

# 黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的大鼠原代心肌细胞损伤的抗凋亡作用

武梦玲<sup>1</sup>, 宋耀鸿<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 南京中医药大学第三附属医院, 南京 210001)

**[摘要]** 目的:研究黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的 SD 大鼠乳鼠原代心肌细胞损伤的抗凋亡作用,并探讨相关的作用机制。方法:利用酶解法和差速贴壁方法从出生 1~3 d 的正常 SD 大鼠的乳鼠心脏中分离得到原代心肌细胞,种于 24 孔板,体外培养 48 h 后,设置空白组、模型组、美托洛尔组及黄芪甲苷低、中、高剂量组。预先给予各组对心肌细胞有害的儿茶酚胺类物质异丙肾上腺素(ISO),造成体外原代心肌细胞损伤模型,空白组心肌细胞不加 ISO;30 min 后予各治疗组相应浓度的美托洛尔( $2.336 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )及黄芪甲苷低、中、高剂量( $3, 10, 30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。BCA 法检测总蛋白含量,蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测原代心肌细胞的 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关蛋白 X(Bax)及 Bcl-2 相关 k 蛋白(Bak)的表达,流式细胞学检测各组细胞的凋亡率,Hochest/PI 双染法镜下观察各组细胞细胞核的形态,从而检测细胞的凋亡情况。结果:与空白组比较,各给药组( $10 \sim 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )原代心肌细胞的活力上调( $P < 0.05$ );HOCHEST/PI 双染结果显示,与模型组比较,美托洛尔组及黄芪甲苷中、高剂量亮蓝色凋亡细胞明显减少;细胞流式结果显示,与模型组比较,美托洛尔组凋亡率下调( $P < 0.01$ ),黄芪甲苷中剂量组凋亡率下调( $P < 0.05$ ),黄芪甲苷高剂量组凋亡率下调( $P < 0.01$ );Bcl-2 灰度值结果显示,与模型组比较,美托洛尔组 Bcl-2 的表达上调( $P < 0.01$ ),黄芪甲苷低剂量组 Bcl-2 表达上调( $P < 0.05$ ),黄芪甲苷中、高剂量组 Bcl-2 表达上调( $P < 0.01$ );Bak 灰度值结果显示,与模型组比较,美托洛尔组 Bak 的表达下调( $P < 0.05$ ),黄芪甲苷高剂量组 Bak 表达下调( $P < 0.05$ );Bax 灰度值结果显示,与模型组比较,美托洛尔组 Bax 的表达下调( $P < 0.01$ ),黄芪甲苷高剂量组 Bax 表达下调( $P < 0.05$ )。结论:黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的大鼠原代心肌细胞损伤有抗凋亡作用。

**[关键词]** 黄芪甲苷; 异丙肾上腺素; 美托洛尔; 原代心肌细胞; 凋亡

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0137-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181035

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1022.011.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-09 10:50

## Anti-apoptosis Effect of Astragaloside on Isoproterenol-induced Rat Primary Cardiomyocytes

WU Meng-ling<sup>1</sup>, SONG Yao-hong<sup>2\*</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. The Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the anti-apoptosis effect of astragaloside IV on isoproterenol-induced rat primary myocardial cell injury. **Method:** Enzymatic lysis and differential velocity adherent technique were used to isolate primary myocardial cells from postnatal heart of 1-3-day-old normal SD rats, inoculate them in 24 aperture planks and cultured for 48 h *in vitro*. Normal group, model group, metoprolol group and low, medium and high-dose astragaloside IV groups were set up. Isoprenaline (ISO) was given to cause heart failure *in vitro*, except for

**[收稿日期]** 20171128(022)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273716);南京市科技计划项目(201201067);江苏省“六大人才高峰”项目(2015-WSN-067)

