

羟基红花黄色素 A 联合黄芪甲苷-IV 对 TNF- α 诱导内皮细胞凋亡的影响

卢芬萍¹, 苏宁¹, 朱明明¹, 征宗梅¹, 申毓军², 刘亭宇¹, 施洪飞^{1*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 天津医科大学, 天津 300070)

[摘要] **目的:**观察羟基红花黄色素 A (hydroxysafflower yellow A, HSYA) 联合黄芪甲苷-IV (astragaloside-IV, As-IV) 对重组肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导人脐静脉内皮细胞 EA. hy926 凋亡的影响。**方法:**噻唑蓝 (MTT) 比色法检测不同浓度 TNF- α (0, 10, 20, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), HSYA (0, 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), As-IV (0, 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对细胞活力的影响以及 HSYA 联合 As-IV (1×10^{-5} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 TNF- α (20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 损伤细胞活力的影响。蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测不同浓度 TNF- α 对 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 活化的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cleaved Caspase-3), 活化的天冬氨酸蛋白水解酶-9 (cleaved Caspase-9) 蛋白表达的影响, 以及 HSYA 联合 As-IV 对上述蛋白表达是否具有改善作用。实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导 Bcl-2 基因表达的影响, 免疫荧光技术分析 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响。**结果:**与空白组比较, TNF- α 在 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可诱导 EA. hy926 细胞活力下降, 上调 Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白的表达, 下调 Bcl-2 蛋白的表达; 与 TNF- α 组比较, HSYA 联合 As-IV 预处理组可减少 TNF- α 诱导的细胞活力下降, 抑制 Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白的表达, 增加 Bcl-2 蛋白的表达, 且 HSYA 联合 As-IV 预处理组对上述指标的改善效果优于 HSYA 或 As-IV 单独预处理组。**结论:** HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导的 EA. hy926 细胞凋亡具有抑制作用, 且效果优于单药, 其机制可能与其下调 Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 和上调 Bcl-2 的表达有关。

[关键词] 羟基红花黄色素 A; 黄芪甲苷-IV; 内皮细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5; R256.2; R242; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0088-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050088

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1526.030.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:26

Effect of Hydroxysafflor Yellow A Combined with Astragaloside-IV on Apoptosis of Endothelial Cells Induced by TNF- α

LU Fen-ping¹, SU Ning¹, ZHU Ming-ming¹, ZHENG Zong-mei¹, SHEN Yu-jun²,
LIU Ting-yu¹, SHI Hong-fei^{1*}

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

2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of hydroxysafflower yellow A (HSYA) combined with astragaloside-IV (As-IV) on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells EA. hy926 induced by human recombinant tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Method:** The effects of different concentrations of TNF- α (0, 10, 20, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), HSYA (0, 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), As-IV (0, 1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the cell viability of EA. hy926, as well as the effect of HSYA combined with As-IV (1×10^{-5} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the viability of EA. hy926 cells induced by TNF- α (20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were measured by

[收稿日期] 20170908(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81574044)

[第一作者] 卢芬萍, 在读硕士, 从事心血管方向的研究, Tel: 15850790693, E-mail: fplu@njucm.edu.cn

[通信作者] * 施洪飞, 博士, 教授, 从事中西医结合营养基础与临床研究, Tel: 18362908558, E-mail: hfshi@njucm.edu.cn

thiazole blue method (MTT) assay; Western blot assay was used to detect the effect of different concentrations of TNF- α on the expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) and cleaved Caspase-9 proteins, and the effect of HSYA combined with As-IV in improving expressions of the above proteins. Real-time PCR assay was used to observe the effect of HSYA combined with As-IV on the expression of Bcl-2 gene induced by TNF- α . Immunofluorescence technique was used to analyze the effect of HSYA combined with As-IV on the expressions of Bcl-2 and Bax proteins induced by TNF- α . **Result:** Compared with the blank group, TNF- α could induce the activity of EA. hy926 cells at 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, up-regulate the expressions of Bax, cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9, and down-regulate the expression of Bcl-2. Compared with TNF- α group, HSYA combined with As-IV pretreatment group could decrease the cell viability induced by TNF- α , inhibit the expressions of Bax, cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9, and increase the expression of Bcl-2 induced by TNF- α . The effect of HSYA combined with As-IV pretreatment group was better than that of single use of HSYA or As-IV pretreatment group. **Conclusion:** HSYA combined with As-IV has an inhibitory effect on the apoptosis of EA. hy926 cells induced by TNF- α , with a better effect than that of single drug. The mechanism may be related to the down-regulation of expressions of Bax, cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 and the up-regulation of Bcl-2 expression.

