

本文引用: 刘芮祺, 李雨晴, 肖 阳, 刘 萍, 丰正男, 傅音睿, 王志琪. 去甲乌药碱配伍 6-姜酚前后对衰竭心肌细胞影响的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(4): 647-653.

去甲乌药碱配伍 6-姜酚前后对衰竭心肌细胞影响的研究

刘芮祺¹, 李雨晴¹, 肖 阳², 刘 萍¹, 丰正男¹, 傅音睿¹, 王志琪^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041

〔摘要〕 **目的** 比较去甲乌药碱配伍 6-姜酚前后对衰竭心肌细胞的作用。**方法** 采用过氧化氢(H_2O_2)法复制衰竭 H9c2 细胞模型。将细胞分为空白组, 模型组, 6-姜酚组, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 去甲乌药碱单用组以及分别与 20 $\mu\text{mol/L}$ 6-姜酚配伍组, 共 9 组, 观察细胞的线粒体形态, 检测线粒体膜电位、 Ca^{2+} 浓度、ATP 含量及线粒体膜部分主动转运酶活性。**结果** 衰竭 H9c2 细胞复制条件为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预 2 h。与模型组相比, 去甲乌药碱单用及与 6-姜酚合用均明显改善模型细胞线粒体的微观结构损害。与单用去甲乌药碱比较, 配伍 6-姜酚对模型细胞具有协同保护作用, 模型细胞的线粒体膜更为完整、边界清晰、嵴结构恢复, 线粒体膜电位显著升高, 细胞质及线粒体钙浓度均大幅降低, 同时, ATP 含量及 Na^+-K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性均显著增强 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 去甲乌药碱与 6-姜酚配伍可显著增强其对衰竭 H9c2 心肌细胞的保护作用, 该作用可能与两者合用协同缓解线粒体钙超载、提高线粒体膜 ATP 酶活性、增加 ATP 的产量及促进线粒体功能恢复有关。

〔关键词〕 去甲乌药碱; 6-姜酚; H9c2 心肌细胞; 能量代谢; 线粒体

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.04.009

Effects of higenamine combined with 6-gingerol on failing cardiomyocytes before and after treatment

LIU Ruiqi¹, LI Yuqing¹, XIAO Yang², LIU Ping¹, FENG Zhengnan¹, FU Yinrui¹, WANG Zhiqi^{1*}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Huaxi School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

〔Abstract〕 **Objective** To compare the effects of higenamine before and after combination with 6-gingerol on failing cardiomyocytes. **Methods** A failing H9c2 cell model was established using hydrogen peroxide (H_2O_2). The cells were divided into nine groups: blank group, model group, 6-gingerol group, higenamine single-use groups (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$), and higenamine combined with 6-gingerol (20 $\mu\text{mol/L}$) groups. The mitochondrial morphology of the cells was observed, and the mitochondrial membrane potential, Ca^{2+} concentration, ATP content, and mitochondrial membrane-associated active transport enzyme activity were measured. **Results** The replication conditions for inducing failing H9c2 cells were determined as 1000 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 2 hours. Compared with the model group, both higenamine monotherapy and its combination with 6-gingerol significantly alleviated mitochondrial ultrastructural damage. Compared with the use of higenamine alone, the combination with 6-gingerol had a synergistic protective effect on the model cells, as evidenced by a more intact mitochondrial membrane, clearer

〔收稿日期〕 2025-01-08

〔基金项目〕 湖南省教育厅重点项目(23A0285); 湖南省自然高校联合基金重点项目(2025JJ90002); 湖南省大学生创新创业项目(S202310541091); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ80059); 长沙市自然科学基金项目(kq2014093)。

〔通信作者〕 * 王志琪, 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: wzqx2004@hnucm.edu.cn。

boundaries, and restored cristae structure. Additionally, mitochondrial membrane potential was significantly higher, cytoplasmic and mitochondrial Ca^{2+} concentrations were markedly lower, and ATP content, along with the activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$, and $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$, significantly enhanced ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** The combination of higenamine and 6-gingerol can significantly enhance the protective effect on failing H9c2 cardiomyocytes. This effect may be related to their synergistic action in alleviating mitochondrial calcium overload, increasing mitochondrial ATPase activity, promoting ATP production, and restoring mitochondrial function.

