

刺囊酸对缺氧复氧诱导心肌细胞凋亡相关基因表达的影响

陈杰¹, 沈映冰², 许静³, 官碧琼³, 罗子玲³

(1. 中山大学附属第一医院药学部, 广东省广州市 510008; 2. 中山大学附属第六医院药剂科, 广东省广州市 510655; 3. 南方医科大学第三附属医院药剂科, 广东省广州市 510630)

[关键词] 刺囊酸; 缺氧复氧损伤; 心肌细胞; 凋亡相关基因

[摘要] **目的** 研究刺囊酸预处理对原代培养的 SD 乳鼠心肌细胞缺氧复氧损伤诱导的心肌细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 及聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP 89 kDa) 表达的影响。**方法** 实验随机分为 6 组: 对照组, 缺氧复氧损伤组, 缺氧预处理组及低、中、高剂量刺囊酸组 (0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$), 分别予以缺氧 3 h 后再复氧 2 h, 检测细胞存活率、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性, Western Blot 杂交法检测心肌细胞 Bcl-2、Bax 及 PARP (89 kDa) 蛋白表达变化。**结果** 与对照组比较, 缺氧复氧损伤组心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.01$), Bax 蛋白及 PARP (89 kDa) 表达显著高于对照组 ($P < 0.01$), 细胞存活率明显低于对照组 ($P < 0.05$)。与缺氧复氧损伤组比较, 不同剂量的刺囊酸预处理能显著提高细胞存活率, 降低 LDH 活性, 呈剂量依赖性; 中剂量刺囊酸显著增加 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.05$), 抑制 Bax 及 PARP (89 kDa) 蛋白表达 ($P < 0.05$)。**结论** 刺囊酸预处理可通过上调 Bcl-2 蛋白表达, 抑制 PARP (89 kDa) 及 Bax 蛋白表达, 抑制细胞凋亡, 对抗心肌细胞缺氧复氧损伤。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Echinocystic Acid on the Expression of Apoptosis-Associated Gene in the Rat Cardiomyocytes Subjected to Anoxia /Reoxygenation Injury

CHEN Jie¹, SHEN Ying-Bing², XU Jing³, GUAN Bi-Qiong³, and LUO Zi-Ling³

(1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Department of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510655, China; 3. Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

[KEY WORDS] Echshinone Acid; Anoxia/Reoxygenation Injury; Cardiomyocyte; Apoptosis-Associated Gene

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of Echinocystic acid on the protein expression of apoptosis-associated Bcl-2, Bax and PARP (89 kDa) in the primary cultured rat cardiomyocytes subjected to anoxia/reoxygenation injury.

Methods The cardiomyocytes were divided into normal group, anoxia/reoxygenation injury group, anoxia/reoxygenation preconditioning group, different concentration Echinocystic acid groups (0.5 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$). Cardiomyocytes were subjected to anoxia for 3 hours and subsequently reoxygenation for 2 hours. Cell viability and LDH activity in medium were measured. The expression of Bcl-2 and the apoptotic protein Bax and PARP (89 kDa) were detected by Western Blot.

Results Compared with that of the control group, the expression of Bcl-2 protein in cardiomyocytes decreased significantly ($P < 0.01$) and the expression of Bax protein and PARP (89 kDa) in cardiomyocytes increased significantly ($P < 0.01$) after reoxygenation. Cell viability decreased obviously ($P < 0.05$). Compared with that of the anoxia/reoxygenation group, pretreatment with different concentration Echinocystic acid decreased LDH activity and increased cell viability ($P < 0.05$), the expression of Bcl-2 protein in the Echinocystic acid (5 $\mu\text{mol/L}$) groups increased significantly ($P < 0.05$) and the expression of Bax protein decreased significantly ($P < 0.05$).

Conclusion The antiapoptotic effects of Echinocystic acid might be attributed to the up-regulated expression of Bcl-2 gene and the inhibited expression of Bax and PARP (89 kDa) gene expression.

