

盐酸小檗碱对 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤的保护机制研究

张立寰, 朱巍虹

宁波市医疗中心李惠利东部医院药剂科, 浙江 宁波 315042

[摘要] 目的: 探讨盐酸小檗碱对 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤的保护作用和机制。方法: 将 H9C2 心肌细胞随机分成对照组、模型组 (200 μmol/L H₂O₂ 处理)、盐酸小檗碱+H₂O₂ 组 (10 μmol/L 盐酸小檗碱预处理+200 μmol/L H₂O₂) 和盐酸小檗碱+Tat-beclin1+H₂O₂ 组 (10 μmol/L 盐酸小檗碱预处理+1 μmol/L Tat-beclin1 和 200 μmol/L H₂O₂)。采用 MTT 法测定细胞活力、乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 法测定细胞损伤、免疫荧光实验分析细胞自噬情况、Western Blot 检测细胞 beclin1 表达。结果: 与对照组比较, 模型组 H9C2 细胞存活率显著降低、LDH 释放显著增加、LC3 绿色荧光增多、beclin1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 盐酸小檗碱+H₂O₂ 组 H9C2 细胞存活率提高, LDH 释放减少、LC3 绿色荧光减少、beclin1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与盐酸小檗碱+H₂O₂ 组比较, 盐酸小檗碱+Tat-beclin1+H₂O₂ 组 H9C2 细胞存活率降低、LDH 释放增加、LC3 绿色荧光增多 ($P < 0.05$)。结论: 盐酸小檗碱能有效减轻 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤和细胞自噬, 其机制可能与抑制 beclin1 表达有关, 为临床上应用盐酸小檗碱防治心肌细胞损伤提供实验基础和理论依据。

[关键词] 盐酸小檗碱; 心肌细胞; 过氧化氢 (H₂O₂); 细胞自噬; 细胞实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 02-0004-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.02.002

Study on Protection Mechanism of Berberine Hydrochloride on H9C2 Myocardial Cell Injury Induced by H₂O₂

ZHANG Lihuan, ZHU Weihong

Abstract: **Objective:** To explore the protection and mechanism of berberine hydrochloride on H9C2 myocardial cell injury induced by H₂O₂. **Methods:** Randomly divided H9C2 myocardial cell into the control group, the model group (treated with 200 μmol/L H₂O₂), the berberine hydrochloride plus H₂O₂ group (treated with 10 μmol/L berberine hydrochloride and 200 μmol/L H₂O₂) and the berberine hydrochloride plus Tat-beclin1 plus H₂O₂ group (treated with 10 μmol/L berberine hydrochloride, 1 μmol/L Tat-beclin1 and 200 μmol/L H₂O₂). Detected cell viability by MTT method, detected cell injury by Lactate dehydrogenase(LDH) method, analyzed cell autophagy by immunofluorescence assay, and detected the expression of cell beclin1 by Western Blot method. **Results:** Compared with those in the control group, H9C2 cell viability in the model group was significantly decreased, LDH release was significantly increased, LC3 green fluorescent was increased and the protein expression of beclin1 was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, H9C2 cell viability in the berberine hydrochloride plus H₂O₂ group was significantly increased, LDH release was significantly decreased, LC3 green fluorescent was decreased and the protein expression of beclin1 was decreased ($P < 0.05$). Compared with those in the berberine hydrochloride plus H₂O₂ group, H9C2 cell viability in the berberine hydrochloride plus Tat-beclin1 plus H₂O₂ group was significantly decreased, LDH release was increased and LC3 green fluorescent was increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Berberine hydrochloride can effectively relieve H9C2 myocardial cell injury and cell autophagy induced by H₂O₂, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of beclin1, which can provide experimental basis and theoretical basis for the prevention and treatment of berberine hydrochloride for myocardial cell injury in clinical practice.