[**Key words**] hydroxysafflower yellow A (HSYA); astragaloside-IV (As-IV); endothelial cell; cell apoptosis

2005 年至 2015 年,因缺血性心脏病(IHD)死亡的人数从 7 648.4 万增长至 8 917 万,在中国,心血管病死亡居于总死亡原因的第 2 位^[1]。缺血再灌注(I/R)是目前治疗 IHD 的主要手段,而该手段使原缺血心肌在代谢、结构、功能等方面发生较血供恢复前更严重甚至不可逆的损伤,从而导致再灌注后不良心血管事件的发生^[2]。

中医认为短时间恢复冠脉血流,只是祛除了瘀血,脏气虚损仍存在,且容易耗伤心气,引起再灌注区脉络受损,脉道不畅,从而加重心肌损伤^[3]。因此,再灌注同时给予益气活血法,可能改善 I/R 造成的损伤。目前关于益气活血法改善缺血心肌损伤的研究颇多,李鑫辉等^[4]研究发现加味丹参饮(丹参、檀香、赤芍、川芎、当归、红花、地黄、黄芪)可改善 I/R 兔的血液流变学状态,调节血管内皮功能;王雪玲^[5]研究发现脑心通胶囊(桃仁、当归、红花、丹参、乳香、川芎、没药、黄芪等)可明显改善冠心病患者肱动脉内皮依赖血管舒张功能和临床症状;藕二祥^[6]研究发现益气活血方(人参、黄芪、党参、丹参、川芎、赤芍、红花)改善冠心病心绞痛患者的小血小板活化,心肌缺血等症状。这些益气活血方中皆含有黄芪和红花 2 味药物。因此,本研究以此为基础探索黄芪配伍红花对血管内皮细胞损伤是否具有改善作用。

黄芪具有益气功效,黄芪甲苷(As-IV)是其关键有效化学成分^[7]。红花具有活血通经、化瘀止痛功效,羟基红花黄色素 A (HSYA)是红花中最具代

表性的活性成分^[8],二者配伍共具益气活血功效。JIA 等^[9]研究表明黄芪甲苷通过引导蛋白激酶 B (Akt)和促凋亡基因 Bad 的磷酸化显著抑制线粒体凋亡通路的活性,从而恢复 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)与 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的比率,减少细胞色素 C 的释放及天冬氨酸蛋白水解酶-9 (Caspase-9)与天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3)的激活。JI 等^[10]研究发现,HSYA 可保护血管内皮细胞的缺氧损伤,通过缺氧诱导因子 1- α -血管内皮生长因子(HIF-1 α -VEGF)途径的上调来升高缺氧诱导的 Bcl-2 与 Bax 的比率,从而抑制缺氧细胞凋亡。但是目前关于 HSYA 联合 As-IV 抑制血管内皮细胞凋亡的机制研究尚少。因此,本研究以人脐静脉内皮细胞株 EA. hy926 为体外模型,通过观察 HSYA 联合 As-IV 对血管内皮细胞凋亡相关基因 Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 表达的影响,探索 HSYA 联合 As-IV 改善血管内皮细胞凋亡的作用机制,为阐明黄芪与红花改善心肌缺血再灌注损伤的作用及机制提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞 人脐静脉内皮细胞 EA. hy926 细胞株(中国科学院上海细胞库)。

1.2 仪器 3131 型 CO₂ 培养箱, Multiskan Specturm 型酶标仪(美国 Thermo 公司); CKX31 型倒置荧光显微镜(日本尼康公司); 1658000 型电泳仪, 1703940 型半干转膜仪, 1708265 型凝胶成像系

统,1708265型荧光实时定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 药物与试剂 As-IV(美国Sigma公司,批号JY0001171); HSYA(中国阿拉丁公司,批号H117996);重组人肿瘤坏死因子- α (TNF- α);胰蛋白酶、不完全高糖培养基(凯基生物,批号分别为AF-300-01A, kgy0012, kgm12800-250);胎牛血清(美国Gibco公司,批号10099-141);噻唑蓝(MTT,中国索莱宝公司,批号m8180-250);逆转录试剂盒, qPCR试剂盒(南京诺唯赞公司,批号分别为R223-01, Q321-02);蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司,批号kgp250);抗人Bcl-2, Bax, Caspase-9, Caspase-3抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为4223s, 5023s, 502s, 14220s); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(上海碧云天生物技术有限公司,批号aa128);二甲基亚砜(DMSO,中国索莱宝公司,批号d8370-100);DAPI染色液、免疫荧光染色试剂盒(抗兔FITC)(中国碧云天公司,批号分别为c1005, p0186)。HSYA, As-IV分别以DMSO溶解,储备浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

