

黄芪总皂苷对 H₂O₂ 诱导心肌细胞凋亡的保护作用

职玉娟, 黄水清(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 研究黄芪总皂苷(ASTs)对 H₂O₂ 诱导心肌细胞凋亡的保护作用及相关调控蛋白 Hsp-70、Caspase-3、Bcl-2、Bax 表达的影响。**方法** (1)常规方法培养大鼠乳鼠心肌细胞, 分为正常对照组、模型组及黄芪总皂苷 4 个剂量组(20, 40, 80, 100 mg·L⁻¹), 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察黄芪总皂苷不同浓度对 H₂O₂ 损伤心肌细胞存活率的影响; (2)乳鼠心肌细胞培养后分为正常对照组、模型组、黄芪总皂苷(100 mg·L⁻¹)预处理组, 细胞免疫组化法和免疫印迹法(Western-blotting)分别检测 Bcl-2、Bax、Hsp-70、Caspase-3 的表达。**结果** (1)各黄芪总皂苷各组与模型组比较, 细胞存活率明显增高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且与黄芪总皂苷呈剂量依赖性; (2)与正常对照组比较, 模型组 Bcl-2、Hsp-70 有少量表达, Bax、Caspase-3 表达明显增多, 黄芪总皂苷(100 mg·L⁻¹)组与模型组比较, 明显促进 Bcl-2、Hsp-70 的表达, 降低 Bax、Caspase-3 的表达。**结论** 黄芪总皂苷对心肌细胞具有良好的抗氧化保护作用, 且呈剂量依赖性, 其作用机制可能是通过上调 Bcl-2、Hsp-70 及下调 Bax、Caspase-3 的表达来实现。

关键词: 黄芪总皂苷; H₂O₂; 四甲基偶氮唑蓝; 细胞免疫组化; 免疫印迹

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0010-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.003

Protective Effects of Astragalosides on Apoptosis of Myocardial Cells Induced by Hydrogen Peroxide

ZHI Yujuan, HUANG Shuiqing(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of astragalosides(ASTs) on the apoptosis of myocardial cells induced by hydrogen peroxide(H₂O₂) and on the expression of apoptosis-related proteins of Hsp-70, Caspase-3, Bcl-2, and Bax. **Methods** In the first experiment, neonatal rat myocardial cells were cultured with the conventional method, and then the cultured cells were divided into normal control group, model group and ASTs pretreatment groups at the concentrations of 20, 40, 80, 100 mg·L⁻¹. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) method was adopted to observe ASTs at different concentrations on the survival rate of injured myocardial cells induced by H₂O₂. In the second experiment, cultured neonatal rat myocardial cells were divided into the normal control group, model group, ASTs pretreatment group(100 mg·L⁻¹), immunocytochemistry and Western blotting were used to detect the expression of Bcl-2, Bax, Hsp-70, and Caspase-3. **Results** In experiment one, the cell survival rate of ASTs pretreatment groups was increased significantly compared to the model group($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the cell survival rate was positively correlated with ASTs concentrations. In experiment two, model group had a small quantity of Bcl-2 and Hsp-70 expression, and had obvious expression of Bax and Caspase-3 compared to the normal control group. ASTs group increased the expression of Bcl-2 and Hsp-70, and decreased the expression of Bax and Caspase-3 significantly compared to the model group. **Conclusion** ASTs has good antioxidation on the myocardial cells with a dose-dependent manner, and its mechanism may be through the up-regulation of Bcl-2 and Hsp-70, and through the down-expression of Caspase-3 and Bax.

Keywords: Astragalosides; H₂O₂; Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT); Immunocytochemistry; Western blotting

收稿日期: 2012-10-04

作者简介: 职玉娟, 女, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病的研究。Email: okzhiyujuan@163.com。通讯作者: 黄水清, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病的研究。Email: hsqhzh2000@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973895); 广东省科技计划项目(20090315)。

