

羟基红花黄色素 A 对内皮细胞 EA.hy926 缺氧复氧后凋亡的抑制作用研究

杨学攀, 征宗梅, 余 曦, 刘亭宇, 施洪飞*, 朱明明

南京中医药大学第二临床医学院 营养学教研室, 江苏 南京 210023

摘要:目的 观察羟基红花黄色素 A (HSYA) 对缺氧复氧诱导的人脐静脉内皮细胞 EA.hy926 凋亡的影响。方法 噻唑蓝 (MTT) 比色法检测不同缺氧 (8、12 h)、复氧 (4、8、12 h) 时间对细胞活力的影响以及不同浓度 HSYA (0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$) 对缺氧 12 h、复氧 8 h 后细胞活力的影响。Western blotting 法检测 HSYA 对缺氧 12 h、复氧 8 h 后 EA.hy926 细胞中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、活化的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (cleaved Caspase-3)、cleaved Caspase-9 蛋白表达的影响。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 HSYA 对缺氧 12 h 复氧 8 h 后 EA.hy926 细胞中 Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响。Hoechst 染色、流式细胞术检测 HSYA 对缺氧 12 h 复氧 8 h 后 EA.hy926 细胞凋亡的影响。结果 与对照组比较, 缺氧 8、12 h, 复氧 4、8、12 h 后 EA.hy926 细胞活力均显著下降, 其中缺氧 12 h、复氧 8 h 后细胞活力下降最为显著 ($P < 0.001$), 且 Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著上升、Bcl-2 蛋白表达水平显著下降。与模型组比较, HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 能够明显提高缺氧复氧后细胞活力 ($P < 0.01$), 并显著上调 Bcl-2 蛋白表达水平, 下调 Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平。结论 HSYA 能有效抑制缺氧复氧导致的 EA.hy926 凋亡, 其机制可能与下调 Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达、上调 Bcl-2 蛋白表达有关。

关键词: 细胞凋亡; 内皮细胞; 羟基红花黄色素 A; 心肌缺血再灌注损伤; 缺氧复氧模型

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)16-3897-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.023

Inhibition of hydroxysafflor yellow A on apoptosis of endothelial cells EA.hy926 after hypoxia-reoxygenation

YANG Xue-pan, ZHENG Zong-mei, YU Xi, LIU Ting-yu, SHI Hong-fei, ZHU Ming-ming

Department of Nutrition, Second Clinical Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To observe the effect of hydroxysafflower yellow A (HSYA) on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells EA.hy926 induced by hypoxia-reoxygenation. **Methods** MTT colorimetry method was used to detect the effects of different hypoxia time (8, 12 h) and different reoxygenation time (4, 8, 12 h) on the cell viability. And after the cell had been in the status of hypoxia for 12 h and reoxygenation for 8 h, this method was adapted once again to evaluate the effects of different concentrations of HSYA (0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{mol/L}$) on cell viability in different time stages. After the cell had been in the status of hypoxia for 12 h, reoxygenation for 8 h, Western blotting was used to test its effects on the expressions of the following proteins in different time stages, which contained Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, and activated cleaved Caspase-9. This method was also used to detect whether it had an improvement effect on the above proteins after the pre-treat the cells with HSYA. Real-time PCR was used to evaluate the mRNA expressions of Bax, Bcl-2 after the cell had been in the status of hypoxia for 12 h, reoxygenation for 8 h, and this method was also used to test the effect of HSYA on the expressions of Bax, Bcl-2 after the same time stages. Hoechst staining and flow cytometry were used to detect the apoptosis situation of the cell after it was in the status of hypoxia for 12 h and reoxygenation for 8 h. And this method was also adapted to detect the effect of HSYA on apoptosis of the cell after the same time stage. **Results** Compared with the control group, the EA.hy926 cell viability decreased significantly after hypoxia for 8, 12 h, reoxygenation for 4, 8, and 12 h ($P < 0.01$). The cell viability decreased the most significantly after hypoxia for 12 h and reoxygenation for 8 h ($P < 0.01$), and during

收稿日期: 2019-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81574044); 江苏省高等学校自然科学研究面上项目 (18KJB330003); 江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX19_1292)

作者简介: 杨学攀, 女, 河北石家庄人, 硕士, 主要从事中西医结合营养技术的作用与机制研究工作。E-mail: 1546534804@qq.com

*通信作者 施洪飞, 男, 江苏扬州人, 教授, 硕士生导师, 主要从事中西医结合营养技术的作用与机制研究工作。E-mail: hfshi@njucm.edu.cn

this period, the expression of Bax, cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3 protein increased significantly, and Bcl-2 protein was decreased significantly. Compared with the H/R group, HSYA (10 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the cell viability ($P < 0.01$) after hypoxia-reoxygenation, and significantly up-regulated the protein expression of Bcl-2, and down-regulated the protein expressions of Bax, cleaved Caspase-9, and cleaved Caspase-3. **Conclusion** Hydroxysafflor yellow A can effectively inhibit the apoptosis of EA.hy926 induced by hypoxia and reoxygenation. The mechanism may be related to the down-regulation of Bax, cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3 protein as well as the up-regulation of Bcl-2 protein.