2 方法

2.1 细胞培养 EA.hy926细胞培养在含10%胎牛血清, $80 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, $0.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的DMEM高糖培养基中,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 恒温培养箱中培养,每2 d换液1次,待细胞长满至80%左右单层时,用0.25%胰蛋白酶溶液进行消化、传代。取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 MTT法检测不同浓度TNF- α , HSYA, As-IV对细胞活力的影响,以及HSYA联合As-IV对TNF- α 损伤细胞活力的影响

2.2.1 检测不同浓度TNF- α 对细胞活力的影响
取对数生长期的细胞,制成细胞悬液,接种于96孔板,每孔5 000个细胞,实验组加入不同质量浓度的TNF- α (10, 20, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),同时设置空白组,每组设置5个复孔,置于 37° 5% CO_2 培养箱中处理24 h,加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT溶液20 μL ,继续孵育4 h,弃上清加入DMSO 200 μL ,孵育震荡10 min,待结晶溶解后用酶标仪490 nm测定吸光度A。以测定不同浓度TNF- α 对细胞活力的影响。

2.2.2 检测不同浓度HSYA, As-IV对细胞活力的影响
细胞接种方法同2.2.1项,实验组加入不同浓度的HSYA(1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), As-IV(1×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),空白组细胞以0.1% DMSO处

理,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中处理24 h,检测方法同2.2.1项,以确定不同浓度HSYA, As-IV对细胞活力的影响。

2.2.3 检测HSYA联合As-IV对TNF- α 损伤细胞活力的影响
细胞接种方法同2.2.1项,实验组分为4组,HSYA($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + TNF- α (20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), As-IV($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + TNF- α (20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), HSYA + As-IV($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + TNF- α (20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),干预方法为HSYA, As-IV, HSYA联合As-IV分别预处理24 h后,每组给予TNF- α 干预24 h,对照组细胞以0.1% DMSO处理,检测方法同2.2.1项,以确定HSYA联合As-IV对TNF- α 损伤细胞活力的影响

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9蛋白表达
取对数生长期细胞,制成悬液,接种于60 mm培养皿,24 h后,单独TNF- α (0, 10, 20, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)干预24 h后收集细胞; HSYA($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), As-IV($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), HSYA联合As-IV($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预处理24 h后每组给予TNF- α (20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)干预24 h,空白组细胞以0.1% DMSO处理,常规收集细胞。用PBS洗2次,按照总蛋白提取试剂盒说明提取总蛋白, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。用BCA法进行蛋白定量。取蛋白质样品40~60 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜,对膜依次进行封闭、一抗(1:1 000)4 $^\circ\text{C}$ 过夜、二抗(1:10 000)室温孵育1 h。用ECL化学发光液显影,采用ImageJ软件对免疫印迹条带扫描后进行灰度值分析。

2.4 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测HSYA联合As-IV对TNF- α 诱导Bcl-2 mRNA表达的影响
取对数生长期细胞,制成悬液,接种于60 mm培养皿,24 h后,分组及干预方法同2.2.3项。常规收集细胞, PBS洗2次,按照trizol法提取总RNA,测定RNA浓度,逆转录合成cDNA,反应条件为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min; $85 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 min。然后按Real-time PCR试剂盒说明书配置反应体系,每组设3个平行样,进行Real-time PCR实验。预变性过程: $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s;扩增过程: $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 s; $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 s, 40个循环;延伸过程: $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 s; $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 s; $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 s。引物Bcl-2,上游5'-ATCACCAGCAGCAAGTGCCCA-3',下游5'-TGGAGTGAGTGTCAAGTCTTCGGA-3',片段长度153 bp。以 β -actin为内参,上游5'-CGGGACCTGACAGACTACCTC-3',下游5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCCA-3',片段长度540 bp(江苏

