

地黄多糖对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤后氧化应激和细胞凋亡的影响

彭辉*, 张华龙

(邢台市人民医院, 河北 邢台 054031)

[摘要] **目的:**研究地黄多糖(polysaccharides from *Rehmanniae Radix*, PRR)对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤后氧化应激和细胞凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法:**分离并培养乳鼠心肌细胞 72 h 后随机分为空白组,缺氧/复氧(H/R)模型组,PRR 10,20,40 mg·L⁻¹干预组和舒血宁注射液(SXN,100 mg·L⁻¹)干预组,每组设 10 个复孔。各组细胞经药物干预 6 h 后,采用噻唑蓝(MTT)检测细胞存活率;检测培养基中天门冬氨酸氨基转移酶(AST),肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH)活性;测定细胞中超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量;采用流式细胞仪检测细胞凋亡状况并计算凋亡率,通过实时荧光定量-聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测凋亡相关基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) mRNA 表达并计算 Bcl-2/Bax 表达,通过蛋白质免疫印迹(Western blot)方法检测细胞中凋亡相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达并进行半定量分析。**结果:**与正常组比较,H/R 模型组细胞存活率显著降低($P < 0.01$),培养基中 AST,CK,LDH 活性显著升高($P < 0.01$),细胞中 SOD,CAT 活性显著降低,MDA 含量显著升高($P < 0.01$),细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$),细胞中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),Bcl-2/Bax 表达显著降低($P < 0.01$),Caspase-3 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与 H/R 模型组比较,PRR 20,40 mg·L⁻¹干预组乳鼠心肌细胞存活率明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),培养基中 AST,CK,LDH 活性明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),细胞中 SOD,CAT 活性明显升高,且 MDA 含量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$),细胞中凋亡相关基因 Bcl-2 mRNA 明显上调而 Bax mRNA 明显下调,Bcl-2/Bax 显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),Caspase-3 蛋白表达量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**PRR 能够通过抑制氧化应激损伤和细胞凋亡而对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞起到一定的保护作用;作用机制可能与其改善抗氧化酶活性,上调抑凋亡基因 Bcl-2 表达、下调促凋亡基因 Bax 表达,提高 Bcl-2/Bax 表达,以及抑制促凋亡蛋白 Caspase-3 表达有关。

[关键词] 地黄多糖; 心肌细胞; H/R 损伤; 氧化应激; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0155-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230155

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0922.032.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:22

Effect of Polysaccharides from *Rehmanniae Radix* on Oxidative Stress and Apoptosis of Neonatal Rat Cardiomyocytes Impaired by Hypoxia-Reoxygenation

PENG Hui*, ZHANG Hua-long

(Xingtai People's Hospital, Xingtai 054031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of polysaccharides from *Rehmanniae Radix* (PRR) on oxidative stress and apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes impaired by hypoxia-reoxygenation (H/R), and its potential mechanism. **Method:** Cardiomyocytes of neonate rat were isolated, cultured for 72 hours, and then randomly divided into six groups: normal control group, model control group, PRR (10, 20, 40 mg·L⁻¹) treatment groups and SXN (100 mg·L⁻¹) treatment group ($n = 10$). Six hours after the drugs were given, the survival rate was detected by MTT; the activities of aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK) and

[收稿日期] 20151217(008)

[基金项目] 河北省卫生计生厅重点科技研究计划项目(20130359)

