

一氧乙酰旋覆花内酯对缺氧心肌细胞的作用研究

酉鹏华 饶堃睿 林静 陈海潮 王军伟 何晓敏

【摘要】 目的:探讨一氧乙酰旋覆花内酯(1-O-acetylbritannilactone, ABL)在心肌细胞缺氧损伤中的作用及其机制。 方法:体外培养 H9C2 心肌细胞,构建缺氧损伤模型,分为对照组、缺氧组、1 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组。采用 CCK-8 法检测心肌细胞活力,采用 RT-PCR 检测白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症指标及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶 p67^{phox} 亚基、NADPH 氧化酶 gp91^{phox} 亚基、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等氧化应激相关指标的 mRNA 表达水平,采用活性氧检测试剂盒进行活性氧(ROS)水平检测,用缺口末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡率,Western blot 检测凋亡蛋白 Bax、Bcl-2、细胞色素 C(CytC)及核因子 κB (NF- κB)p65、NF- κB 抑制蛋白 α (IKB α)的蛋白表达水平。 结果:(1)不同浓度 ABL 对心肌细胞存活率的影响:1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABL 均未影响心肌细胞存活率(P 均 >0.05)。(2)各组心肌细胞缺氧损伤后炎症因子的表达:与对照组相比,缺氧组细胞内 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症因子的 mRNA 表达水平均明显升高(P 均 <0.05),ABL 预处理后上述促炎症因子表达水平呈浓度依赖性降低(P 均 <0.05),但仍高于对照组(P 均 <0.05),且 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组间差异有统计学意义(P 均 <0.05)。(3)各组心肌细胞缺氧损伤后氧化应激的变化:与对照组相比,缺氧组细胞 ROS 水平明显升高,p67^{phox}、gp91^{phox} 的 mRNA 表达水平均明显升高,ABL 预处理后上述改变呈浓度依赖性降低(P 均 <0.05);与对照组相比,缺氧组细胞 SOD、GSH-Px 的 mRNA 表达水平均明显降低(P 均 <0.05),ABL 预处理后上述抗氧化物的表达呈浓度依赖性升高(P 均 <0.05)。(4)各组心肌细胞缺氧损伤后凋亡的变化:与对照组相比,缺氧组细胞凋亡率、Bax 和 CytC 的蛋白表达水平均明显升高,Bcl-2 的蛋白表达水平则明显降低(P 均 <0.05),ABL 预处理后逆转了上述细胞凋亡率及凋亡相关蛋白的改变(P 均 <0.05),且作用呈浓度依赖性(P 均 <0.05)。(5)各组心肌细胞缺氧损伤后相关信号通路的变化:与对照组相比,缺氧组细胞的磷酸化 p65、IKB α 蛋白的表达水平均明显升高(P 均 <0.05),ABL 预处理后上述蛋白表达水平呈浓度依赖性降低(P 均 <0.05)。 结论:ABL 可通过抑制 NF- κB p65/IKB α 信号通路对缺氧损伤的心肌细胞发挥保护性作用。

【关键词】 一氧乙酰旋覆花内酯;心肌细胞;缺氧;核因子 κB ; p65;核因子 κB 抑制蛋白 α

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2018.01.013

The protective effect of 1-O-acetylbritanilactone in hypoxia injury of myocardial cells YOU Penghua¹, RAO Kunrui², LIN Jing¹, CHEN Haichao¹, WANG Junwei¹, HE Xiaomin³. 1. Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Shaanxi 710068; 2. Department of Cardiology, The First Hospital of Nanchang, Jiangxi 330006; 3. The Hospital of Xi'an University of Technology, Shaanxi 710068, China

