

# 红黑二丸甾醇提取物通过非钙依赖磷脂酶 A2 介导的抗心肌细胞缺氧复氧损伤研究<sup>※</sup>

● 姚勇<sup>1\*</sup> 江巍<sup>1</sup> 李玉山<sup>2</sup> 黄德斌<sup>2</sup> 万星<sup>2▲</sup>

**摘要** 目的:探讨红黑二丸甾醇提取物抗心肌细胞 H/R 损伤的作用与机制。方法:western blot 检测不同 H/R 时间点 iPLA2 蛋白的表达,确定 H/R 的时间点;在 H/R 的基础上,用不同浓度梯度的红黑二丸甾醇提取物处理细胞,western blot 检测 iPLA2 蛋白表达,MTT 法检测细胞存活率,试剂盒检测 LDH、SOD、MDA、TNF- $\alpha$  的含量,流式细胞术检测凋亡。结果:H60min/R30min, iPLA2 蛋白表达最高 ( $P < 0.01$ ),红黑二丸甾醇提取物量效依赖地降低了其蛋白表达,同时降低 H/R 时 LDH、MDA、TNF- $\alpha$  的含量,减少凋亡,提高 SOD 的活性及细胞的存活率 ( $P < 0.05$ )。结论:红黑二丸甾醇提取物能通过 iPLA2 量效依赖地抗心肌细胞 H/R 损伤。

**关键词** 红黑二丸 甾醇 缺氧复氧 非钙依赖磷脂酶 A2

心肌缺血再灌注(I/R)损伤是一个复杂的多因素参与的病理过程,钙超载、氧自由基、能量代谢障碍、炎症反应等均参与了损伤过程<sup>[1,2,3]</sup>。非钙依赖磷脂酶 A2 (iPLA<sub>2</sub>) 水解膜磷脂生成花生四烯酸(AA)和溶血磷脂(LPC)<sup>[4]</sup>。AA 继而介导下游一系列的炎症反应,LPC 则能够作用离子通道,如 L-型钙通道、RyR2 等<sup>[5]</sup>发挥效应。故本文用缺氧复氧(H/R)模拟心肌 I/R 时,以 iPLA<sub>2</sub> 为药物研究靶点。早期对 I/R 损伤的治疗主要针对钙超载上,单方面治疗效果不甚理想,因此需开发更为有效的药物。红黑二丸(*Rhizoma et Herba Begoniae Sinensis*, RHBS)是中华秋海棠植物的根茎,中华秋海棠为民间中草药,其味甘苦,具有活血止血、清热解毒的功效,常用于跌打损伤、痢疾肠炎腹痛等疾患<sup>[6]</sup>。有关此药的研究甚少,目前报道的药理功能有:改善微循环、抗炎镇痛、抑菌和降血脂<sup>[7-9]</sup>。本文选取红黑二丸甾醇提取物,探讨其抗心肌 H/R 损伤的作用及靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 材料、试剂及主要仪器** ①材料与试剂:H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>心肌细胞株(ATCC,美国);DMEM 高糖培养基(Gibco,美国);iPLA<sub>2</sub> rabbit polyclonal antibody(Abcam,英国);乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶、丙二醛试剂盒(南京建成生物公司,中国);大鼠 TNF- $\alpha$  Elisa 试剂盒(R&D,美国);MTT(Amresco,美国);Annexin V PE/PI 凋亡试剂盒(Biolegend,美国)。②主要仪器:CO<sub>2</sub> 培养箱(Sanyo,日本);核酸蛋白测定仪(BIO-RAD,德国);垂直电泳仪(BIO-RAD,德国);多功能酶标仪(Molecular Devices,美国);流式细胞仪(Beckman,美国)。**1.2 实验分组及模型的制作** 组别包括正常组、H/R 组、DMSO 溶剂组(10<sup>-3</sup>M)、红黑二丸甾醇提取物低、中、高剂量组。红黑二丸甾醇提取物低、中、高剂量分别为:0.11g/kg,0.22g/kg,0.66g/kg,所需浓度均由 10<sup>-3</sup>M DMSO 稀释。H/R 组:即缺氧时换用缺氧液后置缺氧箱中 37℃ 密闭培养,后换用培养基按常规培养条件复氧。实验过程中,缺氧液、缺氧盒和培养器皿均用氮气充分饱和,以驱逐空气。正常组:细胞培养时间与 H/R 总时程一致。DMSO 溶剂组和药物组:缺氧液和复氧液中给予相应浓度的药物,其他条件同 H/R 组。缺氧液成分:NaCl 8.01g, KCl 0.