**[第一作者]** 武梦玲,在读硕士,从事心血管方面研究,E-mail:329745043@qq.com

**[通信作者]** \*宋耀鸿,博士,副主任医师,从事心血管方面研究,E-mail:temantichf@126.com

normal group. After 30 min, the corresponding concentrations of metoprolol ( $2.336 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and astragaloside IV (low dose  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , middle dose  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , high dose  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were given to the treatment groups. The total protein content was determined with BCA method, the expressions of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and Bcl-2 associated K protein (Bak) in primary cardiomyocytes were detected by Western blot, the apoptosis rate in each group was detected by flow cytometry, and the cell nuclei in each group was observed by Hoechst/PI double staining method. **Result:** Compared with the control group, the vitality of the primary cardiomyocytes in each administration group ( $10\text{-}40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was up-regulated ( $P < 0.05$ ). Hoechst-PI double staining showed that compared with the model group, metoprolol group, and middle and high-dose astragaloside IV group showed decreases in apoptotic bright blue cells. Flow cytometry showed that compared with the model group, the apoptosis rate of metoprolol group was down-regulated ( $P < 0.01$ ), and the apoptosis rate of medium-dose astragaloside IV group was down-regulated ( $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate of high-dose astragaloside IV group was down-regulated ( $P < 0.01$ ). The gray value of Bcl-2 results showed that compared with model group, the expression of Bcl-2 in the metoprolol group was increased ( $P < 0.01$ ), the expression of Bcl-2 was increased in astragaloside IV group ( $P < 0.05$ ), and the expression of Bcl-2 was increased in high-dose astragaloside IV group ( $P < 0.01$ ). The gray value of Bak showed that compared with model group, the expression of Bak in the metoprolol group was down-regulated ( $P < 0.05$ ), and the expression of Bak in high-dose astragaloside IV group was down-regulated ( $P < 0.05$ ). The gray value Bax showed that compared with model group, the expression of Bax in the metoprolol group was down-regulated ( $P < 0.01$ ), and the expression of Bax in high-dose astragaloside IV group was down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Astragaloside IV has the anti-apoptosis effect on the injury of isoproterenol-induced rat primary cardiomyocytes.

[**Key words**] astragaloside IV; isoproterenol; metoprolol; primary cardiomyocyte; apoptosis

黄芪,又名绵黄芪、箭芪、口芪,始载于《神农本草经》,原作黄耆。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分<sup>[1]</sup>,中药药理学认为黄芪保护心肌细胞及其抗病毒性心肌炎的作用机制涉及<sup>[2]</sup>,抑制病毒 RNA 复制;降低细胞内游离钙浓度,减轻钙超载;调控病毒性心肌炎心肌组织的脂肪酸合酶(Fas), FasL, B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)等相关凋亡基因转录,减少心肌细胞凋亡和损伤;减轻细胞因子介导的心肌损害。《中国心血管病报 2016》概要指出<sup>[3]</sup>,心血管病死亡率仍居城乡居民总死亡的首位,这表明了笔者未来将面对严峻的挑战及形势,其防治成为研究的重要课题。黄芪甲苷作为中药黄芪的有效成分之一,具有抗炎抗病毒、抗氧化及保护组织器官等广泛的药理作用<sup>[4-5]</sup>。研究表明黄芪甲苷可以抑制慢性心衰大鼠心肌纤维化,其机制可能是通过上调长链脂酰辅酶 A 脱氢酶(LCAD),下调 6-磷酸果糖激酶 1(PFK1),纠正能量代谢异常实现的<sup>[6]</sup>,可上调低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )表达<sup>[7]</sup>,通过抑制内质网应激(ERS)保护大鼠缺血/再灌注心脏<sup>[8]</sup>,通过葡萄糖调节蛋白 78 (GRP 78),葡萄糖调节蛋白 94 (GRP 94),肌醇需求酶 1 (IRE1)抑制内质网应激进而阻止线粒体通透性转化孔(mPTP)开放而发挥心

肌细胞线粒体保护作用<sup>[9]</sup>,黄芪甲苷还可通过作用于 Toll 样受体 4/p38 蛋白激酶(TLR4/p38 MAPK)信号通路有效改善由脂多糖导致的心肌损伤<sup>[10]</sup>。此外,黄芪甲苷对 H9C2 心肌细胞损伤具有保护作用,其机制可能与其通过维生素 D 轴调节 VDR 基因表达水平有关<sup>[11]</sup>。

与细胞系比较,原代心肌细胞的形态及电生理方面更接近在体细胞,同时可不受神经、内分泌等因素的干扰,能够更直接的观察心肌细胞对不同药物和干预措施的反应,故而,笔者选择建立体外培养 SD 大鼠乳鼠原代心肌细胞体系进行实验研究。异丙肾上腺素(ISO)是 $\beta$ 受体激动剂,可以兴奋心脏,使心率加快、心肌耗氧量增加,造成心肌缺血、坏死等严重的后果,这与线粒体能量代谢紊乱及细胞凋亡等有关<sup>[12]</sup>。利用 ISO 诱导心肌细胞的损伤可引起心肌细胞肥大,同时可以引起心肌细胞能量代谢的紊乱,导致细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。故而,本研究选用高浓度的 $\beta$ 受体激动剂异丙肾上腺素建立体外培养原代心肌细胞损伤模型。因此,本实验通过检测黄芪甲苷干预 ISO 诱导的 SD 大鼠乳鼠原代心肌细胞损伤的凋亡相关指标来探讨黄芪甲苷对损伤心肌细胞的抗凋亡作用,从心肌细胞凋亡的角度探究黄芪甲