【Abstract】 Objective: To explore the role and the underlying mechanism of 1-O-acetylbritanilactone (ABL) in hypoxic injury of myocardial cells. **Methods:** In vitro, H9C2 myocardial cells were exposed to hypoxia, and divided into control group, hypoxia group, 1 $\mu\text{mol/L}$ ABL treatment group and 10 $\mu\text{mol/L}$ ABL treatment group by random number table. The viability of myocardial cells was measured by CCK-8 kit. The mRNA expression of interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), the p67^{phox} and gp91^{phox} subunit of reductive nicotinamide adenine dinucleotide phosphoric acid (NADPH) oxidase, superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured by RT-PCR, and the active oxygen detection kit was used to determine the level of reactive oxygen species (ROS). Nick end labeling (TUNEL) assay was used to detect the apoptosis rate of cells. The protein expression of Bax, Bcl-2, cytochrome C (CytC), nuclear factor κB (NF- κB) p65, IKB α were detected by western blot. **Results:** (1) The effect of different concentrations of ABL on the viability of cardiomyocytes: All the concentrations of ABL (1, 2, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) did not affect the viability of cardiomyocytes (all $P > 0.05$). (2) The expression of inflammatory factors in cardiomyocytes after hypoxia injury in each group: Compared with the control group, the mRNA expression levels of IL-1, IL-6 and TNF- α in hypoxia group were significantly higher (all $P < 0.05$), and the expression level of these cytokines in the ABL treatment groups decreased in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$), but still higher than the control group (all $P < 0.05$), the differences between 1 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ ABL treatment group were statistically significant ($P < 0.05$). (3) Changes of oxidative stress in cardiomyocytes after hypoxia injury in each group: Compared with the control group, the levels of ROS in hypoxia group were significantly increased, the mRNA expression levels of p67^{phox} and gp91^{phox} were also increased, and the changes were reversed by ABL treatment in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA expressions of SOD and GSH-Px in hypoxia group both decreased (both $P < 0.05$), and the expressions of these antioxidants in ABL treatment groups were increased in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). (4) The changes of apoptosis of cardiomyocytes after hypoxia injury in each group: Compared with the control group, the apoptotic rate and the protein expression levels of Bax and CytC in hypoxia group were increased while the protein expression level of Bcl-2 was significantly decreased (all $P < 0.05$), and the apoptotic rate, apoptosis-related protein were reversed by the ABL pretreatment (all $P < 0.05$), and the effect was concentration-dependent (all $P < 0.05$). (5) The changes of signal molecules after hypoxia injury in each group: The protein levels of phosphorylated p65 and IKB α in hypoxia group were significantly higher than those in control group (both $P < 0.05$). The expression level of these proteins was decreased after ABL pretreatment in a concentration-dependent manner (all $P < 0.05$). **Conclusions:** ABL can protect cardiomyocytes against hypoxia induced injury by inhibiting NF- κB p65/IKB α signal pathway.

【Key words】 1-O-acetylbritanilactone; Cardiac myocytes; Hypoxia; Nuclear factor κB ; p65; IKB α

心肌梗死的病理定义为由于长时间缺血导致的心肌细胞死亡^[1]。心肌缺血是氧供需失衡导致的结果^[2]。通常认为自由基损伤、细胞内钙超载及继发的炎症反应是缺氧损伤的重要环节^[3]。一氧乙酰旋覆花内酯 (ABL) 是提取自欧亚旋覆花的一种倍半萜类化合物, 具有抗肿瘤^[4-5]、抗炎^[6]、护肝^[6]、抗粥样硬化^[7]等多种生物学活性。ABL 可通过多条信号通路发挥生物活性作用。Choo 等^[6]研究表明,

ABL 可通过抑制胞外信号调节激酶 (ERK) 和蛋白激酶 B (Akt) 信号通路抑制黑色素活性。Han 等^[8]发现, ABL 通过阻断核因子 κB (NF- κB) 信号通路, 抑制 LPS 诱导的内皮型一氧化氮合酶 (iNOS) 及环氧化酶-2 (COX-2) 的表达, 从而发挥抗炎作用。在心血管领域, Liu 等^[9]发现, ABL 可通过抑制 NF- κB 活性, 抑制新生内膜形成, 从而降低血管成形术后再狭窄的风险。Zhao 等^[10]发现, ABL 可以促进血

管内皮生长因子诱导的 Akt 的磷酸化,进而促进人内皮细胞增殖、迁移和血管生成。然而,ABL 在缺氧心肌细胞中的作用尚无报道。本研究通过建立离体心肌细胞缺氧模型,探讨 ABL 对心肌细胞的保护作用及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