Keywords: Berberine hydrochloride; Myocardial cell; Hydrogen peroxide (H₂O₂); Autophagy; Cell experiment

[收稿日期] 2018-07-16

[作者简介] 张立寰 (1978-), 男, 主管药师, 研究方向: 医院药学。

小檗碱又称为黄连素,是从中药黄连中分离的1种季铵生物碱。临床应用为盐酸小檗碱,对多种革兰氏阳性及阴性菌均有抑制作用,主要用于治疗胃肠炎、细菌性痢疾等疾病^[1]。研究发现除了抗菌作用外,小檗碱还有调节免疫、降糖降脂和心血管保护等多种功效^[2]。心肌细胞损伤是心血管疾病发生发展过程中的共同病理生理过程,小檗碱能减轻心肌细胞损伤,其机制可能与减轻细胞凋亡相关^[3]。研究表明小檗碱能够影响细胞 beclin1 表达和自噬,但这是否与心肌保护相关尚不明确。 H_2O_2 被认为是1种经典的能诱导心肌细胞损伤的模型药物,常用于探讨心血管疾病的研究^[4],但盐酸小檗碱对 H_2O_2 诱导的心肌细胞损伤的保护作用研究较少。本实验拟通过体外研究观察盐酸小檗碱对 H_2O_2 诱导的大鼠 H9C2 心肌细胞损伤、自噬和 beclin1 表达的影响,并利用 Tat-beclin1 激活 beclin1 水平,从分子角度探讨盐酸小檗碱可能的调控机制,为其用于心肌细胞损伤防治提供实验基础和理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞 大鼠 H9C2 心肌细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM 低糖培养基、青链霉素双抗、胎牛血清、胰酶、磷酸盐缓冲液和二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Gibco 公司。盐酸小檗碱和 H_2O_2 溶液购自 Sigma-Aldrich 中国公司。Tat-beclin1 购自 Selleck 中国公司。MTT 和乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。LC3 抗体和荧光二抗购自美国 Sigma 公司。beclin1 抗体和普通二抗购自英国 Abcam 公司。BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液和多聚甲醛购自北京鼎国生物科技公司。ECL 化学发光试剂盒及 Forma CO_2 培养箱购自美国 Thermo 公司。ELX800 酶标仪购自美国 BioTek 公司; IX51 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,蛋白印记相关仪器购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 细胞培养、分组及处理 采用含 10%胎牛血清的 DMEM 低糖培养基培养 H9C2 细胞,培养环境为 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的 5% CO_2 培养箱。将 H9C2 细胞随机分成 4 组:对照组(正常培养,不加任何干预措施)、模型组($200\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 12 h)、盐酸小檗碱 + H_2O_2 组($10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱预处理 24 h 后, $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 12 h)和盐酸小檗碱 + Tat-beclin1 + H_2O_2 组($10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 盐酸小檗碱预处理 24 h 后, $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ Tat-beclin1 和 $200\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 培养 12 h)。

1.4 检测心肌细胞存活率 将对数期生长的 H9C2 细胞按 $5\text{ }000$ 个/孔接种于 96 孔板,依照不同实验分组进行处理,48 h 后收集上清至新的 96 孔板,依照 LDH 检测试剂盒说明书用比色法测定 450 nm 吸光度值;原 96 孔板细胞按 MTT 检测试剂盒说明书操作,每孔加入含 $50\text{ }\mu\text{L}$ MTT 溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h,加入 DMSO 溶解后测定 450 nm 吸光度值。

1.5 检测心肌细胞自噬 将对数期生长的 H9C2 细胞按 $5\text{ }\times$

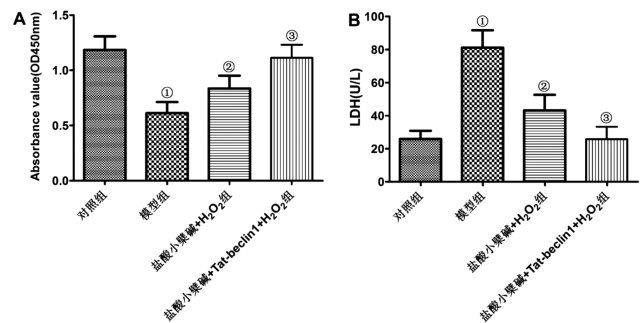
10^4 个/孔接种于放有细胞爬片的 6 孔板,依照不同实验分组进行处理,48 h 后收集细胞,4%多聚甲醛固定 15 min 并穿孔封闭,LC3 抗体(1:1 000) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后荧光二抗(1:5 000)避光室温孵育 1 h,荧光显微镜观察拍照,随机选择 5 个视野分析荧光强度。