苷是否对异丙肾上腺素诱导的大鼠原代心肌细胞损伤有抗凋亡作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 实验用成年 SD 大鼠作为种鼠, SPF 级, 雌雄均有, 体质量( $270 \pm 20$ ) g, 共计 10 只。由上海思捷实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK(沪) 2013-0006。出生 1~3 d 的正常 SD 大鼠的乳鼠, 用于提取原代心肌细胞。实验研究取得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 ACU160908)。

**1.2 药物及试剂** 黄芪甲苷(astragaloside IV)(纯度  $\geq 98\%$ , 源叶生物公司, 批号 JA0815TA14); ISO [梯希爱(上海)化成工业发展有限公司, 批号 M15VB-DI]; 琥珀酸美托洛尔缓释片(美托洛尔, 阿斯利康制药有限公司, 批号 UBFBA); IMDM 培养液, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物公司, 批号分别为 161115, KGA106); 胎牛血清(FBS, Moregate 公司, 批号 1729601); 青霉素-链霉素(美国 HyClon 公司, 批号 SV30010); 不含 EDTA 的胰酶(上海源培公司, 批号 L40415); 细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国 Biosharp 公司, 批号 67080050); Pierce™ BCA 蛋白试剂盒, 磷酸酶抑制剂 Mini Tablets, 蛋白酶抑制剂 Mini Tablets(美国 Thermo 公司, 批号分别为 PB200138, 8886657, 888665); 蛋白免疫印迹法(Western blot)及 IP 裂解液(美国 Biosharp 公司, 批号 BL509A); 细胞凋亡与坏死检测试剂盒(碧云天公司, 批号 C1056); Bcl-2 抗体, Bax 抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 GR95625-11, GR151406-40); Bak(D4E4) Rabbit mAb,  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 B2082, B2801); D-Hanks 溶液(KCl 0.4 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.06 g, NaCl 8 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.35 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.09 g)。

**1.3 仪器** 3111 型  $\text{CO}_2$  培养箱(美国 Thermo 公司), C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司), ECLIPSE Ti-S 型荧光显微镜(日本 Niko 公司), Tanon 5500 型全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司), PowerPac™ Basic 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), TS-317 型 3D 脱色摇床(中国其林贝尔仪器制造有限公司)。

## 2 方法

**2.1 药物配置** 黄芪甲苷用 DMSO 配成  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  母液; 美托洛尔用 DMSO 配制成  $15.38 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  母液; ISO 用 DMSO 配制成  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  母液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  保存, 实验时用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养

基稀释成相应浓度。

**2.2 原代心肌细胞提取** 出生 1~3 d 的 SD 大鼠的乳鼠, 放入 75% 的乙醇中醉死, 取心脏后, 将心脏放入 D-Hanks 中清洗, 剪去上 1/3, 放入 15 mL 的离心管中, 加入 D-Hank 2 mL 清洗后弃上清, 将心脏剪碎为  $1 \text{ mm}^3$  的小块; 向离心管中加入消化液 6 mL,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴箱中消化 5 min, 弃上清; 再向离心管中加入消化液 5 mL,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴箱中消化 10 min, 每隔 2 min 振荡、吹打; 将上清吸出移至新的离心管中, 并加入 IMDM 2 mL 终止消化; 再次向余下的沉淀中加入消化液 5 mL,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴箱中消化 10 min, 如此重复 2 次。将 3 次收集的上清过滤到新的离心管中离心( $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min), 弃上清。向沉淀中加入 D-Hanks 8 mL 后吹打均匀, 再次离心( $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min), 弃上清。加入 IMDM 10 mL 吹打均匀, 移至培养瓶中, 培养 48 h 后加药培养。

