

李玲美,曹策,韩笑,等.羟基红花黄色素 A 对缺氧缺糖/复氧复糖损伤的大鼠 H9C2 心肌细胞氧化应激和细胞凋亡的影响[J].中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 9-16.

Li LM, Cao C, Han X, et al. Effects of hydroxysafflor yellow A on oxidative stress and apoptosis of H9C2 cardiomyocytes injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 9-16.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.002

羟基红花黄色素 A 对缺氧缺糖/复氧复糖损伤的大鼠 H9C2 心肌细胞氧化应激和细胞凋亡的影响

李玲美,曹 策,韩 笑,付建华*,李 磊,张 琼,辛高杰,刘子馨,任钧国*

(中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所,北京 100091)

【摘要】 目的 探讨羟基红花黄色素 A(hydroxysafflor yellow A, HSYA)对大鼠 H9C2 心肌细胞缺氧缺糖/复氧复糖损伤(oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury, OGD/R)后氧化应激及细胞凋亡的影响,并探索其可能的作用通路。**方法** 大鼠 H9C2 心肌细胞稳定传代培养至第三代后,随机分为空白组,缺氧/复氧模型组,给药组分为 HSYA 低、高剂量组(HSYA40、HSYA80, 40、80 $\mu\text{mol/L}$),每组设 10 个复孔。各组细胞在经药物干预 6 h 后,采用 CCK-8 法检测细胞活性;生化仪检测培养基中天门冬氨酸转移酶(AST)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)活性;测定细胞中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)的含量;采用流式细胞仪检测细胞凋亡状况并计算凋亡率;通过蛋白质免疫印迹(Western blot)方法检测细胞中凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)并计算 Bcl-2/Bax 表达,同时检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达并进行半定量分析。**结果** 与正常组相比,缺氧缺糖/复氧复糖组细胞活性明显低于正常组,培养基中 AST、CK、LDH 活性明显升高,SOD、CAT 活性明显降低,MDA 含量升高,细胞凋亡率显著升高,细胞中 Bcl2 和 Bax mRNA 表达明显升高,Bcl2/Bax 表达显著降低,Caspase-3 蛋白表达水平显著升高。与 OGD/R 组相比,羟基红花色素 A 给药组细胞活性明显升高;培养基中 AST、CK 和 LDH 活性明显降低,SOD、CAT 活性明显升高,MDA 含量降低;细胞凋亡率显著降低;细胞中抑凋亡相关基因 Bcl-2 表达上调,而凋亡相关基因 Bax 表达明显下调,Bcl2/Bax 表达显著升高,Caspase-3 蛋白表达水平显著降低。**结论** 羟基红花色素 A 能够通过抑制 H9C2 心肌细胞的氧化应激损伤和凋亡从而对缺氧缺糖/复氧复糖损伤的 H9C2 心肌细胞起到一定保护作用;其作用机制可能与其改善抗氧化酶活性,上调抑制凋亡基因 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】 羟基红花色素 A;缺氧/复氧损伤;凋亡;氧化应激

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 03-0009-08

Effects of hydroxysafflor yellow A on oxidative stress and apoptosis of H9C2 cardiomyocytes injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion

LI Lingmei, CAO Ce, HAN Xiao, FU Jianhua*, LI Lei, ZHANG Qiong, XIN Gaojie, LIU Zixin, REN Junguo*
(Institute of Basic Medicine, Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

【基金项目】北京市中医药科技发展资金青年规划项目(QN-2020-14);国家中医心血管病临床医学研究中心专项科研基金(CMC2022005);国家自然科学基金项目(81673817,81774145);北京市自然科学基金项目(7172191)。

【作者简介】李玲美(1993—),女,博士研究生,研究方向:中药药理学。E-mail:1136819527@qq.com

【通信作者】付建华(1970—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药药理学。E-mail:jianhuaffcn@263.net

任钧国(1968—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药药理学。E-mail:reek2003@163.com