[**Keywords**] higenamine; 6-gingerol; H9c2 cardiomyocytes; energy metabolism; mitochondria

附子-干姜为经典药对,两者相须配伍具有增效作用,素有“附子无干姜不热之说”^[1]。研究证实,附子-干姜药对可改善心力衰竭大鼠心功能,作用机制可能与调节氧化应激、增高线粒体呼吸链复合物和线粒体钙单向转运体的蛋白表达水平有关^[2-3]。去甲乌药碱、6-姜酚分别是附子中的主要强心成分和干姜中改善心血管功能的重要成分,且均具有抗氧化应激、增加心脏能量代谢和改善心功能等作用^[4-7]。也有研究者发现,去甲乌药碱配伍 6-姜酚可改善阿霉素诱导的 H9c2 细胞线粒体功能损伤^[8]。但两者配伍协同作用的具体机制尚未明确。

线粒体功能障碍、氧化应激、钙超载均为心力衰竭的重要病理生理机制,且三者相互关联,形成恶性循环,加重病情^[9-12]。检索已有文献发现,鲜有以 H_2O_2 诱导的衰竭心肌细胞模型探索去甲乌药碱配伍 6-姜酚影响细胞线粒体的报道。课题组前期通过成分配伍在 H9c2 细胞上证实甘草缓和附子心肌毒性,与调节线粒体功能、缓解氧化应激和钙超载相关,且似乎对于衰竭心肌细胞模型具有协同保护作用^[13-14]。为进一步阐明附子干姜药对配伍的科学内涵,本研究拟通过 H_2O_2 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤,观察去甲乌药碱配伍 6-姜酚前后对模型细胞线粒体的影响,为附子“须”干姜的药理学基础提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

大鼠心肌细胞(H9c2)(批号:CL-0089,武汉普诺赛生物科技有限公司);去甲乌药碱标准品($\geq 98\%$)(批号:AFCL2152)、6-姜酚标准品($\geq 98\%$)(批号:AFCE1803)均购自成都艾博克生物科技有限公司;DMEM 高糖培养基(批号:PM150210)、PBS 缓冲液(批号:PB180327)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号:PB1800226)、青链霉素混合液(批号:PB180120)、胎

牛血清(FBS,批号:124210-500)均购自武汉普诺赛公司;3% H_2O_2 溶液(批号:A007-1-1,美国 Milli-Pore 公司);线粒体膜电位试剂盒(批号:M8650,北京索莱宝);ATP 测试盒(货号:E-BC-F002,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶试剂盒(批号:A070-3-2,南京建成生物工程研究所)。

1.2 主要仪器

CO_2 细胞培养箱(型号:3111)、全波长酶标仪(型号:1510)、立式压力蒸汽灭菌锅(型号:LMQ.C)均购自美国 Thermo 公司;多功能酶标仪(型号:SynergyTX,美国 biotek 公司);Milli-Q Plus 超纯水仪(型号:Milli-Q Plus-Q,美国 MilliPore 公司);倒置荧光显微镜(型号:BX51,日本 OLYMUS 公司);电子分析天平(型号:LE204E/02,日本 AND 公司); $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱(型号:F570-86)、高速离心机(型号:5180R)均购自德国 EPPENDORF 公司;制冰机(型号:HZB-50/AB,宁波惠康国际工业有限公司);洁净工作台(型号:SW-CJ-2FD,苏州安泰空气技术有限公司);超声波清洁仪(型号:KM-500DE,昆山市超声仪器有限公司);电热鼓风干燥箱(型号:GZX-9070MEB)、电热恒温水浴锅(型号:SSW-420-2S)均购自上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

2 实验方法

2.1 细胞培养与造模

在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,用含 10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养 H9c2 细胞,待细胞密度达 90%左右后,以 0.25%胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。细胞消化计数后,将 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,每孔 5×10^3 个细胞,分别加入不同浓度(600、800、1 000、1 200、1 400 $\mu\text{mol/L}$) H_2O_2 处理细胞,空白组加入不含 H_2O_2 的培养基,每个浓度

6个复孔,2、3、4 h后弃培养基,各孔加入100 μL 的0.5 $\mu\text{mol/L}$ MTT溶液37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h,于490 nm处酶标仪测定吸光度(OD值)。计算细胞存活率,确定最佳造模条件。细胞存活率(%)=[$A_{\text{给药组}}-A_{\text{空白组}}$]/[$A_{\text{空白组}}-A_{\text{空白组}}$] $\times 100\%$ 。

