

# 艾塞那肽改善缺氧复氧条件下心肌H9c2细胞线粒体功能的机制研究

常广磊\*, 刘 剑, 覃 数, 张冬颖\*(重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1350-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.16

**摘要** 目的:研究艾塞那肽改善缺氧复氧(H/R)条件下心肌H9c2细胞线粒体功能的机制。方法:体外培养H9c2细胞,分为空白对照组、药物对照(艾塞那肽200 nmol/L)组、模型(H/R)组、预处理(艾塞那肽200 nmol/L+H/R)组、胰高血糖素样肽1受体(GLP-1R)抑制剂[Exendin-(9-39)100 nmol/L+艾塞那肽200 nmol/L+H/R]组、环磷腺苷(cAMP)抑制剂(Rp-cAMPS 1 μmol/L+艾塞那肽200 nmol/L+H/R)组和蛋白激酶A(PKA)抑制剂(H-89 5 μmol/L+艾塞那肽200 nmol/L+H/R)组。除前2组外其余各组建立H/R模型,建模前30 min加入艾塞那肽,加入艾塞那肽前10 min加入相应的抑制剂。采用透射电镜观察线粒体形态结构,流式细胞术检测线粒体钙离子(Ca<sup>2+</sup>m)水平及线粒体膜电位(ΔΨm),酶标仪检测细胞三磷酸腺苷(ATP)水平。结果:与空白对照组比较,模型组细胞线粒体嵴肿胀增加,密度降低,呈空泡化;Ca<sup>2+</sup>m水平升高,ΔΨm和ATP水平降低(P<0.05)。与模型组比较,预处理组细胞线粒体嵴肿胀减轻,密度增加,空泡化程度减轻;Ca<sup>2+</sup>m水平降低,ΔΨm和ATP水平升高(P<0.05)。与预处理组比较,3种抑制剂组细胞Ca<sup>2+</sup>m水平升高,ΔΨm和ATP水平降低(P<0.05)。结论:艾塞那肽可减轻H/R条件下H9c2细胞线粒体钙超载,升高ΔΨm,增加ATP生成。其机制可能与激活GLP-1R/cAMP/PKA信号通路有关。

**关键词** 艾塞那肽;缺氧复氧;线粒体;胰高血糖素样肽1受体;环磷腺苷;蛋白激酶A

## Study on the Mechanism of Improvement Effects of Exenatide on Mitochondrial Function of H9c2 Cells under Hypoxia/reoxygenation Condition

CHANG Guanglei, LIU Jian, QIN Shu, ZHANG Dongying (Dept. of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the mechanism of improvement effects of exenatide on mitochondrial function of H9c2 cells under hypoxia/reoxygenation (H/R) condition. METHODS: H9c2 cells were cultured *in vitro* and were divided into blank control group, drug control group (exenatide 200 nmol/L), model group (H/R), pretreatment group (exenatide 200 nmol/L+H/R), glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) inhibitor [Exendin-(9-39)100 nmol/L+exenatide 200 nmol/L+H/R], cAMP inhibitor (Rp-cAMPS 1 μmol/L+exenatide 200 nmol/L+H/R) group and PKA inhibitor (H-89 5 μmol/L+exenatide 200 nmol/L+H/R) group. Except for first 2 groups, H/R model was established in other groups, and they were given exenatide 30 min before modeling and relevant inhibitor 10 min before giving exenatide. Morphology of mitochondria was observed by TEM, and mitochondrial calcium (Ca<sup>2+</sup>m) and the mitochondrial membrane potential (ΔΨm) were determined by flow cytometry. Cellular ATP content was measured by microplate reader. RESULTS: Compared with blank control group, mitochondrial cristae swelling was enhanced in model group, while density decreased, showing vacuolization; Ca<sup>2+</sup>m level increased while ΔΨm and ATP decreased (P<0.05). Compared with model group, mitochondrial cristae swelling relieved in pretreatment group, while density increased, showing vacuolization relieved; Ca<sup>2+</sup>m level decreased, while ΔΨm and ATP increased (P<0.05). Compared with pretreatment group, the levels of Ca<sup>2+</sup>m increased in 3 kinds of inhibitors group, while ΔΨm and ATP decreased (P<0.05). CONCLUSIONS: Exenatide attenuates H9c2 cell mitochondria Ca<sup>2+</sup>m accumulation, increases ΔΨm and ATP production. Which indicate its mechanism may be associated with activating GLP-1R/cAMP/PKA pathway.