[收稿日期] 2012-01-26

[基金项目] 广东省自然科学基金(8451008901000788)

[作者简介] 陈杰, 博士, 主管药师, 研究方向为心血管药理学与临床药学, E-mail 为 chenjiezs@163.com。通讯作者许静, 硕士, 主管药师, 研究方向为心血管药理学与临床药学, E-mail 为 hsujiing77@163.com。

研究表明凋亡是急性心肌缺血再灌注过程中细胞的死亡形式之一^[1],而细胞凋亡的发生受多种基因表达的调控,其中 Bcl-2、Bax 及聚二磷酸腺苷核糖聚合酶[PARP(89 kDa)]基因表达变化与凋亡的关系倍受关注。设想通过药物干预凋亡相关基因的表达,以降低缺血再灌注过程中心肌细胞发生凋亡的程度,从而可为缺血再灌注损伤的防治提供新方法。刺囊酸(Echinocystic acid)可以显著抑制大鼠肝星状细胞系 HSC/T6 的增殖,具有抗肝纤维化活性^[2],还具有诱导 HepG2 及 HL-60 凋亡作用^[3,4],另外,对异丙肾上腺素及加压素诱导的大鼠急性心肌缺血模型具有保护作用,可以防止 ST 段压低^[5],尚未见是否对心肌缺血再灌注损伤凋亡作用的影响之报道。本研究旨在观察刺囊酸对缺氧复氧(anoxia/reoxygenation, A/R)诱导心肌细胞凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 及 PARP(89 kDa)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器

SW-CJ-2FD 型超净化工作台(苏州苏净集团安泰公司);METTLER AE260 电子天平(美国 METTLER 公司);Thermo Multiskan MK3 型酶标仪、Thermo Scientific Series 8000 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);DU640 紫外分光核酸蛋白分析仪(美国 BECKMAN 公司);Mini-PROTEAN3 电泳系统、Mini Trans-Blot 转移系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 试剂

刺囊酸单体(南京春秋生物工程有限公司,批号:510-30-5-201101,纯度 98%,规格 5 mg/支);MTT(美国,Amersco 公司产品,批号:20110228);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所产品,批号:20110229);Bcl-2、Bax、 β -actin 小鼠抗大鼠多克隆抗体及 PARP 兔抗大鼠多克隆抗体和羊抗小鼠 IgG 抗体(二抗)、羊抗兔(二抗)(美国,Santa Cruz 公司产品,批号 sc-7382,批号 sc-4239,批号 sc-4634,批号 sc-4409,批号 sc-4012);其它试剂均为分析纯标准。

1.3 动物

SD 新生大鼠(1~3 天),体重 5~10 g,雌雄不拘(合格证号 SCXK20110011),由中山大学实验动物中心提供。

1.4 心肌细胞的分离培养

取出乳鼠心脏,剪碎 0.1%胰酶消化,用含 10%

胎牛血清的 DMEM 培养基混悬后置 CO₂ 培养箱培养 2 h,将悬浮的心肌细胞过 200 目不锈钢网,计算细胞悬液中台盼蓝负染的活细胞数,达 90% 以上进行培养。头 3 天加入终浓度为 0.1 mmol/L BrdU 抑制纤维细胞生长,培养第 4 天随机分组进行实验。

1.5 MTT 试验

取对数期生长的细胞接种于 96 孔板,每孔 1×10^5 个细胞,细胞贴壁后,用 MTT 试验法筛选出刺囊酸 0.5 μ mol/L ~ 80 μ mol/L 药物无毒的浓度用于实验。

1.6 实验分组

实验随机分为 6 组。对照组:换正常培养液持续 5% CO₂、37℃ 孵育 5 h。缺氧复氧损伤组:按本实验室报道的方法^[6],用模拟缺氧缺糖溶液轻洗三次,换用模拟缺氧缺糖溶液将培养板置于持续 95% N₂、5% CO₂ 平衡的缺氧密闭容器中 37℃ 孵育 3 h,再换上模拟再灌注液,以 95% O₂、5% CO₂ 进行复氧 37℃ 孵育 2 h。缺氧预处理组:缺氧 10 min,再复氧 10 min,重复三次,进行 A/R 操作。低、中、高剂量刺囊酸组:各孔分别加入终浓度为 0.5 μ mol/L、5 μ mol/L 和 50 μ mol/L 的刺囊酸预处理 1 h 之后,进行 A/R 操作。

1.7 细胞存活率检测

培养于 96 孔培养板心肌细胞,接种密度为 10^5 个细胞。实验结束后各组每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μ L,孵育 4 h,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。设不加细胞只加孵育液的空白对照。取 8 孔平均值计算细胞存活率,细胞存活率 = (试验组光吸收值/对照组光吸收值) \times 100%。