2.2 药物浓度筛选

取对数生长期的H9c2细胞接种于96孔板中,每孔 5×10^3 个细胞,用不同浓度(5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)去甲乌药碱、不同浓度(5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$)6-姜酚和不同浓度(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)去甲乌药碱配伍不同浓度(5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)6-姜酚处理细胞,每个浓度6个复孔,24 h后各孔加入100 μL 的MTT溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h,于490 nm处酶标仪测定吸光度(OD值),计算细胞存活率,确定最适药物浓度。

2.3 分组及给药

取对数生长期的H9c2细胞接种于6孔板中, 1×10^6 个/孔,将细胞分为空白组,模型组,6-姜酚组,5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 去甲乌药碱单用组以及分别与20 $\mu\text{mol/L}$ 6-姜酚配伍组,每组5个复孔。除空白组外,其余各组用 H_2O_2 造模2 h后,各给药组加入相应药物处理2 h,空白组用正常培养基培养。

2.4 指标检测

2.4.1 透射电子显微镜观察线粒体超微结构 取对数生长期的H9c2细胞接种于6孔板中, 1×10^6 个/孔,按照“2.3”项处理干预细胞,离心收集细胞沉淀,加入电镜固定液,进行固定、脱水、包埋、聚合、切片、染色操作,最后透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

2.4.2 化学荧光法检测ATP含量 参照“2.3”项处理干预细胞,收集细胞上清液,根据试剂盒说明书进行溶液配制,酶促反应后,应用酶标仪化学荧光法进行检测,计算ATP含量。

2.4.3 JC-1染色法检测线粒体膜电位 参照“2.3”项处理干预细胞,按照JC-1试剂盒说明书操作,在荧光倒置显微镜下观察、拍照。利用JC-1染料检测线粒体膜电位,当线粒体膜电位低时,JC-1染料产生绿色荧光,线粒体膜电位高时,JC-1染料产生红色荧光。

2.4.4 荧光探针法检测细胞钙浓度 参照“2.3”项

处理干预细胞,按照Fluo-4胞内 Ca^{2+} 检测试剂盒及Rhod-2AM线粒体内 Ca^{2+} 检测试剂说明书进行 Ca^{2+} 检测试剂配制、装载Fluo-4及Rhod-2AM探针等步骤,通过荧光倒置显微镜观察、拍照。

2.4.5 ELISA法检测线粒体ATP相关转运酶活性

参照“2.3”项处理干预细胞,收集细胞上清液,参照 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶试剂盒说明书进行操作,酶标仪波长660 nm处检测OD值,利用BCA试剂盒测定细胞蛋白总量,根据OD值与蛋白浓度计算去甲乌药碱配伍6-姜酚前后衰竭H9c2心肌细胞上述酶活性。

2.5 统计学分析

采用SPSS 21.0软件对数据进行处理分析。计量数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若服从正态分布且满足方差齐性,则进行单因素方差分析,各组数据之间采用LSD多重比较;若服从正态分布不满足方差齐性,则进行单因素方差分析,各组数据之间采用Games-Howell多重比较;若不服从正态分布,则进行非参数检验,采用Kruskal-Wallis检验法成对比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模型细胞复制条件

随着 H_2O_2 浓度升高,细胞存活率均较空白组显著降低($P<0.01$),且随着干预时间的延长,细胞存活率越低。其中,当模型组 H_2O_2 浓度为1 000 $\mu\text{mol/L}$ 、造模时间为2 h时,H9c2细胞存活率为50%左右,故选择 H_2O_2 浓度为1 000 $\mu\text{mol/L}$ 、干预2 h为最佳造模条件。

3.2 药物浓度确定

与模型组比较,单用去甲乌药碱浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 、6-姜酚浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率显著升高,5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 去甲乌药碱配伍20 $\mu\text{mol/L}$ 6-姜酚作用2 h后细胞存活率升高($P<0.05$, $P<0.01$)。其余配伍浓度均不能影响细胞存活率。结果见图1—3。

3.3 去甲乌药碱配伍6-姜酚前后对模型细胞内线粒体超微结构的影响

空白组H9c2心肌细胞线粒体超微结构(膜、嵴)及数量等均未见异常;与空白组比较,模型组线

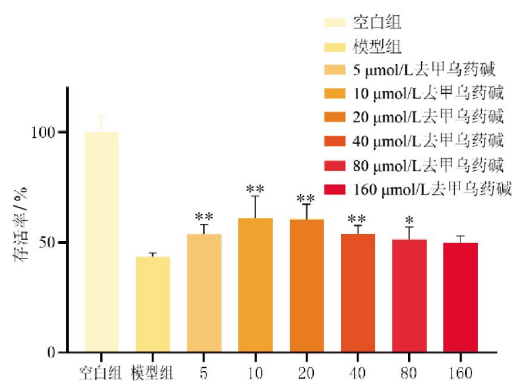


图 1 去甲乌药碱对模型细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, %, $n=6$)