**KEYWORDS** Exenatide; Hypoxia/reoxygenation; Mitochondria; Glucagon-like peptide-1 receptor; Adenosine cyclophosphate; PKA

胰高血糖素样肽1(Glucagon-like peptide-1, GLP-1)是由肠内分泌细胞(L细胞)分泌的肠促胰素,与GLP-1受体(GLP-1 receptor, GLP-1R)结合后发挥降糖作用<sup>[1]</sup>。GLP-1R已被证实存在于胰、心、肾等器官上有表达<sup>[2]</sup>,其多重组织的分布特点决定了GLP-1广泛而复杂的生理功能。但GLP-1半衰期较短

(1~2 min),使其临床应用受限。艾塞那肽(Exenatide)是GLP-1类似物,半衰期为3.5~4 h,临床上已用于2型糖尿病的治疗<sup>[3]</sup>。笔者前期研究发现,艾塞那肽对缺氧复氧(Hypoxia/reoxygenation, H/R)条件下心肌H9c2细胞的线粒体功能具有保护作用<sup>[4]</sup>,但艾塞那肽发挥上述保护作用的机制尚不清楚。研究发现,GLP-1及其类似物可通过结合GLP-1R激活环磷腺苷(cAMP)/蛋白激酶A(PKA)信号转导通路而发挥心血管保护作用<sup>[5]</sup>。本研究以H9c2细胞为研究对象,建立H/R模型模拟体内缺血再灌注环境,进一步探讨GLP-1R/cAMP/PKA信号通路

\* 医师,博士。研究方向:心力衰竭机制。电话:023-89011514。E-mail:224141205@qq.com

# 通信作者:副主任医师,博士。研究方向:心力衰竭机制。电话:023-89011514。E-mail:zdy.chris@gmail.com

是否参与了艾塞那肽对H/R条件下线粒体功能的改善。

## 1 材料

### 1.1 仪器

37 °C细胞培养箱和缺氧复氧箱(美国 Thermo Forma 公司);超净工作台(中国安泰公司);多功能酶标仪(美国 MD 公司);流式细胞仪(美国 Beckman 公司);透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

### 1.2 药品与试剂

DMEM/F12培养基和胎牛血清(美国 HyClone 公司);艾塞那肽注射液(美国 Baxter Pharmaceutical Solutions 公司,批号:A844388;规格:每支10 g);GLP-1R抑制剂 Exendin-(9-39)(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:051M4796V,纯度:≥95%);cAMP抑制剂 Rp-cAMPS(批号:151837-09-1,纯度:≥98%)和 Rhod-2 AM 荧光探针(批号:129787-64-0,纯度:≥90%)均购自美国 Santa Cruz 公司;PKA 抑制剂 H-89(批号:S1643,纯度:≥98%)、三磷酸腺苷(ATP)测试试剂盒(批号:S0026)、JC-1 荧光探针(批号:C2006)和二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010S)均购自江苏碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 细胞

心肌 H9c2 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养与模型建立

取 H9c2 细胞接种于细胞培养皿中,用含 10% 胎牛血清(FBS)、青霉素(100 μg/ml)和链霉素(100 μg/ml)的 DMEM/F12 培养基,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内培养。H9c2 细胞接种至细胞培养瓶或培养皿中,细胞长至 70%~80% 时用无血清 DMEM/F12 培养基洗 3 次,加入 4 ml 无血清 DMEM/F12 培养基培养 24 h,再次换 4 ml 无血清 DMEM/F12 培养基,放入 37 °C 缺氧箱(1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>)中,缺氧培养 12 h 后换含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液,放入 37 °C 正常细胞培养箱,复氧培养 4 h,建立 H/R 模型。

