

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.03.003

麦冬皂苷 D' 对心肌细胞 H9c2 细胞的细胞毒性研究*

林芸芸¹, 顾申红^{1△}, 宋艳玲¹, 蔡海云², 谭 琰¹

(1. 海南医学院第一附属医院, 海南 海口 570000; 2. 海南医学院第一临床学院, 海南 海口 570000)

摘要:目的 探讨麦冬皂苷 D' 对大鼠心肌细胞 H9c2 的细胞毒性作用。方法 麦冬皂苷 D' 0.1, 0.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ 作用于 H9c2 细胞 24 h, MTS 法检测细胞毒性, 流式细胞仪检测细胞凋亡率、细胞周期和线粒体膜电位。结果 不同浓度麦冬皂苷 D' 作用于 H9c2 细胞 24 h, 5 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的药物处理表现出明显的细胞毒性; 流式细胞仪检测显示, 5 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的麦冬皂苷 D' 可诱导 H9c2 细胞凋亡 ($P < 0.05$), 将心肌细胞阻滞于 G_0/G_1 期 ($P < 0.01$), 降低线粒体膜电位 ($P < 0.05$)。结论 较高浓度的麦冬皂苷 D' 对 H9c2 心肌细胞有明显的细胞毒性作用。

关键词: 麦冬皂苷 D'; H9c2 细胞; 毒性作用

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)03-0010-03

Cytotoxicity of Ophiopogon D' on Cardiomyocytes H9c2 Cells

LIN Yunyun¹, GU Shenhong¹, SONG Yanling¹, CAI Haiyun², TAN Yan¹

(1. The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570000; 2. The First Clinical College of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570000)

Abstract: Objective To investigate the cytotoxicity of Ophiopogonin D' (OPD') on rat cardiomyocytes H9c2 cells. **Methods** H9c2 cells were treated with 0.1, 0.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ OPD' for 24 h. The cytotoxicity was measured by MTS assay, and the apoptosis rate, cell cycle, and mitochondrial membrane potential were measured by flow cytometry. **Results** Different concentration of OPD' were treated on H9c2 cells for 24 h, 5 $\mu\text{mol/L}$ and above concentrations of OPD' showed significant cytotoxicity. Flow cytometry results showed that 5 $\mu\text{mol/L}$ and above concentrations of OPD' could induce apoptosis in H9c2 cells ($P < 0.05$), block H9c2 cells in G_0/G_1 phase ($P < 0.01$), and decrease mitochondrial membrane potential ($P < 0.05$). **Conclusion** The higher concentration of OPD' has significant cytotoxic effects on H9c2 cells.

Key words: ophiopogonin D'; H9c2 cells; toxic effect

麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Linn. f.) Ker - Gawl. 有生津解渴、润肺止咳之功效^[1], 有明显的抗心肌缺血功效, 化学成分含麦冬皂苷 A, B, B', C, C', D, D' 等^[2-3]。麦冬皂苷 D (OPD) 可通过调控细胞钙通道稳态, 从而抑制氧化应激, 减少心肌细胞凋亡^[4]; 还可通过抗氧化作用抑制阿霉素诱导的心肌自噬性损伤, 发挥保护效应^[5]。麦冬皂苷 D' (OPD') 与 OPD 结构十分相似, 然而至今对 OPD' 的药物毒理研究很少。本研究中探讨了 OPD' 对心肌细胞 H9c2 细胞的细胞毒性作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞、仪器与试剂

细胞株: 大鼠心肌细胞 H9c2 购自美国模式培养物保藏中心 (ATCC CRL-1446)。

仪器: c150 型 CO₂ 细胞培养箱 (德国 Binde 公司); SW-CJ 型超净工作台 (苏州净化设备公司); A10 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司); DMI8 型倒置显微镜 (德国莱卡公司); MDF-C8V1 型 -80 °C 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); FC500MCL 型流式细胞仪 (美国 Beckman

公司)。

试剂: DMEM 培养基 (批号为 10569010); 胰蛋白酶 (批号为 25200056); EDTA (批号为 AM9260G); 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, 批号为 10099141); 二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号为 D2650), 均购自美国 Gibco 公司。麦冬皂苷 D' (上海一飞生物科技有限公司, HPLC 法测定, 含量 $\geq 98\%$, 批号为 41753-55-3); MTS 细胞毒性检测试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号为 G1780); Annexin V-FITC/PI 凋亡测定试剂盒 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号为 APOAF-20TST); JC-1 型线粒体膜电位检测试剂盒 (碧云天生物技术公司, 批号为 C2006)。