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To investigate the effect of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on oxidative stress and apoptosis of H9C2 cardiomyocytes after oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury and to explore its possible mechanism. **Methods** After rat H9C2 cardiomyocytes were stably subcultured to the third passage, they were randomly divided into control, hypoxia/reoxygenation model (OGD/R), low-dose HSYA (40 $\mu\text{mol/L}$; HSYA40), and high-dose HSYA (80 $\mu\text{mol/L}$; HSYA80) groups with 10 duplicate wells in each group. After 6 hours of treatment, the cells were analyzed by CCK-8 assays and aspartate transferase (AST), creatine kinase (CK), and lactate dehydrogenase (LDH) activities in the medium were measured by a biochemical analyzer. Corresponding kits were used to measure the contents of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) in cells. Flow cytometry was used to assess the apoptosis rate. Western blot was used to detect apoptosis-related proteins B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl2) and Bcl2-related X Protein (Bax) in cells. Caspase-3 expression was analyzed semiquantitatively. **Results** Compared with the normal group, cell proliferation in the OGD/R group was significantly lower, AST, CK, and LDH activities in the medium were significantly increased, SOD and CAT activities were significantly decreased, and the MDA content was increased. The apoptosis rate was significantly increased, Bcl2 and Bax mRNA expression was significantly increased, Bcl2/Bax protein expression was significantly decreased, and Caspase-3 protein expression was significantly increased. Compared with the OGD/R group, cell proliferation in the hydroxysafflor A administration group was significantly increased, AST, CK, and LDH activities in the medium were significantly decreased, SOD and CAT activities were significantly increased, and the MDA content was decreased. The apoptosis rate was significantly reduced and expression of anti-apoptotic gene Bcl-2 was upregulated, while the expression of proapoptotic gene Bax was significantly downregulated, Bcl2/Bax protein expression was significantly increased, and caspase-3 protein expression was significantly decreased. **Conclusions** HSYA protects H9C2 cardiomyocytes from oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress injury and apoptosis. Its mechanism may be related to improving the activity of antioxidant enzymes, upregulating Bcl-2 gene expression, downregulating Bax gene expression, increasing Bcl-2/Bax protein expression, and inhibiting the expression of pro-apoptotic protein Caspase-3.

[Keywords] hydroxysafflor yellow A; oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury; apoptosis; oxidative stress

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

冠心病也被称为缺血性心脏病,主要是由于冠脉循环改变造成冠状动脉血流障碍和心肌能量代谢失衡等进而导致的心肌损伤疾病,在心脑血管疾病中极为常见,临床表现以休克、心律失常、心绞痛和心力衰竭为主,对人类身体健康产生了极大的威胁^[1]。血流灌注的再恢复是治疗冠心病最为有效和重要的方法,但是恢复血流造成的心肌缺血再灌注损伤也是临床亟待解决的问题。心肌缺血再灌注损伤的发病机制包括氧化应激、钙超载、炎症反应等;其中,恢复血流灌注造成的氧化应激反应是心肌缺血再灌注损伤的最先发生的重要机制之一。缺氧/复氧损伤模型是研究缺血再灌注损伤机制过程中最常用的细胞模型。注射用红花黄色素在临床常用于治疗心绞痛、冠心病类疾病^[2-4],其中羟基红花黄色素 A 是注射用红花黄色素的主要成分^[5],分子结构式如图 1 所示,既往研究显示羟基红花黄色素 A 具有明显改善心肌缺血、减慢心率与心肌耗氧量、增加冠状动脉血流量的功效^[6-8]。但羟基红花黄色素 A 对心肌缺血再灌注损伤中氧化应激作用的研究较少。相关研究表明,体外 OGD/R 模型

可以诱导 H9C2 模拟体内心肌缺血再灌注损伤^[9-10]。因此,本研究通过建立 H9C2 心肌细胞 OGD/R 模型对比心肌缺血再灌注损伤,比较氧化应激及凋亡相关指标,探讨羟基红花黄色素 A 在 OGD/R 发生时对 H9C2 心肌细胞的保护作用,完善羟基红花黄色素 A 的药理机制,为临床在治疗缺血性心血管疾病中应用红花黄色素注射液奠定理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

大鼠 H9C2 心肌细胞,购于协和医科大学细胞试验中心。

1.2 主要试剂与仪器

羟基红花黄色素 A (20 mg, HPLC>98%, 货号: CAS146087-19-6, 避光 2~8℃, 成都瑞芬思生物科技有限公司); DMEM 高糖培养基 (Gibco, lot: 8117283); DMEM 无糖培养基 (Gibco, lot: 1897256); 葡萄糖 (Sigma, 080M01752V); DMSO (Amresco, 3483C285); PBS 缓冲液 (Solarbio 公司,