[通讯作者] * 彭辉, 硕士, 主治医师, 从事心外科专业研究, Tel: 15803197633, E-mail: xtrmyyph@163.com

lactic dehydrogenase (LDH) in culture medium were detected; the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the content of malondialdehyde (MDA) in cardiomyocytes were determined; the apoptosis was observed by flow cytometry, and the apoptosis rate was calculated; the mRNA expressions of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) were detected by Real-time PCR, and the ratio of Bcl-2/Bax was calculated; the protein expression of Caspase-3 was detected by Western blot. **Result:** Compared with the model control group, the survival rate of H/R model group was significantly decreased ($P < 0.01$), the activities of AST, CK, LDH in culture medium were significantly increased ($P < 0.01$), the activities of SOD and CAT were significantly decreased ($P < 0.01$), the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$), Bcl-2 and Bax mRNA expressions were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bcl-2/Bax expression was significantly decreased ($P < 0.01$), and Caspase-3 protein expression was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the H/R model group, the survival rate of PRR (20, 40 mg·L⁻¹) treatment group was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the activities of CK, AST, LDH in culture medium were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the activities of SOD, CAT in cardiomyocytes were significantly increased, and the content of MDA was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the apoptosis rate was significantly decreased ($P < 0.01$); the expression of Bcl-2 mRNA was significantly up-regulated, whereas the expression of Bax mRNA and caspase-3 protein were significantly down-regulated, and the ratio of Bcl-2/Bax was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** PRR had an inhibitive effect on oxidative stress and apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes impaired by H/R, which may be related to PRR' capacities of improving the activity of antioxidase, raising the oxygen radical scavenging effect, up-regulating the expression of Bcl-2, down-regulating the expression of Bax, increasing the ratio of Bcl-2/Bax, and inhibiting the expression of Caspase-3 protein.

[**Key words**] polysaccharide from Rehmanniae Radix; cardiomyocytes; H/R injury; oxidative stress; apoptosis

冠状动脉粥样硬化性心脏病已经发展成为多发病和常见病,尤其是其可能引发的急性心肌梗死是导致人类死亡的主要疾病之一。目前临床上对于急性心肌梗死的治疗主要是采用溶栓、介入手术等手段及时恢复血流再灌注,但常常伴发“再灌注损伤”并发症而严重影响愈后。缺血再灌注损伤的病理机制非常复杂,至今仍不明确;但近年来 Zhao 等^[1]和刘艳霞等^[2]研究报道氧化应激损伤和继发性细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤的重要病理机制,这也为我们研发抗缺血再灌注损伤的新型药物提供了新的思路。地黄多糖 (polysaccharides from Rehmanniae Radix, PRR) 为我国传统中药地黄的主要活性成分之一,既往研究发现 PRR 具有抗氧化、提高免疫力、降血糖等多种药理学作用^[2-5]。并且,近年来有研究发现 PRR 能够通告抑制小鼠线粒体过氧化损伤而对其脑缺血再灌注损伤起到保护作用^[6],本实验将通过建立乳鼠心肌细胞缺氧/复氧 (H/R) 损伤模型并给予不同浓度的 PRR 进行干预,研究 PRR 对乳鼠心肌细胞 H/R 损伤后氧化应激和细胞凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 实验用 SD 大鼠 1~3 d 乳鼠^[7] (清洁级、雄性)购自河北省实验动物中心,动物合格证号 SCXK(冀)2013-1003。

1.2 药物及试剂 PRR(陕西慈缘生物技术有限公司,批号 20141108,纯度 $\geq 98\%$),舒血宁注射剂(神威药业有限公司,批号 Z13070538),小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司,批号 150313),DMSO(国药集团化学试剂有限公司,批号 20140329),MTT(美国 Sigma 公司,批号 M2128);天门冬氨酸氨基转移酶(AST),肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶(LDH),超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)活性,丙二醛(MDA),AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒及 Caspase-3 单抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 140128, 130924, 130519, 130420, 131017, 140719, 130724, 131015);TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 1403215),cDNA 逆转录试剂盒(上海斯信生物科技有限公司,批号 20140627)。

