

当归补血汤预处理对缺氧损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响及其机制研究

周春刚 李卿 汤加 徐辰 张志斌

(无锡市中医医院中心实验室,江苏无锡 214062)

摘要 目的:观察当归补血汤抗心肌细胞缺氧损伤的作用,并探讨其作用机制。方法:建立大鼠 H9C2 心肌细胞缺氧损伤模型,以正常培养条件下的心肌细胞为正常对照组,将预先加入当归补血汤的细胞(当归补血汤预处理组)在正常条件下培养 24h,随后与未处理细胞(缺氧组)同时进行缺氧培养,Annexin V/PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡率,DCFH-DA 荧光探针流式细胞仪检测细胞内活性氧簇(ROS)水平,RT-PCR 荧光相对定量检测缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)和 p53 的 mRNA 表达水平,Western blot 检测 Cyt C 蛋白表达水平。结果:缺氧组细胞凋亡率、细胞内 ROS 水平、Cyt C 蛋白表达水平、p53 mRNA 表达水平均明显高于正常对照组($P<0.05$)。经当归补血汤预处理的缺氧损伤心肌细胞凋亡率、细胞内 ROS 水平、Cyt C 蛋白表达水平、p53 mRNA 表达水平均明显低于缺氧组($P<0.05$),HIF-1 α mRNA 水平明显高于缺氧组($P<0.05$)。结论:H9C2 心肌细胞缺氧损伤后细胞凋亡显著增加。当归补血汤能够抑制缺氧损伤心肌细胞凋亡,其可能通过降低 p53 mRNA 表达,促进 HIF-1 α mRNA 表达等机制来减轻缺氧对心肌细胞的损伤作用。

关键词 当归补血汤 H9C2 心肌细胞 细胞凋亡 缺氧诱导因子 肿瘤抑制基因 体外实验

中图分类号 R289.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2015)07-0083-03

目前研究表明,持续稳定的缺氧刺激可使机体建立缺氧适应,维护自身平衡和内环境稳定,但是过强或长期的缺氧应激则会导致线粒体能量代谢障碍,细胞功能严重受损,引发细胞凋亡,进而导致不可逆的中枢神经损伤,微循环障碍,心功能下降。动物实验研究发现,当归补血汤能够减轻脑缺血再灌注对大鼠神经元的损伤,促进细胞功能恢复^[1-2]。孙艳等^[3]研究认为,当归补血汤能够稳定心肌细胞线粒体膜电位,下调凋亡基因蛋白 p53 表达,有效抑制 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡,可见当归补血汤在不同病理条件下对组织损伤的保护作用表现出多靶点、多环节的特点。本研究通过建立 H9C2 心肌细胞缺氧损伤模型,观察缺氧诱导心肌细胞凋亡信号通路中的关键分子 HIF-1 α 和 p53mRNA 的表达,探讨当归补血汤抗缺氧诱导心肌细胞凋亡的可能分子机制。

1 实验材料

1.1 细胞株 大鼠心肌细胞(H9C2),购自上海拜力生物技术有限公司(ATCC CRL1446)。

1.2 当归补血汤煎剂制备 当归(产地甘肃,批号 101027),黄芪(产地内蒙古,批号 101109),按重量 5:1 组方。采用水提醇沉法,将上述精制中药加生理

盐水溶解,以稀盐酸调 pH 值至 7.2~7.4,采用 DMEM 高糖培养基定容后生药量为 50mg/mL(原液),再以孔径为 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤除菌,-80 $^{\circ}$ C 贮存备用。

1.3 试剂 DMEM 高糖(GIBCO 11995065),胎牛血清(GIBCO 6010159),3S 柱式细胞总 RNA 抽提试剂盒(上海博彩生物科技有限公司 K362),MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,噻唑蓝,江苏碧云天生物技术有限公司 C0009],Annexin V/PI 双染凋亡检测试剂盒(美国 BD 556547),SYBR Prime Script RT-PCR Kit II 试剂盒(TAKARA RR820A),BCA 蛋白定量试剂盒(江苏碧云天生物技术有限公司 P0010),GAPDH 单克隆抗体(联科生物 Mab 5465),Cyt C 多克隆抗体(bioss bs-0013R),羊抗兔二抗(bioworlde BS13278)。