1.6 检测心肌细胞 beclin1 表达 将对数期生长的 H9C2 细胞按 $5\text{ }\times 10^4$ 个/孔接种于 6 孔板,依照不同实验分组进行处理,48 h 后用 RIPA 裂解液收集细胞总蛋白并进行 BCA 蛋白定量。利用 12%的 SDS-PAGE 胶将 $30\text{ }\mu\text{g}$ 总蛋白分离后转移至 PVDF 膜,室温封闭 1 h 后,beclin1(1:1 000)抗体 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,ECL 化学发光后采集图像分析灰度。

1.7 统计学方法 数据资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,利用 GraphPad Prism 5 软件进行统计检验和图形绘制,多组间数据比较采用单因素方差分析,Dunnett-t 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

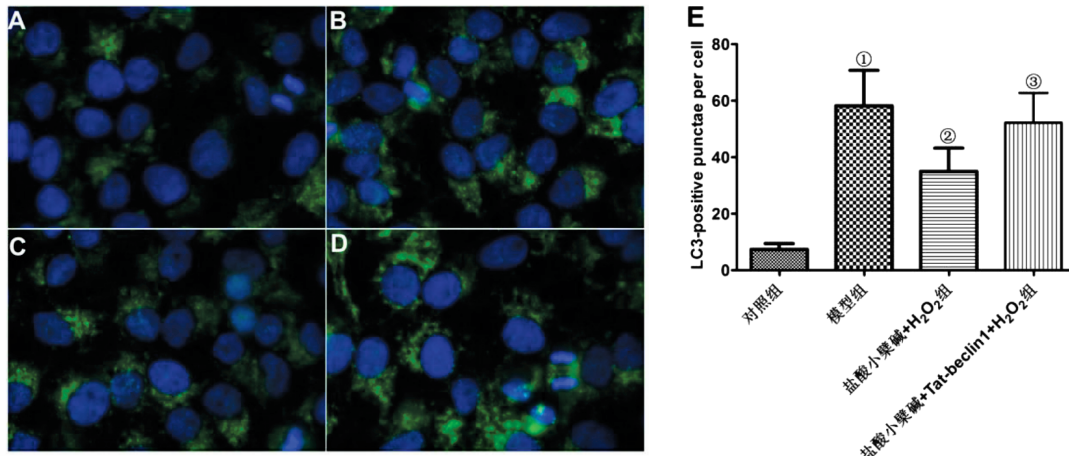
2.1 各组 H9C2 心肌细胞存活率及 LDH 检测结果比较 见图 1。与对照组比较,模型组 H9C2 细胞存活率显著降低、LDH 释放显著增加($P < 0.05$)说明 H_2O_2 模型制备成功。与模型组比较,盐酸小檗碱 + H_2O_2 组 H9C2 细胞存活率提高,LDH 释放减少($P < 0.05$)。与盐酸小檗碱 + H_2O_2 组比较,盐酸小檗碱 + Tat-beclin1 + H_2O_2 组 H9C2 细胞存活率增加、LDH 释放减少($P < 0.05$)。



与对照组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与盐酸小檗碱 + H_2O_2 组比较,③ $P < 0.05$