1.3 仪器 VD-650-U 型超净工作台(上海楚度仪器设备有限公司),FACSAria 流式细胞仪(美国 BD

公司),MCO-20AIC 型 CO₂ 细胞培养箱(日本三洋集团),BS-300 型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),UV-1800 PC 型紫外-可见分光光度计(广州科晓科学仪器有限公司),Maxygene II 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)扩增仪(美国 AXYGEN 公司),DYY-11 型多用电泳仪及 JY-SCZ2 型电泳槽(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 乳鼠心肌细胞的分离与培养^[7] 在超净工作台取心室组织,剪碎后经 0.1% 的胰酶消化(37 ℃,6 min/次)至组织碎块消化完毕,收集上清液并 1 500 r·min⁻¹离心 10 min 取沉淀,植入培养基(10% 胎牛血清 DMEM,内含 1 × 10⁵ U·L⁻¹的青霉素和链霉素),吹打均匀,除杂 1.5 h。收集未贴壁细胞,调整细胞至 6 × 10⁸ 个/L,接种于 35 mm 培养器皿中,经 37 ℃ 5% CO₂,100% 湿度培养 72 h 后用于实验。

2.2 细胞分组与 H/R 损伤模型的制备 取经培养 72 h 后的原代乳鼠心肌细胞,随机分为空白组,H/R 模型组,PRR(10,20,40 mg·L⁻¹)干预组^[8-9]和舒血宁注射液(SXN,100 mg·L⁻¹)干预组,每组设 10 个复孔。除空白组外,其余各组均参照李澎等^[7]报道的方法制备 H/R 损伤心肌细胞模型,弃去培养基,每孔加入预先以 95% N₂-5% CO₂ 混合气饱和 15 min 的无糖台氏液 2 mL;敞盖放入缺氧盒内,通入 95% N₂-5% CO₂ 混合气,流速 1 L·min⁻¹;15 min 后,夹闭进气管和出气管,将缺氧盒置于细胞培养箱内 2.5 h,此过程为缺氧。打开缺氧盒,取出培养皿,吸出上清液,每孔加入 2.5% 胎牛血清 DMEM 培养基 2 mL,置于培养箱内继续培养 2 h,此过程即为复氧。复氧后通过显微镜观察,若出现伪足减少、脱落、悬浮、搏动减弱、搏动频率降低、搏动节律不齐等现象则认定造模成功。确认造模成功后各组立即给药进行干预,干预时间为 6 h。

2.3 细胞存活率的检测 药物干预 6 h 后,将细胞转移至 96 孔培养板,每组设 6 个复孔($n=6$),分别加入 MTT 液(5 g·L⁻¹,20 μL/孔),继续培养 4 h 后去上清,加入 DMSO(150 μL/孔)振荡 15 min 后测定 490 nm 波长处吸光度 A,然后通过 A 计算各组细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.4 培养基中 AST,CK,LDH 活性的检测 取细胞培养液并按照 AST,CK,LDH 活性检测试剂盒操作方法步骤,通过生化分析仪测定各组细胞培养液中 AST,CK,LDH 活性。

2.5 细胞中 SOD,CAT 活性和 MDA 含量的检测

取细胞并通过超声波细胞破碎仪冰浴中处理 30 s,经 4 ℃ 下 3 500 r·min⁻¹离心 10 min 处理后取上清液,然后通过紫外-可见分光光度计测定各组细胞裂解液中 SOD,CAT 活性以及 MDA 含量。

2.6 细胞凋亡的检测 采用 0.25% 胰酶消化并离心取细胞,经 PBS 溶液洗涤后按照 AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒操作方法步骤,加入 500 μL Binding Buffer,5 μL AnnexinV,5 μL PI 后混匀,室温避光孵育 10 min 后通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡状况并计算凋亡率。

2.7 细胞中凋亡相关基因 Bcl-2,Bax mRNA 表达的检测 通过基因库查阅大鼠 Bcl-2,Bax, β -actin 基因 cDNA 序列并设计三者上、下游引物(表 1);常规消化并收集各组细胞,加入适量 Trizol 试剂提取总 RNA,测定总 RNA 浓度,取 1 μg RNA 反转录为 cDNA,行 Real-time PCR 反应。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,由灰度值进行半定量分析 Bcl-2,Bax mRNA 表达,并计算 Bcl-2/Bax 表达。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