### 2.2 分组与给药

取 H9c2 细胞按 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板,细胞密度达 80%~90% 后用于试验。试验分为 7 组,分别为①空白对照组:正常细胞培养液培养 16 h;②药物对照组:正常细胞培养液中加入艾塞那肽(200 nmol/L)培养 16 h;③模型组:H9c2 细胞按“2.1”项下方法建立 H/R 模型;④预处理组:艾塞那肽(200 nmol/L)预处理 H9c2 细胞 30 min 后,建立 H/R 模型;⑤GLP-1R 抑制剂组:加入艾塞那肽(200 nmol/L)之前 10 min,加入 Exendin-(9-39) (100 nmol/L),其余同预处理组;⑥cAMP 抑制剂组:加入艾塞那肽(200 nmol/L)之前 10 min,加入 Rp-cAMPS (1 μmol/L),其余同预处理组;⑦PKA 抑制剂组:加入艾塞那肽(200 nmol/L)之前 10 min,加入 H-89 (5 μmol/L),其余同预处理组。

### 2.3 透射电镜检测 H9c2 细胞线粒体形态结构

H9c2 细胞接种至无菌细胞培养瓶中,按 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板,细胞密度达 80%~90% 时,按“2.2”项下方法分组给药,培养 16 h,用无血清 DMEM/F12 洗涤 3 次,收集细胞;加入 2.5% 戊二醛,固定细胞 2 h,加入 1% 四氧化锇,固定细胞 15 min,室温脱水,包埋,过夜,固化,切片,醋酸铅染色后自然干燥,柠檬酸铅染色;晾干后透射电镜观察空白对照组、药物对照组、模型组和预处理组细胞线粒体形态结构。

### 2.4 流式细胞术检测线粒体内钙离子水平

Rhod-2 AM 是检测线粒体内钙离子(Ca<sup>2+</sup>m)的常用荧光探针,其可特异地透过线粒体膜与 Ca<sup>2+</sup>m 结合,产生红色荧光,检测 Rhod-2 AM 的荧光即可反映线粒体内 Ca<sup>2+</sup>m 水平。心肌 H9c2 细胞按 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板,按“2.2”项下方法分组给

药后,培养 16 h,用无血清 DMEM/F12 洗涤 3 次,常规胰酶消化,收集细胞,加入用二甲亚砜(DMSO)配制的 Rhod-2AM (2 μmol/L)探针,37 °C 恒温孵育箱中孵育 30 min;再用无血清 DMEM/F12 洗涤 3 次,加入 500 μl 无血清 DMEM/F12 重悬,避光送检。流式细胞仪检测各组细胞平均荧光强度,激发波长 543 nm,发射波长 560 nm,每组试验重复 3 次。

### 2.5 流式细胞术检测线粒体膜电位(ΔΨm)

JC-1 是用于检测 ΔΨm 的荧光探针。在 ΔΨm 较高时,JC-1 在线粒体的基质中聚集形成 J-aggregates 聚合物,产生红色荧光;在 ΔΨm 较低时,JC-1 不能聚集,形成 J-monomer 单体,产生绿色荧光。通过检测荧光颜色的变化,以红绿荧光的相对比值来衡量线粒体 ΔΨm 的变化。心肌 H9c2 细胞按 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板,按“2.2”项下方法分组给药后,培养 16 h,用无血清 DMEM/F12 洗涤 3 次,常规胰酶消化,收集细胞,加入用 DMSO 配制的 JC-1 (10 μg/ml)探针,37 °C 恒温孵育箱中孵育 20 min;再用无血清 DMEM/F12 洗涤 3 次,加入 500 μl 无血清 DMEM/F12 重悬,避光送检。流式细胞仪检测各组细胞内荧光强度,单体(绿色荧光):激发波长 488 nm、发射波长 525 nm,聚合物(红色荧光):激发波长 543 nm、发射波长 560 nm;计算红绿荧光的相对比值,每组试验重复 3 次。

### 2.6 ATP 检测试剂盒检测 H9c2 细胞 ATP 水平

心肌 H9c2 细胞按 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板,按“2.2”项下方法分组给药后,培养 16 h,用无血清 DMEM/F12 洗涤 3 次,常规胰酶消化,收集细胞,按 ATP 测试试剂盒说明书步骤检测各组细胞中 ATP 水平,ATP 水平以 nmol/mg protein 形式表示。为了消除样品制备时因蛋白量差异而造成的误差,以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品中的蛋白浓度。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 线粒体形态结构变化