黄芪总皂苷(astragalosides, ASTs)是黄芪的主要有效成分。研究报道,ASTs可减轻自由基所致的心肌细胞损伤,减少乳酸脱氢酶释放^[1];可缩小犬心肌梗死范围,减轻缺血心肌的损伤^[2];抑制病毒感染小鼠心肌细胞Ca²⁺内流,减轻病毒性心肌炎心肌损害^[3];改善异丙肾上腺素导致心肌损伤的心肌能量代谢,降低心肌乳酸和脂质过氧化产物丙二醛的含量^[4]。但是,ASTs对心肌保护作用及心肌细胞凋亡通路的机制目前尚未完全阐明。本研究旨在探讨ASTs对H₂O₂诱导乳大鼠心肌细胞凋亡通路的保护机制,为ASTs的进一步开发和研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及仪器 1~3日龄SPF级SD大鼠,购于广州中医药大学大学城实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2008-0020。四甲基偶氮唑蓝(MTT),美国Sigma公司,批号:MKBG9627V;黄芪总皂苷,上海阿拉丁试剂公司,批号:1125757;胎牛血清(FBS),南美血源,批号:210165K;0.25%胰酶,美国GIBCO公司,批号:917999;DMEM低糖培养基(批号:8111291)、I型胶原酶(批号:498586),美国GIBCO公司;5-溴脱氧尿苷(5-Brdu),美国Sigma公司,批号:HMBC0209V;30% H₂O₂,天津富宇精细化工有限公司;Bcl-2兔多克隆抗体(编号:BA0412)、Bax兔多克隆抗体(编号:BA0315)、Caspase-3兔多克隆抗体(编号:BA2142)、Hsp-70兔多克隆抗体(编号:BA0928)、生物素标记羊抗兔IgG(批号:BA1003)、DAB显色试剂盒(编号:AR1022),武汉博士德公司;BB16UV/BB5060UV CO₂培养箱,德国 Heraeus 公司;RT-2100C酶标分析仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 心肌细胞培养 按常规方法将10只乳鼠分别在全无菌条件下开胸取出心脏,仔细去除其他组织,将心脏置于4℃ HBSS液中,清洗3次,以去除残留血液。用锋利眼科剪将心脏剪成约1 mm³的组织碎块(在冰上操作),加消化酶复合液(0.125%胰酶+0.1% I型胶原酶),37℃水浴8 min,吸出上清液加入等量完全DMEM培养基(含10% FBS、1%青链霉素、0.1 mmol·L⁻¹ 5-Brdu)终止消化,200目筛网过滤,1000 r·min⁻¹、10 min离心,弃上清,细胞沉淀用完全培养基悬浮;剩下的组织块加入消化酶继续消化,每次8 min,消化8~10次,直至组织块几乎完

全消化。最后将收集到的细胞悬液放入培养瓶中,5% CO₂、37℃培养90 min,以除去贴壁成纤维细胞,然后将细胞悬液种于新的培养瓶或培养板内。

1.2.2 MTT法检测ASTs对H₂O₂损伤心肌细胞的作用

实验共分为6组:正常对照组、模型组、ASTs 4个剂量组(20, 40, 80, 100 mg·L⁻¹)。收集消化分离得到的心肌细胞,90 min差速贴壁后,将细胞悬液以2.5×10⁴个/mL均匀种于96孔板内,种板后48 h换液,72 h后换无血清培养基同步24 h,加入不同浓度的ASTs作用30 min后,模型组及ASTs各组均加150 μmol·L⁻¹ H₂O₂作用20 h。采用MTT法检测细胞存活率。

1.2.3 细胞免疫组化法检测心肌细胞Bcl-2、Bax、Hsp-70、Caspase-3的表达

实验分为3组:正常对照组、模型组、ASTs(100 mg·L⁻¹)组。心肌细胞以1×10⁶个/mL的密度种于6孔板,孔板内置灭菌的盖玻片。每组2个复孔,实验重复3次。心肌细胞种板48 h后换液,72 h后换无血清培养基同步24 h。ASTs组先加ASTs(100 mg·L⁻¹)作用30 min,再与模型组一起加150 μmol·L⁻¹ H₂O₂作用20 h。免疫组化法检测:取出培养板,PBS洗3遍,4%中性甲醛固定15 min,PBS洗3次,每次2 min,3% H₂O₂孵育15 min(以清除内源性过氧化物酶),PBS洗3次,每次2 min,加正常山羊血清封闭液封闭20 min,倾去勿洗,滴加Bax、Bcl-2、Caspase-3、Hsp-70一抗(1:100)50 μL于盖破片上,4℃过夜,PBS洗3次,每次2 min,加生物素标记羊抗兔IgG(1:200)50 μL,37℃孵育1 h,PBS洗3次,每次2 min,DAB显色7 min,流水冲洗10 min。显微镜下观察,拍照。