**2.3 CCK-8 法检测黄芪甲苷对损伤的原代心肌细胞抗凋亡的影响** 将提取的原代心肌细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 培养 48 h 后, 随机分为空白组、模型组和黄芪甲苷各加药组( $0 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每组均设 3 个平行孔。空白组为含 10% 胎牛血清的完全培养基 100  $\mu\text{L}$ , 空白组为含与实验组等量细胞的 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液。除空白组, 其余各组加入对心肌细胞有害的 ISO ( $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 30 min 后, 细胞加药培养 12, 24, 48 h。每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu\text{L}$  培养 1~4 h 后, 在酶联免疫检测仪上于波长 450 nm 处测定各孔的吸光度 A。

$$\text{细胞活力} = (\text{加药组 A} - \text{空白组 A}) / (\text{模型组 A} - \text{空白组 A}) \times 100\%$$

**2.4 ISO 诱导心肌细胞损伤模型的建立及实验分组** 从正常 SD 大鼠乳鼠心肌利用酶消化和差速贴壁方法分离得到原代心肌细胞, 种于 24 孔板, 体外培养 48 h 后, 用对心肌细胞有害的 ISO, 造成体外原代心肌细胞损伤模型<sup>[15-16]</sup>, 空白组心肌细胞不加 ISO。设置空白组、模型组、美托洛尔组及黄芪甲苷低、中、高剂量组; 各组设 8 孔, 重复 3 次。其具体操作加入浓度为  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ISO, 30 min 后加入不同浓度的药物。美托洛尔心肌细胞给药质量浓度  $2.336 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。黄芪甲苷心肌细胞给药浓度分别为低剂量  $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 中剂量  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 高剂量  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培育 24 h, 实验结束后, 镜下观察细胞形态, 收集心肌细胞及培养上清液用于指标测定。

**2.5 各实验组原代心肌细胞蛋白提取及蛋白定量**

用 PBS 快速冲洗细胞 2 遍后;加入适量的裂解液(含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂),吹打几次,用细胞刷将细胞刮下,冰上静置 10 min,1 万  $\times g$  离心 5 min,弃沉淀,取上清待用。利用 BCA 法测定不同浓度 BSA 以及上清液的 A,绘制标准曲线。根据酶标仪所示 A,参照标准曲线,读取上清液中蛋白浓度(具体过程按试剂盒说明书操作)。

**2.6 Hochest/PI 双染法** 镜下观察各组细胞的凋亡情况每个样品收集约 10 ~ 100 万细胞于 1.5 mL 离心管内,离心弃上清;细胞沉淀用细胞染色缓冲液 0.8 ~ 1  $\mu\text{L}$  重悬。加入 Hoechst 染色液 5  $\mu\text{L}$ ,加入 PI 染色液 5  $\mu\text{L}$ ,混匀,冰浴孵育 20 ~ 30 min。染色后 PBS 洗涤 1 次,在荧光显微镜下观察。

**2.7 流式法检测各组细胞的凋亡率** 用不含 EDTA 的胰酶消化收集(胰酶消化时间不易过长,否则容易引起假阳性);用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min)收集  $1 \sim 5 \times 10^5$  个细胞;加入 Binding Buffer 500  $\mu\text{L}$  悬浮细胞;加入 Annexin V-FITC 5  $\mu\text{L}$  混匀后,加入 Propidium Iodide 5  $\mu\text{L}$  混匀;室温、避光、反应 10 min;在 1 h 内,利用流式细胞仪进行观察和检测。

**2.8 Western blot 检测 Bcl-2, Bax 及 Bak 的蛋白水平** 将蛋白在 97  $^{\circ}\text{C}$  金属浴 10 min 的条件下充分变性。制备 12% 分离胶,加入样品及预染蛋白质分子量标准(上样量为 40  $\mu\text{L}$ )进行电泳,电压控制 80 V,当溴酚蓝条带到达分离胶处,将电压调节至 120 V 溴酚蓝条带到达分离胶下端边缘后停止电泳。再用 80 V 恒定电压转膜 1 h。之后进行免疫反应,将膜浸泡于 10% 封闭蛋白中室温下进行封闭,将一抗用 PBST 按照一定比例稀释至适当浓度(Bcl-2, Bax, Bak 稀释比例均为 1:1 000)孵育一抗,孵育完成后,用 PBST 在室温下脱色摇床上清洗 3 次后孵育二抗,完成后用 PBST 在室温下脱色摇床上进行洗膜。最后加入 ECL 混合液在暗室中反应 1 min,取出膜置凝胶成像系统进行灰度扫描,用分析软件计算各组蛋白的灰度值,计算目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值,进行统计学分析。

