

# 肉豆蔻-8 散提取物对过氧化氢诱导心肌细胞损伤的影响

张媛彦<sup>1</sup>, 肖云峰<sup>2</sup>, 李文妍<sup>3</sup>, 王玉华<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; <sup>2</sup>内蒙古医科大学新药安全评价研究中心, 呼和浩特 010110;

<sup>3</sup>内蒙古自治区人民医院, 呼和浩特 010110)

**摘要** 研究肉豆蔻-8 散提取物对过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导乳鼠心肌细胞损伤的影响, 并探讨其作用机制。分离并培养大鼠乳鼠心肌细胞, 建立  $H_2O_2$  诱导心肌细胞损伤模型。倒置显微镜下观察肉豆蔻-8 散提取物对心肌细胞形态学的影响; 采用 MTT 法检测心肌细胞活力; 使用全自动生化分析仪检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶(CK)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)的含量; 采用试剂盒法检测细胞中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)的含量; 采用 Hoechst 荧光细胞核染色观察心肌细胞凋亡形态; 使用流式细胞仪测定心肌细胞凋亡率。100  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  作用 2 h 能明显造成约 50% 心肌细胞损伤。 $H_2O_2$  模型组出现细胞间隙增大、细胞数减少、细胞胞浆空泡等明显损伤现象。与  $H_2O_2$  模型组比较, 肉豆蔻-8 散提取物各剂量组, 心肌细胞形态不同程度好转; 能明显降低  $H_2O_2$  损伤心肌细胞培养液中 LDH、CK、AST 含量; 显著降低  $H_2O_2$  损伤心肌细胞内 MDA 和 NO 含量, 并提高 SOD 活力, 能明显抑制  $H_2O_2$  损伤心肌细胞凋亡。通过改善细胞生存状态、提高细胞活力、降低氧化应激损伤、抑制炎症反应、抑制细胞凋亡, 肉豆蔻-8 散提取物可改善  $H_2O_2$  诱导心肌细胞损伤状态, 从而对  $H_2O_2$  损伤的心肌细胞起到保护作用。

**关键词** 肉豆蔻-8 散; 心肌细胞; 过氧化氢; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2018)02-0222-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180213

引用本文 张媛彦, 肖云峰, 李文妍, 等. 肉豆蔻-8 散提取物对过氧化氢诱导心肌细胞损伤的影响[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(2): 222–228.

Cite this article as: ZHANG Yuanyan, XIAO Yunfeng, LI Wenyan, et al. Effects of Roudoukou-8 San against hydrogen peroxide-induced injury of cardiomyocyte[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(2):222–228.

## Effects of Roudoukou-8 San against hydrogen peroxide-induced injury of cardiomyocyte

ZHANG Yuanyan<sup>1</sup>, XIAO Yunfeng<sup>2</sup>, LI Wenyan<sup>3</sup>, WANG Yuhua<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Pharmacy Department of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; <sup>2</sup> Evaluation Center for New Drug Safety, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110; <sup>3</sup> Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010110, China

**Abstract** To study the effects of Roudoukou-8 San against hydrogen peroxide-induced cardiomyocyte in neonatal rats and to explore its mechanism. Cardiomyocytes were isolated and cultivated by neonatal rats and the injure models were established by  $H_2O_2$ . Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the protective effects of Roudoukou-8 San on  $H_2O_2$ -induced cardiomyocyte. The effects of Roudoukou-8 San on myocardium morphology were observed under inverted microscope. The contents of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and aspartate aminotransferase (AST) in cell culture medium were determined by Automatic biochemical instrument; The levels of malonyldialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and NO in the cells were detected by kit method. The apoptotic morphology of cardiomyocytes was observed by Hoechst fluorescence staining. Cell apoptosis were measured by Annexin V and PI double staining and flow cytometry. 100  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$

收稿日期 2017-10-21 \*通信作者 Tel:13327127619 E-mail:yuhuawang59@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81360678); 内蒙古青年科技英才资助项目(No. NJYT-17-B29); 内蒙古自治区卫生和计划生育委员会医疗卫生科研计划资助项目(No. 201702059)

for 2 h could cause about 50% of myocardial injury. In the inverted optical microscope,  $H_2O_2$  model group showed increased cell gap, decreased cell count, cell cytoplasmic vacuoles and other obvious damage. *Roudoukou-8 San* protected cell from  $H_2O_2$ -induced morphological improved in different degrees, reduced the release of LDH, CK and AST content, reduced the content of MDA, NO in myocardial cells significantly and increased the activity of SOD. *Roudoukou-8 San* energy significantly inhibited  $H_2O_2$  damage myocardial cell apoptosis. Our study suggested that *Roudoukou-8 San* can protect cardiomyocyte from  $H_2O_2$ -induced injury by improving the cell viability, reducing oxidative stress injury, inhibiting inflammatory reaction and inhibiting cell apoptosis.