睿捷生物公司合成)。最终用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

2.5 细胞免疫荧光分析 Bcl-2, Bax 蛋白的表达 将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,制成悬液,按每孔 3 000 个细胞分别接种于铺有灭菌盖玻片爬片的 24 孔板中,待细胞贴壁 24 h 后,分组及干预方法同 2.2.3 项, TBST 清洗,多聚甲醛固定, 0.75% H_2O_2 500 μ L 孵育 30 min 消除非特异性反应, TBST 清洗,加入 5% BSA 封闭 1 h,加入一抗(1:1 00), 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗去一抗后,加 FITC 荧光标记的二抗(1:1 000),孵育 1 h, TBST 清洗,加 DAPI 染色液孵育 5 min, TBST 清洗 15 min,吸干,滴入抗荧光淬灭封片液于培养皿底部,荧光倒置显微镜观察与分析。

2.6 统计学方法 数据以 GraphPad Prism 统计软件处理分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间的数据比较采用 ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各实验组重复 3 次以上。

3 结果

3.1 不同浓度 TNF- α , HSYA, As-IV 对 EA. hy926 细胞活力的影响 与空白组比较, TNF- α 质量浓度为 20 μ g \cdot L $^{-1}$ 时,明显促进细胞凋亡 ($P < 0.01$)。当 HSYA, As-IV 浓度为 1×10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ 时,对细胞活力无影响,因此 2 味药物均选取 1×10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ 作为后续实验的干预浓度(表 1)。

表 1 TNF- α , HSYA, As-IV 对 EA. hy926 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 1 Effect of TNF- α HSYA, As-IV on viability of EA. hy926 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	浓度	24 h 活力/%
TNF- α	0 μ g \cdot L $^{-1}$	100.25 \pm 2.75
	10 μ g \cdot L $^{-1}$	99.75 \pm 1.50 ²⁾
	20 μ g \cdot L $^{-1}$	90.25 \pm 1.89 ²⁾
	50 μ g \cdot L $^{-1}$	78.00 \pm 4.16
HSYA	0 mol \cdot L $^{-1}$	100.00 \pm 5.29
	1×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$	104.50 \pm 9.15
	5×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$	100.25 \pm 7.09
	1×10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$	100.50 \pm 5.80
	1×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$	84.75 \pm 4.43 ¹⁾
As-IV	0 mol \cdot L $^{-1}$	100.25 \pm 5.68
	1×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$	107.00 \pm 16.79
	5×10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$	123.75 \pm 18.48 ¹⁾
	1×10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$	109.00 \pm 3.56
	1×10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$	67.00 \pm 7.44 ²⁾

注:与本组空白浓度比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 损伤 EA. hy926 细

胞活力的影响 与空白组比较, TNF- α 组细胞活力下降 ($P < 0.01$); 与 TNF- α 处理组比较, HSYA 联合 As-IV 可明显抑制 TNF- α 对细胞活力的损伤作用 ($P < 0.01$), 表明 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 损伤 EA. hy926 细胞活力具有抑制作用(表 2)。

表 2 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 损伤 EA. hy926 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

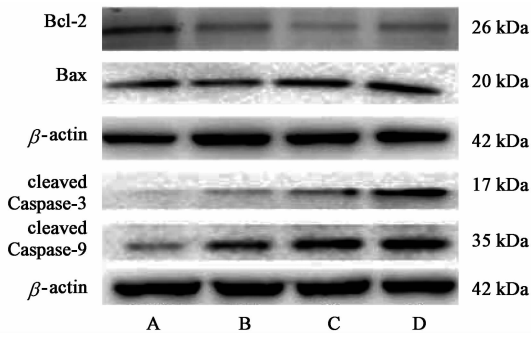
Table 2 Effect of medicine on viability of EA. hy926 cells induced by TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	浓度/mol \cdot L $^{-1}$	24 h 活力/%
空白	-	100.25 \pm 2.75
TNF- α	-	78.25 \pm 4.57 ²⁾
HSYA	1×10^{-5}	79.50 \pm 1.29
As-IV	1×10^{-5}	81.00 \pm 3.74
HSYA + As-IV	$1 \times 10^{-5} + 1 \times 10^{-5}$	95.75 \pm 0.96 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 TNF- α 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