H9C2 心肌细胞株购自中国科学院细胞库; ABL(纯度为 98%)购自中国辰光生物公司;总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司;抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)抗体、抗 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体、抗细胞色素 C(CytC)抗体、抗总 NF- κ B p65 (T-p65)抗体、抗磷酸化 NF- κ B p65 (P-p65)抗体购自美国 CST 公司;抗总 NF- κ B 抑制蛋白 α (T-IK β)抗体、抗磷酸化 IK β α (P-IK β α)抗体购自美国 Abcam 公司;抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体购自美国 Santa Cruz 公司;活性氧(ROS)检测试剂盒购自中国碧云天公司;反转录试剂盒、缺口末端标记法(TUNEL)检测试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.2 H9C2 心肌细胞培养及分组

H9C2 心肌细胞置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中,采用含 10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 低糖培养基预培养。为探讨 ABL 对缺氧心肌细胞的影响,将 H9C2 心肌细胞随机分为 6 组:对照组、缺氧组和 ABL 4 个不同浓度的预处理组(1、2、5、10 μ mol/L 组)。缺氧组细胞用预先经 95%N₂、5%CO₂ 混合气饱和 1 h 的模拟缺氧液置换正常培养液后,放入 95%N₂、5%CO₂、37℃培养箱中缺氧培养 4 h。ABL 预处理组则在相应浓度的药物孵育 6 h 后给予缺氧处理。

1.3 CCK-8 法测定细胞存活率

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,每组 6 个复孔,每孔细胞数>1 000 个(空白对照组加入等量不含细胞的培养基),于 37℃、5%CO₂ 培养箱中预培养过夜。每组给予相应处理后,每孔每 100 μ L 加入 CCK-8 溶液 10 μ L,孵育 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 波长处的光密度值(OD 值),重复测定 3 次。按公式计算细胞存活率:存活率(%) = OD 值_{实验组}/OD 值_{空白对照组} × 100%。

1.4 RT-PCR 检测 mRNA 表达水平

TRIzol 提取细胞总 RNA,利用反转录试剂盒将每组 2 mg 总 RNA 逆转录为 cDNA。利用 LightCycler 480 SYBR Green 荧光定量 PCR 仪进

行 PCR 反应,反应条件为:93℃预变性 2 min,然后 93℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 40 个循环,最后 72℃延伸 7 min。每个样品设 3 个复管。以 GAPDH 为内参,计算白细胞介素(IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶 p67^{phox} 亚基、NADPH 氧化酶 gp91^{phox} 亚基、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等的 mRNA 相对表达水平。

1.5 ROS 检测试剂盒检测 ROS

取对数生长期的细胞接种于 96 孔板中,每组 6 个复孔,每孔细胞数>1 000 个,预培养过夜。每组给予相应处理后,PBS 洗涤细胞 3 次,每孔加入 100 μ L 无血清培养基,再加入 0.1 μ L 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),阳性对照孔加入 0.1 μ L ROS 阳性对照试剂 Rosup。避光孵育 30 min 后,用无血清培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。用酶标仪测定在 488 nm 波长、525 nm 波长处的光密度值(OD 值),计算相对 OD 值,重复测定 3 次。相对 OD 值 = OD 值_{实验组}/OD 值_{空白对照组}。

1.6 TUNEL 染色检测细胞凋亡

用 4%多聚甲醛室温固定爬片细胞 10 min,PBS 洗涤 2 次,给予 0.2% Triton X-100 通透细胞 10 min。PBS 洗涤后,每张爬片滴加底物平衡液 15 μ L,室温孵育至少 10 s;弃去底物平衡液,滴加底物工作液 11 μ L,湿盒中 37℃孵育 1 h;加入漂洗缓冲液振荡 15 s 后室温孵育 10 min,PBS 漂洗 3 次;滴加荧光素工作液 13 μ L(预先复温至室温),湿盒中室温避光孵育 30 min,PBS 漂洗 4 次;4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染色后封片,荧光显微镜下观察、拍照。凋亡率 = 细胞凋亡数/总细胞数 × 100%,每张爬片观察 10 个视野,每组选取 5 张爬片。

1.7 Western blot 检测蛋白表达水平

收集处理后的各组细胞,裂解缓冲液裂解后,离心取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白使用 10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h。4℃孵育一抗过夜,37℃孵育二抗 1 h,使用双色红外成像系统进行扫膜分析。采用 Quantity One 软件分析 Bax、Bcl-2、CytC、P-p65、T-p65、P-IK β α 、T-IK β α 蛋白和 GAPDH 内参蛋白条带的灰度值,目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白的相对表达水平。

