

苓桂术甘汤含药血清对 TGF- β_1 诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的影响*

许 闪¹, 黄金玲^{1,2}, 王 靓^{1,2△}, 施 慧¹, 邵 菁^{1,2}, 洪星辉¹, 甘贤兵^{1,2}, 刘 蕾¹

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽省中医药科学院中西医结合研究所, 安徽 合肥 230038)

摘要: 目的 观察苓桂术甘汤(Linggui Zhugan decoction, LGZGD)含药血清对转化生长因子- β_1 (Transforming growth factor, TGF- β_1)诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 损伤的保护作用。方法 分别使用 10% 的空白大鼠血清、LGZGD 小、中、大剂量组含药血清和大鼠心肌细胞 H9c2 共培养, 12 h 后加入 20 ng·mL⁻¹ 的 TGF- β_1 建立大鼠心肌细胞损伤模型, 继续培养 12 h 后采用 ELISA 法检测细胞中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量。结果 与正常组比, TGF- β_1 组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的含量明显升高($P<0.01$), 与 TGF- β_1 组比, LGZGD 4.2, 8.4 g·kg⁻¹ 组的 TNF- α 的含量显著下降, 分别由(323.839±35.614)下降至(191.399±43.203)和(175.030±19.589)ng·L⁻¹($P<0.05$ 、 $P<0.01$); LGZGD 4.2, 8.4 g·kg⁻¹ 组的 IL-6 的含量由(67.171±13.506)下降至(40.490±7.899)和(30.548±2.226)ng·L⁻¹($P<0.05$ 、 $P<0.01$), LGZGD 2.1, 4.2, 8.4 g·kg⁻¹ 组的 IL-1 β 含量由(23.463±3.053)下降至(14.793±4.244)、(14.600±3.517)和(9.253±2.720)ng·L⁻¹($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。结论 LGZGD 含药血清对 TGF- β_1 诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 的损伤有显著的保护作用。

关键词: 苓桂术甘汤; TGF- β_1 ; H9c2 心肌细胞; TNF- α ; IL-6; IL-1 β

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)06-0001-03

慢性心力衰竭(CHF)是一种复杂的临床症状, 是各种心脏病的严重阶段。目前研究证实, 心室重构、内分泌及细胞因子的紊乱是 CHF 病理生理过程发生发展的两大因素^[1]。在初始的心肌损伤以后, 多种内源性的神经内分泌和细胞因子系统的激活, 进一步加重了心肌损伤和心功能恶化^[2]。机体可产生多种细胞因子, 心肌细胞也成为多种细胞因子作用的靶细胞。炎症细胞因子在慢性心力衰竭中发挥着重要的作用^[3-4]。

课题组前期研究证明, 体内实验中 LGZGD 可以降低急性心肌梗死心室重构模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 ET-1 的含量, 通过调节细胞因子网络干预急性心肌梗死后的心室重构^[5]; 体外实验中 LGZGD 含药血清可以通过增加细胞存活率来保护由 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞损伤, 通过改善细胞凋亡形态、降低细胞凋亡率、降低心肌细胞 H9c2 中胱

天蛋白酶 3 和胱天蛋白酶 8 的含量来抑制 TGF- β_1 诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 的凋亡。实验在前期研究基础上, 体外培养大鼠心肌细胞 H9c2 并通过 TGF- β_1 的诱导来建立心肌细胞 H9c2 损伤模型, 通过 ELISA 法测定 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等含量的变化来观察 LGZGD 含药血清对 TGF- β_1 诱导的心肌细胞 H9c2 损伤的影响, 为 CHF 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物与细胞株

清洁级 SD 大鼠, 雄性(♂), 体质量(200±20)g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(皖)2011-002; 自由摄食和饮水, 室温控制在 20~25℃, 相对湿度 40%~60%, 定时通风换气。大鼠心肌细胞株 H9c2 购于中国科学院上海生命科学研究所细胞资源中心。

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30973707, 81373533); 国家自然科学基金青年项目(81202631); 安徽省自然科学基金青年项目(1508085QH192)

收稿日期: 2015-09-21

作者简介: 许闪(1990-), 女, 安徽萧县人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 中药防治心血管疾病的作用及机制。