1.4 仪器 流式细胞仪(美国 BD),Light Cycler480 荧光定量 PCR 仪(德国 Roche),二氧化碳三气培养箱(美国 Thermo 3131),二氧化碳普通培养箱(美国 Thermo 371),Smart Spec Plus 分光光度计(美国 BIO-RAD)。

2 实验方法

2.1 缺氧模型的建立 取对数生长期 H9C2 细胞,

基金项目:江苏省无锡市科技局科技支撑发展项目(CSE01N1224)

接种于6孔板中,每孔接种 10×10^4 个细胞,培养24h,弃去细胞上清液,更换DMEM无糖无血清培养基,然后置入 37°C ,含94% N_2 、5% CO_2 、1% O_2 的三气培养箱中培养24h即为缺氧。实验设正常对照组:细胞始终在正常培养条件下, 37°C 、5% CO_2 的普通培养箱中培养;缺氧组:正常培养条件下, 37°C 、5% CO_2 的普通培养箱培养24h,然后缺氧条件下培养;当归补血汤预处理组:正常培养条件预先加入当归补血汤 $500\mu\text{g/mL}$, 37°C 、5% CO_2 的普通培养箱培养24h后,与缺氧组同时进行缺氧培养。

2.2 AnnexinV/PI染色流式细胞仪检测细胞凋亡 Annexin V/PI染色的试剂准备、染色及分析过程严格按照试剂说明书操作。

2.3 DCFH-DA荧光探针流式细胞仪检测细胞内活性氧簇(ROS)水平 细胞收集后悬浮于荧光探针DCFH-DA(无血清DMEM 1:1000稀释)中,终浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 。细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 37°C 细胞培养箱内孵育20min,每隔3~5min颠倒混匀一次,用无血清DMEM洗涤细胞3次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。Rosup(50mg/mL)作为活性氧阳性对照。

2.4 RT-PCR实时荧光相对定量分析 H9C2细胞总RNA采用3S柱式细胞总RNA抽提试剂盒,按照试剂盒上操作步骤完成总RNA的提取。在吸光度260nm处测定RNA浓度,样本RNA浓度范围 $10\sim 30\text{ng}/\mu\text{L}$,260/280nm OD比值范围在1.2~1.9之间。RNA提取物 -80°C 保存。管家基因 β -actin作为内参基因,目的基因和内参基因引物序列见表1,由上海博彩生物科技有限公司合成。采用溶解曲线和琼脂糖凝胶电泳分析产物的特异性,相对定量分析采用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法^[4]。

2.5 Western blot检测H9C2心肌细胞Cyt C蛋白水平 细胞蛋白定量采用碧云天BCA蛋白定量试剂盒,取细胞蛋白提取液上清,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将电泳分离后的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上,用5%BSA封闭1.5h后分别将膜放入杂交袋中加入一抗(1:300稀释),封口,室温下孵育1h, 4°C 过夜。用1×TBS-T洗膜后,以相应的二抗孵育1.5h,并以GAPDH(1:500稀释)单克隆抗体作为内参对照。采用Image-Pro Plus 4.1软件分析蛋白条带的积分吸光度值,以靶蛋白/GAPDH吸光度比值反映靶蛋白水平。

2.6 统计学方法 数据处理采用SPSS11.5软件,计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异显著性分析, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 各组H9C2细胞凋亡率比较 H9C2心肌细胞正常培养条件下培养24h,心肌细胞凋亡率为 $(14.24 \pm 2.74)\%$,而缺氧培养24h后细胞凋亡率为 $(61.12 \pm 17.07)\%$,2组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。经当归补血汤预处理后再行缺氧培养的心肌细胞凋亡率为 $(28.13 \pm 4.82)\%$,明显低于缺氧组($P < 0.05$)。

3.2 各组H9C2细胞内ROS水平比较 正常对照组细胞内ROS水平为 $(0.71 \pm 0.15)\%$,缺氧组为 $(19.45 \pm 4.11)\%$,明显高于正常对照组($P < 0.05$);当归补血汤预处理组ROS水平 $(9.36 \pm 1.84)\%$,明显低于缺氧组($P < 0.05$);活性氧阳性对照组细胞内ROS水平为 $(40.62 \pm 8.60)\%$ 。