3.3 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导 Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白表达的影响 不同浓度 TNF- α 作用细胞 24 h 后,实验结果显示,与空白组比较, TNF- α 处理组 cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白的表达水平均明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$), 且呈一定的剂量依赖效应; Bax 蛋白表达水平在 TNF- α 浓度为 20 μ g \cdot L $^{-1}$ 时明显升高 ($P < 0.05$) (图 1, 表 3), 以上结果表明 TNF- α 在质量浓度为 20 μ g \cdot L $^{-1}$ 可显著调控凋亡相关蛋白诱导血管内皮细胞凋亡。用 HSYA 和 As-IV 预处理 24 h 后, TNF- α 干预 24 h, 实验结果显示, 与 TNF- α 组比较, HSYA, As-IV, HSYA 联合 As-IV 组 Bcl-2 蛋白的表达均明显升高, 且联合处理组效果优于单药组 ($P < 0.01$); HSYA 联合 As-IV 组 Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), 而 HSYA, As-IV 组无统计学意义(图 2, 表 4)。HSYA, As-IV, HSYA 联合 As-IV + TNF- α 组 cleaved Caspase-3 蛋白的表达均降低 ($P < 0.01$), 3 组间比较差异无统计学意义; HSYA, HSYA 联合 As-IV 组 cleaved Caspase-9 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且二者之间效果无统计学差异, 而 As-IV 组无显著差异(图 2, 表 4)。综上所述, 与 TNF- α 组比较, HSYA 联合 As-IV 可以上调 Bcl-2 蛋白的表达, 下调 Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白的表达。

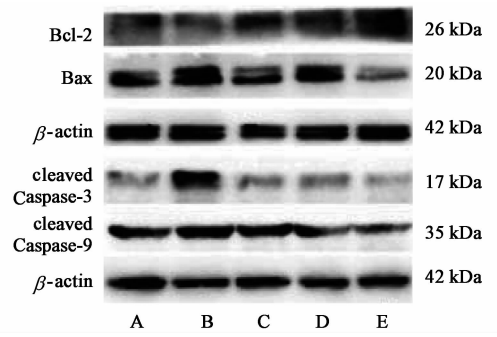
3.4 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导 Bcl-2 mRNA 表达的影响 药物预处理 24 h 后, TNF- α 干预 24 h, 与空白组比较, TNF- α 诱导组 Bcl-2 基因表达增加,



A ~ D. TNF-α 0, 10, 20, 50 μg·L⁻¹ 组

图 1 TNF-α 对 EA. hy926 细胞中 Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of TNF-α on intracellular expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9



A. 空白组; B. TNF-α 组; C. HSYA 组; D. As-IV 组; E. HSYA + As-IV 组 (图 3, 4 同)

图 2 HSYA 联合 As-IV 对 TNF-α 诱导 EA. hy926 细胞中 Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of medicine on intracellular expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 induced by TNF-α

表 3 TNF-α 对 EA. hy926 细胞中 Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of TNF-α on intracellular expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/μg·L ⁻¹	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	cleaved Caspase-3/β-actin	cleaved Caspase-9/β-actin
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
TNF-α	10	0.44 ± 0.14 ²⁾	1.10 ± 0.15	2.45 ± 0.56	1.75 ± 0.28
	20	0.33 ± 0.17 ²⁾	2.21 ± 0.69 ¹⁾	3.33 ± 0.91 ¹⁾	2.41 ± 0.18 ¹⁾
	50	0.20 ± 0.08 ²⁾	1.57 ± 0.05	3.58 ± 0.82 ²⁾	3.32 ± 0.74 ²⁾

表 4 药物对 EA. hy926 细胞中 Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of medicine on intracellular expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	cleaved Caspase-3/β-actin	cleaved Caspase-9/β-actin
空白	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
TNF-α	-	0.03 ± 0.00 ²⁾	1.43 ± 0.14 ¹⁾	3.24 ± 0.64 ²⁾	3.06 ± 0.48 ²⁾
HSYA	1 × 10 ⁻⁵	0.26 ± 0.01 ^{4,6)}	1.28 ± 0.24	1.01 ± 0.20 ⁴⁾	2.01 ± 0.32 ³⁾
As-IV	1 × 10 ⁻⁵	0.13 ± 0.02 ^{4,6)}	1.11 ± 0.18	1.11 ± 0.25 ⁴⁾	2.47 ± 0.44
HSYA + As-IV	1 × 10 ⁻⁵ + 1 × 10 ⁻⁵	0.43 ± 0.26 ⁴⁾	0.37 ± 0.12 ⁴⁾	0.45 ± 0.04 ⁴⁾	1.51 ± 0.16 ⁴⁾