基因		引物
Bcl-2	上游	5'-GGGATGCCTTTGTGGA ACTA-3'
	下游	5'-TGATTTGACCATTTGCGCTGA-3'
Bax	上游	5'-ATCCAGGATCGAGCAGGGAGGATGG-3'
	下游	5'-AGATGGTCACTGTCTGCCATGTGGG-3'
β -actin	上游	5'-CCTGTATGCCTCTGGTCTGA-3'
	下游	5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCT-3'

2.8 细胞中 Caspase-3 蛋白表达的检测 参照 2.5 项的方法取细胞裂解提取液,12 000 r·min⁻¹低温(4 ℃)离心 20 min 取沉淀,采用 BCA 法蛋白定量后行蛋白变性,上样、电泳(待溴酚蓝接近胶底部时停止)、转膜、丽春红溶液染色、室温下经 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(Caspase-3, β -actin)4 ℃ 孵育过夜、洗膜、二抗室温摇床上孵育 1 h 后经 ECL 显色,以条带灰度值表示蛋白表达量并进行半定量分析。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 15.0 统计学软件进行数理统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间均数比较采用 One-way ANOVA 分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞存活率的影响 与空白组比较,发现 H/R 模型组乳鼠心肌细胞存活率显著降低($P < 0.01$);经 PRR 20,40 mg·L⁻¹或 SXN 干预 6 h 后,H/R 损伤乳鼠心肌细胞存活率明显升

高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); PRR 40 mg·L⁻¹ 干预组细胞存活率明显高于 SXN 干预组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 PRR 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 2 Effect of PRR on survival rate of neonatal rat impaired by H/R ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	存活率/%
空白	-	96.8 ± 4.2
H/R 模型	-	43.7 ± 5.0 ²⁾
PRR	10	49.1 ± 5.6
	20	68.0 ± 7.1 ³⁾
	40	82.5 ± 6.8 ^{4,5)}
	100	71.3 ± 6.4 ⁴⁾
SXN	100	71.3 ± 6.4 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 H/R 模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与 SXN 干预组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表 3~6 同)。

表 3 PRR 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞培养液中心肌酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Effect of PRR on activity of enzymes in culture medium of neonatal rat impaired by H/R ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	AST/U·mL ⁻¹	CK/U·mL ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹
空白	-	19.4 ± 3.2	1.4 ± 0.4	508.7 ± 76.9
H/R 模型	-	35.8 ± 5.7 ²⁾	2.7 ± 0.6 ²⁾	912.6 ± 158.0 ²⁾
PRR	10	30.7 ± 6.2	2.4 ± 0.6	839.1 ± 164.7
	20	26.3 ± 5.8 ³⁾	1.8 ± 0.5 ³⁾	768.4 ± 150.2 ³⁾
	40	23.0 ± 4.6 ⁴⁾	1.5 ± 0.4 ^{4,5)}	621.8 ± 134.9 ^{4,5)}
	100	25.9 ± 5.1 ³⁾	1.9 ± 0.5 ³⁾	760.2 ± 145.3 ³⁾
SXN	100	25.9 ± 5.1 ³⁾	1.9 ± 0.5 ³⁾	760.2 ± 145.3 ³⁾

MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); PRR 40 mg·L⁻¹ 干预组 CAT 活性显著高于 SXN 干预组 ($P <$

3.2 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞培养基中心肌酶活性的影响 H/R 模型组乳鼠心肌细胞培养基中 AST,CK,LDH 活性较空白组显著升高 ($P < 0.01$); 经 PRR 20,40 mg·L⁻¹ 或 SXN 干预 6 h 后,H/R 损伤乳鼠心肌细胞培养基中 AST,CK,LDH 活性明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); PRR 40 mg·L⁻¹ 干预组细胞培养中 CK,LDH 活性明显低于 SXN 干预组 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.3 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 H/R 模型组乳鼠心肌细胞 SOD, CAT 活性较空白组显著降低,且 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$); 经 PRR 20,40 mg·L⁻¹ 干预 6 h 后, H/R 损伤乳鼠心肌细胞 SOD, CAT 活性明显升高,