1.8 统计学分析

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示。各组间比较使用单因素方差分析,两组间比较使用两独立样本的 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ABL 对 H9C2 心肌细胞存活率的影响

与对照组相比,1、2、5、10 μmol/L ABL 处理细胞 6 h 后均对细胞存活率无明显影响,各组间差异无统计学意义(*P* 均>0.05),即上述浓度 ABL 对 H9C2 心肌细胞均无明显毒性作用(见图 1)。因此我们选取 1 μmol/L 和 10 μmol/L 两个浓度进行后续实验。

2.2 ABL 对 H9C2 心肌细胞缺氧损伤后炎症因子表达的影响

与对照组相比,缺氧组 H9C2 心肌细胞炎症标志物 IL-1、IL-6、TNF-α 的 mRNA 表达水平均明显升高(*P* 均<0.05)。与缺氧组相比,1 μmol/L ABL

组和 10 μmol/L ABL 组上述炎症因子的 mRNA 表达水平呈浓度依赖性降低(*P* 均<0.05),但仍高于对照组(*P* 均<0.05),且两 ABL 预处理组组间比较差异有统计学意义(*P* 均<0.05)。见表 1。

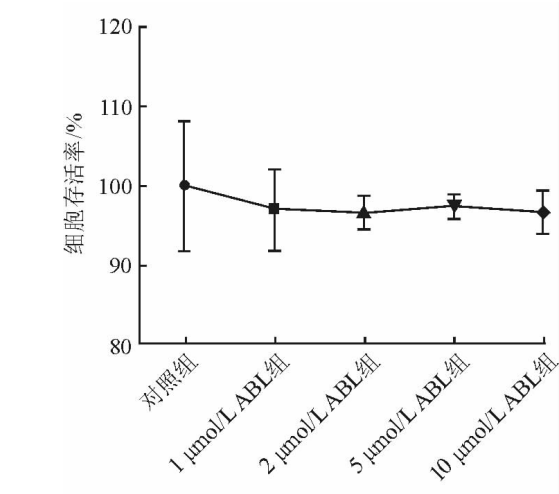


图 1 各组心肌细胞存活率

表 1 各组心肌细胞炎症标志物 mRNA 表达水平的比较

	对照组	缺氧组	1 μmol/L ABL 组	10 μmol/L ABL 组
IL-1	(1.63 ± 0.16) × 10 ⁻⁵	(6.83 ± 0.42) × 10 ⁻⁵ (¹)	(5.10 ± 0.43) × 10 ⁻⁵ (¹)(²)	(2.86 ± 0.35) × 10 ⁻⁵ (¹)(²)(³)
IL-6	(1.80 ± 0.07) × 10 ⁻³	(6.90 ± 0.68) × 10 ⁻³ (¹)	(3.92 ± 0.08) × 10 ⁻³ (¹)(²)	(2.51 ± 0.09) × 10 ⁻³ (¹)(²)(³)
TNF-α	(2.03 ± 0.08) × 10 ⁻⁶	(5.52 ± 0.48) × 10 ⁻⁶ (¹)	(3.78 ± 0.49) × 10 ⁻⁶ (¹)(²)	(2.61 ± 0.26) × 10 ⁻⁶ (¹)(²)(³)

注:与对照组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与缺氧组相比,⁽²⁾*P*<0.05;与 1 μmol/L ABL 组相比,⁽³⁾*P*<0.05

2.3 ABL 对 H9C2 心肌细胞缺氧损伤后氧化应激的影响

缺氧组 ROS 水平和促氧化应激因子 p67^{phox}、gp91^{phox}的 mRNA 表达水平明显高于对照组,而抗氧化因子 SOD、GSH-Px 的 mRNA 表达水平则明显下降(*P* 均<0.05)。与缺氧组相比,1 μmol/L ABL 组和 10 μmol/L ABL 组 ROS 水平,p67^{phox}、gp91^{phox}的 mRNA 表达水平呈浓度依赖性降低,

SOD、GSH-Px 的 mRNA 表达水平则呈浓度依赖性升高(*P* 均<0.05),且两 ABL 预处理组组间差异有统计学意义(*P* 均<0.05)。除 10 μmol/L ABL 组 p67^{phox}mRNA 的表达水平与对照组相比无明显差异(*P*>0.05),1 μmol/L ABL 组和 10 μmol/L ABL 组其余指标与对照组相比均存在明显差异(*P* 均<0.05)。见表 2。