1.2 方法

细胞株培养: 大鼠心肌细胞 H9c2 为贴壁细胞, 在含有 10% FBS, 100 U/mL 青霉素和 100 g/L 链霉素的 DMEM 培养基中, 置 5% CO₂, 37 °C 细胞培养箱中培养。待细胞生长至约 90% 时, 弃去原培养基, 用 PBS 轻轻吹吸 1~2 次, 后用预热的 0.25% 胰蛋白酶消化、传代, 平

*基金项目: 国家自然科学基金 [81560054]。

第一作者: 林芸芸, 女, 大学本科, 主治医师, 研究方向为全科医学和老年病学, (电子信箱) 35290637@qq.com。

△通信作者: 顾申红, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主任医师, 研究方向为临床全科医学, (电话) 0898-66772248。

均2 d传代1次。

细胞存活率检测:将 H9c2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,按 3×10^4 个/孔的细胞密度均匀接种于 96 孔板。第 2 天待细胞贴壁生长后弃去培养基,用 PBS 洗去未贴壁细胞,加入新鲜培养基。OPD' 组分别加入不同浓度 (0.1, 0.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 的 OPD', 对照组则加等量不含药物的培养液。继续培养 24 h 后弃去上清液,每孔加 MTS 20 μL 和不含血清培训基 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 ~ 1.0 h。用酶标仪在 480 nm 波长下检测各孔吸光度 (A), 并计算细胞存活率。细胞存活率 = $1 - (\text{OPD' 组 } A_{490} - \text{校零孔 } A_{490}) / (\text{对照组 } A_{490} - \text{校零孔 } A_{490}) \times 100\%$ 。

心肌细胞凋亡能力检测:根据 Annexin V - FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。将 H9c2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,按 2×10^5 个/孔的细胞密度均匀接种于 6 孔板。第 2 天待细胞贴壁生长后弃去培养基,用 PBS 洗去未贴壁细胞,加入新鲜培养基。OPD' 组分别加入不同浓度 (0.1, 0.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$) 的 OPD', 对照组则加等量不含药物的培养液。继续培养 24 h, 弃去上清液,胰酶消化,离心,收集细胞,用 250 μL 结合缓冲液重悬细胞并调整细胞浓度约为 1×10^6 个/mL。向细胞悬液中依次加入 Annexin V - FITC 和 PI 溶液,混匀,室温避光孵育 15 min, 加入 400 μL PBS, 混匀后上流式细胞仪检测分析。

心肌细胞周期检测:按“心肌细胞凋亡能力检测”项下自“将 H9c2 细胞”至“收集细胞”同法操作,70% 冷乙醇(无水乙醇以 PBS 配制)固定过夜,PBS 洗涤 2 次后弃上清液,PI 染液冰浴 30 min,将试管置室温避光染色 30 min,通过流式细胞仪分析细胞周期分布。

线粒体膜电位检测:按“心肌细胞凋亡能力检测”项下自“将 H9c2 细胞”至“加等量不含药物的培养液”同法操作。继续培养 24 h,用 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$) 洗涤 2 次。加入 2 mL 细胞培养液,培养液中可以含有血清和酚红。采用流式细胞仪进行检测,设置激发波长为 525 nm,发射光波长为 595 nm,测定荧光强度。

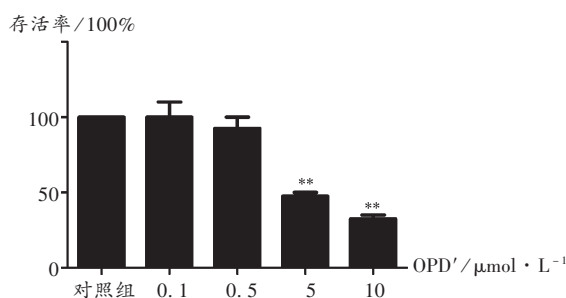
1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPD'对心肌细胞的细胞毒性

MTS 法检测 OPD'对细胞的毒性见图 1。随着 OPD'处理浓度的增加,H9c2 细胞数量呈明显下降趋势,其中 5 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的 OPD'对心肌细胞有明显的毒性作用。