与空白对照组比较,药物对照组 H9c2 细胞线粒体形态结构无明显变化;模型组 H9c2 细胞线粒体嵴肿胀,嵴肿胀结构紊乱,空泡化,密度减低。与模型组比较,预处理组 H9c2 细胞线粒体嵴肿胀减轻,排列较整齐,空泡化程度明显减少,提示艾塞那肽可减轻 H/R 诱导的线粒体形态结构损伤。H9c2 细胞线粒体形态结构的透射电镜图见图 1。

### 3.2 Ca<sup>2+</sup>m 水平变化

与空白对照组比较,模型组 H9c2 细胞 Ca<sup>2+</sup>m 水平增加 (*P* < 0.05);与模型组比较,预处理组 H9c2 细胞 Ca<sup>2+</sup>m 水平减少 (*P* < 0.05);与预处理组比较,3 种抑制剂组 H9c2 细胞 Ca<sup>2+</sup>m 水平增加 (*P* < 0.05)。上述结果提示,艾塞那肽可降低 H/R 条件下 H9c2 细胞 Ca<sup>2+</sup>m 水平,其机制可能与激活 GLP-1R/cAMP/PKA 信号通路有关。各组 H9c2 细胞 Ca<sup>2+</sup>m 水平的测定结果见表 1。

### 3.3 ΔΨm 变化

与空白对照组比较,模型组 H9c2 细胞 ΔΨm 减小 (*P* < 0.05);与模型组比较,预处理组 H9c2 细胞 ΔΨm 增加 (*P* < 0.05);与预处理组比较,3 种抑制剂组 H9c2 细胞 ΔΨm 减小 (*P* < 0.05)。上述结果提示,艾塞那肽可升高 H/R 条件下 H9c2 心肌细胞的 ΔΨm,其机制可能与激活 GLP-1R/cAMP/PKA 信号通路有关。各组 H9c2 细胞 ΔΨm 水平的测定结果见表 1。

### 3.4 细胞 ATP 水平变化

与空白对照组比较,模型组 H9c2 细胞 ATP 水平降低 (*P* < 0.05);与模型组比较,预处理组 H9c2 细胞 ATP 水平升高 (*P* <

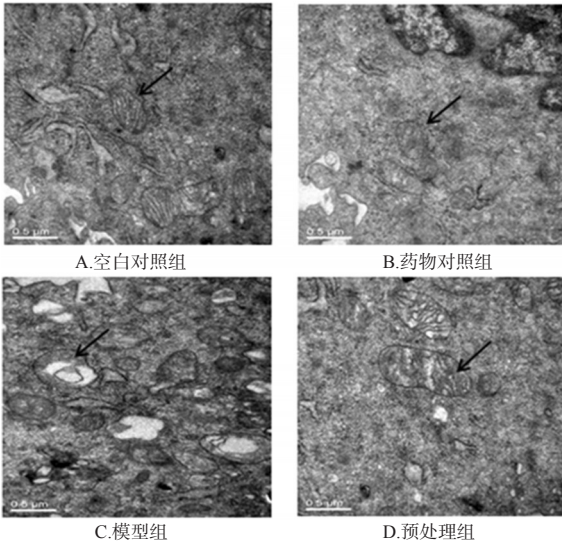


图1 各组H9c2细胞线粒体形态结构的透射电镜图( $\times 30\ 000$ )  
Fig 1 TEM of the structure of H9c2 cellular mitochondria in each group( $\times 30\ 000$ )