**2.9 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计学软件,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,先使用单因素方差分析,待有差异后两组之间比较再用 Student's-*t* test 检验,两组以上的比较使用 Dunnett's test 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 SD 大鼠乳鼠原代心肌细胞的形态** SD 大鼠

乳鼠原代细胞提取成功后,显微镜下可见细胞形态变为梭形或不规则扁平状,24 h 后即可看到单个细胞的自发收缩,继而细胞逐渐铺展伸出伪足,形成不规则的星形,48 h 后,可见细胞相互接触交织成网,形成细胞单层或细胞簇,镜下呈规律性自发收缩。见图 1。

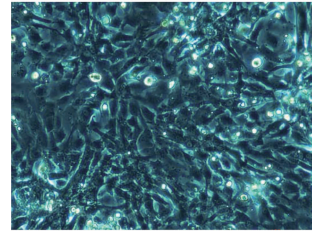


图 1 乳鼠原代心肌细胞( $\times 200$ )

Fig. 1 Neonatal rat primary cardiomyocytes( $\times 200$ )

**3.2 对损伤的原代心肌细胞抗凋亡的影响** 与空白组比较,原代心肌细胞的活力能被一定浓度的黄芪甲苷上调,随着黄芪甲苷的浓度增加及作用时间延长,黄芪甲苷上调细胞活力效果越强,呈时间和浓度的依赖性,黄芪甲苷作用原代心肌细胞 24 h 的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,在 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  后,细胞活力未有明显上调趋势。因此,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为中浓度,选择 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为实验研究最大浓度。见表 1。

**3.3 对损伤后原代心肌细胞细胞核形态的影响** Hochest-PI 双染是根据细胞膜的完整性区分坏死细胞(细胞膜破坏 PI 进入成红色)、细胞核的形态区分凋亡和正常细胞(前者核聚缩成亮蓝色、后者为普通蓝色)。空白组无红色坏死细胞及凋亡细胞;模型组出现凋亡细胞和坏死细胞;美托洛尔组相较于模型组红色坏死细胞及亮蓝色凋亡细胞明显减少。同时,黄芪甲苷的凋亡细胞明显减少,并呈剂量依赖性,表明黄芪甲苷具有抗凋亡的作用。见图 2。

**3.4 对损伤后原代心肌细胞凋亡率的影响** 空白组未见凋亡细胞,模型组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,美托洛尔组及黄芪甲苷低、中、高浓度组凋亡率都有不同程度的下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

**3.5 对损伤后原代心肌细胞的 Bcl-2, Bax 及 Bak 蛋白表达的影响** 经异丙肾上腺素诱导的大鼠原代心肌细胞损伤后,与空白组比较,模型组心肌细胞的 Bcl-2 表达显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,美托洛尔组及黄芪甲苷中、高剂量组 Bcl-2 的表达显著上调( $P < 0.01$ ),黄芪甲苷低剂量组 Bcl-2 的表达

表 1 不同浓度下黄芪甲苷对原代心肌细胞活力的影响( $n=3$ )

Table 1 Effect of astragaloside IV on vitality of primary cardiomyocytes at different concentrations( $n=3$ )

黄芪甲苷 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	12 h		24 h		48 h	
	$A(\bar{x}\pm s)$	细胞活力/%	$A(\bar{x}\pm s)$	细胞活力/%	$A(\bar{x}\pm s)$	细胞活力/%
0	$0.28\pm 0.04$	2.1	$0.30\pm 0.05$	1.9	$0.28\pm 0.10$	2.2
2.5	$0.38\pm 0.06$	7.2	$0.38\pm 0.11$	5.6	$0.34\pm 0.07$	5.6
5	$0.64\pm 0.60$	20.2	$0.68\pm 0.15$	21.4	$0.52\pm 0.17$	15.7
10	$0.91\pm 0.04^{1)}$	33.8	$1.23\pm 0.24^{1)}$	49.0	$1.05\pm 0.15^{1)}$	45.3
15	$1.04\pm 0.20^{1)}$	40.6	$1.35\pm 0.22^{1)}$	54.9	$1.15\pm 0.18^{1)}$	50.7
20	$1.23\pm 0.20^{1)}$	50.1	$1.67\pm 0.07^{1)}$	71.1	$1.33\pm 0.22^{1)}$	60.8
25	$1.38\pm 0.11^{1)}$	58.1	$1.69\pm 0.14^{1)}$	72.6	$1.45\pm 0.17^{1)}$	67.5
30	$1.72\pm 0.15^{1)}$	74.9	$1.85\pm 0.15^{1)}$	80.3	$1.62\pm 0.21^{1)}$	77.0
35	$1.85\pm 0.09^{1)}$	81.4	$1.83\pm 0.23^{1)}$	79.4	$1.71\pm 0.45^{1)}$	82.0
40	$1.92\pm 0.11^{1)}$	85.3	$1.93\pm 0.20^{1)}$	84.7	$1.84\pm 0.17^{1)}$	88.9

