

心血管疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000337

参麦注射液对心肌细胞中细胞色素 P450 酶的影响

张红曦,董志

(重庆医科大学药学院生化与分子药理教研室,重庆 400016)

【摘要】目的:研究参麦注射液(shenmai injection,SMI)对大鼠 H9c2 心肌细胞中细胞色素 P450(cytochrome P450,CYP450) mRNA 表达的影响。**方法:**通过传代的方法培养心肌细胞,通过细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)检测给药后细胞的活性,乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)实验检测细胞毒性,最终选取合适的浓度和给药时间对细胞进行处理,采用 real-time PCR 方法,检测不同给药浓度下各处理组对大鼠 H9c2 心肌细胞中 CYP450 亚酶 CYP2C11、CYP2J3、心房利钠肽(atrial natriuretic polypeptide,ANP)和脑钠肽(brain natriuretic peptide,BNP)mRNA 表达的影响。**结果:**SMI 对 H9c2 细胞 CYP2J3 和 CYP2C11 的表达具有诱导的作用,在 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达水平上,SMI H9c2 细胞也具有诱导的作用,且随着浓度的增加,诱导作用逐渐增强。**结论:**CYP2J3、CYP2C11、ANP 和 BNP 等相关分子是心血管的重要靶点,而 SMI 对心血管疾病疗效明确,因此心脏 P450 酶系统可能是 SMI 治疗心血管疾病新的途径或靶点。

【关键词】参麦注射液;细胞色素 P450 酶;H9c2 心肌细胞;实时荧光定量聚合酶链式反应

【中图分类号】R969.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-05-12

Effects of Shenmai injection on the cytochrome P450 enzymes in cardiomyocytes

Zhang Hongxi,Dong Zhi

(Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To investigate the influence of Shenmai injection(SMI) on mRNA expression of cytochrome P450(CYP450) in H9c2 myocardial cell. **Methods:**H9c2 cell was cultured by method of passage. Cell counting kit-8(CCK-8) assay was used to detect the viability of H9c2 cells and lactate dehydrogenase(LDH) assay was used to detect the toxicity of H9c2 cells. The expression of CYP 2J3,CYP2C11,atrial natriuretic polypeptide(ANP) and brain natriuretic peptide(BNP) were measured by real-time PCR. **Results:**SMI could induce the expression of CYP 2J3 and CYP2C11 in H9c2 cell. In addition,SMI could induce the mRNA of ANP and BNP in a dose-dependent manner. **Conclusion:**SMI was widely used in the treatment of cardiovascular diseases. CYP2J3,CYP2C11,ANP and BNP mRNA expression maybe the new targets of metabolism.

【Key words】Shenmai injection;cytochrome P450;H9c2 myocardial cell;real-time fluorescent quantitative PCR

参麦注射液(shenmai injection,SMI)是在《症因脉治》中麦冬饮基础上应用现代科学技术研制成的中药注射液,临床广泛用于治疗心血管疾病^[1]。尤其在西药常规治疗的基础上显示了一定的疗效。大鼠 H9c2 心肌细胞是从大鼠品系 BDIX,以鼠胚胎心脏器官内的心室组织为最初细胞培养来源,以选择性继代培养的方式,成功繁殖出的 1 株同时具有骨骼肌与心肌功能的特异心肌细胞株系作为心脏成肌细胞,因此常用于心肌疾病的研究。已有报道关于

SMI 对大鼠心脏组织细胞色素 P450 (cytochrome P450,CYP450)酶的影响^[2],本实验从细胞水平探讨 SMI 对 CYP450 酶的影响,以期找到 SMI 可能的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 大鼠胚胎心肌细胞 H9c2,购买于协和细胞中心资源中心。

1.1.2 主要药品与试剂 SMI(生药含量:红参 0.1 g/ml,麦冬 0.1 g/ml,批号:1107201),由正大青春宝药业提供。DMEM 培养基(Hyclone);新生胎牛血清(Hyclone);0.25%胰蛋白酶

作者介绍:张红曦,Email:zhanghongxi527@163.com,

研究方向:药理学。

通信作者:董志,Email:zhidong073@hotmail.com。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000337.html