图1 各组 H9C2 心肌细胞存活率及 LDH 检测结果比较

2.2 各组 H9C2 心肌细胞自噬检测结果比较 见图 2。与对照组比较,模型组 H9C2 细胞 LC3 绿色荧光增多($P < 0.05$),自噬激活;与模型组比较,盐酸小檗碱 + H_2O_2 组 H9C2 细胞 LC3 绿色荧光减少($P < 0.05$),自噬被抑制;说明 H_2O_2 模型自噬活化,盐酸小檗碱抑制 H_2O_2 诱导的 H9C2 心肌细胞自噬;与盐酸小檗碱 + H_2O_2 组比较,盐酸小檗碱 + Tat-beclin1 + H_2O_2 组 H9C2 细胞 LC3 绿色荧光增多($P < 0.05$),自噬增加,说明激活 beclin1 能减弱盐酸小檗碱的心肌细胞自噬。

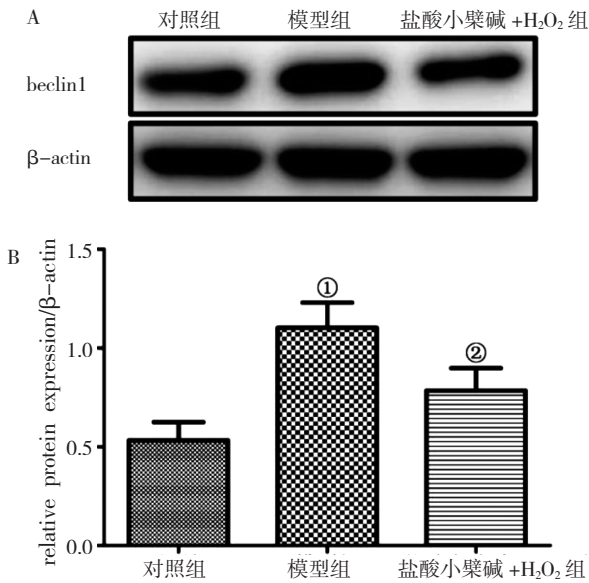


A: 对照组; B: 模型组; C: 盐酸小檗碱+H₂O₂组; D: 盐酸小檗碱+Tat-beclin1+H₂O₂组。

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与盐酸小檗碱+H₂O₂组比较, ③ $P < 0.05$

图2 各组 H9C2 心肌细胞自噬检测结果比较

2.3 盐酸小檗碱抑制 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞 beclin1 表达结果 见图 3。与对照组比较, H₂O₂ 模型组 H9C2 细胞 beclin1 蛋白表达显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 盐酸小檗碱+H₂O₂ 组 H9C2 细胞 beclin1 蛋白表达降低($P < 0.05$)。



与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

图3 盐酸小檗碱抑制 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞 beclin1 表达结果

3 讨论

心血管疾病的发病率和致死率逐渐增加, 严重危害人类健康, 是全球面临的重大公共卫生现状。心血管疾病发病机制非常复杂, 心肌细胞损伤是各种心血管疾病的病理生理学基础^[9], 对于心肌细胞损伤的防治也是心血管疾病研究关注的焦点。

本研究选用 H9C2 细胞作为研究对象, 它来源于胚胎期大鼠心脏组织, 作为 1 种有力的研究工具广泛用于心血管领域的研究^[6]。H₂O₂ 是一种易穿透细胞膜的活性氧成分, 由于其性质稳定且易于制备, 常用于细胞损伤。H₂O₂ 刺激是研究体外细胞损伤最常用的模型, 可部分模拟体内损伤的病理生理过程^[7]。本研究参照文献[8], 采用 200 μmol/L H₂O₂ 处理大鼠 H9C2 心肌细胞 12 h, 结果显示细胞活力显著降低, 同时 LDH 释放显著增加, 表明 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤模型制备成功。而加用盐酸小檗碱预处理能使 H₂O₂ 诱导的 H9C2 细胞活力部分恢复, 且 LDH 释放减少, 提示盐酸小檗碱能够减轻部分细胞损伤。