Fig.1 Effects of higenamine on the viability of model cells ($\bar{x} \pm s$, %, $n=6$)

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

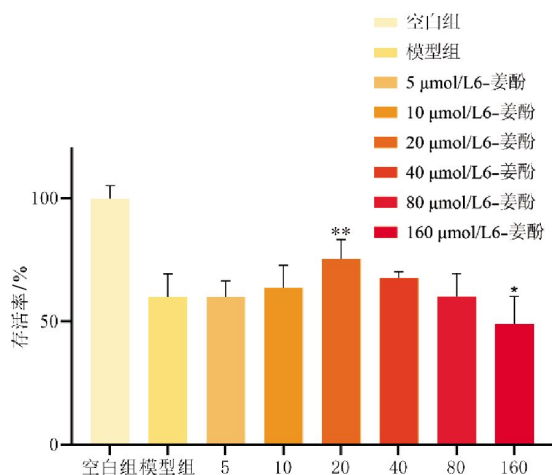


图 2 6-姜酚对模型细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, %, $n=6$)

Fig.2 Effects of 6-gingerol on the viability of model cells ($\bar{x} \pm s$, %, $n=6$)

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

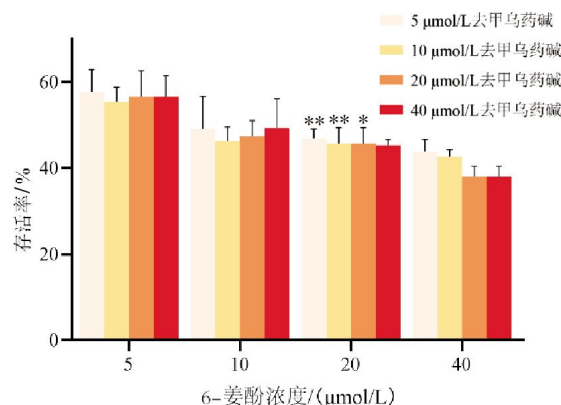


图 3 6-姜酚、去甲乌药碱配伍对模型细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, %, $n=6$)

Fig.3 Effects of 6-gingerol combined with higenamine on the viability of model cells ($\bar{x} \pm s$, %, $n=6$)

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

粒体整体呈现水肿、数量减少,超微结构出现膜肿胀、嵴断裂溶解、间隙增大等病变;与模型组比较,6-姜酚组、去甲乌药碱单用组,线粒体整体结构情况稍有改善,微观结构损害情况明显减轻;与去甲乌药碱单用组比较,5、10、20 μmol/L 去甲乌药碱配伍6-姜酚后线粒体膜相对完整、边界较清晰,嵴结构完整,空泡化情况较少。详见图4。

3.4 去甲乌药碱配伍6-姜酚前后对模型细胞ATP含量的影响

与空白组比较,模型组ATP含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,去甲乌药碱组可升高模型细胞ATP含量($P<0.01$);与对应浓度去甲乌药碱单用组比较,去甲乌药碱配伍6-姜酚组ATP含量明显增加($P<0.01$)。详见图5。