**Key words** *Roudoukou-8 San*; cardiomyocyte; hydrogen peroxide; oxidative stress; cell apoptosis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81360678); Inner Mongolia Youth Science and Technology Talents Project (No. NJYT-17-B29); Medical and Health Research Plan Project of Inner Mongolia Autonomous Region Health and Family Planning Commission (No. 201702059)

肉豆蔻-8 散是由沉香、肉豆蔻、丁香、广枣、木香、旋覆花、阿魏和牦牛心八味药材组成,该方最早收录于《普济方集》中<sup>[1]</sup>。目前该方剂被《内蒙古蒙药制剂规范》第二册收录<sup>[2]</sup>。该方具有镇“赫依”、止痛、温胃、祛“巴达干”、燥“协日乌素”的功效,临床用于各种“赫依”病、心“赫依”热、心烦、气短、失眠、心供血不足、心区疼痛、风湿性心脏病等。目前,本课题组对于肉豆蔻-8 散的研究主要包括有效成分的含量测定、动物实验模型的药效学研究和药代动力学分析等<sup>[3-6]</sup>。课题组还对肉豆蔻-8 散提取物的主要成分进行指认和定量分析,其有效成分包括丁香酚、鞣花酸、木香烃内酯、去氢木香内酯和去氢二异丁香酚等。肖云峰等<sup>[7]</sup>运用整体动物试验及测定内源性物质含量的方法,已从体内评价了该方剂对实验动物心脏的保护作用。

乳鼠原代心肌细胞的培养是一种可以排除体液、神经等干扰因素并保持心肌结构和功能稳定的体外实验研究模型。高效、稳定的培养原代心肌细胞有助于从细胞层面探讨心血管疾病的发病机制及其治疗手段<sup>[8]</sup>。 $H_2O_2$  作为高活性反应分子性氧簇(ROS)之一,极易通过细胞膜,它可以通过 Haber-Weiss 反应产生  $OH^-$ ,从而导致膜脂过氧化、DNA 链断裂和蛋白质的损伤<sup>[9]</sup>。 $H_2O_2$  易获得、性质稳定且应用方便,常被用做体外氧化应激损伤模型建立的工具<sup>[10]</sup>。因此,本实验采用体外培养原代心肌细胞的方法,利用  $H_2O_2$  模拟体内的氧化应激损伤,首次从细胞层面进一步研究肉豆蔻-8 散提取物对心肌的保护作用,以综合评价肉豆蔻-8 散的临床应用价值及其可能的作用机制。

## 1 材 料

### 1.1 肉豆蔻-8 散提取物的制备

称取肉豆蔻-8 散 10.0 g 于 500 mL 圆底烧瓶中,加入 75% 乙醇 250 mL,加热回流 2 次,每次 30 min,合并滤液,蒸干得浸膏约 3 g。取肉豆蔻-8 散提取物约 10 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加入 DMSO 100  $\mu$ L 使其完全溶解,用无血清培养液稀释至刻度,配成 1 mg/mL 肉豆蔻-8 散提取物原液。用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌,4  $^{\circ}$ C 保存,使用时稀释成相应浓度。

### 1.2 试 剂

肉豆蔻-8 散(内蒙古医科大学药学院制备);DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(中国 Biotopped 公司);Ⅱ型胶原酶(德国 Sigma 公司);30% 过氧化氢(天津永晟精细化工有限公司);DMSO(中国 Coolaber 公司);MTT(美国 Amresco 公司);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术研究所);BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);lactate dehydrogenase (LDH)、creatine kinase (CK)、aspartate aminotransferase (AST)(宁波美康生物科技股份有限公司);Superoxide dismutase (SOD)、malonyldialdehyde (MDA)、NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所);细胞凋亡试剂盒(美国 BD 公司)。

### 1.3 仪 器

超纯水系统(美国 Millipore 公司);台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);倒置式生物显微镜(德国 Leica 公司);酶标仪(日本 Bio-rad 公司);全自动生化分析仪(爱尔兰 Sapphire 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 1.4 动物

清洁级, Wistar 乳鼠, 1~3 d 齡, 体重(6.66 ± 2.00) g, 购自内蒙古大学实验动物中心, 实验动物生产许可证编号: SCXK(蒙)2014-0001。