1.2.4 免疫印迹法检测心肌细胞Bcl-2、Bax、Hsp-70、Caspase-3的表达

实验分为3组:正常对照组、模型组、ASTs(100 mg·L⁻¹)组。细胞以1×10⁶个/mL密度种于培养瓶内,每瓶5 mL液体量。培养48 h后换液,72 h后换无血清培养基同步24 h,ASTs组加ASTs(100 mg·L⁻¹)预处理30 min,与模型组一起加150 μmol·L⁻¹ H₂O₂作用20 h,进行Western-blotting检测。样品处理:每个培养瓶内加入1 mL细胞裂解液和10 μL PMSF(10 mg·mL⁻¹)(冰上操作),在4℃冰箱裂解30 min,10000 r·min⁻¹、30 min离心处理后收集上清即得总蛋白质样品。取定量裂解后的细胞样品100 μL加入5×蛋白上样缓冲液25 μL,混匀后放

入沸水中煮 3~5 min 使蛋白变性。按照每孔 25 μg 蛋白量上样, 经 SDS-PAGE 后, 将蛋白从电泳凝胶中转移到 PVDF 膜上, 加入 10 %脱脂奶粉封闭 2 h, 用 TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, 然后加 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Hsp-70 一抗 (1:500) 4 °C 过夜, TBST 缓冲液洗 5 次, 每次 5 min, 加入 HRP 标记的二抗 (1:1000) 室温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗 5 次, 每次 5 min, 用化学发光剂显影, X 线片曝光, Quantity One 分析胶片灰度值。

1.3 统计学处理方法 数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS17.0 统计软件分析, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASTs 对 H₂O₂ 损伤心肌细胞的影响 (MTT 法)

见表 1。与模型组比较, ASTs 各剂量组对 H₂O₂ 损伤心肌细胞均有明显的保护作用, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 以 ASTs 100 mg·L⁻¹ 组作用效果最好。

表 1 不同浓度 ASTs 对 H₂O₂ 损伤心肌细胞的作用 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 1 Effect of different concentrations of astragalosides on myocardial cells injured by H₂O₂

组别	药物浓度 / mg·L ⁻¹	细胞存活率(OD 值)
正常对照组	-	0.6012±0.01886
模型组	-	0.3514±0.01352
ASTs 组	20	0.4070±0.03190*
ASTs 组	40	0.4352±0.04271**
ASTs 组	80	0.5140±0.03639**
ASTs 组	100	0.5392±0.01698**

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 心肌细胞 Bcl-2、Bax、Hsp-70、Caspase-3 的表达 (细胞免疫组化法)

见图 1。Hsp-70 可表达在核内、线粒体、胞浆, 正常对照组表达较多, 模型组表达明显减少, ASTs 组(100 mg·L⁻¹)较模型组表达明显增多; Caspase-3 正常情况下表达在胞浆, 受刺激后转移至细胞核。正常对照组表达很少, 模型组表达明显增多, ASTs 组(100 mg·L⁻¹)与模型组相比表达明显下降; Bcl-2 主要表达在核膜、线粒体膜、内质网膜, 正常对照组有适量表达, 模型组表达稍多, ASTs 组(100 mg·L⁻¹)较模型组表达明显增多; Bax 正常情况下表达在胞浆, 在凋亡信号诱导后很快迁移到线粒体。正常对照组有少量表达在线粒体, 模型组可见大