注:与 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

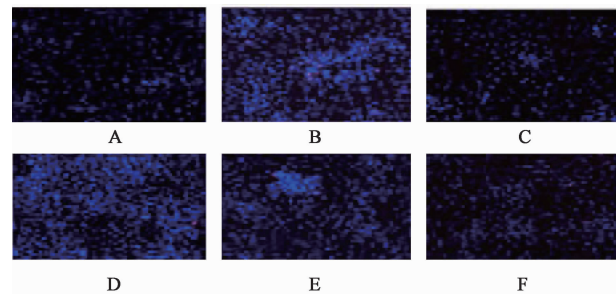


图 2 黄芪甲苷对损伤后原代心肌细胞细胞核形态的影响(Hoechst/PI,  $\times 100$ )

Fig. 2 Effect of astragaloside IV on karyomorphism of myocardial cells after injury(Hoechst/PI,  $\times 100$ )

表 2 黄芪甲苷对损伤后原代心肌细胞凋亡率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of astragaloside IV on apoptosis rate of myocardial cells after injury( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
正常	-	$0.43\pm 0.31$
模型	-	$22.13\pm 2.81^{1)}$
美托洛尔	$2.336^{4)}$	$11.87\pm 1.19^{3)}$
黄芪甲苷	3	$18.57\pm 2.00$
	10	$11.97\pm 2.07^{2)}$
	30	$9.77\pm 2.55^{3)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>4)</sup>表示单位为  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

上调( $P < 0.05$ )。经异丙肾上腺素诱导的大鼠原代心肌细胞损伤后,与空白组比较,模型组心肌细胞的 Bax 表达增强( $P < 0.01$ );与模型组比较,美托洛尔

组 Bax 表达显著下调( $P < 0.01$ ),黄芪甲苷高剂量组 Bax 表达下调( $P < 0.05$ )。经异丙肾上腺素诱导的大鼠原代心肌细胞损伤后,与空白组比较,模型组心肌细胞的 Bak 表达上调( $P < 0.05$ );与模型组比较,美托洛尔组及黄芪甲苷高剂量组 Bak 表达下调( $P < 0.05$ )。与模型组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3,图 3。

表 3 黄芪甲苷对损伤后原代心肌细胞的 Bcl-2, Bax 和 Bak 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of astragaloside IV on expression of Bcl-2, Bax and Bak protein in myocardial cells after injury( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-2/ $\beta$ -actin	Bak/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin
正常	-	$1.51\pm 0.11$	$0.46\pm 0.20$	$0.58\pm 0.13$
模型	-	$0.59\pm 0.08^{2)}$	$1.39\pm 0.47^{1)}$	$1.48\pm 0.13^{2)}$
美托洛尔	$2.336^{5)}$	$1.33\pm 0.47^{4)}$	$0.53\pm 0.19^{3)}$	$0.91\pm 0.16^{4)}$
黄芪甲苷	3	$0.78\pm 0.01^{3)}$	$1.19\pm 0.26$	$1.40\pm 0.31$
	10	$1.06\pm 0.02^{4)}$	$0.92\pm 0.30$	$1.25\pm 0.33$
	30	$1.50\pm 0.33^{4)}$	$0.54\pm 0.11^{3)}$	$0.99\pm 0.16^{3)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;<sup>5)</sup>表示单位为  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

#### 4 讨论

心力衰竭是各种心血管疾病发展的终末阶段,由于神经、体液、激素和心脏重构造成了恶性循环,最终导致死亡。它并不是一个独立的疾病。其中,心肌重塑是心脏应对压力负荷、维持心脏正常输出所做出的适应性反应,涉及心肌细胞的凋亡和肥大、血管新生及细胞外基质相关改变的多个病理生理过