## 2 方法

### 2.1 原代乳鼠心肌细胞培养

实验操作在无菌条件下进行。取 1~3 d 齡 Wistar 乳鼠, 浸泡 75% 酒精消毒。用眼科剪沿剑突正中线略偏左侧剪取心脏心尖部, 置预冷的 PBS 缓冲溶液中清洗 3 遍, 将其转移入 0.1% 胰酶中, 均匀剪成约 1 mm<sup>3</sup> 的碎块, 弃上清液。加入 0.1% 胰酶 6 mL 吹打管吹打, 37 °C 水浴消化 6 min, 不断振摇, 自然沉降后, 弃上清液。再加入 0.08% 胰酶与 0.05% II 型胶原酶的混合酶 5 mL 于 37 °C 水浴消化 5 min, 中间振摇 3 min, 吸取上清液, 用等体积预冷含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化, 重复消化 10 次。细胞悬液经 200 目筛网过滤至离心管中, 1 000 r/min, 离心 10 min。用含 20% FBS 的完全培养基重悬细胞后, 将细胞转移至培养瓶中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1 h, 以差速贴壁的方法去除已贴壁的成纤维细胞。吸出细胞悬液转移至另一培养瓶中, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶 40 μL, 以抑制成纤维细胞的生长, 继续培养, 48 h 后换液。取培养 3 d 同步搏动的心肌细胞用于实验。

### 2.2 分组及给药

实验共分为 5 组: 正常对照组、模型组、肉豆蔻-8 散(高、中、低)剂量组。正常对照组加入无血清培养液培养, 作用 12 h 后换液, 继续用无血清培养液培养 2 h; 模型组加入无血清培养液培养, 作用 12 h 后换液, 加入终浓度为 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的无血清培养液, 作用 2 h; 肉豆蔻-8 散低、中、高剂量组分别加入终浓度为 25、50、100 μg/mL 含肉豆蔻-8 散提取物的无血清培养液, 作用 12 h 后换液, 再加入终浓度为 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的无血清培养液, 作用 2 h。

### 2.3 MTT 法检测心肌细胞活力

2.3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导心肌细胞损伤模型的建立 取培养 3 d 同步搏动的心肌细胞, 用 0.25% 胰酶消化细胞。调整细胞密度每毫升 3 × 10<sup>5</sup> 个, 在 96 板上每孔接种 100 μL。在培养箱中培养 24 h 后, 吸

弃原培养液。正常对照组每孔加入无血清培养液 100 μL; 模型组每孔加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度分别为 25、50、100、200、400 μmol/L 无血清培养液 100 μL。在孵箱中继续培养 2 h 后, 每孔加入 MTT 溶液(0.5 mg/mL)20 μL, 继续孵育 4 h, 吸弃原培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 振荡 10 min, 于酶标仪 490 nm 处读取吸收度, 计算细胞抑制率。

### 2.3.2 肉豆蔻-8 散提取物对正常心肌细胞的影响

取培养 3 d 同步搏动的心肌细胞, 用 0.25% 胰酶消化细胞。调整细胞密度为每毫升 3 × 10<sup>5</sup> 个, 在 96 板上每孔接种 100 μL。在培养箱中培养 24 h 后, 吸弃原培养液。正常对照组每孔加入无血清培养液 100 μL; 给药组每孔加入含肉豆蔻-8 散提取物终浓度分别为 25、50、100 μg/mL 的无血清培养液 100 μL。在孵箱中继续培养 12 h 后, 采用 MTT 法检测心肌细胞活力。

2.3.3 肉豆蔻-8 散提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导心肌细胞损伤的影响 取培养 3 d 同步搏动的心肌细胞, 用 0.25% 胰酶消化细胞。调整细胞密度为每毫升 3 × 10<sup>5</sup> 个, 在 96 板上每孔接种 100 μL。在培养箱中培养 24 h, 吸弃原培养液。实验分组及给药按照“2.2”项下操作, 孵育 2 h 结束后, 于倒置显微镜下观察各孔中细胞的形态学变化, 并采用 MTT 法检测细胞存活率。细胞存活率为各组吸收度和正常组吸收度的比值。

### 2.4 生化指标检测

2.4.1 培养液中 LDH、CK、AST 含量的检测 取培养 3 d 同步搏动的心肌细胞, 用 0.25% 胰酶消化细胞。调整细胞密度为每毫升 6 × 10<sup>5</sup> 个, 在 6 板上每孔接种 2 mL。在培养箱中培养 24 h, 吸弃原培养液。实验分组及给药按照“2.2”项下操作, 孵育 2 h 结束后, 分别收集各孔培养液。1 000 r/min, 离心 7 min, 吸取上清液至离心管中, 每组平行处理 6 份。采用全自动生化分析仪对处理好的样本进行检测, 检测指标包括 LDH、CK 和 AST。