※基金项目 国家自然科学基金(NO. 81360654)

\* 作者简介 姚勇,男,副主任医师,主要从事疼痛介入研究。

▲通讯作者 万星,E-mail:504810759@qq.com

• 作者单位 1. 湖北省恩施州中心医院(445000);2. 湖北民族学院医学院(445000)

894g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1g, CaCl<sub>2</sub> 0.1g, HEPES 0.953g, Na lactate 2.24mL; 加 ddH<sub>2</sub>O 至 1000mL, 调 pH 值至 6.2。

1.3 红黑二丸甾醇类物质提取 将药材洗净晾干, 粉碎后过 60 目筛, 以料液比 1:24 加入萃取溶剂乙酸乙酯进行萃取, 提取温度 55℃, 提取时间 52min, 然后将萃取部位超声处理 1h, 最后抽滤取清液, 并测定甾醇的含量<sup>[7]</sup>。

1.4 Western blot 检测 iPLA<sub>2</sub><sup>[10]</sup> 心肌细胞株接种至直径 7cm 的培养皿中, 待铺满皿底, 给予相应处理后, 每皿加 100μL 裂解液 (10mmol/L Tris - buffered saline, 1mmol/L EDTA, 2mmol/L sodium orthovanadate, 0.2 mmol/L PMSF, 2μg/mL leupeptin, 2μg/mL aprotinin, and 1% Triton X - 100) 冰上裂解 30min, 12000r/min、4℃ 离心收集上清液。BCA 法测蛋白浓度。配制相应浓度的 SDS - PAGE 分离胶, 以 60V、15min 转至 100V、1h 条件电泳, 100V、75min 湿转。用 5% (质量分数) 脱脂奶粉封闭 1h, 一抗预敷, 4℃ 过夜, iPLA<sub>2</sub> 一抗稀释比为  $V_{(iPLA_2 \text{ 抗体})} : V_{(TBST)} = 1 : 500$ 。次日, TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 二抗室温孵育 2h, iPLA<sub>2</sub> 二抗稀释比为  $V_{(羊抗兔二抗)} : V_{(TBST)} = 1 : 40000$ , 再洗膜 3 次, 每次 10min。滴加  $V_{(过氧化物)} : V_{(Luminol/增强剂)} = 1 : 1$  的 Ecl 化学发光试剂, 暗室曝光。

1.5 LDH、SOD、MDA、TNF - α 的测定 细胞接种至直径 7cm 的培养皿, H/R 或相应处理后, 用 PBS 清洗干净, 加 330μL 裂解液破碎细胞, 12000r/min、4℃ 离心 15min 收集上清液, SOD 上样 30μL, 按试剂盒说明操作, MDA 上样 135μL, 按说明书计量减半操作。LDH、TNF - α 测定, 则将细胞接种在 24 孔板, 取复氧后的细胞培养上清, 按 ELISA 说明检测。

1.6 MTT 法测细胞存活率 将培养至 3 ~ 5 代的细胞以 0.125% (质量分数) 胰酶消化, 接种至 96 孔板, 每组设 6 个复孔, 用培养基将细胞密度调成  $1 \times 10^5$  / 孔, 待细胞融合至 70% 时, 按上述分 6 组, 等细胞复氧结束后, 每孔加入 MTT (5mg/mL) 20μL, 置培养箱中孵育 4 小时, 吸弃培养基, 加入 DMSO 150μL, 室温避光振荡 15min, 使结晶充分溶解, 酶标仪于 492nm 波长处测 OD 值, 每组取平均值。

1.7 Annexin V PE/PI 测细胞早晚期凋亡 细胞以一定密度接种至 6 孔板, 48h 铺满皿底后, 按上述分组

进行造模或者给药处理后, 每孔加 1mL 胰酶消化, 离心后去上清, 加 PBS 洗净再离心去上清, 加 100μL Annexin V Binding Buffer 重悬, 转移至 5mL 的 EP 管。加 5μL Annexin V PE, 10μL PI, 轻轻混匀, 室温 (25℃) 避光孵育 15min, 每管加 400μL Annexin V Binding Buffer, 混匀, 送流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理 采用 spss 软件进行处理, 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较和 Dunnett - t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同 H/R 时间 iPLA<sub>2</sub> 蛋白的表达 随着缺氧时间增加, iPLA<sub>2</sub> 蛋白逐渐增加, 至 H60min/R30min 时, 其表达最高 ( $P < 0.01$ ), 后逐渐降低至正常。见图 1。