表 5 药物对 TNF-α 诱导 EA. hy926 细胞中 Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of medicine on mRNA expression of Bcl-2 in EA. hy926 induced by TNF-α ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	Bcl-2
空白	-	1.00 ± 0.00
TNF-α	-	2.93 ± 0.17
HSYA	1 × 10 ⁻⁵	5.67 ± 0.66
As-IV	1 × 10 ⁻⁵	10.35 ± 2.85 ⁴⁾
HSYA + As-IV	1 × 10 ⁻⁵ + 1 × 10 ⁻⁵	10.66 ± 0.80 ⁴⁾

但差异无统计学意义;与 TNF-α 组比较, As-IV 组, HSYA 联合 As-IV 组 Bcl-2 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$), 两组干预效果无统计学差异; As-IV 组无统计学意义(表 5)。

3.5 免疫荧光分析 HSYA 联合 As-IV 对 TNF-α 诱导 EA. hy926 细胞中 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

与空白组比较, TNF-α 组 Bcl-2 荧光表达强度较低, Bax 荧光表达强度较高, 与 TNF-α 组比较, HSYA, As-IV, HSYA 联合 As-IV 组 Bcl-2 荧光表达强度较高, Bax 荧光表达强度较低, 而联合比单药组效果更明显(图 3, 4)。

4 讨论

缺血性心脏病最常见的原因是冠状动脉粥样硬化引起的冠状动脉狭窄和闭塞^[11]。而再灌注治疗将加剧心肌损伤的严重性, 再灌注损伤与 Ca²⁺ 超载、细胞凋亡、坏死、微血栓形成、血小板聚集、能量代谢障碍以及 TNF-α, 白细胞介素-6 (IL-6), C-反应蛋白 (CRP) 等炎症介质的释放有关^[12]。

缺血性心脏病属中医“真心痛”、“胸痹”等范畴, 其病机是“气虚血瘀, 脉络不畅”, 治法宜益气活血。本课题前期研究结果发现, HSYA 和 As-IV 配伍

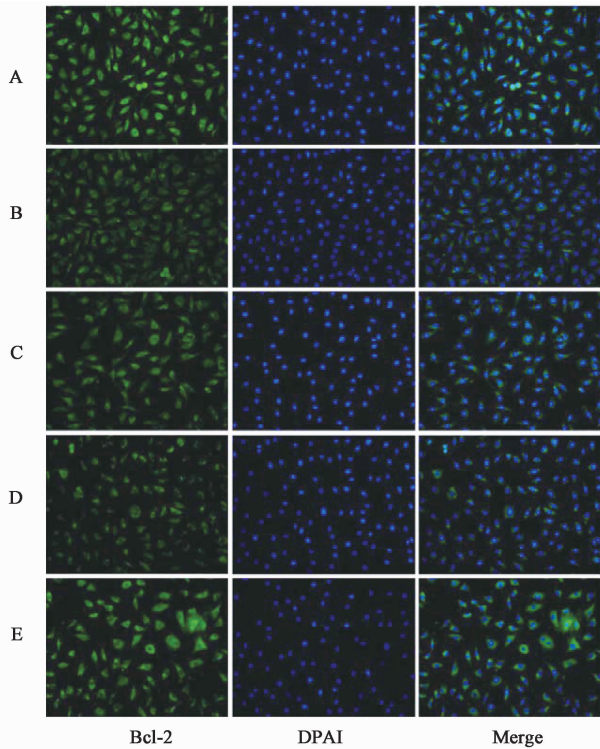


图 3 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导 EA. hy926 细胞中 Bcl-2 蛋白表达的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of HSYA combined with As-IV on expression of Bcl-2 protein in EA. hy926 cells induced by TNF- α (immunofluorescence, $\times 200$)