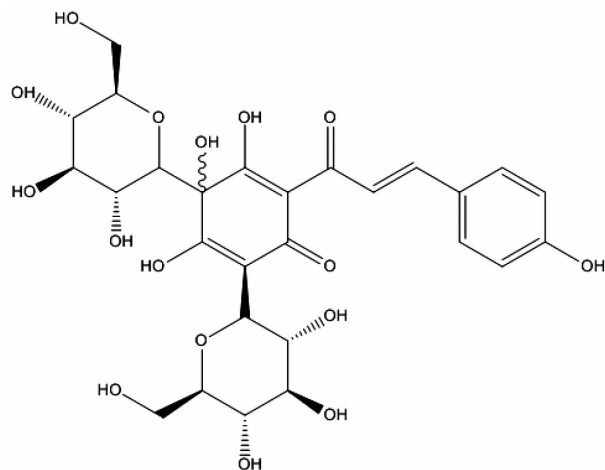


图 1 羟基红花黄色素 A 分子结构式

Figure 1 Molecular structural formula of HSYA

批号 P1020-500); 胎牛血清 (Gibco 公司, 批号 10099-141); 细胞活力检测试剂盒 (Dojindo 公司, 批号 CK04); 10×电泳缓冲液, 10×封闭洗涤液 (北京华兴博创基因技术有限公司, 货号分别为 HX1896, HX1893); 增强型化学发光检测试剂 (美国 Thermo Scientific, 货号 34096); 兔抗 Caspase-3 抗体 (英国 Abcam, 货号 ab13847); 兔抗 β -actin 抗体 (美国 Affinity Biosciences, 货号 AF7018); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 Ig G (北京源博汇科生物技术研究, 批号 127760); Hoechst33342 染色液 (北京索莱宝, 批号 20180509); FITC 标记羊抗兔 Ig G (北京源博汇科生物技术研究, 批号 138768) 谷草转氨酶 AST/GOT 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号: C010-1); 肌酸激酶 CK 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号: A032); 乳酸脱氢酶 LDH 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号: A020-2)。

生物安全柜 (苏净集团安泰公司, BHC-1300 II A/B3), CO_2 培养箱 (Thermo 371), 倒置显微镜 (Olympus, IX51), 酶标仪 (BioTek SYNERGY4), 超低温保存箱 (Haier, Bio-Medical), 电子天平 (Sartorius BSA224S-CW), 高压蒸汽消毒器 (HIRAYAMA, HVE-50), 冷冻高速离心机 (Thermo, IEC CL31R), 电泳仪 (美国 Bio-Rad, Power Pac Universal), 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad, Chemi Doc XRS+), 流式细胞仪 (EPICS ELITE 型, 美国 BC 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 H9C2 细胞的培养

取出置于液氮中冻存的 H9C2 心肌细胞, 打开

无菌操作台, 将其置于 37°C 纯水中使其快速解冻, 复苏后通过移液管将细胞转移至离心管, 加入含 10% FBS 高糖 DMEM 的培养基 4 mL, 充分混合, 1000 r/min 离心 5 min, 沉淀用完全培养基 5 mL 重悬于 37°C , 5% CO_2 的条件下静置培养, 24 h 后换液, 待细胞达到 80% 融合时, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 完全培养液重悬, 调节细胞浓度至 $0.5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于细胞培养瓶或 96 孔板内。复苏细胞稳定三代后, 用于实验。

1.3.2 分组、给药及缺氧缺糖/复氧复糖损伤模型的建立

实验分为空白组 (Control)、模型组 (OGD/R), 给药组分 HSYA 低、高剂量组 (HSYA40、HSYA80, 40 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$)。取接种于细胞板或细胞瓶中的细胞, 弃旧培养基, PBS 洗板/孔两次之后, 空白对照组更换成 DMEM 完全培养基后, 放回 37°C , 5% CO_2 的培养箱中培养 6 h; 模型组更换成低氧处理过的无糖 DMEM 培养基, 给药组换成低氧处理过的含药无糖 DMEM 培养基后, 将细胞放进充入氮气的缺氧盒中密闭培养 4 h (缺氧缺糖缺血清), 缺氧结束后, 每瓶/孔加入葡萄糖, 使终浓度为 4.5 g/L, 置于 37°C , 5% CO_2 的培养箱中培养 2 h (复氧复糖)。给药组在缺氧时加入不同剂量的受试药物 (受试药物为无糖 DMEM 培养基配制)。其余操作同模型组。缺氧缺糖 4 h/复氧复糖 2 h 结束后, 收集细胞或细胞上清进行检测。

1.3.3 H9C2 细胞活力 CCK-8 检测

细胞活力检测采用 CCK-8 法, 复氧结束后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL , 继续培养 4 h 后, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 OD 值, OD 值大小与活细胞数量成正比。

1.3.4 流式细胞检测细胞凋亡率

H9C2 细胞采用相应浓度的小分子化合物处理, 胰蛋白酶消化和离心, 弃上清液, PBS 缓冲液重悬洗涤, 加入细胞凋亡检测试剂后, 避光孵育 20 min 后置于流式细胞分析仪进行细胞凋亡检测。

1.3.5 细胞 SOD、CAT 活性、MDA 含量检测

缺氧缺糖复氧复糖结束后, 收集细胞, 按照试剂盒说明书进行 SOD 活性、CAT 活性和 MDA 含量检测。

1.3.6 细胞 CK、AST、LDH 水平的检测

缺氧缺糖复氧复糖实验结束后, 收取细胞培养基, 按照试剂盒说明书检测 CK、AST、LDH 水平。

1.3.7 RT-PCR 检测凋亡相关基因

空白对照组、模型组和给药组的细胞总 RNA 采用 TRIzol 提取法进行提取,引物由北京 Invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。检测浓度后进行逆转录反应,随后进行荧光定量,实验中每组设置均设置 3 个复孔,采用相对定量法分析。