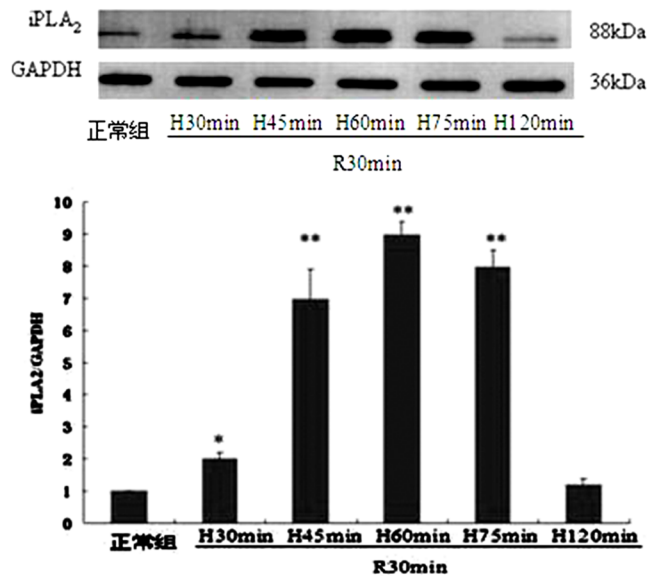


图 1 心肌 H/R 时 iPLA<sub>2</sub> 蛋白的时效关系 (western blot 条带图和对应的灰度比) (n = 6)

注: 与正常组比 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

2.2 红黑二丸甾醇提取物对 H/R 损伤的影响 心肌细胞 H60min/R30min 时, LDH、MDA、TNF - α 显著性增高, SOD 活性及细胞存活率下降, 早期凋亡细胞增多 ( $P < 0.01$ ), 低中高浓度的红黑二丸甾醇提取物干预后, 量效依赖地降低了 LDH、MDA、TNF - α 的表达, 提高了 SOD 的活性, 提高细胞存活率, 减少早期凋亡的产生 ( $P < 0.05$ )。见表 1、图 2、图 3。

表1 红黑二丸甾醇提取物对 LDH、SOD、MDA、TNF- $\alpha$  的影响 (n=6)

分组	LDH(U/ml)	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
正常组	120.66 ± 10.28	28.89 ± 0.79	0.61 ± 0.04	25.50 ± 6.12
H60min/R30min 组	225.38 ± 18.55**	12.59 ± 1.25**	1.56 ± 0.11**	130.69 ± 15.68**
DMSO 组	220.85 ± 20.75**	13.14 ± 0.87**	1.47 ± 0.17**	134.25 ± 10.15**
红黑二丸甾醇 0.66g/kg 组	148.28 ± 15.02*	22.79 ± 2.14*	0.89 ± 0.15*	70.06 ± 9.93*
红黑二丸甾醇 0.22g/kg 组	157.74 ± 30.17*	19.15 ± 1.73*	1.09 ± 0.29*	94.65 ± 6.47*
红黑二丸甾醇 0.11g/kg 组	179.56 ± 13.79	18.65 ± 2.56*	1.28 ± 0.37	128.13 ± 20.07

注:与 H60min/R30min 组比较,\* $P < 0.05$ ;与正常组比较,\*\* $P < 0.01$ 。

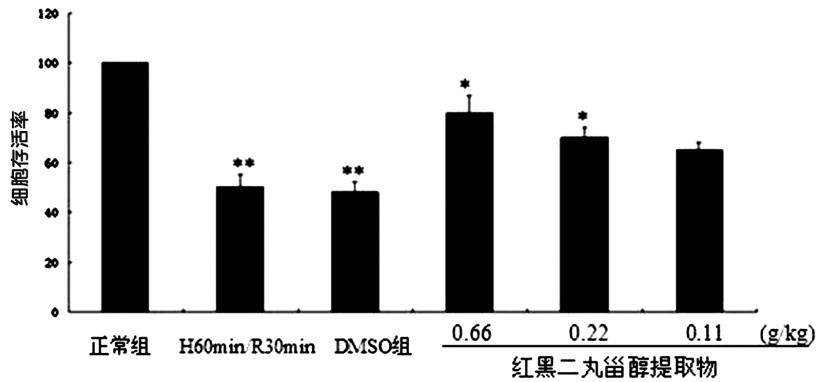


图2 红黑二丸甾醇提取物对细胞存活率的影响 (n=6)