表1 各组H9c2细胞 $Ca^{2+}_m$ 、 $\Delta\Psi_m$ 及ATP水平的测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Results of the levels of  $Ca^{2+}_m$ ,  $\Delta\Psi_m$  and ATP in H9c2 cells of each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	$Ca^{2+}_m$	$\Delta\Psi_m$	ATP, nmol/mg protein
空白对照组	3	85.85 $\pm$ 4.91	1.97 $\pm$ 0.03	12.25 $\pm$ 3.12
药物对照组	3	89.06 $\pm$ 3.09	1.96 $\pm$ 0.02	12.03 $\pm$ 2.41
模型组	3	148.48 $\pm$ 5.93*	0.60 $\pm$ 0.09*	3.49 $\pm$ 0.54*
预处理组	3	117.91 $\pm$ 2.82 <sup>#</sup>	1.10 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	7.04 $\pm$ 0.98 <sup>#</sup>
GLP-1R抑制剂组	3	153.24 $\pm$ 8.97 <sup>Δ</sup>	0.53 $\pm$ 0.14 <sup>Δ</sup>	3.76 $\pm$ 1.77 <sup>Δ</sup>
cAMP抑制剂组	3	144.45 $\pm$ 11.24 <sup>Δ</sup>	0.52 $\pm$ 0.12 <sup>Δ</sup>	3.84 $\pm$ 1.27 <sup>Δ</sup>
PKA抑制剂组	3	145.45 $\pm$ 9.39 <sup>Δ</sup>	0.61 $\pm$ 0.12 <sup>Δ</sup>	3.66 $\pm$ 0.90 <sup>Δ</sup>

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与预处理组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; vs. pretreatment group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

0.05);与预处理组比较,3种抑制剂组H9c2细胞ATP水平降低( $P < 0.05$ )。上述结果提示,艾塞那肽可升高H/R条件下H9c2细胞ATP水平,其机制可能与激活GLP-1R/cAMP/PKA信号通路有关。各组H9c2细胞ATP水平的测定结果见表1。

#### 4 讨论

线粒体功能障碍在心肌缺血再灌注损伤中起着非常关键的作用<sup>[6]</sup>。因此,探索与之相关的药物治疗是心肌缺血再灌注损伤治疗策略的研究焦点。cAMP/PKA信号转导途径在调节细胞能量代谢如葡萄糖转运和利用、线粒体功能等方面发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。鉴于cAMP/PKA信号转导通路在细胞能量中的重要作用,同时其亦参与了GLP-1及类似物对心血管的保护,笔者推测该信号通路在艾塞那肽改善H/R条件下H9c2细胞线粒体功能的作用中起着重要的调节作用。因此,本研究选择GLP-1R/cAMP/PKA信号转导通路相应抑制剂作为干预手段,拟通过观察相应抑制剂干预后线粒体功能指标的变化,进一步阐明艾塞那肽改善H/R条件下H9c2细胞线粒体功能的机制。

本研究首先采用透射电镜观察了不同条件下线粒体结构变化。结果发现,H/R可导致H9c2细胞线粒体嵴肿胀,嵴肿胀结构紊乱,空泡化,密度减低;而给予艾塞那肽预处理后H9c2细胞线粒体嵴肿胀减轻,排列较整齐,空泡化程度明显减少。

这提示艾塞那肽可减轻H/R诱导的形态结构损伤,维持H/R条件下线粒体形态结构,从而改善线粒体功能。

既往研究显示,心肌缺血再灌注时,由于组织氧灌注恢复,将引起剧烈的线粒体氧化应激,持续的线粒体氧化应激将导致线粒体功能障碍,表现为线粒体内钙超载<sup>[8]</sup>、 $\Delta\Psi_m$ 降低<sup>[9-10]</sup>。本试验研究发现,H/R可导致H9c2细胞 $Ca^{2+}_m$ 聚集使线粒体钙超载;而给予艾塞那肽预处理后,可减轻H/R条件下 $Ca^{2+}_m$ 聚集,提示艾塞那肽可通过抑制线粒体钙超载来改善H/R条件下线粒体功能。而给予GLP-1R抑制剂、cAMP抑制剂及PKA抑制剂干预后,抑制了艾塞那肽减轻H/R条件下H9c2细胞线粒体钙超载的作用。这提示艾塞那肽可能通过激活GLP-1R/cAMP/PKA信号通路来抑制H/R诱导的H9c2细胞线粒体钙超载。