表 2 各组心肌细胞 ROS 水平及氧化应激标志物 mRNA 表达水平的比较

	对照组	缺氧组	1 μmol/L ABL 组	10 μmol/L ABL 组
ROS 水平	7.33 ± 0.52	15.21 ± 0.75(¹)	11.00 ± 0.89(¹)(²)	8.00 ± 0.63(¹)(²)(³)
p67 ^{phox}	(1.45 ± 0.03) × 10 ⁻⁵	(5.61 ± 0.34) × 10 ⁻⁵ (¹)	(3.24 ± 0.46) × 10 ⁻⁵ (¹)(²)	(1.70 ± 0.05) × 10 ⁻⁵ (²)(³)
gp91 ^{phox}	(4.14 ± 0.17) × 10 ⁻⁷	(22.50 ± 1.80) × 10 ⁻⁷ (¹)	(11.30 ± 0.97) × 10 ⁻⁷ (¹)(²)	(5.48 ± 1.79) × 10 ⁻⁷ (¹)(²)(³)
SOD	0.46 ± 0.02	0.12 ± 0.02(¹)	0.21 ± 0.01(¹)(²)	0.41 ± 0.02(¹)(²)(³)
GSH-Px	0.27 ± 0.01	0.07 ± 0.01(¹)	0.15 ± 0.01(¹)(²)	0.25 ± 0.01(¹)(²)(³)

注:与对照组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与缺氧组相比,⁽²⁾*P*<0.05;与 1 μmol/L ABL 组相比,⁽³⁾*P*<0.05

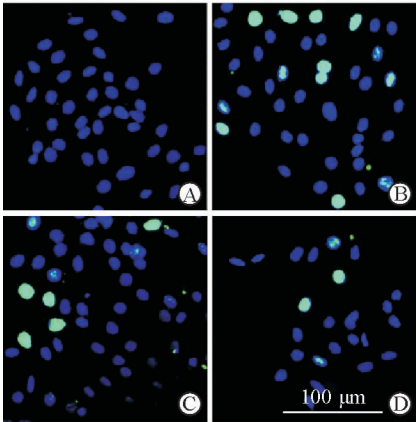
2.4 ABL 对 H9C2 心肌细胞缺氧损伤后凋亡率的影响

TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡率,对照组凋亡不明显(<3%),缺氧组凋亡率与对照组相比明显升

高(*P*<0.05);与缺氧组相比,1 μmol/L ABL 组和 10 μmol/L ABL 组心肌细胞凋亡率呈浓度依赖性降低(*P* 均<0.05),但仍高于对照组(*P* 均<0.05),且两 ABL 预处理组组间差异有统计学意义(*P*<0.05)。

见图 2、表 3。

Western blot 检测促凋亡蛋白 Bax、CytC 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达情况,与对照组相比,缺氧组 Bax、CytC 的蛋白表达水平明显增加,Bcl-2 的蛋白表达水平明显降低(P 均 <0.05);与缺氧组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组 Bax、CytC 的蛋白表达水平呈浓度依赖性降低,Bcl-2 的蛋白表达水平呈浓度依赖性增加(P 均 <0.05),但与对照组相比仍有差异(P 均 <0.05),且两 ABL 预处理组组间差异有统计学意义(P 均 <0.05)。见图 3、表 3。



注:A 为对照组;B 为缺氧组;C 为 1 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组;D 为 10 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组

图 2 TUNEL 染色检测各组心肌细胞的凋亡情况

表 3 各组心肌细胞的凋亡率及凋亡相关蛋白表达水平的比较

	对照组	缺氧组	1 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组	10 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组
凋亡率/%	2.83 \pm 0.11	48.30 \pm 0.32 ⁽¹⁾	24.60 \pm 0.25 ⁽¹⁾⁽²⁾	13.10 \pm 0.34 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
Bax	0.06 \pm 0.02	0.30 \pm 0.02 ⁽¹⁾	0.19 \pm 0.02 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.10 \pm 0.03 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
Bcl-2	0.49 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02 ⁽¹⁾	0.22 \pm 0.04 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.38 \pm 0.04 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
CytC	0.10 \pm 0.03	0.36 \pm 0.02 ⁽¹⁾	0.26 \pm 0.02 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.16 \pm 0.02 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾ $P<0.05$;与缺氧组相比,⁽²⁾ $P<0.05$;与 1 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组相比,⁽³⁾ $P<0.05$