0.01),MDA 含量明显低于 SXN 干预组 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 PRR 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞中 SOD,CAT 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of PRR on activity of SOD, CAT and content of MDA in cardiomyocytes of neonatal rat impaired by H/R ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	CAT/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹
空白	-	124.0 ± 15.8	31.7 ± 4.8	5.9 ± 1.6
H/R 模型	-	61.7 ± 13.2 ²⁾	18.0 ± 3.5 ²⁾	12.2 ± 2.5 ²⁾
PRR	10	72.9 ± 14.0	20.5 ± 4.2	9.8 ± 2.2
	20	90.5 ± 17.8 ⁴⁾	24.6 ± 3.9 ³⁾	8.3 ± 1.7 ⁴⁾
	40	98.1 ± 16.3 ⁴⁾	28.1 ± 4.6 ^{4,6)}	6.5 ± 1.4 ^{4,5)}
	100	84.7 ± 15.1 ³⁾	20.9 ± 3.3	7.8 ± 1.9 ⁴⁾
SXN	100	84.7 ± 15.1 ³⁾	20.9 ± 3.3	7.8 ± 1.9 ⁴⁾

3.4 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞凋亡状况的影响 与正常组比较,H/R 模型组乳鼠心肌细胞凋亡数量明显增多;较 H/R 模型组,PRR 20,40 mg·L⁻¹ 干预组细胞凋亡数量显著减少 ($P < 0.01$)。计算凋亡率显示与空白组比较,H/R 模型组乳鼠心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$);较 H/R 模型组,PRR 20,40 mg·L⁻¹ 干预组和 SXN 干预组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$);PRR 40 mg·L⁻¹ 干预组细胞凋亡率显著低于 SXN 干预组 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 PRR 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of PRR on apoptosis of cardiomyocytes in neonatal rat impaired by H/R ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	凋亡率/%
空白	-	3.8 ± 1.6
H/R 模型	-	47.4 ± 6.5 ²⁾
PRR	10	42.0 ± 7.3
	20	27.9 ± 5.6 ⁴⁾
	40	16.5 ± 4.7 ^{4,5)}
	100	23.8 ± 5.1 ⁴⁾
SXN	100	23.8 ± 5.1 ⁴⁾

3.5 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达和 Bcl-2/Bax 的影响 H/R 模型组乳鼠心肌细胞中 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达较空白组明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), Bcl-2/Bax 显著降低 ($P < 0.01$); 而较 H/R 模型组, PRR 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组细胞 Bcl-2

mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$), Bax mRNA 表达明显下调 ($P < 0.05, P < 0.01$), Bcl-2/Bax 显著升高 ($P < 0.01$); PRR 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组细胞 Bcl-2 mRNA 表达和 Bcl-2/Bax 表达明显高于 SXN 干预组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

表 5 PRR 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达和 Bcl-2/Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of PRR on expression of Bcl-2, Bax mRNA and Bcl-2/Bax of cardiomyocytes in neonatal rat impaired by H/R ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2 ($\times 10^{-3}$)	Bax ($\times 10^{-3}$)	Bcl-2/Bax
空白	-	35.8 \pm 6.0	64.9 \pm 17.6	0.55 \pm 0.26
H/R 模型	-	46.2 \pm 7.3 ¹⁾	120.5 \pm 25.7 ²⁾	0.38 \pm 0.17 ²⁾
PRR	10	51.9 \pm 6.8	102.7 \pm 31.4	0.49 \pm 0.20 ³⁾
	20	58.7 \pm 7.5 ³⁾	86.1 \pm 35.2 ³⁾	0.68 \pm 0.26 ⁴⁾
	40	70.3 \pm 8.1 ^{4,5)}	74.9 \pm 28.0 ⁴⁾	0.94 \pm 0.35 ^{4,6)}
SXN	100	53.5 \pm 6.2	92.6 \pm 33.1 ³⁾	0.58 \pm 0.22 ³⁾