(Hyclone); TRizol (Invitrogen); 细胞计数 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒 (东仁化学科技); 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活力定量测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); RNA 提取试剂盒 (Biomed 公司); 反转录聚合酶链式反应试剂盒 (TransGen 公司), SYBR Green SuperMix (Applied Biosystems 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器设备 电子天平 (德国 Sartorius BS223S), 水浴锅 (北京市长风仪器仪表公司 HW·SYII-K), 紫外分析仪 (Beckman) PCR 仪 [GeneAmp PCR System 2400 (PE Applied Biosystem)]; ABI StepOne/StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 扩增仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 大鼠 H9c2 心肌细胞为贴壁细胞, 呈长梭形, 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEN 高糖培养基中, 放于 37 ℃, 含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 当细胞长至 80% 左右融合时传代, 用 0.25% 胰酶消化, 置于显微镜下观察至细胞皱缩变圆时, 立即吸弃胰蛋白酶, 加入新的培养基, 用吸管轻轻吹打, 使细胞分散均匀, 计数后按 1:2~1:4 比例分瓶传代, 平均 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞活力测定 取对数生长期的 H9c2 心肌细胞, 接种于 96 孔板每孔 100 μl, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁且单层细胞铺满孔底后进行实验, 加入不同浓度 SMI, 设 Control 组作为对照, 各组均设 5 个复孔。培养箱中培养 24 h 后, 每孔加入 10 μl 的 CCK-8 溶液 (注意不要在孔中生成气泡, 气泡会影响吸光度 (absorbance, A) 值的读数, 培养板在培养箱内孵育 1~4 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的 A 值。

1.2.3 细胞 LDH 的测定 取对数生长期的 H9c2 心肌细胞, 接种于 96 孔板每孔 100 μl, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁且单层细胞铺满孔底后进行实验, 加入不同浓度 SMI, 设 Control 组作为对照, 各组均设 5 个复孔。作用 24 h 后, 按照试剂盒说明书制作标准曲线, 检测并计算实验组每孔 LDH 漏出率。

1.2.4 大鼠 H9c2 心肌细胞总 RNA 的提取 按实验分组分别处理细胞后, 弃去孔内的培养液, 每孔加入 1 ml PBS 洗涤细胞 2 遍, 弃去 PBS 后加入 1 ml Trizol 试剂, 吹打细胞使其完全脱落, 转入 EP 管中, 标记组别; 每个管中加入 200 μl 氯仿, 剧烈震荡 15 s 后 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min; 取上清加入新的 EP 管中, 再加入 500 μl 异丙醇, 轻轻混匀后 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min; 弃上清, 加入 1 ml 75% 乙醇, 涡旋使

沉淀悬浮, 7 500 r/min, 4 ℃ 离心 5 min; 弃上清, 晾干后加入 20~50 μl DEPC H₂O 溶解, 用紫外分光光度计测定 A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值, 用以检测 RNA 的纯度, A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值大于 1.7~1.9, 可用于下一步的实验。

1.2.5 Real-time PCR 按 TransGen 公司一步法逆转录试剂盒说明书进行逆转录实验。取总 RNA 1 μg, 加入 2 × 逆转录缓冲液 10 μl, 逆转录酶混合液 1 μl, 锚定低聚糖 (dT) 1 μl, 加去 RNA 酶水至终体积为 20 μl 并混匀。逆转录的条件为: 42 ℃ 30 min, 85 ℃ 5 min。产物在 -20 ℃ 保存备用。

按 TransGen 公司 TransStart Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书进行 qPCR 实验。取转录产物 2 μl, 2 × 快速 SYBR Green 预混合液 10 μl, 特异性引物正义链和反义链各 0.5 μl, 加去 RNA 酶水至终体积为 20 μl 并混匀, 扩增条件: 起始变性 95 ℃ 20 s, 循环时 95 ℃ 3 s, 60 ℃ 30 s 进行 40 个循环, 最后熔解曲线 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min。特异性引物序列见表 1。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间采用单因素方差分析, 实验组分别与 control 组比较, 采用两独立样本 *t* 检验。检验水平准定为 $\alpha = 0.05$, 由于 CCK8 实验和 LDH 实验共分为 10 组, 因此进行 *t* 检验时调整检验水准 $\alpha' = 0.05/10 = 0.005$; qPCR 实验共分 5 组, 调整检验水准 $\alpha' = 0.05/5 = 0.01$ 。