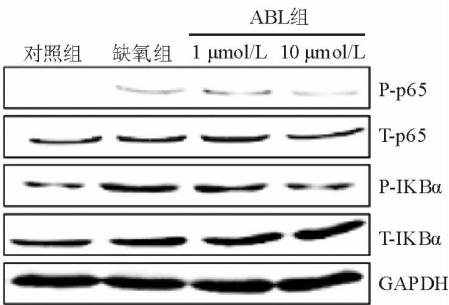


图 4 Western blot 检测各组心肌细胞 NF- κ B p65/I κ B α 信号通路相关蛋白的磷酸化水平

3 讨论

欧亚旋覆花被广泛用于治疗支气管炎、哮喘、肝炎和肿瘤等疾病。研究表明,ABL 可作用于

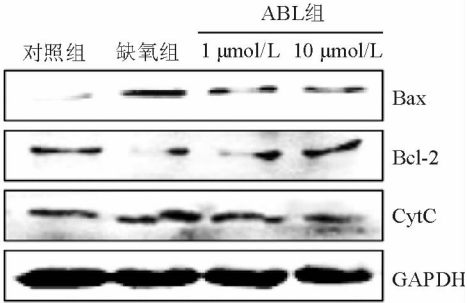


图 3 Western blot 检测各组心肌细胞凋亡相关蛋白的表达

2.5 ABL 对 H9C2 心肌细胞缺氧损伤相关信号通路的影响

由于 ABL 可通过影响 NF- κ B 信号通路产生抗炎^[8]和抑制新生内膜形成^[9]等多种生物学效应,而 NF- κ B 信号通路在心肌缺氧损伤中发挥重要作用^[11-12],因此我们检测了心肌细胞中 NF- κ B p65 及其下游 I κ B α 的磷酸化水平,以探讨 ABL 对 H9C2 心肌细胞缺氧损伤的潜在保护机制。与对照组相比,缺氧组 NF- κ B p65 及 I κ B α 的磷酸化水平明显上调(P 均 <0.05)。与缺氧组相比,1 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ ABL 组 NF- κ B p65 及 I κ B α 的磷酸化水平呈浓度依赖性降低(P 均 <0.05),但仍高于对照组(P 均 <0.05),且两 ABL 预处理组组间差异有统计学意义(P 均 <0.05)。见图 4、表 4。

ERK^[5]、Akt^[5]、NF- κ B^[13]、血管内皮生长因子(VEGF)^[10]等多种与心肌缺氧损伤相关的信号通路。我们据此提出假设,ABL 可以通过调节 NF- κ B 信号通路抑制心肌细胞缺氧损伤。

心肌缺血损伤是多因素参与的复杂病理过程,涉及炎症反应、氧化损伤、能量代谢紊乱和细胞内钙超载等^[14-16]。这些均会引起线粒体损伤、ROS 释放增加和炎症因子水平升高,最终导致心肌细胞的凋亡与坏死。本研究体外培养 H9C2 心肌细胞,在构建心肌细胞缺氧模型的基础上,探讨 ABL 在心肌细胞缺氧损伤中的作用。结果表明,缺氧能引起明显的心肌细胞损伤,而 ABL 能显著拮抗缺氧所致的炎症反应、氧化应激以及细胞凋亡。

表 4 各组 NF-κB p65/IKBα 信号通路相关蛋白表达水平的比较

	对照组	缺氧组	1 μmol/L ABL 组	10 μmol/L ABL 组
P-p65/T-p65	0.17 ± 0.01	0.35 ± 0.02 ⁽¹⁾	0.24 ± 0.02 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.20 ± 0.03 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
P-IKBα/T-IKBα	0.26 ± 0.03	0.98 ± 0.01 ⁽¹⁾	0.57 ± 0.02 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.38 ± 0.02 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注：与对照组相比，⁽¹⁾*P*<0.05；与缺氧组相比，⁽²⁾*P*<0.05；与 1 μmol/L ABL 组相比，⁽³⁾*P*<0.05