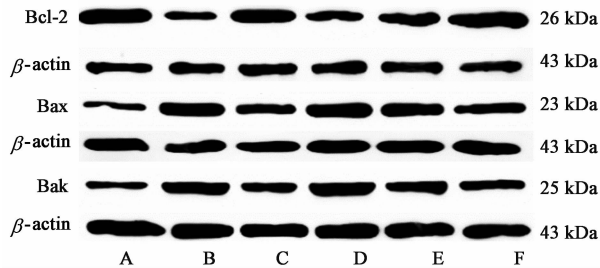


图 3 各组心肌细胞的 Bcl-2, Bax 及 Bak 蛋白的表达电泳

Fig. 3 Expression of Bcl-2, Bax and Bak protein in each group

程<sup>[17-19]</sup>。在心肌重塑的过程中,心肌细胞凋亡起关键作用。心肌细胞的凋亡在细胞丢失的同时,因其代偿及修复机制,伴随病理性细胞肥大和间质纤维化进程,发生心肌的重构<sup>[20-21]</sup>。心室肌的凋亡和重构导致心室的结构重构,加重了心衰的程度<sup>[22]</sup>;同时心衰的加重影响凋亡及结构重构,致使心房肌细胞凋亡及心房纤维化明显增多<sup>[23-24]</sup>。由此可知,抑制细胞凋亡可延缓心力衰竭的进一步发展。

细胞凋亡即细胞程序性死亡,是许多疾病如心血管疾病、自身免疫性疾病等的发病原因之一。心肌细胞的凋亡是一种自主性的自杀方式,当细胞的“自杀”程序被激活,通过一系列基因调控,细胞开始自动消亡。心肌细胞是一种不具备增殖能力的终末分化细胞,它的凋亡可使心肌细胞大量丧失,从而使心脏收缩功能减弱,而当心肌细胞数量减少到一定程度时,心功能出现代偿,最终导致心力衰竭,并呈进行性恶化的趋势<sup>[25]</sup>。故而,在功能受损的心脏中,保持一定数量的心肌细胞对于维持心功能至关重要,而凋亡是心肌细胞死亡的重要机制<sup>[26]</sup>。因此,通过干预凋亡过程中的凋亡信号或传导途径,为治疗心血管疾病提供了可能的途径。

细胞的凋亡过程,需要多种基因和蛋白参与,如 Caspase 家族蛋白, Bcl-2 家族蛋白及 p53 蛋白等,这些蛋白在凋亡的信号转导中有着不可替代的地位。Bcl-2 是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一,同时也是研究最早的与凋亡有关的基因。蛋白在细胞凋亡过程中的作用至关重要,在哺乳动物、线虫和细菌中就已有 20 余种 Bcl-2 家族蛋白质被发现。与 Bcl-2 同源的家族成员基本分 2 类,如 Bcl-xL, mcl-1, Bcl-2 等及 Bad, Bid 等。抑制凋亡蛋白 Bcl-2 可与促凋亡蛋白 Bax 形成异源二聚体作为在细胞死亡信号通路上的分子开关,即 Bcl-2/Bax 可调节细胞的凋亡。换言之,若 Bax 相对表达高于 Bcl-2,则 Bax 同源二聚体的数量增多,从而促进细胞凋亡;如果 Bcl-2 相对量高于 Bax,则促进 Bcl-2/Bax 异源二聚体

的形成,同时 Bcl-2 同二聚体的量增多,从而抑制细胞死亡<sup>[27]</sup>。

在本研究中笔者发现,黄芪甲苷具有抗异丙肾上腺素诱导的大鼠乳鼠原代心肌细胞凋亡的作用。与模型组比较,经黄芪甲苷干预后的 ISO 诱导的原代心肌细胞,其 Bcl-2 的表达明显上调,同时 Bax 的表达下调,这就表明,黄芪甲苷可调控细胞死亡信号通路上的 Bcl-2/Bax。

