

黄芪甲苷促进乳鼠心肌细胞自噬及抑制缺血诱导的心肌细胞凋亡作用研究

屈玉春, 王大伟, 严 夏, 黄伟新, 王 津(广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 观察黄芪甲苷(AS)对缺血模型诱导的乳鼠心肌细胞自噬的影响, 探讨黄芪甲苷的心肌保护作用及机制。**方法** 建立乳鼠心肌缺血的细胞损伤模型, 采用分子生物学及免疫细胞化学法观察心肌细胞在缺血模型及黄芪甲苷处理后的自噬与细胞损伤变化。**结果** 心肌细胞的自体吞噬程序会被缺血刺激激活, 缺血可致心肌细胞死亡。黄芪甲苷可明显恢复缺血处理诱导的心肌细胞损伤, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的黄芪甲苷分别使细胞活性恢复至 80 %及 85 % (均 $P < 0.05$), 使凋亡细胞数目降低至正常对照组的 2.6 倍及 1.8 倍 (均 $P < 0.05$), 且呈现出剂量依赖效应。同时, 黄芪甲苷可促进自噬蛋白(LC3)的表达; 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的黄芪甲苷分别使细胞 LC3 升高至正常对照组的 1.5 倍及 1.7 倍 (均 $P < 0.05$)。**结论** 黄芪甲苷可恢复缺血降低的心肌细胞活性, 降低缺血诱导的心肌细胞凋亡, 其机制可能与促进缺血诱导的心肌细胞自噬相关。

关键词: 心肌细胞; 缺血; 自噬; 凋亡; 乳鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0169-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.013

Study of Astragaloside IV in Promoting Autophagy and Inhibiting Ischemia-induced Cardiomyocytes Apoptosis

QU Yuchun, WANG Dawei, YAN Xia, HUANG Weixin, WANG Jin (The Second Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of astragaloside IV on the autophagy of cardiomyocytes induced by ischemia, and to explore the myocardial protection and mechanism of astragaloside IV. **Methods** The neonatal ischemia cardiomyocyte model was established. By using the methods of molecular biology and immunocytochemistry, the changes of cardiomyocyte autophagy and injury in ischemia model before and after being treated with astragaloside IV were observed. **Results** The process of cardiomyocyte autophagy could be activated by ischemia which will induce the death of cardiomyocyte. The astragaloside IV medicated serum could recover the cardiomyocyte injury induced by ischemia obviously. Astragaloside IV at 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ recovered the activity of cells to 80 % ($P < 0.05$) and 85 % ($P < 0.05$), and decreased the number of apoptotic cells to 2.6 ($P < 0.05$) and 1.8 ($P < 0.05$) times of normal group, respectively. The above effects were dose-dependently. Furthermore, the astragaloside IV medicated serum could promote the expression of autophagy protein LC3 and inhibit the expression of Beclin 1 protein. Astragaloside IV at 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ increased the level of autophagy protein LC3 to the 1.5 ($P < 0.05$) and 1.7 ($P < 0.05$) times of normal group. **Conclusion** Astragaloside IV can recover the cardiomyocytes activity which is decreased by ischemia, and decrease the myocardial cell apoptosis induced by ischemia. The mechanism may be related with promoting the autophagy of cardiomyocytes induced by ischemia.

Keywords: Cardiomyocytes; Ischemia; Autophagy; Apoptosis; Neonatal rats

收稿日期: 2013-12-07

作者简介: 屈玉春, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 心血管内科临床与科研。Email: qqyycc555@163.com。通讯作者: 王大伟, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 从事心血管急症的临床与实验研究。Email: 13902236233@139.com。