1.8 乳酸脱氢酶活性检测

实验结束后各组分别取孵育液 200 μ L,用试剂盒测量 LDH 的活性。

1.9 心肌细胞 Bcl-2、Bax 及 PARP(89 kDa)蛋白含量的测定

实验结束后,用预冷 PBS 洗涤各组细胞,分别按试剂盒方法提取总蛋白和核蛋白,按 Lowry 法进行蛋白定量,用 15% 分离胶和 5% 积层胶制胶,加样,电泳 70 min(恒压 80 V 15 min,恒压 180 V 50 min),电转移 120 min(恒流 200 mA)后,膜取出放入 1% 脱脂奶粉中封闭(4℃ 过夜)。再分别取 Bcl-2、Bax 或 β -actin(内标)小鼠抗大鼠一抗(效价 1:2000),PARP(89 kDa)一抗与膜孵育 3 h,洗膜后再与羊抗小鼠二抗或羊抗兔(二抗)(效价 1:1000)

孵育 2 h,用增强化学发光试剂进行显色及摄片处理,美国 GDS-8000 UVP 成像仪成像,用 LAB WOEK45 软件分析条带灰度值,以各组灰度值进行统计分析,重复实验 3 次。

1. 10 数据处理

各实验组数据均以 $\bar{x}+s$ 表示,并根据资料性质分别进行 χ^2 检验、方差分析及组间 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2. 1 刺囊酸对缺氧复氧损伤后心肌细胞存活率及 LDH 活性的影响

与对照组相比,缺氧复氧损伤组细胞存活率明显降低,LDH 活性显著升高($P<0.01$);与缺氧复氧损伤组相比,缺氧预处理组及低、中、高剂量刺囊酸组细胞存活率升高,LDH 活性显著降低,且呈剂量依赖性,表明刺囊酸预处理可以保护心肌细胞($P<0.01$;表 1)。

表 1. 刺囊酸对缺氧复氧损伤后心肌细胞存活率及 LDH 活性的影响($\bar{x}+s,n=8$)

Table 1. Effect of Echshinone acid on cell viability and LDH activity in rat ventricular myocytes subjected to A/R injury ($\bar{x}+s,n=8$)

分 组	细胞存活率	LDH (IU/L)
对照组	98. 12% ± 12. 43%	2. 11 ± 0. 89
缺氧复氧损伤组	34. 56% ± 4. 67% ^a	112. 89 ± 20. 67 ^a
缺氧预处理组	90. 45% ± 11. 12% ^b	11. 45 ± 4. 06 ^b
低剂量刺囊酸组	52. 12% ± 7. 21% ^b	78. 34 ± 13. 56 ^b
中剂量刺囊酸组	72. 56% ± 10. 23% ^b	56. 76 ± 8. 75 ^b
高剂量刺囊酸组	88. 79% ± 11. 85% ^b	29. 68 ± 3. 23 ^b

a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.01$,与缺氧复氧损伤组比较。

2. 2 刺囊酸对心肌细胞缺氧复氧损伤后 Bcl-2、Bax 及 PARP(89 kDa) 蛋白表达的影响

从表 1 结果呈剂量依赖性诱导出心肌细胞保护作用,故可选择中剂量组进行实验,结果表明,缺氧复氧损伤组心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达显著低于对照组($P<0.01$),Bax 及 PARP(89 kDa)蛋白表达显著高于对照组($P<0.01$);而与缺氧复氧损伤组比较,中剂量刺囊酸能显著增加 Bcl- 2 蛋白表达($P<0.05$),抑制 Bax 及 PARP(89 kDa)蛋白表达($P<0.05$;表 2 和图 1)。

表 2. 刺囊酸对缺氧复氧损伤后心肌细胞 Bcl-2、Bax 及 PARP(89 kDa) 蛋白表达的影响($\bar{x}+s,n=3$)

Table 2. Effect of Echshinone acid on relative expression of Bcl-2, Bax and PARP (89 kDa) in cultured cardiomyocytes subjected to A/R injury ($\bar{x}+s,n=3$)