综上所述,黄芪甲苷能明显调节 ISO 诱导的原代心肌细胞损伤的相关凋亡指标的蛋白表达,提示黄芪甲苷对异丙肾上腺素所诱导损伤的原代心肌细胞具有抗凋亡作用,可能是通过调节细胞死亡信号通路上的相关凋亡蛋白来实现的。为进一步开发黄芪甲苷在心血管方面的更大价值,笔者还需进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] 孙政华,邵晶,郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医临床研究, 2015, 7(25): 22-25.
- [2] REN S, ZHANG H, MU Y, et al. Pharmacological effects of astragaloside IV: a literature review[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3): 413-416.
- [3] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2016》概要[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(6): 521-530.
- [4] LI L, TAO H Y, CHEN J B. Anti-apoptosis effect of astragaloside on adriamycin induced rat's cardiotoxicity [J]. Chin J Integr Tradi West Med, 2006, 26(11): 1011-1014.
- [5] 谢靖,高惠春,郑玺. 黄芪甲苷对急性脑出血大鼠神经功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(10): 1905-1908.
- [6] 唐斌,张金国,谭洪勇,等. 黄芪甲苷对慢性心衰大鼠心肌纤维化及能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3): 411-416.
- [7] SI J, WANG N, WANG H, et al. HIF-1 $\alpha$  signaling activation by post-ischemia treatment with astragaloside IV attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107832.
- [8] 贺永贵,张义东,张国彬,等. 黄芪甲苷保护大鼠缺血/再灌注心脏的内质网应激机制研究[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(9): 1289-1293.
- [9] 李璐,蔡志亮,贺翼飞,等. 内质网应激在黄芪甲苷诱导的心肌线粒体保护中的作用[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(6): 854-858.
- [10] 李梦非,王洪新,鲁美丽,等. 黄芪甲苷通过 TLR4/p38MAPK 信号通路抑制脂多糖诱导的小鼠心肌损伤[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 35-38.

- [11] 王焕珍,柴艺汇,高洁,等. 黄芪甲苷对异丙肾上腺素诱导的 H9C2 心肌细胞维生素 D 受体 mRNA 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(7):1454-1456.
- [12] Kubavat J B, Asdaq S M. Role of *Sida cordifolia* L. leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury[J]. J Ethnopharmacol,2009,124(1):162-165.
- [13] Kniewald H, Malcic I, Radosevic K, et al. Application of flow cytometry in the study of apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2007,29(10):681-687.
- [14] GAO Y, LIU H R, ZHAO R R, et al. Autoantibody against cardiac beta1-adrenoceptor induces apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2006,38(7):443-449.
- [15] 黄涌,董小变,庄晓东,等. 沉默信息调节因子 1 参与依达拉奉对抗异丙肾上腺素致心肌细胞损伤[J]. 中国动脉硬化杂志,2014,22(5):467-471.
- [16] 李南,姜晓蕾,刘万顺,等. 壳聚糖衍生物对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌损伤的保护作用[J]. 中国海洋药物,2013,32(6):41-48.
- [17] GAO Y, LI T, WU C, et al. Pim-1 mediated signaling during the process of cardiac remodeling following myocardial infarction in ovine hearts[J]. J Mol Cell Cardiol,2013,63(10):89-97.
- [18] SI L, XU J, YI C, et al. Asiatic acid attenuates the progression of left ventricular hypertrophy and heart failure induced by pressure overload by inhibiting myocardial remodeling in mice [J]. J Cardiovasc Pharmacol,2015,66(6):558-568.
- [19] Aoyama M, Kawase H, Bando Y K, et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition alleviates shortage of circulating glucagon-like peptide-1 in heart failure and mitigates myocardial remodeling and apoptosis via the exchange protein directly activated by cyclic AMP 1/Ras-related protein 1 axis [J]. Circ Heart Fail, 2016, 9(1):e002081.
- [20] 刘晓梅,孙秀枝,刘瑞华,等. 三七总皂苷调控 mRNA-466b 抑制急性心梗大鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(22):6-10.
- [21] De Jong A M, Maass A H, Oberdorf-Maass S U, et al. Mechanisms of atrial structural changes caused by stretch occurring before and during early atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res,2011,89(4):754-765.
- [22] Heusch G. Heart rate and heart failure. not a simple relationship[J]. Circ J,2011,75(2):229-236.
- [23] González A, Ravassa S, Beaumont J, et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium [J]. J Am Coll Cardiol,2011,58(18):1833.
- [24] Ohtani K, Yutani C, Nagata S, et al. High prevalence of atrial fibrosis in patients with dilated cardiomyopathy [J]. J Am Coll Cardiol,1995,25(5):1162-1169.
- [25] LI L, WANG X, CHEN W, et al. Regulatory role of CARD3 in left ventricular remodelling and dysfunction after myocardial infarction[J]. Basic Res Cardiol,2015,110(6):1-19.
- [26] Fujita T, Ishikawa Y. Apoptosis in heart failure: the role of the  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes[J]. Circ J,2011,75(8):1811-1818.
- [27] Hong J, Park J S, Lee H, et al. Myosin heavy chain is stabilized by Bcl-2 interacting cell death suppressor (BIS) in skeletal muscle[J]. Exp Mol Med,2016,48(4):e225.

[责任编辑 周冰冰]