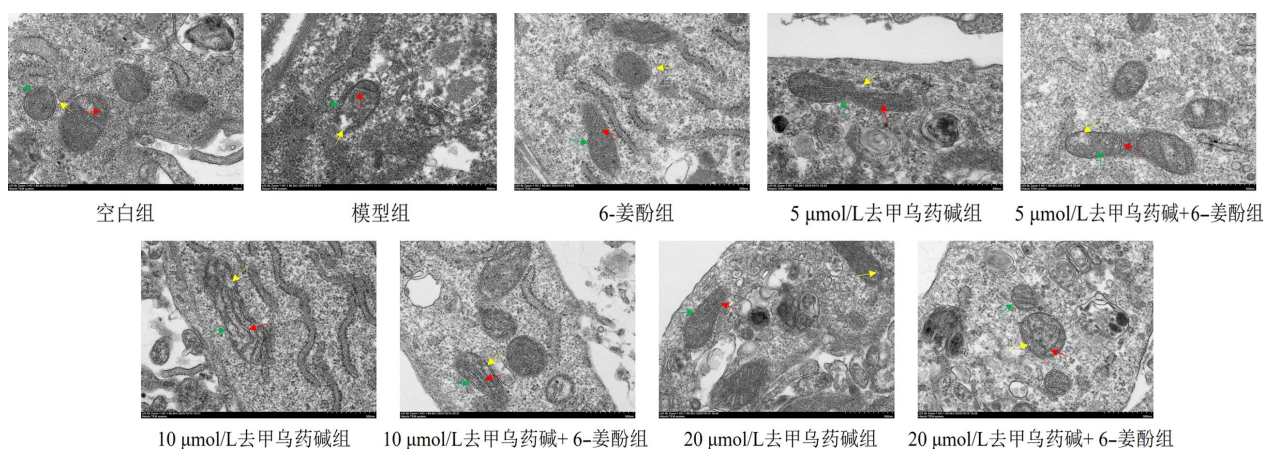


图 4 不同浓度去甲乌药碱配伍6-姜酚对模型细胞线粒体超微结构的影响($\times 25\ 000$)

Fig.4 Effects of different concentrations of higenamine combined with 6-gingerol on mitochondrial ultrastructure of model cells ($\times 25\ 000$)

注:红色箭头代表线粒体嵴形态,线粒体肿胀变形,嵴断裂且缺失;黄色箭头代表空泡化现象;绿色箭头代表线粒体膜肿胀情况,线粒体肿胀变形、呈空泡状,线粒体膜被破坏。

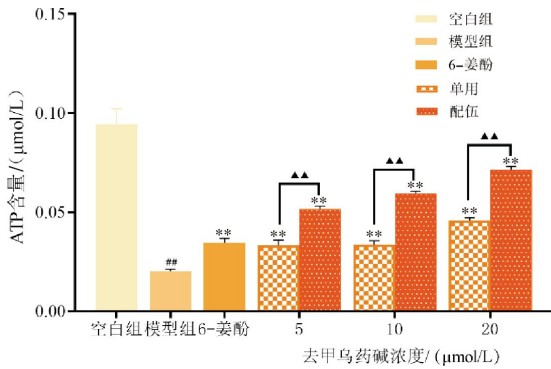


图 5 不同浓度去甲乌药碱配伍 6-姜酚对模型细胞 ATP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.5 Effects of different concentrations of higenamine combined with 6-gingerol on ATP content in model cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:与空白组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$;与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与对应浓度去甲乌药碱单用组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

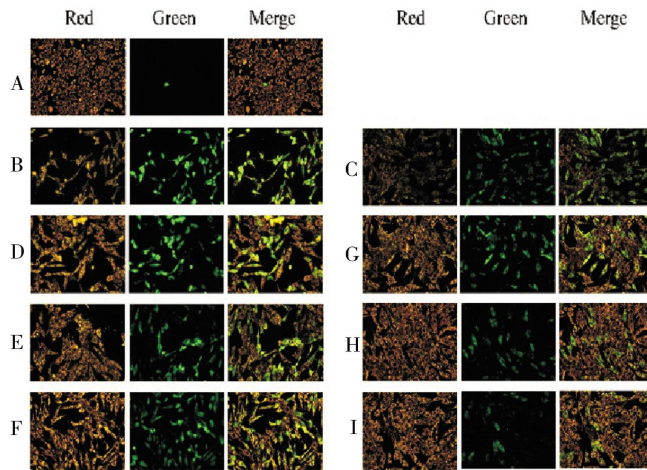
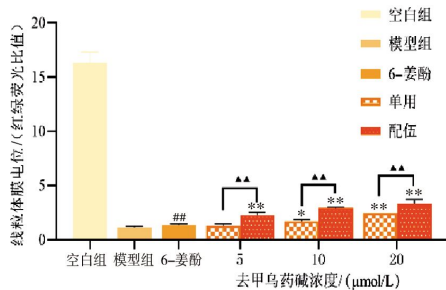


图 6 不同浓度去甲乌药碱配伍 6-姜酚对模型细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, $\times 100$)

Fig.6 Effects of different concentrations of higenamine combined with 6-gingerol on mitochondrial membrane potential in model cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, $\times 100$)