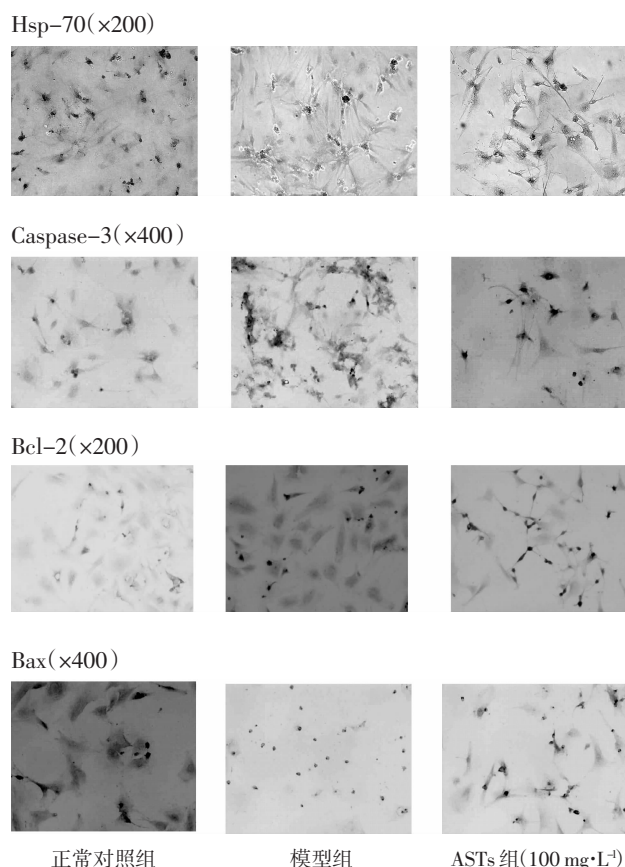


图 1 各组心肌细胞 Hsp-70、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达 (细胞免疫组化法)

Figure 1 The Hsp-70, Caspase-3, Bcl-2, Bax protein expression in myocardial cells of different groups (by immunocytochemistry)

量高分散表达在线粒体, ASTs 组(100 mg·L⁻¹)与模型组相比线粒体表达减少。

2.3 心肌细胞 Hsp-70、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达图谱 (免疫印迹法)

见图 2。与正常对照组比较, 模型组 Caspase-3、Bax 表达明显增多, Hsp-70 表达减少, Bcl-2 表达稍多; 与模型组相比, ASTs 组 (100 mg·L⁻¹)Caspase-3、Bax 表达明显减少; Hsp-70、Bcl-2 表达明显增多。

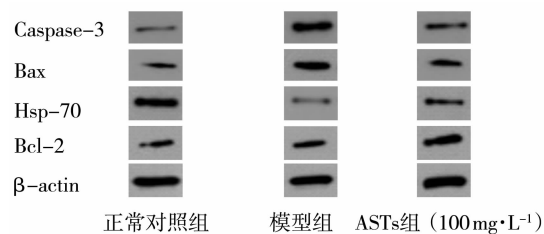


图 2 各组心肌细胞 Hsp-70、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达图谱 (免疫印迹法)

Figure 2 The protein expression Hsp-70, Caspase-3, Bcl-2, Bax in myocardial cells of different groups (by immunoblotting)

3 讨论

现代研究表明多种心脏疾病的病理过程都有凋亡机制参与,其中自由基导致的细胞凋亡是心肌受损的主要途径。形态学观察表明, H₂O₂ 可使培养的心肌细胞发生氧化应激性损伤,出现细胞破碎或胞体皱缩、变小变圆。一般认为,较高浓度 H₂O₂ 作用于心肌细胞时,易使膜脂质过氧化,膜性细胞器发生破坏,造成细胞坏死;较低浓度 H₂O₂ 作用于心肌细胞时,可通过影响凋亡信号转导与相关基因功能,造成细胞凋亡^[5-6]。本实验用低浓度 H₂O₂ (150 μmol·L⁻¹) 建立心肌细胞凋亡模型,用 ASTs 进行干预,研究结果显示,ASTs 能够抑制 H₂O₂ 诱导的心肌细胞凋亡,可明显提高心肌细胞存活率,并呈量效关系。