2.4.2 细胞中 MDA、SOD、NO 含量的检测 取培养 3 d 同步搏动的心肌细胞, 用 0.25% 胰酶消化细胞。调整细胞密度为每毫升 6 × 10<sup>5</sup> 个, 在 6 板上每孔接种 2 mL。在培养箱中培养 24 h, 吸弃原培养液。实验分组及给药按照“2.2”项下操作, 孵育 2 h 结束后, 弃去每孔培养液, 每孔加入

PBS缓冲液2 mL,用细胞刮刀收集各组细胞并重悬,1 000 r/min,5 min,弃上清液。用RIPA裂解液于冰台上裂解细胞,进行BCA定量,严格按照试剂盒操作说明书测定细胞中MDA、SOD、NO的含量。

### 2.5 肉豆蔻-8散提取物对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的心肌细胞损伤凋亡的影响

2.5.1 Hoechst染色观察心肌细胞凋亡形态 取培养3 d同步搏动的心肌细胞,用0.25%胰酶消化细胞。调细胞密度为每毫升2×10<sup>5</sup>个,在24孔板上每孔接种0.5 mL,在培养箱中培养24 h,吸弃原培养液。实验分组及给药按照“2.2”项下操作,孵育2 h结束后,弃去每孔培养液。每孔加入Hoechst 33342染液250 μL,避光孵育30 min,弃去染液,PBS缓冲液清洗3次,于荧光显微镜下观察心肌细胞凋亡形态。

2.5.2 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率 取培养3 d同步搏动的心肌细胞,用0.25%胰酶消化细胞。调整细胞密度为每毫升1×10<sup>6</sup>个,在6板上每孔接种2 mL。在培养箱中培养24 h,吸弃原培养液。实验分组及给药按照“2.2”项下操作,孵育2 h结束后,分别收集各孔培养液。1 000 r/min,离心5 min,弃去上清液。用0.25%胰酶消化不同组别孔底的心肌细胞。消化过程终止后,1 000 r/min,离心5 min,弃去上清液。合并以上两次所得细胞,用PBS缓冲液清洗2次,弃去PBS缓冲液,加入1×结合缓冲液100 μL重悬细胞,按照AnnexinV/PI凋亡检测试剂盒操作说明,1 h内完成检测。

### 2.6 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行数据分析和统计,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的心肌细胞损伤模型的建立

与正常对照组比较,不同浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组均有极显著性差异( $P < 0.01$ )。随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>剂量增大,心肌细胞损伤率增加且呈浓度依赖性。其中,加入100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抑制率达到50%左右,符合实验要求。因此,选择100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为实验损伤模型。结果见图1。

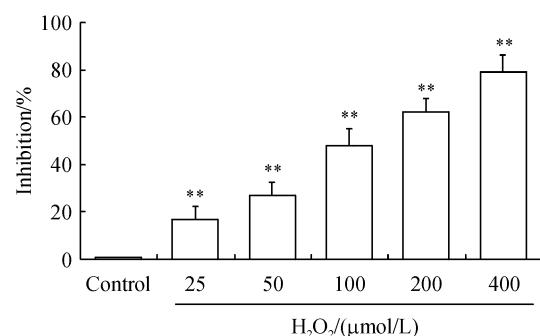


Figure 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cardiomyocyte injury model ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

### 3.2 肉豆蔻-8散提取物对正常心肌细胞的影响

与正常对照组比较,各给药组对心肌细胞活力无明显影响( $P > 0.05$ )。这表明肉豆蔻-8散提取物对正常心肌细胞没有影响,不会干扰后续肉豆蔻-8散提取物对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导心肌细胞损伤影响的实验结果。结果见图2。

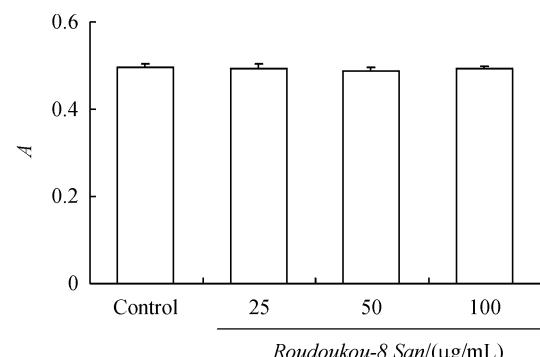


Figure 2 Effect of Roudoukou-8 San on normal cardiomyocytes ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.3 肉豆蔻-8散提取物对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导心肌细胞损伤的影响