3.6 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞 Caspase-3 表达的影响 H/R 模型组乳鼠心肌细胞中 Caspase-3 表达量较空白组显著增高 ($P < 0.01$); 较 H/R 模型组, PRR 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组细胞中 Caspase-3 表达量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); PRR 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组细胞 Caspase-3 表达量显著低于 SXN 干预组 ($P < 0.05$)。见图 2 及表 6。

要的作用^[10-12], 所以 SOD 和 CAT 的活性能够反映机体抗氧化能力水平; 此外细胞膜过氧化终产物 MDA 的含量水平也能间接反映机体氧化应激损伤程度^[13]。血清心肌酶活性水平是临床上诊断心肌细胞损伤的常用指标^[14], 正常生理状态下, 心肌酶存于心肌细胞中而血清中活性非常低, 而当心肌细胞膜受损后心肌酶将迅速释放入血而导致血清中心肌酶 AST, CPK, LDH 活性陡然增高, 所以血清 AST, CPK, LDH 活性能够敏感地反映心肌细胞受损程度。

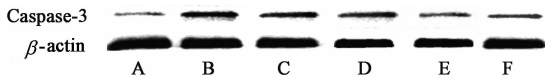


图 2 各组 H/R 损伤乳鼠心肌细胞中 Caspase-3 的表达
A. 空白组; B. H/R 模型组; C. RPS 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组; D. RPS 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组; E. RPS 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组; F. SXN 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预组

Fig. 2 Expression of Caspase-3 of cardiomyocytes in neonatal rat impaired by H/R

表 6 RPS 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞中 Caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of RPS on expression of Caspase-3 of cardiomyocytes in neonatal rat impaired by H/R ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3/ β -actin
空白	-	0.23 \pm 0.05
H/R 模型	-	0.58 \pm 0.11 ²⁾
RPS 干预	10	0.53 \pm 0.14
	20	0.40 \pm 0.08 ³⁾
	40	0.32 \pm 0.07 ^{4,5)}
	SXN 干预	100

细胞凋亡过程有多种基因参与调控, 包括 Caspase-3 和 Bcl-2 基因家族^[15]。Caspase-3 是激活各种凋亡刺激因子的关键蛋白酶, 参与细胞凋亡的启动及整个凋亡过程的调节; Bcl-2 能够抑制线粒体破裂, 可直接与凋亡刺激因子结合而抑制 Caspase-3 激活, 抑制促凋亡蛋白 Bax 细胞毒性作用, 调节细胞内钙浓度, 从而起到抑制细胞凋亡的作用^[16]; Bax 属于 Bcl-2 基因家族成员, 具有诱导线粒体渗透性改变而释放细胞色素 C, 激活促凋亡蛋白 Caspase-9, 而表现出促细胞凋亡作用^[17]。此外, Bax 能够与 Bcl-2 聚合成二聚体, 从而抑制 Bcl-2 活性而促进细胞凋亡, 所以 Bax/Bcl-2 更加能够体现 Bcl-2 基因家族对细胞凋亡的调控作用^[18-19]。

4 讨论

氧自由基 (ROS) 代谢失常是导致机体氧化应激损伤的重要病理基础, 而抗氧化酶 SOD, CAT 对维持体内正常生理状态下的 ROS 动态平衡发挥着重

本实验研究发现, 与空白组比较, 经 PRR 干预 6 h, 能够显著降低 H/R 损伤乳鼠心肌细胞培养液中心肌酶 (AST, CPK, LDH) 水平, 改善抗氧化酶 SOD, CAT 活性, 并降低 MDA 含量, 提示 PRR 能够有效改善抗氧化酶活性、提高自由基清除能力, 降低 H/R 损伤乳鼠心肌细胞氧化应激损伤; 并且经 PRR 干预 6 h 后, 能够显著上调 H/R 损伤乳鼠心肌细胞 Bcl-2

表达、下调 Bax 表达,提高 Bcl-2/Bax,下调 Caspase-3 蛋白表达,显著降低 H/R 损伤乳鼠心肌细胞凋亡率,提示 PRR 对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞凋亡具有抑制作用。

综上所述,PRR 能够通过抑制氧化应激损伤和细胞凋亡而对 H/R 损伤乳鼠心肌细胞起到一定的保护作用;作用机制可能与其改善抗氧化酶活性,调节凋亡相关基因表达(上调 Bcl-2 表达、下调 Bax 表达,提高 Bcl-2/Bax)以及抑制促凋亡蛋白 Caspase-3 表达有关。

[参考文献]

[1] Zhao Y J, Wang Y L, Du L J, et al. Effect of spermine preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury and cardiomyocyte apoptosis in isolated perfused rat heart [J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28 (8): 1135-1140.