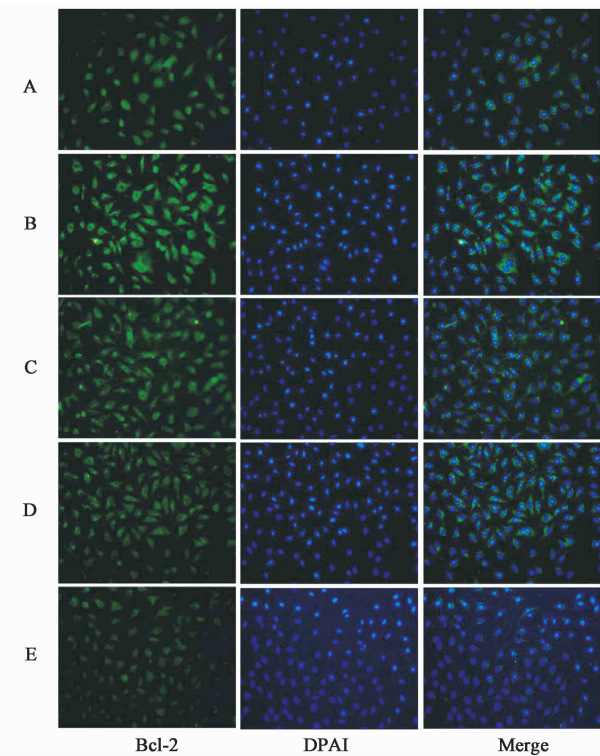


图 4 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导 EA. hy926 细胞中 Bax 蛋白表达的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of HSYA combined with As-IV on expression of Bax protein in EA. hy926 cells induced by TNF- α (immunofluorescence, $\times 200$)

可通过改善血管内皮细胞的内分泌功能,调节血管舒缩状态,抗氧化等机制对缺血心肌发挥保护作用,且效果优于单药^[13-15]。在前期研究的基础上,探讨红花与黄芪关键活性成分 HSYA 与 As-IV 联合保护 I/R 损伤的可能机制。

心肌缺血再灌注的同时可导致 TNF- α 自分泌上调,并作用于血管内皮细胞,通过各种途径诱发细胞凋亡^[16]。本研究结果显示, TNF- α 处理血管内皮细胞,随着 TNF- α 浓度的升高,细胞活力逐渐下降,这与上述研究报道一致。Scarabelli 等^[17]研究发现,在 I/R 的早期阶段,一些微小冠脉血管内皮细胞最先凋亡,并释放可溶性促凋亡介质促进周围心肌细胞凋亡。细胞凋亡可能是 I/R 损伤发病机制中的关键环节之一。及时控制血管内皮细胞的凋亡成为降低 I/R 损伤的重要途径。本课题通过 MTT 法检测内皮细胞活力发现, TNF- α 诱导细胞活力下降,而 HSYA 联合 As-IV 预处理组可有效改善细胞活力下降,表明 HSYA 联合 As-IV 对 TNF- α 诱导细胞活力下降具有抑制作用。

Bcl-2 多基因家族,可双向调节细胞凋亡。Bcl-2 与 Bcl-xL 主要结合在线粒体外膜,通过抑制细胞色素 C 释放及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族的激活发挥抗凋亡作用^[18]; Bax 在功能上与 Bcl-2 相反,其促进细胞凋亡的机制一方面可能是与 Bcl-2 结合形成异源二聚体,抑制 Bcl-2 的功能;另一方面可通过 Bax/Bax 同源二聚体易位到线粒体后破坏线粒体膜的功能,启动 Caspase 系统级联反应,导致细胞凋亡^[19]。Brocheriou 等^[20]研究发现 Bcl-2 转基因鼠的心肌缺血-再灌注模型与对照组比较,梗死面积和凋亡细胞数均减少,提示 Bcl-2 具有抗心肌细胞凋亡的作用。XIE 等^[21]研究 Bcl-2 和 Bax 在大鼠 I/R 损伤心肌的再灌注区和非再灌注区表达的不同,结果在再灌注区未发现 Bcl-2 表达而 Bax 表达增加,即 Bcl-2 和 Bax 表达的多少可影响细胞凋亡的严重程度。本实验研究表明随着 TNF- α 浓度升高, EA. hy926 细胞中 Bcl-2 蛋白表达逐渐降低,且具有一定的剂量依赖效应; Bax 蛋白与空白组比较表达升高。HSYA 联合 As-IV 可以有效的降低 TNF- α 诱导的凋亡蛋白 Bax 的表达,提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,与单独 HSYA, As-IV 处理组比较,改善效应更加显著。

Caspase 家族在调控细胞凋亡中也具有重要的作用。Caspase 家族是一类特殊的蛋白水解酶家族, Caspase-9 的活化主要在内皮细胞,活化的 Caspase-9