注:与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

图 1 OPD'对 H9c2 细胞存活率的影响

2.2 OPD'对心肌细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 OPD'对心肌细胞 H9c2 凋亡的影响。与对照组相比,OPD' 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组凋亡率明显上升 ($P < 0.05$)。提示 5 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的 OPD'可诱导 H9c2 细胞凋亡。详见表 1。

表 1 OPD'对心肌细胞凋亡率的影响 ($\bar{X} \pm s, \%$)

组别	凋亡率 (%)	t 值	P 值
对照组	3.9 ± 1.1		
OPD'组 0.1 $\mu\text{mol/L}$	4.6 ± 1.6	0.624	0.283
0.5 $\mu\text{mol/L}$	5.1 ± 1.7	1.026	0.181
5.0 $\mu\text{mol/L}$	8.9 ± 2.1	3.653	0.011
10.0 $\mu\text{mol/L}$	11.9 ± 1.9	6.311	0.002

2.3 OPD'对心肌细胞周期的影响

流式细胞仪检测 H9c2 细胞周期发现,5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_0/G_1 期所占比例分别为 $(48.7 \pm 0.3)\%$ 和 $(61.4 \pm 0.5)\%$,与对照组的 $(32.0 \pm 0.4)\%$ 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。而 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_0/G_1 期所占比例与对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),详见表 2。提示 5 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的 OPD'可将心肌细胞阻滞于 G_0/G_1 期,进而造成心肌细胞周期失调。

表 2 OPD'对心肌细胞周期的影响 (%)

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	32.0 ± 0.4	35.2 ± 0.8	32.8 ± 0.7
OPD'组 0.1 $\mu\text{mol/L}$	33.7 ± 0.1	34.7 ± 0.7	31.6 ± 0.4
0.5 $\mu\text{mol/L}$	34.3 ± 0.2	35.9 ± 0.3	29.7 ± 0.8
5.0 $\mu\text{mol/L}$	$48.7 \pm 0.3^*$	$27.9 \pm 0.7^*$	$23.4 \pm 1.1^*$
10.0 $\mu\text{mol/L}$	$61.4 \pm 0.5^\Delta$	$18.3 \pm 1.5^\Delta$	$20.3 \pm 1.3^\Delta$

注:与对照组比较, $t = 57.850, 12.872, 14.873$, * $P = 0.001, 0.001, 0.001$; $t = 79.527, 17.218, 14.663$, $^\Delta P = 0.001, 0.001, 0.001$ 。

2.4 OPD'对心肌细胞线粒体膜电位的影响

流式细胞仪检测 OPD'对心肌细胞 H9c2 线粒体膜电位的影响,与对照组相比,OPD' 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组和

0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞线粒体膜电位无明显差异 ($P>0.05$), 而 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞线粒体膜电位明显下降 ($P<0.01$)。详见表 3。

表 3 OPD'对心肌细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{X} \pm s$)

组别	MMP(FI)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	1.21 $\pm$ 0.37		
OPD'组 0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.95 $\pm$ 0.12	1.157	0.156
0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.73 $\pm$ 0.21	1.954	0.061
5.0 $\mu\text{mol/L}$	0.41 $\pm$ 0.14*	3.503	0.012
10.0 $\mu\text{mol/L}$	0.09 $\pm$ 0.03*	5.226	0.003

注:与对照组比较, * $P<0.01$ 。

3 讨论

本研究结果显示, OPD'浓度超过 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, H9c2 细胞存活率明显下降, 凋亡率明显下降, 线粒体膜电位下降; 且 OPD'可阻滞 H9c2 细胞由 G_0/G_1 期进入 S 期, 使心肌细胞周期失调。提示 OPD'对大鼠 H9c2 细胞有明显细胞毒性, 可能是通过刺激凋亡通路活化而发挥作用的。线粒体膜电位的降低, 是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 是细胞早期凋亡的重要指标^[6]。在凋亡信号的刺激下, 线粒体的膜电位丢失, 线粒体的通透性发生变化, 线粒体产生三磷酸腺苷(ATP)的能力降低, 无法维持其正常功能对细胞供能, 细胞就会发生凋亡^[7]。另一方面, 热休克蛋白 Hsp90 作为心脏保护蛋白 ErbB2 的分子伴侣, 可通过与 ErbB2 结合发挥保护心脏的作用, 而 ATP 的减少会降低 Hsp90 对 ErbB2 的亲合力, 其对心脏的保护作用也会下降^[8]。可见, OPD'可能通过影响高能磷酸池对心肌细胞产生细胞毒性作用。