注:A.空白组;B.模型组;C.6-姜酚组;D.5 μmol/L 去甲乌药碱组;E.5 μmol/L 去甲乌药碱+20 μmol/L 6-姜酚组;F. 10 μmol/L 去甲乌药碱组;G.10 μmol/L 去甲乌药碱+20 μmol/L 6-姜酚组;H. 20 μmol/L 去甲乌药碱组;I.20 μmol/L 去甲乌药碱+20 μmol/L 6-姜酚组。与空白组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$;与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与对应浓度去甲乌药碱单用组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

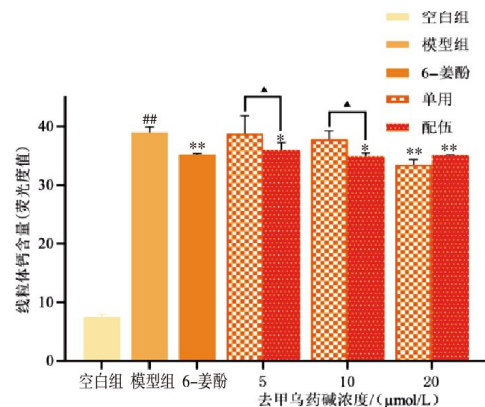
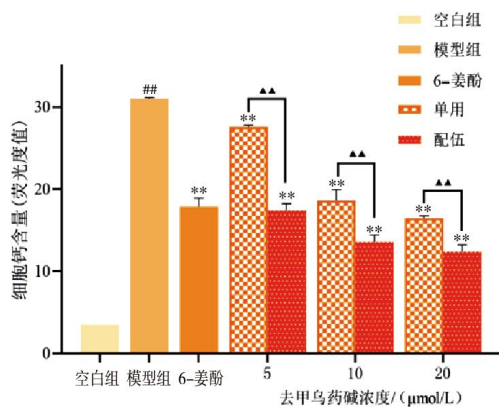


图 7 不同浓度去甲乌药碱配伍 6-姜酚对模型细胞细胞质内及线粒体内钙浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.7 Effects of different concentrations of higenamine combined with 6-gingerol on calcium concentration in cytoplasm and mitochondria in model cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

注:与空白组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$;与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与对应浓度去甲乌药碱单用组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

3.5 去甲乌药碱配伍 6-姜酚前后对模型细胞内线粒体膜电位的影响

与空白组比较,模型组线粒体膜电位降低 ($P<0.01$);与模型组比较,去甲乌药碱组可升高模型细胞线粒体膜电位 ($P<0.01$);与对应浓度去甲乌药碱单用组比较,去甲乌药碱配伍 6-姜酚组线粒体膜电位可进一步升高 ($P<0.01$)。详见图 6。

3.6 去甲乌药碱配伍 6-姜酚前后对模型细胞细胞质内及线粒体内钙浓度的影响

与空白组比较,模型组细胞质内及线粒体内钙浓度均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,去甲乌药碱组可降低模型细胞细胞质内及线粒体钙浓度 ($P<0.01$),与对应浓度去甲乌药碱单用组比较,去甲乌药碱配伍 6-姜酚组细胞质内及线粒体内钙浓度明显降低 ($P<0.01$)。详见图 7。

表 1 不同浓度去甲乌药碱配伍 6-姜酚对模型细胞线粒体 Ca²⁺转运相关 ATP 酶活性影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of different concentrations of higenamine combined with 6-gingerol on the activity of mitochondrial Ca²⁺ transport-related ATPase in model cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

项目	空白组	模型组	6-姜酚组	去甲乌头碱/(5 μmol/L)		去甲乌头碱/(10 μmol/L)		去甲乌头碱/(20 μmol/L)	
				单用组	配伍组	单用组	配伍组	单用组	配伍组
Ca ²⁺ -ATP 酶/(U/mgprot)	3.36±0.73	0.91±0.08 [#]	0.28±0.31 ^{**}	1.42±0.23 [*]	1.59±0.12 [*]	1.75±0.10 ^{**}	2.32±0.04 ^{**▲}	1.85±0.07 ^{**}	3.74±0.06 ^{**▲}
Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶/(U/mgprot)	5.67±0.46	2.55±0.22 [#]	2.88±0.12	3.89±0.24 ^{**}	4.69±0.21 ^{**▲}	4.99±0.16 ^{**}	5.35±0.12 ^{**▲}	4.64±0.15 ^{**}	5.24±0.30 ^{**▲}
Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶/(U/mgprot)	1.12±0.04	0.36±0.12 [#]	0.84±0.19 ^{**}	0.68±0.14 ^{**}	0.93±0.04 ^{**▲}	0.58±0.06 ^{**}	0.68±0.00 ^{**}	0.33±0.06	0.74±0.08 ^{**▲}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与对应浓度去甲乌药碱单用组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