1.3.8 Western blot 检测相关蛋白表达

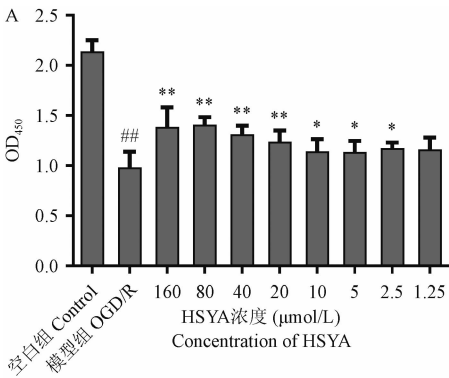
实验结束后,弃上清,预冷 PBS 冲洗 3 遍,收集并裂解细胞,BCA 法蛋白定量后,加 5×蛋白上样缓冲液置于沸水中 10 min 使蛋白充分变性。取等量蛋白样品上样,SDS-PAGE 分离后,将蛋白转印至 PVDF 膜,5% BSA 封闭 1 h,加入对应一抗 Caspase-3(1 : 1 000),4℃ 冰箱孵育过夜。TBST 洗涤 5 次,辣根过氧化物酶标记二抗(1 : 50000),室温孵育 2 h,TBST 洗涤 5 次,增强型化学发光试剂显色,系统成像软件灰度分析。同时,以内参 GAPDH 的蛋白表达水平为参照。

1.4 统计学方法

实验结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 One-way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性应用 Tukey 检验,方差不齐采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence
Bcl-2	F-GGGCTACGAGTGGGATACTGGAG
	R-CGGGCGTTTCGGTTGCTCT
Bax	F-GGTGTTGCCCTTTTCTACTTTGC
	R-GCTCCCGGAGGAAGTCCAGTG
GAPDH	F-TTCCTACCCCAATGTATCCG
	R-CCACCCTGTGTCTAGCCATA



注:与空白组相比,## $P < 0.01$;与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 2 HSYA 对缺氧/复氧诱导的 H9C2 细胞活性和细胞存活率的影响

Note. Compared with the control group, ## $P < 0.01$. Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Effects of HSYA on oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced cell viability and the rate of cell viability

2 结果

2.1 HSYA 对 OGD/R 诱导的 H9C2 细胞活性和细胞存活率的影响

细胞活力 CCK-8 检测结果显示,缺氧复氧损伤后 H9C2 细胞活力 OD 值显著降低,与空白组相比具有统计学差异($P < 0.05$),提示细胞损伤严重。各给药组处理后细胞活力 OD 值升高,与模型组相比,具有统计学差异($P < 0.05$);对缺氧复氧损伤细胞有保护作用($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 HSYA 对 OGD/R 诱导的 H9C2 细胞凋亡率的影响

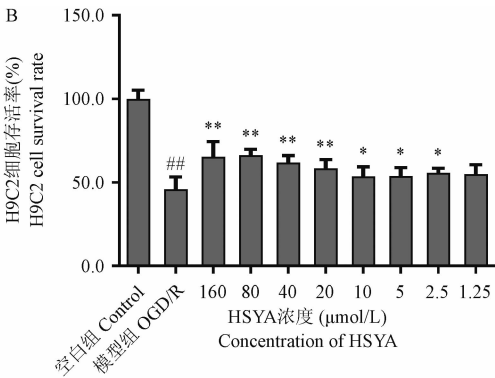
羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 细胞凋亡率的影响流式细胞技术检测结果显示,缺氧复氧损伤后 H9C2 细胞凋亡率显著升高,与空白组相比具有统计学差异($P < 0.05$),提示细胞损伤严重。各给药组处理后细胞凋亡率降低,与模型组相比,具有统计学差异($P < 0.05$);说明羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤细胞有保护作用($P < 0.05$)。见图 3。