2 结 果

2.1 细胞活力测定结果

本实验以 SMI 2~100 mg/ml 作用于大鼠 H9c2 心肌细胞 24 h 后, CCK-8 实验法检测 A 的变化。A 值与细胞增值活力成正比, A 值越高, 细胞生长增值活力越高; A 值降低, 细胞增殖生长活力则受到抑制。结果表明: SMI 不同浓度处理组与 Control 组相比, 吸光度降低, 且随着浓度的升高, 吸光度降低增加。说明 SMI 在实验剂量范围内作用于大鼠 H9c2 心肌细胞后可抑制细胞的增值, 并具有剂量效应关系。见表 2。

2.2 LDH 测定结果

LDH 的释放可以反映细胞膜受损程度, 同时也是细胞存活的重要指标。本实验表明, 不同浓度 SMI 作用于细胞后可引起细胞培养液中 LDH 不同程度的升高, 并且具有剂量依赖性。说明 SMI 在实验剂量范围内作用于大鼠 H9c2 心肌细胞后可引起细胞膜损伤, 对大鼠 H9c2 心肌细胞表现出一定的毒性作用, 并具有剂量效应关系。见表 2。

表 1 用于 real-time PCR 分析的大鼠 P450 亚酶引物序列

Tab.1 P450 enzymes primer sequences for semi-quantitative RT-PCR analysis

P450 亚酶	正义链	反义链
ANP	GGAGCCTGCGAAGGTCAA	TATCTTCGCTACCGAAGCTGT
BNP	CAGAAGCTGCTGGAGCTGATAAG	TGTAGGGCCTTGCTCCTTTG
CYP2C11	CACCAGCTATCACTGGATTGCG	GTCTGCCCTTTGACAGGAA
CYP2J3	CATTGAGCTCACAAGTGGCTTT	CAATTCCTAGGCTGTGATGTCG
β-actin	CCAGATCATGTTTGAGACCTTCAA	GTGGTACGACCAGGCATACA

表 2 SMI 处理 H9c2 心肌细胞后细胞活力及 LDH 释放变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 Cell viability and LDH release of H9c2 cell after Shenmai injection ($\bar{x} \pm s, n=5$)

不同处理组	CCK-8 实验 A 值	LDH 释放 (U/dl)
Control 组	1.096 ± 0.010	1545.442 ± 70.349
SMI 2 mg/ml 组	1.074 ± 0.014	1572.558 ± 25.300
SMI 4 mg/ml 组	1.006 ± 0.029 ^a	1656.977 ± 44.791
SMI 6 mg/ml 组	1.028 ± 0.017 ^a	1756.854 ± 28.452 ^a
SMI 8 mg/ml 组	0.991 ± 0.021 ^a	1811.430 ± 10.832 ^a
SMI 10 mg/ml 组	0.994 ± 0.032 ^a	1787.165 ± 31.396 ^a
SMI 20 mg/ml 组	0.906 ± 0.016 ^a	1892.904 ± 57.855 ^a
SMI 40 mg/ml 组	0.788 ± 0.018 ^a	1639.593 ± 34.795
SMI 60 mg/ml 组	0.277 ± 0.003 ^a	2763.396 ± 44.195 ^a
SMI 80 mg/ml 组	0.194 ± 0.006 ^a	2955.739 ± 66.144 ^a
SMI 100 mg/ml 组	0.196 ± 0.005 ^a	3252.857 ± 79.665 ^a
F 值	2 080.455	785.188
P 值	0.000	0.000

注: a, 实验组分别于 Control 组比较, $P \leq 0.005$

2.3 Real-time PCR 测定结果

结果表明,与 Control 组相比较 SMI 组对 CYP2J3、CYP2C11、ANP 和 BNP mRNA 表达均有明显的上调,并且在实验剂量范围内,随着浓度的增加,诱导作用逐渐增强。见表 3。

3 讨论

SMI 作为中医临床常用注射剂,在心血管疾病中应用广泛。谷腾飞等^[3]研究发现,SMI 可提高缺血再灌注损伤后大鼠心肌组织心型脂肪酸结合蛋白(heart fatty acid binding protein, h-FABP)的水平和抑制血清游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)的升高,对心肌产生保护作用。另有研究表明,心肌缺血再灌注损伤时大鼠细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达升高,SMI 能明显抑制 ICAM-1 表达上调,推测 SMI 对缺血再灌注大鼠心肌