[2] 刘艳霞,顾云,辛毅,等. 大鼠急性心肌缺血再灌注损伤诱导细胞凋亡的实验研究[J]. 心肺血管病杂志, 2009,28(3): 191-194.

[3] 李文波. 酶-超声提取地黄多糖及其抗氧化性研究[J]. 德州学院学报, 2009,25(4): 46-49.

[4] 赵平鸽,刘晓. 地黄多糖的提取纯化及其对糖尿病小鼠血糖的影响研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(9): 29-32.

[5] 杨兵,夏先林,施晓丽,等. 熟地黄多糖对断奶仔猪抗氧化性能和免疫性能的影响[J]. 江苏农业学报, 2012,28(4): 787-789.

[6] 朱敏丰. 地黄多糖对局灶性脑缺血小鼠线粒体过氧化损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2015,31(2): 40-43.

[7] 李澎,王建农,卢树杰,等. 山楂叶原花青素对乳鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2009,34(1): 96-99.

[8] Liu C L, Cheng L, Ko C H, et al. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory components from the root of *Rehmannia glutinosa* and its underlying mechanism via inhibition of iNOS pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2012,143(3): 867-875.

[9] 张琰琴,王磊,王玉红,等. 地黄多糖对过氧化氢损伤大鼠脂肪间充质干细胞的保护作用[J]. 中华中医药学刊, 2008,26(4): 755-757.

[10] Lartigue A, Burlat B, Coutard B, et al. The megavirus chilensis Cu, Zn-superoxide dismutase: the first viral structure of a typical CCS-independent hyperstable dimeric enzyme [J]. J Virol, 2014, 2588 (14): 254-261.

[11] 冷雪,张立德,贾连群,等. 人参皂苷 Rb₁ 对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血影响的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 104-108.

[12] Jin Y, Liu K, Peng J, et al. Rhizoma dioscoreae nipponicae polysaccharides protect HUVECs from H2O₂-induced injury by regulating PPAR γ factor and the NADPH oxidase/ROS-NF- κ B signal pathway [J]. Toxicol Lett, 2014, 232(1): 149-158.

[13] Laumbach R J, Kipen H M, Ko S, et al. A controlled trial of acute effects of human exposure to traffic particles on pulmonary oxidative stress and heart rate variability[J]. Part Fibre Toxicol, 2014, 11(1): 45-51.

[14] 文朝. 心肌坏死标志物联合检测在急性心肌梗死早期诊断及鉴别中的意义[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(11): 2013-2015.

[15] 高玉峰,王小杰,闫文翠,等. 生黄合剂对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 244-247.

[16] Ogura T, Tanaka Y, Tamaki H, et al. Docetaxel induces Bcl-2-and pro-apoptosis caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells [J]. Int J Oncol, 2016, 48(6): 2330-2338.

[17] Farhadi F, Jahanpour S, Hazem K, et al. Garlic (*Allium sativum*) fresh juice induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma: the involvement of Caspase-3, Bax and Bcl-2 [J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2015, 9(4): 267-273.

[18] Saeedi Borujeni M J, Hami J, Haghiri H, et al. Evaluation of Bax and Bcl-2 Proteins expression in the rat hippocampus due to childhood febrile seizure [J]. Iran J Child Neurol, 2016, 10(1): 53-60.

[19] Renault T T, Dejean L M, Manon S, et al. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2 [J]. Mech Ageing Dev, 2016, S0047/6374 (16): 30049-30045.

[责任编辑 周冰冰]