$\Delta\Psi_m$ 降低在缺血再灌注诱导的线粒体损伤中起着关键作用。H/R条件下,细胞内活性氧生成增加,钙超载以及伴随的腺嘌呤核苷酸的消耗,都将促使 $\Delta\Psi_m$ 降低。本研究通过流式细胞术观察发现,H/R不仅导致线粒体钙超载,而且导致 $\Delta\Psi_m$ 降低;而给予艾塞那肽预处理后,艾塞那肽可抑制H/R诱导的 $\Delta\Psi_m$ 降低。上述结果说明,艾塞那肽可通过抑制 $\Delta\Psi_m$ 降低来改善H/R条件下线粒体功能。而给予GLP-1R抑制剂、cAMP抑制剂及PKA抑制剂干预后,阻滞了艾塞那肽抑制H/R条件下H9c2心肌细胞 $\Delta\Psi_m$ 降低的作用。这提示艾塞那肽可能通过激活GLP-1R/cAMP/PKA信号通路来抑制H/R诱导的H9c2心肌细胞 $\Delta\Psi_m$ 降低。

线粒体膜转换孔开放使线粒体内膜对质子通透性增加,导致电子呼吸链解偶联和 $\Delta\Psi_m$ 降低,从而导致线粒体ATP生成障碍。本研究结果显示,H/R可导致H9c2细胞ATP生成减少;给予艾塞那肽干预后,H/R条件下H9c2细胞ATP生成增加,进一步提示艾塞那肽可改善H/R条件下线粒体功能。而给予GLP-1R抑制剂、cAMP抑制剂及PKA抑制剂干预后,抑制了艾塞那肽增加H/R条件下H9c2细胞ATP生成的作用。这提示艾塞那肽可能通过激活GLP-1R/cAMP/PKA信号通路来抑制H/R诱导的心肌H9c2细胞ATP水平降低。

综上所述,H/R条件下,艾塞那肽可抑制H9c2细胞线粒体钙超载、升高 $\Delta\Psi_m$ 、增加ATP生成,其机制可能与其激活GLP-1R/cAMP/PKA信号通路有关。

#### 参考文献

- [1] 彭霄霞,徐康康.胰高血糖素样肽-1类似物利拉鲁肽治疗2型糖尿病的机制与临床评价[J].中国药房,2011,22(22):2 083.
- [2] 庾辉,叶林,张冬颖,等.艾塞那肽预处理对过氧化氢损伤的H9c2心肌细胞的保护作用研究[J].中国药房,2012,23(21):1 972.
- [3] Garber AJ. Novel GLP-1 receptor agonists for diabetes[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(1): 45.
- [4] Chang GL, Zhang DY, Liu J, et al. Exenatide protects against hypoxia/ reoxygenation-induced apoptosis by improving mitochondrial function in H9c2 cells[J]. *Exp Biol Med*: Maywood, 2014, 239(4): 414.
- [5] Wang D, Luo P, Wang Y, et al. Glucagon-like peptide-1 protects against cardiac microvascular injury in diabetes via a cAMP/PKA/Rho-dependent mechanism[J]. *Diabetes*, 2013, 62(5): 1 697.
- [6] Boengler K, Heusch G, Schulz R. Mitochondria in post-conditioning[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(5): 863.

# 千年健挥发油对佐剂性关节炎模型大鼠的药效作用及其机制研究

胡远<sup>1\*</sup>, 李晋奇<sup>1,2#</sup>, 张舒涵<sup>2</sup>, 何丹<sup>2</sup>(1.四川省医学科学院/四川省人民医院, 成都 610072; 2.电子科技大学医学院, 成都 610054)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1353-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.17

**摘要** 目的:研究千年健挥发油对佐剂性关节炎(AA)大鼠的药效作用及其机制。方法:取60只大鼠随机分为正常对照(0.5%聚山梨酯80)组、模型对照(0.5%聚山梨酯80)组、阳性对照(雷公藤多苷片, 10 mg/kg)组和千年健挥发油高、中、低剂量(0.08、0.04、0.02 ml/kg)组,除正常对照组外,其余各组大鼠均于右后足跖部ih完全弗氏佐剂复制大鼠AA模型,造模当日开始连续ig给药25 d,每天1次。检测大鼠足关节肿胀度、免疫器官(胸腺、脾脏)脏器指数、组织病理学变化以及血清中白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量。结果:与正常对照组比较,模型对照组大鼠原发性和继发性关节肿胀度、胸腺指数升高,脾脏指数降低,血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );足关节可见明显组织肿胀,大量中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞浸润关节周围组织,滑膜细胞增生,呈明显关节炎性病变。与模型对照组比较,千年健挥发油各剂量组大鼠原发性和继发性关节肿胀度降低、血清中IL-1 $\beta$ 含量减少,千年健挥发油中、低剂量组大鼠胸腺指数升高,千年健挥发油高剂量组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 含量减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );各给药组大鼠关节周围组织炎性细胞浸润减轻,关节滑膜细胞增生不明显,形态得到改善。结论:千年健挥发油对AA大鼠有一定的药效作用,其机制可能与减少血清中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量有关。