基金项目: 广东省自然科学基金(8151040701000046)。

自噬是细胞内长寿命蛋白和胞浆成分降解再循环利用的一种进化保守方式。正常情况下,心脏维持着低水平的自噬。心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion injury, IR)的病理生理过程中,均有自噬参与。其中,能量缺乏、低氧或炎症、细胞器损伤等应激状态都可以激活自噬^[1]。通过自噬修复而来的氨基酸和脂肪酸可被利用来产生能量,因而是心肌细胞缺氧耐受的重要调节机制。通常情况下,自噬通过对包括细胞器在内的胞浆成分进行循环利用维持细胞的正常功能^[2]。抑制自噬可导致功能异常的蛋白和细胞器堆集并促进凋亡。自噬蛋白(LC3),为自噬相关基因 Atg8 同源体,是目前所知的唯一在自噬体上表达的蛋白,因此被广泛作为自噬标志物^[3]。它被绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)标记后,通过荧光显微镜可以观察到自噬体的形成。它也可被利用来进行自噬流的检测,从而更准确地解释自噬体数目增加的真正原因。心肌缺血阶段,通过 AMPK 信号通路激活自噬而促进心肌细胞的存活,但再灌注阶段通过 Beclin1 途径激活的自噬对心脏却有害无益^[4]。

黄芪苷分为黄芪苷 I、黄芪苷 II、黄芪苷 IV。其中生物活性最好的是黄芪苷 IV,即黄芪甲苷(Astragaloside, AS)。实验表明黄芪甲苷具有抗应激功效,可阻止应激反应警戒期的肾上腺增生和胸腺萎缩,阻止应激反应抵抗期和衰竭期出现的异常变化从而起到抗应激作用,特别对营养物质代谢过程中酶的双向调节效果显著,在一定程度上减轻和消除了应激对机体生理机能的影响^[5]。然而,黄芪甲苷对心肌缺血再灌注损伤中细胞自噬的调节作用尚未明确,故本研究以此为切入点,观察黄芪甲苷对缺血诱导的自噬的调节及对心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 乳鼠 20 只,1~3 日龄,雌雄不限。动物生产许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.2 主要试剂及仪器 超净工作台,美国 Aire 公司;MCO-20AIC 型 CO₂ 培养箱,日本 SANYO 公司;3-18K 型低温高速离心机,德国 Sigma 公司;FV1000 型激光共聚焦显微镜,日本 OLYMPUS 公司;AG22331 型生物分光光度计,德国 Eppendorf 公司。LC3 抗体,批号:NB100-2220,美国 Novus Biologicals 公司; α -SA 抗体,批号:ab66186,英国 Abcam 公司。

1.3 心肌细胞的原代培养及鉴定^[7] 于无菌条件下取

出乳鼠心脏,用 PBS 平衡盐溶液清洗 3 次后剪成 1 mm 大小,用终浓度均为 0.04 % 的胰蛋白酶和胶原酶 II 型混合液分次消化,每次 10 min 至消化完全,加入含 10 % 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液制成单细胞悬液,经 2200 目筛网过滤,将滤液转移到 25 cm 的细胞培养瓶中,置于 37 °C、5 % CO₂、饱和湿度孵箱中培养 90 min,弃去贴壁细胞,未贴壁细胞即心肌细胞,继续培养至 48 h 后进入实验。免疫细胞化学法鉴定心肌细胞,肌动蛋白单克隆抗体 a-SA 染色阳性(阳性率 $\geq$ 90 %)。

1.4 分组及缺血细胞模型 将培养 48 h 心肌细胞培养液换成无血清 DMEM/F12 液同步化,24 h 后随机分为 4 组:正常对照组(Control):常氧(5 % CO₂ 培养箱)DMEM(10 % FBS)培养;模型组(Ischemia, Isch):低氧(1 % O₂, 5 % CO₂, 94 % N₂)DMEM 培养基(10 % FBS)培养;黄芪甲苷(Isch-AS)低、高剂量组(10, 20 μ mol·L⁻¹):分别在低氧 DMEM 培养基内加入 10, 20 μ mol·L⁻¹ AS;各组均在处理 8 h 后进行相关观察。