会激活 Caspase-3^[22],而 Caspase-3 是激活凋亡刺激因子的关键蛋白酶,在凋亡级联反应中处于核心地位,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[23]。研究表明,Caspase-3 介导的凋亡参与了 I/R 损伤形成,其可引起 DNA 损伤修复酶降解,同时激活核酸内切酶,从而导致细胞凋亡,加重心肌损伤^[24]。本研究发现,TNF- α 可诱导 EA.hy926 细胞中凋亡蛋白 cleaved Caspase-3,cleaved Caspase-9 表达上调,且呈一定的剂量依赖效应,而 HSYA 联合 As-IV 可以有效地降低 TNF- α 诱导的凋亡蛋白 cleaved Caspase-3,cleaved Caspase-9 的表达,与单独 HSYA,As-IV 预处理组比较,具有较稳定的改善效应。

综上所述,本研究表明 HSYA 与 As-IV 联合可抑制血管内皮细胞的凋亡,改善 I/R 造成的损伤,且效果优于单药,其机制与抑制促凋亡蛋白 Bax,cleaved Caspase-3,cleaved Caspase-9,激活抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达有关。I/R 损伤的作用机制涉及诸多因素,还需进一步深入研究,及时的控制血管内皮细胞的凋亡,防止凋亡扩散,有望成为药物治疗缺血性心脏病的药物靶点。

[参考文献]

[1] WANG H, Naghavi M, Allen C, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015[J]. Lancet, 2016, 388(10053): 1459-1544.

[2] Ujueta F, Weiss E N, Shah B, et al. Effect of percutaneous coronary intervention on survival in patients with stable ischemic heart disease[J]. Curr Cardiol Rep, 2017, 19(2): 1-17.

[3] 王宁,严冬. 中医药抗心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(2): 188-191.

[4] 李鑫辉,黄政德,喻嵘,等. 益气活血法对血瘀证心肌缺血再灌注损伤兔血液流变性及内皮素的影响[J]. 中国中医急症,2010,19(2):269-271.

[5] 王雪玲. 益气活血法对冠心病多重危险因素及稳定型心绞痛患者内皮功能影响的临床探讨[J]. 临床医学研究与实践,2016, 24(1):9-10,13.

[6] 藕二祥. 益气活血法对冠心病心绞痛患者血小板活化功能的影响[J]. 中国中医急症, 2011,20(1): 122-123.

[7] 陈靖宇,陈铁龙. 黄芪甲苷对心肌细胞保护作用的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(9): 980-983.

[8] 牛凯,张宇,郑为超. 羟基红花黄色素 A 与心血管作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(12): 70-72.

[9] JIA Y, ZUO D, LI Z, et al. Astragaloside IV inhibits doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis mediated by mitochondrial apoptotic pathway via activating the PI3K/Akt pathway[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2014, 62(1): 45-53.

[10] JI D B, ZHU M C, ZHU B, et al. Hydroxysafflor yellow A enhances survival of vascular endothelial cells under hypoxia via upregulation of the HIF-1 alpha-VEGF pathway and regulation of Bcl-2/Bax[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2008, 52(2): 191-202.

[11] 翟恒博,刘俊. 缺血性心脏病再认识[J]. 心血管病学进展, 2016, 37(4): 395-400.

[12] Turer A T, Hill J A. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy[J]. Am J Cardiol, 2010, 106(3): 360-368.

[13] 王强,施洪飞,赵光辉,等. 红芪复方对心肌缺血犬心肌梗死与血液酶学作用研究[J]. 中成药, 2011, 33(12): 2160-2162.

[14] 王强,施洪飞. 红芪复方预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35(9): 659-664.

[15] 苏宁,卢芬萍,朱明明,等. 黄芪甲苷联合羟基红花黄色素 A 对小鼠心肌梗死的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):98-103.

[16] Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF- α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure [J]. Pharmacol Therapeut, 2010, 127(3): 295-314.

[17] Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, et al. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury [J]. Circulation, 2001, 104(3): 253-256.

[18] 张雯,宋俊科,杜冠华. 缺血再灌注损伤与细胞凋亡信号转导通路[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(7): 565-569.

[19] 李伟,沈明勤,陆晓晖. 中药防治心肌缺血再灌注损伤作用机制的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(3): 549-553.

[20] Brocheriou V, Hagège A A, Oubena Ssa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury[J]. J Gene Med, 2000, 2(5): 326-333.

[21] XIE Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia[J]. Jpn Heart J, 2001, 42(6): 759-770.

[22] Scarabelli T M, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium[J]. Curr Probl Cardiol, 2006, 31(3): 181-264.

[23] Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1): 87-95.

[24] Nicholson D W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(11): 1028-1042.

[责任编辑 邹晓翠]