目前认为细胞凋亡的发生机制主要有两条信号通路介导其发生,一条是通过 Fas/FasL 及 TNF/TNFR 依次激活 caspase-8 和 caspase-3 的死亡受体通路。另一条是通过线粒体的信号通路:氧自由基刺激作用时,促凋亡蛋白 Bax、Bak 从胞浆转移到线粒体膜上,改变线粒体膜的通透性,导致线粒体膜电位的降低,并且构成跨线粒体外膜的孔,使线粒体膜间隙的细胞色素 C (Cytochrome C) 通过电压依赖性阴离子通道 (VDAC) 外流至细胞浆^[7]。细胞色素 C 与促凋亡蛋白酶因子-1 (Apaf-1) 和 ATP 及 pro-caspase-9 形成凋亡体复合物^[8-9],导致 caspase-9 的激活,在 caspase-9 被激活后,再作用于其下游的 caspase-3 酶原,活化 caspase-3,活化的 caspase-3 能对其底物特异性切割,使 DNA 片段化^[10-11],最终导致凋亡的发生。在凋亡过程中,Bcl-2 可阻止细胞色素 C 的释放,阻止 Caspase-3 的活化,抑制凋亡的发生^[12]。

热休克蛋白 (heat shock proteins, Hsp) 是细胞在应激情况下启动热休克基因而产生的一种结构高度保守的蛋白质,是一组具有内源性保护作用的应激性蛋白质。其中 Hsp70 可阻止寡聚化的 Apaf-1 与 pro-caspase-9 的募集结合^[13-14]。其还可以提高心肌细胞蛋白质的正确折叠或聚集能力,防止在正确的多聚体形成前新合成蛋白质的错误折叠或聚集;促使受损心肌细胞、变性蛋白质恢复或加速其降解和消除,陪伴蛋白分子在细胞内跨膜转运,保护心肌细胞肌动蛋白和细胞骨架,增加心肌细胞一氧化氮的合成,抑制心肌细胞凋亡^[15]。

ASTs 能改善心肌能量代谢,本实验对线粒体通路中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 Hsp-70 相关蛋白的表达进行了实验研究,发现模型组 Bcl-2、Hsp-70 表达下降而 Caspase-3、Bax 表达明显增高,黄芪总

皂苷能促进 Bcl-2、Hsp-70 蛋白的表达而明显降低 Caspase-3、Bax 蛋白的表达。ASTs 能够剂量依赖性地抑制 H₂O₂ 诱导的心肌细胞凋亡,其可能机制为通过上调 Bcl-2、Hsp-70 蛋白的表达来抑制 Bax、Caspase-3 的活性。

参考文献:

- [1] 李靖,朱健华,黄崇勤,等. 黄芪皂甙对培养心肌细胞损伤的影响[J]. 中国现代医学杂志, 1998, 8(8): 7-9.
- [2] 雷春利,陈羽,吕文伟,等. 黄芪总皂甙对犬急性心肌梗塞缺血面积、心外膜心电图、心肌酶的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1995, 21(2): 111-113.
- [3] 陆曙,张寄南,杨笛,等. 黄芪总皂甙影响病毒感染心肌细胞肌浆网钙泵活力及其基因表达[J]. 中华医学杂志, 2000, 80(12): 953-954.
- [4] 冯琳,孟丹,陈相健,等. 黄芪总皂甙对异丙肾上腺素致大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(17): 1313-1316.
- [5] Chen QM, Tu VC, Wu Y, et al. Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 373(1): 242-248.
- [6] Von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. Circulation, 1999, 99(22): 2934-2941.
- [7] Shigeomi Shimizu, Yasuo Shinohara, Yoshihide Tsujimoto. Bax and Bcl-X_L independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator [J]. Oncogene, 2000, 19, 4309-4318.
- [8] Hu Y, Benedict MA, Ding L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis [J]. EMBO J, 1999, 18(13): 3586-3595.
- [9] Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development [J]. Cell, 1998, 94(6): 739-750.
- [10] Acehan D, Jiang X, Morgan DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation [J]. Mol Cell, 2002, 9(2): 423-432.
- [11] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis [J]. Biochem J, 1997, 326(1): 1-16.
- [12] Swanton E, Savory P, Cosulich S, et al. Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts [J]. Oncogene, 1999, 18(10): 1781-1787.
- [13] Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(8): 469-475.
- [14] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, et al. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70 [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(8): 476-483.
- [15] Latchman DS. Heat shock proteins and cardiac protection [J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(4): 637-646.

(编辑: 邓响潮)