如图3所示,与正常对照组比较,模型组吸收度显著降低,细胞存活率显著下降,说明模型组心肌细胞活力明显下降( $P < 0.01$ )。25、50、100 μg/mL肉豆蔻-8散各剂量组与模型组相比,其细胞存活率均有所提高,且具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。肉豆蔻-8散低剂量组与高剂量组之间具有极显著性差异( $P < 0.01$ ),中剂量组与高剂量组之间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。说明肉豆蔻-8散提取物能明显提高H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤心肌细胞的活力,且作用呈剂量依赖性,以高剂量组保护作用最佳。

### 3.4 肉豆蔻-8 散提取物对 $H_2O_2$ 诱导心肌细胞损伤的形态学影响

于倒置光学显微镜下观察,分组处理前,各组心肌细胞生长状态良好。不同实验组经药物干预之后,正常组呈单层簇状生长,且伪足多而饱满,搏动明显,节律一致; $H_2O_2$  模型组出现细胞间隙增大、细胞数减少、细胞浆空泡、伪足少、细胞脱落、悬浮、溶解坏死等明显损伤现象;肉豆蔻-8 散各剂量组与  $H_2O_2$  模型组比较,心肌细胞形态不同程度好转,且以高剂量( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )组改善效果最明显。结果见图 4。

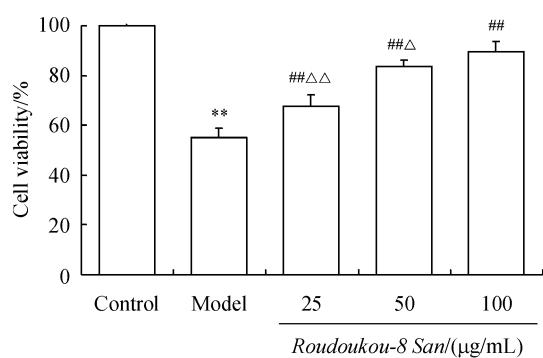


Figure 3 Effects of Roudoukou-8 San on  $H_2O_2$ -induced cardiomyocyte injury ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

\* \*  $P < 0.01$  vs Control; #  $P < 0.01$  vs Model; △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$  vs Roudoukou-8 San ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )

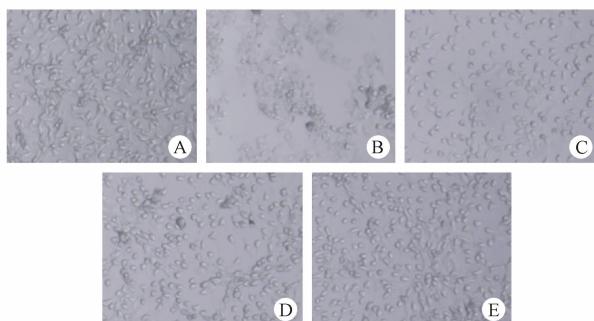


Figure 4 Morphological effects of Roudoukou-8 San on  $H_2O_2$ -induced cardiomyocyte injury

A: Control; B: Model; C: Roudoukou-8 San ( $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ); D: Roudoukou-8 San ( $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ); E: Roudoukou-8 San ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )

Table 1 Content of LDH, CK and AST in the culture solution of cardiomyocytes ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Group	LDH (U/L)	CK (U/L)	AST (U/L)
Control	$20.18 \pm 4.93$	$5.38 \pm 1.14$	$2.10 \pm 0.42$
Model	$73.97 \pm 8.80^{**}$	$12.13 \pm 1.26^{**}$	$11.18 \pm 0.74^{**}$
Roudoukou-8 San ( $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )	$53.55 \pm 5.22^{\# \#}$	$9.8 \pm 0.73^{\# \#}$	$7.90 \pm 0.69^{\# \#}$
Roudoukou-8 San ( $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )	$46.13 \pm 4.88^{\# \#}$	$8.58 \pm 0.66^{\# \#}$	$6.13 \pm 0.54^{\# \#}$
Roudoukou-8 San ( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )	$27.15 \pm 5.13^{\# \#}$	$7.30 \pm 0.64^{\# \#}$	$4.03 \pm 0.46^{\# \#}$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.01$  vs model group