3.3 各组H9C2心肌细胞Cyt C蛋白表达水平比较 结果见图1。缺氧组Cyt C/GAPDH吸光度比值为 (0.74 ± 0.11) ,明显高于正常对照组的 (0.20 ± 0.06) ,表明缺氧组Cyt C蛋白表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$);当归补血汤组Cyt C/GAPDH吸光度比值为 (0.47 ± 0.05) ,表明Cyt C蛋白表达水平显著低于模型组($P < 0.05$)。

3.4 各组H9C2心肌细胞缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、p53 mRNA表达水平比较 见表2。

4 讨论

表1 目的基因和内参基因引物序列及产物特征

基因	引物序列	GenBank 编号	cDNA 位置	产物大小	产物 Tm
HIF-1 α	5'-CAACTGCCACCCTGATGAAT-3'	NM_024359.1	1866-1999	133bp	81.58
	5'-CCACTGTATGCTGATGCCCTTAG-3'				
p53	5'-GCTGAGTATCTGGACGACA-3'	NM_030989.3	732-935	204bp	87.85
	5'-CAGGCACAACACGAACC-3'				
β -actin	5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3'	NM_031144	957-1147	191bp	87.7
	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'				

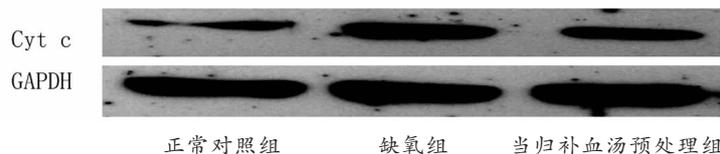


图1 各组H9C2心肌细胞Cyt C蛋白表达水平比较

表2 各组H9C2心肌细胞HIF-1 α 和p53的mRNA表达水平比较

组别	HIF-1 α	p53
正常对照组	1.13 ± 0.34	0.58 ± 0.16
缺氧组	1.02 ± 0.16	$2.11 \pm 0.39^*$
当归补血汤预处理组	$2.33 \pm 0.59^\Delta$	$0.50 \pm 0.21^\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与缺氧组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

通过缺氧诱导 H9C2 心肌细胞凋亡发现, 缺氧 24h 后心肌细胞凋亡率及细胞内 ROS 水平明显增加, Cyt C 蛋白水平显著升高。研究表明, 细胞缺氧条件下, 线粒体是 ROS 产生的主要来源, 二者互为因果, ROS 异常增多就会影响线粒体的氧化磷酸化而降低细胞内 ATP 的合成, 引起线粒体膜通透性的改变, 诱导 Cyt C 释放, 导致细胞凋亡或坏死。当归补血汤预处理细胞缺氧损伤后, 心肌细胞凋亡率明显降低, 细胞内 ROS 及 Cyt C 蛋白水平亦显著降低, 表明当归补血汤能够减轻心肌细胞氧化应激损伤, 减少细胞内 ROS 生成, 提高心肌细胞耐缺氧能力, 抑制细胞凋亡。

研究认为, 缺氧诱导凋亡与依赖 HIF-1 信号途径相关, 但是在缺氧过程中是促凋亡还是抗凋亡作用可能是 HIF-1 和 p53 相互作用的结果^[5]。p53 和 HIF-1 都是调节细胞适应应激反应的主要分子。p53 作为肿瘤抑制基因, 在维护染色体基因组的稳定性方面发挥了重要作用, 是 DNA 损伤和细胞凋亡的关键转录调节因子, 其通过调节细胞周期和细胞凋亡相关基因表达参与细胞缺氧的应答反应。正常条件下, p53 蛋白半衰期短, 维持低水平状态, 缺氧状态下 p53 蛋白稳定性增加, 活性增强, 促进促凋亡基因的转录^[6]。HIF-1 是氧代谢的主要转录调节因子, 缺氧条件下诱导包括糖代谢、细胞分化、炎症反应等多种信号通路相关蛋白的表达, 使机体产生适应性应答。HIF-1 α 亚基的活化和表达是 HIF-1 生物活性决定因子, 正常氧含量条件下, HIF-1 α 蛋白不断合成并降解, 始终维持低水平的动态平衡状态, 缺氧状态下, HIF-1 α 与 HIF-1 β 形成稳定的二聚体诱导靶基因的活化表达^[7]。