3.7 去甲乌药碱配伍 6-姜酚前后对模型细胞线粒体内 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性的作用的影响

与空白组比较,模型组内 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性均降低($P<0.01$);与模型组比较,去甲乌药碱组可升高模型细胞 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性($P<0.01$);与对应浓度去甲乌药碱单用组比较,去甲乌药碱配伍 6-姜酚组 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性明显升高($P<0.01$)。详见表 1。

4 讨论

附子辛甘大热,为纯阳之品,入心、肾、脾经,走而不守,能通行十二经,为回阳救逆第一药;干姜辛而大热,归脾、肾、心、肺经,纯阳之味,守而不走,长于温中散寒。附子与干姜合用,具有协同作用,可使回阳救逆、温中散寒的功效大为增强^[15-16]。现代研究表明,附子-干姜配伍通过增强心肌收缩力、扩张冠脉、增加心肌血流量、改善微循环等,发挥抗心力衰竭作用^[17-18]。

氧化应激是心力衰竭的重要生理病理机制之一,主要是由于 ROS 蓄积导致机体或组织的氧化/抗氧化系统平衡破坏,通过多种途径介导细胞发生凋亡、自噬以及炎症的损伤,从而造成不可逆的心肌细胞损伤和心肌功能障碍^[19]。与此同时,氧化应激损害线粒体呼吸链,降低 ATP 生成;ROS 直接损伤线粒体 DNA 和蛋白质,进一步加剧细胞能量代谢障碍^[11]。本实验结果显示,单用去甲乌药碱及配伍 6-姜酚后,模型细胞线粒体膜相对完整、边界较清晰,嵴结构完整,空泡化情况较少,线粒体膜电位升高,且 ATP 含量上升,提示去甲乌药碱及配伍 6-姜酚均可缓解氧化应激,改善线粒体产能功能。

钙超载是指各种原因所致的钙浓度异常升高现象,正常情况下,线粒体通过钙单向转运体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)摄取钙离子,并通过钠钙交换体钠钙交换体(sodium calcium exchanger, NCX)排出钙离子,维持钙稳态。氧化应激所致的线粒体膜损伤,由于过度激活 MCU 和抑制 NCX,最终导致线粒体内钙超载。实验结果显示,去甲乌药碱配伍降低衰竭心肌细胞细胞质及线粒体内钙浓度,上述结果与之前报道一致^[4];配伍 6-姜酚,则可进一步增强去甲乌药碱缓解钙超载的作用。钙超载的发生与生物膜 ATP 相关转运酶活性降低、线粒体钙离子转运通道变化等有关。Na⁺-K⁺-ATP 酶位于细胞膜,维持质膜的电化学梯度,当细胞内钠浓度升高,激活 Na⁺/Ca²⁺交换器,将细胞内钙转运出胞外;Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶位于肌浆网,使肌浆网释放 Ca²⁺,泵出细胞外;Ca²⁺-ATP 酶位于细胞膜和线粒体膜上,负责将细胞内游离的 Ca²⁺转运至胞外或者摄入肌浆网内,二者均可维持细胞内低钙环境^[20-21]。实验显示,去甲乌药碱及与 6-姜酚合用均使模型细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性显著提高。去甲乌药碱可缓解钙超载,维持钙稳态,与增加 ATP 酶活性,促进细胞内 Ca²⁺转入肌浆网或转出至细胞外有关,配伍 6-姜酚可进一步缓解钙超载。

有学者指出,去甲乌药碱通过上调核转示因子红系 2 相关因子 2 的表达,激活抗氧化酶,进而保护心肌细胞免受氧化应激的损伤^[22];去甲乌药碱与 6-姜酚配伍通过上调过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ 共激活剂 α 的表达,来增强线粒体能量代谢^[8]。但两者配伍使用的协同作用及其具体机制不明。本实验研究结果证实,去甲乌药碱和 6-姜酚配伍后可增加线粒体膜电位和 ATP 的生成,提高 Na⁺-K⁺-ATP、Ca²⁺-

ATP 及 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性,降低细胞质内及线粒体内钙浓度,即通过增强抗氧化应激能力、恢复钙稳态改善衰竭心肌细胞功能;并首次在 H_2O_2 诱导的衰竭心肌细胞上发现,6-姜酚与去甲乌药碱在促进保护线粒体和促进线粒体能量代谢上具有协同增效作用。