的保护作用与抑制 ICAM-1 表达上调有关^[4]。本文以心肌细胞中 CYP2J3、CYP2C11、ANP 和 BNP 为考察指标,探索 SMI 对其 mRNA 表达的影响,以期找出 SMI 心脏保护作用的新靶点。

CYP450 酶是人体最重要的代谢酶,参与生物体内源性物质和外源性物质的生物转化^[5]。花生四烯酸经 CYP 表氧化酶代谢产生表氧-二十碳三烯(epoxyeicosatrienoic acid, EETs),其在心脏保护方面具有明显作用,在治疗心脑血管缺血性疾病中也具有显著疗效,因此本文选择与心血管疾病密切相关的 CYP 亚型进行探讨。

研究首先通过 CCK-8 实验检测给药后 H9c2 心肌细胞活力,结果显示,在 SMI 浓度为 2~100 mg/ml 作用于大鼠 H9c2 心肌细胞后,细胞的存活率降低,且呈现浓度依赖性。通过 NEIC 软件计算 SMI 的 IC₅₀ 值为 39 mg/ml,为下一步实验浓度选择提供依据。

LDH 实验检测给药后 H9c2 心肌细胞损伤程度。结果显示,SMI 作用于大鼠 H9c2 心肌细胞后,细胞培养液中 LDH 的释放随着 SMI 浓度的增加而增加,而且在 60 mg/ml 以后呈现急剧增多的趋势,说明高浓度 SMI 作用于大鼠 H9c2 心肌细胞后会表现出一定的毒性,引起细胞膜的损伤。同时也进一步验证了 CCK-8 的结果。

CYP 表氧化酶的 CYP2J 和 CYP2C 家族能代谢花生四烯酸生成具有生物活性的化学物质 EETs,而 EETs 在调节血压^[6]、舒张血管、调节细胞增殖^[7]、炎症^[8]、参与细胞信号转导等方面都起着重要作用。已有报道称 SMI 对 CYP2J3 有明显的诱导趋势。本实验结果显示,SMI 对 H9c2 细胞 CYP2J3 和 CYP2C11 的表达也具有诱导的作用,且随着浓度的增加,诱导作用逐渐增强。

同属利钠肽家族的 ANP 和 BNP 在心脏负荷过

表 3 SMI 对 H9c2 细胞 CYP450 亚酶 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.3 Effects of Shenmai injection on mRNA expression of CYP enzymes in H9c2 cell ($\bar{x} \pm s, n=5$)

不同处理组	CYP2J3	CYP2C11	ANP	BNP
Control 组	0.940 ± 0.026	1.065 ± 0.400	1.059 ± 0.186	1.012 ± 0.052
SMI 2 mg/ml 组	2.620 ± 0.452 ^a	2.010 ± 0.299 ^a	1.250 ± 0.159	1.462 ± 0.122 ^a
SMI 4 mg/ml 组	3.665 ± 1.223 ^a	3.415 ± 0.215 ^a	3.310 ± 0.380 ^a	1.707 ± 0.622
SMI 8 mg/ml 组	11.428 ± 0.925 ^a	5.906 ± 0.575 ^a	6.650 ± 1.060 ^a	2.376 ± 0.238 ^a
SMI 16 mg/ml 组	18.504 ± 5.887 ^a	12.846 ± 1.228 ^a	7.195 ± 2.950 ^a	4.053 ± 0.521 ^a
SMI 32 mg/ml 组	19.260 ± 1.795 ^a	34.572 ± 0.890 ^a	27.548 ± 3.690 ^a	9.755 ± 0.690 ^a
F 值	49.646	1 768.717	126.904	268.938
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 实验组分别于 Control 组比较, $P \leq 0.01$