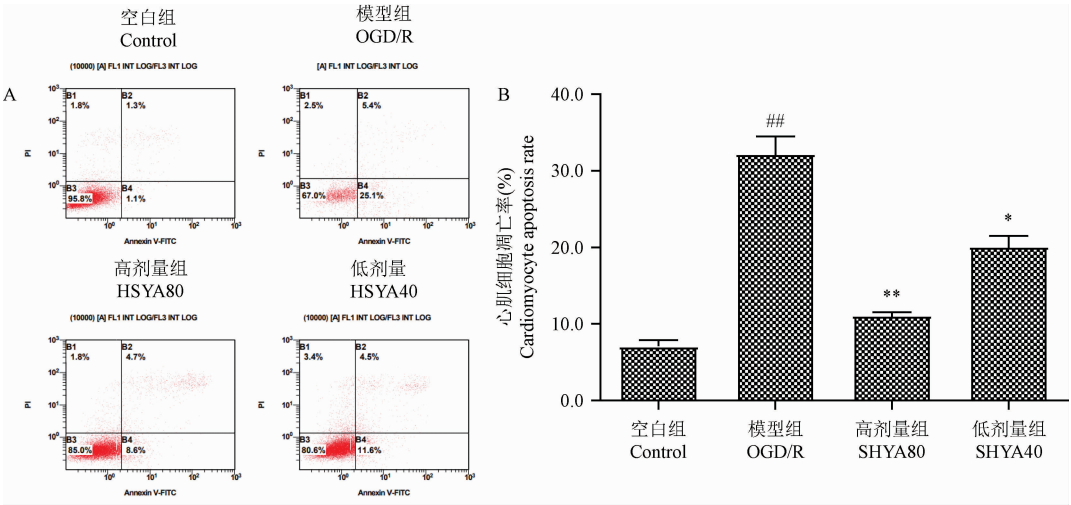
2.3 HSYA 对 OGD/R 诱导的 H9C2 细胞形态的影响

通过电镜下观看发现,与空白组相比,模型组细胞体积缩小,细胞核皱缩凝聚,核染色质边移,细胞核离散,细胞核质颜色加深;而相较于模型组,HSYA 组细胞的体积较为正常,细胞核呈椭圆形,核染色质边移减少。见图 4。

2.4 HSYA 对 OGD/R 诱导的 H9C2 细胞 CK、AST、LDH 水平的影响

羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 细





注:与空白组相比, ## $P<0.01$;与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 细胞凋亡率的影响

Note. Compared with the control group, ## $P<0.01$. Compared with the model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 The effect of hydroxysafflor yellow A on the apoptosis rate of H9C2 cells injured by hypoxia and reoxygenation

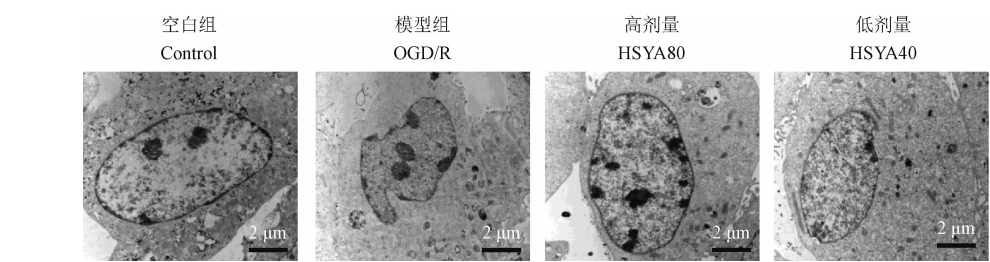


图 4 羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 细胞凋亡的影响

Figure 4 The effect of hydroxysafflor yellow A on apoptosis of H9C2 cells injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion

胞 CK、AST、LDH 水平的影响根据化学发光试剂盒检测结果显示,与空白组相比,模型组 CK、AST、LDH 显著升高,具有显著差异($P<0.01$);与模型组相比,HSYA 各组 CK、AST、LDH 水平降低,除 HSYA40 组的 CK 不具有统计学差异外,HSYA40 和 HSYA80 的 AST、CK、LDH 均具有统计学差异。见表 2。

2.5 HSYA 对 OGD/R 诱导的 H9C2 细胞 SOD 活性、MDA、CAT 含量的影响

试剂盒检测结果显示,与空白组相比,缺氧复氧损伤后 H9C2 细胞 SOD 活性和 CAT 含量明显降低,MDA 含量升高。与模型组比较,各给药组处理后 SOD 活性和 CAT 含量升高,MDA 含量降低。见表 3。

2.6 HSYA 对 OGD/R 诱导的 H9C2 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 的影响

与空白组相比,模型组结果显示 Caspase-3 的蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型组比较,HSYA80

表 2 羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 细胞培养基中心肌酶活性的影响

Table 2 Effects of hydroxysafflor yellow A on the activity of myocardial enzymes in the culture medium of H9C2 cells injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion

组别 Groups	天门冬氨酸转移酶 (U/mL) AST	肌酸激酶 (U/mL) CK	乳酸脱氢酶 (U/mL) LDH
空白组 Control	18.14±1.64	1.94±0.01	126.32±4.50
模型组 OGD/R	43.00±9.33 ^{##}	2.24±0.03 [#]	530.53±57.82 ^{##}
高剂量组 HSYA80	26.03±1.19 ^{**}	1.99±0.02 [*]	226.32±17.69 ^{**}
低剂量组 HSYA40	27.66±1.52 [*]	2.09±0.01	283.16±17.97 [*]

注:与空白组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

组和 HSYA40 组细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达均降低($P<0.05$),但仅有 HSYA80 组具有统计学差异。见图 5。