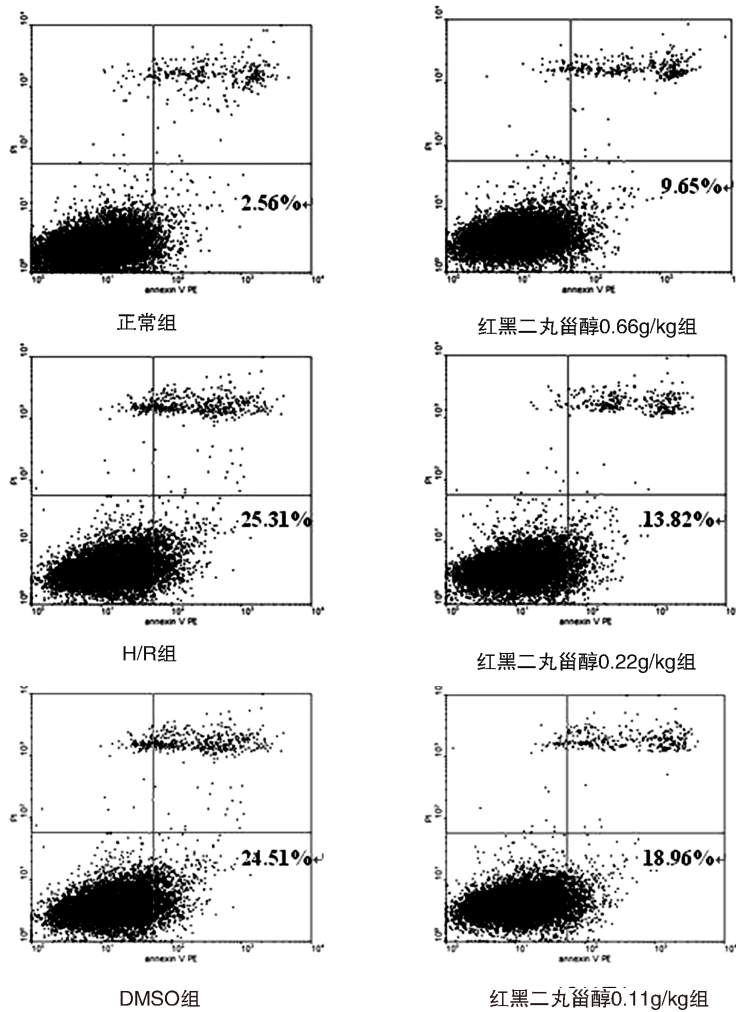


图3 红黑二丸甾醇提取物对细胞早晚期凋亡的影响 (n=6)

2.3 红黑二丸甾醇提取物对 iPLA<sub>2</sub> 的影响 心肌细胞 H/R 时, iPLA<sub>2</sub> 显著性增高 ( $P < 0.01$ ), 低中高浓度的红黑二丸甾醇提取物干预后, 量效依赖地降低了 iPLA<sub>2</sub> 的表达 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

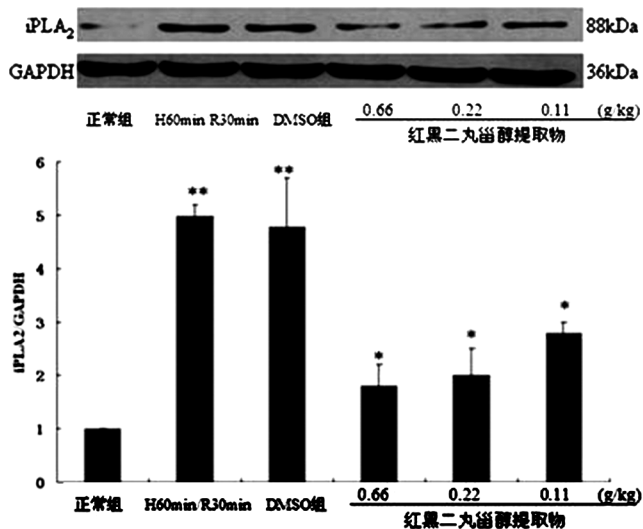


图 4 红黑二丸甾醇提取物对 iPLA<sub>2</sub> 蛋白的影响 (western blot 条带图和对应的灰度比) (n = 6)

注:与 H60min/R30min 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与正常组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