LDH: Lactate dehydrogenase; CK: Creatine kinase; AST: Aspartate aminotransferase

### 3.5 心肌细胞培养液中 LDH、CK 和 AST 的含量

与正常对照组比较,模型组上清液中 LDH、CK 和 AST 释放量显著增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,肉豆蔻-8 散低剂量组( $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )、中剂量组( $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )、高剂量组( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )上清液中 LDH、CK 和 AST 含量明显下降( $P < 0.01$ ),且随着给药组浓度增加呈剂量依赖性。结果见表 1。

### 3.6 心肌细胞中 MDA、SOD、NO 的含量

与正常对照组相比,模型组心肌细胞内 SOD 活力明显降低( $P < 0.01$ ),MDA 和 NO 含量明显增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,肉豆蔻-8 散低剂量组( $25\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )心肌细胞内 SOD 活力上升( $P < 0.05$ ),中剂量组( $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )和高剂量组( $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ )心肌细胞内 SOD 活力明显上升( $P < 0.01$ );各剂量肉豆蔻-8 散给药组均可明显降低心肌细胞内 MDA 和 NO 水平( $P < 0.01$ ),且随着给药组浓度增加呈剂量依赖性。结果见表 2。

### 3.7 Hoechst 染色观察心肌细胞凋亡形态

Hoechst 荧光细胞核染色结果显示,正常对照组心肌细胞成均一的核染,且未见异常核,见图 5-A;模型组细胞呈典型凋亡状态,镜下可见染色质浓集、核固缩、核碎裂、细胞数量少等多种凋亡形态学特征,见图 5-B;肉豆蔻-8 散低、中、高剂量组可见核固缩、破裂等现象明显减小、细胞数量较模型组增多,其细胞形态分别见图 5-C、5-D、5-E。

### 3.8 流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率

结果显示,正常对照组只有少部分细胞发生凋亡,见图 6-A;模型组早期凋亡和晚期凋亡细胞数明显增加,见图 6-B;而肉豆蔻-8 散各剂量组与模型组相比,细胞的凋亡情况明显减少,但并不可以恢复至正常水平,见图 6-C、6-D、6-E。

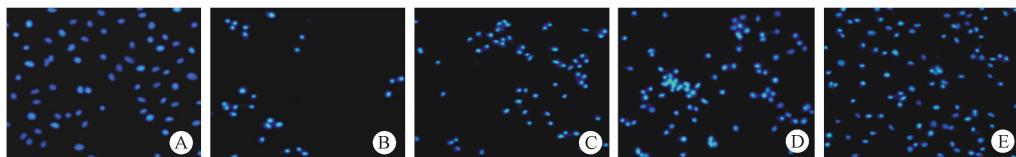
对流式细胞图导出的数据进行统计分析,计算心肌细胞凋亡率,结果见表 3。

**Table 2** Contents of MDA, SOD, and NO in myocardial cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

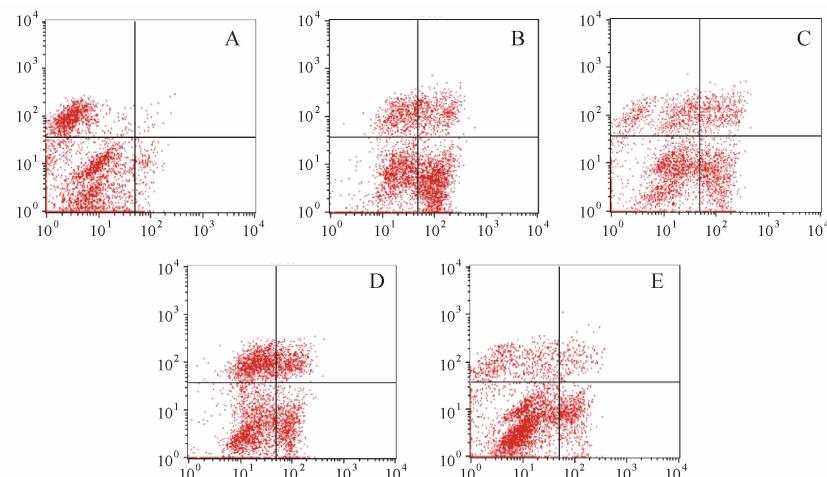
Group	MDA/( nmol/mg prot)	SOD/( U/mg Hb)	NO/( $\mu$ mol/L)
Control	0. 65 $\pm$ 0. 12	67. 92 $\pm$ 8. 51	6. 24 $\pm$ 1. 49
Model	2. 82 $\pm$ 0. 30 **	35. 38 $\pm$ 5. 79 **	36. 25 $\pm$ 3. 30 **
Roudoukou-8 San(25 $\mu$ g/mL)	1. 99 $\pm$ 0. 16##	43. 03 $\pm$ 4. 79 *	27. 13 $\pm$ 4. 28##
Roudoukou-8 San(50 $\mu$ g/mL)	1. 56 $\pm$ 0. 25##	50. 30 $\pm$ 5. 14##	16. 02 $\pm$ 3. 36##
Roudoukou-8 San(100 $\mu$ g/mL)	0. 95 $\pm$ 0. 12##	59. 84 $\pm$ 6. 41##	10. 10 $\pm$ 2. 13##