转录因子 NF-κB 是炎症反应的关键因子,参与多种病理状态的发生发展,如心肌缺血再灌注和心肌细胞凋亡等^[17],而心肌缺氧损伤同样会激活 NF-κB^[18]。为进一步研究 ABL 保护缺氧心肌细胞的潜在机制,我们观察了缺氧后心肌细胞中 NF-κB p65/IKBα 磷酸化的情况。结果显示,NFκB p65 和 IKBα 的磷酸化程度在缺氧过程中均明显增加,并且该变化可被 ABL 抑制,表明 NF-κB p65 和 IKBα 的磷酸化过程参与了心肌细胞的缺氧损伤过程,ABL 可通过抑制其磷酸化在心肌细胞缺氧损伤中发挥保护性作用。

本研究发现,ABL 可通过抑制 NFκB p65/IKBα 信号通路拮抗心肌细胞缺氧损伤,抑制心肌细胞的炎症反应和氧化应激反应,提高心肌细胞存活率,这为心肌细胞缺氧损伤及相关疾病的防治提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Cui YC, Pan CS, Yan L, et al. Ginsenoside Rb1 protects against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury via energy metabolism regulation mediated by RhoA signaling pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7:44579.

[2] Sun T, Dong YH, Du W, et al. The role of microRNAs in myocardial infarction; from molecular mechanism to clinical application[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4):E745.

[3] Neri M, Riezzo I, Pascale N, et al. Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction; a critical issue for clinicians and forensic pathologists [J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017:7018393.

[4] Wang F, Li H, Qiao JO. 1-O-acetylbritannilactone combined with gemcitabine elicits growth inhibition and apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4):5568-5572.

[5] Choo SJ, Ryoo IJ, Kim KC, et al. Hypo-pigmenting effect of sesquiterpenes from Inula britannica in B16 melanoma cells [J]. Arch Pharm Res, 2014, 37(5):567-574.

[6] Dong M, Hong T, Liu SA, et al. Hepatoprotective effect of the flavonoid fraction isolated from the flower of Inula britannica against D-Galactosamine-induced hepatic injury [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(6):1919-1923.

[7] Kim N, Hwangbo C, Lee S, et al. Eupatolide inhibits PDGF-induced proliferation and migration of aortic smooth muscle cells through ROS-dependent heme oxygenase-1

induction[J]. Phytother Res, 2013, 27(11):1700-1707.

[8] Han M, Wen JK, Zheng B, et al. Acetylbritannilactone suppresses NO and PGE2 synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression[J]. Life Sci, 2004, 75(6):675-684.

[9] Liu B, Han M, Wen JK. Acetylbritannilactone inhibits neointimal hyperplasia after balloon injury of rat artery by suppressing nuclear factor-kappa B activation [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324(1):292-298.

[10] Zhao J, NiuH, LiA, et al. Acetylbritannilactone modulates vascular endothelial growth factor signaling and regulates angiogenesis in endothelial cells[J]. PLoS One, 2016, 11(2):e0148968.

[11] Sun N, Wang H, Wang L. Protective effects of ghrelin against oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammation in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the HMGB1 and TLR4/NF-κB pathway [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3):2764-2770.

[12] Diaz A, Humeres C, Gonzalez V, et al. Insulin/NFκB protects against ischemia-induced necrotic cardiomyocyte death[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(2):451-457.

[13] Wang BZ, Yu ZG. The combination use of 1-O-acetylbritannilactone (ABL) and gemcitabine inhibits cell growth and induces cell apoptosis in lung adenocarcinoma cells[J]. Pharmazie, 2016, 71(4):213-217.

[14] Guo J, Wang SB, Yuan TY, et al. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation [J]. Atherosclerosis, 2013, 231(2):384-391.

[15] Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, et al. Inflammation in myocardial diseases[J]. Circ Res, 2012, 110(1):126-144.

[16] Vander Heide RS, Steenbergen C. Cardioprotection and myocardial reperfusion: pitfalls to clinical application [J]. Circ Res, 2013, 113(4):464-477.

[17] Yang Y, Ding S, Xu GJ, et al. MicroRNA-15a inhibition protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes by targeting mothers against decapentaplegic homolog 7[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(6):3699-3705.

[18] Kim YS, Kim JS, Kwon JS, et al. BAY 11-7082, a nuclear factor-kappa B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model [J]. Int Heart J, 2010, 51(5):348-353.

(收稿:2017-06-08 修回:2017-10-15)

(本文编辑:胡晓静)