△通信作者: 王靓, E-mail: wangliang_01@163.com

1.2 药品与试剂

LGZGD 按原方比例(茯苓:桂枝:白术:甘草=4:3:3:2)参考文献[6]方法,由安徽省亳州市兴和药业有限公司提取制成含 4.8 g 生药/g 的干浸膏粉末(批号:20141223),其中桂皮醛含量 9.945 mg·g⁻¹,甘草酸含量:14.71 mg·g⁻¹,密封 4℃冰箱保存备用。

高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),人重组 TGF-β₁(批号 0913209,美国 PEPROTECH 公司),TNF-α/IL-6/IL-1β 酶联免疫分析试剂盒(批号 20150709,上海谷研实业有限公司)。

1.3 仪器

3111 型-恒温 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),ATOM 全自动酶联免疫工作站(意大利 MAROCHE),3K15-高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),SW-CJ 系列洁净工作台(AIRTECH,苏州安泰空气技术有限公司)。

1.4 含药血清的制备

取清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,随机均分为空白对照组,按含生药量分别为 LGZGD 2.1,4.2,8.4 g·kg⁻¹(分别相当于临床成人等效量的 0.5,1,2 倍)等 4 组,灌胃给药,10 mL·kg⁻¹,空白对照组给予等体积的蒸馏水,连续给药 5d,末次给药后 1 h 各组大鼠无菌条件下腹主动脉取血,3 000 × g,离心 15 min 后取血清,56℃水浴 30 min 灭活补体,同组血清混匀,0.22 μm 滤膜过滤除菌,-80℃保存备用。

1.5 检测指标和方法

将对数生长期心肌细胞 H9c2 以 3×10⁵ 个·mL⁻¹

的密度接种于 6 孔板中,分成 6 组,正常组、模型组、空白血清组、LGZGD 2.1,4.2,8.4 g·kg⁻¹ 含药血清组。空白血清组细胞以含 10% 正常组大鼠血清的培养液培养,LGZGD 含药血清组细胞分别用含 10% LGZGD 2.1,4.2,8.4 g·kg⁻¹ 的含药血清的培养液培养,12 h 后除正常组之外其余各组加入 20 ng·mL⁻¹TGF-β₁,培养 12 h 后收集细胞上清液,3000×g 离心 10min,取上清液按 ELISA 试剂盒说明书分别检测 TNF-α/IL-6/IL-1β 的含量。

1.6 统计学处理

使用 SPSS17.0 for windows 统计软件进行生物学分析,结果用平均数±标准差表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,*P*<0.05 表示差异显著有统计学意义。

2 结果

LGZGD 含药血清对 TGF-β₁ 诱导 H9c2 心肌细胞内 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量的影响,结果见表 1。

ELISA 结果显示(表 1),与正常组比,20 ng·mL⁻¹ TGF-β₁ 作用心肌细胞 H9c2 12 h 后,细胞中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的含量明显升高(*P*<0.01),经过 LGZGD 4.2,8.4 g·kg⁻¹ 预处理组的 H9c2 细胞 TNF-α 和 IL-6 的含量显著下降(*P*<0.05、*P*<0.01),经过 LGZGD 2.1,4.2,8.4 g·kg⁻¹ 预处理组的 H9c2 细胞 IL-1β 的含量也明显下降(*P*<0.05、*P*<0.01),以上结果说明 LGZGD 含药血清可以降低由 TGF-β₁ 诱导的心肌细胞 H9c2 中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 等含量的升高,对心肌细胞 H9c2 的损伤有一定的保护作用。

表 1 LGZGD 含药血清对 TGF-β₁ 诱导 H9c2 心肌细胞内 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量的影响

Group	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)
Normal control	168.780±35.829	25.285±7.408	7.230±3.09
TGF-β ₁ 20 ng·mL ⁻¹	323.839±35.614**	67.171±13.506**	23.463±3.053**
Blank serum group	266.101±82.725	59.569±7.585	19.706±5.363
TGF-β ₁ + LGZGD 2.1 g·kg ⁻¹	247.054±50.971	53.940±12.126	14.793±4.244 [#]
4.2 g·kg ⁻¹	191.399±43.203 [#]	40.490±7.899 [#]	14.600±3.517 ^{##}
8.4 g·kg ⁻¹	175.030±19.589 ^{##}	30.548±2.226 ^{##}	9.253±2.720 ^{##}