分 组	Bcl-2	Bax	PARP
对照组	36. 56 ± 5. 78	44. 33 ± 6. 97	13. 29 ± 5. 45
缺氧复氧损伤组	9. 80 ± 1. 24 ^a	79. 34 ± 14. 90 ^a	47. 43 ± 9. 98 ^a
缺氧预处理组	35. 21 ± 6. 13 ^b	50. 73 ± 10. 81 ^b	17. 67 ± 4. 11 ^b
中剂量刺囊酸组	32. 37 ± 5. 98 ^b	51. 56 ± 10. 23 ^b	23. 63 ± 5. 04 ^b

a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.01$,与缺氧复氧损伤组比较。

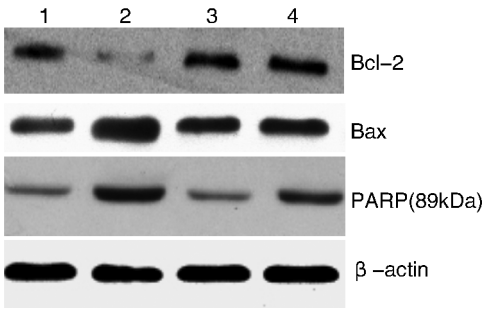


图 1. 各种处理对心肌细胞 Bcl-2、Bax 及 PARP(89 kDa) 蛋白表达的影响 1 为对照组,2 为缺氧复氧损伤组,3 为缺氧预处理组,4 为中剂量刺囊酸组。

Figure 1. Effect of anoxia and reoxygenation and other treatments on the expression of Bcl-2, Bax and PARP (89 kDa) in cultured cardiomyocytes

3 讨 论

心肌细胞缺氧再复氧时,产生大量氧自由基,造成细胞膜脂质过氧化,膜通透性增加,胞内酶 LDH 等漏出,LDH 漏出量的多少能反映细胞膜的受损程度^[1]。本研究发现,刺囊酸预处理 24 h 后,呈剂量依赖性使细胞存活率升高,LDH 显著降低,有效对抗缺氧再复氧损伤。

细胞凋亡发生过程中有多种促凋亡和抗凋亡的蛋白相互作用,两者失调导致细胞凋亡^[7]。Bcl-2 蛋白是一种重要的抗凋亡蛋白,主要在凋亡的上游过程发挥作用,Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白结合形成异二聚体,抑制了 Bax 蛋白的促凋亡作用,此二聚体成为细胞死亡信号通路上的分子开关^[8]。本实验结果表明,刺囊酸可以上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白的表达,最终减少缺氧复氧心肌细胞凋亡。

PARP 是定位在细胞核内,与应激条件下 DNA 修复密切相关的一种酶。PARP 对于细胞的稳定和

存活非常重要,PARP 失去酶活力会加速细胞的不稳定。PARP 剪切被认为是细胞凋亡的一个重要指标,也通常被认为是 Caspase-3 激活的指标^[9,10]。本实验结果表明,在心肌细胞受到氧化刺激时损伤细胞 DNA,胞内 DNA 的损伤激发应激蛋白 PARP 的活性,使其表达增加,超过其修复 DNA 损伤能力,而刺囊酸预处理后,能显著抑制 PARP(89 kDa)蛋白表达,使 DNA 损伤程度降低,修复损伤以利于细胞功能的恢复。

本研究结果证明刺囊酸预处理可通过上调 Bcl-2 蛋白表达,抑制 Bax 蛋白活性,进而抑制心肌细胞在缺氧复氧损伤时细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, 20(6): 445-462.
- [2] Lee MK, Ha NR, Yang H, et al. Antiproliferative activity of triterpenoids from *Eclipta prostrata* on hepatic stellate cells[J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(9): 775-780.
- [3] Tong X, Lin S, Fujii M, et al. Molecular mechanisms of echinocystic acid-induced apoptosis in HepG2 cells[J].

Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(3): 539-546.

- [4] Tong X, Lin S, Fujii M, et al. Echinocystic acid induces apoptosis in HL-60 cells through mitochondria-mediated death pathway[J]. *Cancer Lett*, 2004, 212(1): 21-23.
- [5] Wu J, Li J, Zhu Z, et al. Protective effects of echinocystic acid isolated from *Gleditsia sinensis* Lam against acute myocardial ischemia[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(1): 8-10.
- [6] 陈杰,许静,袁芳,等. 丹参酮ⅡA 预处理对大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的延迟保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2009, (21): 1 836-839.
- [7] 翟宏颖,王桂敏. 菟丝子黄酮对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(3): 211-215.
- [8] 雷伟程,徐建军. 三碘甲状腺原氨酸对缺血再灌注损伤后未成熟心肌细胞中 Bax、Bcl-2 的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(8): 665-667.
- [9] Tao R, Kim SH, Honbo N, et al. Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia-reperfusion injury by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(6): 659-668.
- [10] Szabo G, Bahrle S. Role of nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in myocardial reperfusion injury[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, 3(3): 215-220.

(此文编辑 许雪梅)