本研究以中药附子和干姜中的活性成分去甲乌药碱与 6-姜酚配伍为对象,在细胞模型上阐释了附子“须”干姜,这一发现为附子-干姜药对的配伍提供了新的实验依据。去甲乌药碱与 6-姜酚作为中药的活性成分具有来源广泛的优点,本研究也为心力衰竭的治疗提供了新的药物组合策略。未来,可进一步研究该药对改善心力衰竭的具体机制,通过动物实验等验证其安全性和疗效。

参考文献

- [1] SAVARESE G, BECHER P M, LUND L H, et al. Global burden of heart failure: A comprehensive and updated review of epidemiology[J]. *Cardiovascular Research*, 2023, 118(17): 3272–3287.
- [2] ZHANG L, LU X H, WANG J B, et al. Zingiberis rhizoma mediated enhancement of the pharmacological effect of aconiti lateralis Radix praeparata against acute heart failure and the underlying biological mechanisms[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 96: 246–255.
- [3] 屈新亮, 段广靖, 赵 博, 等. 附子-干姜对大鼠急性心肌缺血的抗炎、抗氧化、抗凋亡保护作用及机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(3): 31–37.
- [4] WEN J X, LI M J, ZHANG W W, et al. Role of higenamine in heart diseases: A mini-review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 12: 798495.
- [5] WEN J X, ZHANG L, WANG J, et al. Therapeutic effects of higenamine combined with [6]-gingerol on chronic heart failure induced by doxorubicin via ameliorating mitochondrial function[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(7): 4036–4050.
- [6] 曾小曼, 陈泽江, 张腊喜, 等. 6-姜酚通过 Akt/GSK3- β 信号通路改善心肌缺血再灌注损伤的研究[J]. *国际老年医学杂志*, 2023, 44(3): 308–312.
- [7] MANSINGH D P, O J S, SALI V K, et al. [6]-Gingerol-induced cell cycle arrest, reactive oxygen species generation, and disruption of mitochondrial membrane potential are associated with apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2018, 32(10): e22206.
- [8] WEN J X, WANG J, LI P Y, et al. Protective effects of higenamine combined with [6]-gingerol against doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction and toxicity in H9c2 cells and potential mechanisms[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 115: 108881.
- [9] WU C N, ZHANG Z, ZHANG W D, et al. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial therapies in heart failure[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 175: 106038.
- [10] DRIDI H, SANTULLI G, BAHLOULI L, et al. Mitochondrial calcium overload plays a causal role in oxidative stress in the failing heart[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(9): 1409.
- [11] ZHOU B, TIAN R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(9): 3716–3726.
- [12] BALDERAS E, LEE S H J, RAI N K, et al. Mitochondrial calcium regulation of cardiac metabolism in health and disease[J]. *Physiology*, 2024, 39(5): 247–268.
- [13] 何 苗, 李耀伟, 王志琪, 等. 基于细胞线粒体能量代谢研究甘草次酸拮抗乌头碱的心肌毒性作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(11): 1650–1656.
- [14] 何 苗. 甘草次酸拮抗乌头碱心肌毒性的体外实验研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- [15] 赵婉璐, 潘 轶, 徐诗蕙, 等. 以附子、肉桂、干姜为例探讨走守配伍的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(12): 7240–7243.
- [16] 梁小雨, 石玉姣, 刘永成, 等. 附子药理作用机制及减毒增效技术的研究进展[J]. *环球中医药*, 2024, 17(7): 1428–1439.
- [17] 姜 波, 常晶晶, 张春蕾, 等. 附子心脏毒性及配伍减毒增效机制研究进展[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(6): 1346–1353.
- [18] 刘鑫旭, 吴嘉瑞, 张 丹, 等. 基于网络药理学的附子-干姜药对治疗心力衰竭的作用机制分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21): 212–219.
- [19] HU C X, ZHAO L F, WU D X, et al. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 120.
- [20] AIMO A, CASTIGLIONE V, BORRELLI C, et al. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies[J]. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2020, 27(5): 494–510.
- [21] YANG S S, LIAN G J. ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2020, 467(1/2): 1–12.
- [22] YANG S W, CHU S F, AI Q D, et al. Anti-inflammatory effects of higenamine (Hig) on LPS-activated mouse microglia (BV2) through NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 85: 106629.