1.5 细胞活性测定 采用 LDH 试剂盒测定。留取处理后的新鲜细胞及培养液, Triton 100 裂解贴壁细胞后,细胞裂解液与细胞培养液各取等量分别注入 96 孔板,加入 LDH 反应试剂。室温孵育后,于 490 nm 波长读取各孔 OD 值,计算活细胞占总细胞量的百分比即为待测细胞活性。

1.6 荧光显微镜观察细胞凋亡 采用 TUNEL 试剂盒测定细胞凋亡。将细胞接种于培养板,处理后,用多聚甲醛固定 30 min,加入 TUNEL 反应试剂,37 °C 孵育,封片后于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。TUNEL 阳性细胞计数通过 IPP 软件完成。

1.7 蛋白质免疫印记(Western blot)分析 收集 Ripa 裂解的细胞裂解液。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定,每道加 50 μ g 蛋白,电泳分离蛋白。将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。封闭 1 h 后,用抗 LC3 抗体 4 °C 孵育过夜,洗膜后加入羊抗鼠二抗,室温孵育 1 h,洗膜后用 ECL 试剂浸泡后显影。

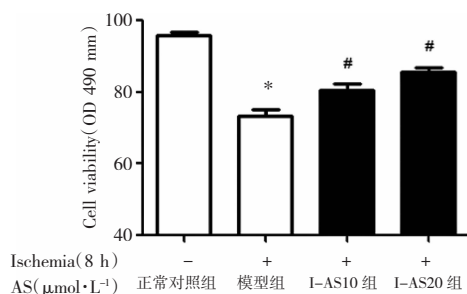
1.8 统计学处理方法 采用 SPSS 18.0 软件,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞鉴定 心肌细胞胞浆中抗 α -SA 抗原表达阳性,呈棕黄色;非心肌细胞呈阴性,镜下任选 15 个视野,计数 100 个细胞,阳性细胞比率约

为 92 %。

2.2 各组心肌细胞活性比较 见图 1。LDH 释放量可用于反映细胞的损伤程度^[8]，亦可用于计算细胞活性。缺血处理后，与正常对照组比较 (96 %)，模型组的细胞活性明显降低 (75 %)，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与模型组比较，10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芪甲苷分别使细胞活性恢复至 80 % 及 85 % (均 $P < 0.05$)，呈现出剂量依赖效应，说明黄芪甲苷可恢复缺血处理的心肌细胞活性。



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ 。

图 1 各组心肌细胞活性比较

Figure 1 Myocardial cell activity of different groups

2.3 各组心肌细胞凋亡比较(TUNEL 染色法) 见图 2。与正常对照组比较，模型组发生凋亡的细胞数目明显增多，增至 5.4 倍，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芪甲苷分别使凋亡细胞数目降低至模型组的 1/2 及 1/3 (均 $P < 0.05$)，黄芪甲苷组可明显降低缺血处理诱导的心肌细胞凋亡数目，且呈现出剂量依赖效应，提示黄芪甲苷可明显降低缺血诱导的心肌细胞凋亡。

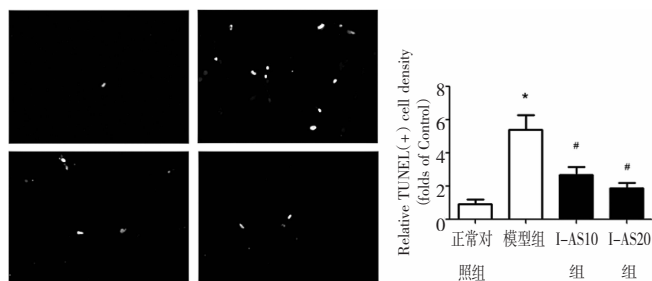


图 2 各组心肌细胞凋亡比较(TUNEL 染色)

Figure 2 Astragaloside inhibited the cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia 8 h

2.4 心肌细胞自噬蛋白 LC3 的表达(Western blot 法) 见图 3。与正常对照组比较，模型组心肌细胞 LC3 的表达增加 1.3 倍，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)；10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芪甲苷分别使细胞