2.7 HSYA 对 OGD/R 诱导的 H9C2 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平及 Bcl-2/Bax 的影响

与空白组相比,模型组的 Bcl-2、Bax 表达水平升高($P<0.05$),Bcl-2/Bax 比值降低($P<0.05$)。与模型组相比,HSYA80 组和 HSYA40 组的 Bax 表达水平均降低($P<0.05$),HSYA80 组 Bcl-2 表达和 Bcl-2/Bax 比值升高($P<0.05$),而 HSYA40 组无统计学差异。见表 4。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是由多种信号转导通路和细胞调控因子共同参与的复杂反应过程,目前其发病机制尚未完全阐明。心肌缺血后,由于缺少氧和营养物质,心肌细胞由有氧代谢变成无氧代谢,细胞内 pH 下降,引起细胞内 Ca^{2+} 超载,进而造成心肌细胞死亡。及时的恢复血液灌注是减少心肌细胞死亡的一种方式。然而,在心肌恢复血流再灌注过程中,血液中循环氧的增加导致氧自由基增加,胞浆线粒体 Ca^{2+} 超载,血流的恢复虽带来了循环氧,但使得细胞内的 pH 变为中性,导致 ATP 快速消耗和炎症反应,引起细胞死亡,造成再灌注损伤。既往研究发现,心肌缺血再灌注损伤发生的机制与细胞死亡、氧化应激失衡、能量代谢障碍、自噬等病理生理特征相关,且这些病理机制互相交错,互为因果。缺氧会导致机体内活性氧自由基的含量水平呈现快速增长,并且同时引发氧化应激反应,后者是造成心肌损伤的重要因素^[11-13]。氧化应激在心肌缺血再灌注损伤的发生发展中起重要作用,氧化应激造成体内的活性氧含量水平超出机体的抗氧

表 3 羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 细胞中 SOD、MDA、CAT 的影响
Table 3 Effects of hydroxysafflor yellow A on SOD, MDA and CAT in H9C2 cells injured by hypoxia and reoxygenation

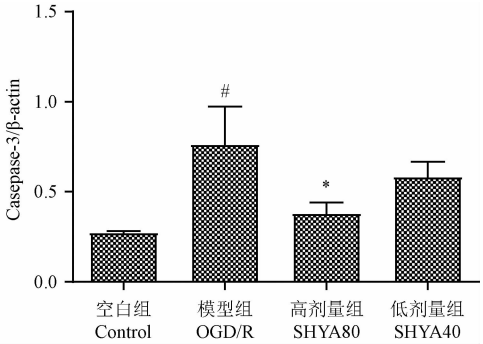
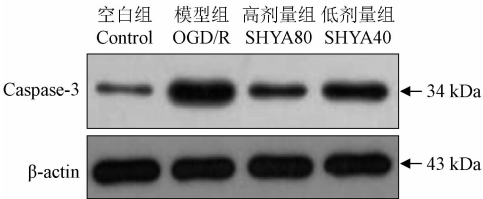
组别 Group	超氧化物歧化酶 (U/mg) SOD	丙二醛 (μmol/g) MDA	过氧化氢酶 (U/mg) CAT
空白组 Control	121.94±15.30	4.45±0.07	40.23±10.61
模型组 OGD/R	72.83±4.70 ^{##}	12.79±1.33 ^{##}	22.21±5.09 [#]
高剂量组 HSYA80	114.40±20.63 [*]	5.56±1.11 ^{**}	38.40±10.15 [*]
低剂量组 HSYA40	104.06±24.30 [*]	8.33±2.20 [*]	24.60±9.77

注:与空白组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

表 4 羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 心肌细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平及 Bcl-2/Bax 的影响
Table 4 Effects of hydroxysafflor yellow A on Bcl-2 and Bax mRNA expression levels and Bcl-2/Bax in H9C2 cardiomyocytes injured by hypoxia and reoxygenation

组别 Group	相对表达量 Bax/GAPDH	相对表达量 Bcl-2/GAPDH	相对表达量 Bcl-2/Bax
空白组 Control	1.00±0.02	1.00±0.04	1.00±0.01
模型组 OGD/R	2.23±0.04 [#]	1.38±0.03 [#]	0.62±0.04 [#]
高剂量组 HSYA80	1.33±0.01 [*]	1.74±0.01 [*]	1.31±0.02 [*]
低剂量组 HSYA40	1.60±0.02 [*]	1.47±0.01	0.92±0.01

注:与空白组相比, [#] $P<0.05$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with the control group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$.



注:与空白组相比, [#] $P<0.05$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$ 。

图 5 羟基红花黄色素 A 对缺氧复氧损伤的 H9C2 心肌细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 的影响

Note. Compared with the control group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$.