通过检测 HIF-1 α 和 p53 mRNA 表达水平发现, 在缺氧模型中, p53 mRNA 表达显著上调, 而 HIF-1 α mRNA 并没有出现明显升高, 甚至出现一定程度的降低。研究表明, 低氧或缺氧条件下, 线粒体 DNA 是受 ROS 和 Cyt C 攻击破坏的重要靶分子, 线粒体 DNA 氧化损伤亦导致 p53 基因高表达^[8], p53 在调节 HIF-1 活性方面起关键作用, p53 表达增高, 抑制 HIF-1 活性, 降解 HIF-1 α ^[9]。而通过对死亡受体和线粒体等凋亡途径的关键基因表达研究发现, Bax 基因、Fas/Fas L 基因及 caspase 蛋白酶家族基因 mRNA 表达水平均没有明显改变 (另文报道), 而 p53 mRNA 上调和 Bcl-2 mRNA 下调表达最明显, 我们推测, p53 在缺氧诱导凋亡中发挥主要调节作用, 而 HIF-1 可能通过减少细胞内 ROS 产生等机制在 H9C2 细胞缺氧模型中发挥保护性作用。当归补血汤预处理后, p53 mRNA 表达显著下调, HIF-1 α mRNA 表达则显著上调。中药

研究亦证实黄芪、黄芪多糖和当归多糖在不同条件下均能下调 p53 表达, 从而抑制细胞凋亡^[10-12]。以上结果表明当归补血汤能够通过调节 HIF-1 α mRNA 和 p53 mRNA 表达等机制, 提高缺氧损伤心肌细胞存活能力, 下一步将对缺氧损伤药物干预后 HIF-1 α 及 p53 蛋白下游调节 ROS 相关的靶基因做深入研究, 进一步明确当归补血汤抗缺氧应激损伤的机制。

参考文献

- [1] 周凌云, 罗亚非, 姜金波, 等. 当归补血汤对局灶性脑缺血再灌注损伤后大鼠神经功能影响. 实用中医药杂志, 2012, 28(4): 292
- [2] 陆莹, 罗亚非, 范瑞娟, 等. 当归补血汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注血-脑屏障和大脑皮质神经元的影响. 神经解剖学杂志, 2013, 29(3): 301
- [3] 孙艳, 孙樱丹, 徐厚谦, 等. 当归补血汤含药血清对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 250
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. Method, 2001, 25(4): 402
- [5] Kaluzova M, Kaluz S, Lerman MI, et al. DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1 α in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. Mol Cell Biol, 2004, 24(13): 5757
- [6] Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. Nature, 2009, 458(7242): 1127
- [7] Goda N, Dozier SJ, Johnson RS. HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression. Antioxid. Redox Signal, 2003, 5(4): 467
- [8] Zaky A, Busso C, Izumi T, et al. Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. Nucleic Acids Res, 2008, 36(5): 1555
- [9] Chen D, Li M, Luo J, et al. Direct interactions between HIF-1 α and Mdm2 modulate p53 function. J. Biol. Chem, 2003, 278(16): 13595
- [10] 林春颖, 曾翠梅, 黄凤婷. 黄芪散对 H22 肝癌细胞 p53 基因表达的影响. 四川中医, 2012, 30(2): 30
- [11] 颜玲, 黄德彬, 刘锦红, 等. 黄芪多糖对脑缺血再灌注大鼠脑皮质中 HSP70、PKB 和 p53 蛋白表达的影响. 中国病理生理杂志, 2012, 28(9): 1610
- [12] 张先平, 刘俊, 徐春燕, 等. 当归多糖对小鼠衰老造血干细胞端粒、端粒酶及 p53 的影响. 中国中药杂志, 2013, 37(14): 2354

第一作者: 周春刚 (1974—), 免疫学硕士, 副主任技师, 主要从事心血管病诊断技术研究。

通讯作者: 张志斌, 生物化学硕士, 主任技师。491073429@qq.com

收稿日期: 2015-04-18

编辑: 吴宁