LC3 升高至模型组的 1.15 倍及 1.3 倍，差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，且呈现出剂量依赖效应，提示黄芪甲苷可能是通过激活自噬从而抑制缺血诱导的心肌细胞损伤。

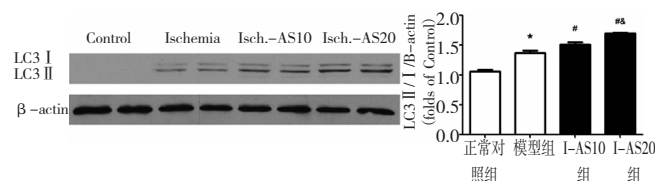


图 3 各组心肌细胞自噬蛋白 LC3 表达的比较

Figure 3 Astragaloside promoted the LC3 expression in cardiomyocyte induced by ischemia 8 h

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤(IR)的关键环节之一是细胞能量供应缺乏，进而引起细胞的坏死与凋亡^[9]。各种促凋亡的损伤因素，一般是通过激活死亡受体依赖性信号转导通路和线粒体依赖性信号转导通路诱发细胞凋亡。缺血后再灌注期间，心肌细胞的凋亡过程可分为几个阶段：①早期起始阶段；②中性粒细胞浸润的中间阶段；③数天、数周或数月之后的延迟阶段。

细胞自噬广泛存在于真核细胞内，是一种溶酶体依赖性降解途径，在维持细胞存活、更新、物质再利用和内环境稳定中起着重要作用^[10]。自噬有 3 种基本形式：巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。巨自噬即通常所指的自噬中，细胞胞浆内容物为双侧囊泡膜所包裹形成自噬体并随后被送往溶酶体进行降解，这是最主要的也是最广泛的一种自噬形式^[11]。

自噬在心肌缺血损伤的早期，可以分解受损的细胞器，使细胞器原件可以得到重复利用，有利于细胞的存活^[12]；但是严重的心肌缺血晚期，自体吞噬过度表达会促进细胞的凋亡，导致细胞的死亡^[13]。因此，如何调节缺血心肌细胞的自体吞噬和凋亡，使其保持平衡，维持细胞的活性，对改善缺血性心脏病的预后十分重要^[14]。心肌缺血早期，促进自噬可降低继发的心肌细胞凋亡，抑制自噬常常导致细胞凋亡和坏死增多。然而，自噬对心脏疾病的调节有双向作用：早期损伤时，通过清除损伤的细胞器和蛋白质聚合物，维持内环境稳定，促进细胞存活；在严重损伤晚期时，自噬的过度激活又可导致心肌细胞死亡。本研究结果表明，缺血处理可诱导体外培养的心肌细胞凋亡，同时激活细胞自噬。黄芪甲苷可减少缺血损伤的心肌细胞的发生凋亡。

LC3 是自噬相关基因 8(ATG8)的同源物,被认为是自噬体的标志分子^[15]。通过检测细胞内 LC3 的含量,可以判断细胞状态,判断其自噬是被诱导还是被抑制^[16]。自噬由自噬相关基因来调节,其中很多基因与自噬体形成相关。本研究结果表明,黄芪甲苷具有保护缺血损伤的心肌细胞的作用,其机制可能是通过上调 LC3 表达而促进缺血诱导的心肌细胞自噬。

本实验通过建立乳鼠心肌缺血模型,观察心肌细胞自噬的变化及中药提取化合物黄芪甲苷的调节作用及机制,结果表明心肌细胞的自体吞噬程序会被缺血刺激激活,从而导致心肌细胞死亡;黄芪甲苷可恢复因缺血降低的心肌细胞活性,减少缺血诱导的心肌细胞凋亡,其机制可能与促进缺血诱导的心肌细胞自噬相关。

参考文献:

- [1] 曾敏, 颜红兵. 自噬与心肌缺血再灌注[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(8): 711-713.
- [2] 杨树森, 刘巍, 李为民, 等. 自噬在心肌缺血和缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华心血管病杂志, 2008, 36(11): 1050-1053.
- [3] 周广舟, 景红娟, 卢延克, 等. 自噬标志分子 MAP1-LC3 的重组载体构建及表达分析[J]. 生物技术, 2012, 22(5): 13-17.
- [4] 马芹芹, 刘立亚, 黄秀兰. Beclin1 与 mTOR 对心肌缺血/再灌注损伤中自噬的交互调控机制[J]. 心脏杂志, 2012, 03: 174-179.
- [5] 梅洪睿, 云霞, 杨红, 等. 黄芪中主要活性成分的分离提取研究进展[J]. 分析实验室, 2008, 27(2): 242-243.
- [6] 张银娣, 徐勤娥, 刘小浩. 黄芪苷升高白细胞及抗应激作用的研究[J]. 南京医学院学报, 1992, 12(3): 64-68.
- [7] 黄丹丹, 许立. 新生大鼠原代心肌细胞的培养与鉴定[J]. 皖南医学院学报, 2013, 32(3): 184-186.
- [8] 李利娟, 来丽萍. 损伤的鼠心肌细胞 cTnI 和 LDH 释放浓度和时间关系[J]. 宁夏医学院学报, 2005, 27(1): 1-4, 7.
- [9] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: A Review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. Cell Prolif, 2012, (45): 487-498.
- [10] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease[J]. Circ Res, 2009, (104): 150-158.
- [11] Z. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten Alive: A history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol, 2010, (12): 814-822.
- [12] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease[J]. Circ Res, 2009, (104): 150-158.
- [13] Ryter SW, Lee SJ, A. Smith, et al. Autophagy in vascular disease[J]. Proc Am Thorac Soc, 2010, (7): 40-47.
- [14] Noh HS, Shin IW, Kim DR, et al. Propofol Protects the autophagic cell death induced by the ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Mol Cells, 2010, (30): 455-460.
- [15] Chifenti B, Locci MT, Battini L, et al. Autophagy-related protein LC3 and beclin-1 in the first trimester of pregnancy[J]. Clin Exp Reprod Med, 2013, (40): 33-37.
- [16] De Haan CA, Molinari M, Reggiori F. Autophagy-independent LC3 function in vesicular traffic[J]. Autophagy, 2010, (6): 994-996.

(编辑: 邓响潮)

加味参附颗粒对慢性心力衰竭大鼠血流动力学及心肌能量代谢的影响

史振羽, 靳利利, 袁 丁, 姚 楠, 王清海, 荣尚一(广东省第二中医院, 广东 广州 510095)

摘要: **目的** 观察加味参附颗粒对慢性心力衰竭大鼠的血流动力学、心肌线粒体蛋白浓度及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 50 只, 随机分为 5 组: 正常对照组, 模型组, 曲美他嗪组及加味参附颗粒高、低剂量组, 每组各 10 只。采用腹主动脉缩窄法建立心衰模型, 预处理 8 周后, 测定心衰大鼠心率、左室内最大上升和下降速率($\pm \text{dp/dt}_{\text{max}}$)、血压、心肌线粒体蛋白浓度及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性。**结果** 加味参附颗粒高、低剂量组心率、血压均低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 在改善心率方面优于曲美他嗪组($P < 0.05$)。加味参附颗粒高、低剂量组 $\pm \text{dp/dt}_{\text{max}}$ 、心肌线粒体蛋白浓度及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性均高于模型组($P < 0.05$); 与曲美他嗪组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 加味参附颗粒可能通过改善心肌能量代谢, 进而改善心衰大鼠血流动力学, 提高心肌线粒体蛋白浓度及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性。

收稿日期: 2013-10-14

作者简介: 史振羽, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗心血管疾病。Email: 353384208@qq.com。通讯作者: 靳利利, 主任中医师, 博士。研究方向: 中西医结合心血管疾病临床与实验研究。Email: jinlili99@163.com。

基金项目: 广东科技计划课题(2010B030700021)。