Figure 5 The effect of hydroxysafflor yellow A on the apoptosis-related protein Caspase-3 in H9C2 cardiomyocytes injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion

化能力范围^[14-15],因此,过量的活性氧会造成细胞损伤,引发细胞凋亡,进而导致机体的器官组织发生功能性障碍^[16]。

缺氧复氧损伤细胞模型是模拟组织缺血再灌注损伤的重要模型。在心肌细胞损伤中,CK、AST、LDH 等心肌酶是评估心肌缺血损伤程度的重要方法,,它们的活性可间接反映心肌缺血损伤的不同程度和范围,因此,CK、AST、LDH 活性的增加被认为是心肌细胞损伤最敏感的指标,与心肌的损伤程度呈正相关^[17]。此外,MDA 是氧自由基经过脂质过氧化反应的终产物,可以造成细胞膜变性,改变膜的流动性和通透性,间接反映出氧自由基造成心肌细胞的损伤程度^[18-19]。面对机体内过量的氧自由基,SOD 作为抗氧化酶,可以有效清除体内的氧自由基,使得自由基的损害降低,避免心肌细胞膜的过度损伤^[20]。CAT 是一种酶类清除剂,它可通过使氧化氢分解为分子氧和水的方式,实现体内过量的过氧化氢的降解,避免细胞受到过氧化氢的损伤。本研究发现,羟基红花黄色素 A 可以降低 AST、CK、LDH 活性,提高 SOD 和 CAT 活性,降低 MDA 含量水平,由此证明羟基红花黄色素 A 可以通过抗氧化应激作用来减轻 OGD/R 对心肌细胞造成的损伤。

在心肌细胞缺血再灌注损伤发病进程中,心肌细胞的异常凋亡是缺血再灌注损伤的重要表现,随着心肌细胞凋亡数量的不断增加,心脏的功能也会持续性降低^[21-22]。Caspase 是一种可以促进细胞凋亡的酶,在凋亡过程起到关键作用,Caspase-3 作为凋亡过程中的终末剪切酶,主要通过催化细胞基质裂解的方式加快细胞凋亡,是细胞凋亡的重要执行节点^[23-24]。作为最主要的凋亡基因,属于 Bcl-2 基因家族的 Bax 基因,可通过编码的 Bax 蛋白与 Bcl-2 结合形成异二聚体,进而对抑制凋亡的 Bcl-2 产生阻止作用,因此,Bax/Bcl-2 之间的比例大小是影响细胞凋亡强弱的关键因素^[25]。本研究发现,羟基红花黄色素 A 可以提高抑凋亡基因 Bcl-2 的表达,降低促凋亡基因 Bax 的表达,降低 Caspase-3 的蛋白表达水平,证明羟基红花黄色素 A 可以通过调节 Bax/Bcl2/Caspase-3 通路减少细胞凋亡,从而减轻 OGD/R 对大鼠 H9C2 心肌细胞的损伤。

综上所述,羟基红花黄色素 A 能够减轻 OGD/R 导致的 H9C2 心肌细胞氧化应激,减少细胞凋亡从而减轻心肌细胞的损伤程度,对心肌细胞具有良好

的保护作用,在治疗缺血性心肌疾病方面具有显著的潜力。

参考文献:

- [1] Sattar Y, Faisaluddin M, Almas T, et al. Cardiovascular outcomes of transradial versus transfemoral percutaneous coronary intervention in End-Stage renal Disease: a Regression-Based comparison [J]. Int J Cardiol Heart Vasc, 2022, 43: 101110.
- [2] Xuan J, Huang M, Lu Y, et al. Economic evaluation of safflower yellow injection for the treatment of patients with stable angina pectoris in China: a cost-effectiveness analysis [J]. J Altern Complement Med, 2018, 24(6): 564-569.
- [3] Kong D, Xia W, Zhang Z, et al. Safflower yellow injection combined with conventional therapy in treating unstable angina pectoris: a meta-analysis [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(5): 553-561.
- [4] 郭婉琴,王语晴,任宇婷,等.注射用红花黄色素对高脂血症模型小鼠血脂水平影响[J].辽宁中医药大学学报,2023,25(1):9-14.
- [5] 史海蛟,丁莉莉,周宇石,等.冠心病合并中风的中医病机认识及临床研究进展[EB/OL].(2022-08-05)[2023-03-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20220805.1150.004.html>.
- [6] 杨雅清,杨志稳,曾玉平,等.红花黄色素治疗稳定型心绞痛的 Meta 分析[J].中国药物评价,2021,38(5):431-440.
- [7] 付建华,张琼,樊长征,等.注射用红花黄色素与羟基红花黄色素 A 对大鼠急性心肌缺血的保护作用比较[J].国际中医中药杂志,2011,33(8):692-694.
- [8] 张雅筠,康永,倪艳,等.基于 CiteSpace 的注射用红花黄色素研究现状可视化分析[J].中国医药科学,2022,12(3):67-70.
- [9] Vahabzadeh G, Soltani H, Barati M, et al. Noscapine protects the H9C2 cardiomyocytes of rats against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(8): 5711-5719.
- [10] Yang B, Zheng C, Yu H, et al. Cardio-protective effects of salvianolic acid B on oxygen and glucose deprivation (OGD)-treated H9C2 cells [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2274-2281.
- [11] Tungalag T, Park KW, Yang DK. Butein ameliorates oxidative stress in H9C2 cardiomyoblasts through activation of the NRF₂ signaling pathway [J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(8): 1430.
- [12] Liu X, Bian H, Dou QL, et al. Ginkgetin alleviates inflammation, oxidative stress, and apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation in H9C2 cells via caspase-3 dependent pathway [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 1928410.
- [13] 谢君,芦波,李建华,等.丹参喷干粉对缺氧/复氧诱导的心肌细胞损伤的保护作用及其机制[J].中成药,2021,43(11):2989-2996.