麦冬含多种甾体皂苷, 具有抗疲劳、清除自由基、提高细胞免疫功能及降血糖的作用^[9]。麦冬有镇静、催眠、抗心肌缺血、抗心律失常、抗肿瘤等作用, 尤其对增进老年人健康具有多方面功效^[10]。目前, 对麦冬的药理活性方面的研究主要集中于其粗提物, 对其中单体化合物研究较少。OPD 和 OPD'作为麦冬的主要成分, 结构十分相似, 差异仅为糖基侧链取代不同, OPD 含有岩藻糖取代基而 OPD 含葡萄糖取代基^[11]。对于 OPD 的研究相对较多: OPD 可通过降低阿霉素诱导的活性氧簇(ROS)累积, 进而缓解内质网应激而对心肌产生保护作用^[4]; OPD 可通过抑制内质网应激及其介导的细胞凋亡通路减轻大鼠心肌细胞的凋亡^[12]; 另外, OPD 可通过降低自噬抑制血管紧张素 II 诱导的心肌肥大^[15]。OPD 对心肌细胞的损伤、肥大均有保护作用, 本研究中发现 OPD'却对心肌细胞产生细胞毒性作用。OPD 与 OPD'同为参麦注射液成分, 参麦注射液可增加机体耐缺氧能力, 减少心

肌耗氧量, 并有保护、修复心肌细胞的作用^[13-15], 而其不良反应可能与 OPD'的细胞毒性相关。

综上所述, 一定浓度的 OPD'对心肌细胞有促进凋亡作用, 会干扰细胞周期, 有一定细胞毒性。通过与 OPD 功能的对比发现, 可通过优化 OPD'结构的方式对药物进行改良, 但 OPD'的具体作用机制和其在机体内的转化机制还需要作进一步研究。

参考文献:

- [1] 周二付. 中药材麦冬的药理作用研究[J]. 中医临床研究, 2017, 9(9): 125-126.
- [2] 曾凡玉, 李思瑶, 石 锴. 麦冬多糖的药理研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(1): 55-67.
- [3] 张力妮, 张 静, 孙润广, 等. 麦冬多糖的修饰及其抗氧化活性与空间结构的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(1): 27-33.
- [4] 孟 晨, 袁彩华, 张晨晨, 等. 麦冬皂苷 D 通过减轻内质网应激对阿霉素所致心肌损伤产生保护作用[J]. 药理学学报, 2014, 49(8): 1117-1123.
- [5] 王 远, 王宇光, 马增春, 等. 麦冬皂苷 D 通过降低自噬抑制血管紧张素 II 诱导的心肌肥大[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(10): 1370-1376.
- [6] 梁 洁, 康清梅, 张 雄, 等. 姜黄素改善 N2a/APP695swe 细胞线粒体功能和抑制细胞凋亡的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(2): 155-161.
- [7] 陈晓红, 程海清, 邓 易, 等. 镰形棘豆对 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位和凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(1): 54-58.
- [8] MOURADIAN M, MA IV, VICENTE ED, et al. Docosahexaenoic Acid-mediated Inhibition of Heat Shock Protein 90-p23 Chaperone Complex and Downstream Client Proteins in Lung and Breast Cancer[J]. Nutrition & Cancer, 2016, 69(1): 92-104.
- [9] 曹景诚, 梁茂新. 基于文献分析的麦冬潜在功效探讨[J]. 中医杂志, 2016, 57(2): 166-169.
- [10] 黄光辉, 孙连娜. 麦冬多糖的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 523-529.
- [11] 黄小燕, 王宇光, 李 晗, 等. 基于人孕烷 X 受体调控 CYP3A4 转录表达的麦冬皂苷 D 和麦冬皂苷 D'的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2017(5): 2302-2306.
- [12] 油文亭. 麦冬皂苷 D 通过 CYP2J3/EETs 系统发挥心肌保护作用的分子机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [13] 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.
- [14] 侯雅竹, 毛静远, 王贤良, 等. 参麦注射液治疗心力衰竭疗效与安全性的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(8): 939-945.
- [15] 石 建, 李世峰. 参麦注射液辅助治疗急性心肌梗死的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(24): 2222-2224.

(收稿日期: 2018-06-05)