细胞凋亡被认为在心肌细胞损伤和小檗碱的保护作用中发挥一定作用^[9], 自噬与凋亡之间存有复杂的交互调控, 自噬同样作为 1 种程序性细胞死亡模式, 也参与心肌细胞损伤的发生发展^[10]。近年来, 自噬和细胞损伤的关系逐渐成为热点。生理状态下, 细胞维持低自噬状态和内环境稳态, 自噬的增加会导致内环境紊乱使得细胞死亡^[11]。自噬主要依赖于自噬相关基因编码的蛋白调控, beclin1 作为 ATG6 同源基因, 是调节自噬的主要分子之一, 它可以通过其进化保守结构域与 III 型 PI3K 结合形成蛋白复合物, 再与自噬相关分子 ATG14 直接作用激活自噬^[12]。LC3 是自噬膜表面标记分子, 其水平的改变能一定程度反映细胞自噬的状态。自噬和 beclin1 在盐酸小檗碱减轻心肌细胞损伤是否发挥作用并未见报道, 因此本研究选择了 beclin1 和 LC3 作为自噬水平的评价指标和盐酸小檗碱机制探讨的方向。通过免疫荧光和蛋白印记分别检测了细胞自噬和 beclin1 表达情况, 发现 H₂O₂ 诱导的 H9C2 细胞自噬和 beclin1 表达增加, 加用盐酸小檗碱预处理能抑制 H₂O₂ 诱导的 H9C2 细胞自噬和 beclin1 表达, 提示盐酸小檗碱抑制 beclin1 表达而减轻心肌细胞自噬发挥细胞的保护作用。

为了进一步证实 beclin1 在盐酸小檗碱保护心肌细胞损伤中的作用,我们加用了 Tat-beclin1 处理,发现盐酸小檗碱对心肌细胞的保护以及细胞自噬的抑制效果均减弱。Tat-beclin1 是 1 种细胞可透过性肽段,能够通过动员内源性 beclin1 诱导自噬反应, beclin1 回复实验表明盐酸小檗碱保护心肌细胞损伤的机制可能与其抑制 beclin1 的表达有关。综上,盐酸小檗碱对 H₂O₂ 诱导的 H9C2 心肌细胞损伤有一定的保护作用,其机制可能与盐酸小檗碱抑制 beclin1 表达和细胞自噬有关。

[参考文献]

- [1] 齐双翡,王玉珍. 小檗碱在消化系统常见疾病中的作用研究进展[J]. 广东医学, 2017, 38(s1): 343-345.
- [2] 胡诚毅,莫志贤. 黄连素的药理作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 213-219.
- [3] 吕秀秀,王华东,余小慧. 小檗碱抑制去甲肾上腺素诱导心肌细胞凋亡的机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(10): 1974.
- [4] Yasuda J, Okada M, Yamawaki H. T3 peptide, an active fragment of tumstatin, inhibits H₂O₂-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts[J]. European Journal of Pharmacology, 2017, 807: 64-70.
- [5] Wang WE, Li L, Xia X, et al. Dedifferentiation, proliferation and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic Injury [J]. Circulation, 2017, 136(9): 834-848.
- [6] Xie J, Potter A, Xie W, et al. Evaluation of a dithio-carbamate derivative as a model of thiol oxidative stress in H9C2 rat cardiomyocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 70 (5): 214-222.
- [7] Sun G, Ning Y, Dai D, et al. The protective role of the TOPK/PBK pathway in myocardial ischemia/reperfusion and H₂O₂-induced injury in H9C2 cardiomyocytes [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(3): 267.
- [8] 闫振富. PARP 表达量降低对氧化应激损伤人心肌细胞凋亡的抑制作用及机制[J]. 山东医药, 2018, 58(1): 40-42.
- [9] 于立明,段维勋,赵国龙,等. 小檗碱减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(4): 433-438.
- [10] Xie M, Kong Y, Tan W, et al. HDAC inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy[J]. Circulation, 2014, 129(10): 1139-1151.
- [11] Green DR, Levine B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate[J]. Cell, 2014, 157 (1): 65-75.
- [12] Ma B, Cao W, Li W, et al. Dapper1 promotes autophagy by enhancing the Beclin1-Vps34-Atg14L complex formation[J]. Cell Research, 2014, 24(8): 912-924.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)