\*  $P < 0. 05$ , \*\*  $P < 0. 01$  vs control group; ##  $P < 0. 01$  vs model group

MDA: Malonyldialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; NO: Nitric oxide

**Figure 5** Hoechst staining to observe the apoptotic morphology of cardiomyocytes

A: Control; B: Model; C: Roudoukou-8 San (25  $\mu$ g/mL); D: Roudoukou-8 San (50  $\mu$ g/mL); E: Roudoukou-8 San (100  $\mu$ g/mL)

**Figure 6** Flow cytometry detection of myocardial cell apoptosis rate

A: Control; B: Model; C: Roudoukou-8 San (25  $\mu$ g/mL); D: Roudoukou-8 San (50  $\mu$ g/mL); E: Roudoukou-8 San (100  $\mu$ g/mL)

**Table 3** Apoptosis rate of cardiomyocytes detected by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Group	Apoptosis rate/%
Control	3. 68 $\pm$ 0. 69
Model	51. 19 $\pm$ 2. 02 **
Roudoukou-8 San(25 $\mu$ g/mL)	35. 90 $\pm$ 2. 14##
Roudoukou-8 San(50 $\mu$ g/mL)	29. 20 $\pm$ 1. 88##
Roudoukou-8 San(100 $\mu$ g/mL)	15. 82 $\pm$ 1. 81##

\*\*  $P < 0. 01$  vs control group; ##  $P < 0. 01$  vs model group

结果显示,与正常对照组比较,模型组有极显著性差异( $P < 0. 01$ ), $H_2O_2$ 模型组细胞凋亡率显著增加;与模型组比较,肉豆蔻-8 散各剂量组均有极显著性差异( $P < 0. 01$ ),肉豆蔻-8 散各剂量组心肌细胞凋亡率显著下降,表明肉豆蔻-8 散提取物可以显著降低 $H_2O_2$ 诱导的心肌细胞凋亡,且凋亡率随肉豆蔻-8 散剂量的增加逐渐降低。

#### 4 讨 论

本研究对原代乳鼠心肌细胞进行分离和培养,利用100  $\mu$ mol/L  $H_2O_2$ 建立体外心肌氧化损伤模型。MIT检测结果显示, $H_2O_2$ 能够使细胞活力显著减低,肉豆蔻-8 散提取物可以增加 $H_2O_2$ 损伤心肌细胞的活力。通过倒置光学显微镜和Hoechst染色后荧光显微镜下观察发现肉豆蔻-8 散提取物能够显著改善 $H_2O_2$ 诱导状态下心肌细胞形态、增高其存活率并降低其凋亡率。

心肌酶活性变化是判断心肌损伤的重要标志。目前临幊上多以血清中LDH、CK、AST活性升高作为心肌缺血的早期诊断指标,LDH还可以作为衡量细胞坏死的指标<sup>[11-12]</sup>。正常生理状态下,心肌细胞中心肌酶LDH、CK和AST活性非常低,而当

心肌细胞膜受损后,心肌酶将迅速大量释放,导致细胞培养基中 LDH、CK 和 AST 含量明显增高<sup>[13]</sup>。实验结果显示,用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 干预的肉豆蔻-8 散不同剂量组均能够显著降低细胞培养液中 LDH、CK 和 AST 活性且呈剂量依赖性,表明肉豆蔻-8 散提取物能够抑制损伤心肌细胞 LDH、CK 和 AST 的漏出,维护细胞膜的完整性,起到保护心肌细胞的作用。

不饱和脂肪酸是细胞膜主要成分之一,在氧自由基的攻击下极易发生脂质过氧化而生成 MDA。MDA 的含量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,能够间接反映出心肌细胞损伤的程度<sup>[14]</sup>;SOD 是生物体内清除自由基的重要酶类之一,是评估机体抗氧化防御体系功能的重要指标。SOD 可对抗或阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞,具有特殊的生理活性<sup>[15]</sup>;NO 是一种新型的生物信息递质,NO 的含量过高会对心肌细胞产生强烈的毒性损伤<sup>[16-17]</sup>。实验结果表明,肉豆蔻-8 散各剂量组细胞内 MDA 含量较模型组明显降低,SOD 活力明显比模型组增高;经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤后,心肌细胞内 NO 含量明显升高,造成线粒体酶活性被抑制。肉豆蔻-8 散提取物可明显降低损伤后心肌细胞内 NO 含量。