**关键词** 千年健;挥发油;佐剂性关节炎;药效作用;白细胞介素1 $\beta$ ;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;大鼠

## Pharmacodynamic Effects of Volatile Oil from *Homalomena occulta* on Adjuvant-induced Arthritis Model Rats and Its Mechanism Study

HU Yuan<sup>1</sup>, LI Jinqi<sup>1,2</sup>, ZHANG Shuhan<sup>2</sup>, HE Dan<sup>2</sup>(1.Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 2.School of Medicine of UESTC, Chengdu 610054, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the pharmacodynamic effects of volatile oil from *Homalomena occulta* on adjuvant-induced arthritis (AA) model rats and its mechanism. METHODS: 60 rats were randomly divided into normal control group (0.5% polysorbate 80), model control group (0.5% polysorbate 80), positive control group (Tripterygium glycosides tablets, 10 mg/kg), high-dose, middle-dose and low-dose (0.08, 0.04 and 0.02 ml/kg) groups of volatile oil from *H. occulta*. Except for normal control group, other groups were given complete Freund's adjuvant subcutaneously via right rear foot plantar to induce AA model, and given relevant medicine intragastrically for 25 days, once a day, since modeling. The articular swelling degree, immune organ (thymus gland and spleen) index, pathological change, the contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum were detected. RESULTS: Compared with normal control group, the primary and secondary articular swelling degree and thymus gland index of rats and the serum contents of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  increased in model control group, while spleen index decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); obvious tissue swelling, large amount of neutrophile granulocyte, leukomonocyte and macrophage infiltrating joint surrounding tissue, the proliferation of synovial cells and obvious osteoarthritic lesion were observed in podarthrum. Compared with model control group, the primary and secondary articular swelling degree and the serum content of IL-1 $\beta$  decreased in the volatile oil from *H. occulta* groups; thymus gland index increased in middle-dose and low-dose groups of the volatile oil from *H. occulta*; the content of TNF- $\alpha$  decreased in high-dose group of the volatile oil from *H. occulta* ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The inflammatory cell infiltration of joint surrounding tissue relieved in treatment groups, synovial cells proliferation was not obvious and synovial cells morphology was improved. CONCLUSIONS: The volatile oil from *H. occulta* has the pharmacodynamic effects on AA in rat, and its mechanism might be related to the serum content reduction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

**KEYWORDS** *Homalomena occulta*; Volatile oil; Adjuvant-induced arthritis; Pharmacodynamic effect; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ ; Rat

[7] Valsecchi F, Ramos-Espiritu LS, Buck J, et al. cAMP and mitochondria[J]. *Physiology*: Bethesda, 2013, 28(3): 199.

[8] Shintani-Ishida K, Inui M, Yoshida K. Ischemia-reperfusion induces myocardial infarction through mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(2): 233.

\* 主管药师。研究方向:中药药理与制剂。电话:028-87394757。E-mail: 18980003565@163.com

# 通信作者:副研究员,博士。研究方向:药理毒理学与药物开发。电话:028-87394757。E-mail: lijinqi2002@126.com

[9] Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, et al. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(2): 841.

[10] Hoshovs'ka IuV, Shymans'ka TV, Rudyk OV, et al. Mitochondria permeability transition as a target for ischemic preconditioning[J]. *Fiziol Zh*, 2011, 57(4): 111.

(收稿日期:2015-07-04 修回日期:2015-09-15)

(编辑:邹丽娟)