注:与正常组比,***P*<0.01;与模型组比,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01

3 讨论

近年来研究发现,IL-1β、IL-6 和 TNF-α 均可

介导炎症反应,并且与心衰的严重程度正相关^[7-9]。TNF-α 是由活化的单核巨噬细胞分泌的一种细胞

激动剂,可损害血管内皮,抑制心肌收缩力^[10],诱导心肌细胞凋亡或坏死,导致左心室明显扩大,刺激成纤维细胞增殖,参与心室重构的病理过程^[11-13]。IL-1 β 可由多种细胞合成,主要来源于单核细胞,血管的平滑肌细胞和内皮细胞也可产生。研究证实,在 CHF 中,IL-1 β 可以抑制心肌蛋白质合成、促进其分解,降低心肌细胞收缩力;IL-1 β 的增加还可促使其他具有负性肌力作用的细胞因子释放增加,如:TNF- α ,并与 TNF- α 协同发挥负性肌力和细胞毒效应并导致心肌功能的抑制^[14]。IL-6 是参与心功能异常调节的细胞因子,对心肌细胞产生细胞毒性作用,直接损伤心肌细胞,促进心肌细胞肥大和加重心室重构^[15],抑制心肌细胞的兴奋收缩偶联。与此同时,TNF- α 既可诱导合成 IL-1 β ,又可进一步激活 IL-6^[16],IL-1 β 也可诱导 TNF- α 的分泌,并与 TNF- α 协同诱导多种细胞产生 IL-6,这 3 种细胞因子相互作用,共同促进心室重构及 CHF 的发生发展。

研究结果表明,TGF- β_1 作用于心肌细胞 H9c2 后,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量显著升高,提示 TGF- β_1 可以诱导心肌细胞 H9c2 发生损伤,而经过 LGZGD 2.1,4.2,8.4 g·kg⁻¹ 预处理组的 H9c2 细胞中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量明显下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$),表明 LGZGD 含药血清对 TGF- β_1 诱导的 H9c2 细胞损伤有显著的保护作用,其机制与抑制细胞因子过度激活有关。

参考文献:

- [1] Jolda-Mydlowska B, Salomon P. Cytokines and remodeling of the heart in patients with congestive heart failure [J]. Pol Arch Med Wewn, 2003, 109(1): 23-33.
- [2] Hoppeler H, Vogt M. Muscle tissue adaptations to hypoxia [J]. J Exp Biol, 2001, 204(18): 3133-3139.
- [3] Vogt M, Puntschart A, Geiser J, et al. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions [J]. J Appl Physiol, 2001, 91(1): 173-182.
- [4] 黄颖. 米力农对慢性心力衰竭患者心功能及血清 TNF- α 、IL-6 的影响[J]. 海南医学, 2013, 24(24): 3657-3658.
- [5] 王 靓, 侯晓燕, 保永亮, 等. 苓桂术甘汤对急性心肌梗死心室重构模型大鼠 TNF- α 、IL-6 和 ET-1 的影响[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(4): 23-25.
- [6] 黄金玲, 王慧慧, 陈慧芳, 等. 正交试验法优选苓桂术甘汤的提取工艺[J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(6): 65-67.
- [7] 周云艳, 孔一慧, 李为民. 心力衰竭与炎症细胞因子相关研究新进展[J]. 心血管病学进展, 2014, 35(5): 543-546.
- [8] 梁德贤, 李志文, 李庆军, 等. 慢性充血性心力衰竭患者血红蛋白、炎症细胞因子变化的临床意义 [J]. 医药论坛杂志, 2014, 35(9): 82-83.
- [9] 董晓蕾, 常文静, 蔡辉. 炎症细胞因子与慢性心力衰竭[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(4): 438-441.
- [10] 田帅, 李海滨, 张素华. 炎症细胞因子与心力衰竭的相关性研究[J]. 河北医药, 2014, 36(1): 44-45.
- [11] Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, et al. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways[J]. J Clin Invest, 2007, 117(9): 2692-2701.
- [12] Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, et al. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein1 in chronic heart failure [J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(3): 749-756.
- [13] Rordorf R, Savastano S, Sanzo A, et al. Tumor necrosis factor- α predicts response to cardiac resynchronization therapy in patients with chronic heart failure[J]. Circ J, 2014, 78(9): 2232-2239.
- [14] 段佳佳, 夏大胜. 慢性心力衰竭患者炎症细胞因子的变化及作用[J]. 中国心血管杂志, 2012, 17(2): 93-95.
- [15] 吉利, 张艳. 益气通脉饮对慢性心力衰竭大鼠心功能及血清 TNF- α 、IL-6、TGF- β_1 水平的影响[J]. 西部中医药, 2015, 28(5): 25-27.
- [16] Irita J, Okura T, Manabe S, et al. Plasma osteopontin levels are higher in patients with primary aldosteronism than in patients with essential hypertension [J]. Am J Hypertens, 2006, 19(3): 293-297.