- [14] Zhang Q, Fu H, Gong W, et al. Plumbagin protects H9C2 cardiomyocytes against TBHP-induced cytotoxicity by alleviating ROS-induced apoptosis and modulating autophagy [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(2): 501.
- [15] Wang X, Yang L, Kang L, et al. Metformin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via up-regulation of antioxidant enzymes [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182777.
- [16] 谭雪峰, 丁志敏, 郭成根, 等. 运动调节线粒体功能改善心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(14): 2242-2248.
- [17] 蹇明辉, 陈文明, 张怡. 延胡索乙素对高糖诱导 H9C2 细胞凋亡和氧化应激的抑制作用 [J]. *遵义医科大学学报*, 2022, 45(3): 317-321.
- [18] 刘蕾, 赵雪东, 王智彬. 北五味子多糖对缺氧/复氧心肌细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(12): 2174-2179.
- [19] Nehra S, Bhardwaj V, Kalra N, et al. Correction to: Nanocurcumin protects cardiomyoblasts H9c2 from hypoxia-induced hypertrophy and apoptosis by improving oxidative balance [J]. *J Physiol Biochem*, 2022, 78(3): 707.
- [20] 胡子恒, 赵明君, 董静, 等. 芝麻素干预 H9c2 细胞缺氧/复氧损伤的机制 [J]. *中成药*, 2022, 44(7): 2325-2329.
- [21] 沈钦海, 张盟辉, 秦召敏, 等. 槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(3): 16-22.
- [22] 严琳, 李亚萍, 王冬, 等. 基于自噬探讨芬太尼复合丙泊酚对大鼠心脏缺血再灌注损伤的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(4): 22-28.
- [23] 韩兆丰, 于艳, 吴振起, 等. 茅苍术及其麸炒品水提物对 H/R 诱导 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(8): 101-104, 272.
- [24] 支文冰, 余金花, 王春柳, 等. 制冰片介导 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路改善心肌细胞 H/R 损伤 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(5): 68-73, 267.
- [25] 王兴, 陈子琪, 李林, 等. 真武汤对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K-AKT 通路的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(7): 27-33, 57.

[收稿日期] 2022-08-12

中和阻断中和外周循环的 IL1 β 可减缓慢病毒感染 OPTN^{E478G} 肌萎缩侧索硬化症小鼠模型肌萎缩侧索硬化症的进展

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种不可逆的神经退行性疾病, 大部分患者一旦发病, 仅有 3~5 年存活期, 且目前没有安全有效的延缓该疾病进展的药物。因此, 迫切需要开发一种基于症状的治疗方法, 以提高 ALS 患者的生存率并改善他们的生活质量。据报道, 炎症状态, 尤其是白细胞介素 1 β (IL1 β) 升高, 在 ALS 进展中起关键作用。本研究发现通过中和外周循环 IL1 β 可减缓 ALS 小鼠模型的进展。

通过将携带 OPTN^{E478G} (视神经蛋白, ALS 患者的一种突变) 的慢病毒微量注射到小鼠的运动皮层内制备 ALS 小鼠模型。先前的研究发现, ALS 小鼠模型中 IL1 β 分泌显著升高。本文通过尾静脉注射抗 IL1 β 抗体中和外周循环 IL1 β , ELISA 和 RT-PCR 检测到 IL1 β 的蛋白和基因表达水平降低, TUNEL 检测到神经细胞死亡, MAP2 和 CASP3 的免疫荧光染色发现神经元细胞凋亡, GFAP 染色发现星形胶质细胞的数量减少。在旋转杆试验、握力试验、平衡木试验和足迹试验中, 发现抗 IL1 β 治疗后的 ALS 小鼠肌肉力量和运动功能增强。

该模型显示神经炎症可加快 ALS 的进展。同时, ALS 小鼠表现出神经炎症和 IL1 β 分泌升高。中和外周循环 IL1 β 后, ALS 小鼠表现出神经细胞的死亡和星形胶质细胞增生减少, 肌肉力量和运动能力得到改善。综上所述, 阻断 IL1 β 是减缓 ALS 进展的有效策略。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学 (英文)》期刊 (*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(1): 18-25, <https://doi.org/10.1002/ame2.12297>)。