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000374

Parylene 涂层封堵器治疗儿童先天性心脏病疗效观察

秦 莉, 易岂建, 李 谧, 吕铁伟, 白永红, 计晓娟, 蒲晓芳, 罗 雪

(重庆医科大学附属儿童医院心内科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿科学重庆市实验室,

重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨 Parylene 涂层封堵器(Parylene coating occluder)治疗儿童先天性心脏病(congenital heart diseases, CHD)的临床安全性、有效性及阻断镍离子释放入血的效果。**方法:**将待实施介入治疗的 CHD 患儿 23 例按照随机分组原则分为派瑞林组(A 组)及传统组(B 组),均为北京华医圣杰医疗器械公司产品。A 组 12 例,其中室间隔缺损(ventricular septal defects, VSD)4 例,动脉导管未闭(patent ductus arteriosus, PDA)8 例,B 组 11 例,其中 VSD 3 例,PPA 8 例。所有患儿均由其监护人签署知情同意书。2 组均在 X 线、心脏彩超及心电图监测下完成经导管介入封堵治疗,于术前、术后 1 d、1 月、3 月、6 月随访观察临床症状体征、肝肾功、血常规、心电图、心脏彩超、胸片及血镍浓度变化情况。**结果:**2 组介入封堵治疗均成功,成功率均为 100%(23/23);A 组中有 1 例术后即刻有少量残余分流,随访至术后 6 月时残余分流消失。无机械性溶血、封堵器脱落、移位、心律失常等并发症发生。随访各时间点 2 组之间在临床症状体征、肝肾功能(分别为 $P=0.819$ 、 $P=0.418$ 、 $P=0.991$ 、 $P=0.828$)、血常规(分别为 $P=0.521$ 、 $P=0.239$ 、 $P=0.088$)、心电图、心脏彩超(分别为 $P=0.249$ 、 $P=0.239$ 、 $P=0.213$ 、 $P=0.071$ 、 $P=0.397$)、胸片(P 分别为 0.537、0.114)和血液镍离子浓度($P=0.797$)方面均无统计学意义。**结论:**小儿 CHD 介入治疗中,Parylene 涂层封堵器在有效性、安全性及阻断镍离子释放入血方面与传统封堵器无显著差异。

【关键词】封堵器;先天性心脏病;介入治疗;镍离子;儿童**【中图分类号】**R725.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-03-09

作者介绍:秦 莉,Email:443487841@qq.com,

研究方向:小儿心血管疾病。

通信作者:易岂建,Email:1105643760@qq.com

基金项目:重庆市卫生局资助(编号:2012-2-084)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000374.html

重或心脏扩大时代偿性增加,起到维护心功能的作用^[9]。本实验在 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达水平上,SMI 对 H9c2 细胞都具有诱导的作用,且随着浓度的增加,诱导作用逐渐增强。

综上所述,本实验通过 SMI 对心肌细胞 CYP450 酶的影响研究发现,SMI 对 CYP2J3、CYP2C11、ANP 和 BNP 均有明显的上调作用,根据相关报道 SMI 对心脏组织也有相同的调节作用,推测 CYP2J3、CYP2C11、ANP 和 BNP 等相关分子可能是 SMI 治疗心血管疾病的靶点,其分子机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 曹旭东,丁志山,陈建真.参麦注射液药理及临床研究进展[J].中国中医药信息杂志,2010,17(3):104-106.
- [2] 张红曦,王宇光,马增春,等.参麦注射液对大鼠心脏细胞色素 P450 酶的调节作用[J].中国药理学通报,2014,30(4):484-489.
- [3] 谷腾飞,赵 明,蒋 鹏,等.参麦注射液对缺血-再灌注损伤大鼠心肌 H-FABP 和血清 FFA 的影响[J].临床麻醉学杂志,2011,27(6):

590-592.

- [4] 蒋 鹏,赵 明,刁玉晶,等.参麦注射液对心肌缺血再灌注损伤大鼠 ICAM-1 表达的影响[J].现代预防医学,2011,38(7):134-1348.
- [5] Deng YM, Theken KN, Lee CR. Cytochrome P450 epoxigenases, soluble epoxide hydrolase, and the regulation of cardiovascular inflammation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(2):331-341.
- [6] Kerr AJ, Raffel OC, Whalley GA, et al. Elevated B-type natriuretic peptide despite normal left ventricular function on rest and exercise-stress echocardiography in mitral regurgitation[J]. Eur Heart J, 2008, 29(3):363-370.
- [7] Sellers KW, Sun C, Diez-Freire C, et al. Novel mechanism of brain soluble epoxide hydrolase-mediated blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rat[J]. FASEB J, 2005, 19(6):626-628.
- [8] Michaelis UR, Fisslthaler B, Barbosa-Sicard E, et al. Cytochrome P450 epoxigenases 2C8 and 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt23):5489-5498.
- [9] 赵雪燕,杨跃进,张 健,等.心力衰竭患者 N 末端 A、B 及 C 型利钠肽原与超声心动图和心功能对比分析[J].中华心血管病杂志,2009,37(6):486-490.

(责任编辑:冉明会)