 5 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞浆中 ROS 的影响

Fig. 5 Effect of YXY on ROS level in cytoplasm of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured H9c2 cells

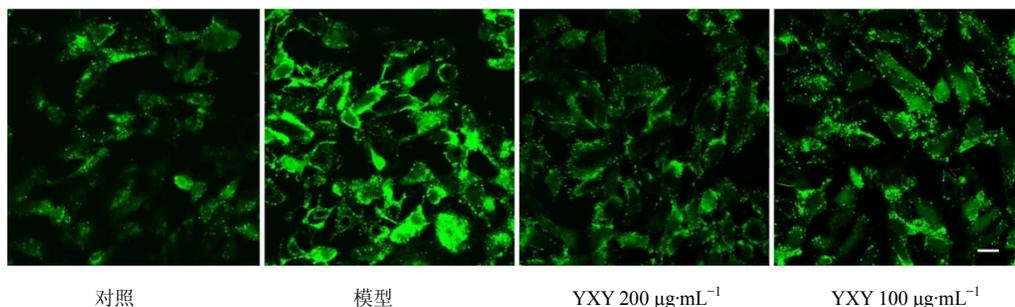


图 6 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞胞浆中游离钙离子浓度的影响

Fig. 6 Effect of YXY on concentration of free calcium in cytoplasm of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured H9c2 cells

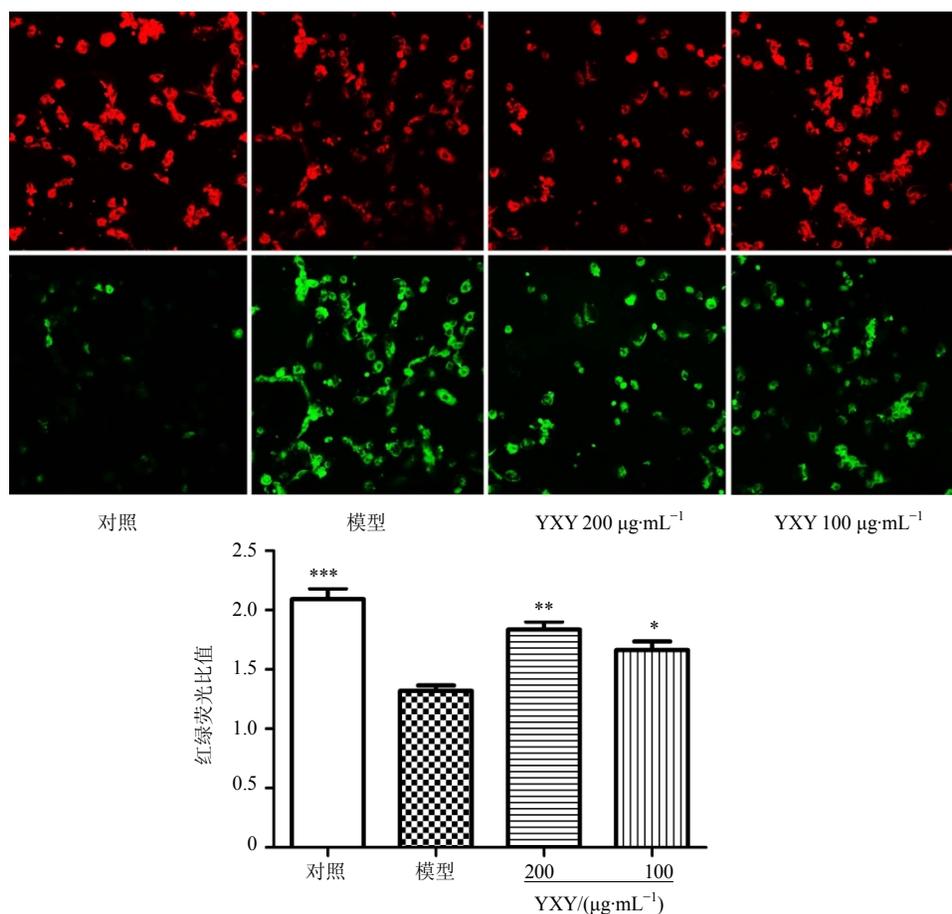


图 7 YXY 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤 H9c2 细胞胞浆中线粒体膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 7 Effect of YXY on mitochondria membrane potential in cytoplasm of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

生影响。YXY 可通过稳定心肌细胞线粒体膜电位有效抑制线粒体膜电位下降介导的线粒体机制而发挥保护心肌细胞作用。同时, YXY 显著降低细胞内钙水平, 初步提示影响线粒体钙吸收和释放相关功能, 减轻钙超载, 也是 YXY 减轻心肌细胞损伤的机制之一。

综上所述, 本研究首次报道了 YXY 对  $H_2O_2$  诱导心肌细胞的保护作用, 并且发现其作用与线粒体途径有关。YXY 是否可引起线粒体膜破坏? 是否可以影响心肌细胞能量代谢系统? 是否影响线粒体途径介导的心肌细胞凋亡? 还需深入研究。

#### 参考文献

- [1] 江凤林. 新编冠心病学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998.
- [2] Gustafsson A B, Gottlieb R A. Mechanisms of apoptosis in the heart [J]. *J Clin Immunol*, 2003, 23(6): 447-459.
- [3] 刘羿男, 王卫平, 贾竹青, 等.  $\alpha$ -硫辛酸对在  $H_9c_2$  细胞在  $H_2O_2$  导致的氧化应激损伤中的保护作用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(03): 227-233.
- [4] Sharikabad M N, Ostbye K M, Brors O. Effect of hydrogen peroxide on reoxygenation-induced  $Ca^{2+}$  accumulation in rat cardiomyocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(4): 531-538.
- [5] Sterba M, Popelova O, Vavrova A, et al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(8): 899-929.
- [6] Murray T V, Ahmad A, Brewer A C. Reactive oxygen at the heart of metabolism [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24(3): 113-20.
- [7] Zhang Q, Huang W D, Lv X Y, et al. Puerarin protects differentiated PC12 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2011, 36(5): 419-426.
- [8] Then S M, Sanfeliu C, Top G M, et al. Gammatotocotrienol does not substantially protect DS neurons from hydrogen peroxide-induced oxidative injury [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2012, 9(1): 1-10.
- [9] Fu J, Huang H, Liu J, et al. Tanshinone IIA protects cardiac myocytes against oxidative stress-triggered damage and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568(1/3): 213-221.
- [10] Sun X, Sun G B, Wang M, et al. Protective Effects of Cynaroside A-against  $H_2O_2$ -Induced Apoptosis in  $H_9c_2$  Cardiomyoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(8): 2019-2029.
- [11] 刘霖, 范谦, 杨新春, 等. 过氧亚硝酸阴离子加重急性心肌梗死患者缺血-再灌注心肌损伤 [J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2008, 16(4): 219-221.
- [12] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 99-163.
- [13] Pizzo P, Drago I, Filadi R, Pozzan T. Mitochondrial  $Ca^{2+}$  homeostasis: Mechanism, role, and tissue specificities [J]. *Pflugers Archiv J*, 2012, 464(1): 3-17.
- [14] 陆久维, 翟宇佳, 孙飞. 线粒体钙离子转运的研究进展 [J]. *生物物理学报*, 2013, 29(3): 167-180.