心肌缺血再灌注 (I/R) 损伤是一个复杂的多因素参与的病理过程, 早期对 I/R 损伤的治疗主要针对钙超载上, 单方面治疗效果不甚理想, 因此, 需开发更为有效的药物。天然药物作为重要的药物资源越来越受到重视。本文选择红黑二丸甾醇为研究对象, 旨在开发更为有效的抗 I/R 损伤的药物。用心肌细胞 H9C2H/R 模拟心肌 I/R 损伤, 检测红黑二丸对 LDH、SOD、MDA、TNF- $\alpha$ 、细胞存活率及凋亡的影响。结果表明: 红黑二丸甾醇提取物量效依赖地降低了 H/R 时 LDH、MDA、TNF- $\alpha$  的含量, 提高 SOD 的活性, 提高细胞存活率并减少凋亡发生。提示红黑二丸甾醇能保护心肌细胞抗 H/R 损伤。

心肌缺血时, 心肌肌膜的破损导致细胞功能错乱, 会进一步加重损伤的发生, 而 iPLA<sub>2</sub> 在磷脂的维持和修复程度上发挥关键作用<sup>[11-13]</sup>; 同时, 炎症反应也是心肌缺血的一个重要病理机制, iPLA<sub>2</sub> 水解膜磷脂产生的 AA 是最重要的炎症因子, AA 会激发下游

一系列炎症通路放大炎症效应, 已有文献报道 iPLA<sub>2</sub> 参与了心肌 I/R 损伤。所以结合红黑二丸的抗炎作用, 本文选择 iPLA<sub>2</sub> 作为其靶点 (复氧时间固定为 30min 短时间, 是因为长时间复氧, 凋亡加重, caspase-3 会酶切 iPLA<sub>2</sub><sup>[14]</sup>), 观察红黑二丸能否抑制其表达, 结果表明: 红黑二丸甾醇提取物量效依赖地降低了 iPLA<sub>2</sub> 蛋白的表达, 提示 iPLA<sub>2</sub> 可能是红黑二丸抗 H/R 损伤的作用靶点, 为其临床应用提供科学依据。

### 参考文献

- [1] Zhao ZQ, Vinten - Johansen J. Postconditioning: reduction of reperfusion - induced injury. *Cardiovasc Res*. 2006;70(2):200 - 11.
- [2] Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJ. Reperfusion injury in humans; a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovasc Res*. 2007;74(3):343 - 55.
- [3] Xiong J, Xue FS, Yuan YJ, Wang Q, Liao X, Wang WL. Cholinergic anti - inflammatory pathway: a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(19):2720 - 6.
- [4] Satoshi AKIBA and Takashi SATO. Cellular Function of Calcium - Independent Phospholipase A<sub>2</sub> [J]. *Biol. Pharm. Bull*, 2004, 27(8):1174 - 1178.
- [5] Yuki N., Midori Y., Sei K. Et. Cell membrane - derived lysophosphatidylcholine activates cardiac ryanodine receptor channels [J]. 2007, 453(4):455 - 462.
- [6] 范文娟, 高昂, 巩江, 等. 全球秋海棠属药学研究概况 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(2):59 - 61.
- [7] 李丹平, 朱乐, 余卓尔, 潘思轶. 红黑二丸中甾醇类物质的抑菌活性 [J]. *食品科学*, 2012, 33(11):70 - 74.
- [8] 习忻, 徐先早, 刘韩英, 等. 红黑二丸对小鼠耳廓微循环的影响 [J]. *湖北民族学院学报*, 2010, 27(3):12 - 13.
- [9] 徐元翠, 李玉山. 红黑二丸提取物对凝血系统影响的实验研究 [J]. *中国药师*, 2010, 13(11):1599 - 1600.
- [10] SHI J LIU, JANE M. Stimulation of different phospholipase A<sub>2</sub> isoforms by TNF -  $\alpha$  and IL - 1 $\beta$  in adult rat ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(4):H1462 - H1472.
- [11] HSU Y H, DURLAO D S, CAO J, et al. Assessing phospholipase A<sub>2</sub> activity toward cardiolipin by mass spectrometry [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59267.
- [12] 张鹭, 张浩. 磷脂酶 A<sub>2</sub> 及其功能概述 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2004, 25(2):178 - 180.
- [13] ZACHMAN D K, CHICCO A J. The role of calcium - independent phospholipase A<sub>2</sub> in cardiolipin remodeling in the spontaneously hypertensive heart failure rat heart [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(3):525 - 34.
- [14] Jesús Balsinde, Rebeca Pérez, María A. Balboa. Calcium - independent phospholipase A<sub>2</sub> and apoptosis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1761(11):1344 - 1350.