本实验通过流式细胞仪 AnnexinV/PI 染色,测定细胞凋亡率。实验结果显示,肉豆蔻-8 散提取物可明显抑制心肌细胞凋亡,对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的心肌细胞凋亡有明显保护作用。

本研究认为肉豆蔻-8 散提取物对心肌细胞具有显著抗过氧化损伤保护作用,可以抑制细胞凋亡,提示肉豆蔻-8 散可能成为良好的防治心血管疾病的物质基础,有望为心血管疾病的治疗发挥重要作用。

#### 参考文献

- [1] Akewang LD. *Pu Ji Preparation* (普济方集)[M]. Inner Mongolia: Inner Mongolia Science and Technology Press, 1986.
- [2] Inner Mongolia Autonomous Region Food and Drug Administration. *Inner Mongolia Mongolian Medicine Preparation Specification* (内蒙古蒙药制剂规范)[S]. Inner Mongolia: Inner Mongolia People's Publishing, 2014:152.
- [3] Wang W, Han JW, Sun LJ, et al. Determination of quercetin in Baweichenxiang capsule by HPLC[J]. *Chin New Drugs* (中国新药杂志), 2010, 19(18):1719-1721. [4] Hao ML, Ji XW, Wang YH. Determination of eugenol in Baweichen-xiang capsule by GC[J]. *Chin Tradi Pat Med* (中成药), 2010, 32(1):166-168.
- [5] Gao WJ, Mei LP, Wang YH. Determination of total flavone content in Roudoukou Bawei capsules by colorimetry [J]. *Chin Pharm* (中国药业), 2014, 23(24):63-65.
- [6] Xiao YF, Gao WJ, Ji XW, et al. Comparison research the pharmacokinetic of eugenol in mongolian medicine Baweichenxiangsan with different animal heart[J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2016, 36(2):176-181.
- [7] Xiao YF, Li WY, Wang YH. Protective effect of Roudoukou Bawei capsule on experimental animals' heart [J]. *Chin Tradi Pat Med* (中成药), 2016, 38(4):898-902.
- [8] Liu B, Liu XL, Pan GL, et al. Improvement of method of primary culturing myocardial cells of neonatal rat [J]. *Central South Pharm* (中南药学), 2017, 15(1):18-21.
- [9] Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, et al. Oxidative stress in cardiovascular disease[J]. *Indian J Biochem Bioophys*, 2009, 46(6):421-440.
- [10] He L, Sun GB, Chen RC, et al. Research progress on myocardial cell injury model[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med* (中药药理与临床), 2010, 26(6):81-84.
- [11] Liu YB. Clinical significance of four myocardial markers in the diagnosis of acute myocardial infarction[J]. *Chin J Mod Drug Appl* (中国现代药物应用), 2014, 8(15):80-81.
- [12] Sun H, Yang JP, Mao Y. Involvement of Fas-dependent pathway in rhein-induced apoptosis of HK-2 cells [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, 46(4):469-475.
- [13] Meng JF. The Protective effect of rehmannia polysaccharide on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced neonatal rat cardiomyocyte injury and its mechanism[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Clin Med* (中药药理与临床), 2016, 7(1):90-95.
- [14] Feng Y, Wang JH, Shen CX, et al. Elevation of plasma lipid peroxides in patients with acute coronary syndrome[J]. *J Southeast Univ (Med Sci Edi)* (东南大学学报 医学版), 2007, 26(2):98-101.
- [15] Wei SJ, Ren ZT, Yang XY, et al. Protective effects of laminaria polysaccharide sulfate on cardiomyocytes of neonatal rat injured by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2015, 34(2):39-44.
- [16] Ni W, Chen F. Antioxidation of yindanxinnaotong capsule on myocardial injury induced by hypoxia and reoxygenation [J]. *Chin J Interg Med Cardio-/Cerebrov Ascular Disease* (中西医结合心脑血管病杂志), 2008, 11(6):1308-1309.
- [17] Tatsumi T, Matoba S, Kawahara A, et al. Cytokine induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes[J]. *Am Coll Cardiol*, 2000, 35(5):1338-1346.