(编辑: 杨阳)

(英文摘要见第 7 页)

- [12] Meckfessel MH, Brandt S. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products [J]. J Am Acad Dermatol, 2014, 71(1): 177-184.
- [13] 吴金燕, 蒋献. 神经酰胺与皮肤屏障[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(1): 64-65.
- [14] Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, et al. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2009, 72(2): 295-303.
- [15] 赵鑫. TEWL在评价皮肤屏障功能研究中的应用 [J]. 广东化工, 2014, 41(14): 133-134.
- [16] 李博鑑. 皮肤科证治概要 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 626.
- (编辑: 杨阳)

Study on the Effects of Jianpi Decoctions on Skin Barrier of Disturbance Model in Mice

SUN Xiaofei, YANG Haoran, FANG Kai, XIE Yuhuan
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of Jianpi decoctions—ShenLingBaiZhu powder and LiuJunZiTang on skin barrier by using a mice skin barrier dysfunction model. **Methods** The mouse model of skin barrier dysfunction was made by repeated tape stripping. The Transepidermal Water Loss (TEWL), epidermis thickness and content of epidermal ceramides were tested among normal group, model group and Jianpi decoction groups. **Results** The TEWL and epidermis thickness of models were increased and content of epidermal ceramides was decreased than normal group. The TEWL and epidermis thickness in each group of Jianpi decoction groups were significantly lower than that of model group. Content of epidermal ceramides in Jianpi decoction groups were higher than model group. **Conclusion** Jianpi decoctions could improve the function of skin mechanical barrier, the mechanism of which was related to increase of the content of epidermal ceramides. The effects of strengthening the spleen and removing dampness was better than strengthening the spleen and replenishing qi.

KEY WORDS: Jianpi decoctions; disturbance of skin barrier; TEWL; ceramide; epidermal thickness

(原文见第1页)

Effects of Serum Containing Lingui Zhugan Decoction on TNF- α , IL-6 and IL-1 β of Myocardial H9c2 Cells Injury Induced by TGF- β_1

XU Shan¹, HUANG Jinling^{1,2}, WANG Liang^{1,2}, SHI Hui¹, SHAO Jing^{1,2},
HONG Xinghui¹, GAN Xianbing^{1,2}, LIU Lei¹

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. Research Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the protective effect of serum containing LGZGD on myocardial H9c2 cells injury induced by TGF- β_1 in vitro. **Methods** The myocardial H9c2 cells were incubated with serum containing LGZGD respectively (100 μ L, 10%). After 12 hours, myocardial H9c2 cells in each group were treated with TGF- β_1 (20 ng $\cdot$ mL⁻¹) except normal control group. The method of ELISA was used to detect the contents of TNF- α , IL-6 and IL-1 β . **Results** Compared with the normal control group, the contents of TNF- α , IL-6 and IL-1 β increased markedly ($P < 0.01$). Compared with TGF- β_1 group, the content of TNF- α in LGZGD 4.2, 8.4 g $\cdot$ kg⁻¹ pretreatment groups declined from (323.839 $\pm$ 35.614) to (191.399 $\pm$ 43.203) and (175.030 $\pm$ 19.589) ng $\cdot$ L⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the IL-6 content declined from (67.171 $\pm$ 13.506) to (40.490 $\pm$ 7.899) and (30.548 $\pm$ 2.226) ng $\cdot$ L⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the content of IL-1 β decreased to (14.793 $\pm$ 4.244), (14.600 $\pm$ 3.517) and (9.253 $\pm$ 2.720) ng $\cdot$ L⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in LGZGD 2.1, 4.2, 8.4 g $\cdot$ kg⁻¹ groups. **Conclusion** Serum containing LGZGD has significant protective effects on myocardial H9c2 cells injured by TGF- β_1 .

KEY WORDS: Lingui Zhugan decoction; TGF- β_1 ; myocardial H9c2 cells; TNF- α ; IL-6; IL-1 β