Key words: apoptosis; endothelial cells; hydroxysafflor yellow A; myocardial ischemia-reperfusion injury; hypoxia-reoxygenation model

急性心肌梗死 (AMI) 在中国的死亡率居高不下, 据统计, 2015 年我国农村地区 AMI 死亡率为 0.709/万人, 城市地区则为 5.638/万人^[1]。目前 AMI 最有效的治疗方法为经皮冠状动脉介入治疗和溶栓治疗, 但之后可能出现的心肌缺血再灌注损伤会影响 AMI 的治疗效果, 不利于患者身体健康, 因此如何有效预防心肌缺血再灌注损伤已成为亟待解决的问题^[2]。心肌缺血再灌注损伤属于中医的“胸痹”范畴, 李辉等^[3]认为心肌缺血再灌注损伤的病因病机为痰瘀痹阻心脉, 张东等^[4]将其病因病机归为痰瘀互结, 说明血瘀是心肌缺血再灌注损伤的基本病机。红花具有活血化瘀、通经止痛之功效, 其中羟基红花黄色素 A (HSYA) 作为主要的活性成分, 发挥着重要的药效学作用^[5]。临床上, HSYA 常应用于缺血性心血管疾病, 具有扩张冠状动脉、改善心肌缺血、抑制血栓形成、抑制细胞凋亡的作用^[6]。本实验采用人脐静脉内皮细胞 EA.hy926 缺氧复氧模型研究 HSYA 对 EA.hy926 细胞损伤后的保护作用, 并探讨 HSYA 影响 EA.hy926 细胞凋亡的潜在机制。

1 材料

1.1 细胞

EA.hy926 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 仪器

HERAce11CO₂ 细胞培养箱、细胞培养超净台、三气培养箱、酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); 核酸蛋白分析仪、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪、125-BR 垂直电泳仪、凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); IX-70 倒置荧光显微镜、CK40 倒置光学显微镜 (日本尼康公司)。

1.3 药物与试剂

HSYA (批号 H117996, 质量分数 $\geq 98\%$, 阿拉丁公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司); 噻唑蓝 (MTT, 中国索莱宝公司); 逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒 (南京诺唯赞公司); Bax 抗体 (美国

Cell Signaling Technology 公司); Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 抗体 (Proteintech 公司); Hoechst 染色试剂盒、 β -actin 抗体 (上海碧云天生物技术有限公司); Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I (上海优宁维生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

EAhy926 细胞培养于含有 10% FBS、青霉素 80 U/mL、链霉素 0.08 mg/mL 的不完全高糖 DMEM 培养基中, 并在 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 每 2 天换液, 待细胞长至 80% 时用胰酶消化并传代。取对数生长期细胞进行实验。缺氧实验时, 将培养液替换为磷酸盐缓冲液 (PBS)^[7], 放入缺氧培养箱中, 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 缺氧 12 h 后, 从缺氧培养箱中取出细胞, 将 PBS 替换为细胞培养液, 在 5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中复氧 8 h。HSYA 预处理时, 待细胞长至 80%, 加入 HSYA 24 h 后, 弃去培养液加入 PBS 进行缺氧 12 h, 之后复氧 8 h。

2.2 MTT 检测细胞活力

取对数生长期细胞, PBS 洗 2 遍, 胰酶消化 2 min 后培养基终止消化, 离心后重悬。将事先消毒好的盖玻片与载玻片取出, 将 100 μL 悬液打进玻片里, 显微镜下计数。计数完成的细胞置于可拆卸的 96 孔板中, 待细胞生长 24 h 后模型组培养液替换为 PBS 并放入 1% O₂、5% CO₂、94% N₂ 的三气培养箱中进行缺氧实验, 对照组细胞换液后继续在普通培养箱中培养。模型组细胞缺氧 8、12 h 之后, 培养基替换 PBS, 并放置于普通培养箱中培养, 对照组细胞换液后继续在普通培养箱中培养。模型组细胞分别复氧 4、8、12 h 后与相应的对照组加 MTT, 4 h 后弃去培养液, 加 DMSO 200 μL , 于 490 nm、10 min、间隔震荡的条件下测量吸光度 (A) 值, 检测不同缺氧、复氧时间对 EA.hy926 细胞活力的影响。

细胞活力 = $A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$

HSYA 预处理时,细胞长至 80%后加入不同浓度(0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$)的 HSYA 预处理 24 h。缺氧 12 h,复氧 8 h 后,MTT 法检测不同浓度 HSYA 对 EA.hy926 细胞活力的影响。

2.3 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将盖玻片置于 70%乙醇中,5 min 后取出盖玻片用细胞培养级 PBS 洗涤 2 遍,之后用细胞培养液清洗 1 遍。将细胞培养液洗过的盖玻片放入培养皿内种入细胞,待细胞长至 80%时进行缺氧复氧实验。细胞分为对照组、模型组和 HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组。加入 HSYA 预处理细胞 24 h 后,细胞缺氧 12 h,复氧 8 h。吸尽培养液,加入 0.5 mL 固定液,将固定液覆盖于盖玻片上,10 min 后倒掉固定液,PBS 洗 2 次,可轻晃,每次 3 min,吸尽 PBS。在培养皿内加入 0.5 mL Hoechst33258 染色液,染色液覆盖于盖玻片上,染色 5 min,吸去染色液,PBS 洗 2 遍,每次 3 min。将一滴抗荧光淬灭封片液滴于载玻片上,再将细胞的盖玻片盖在载玻片上,充分接触封片液,避免产生气泡。于荧光显微镜下进行检测。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞分为对照组、模型组和 HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组,细胞经 HSYA 预处理 24 h 和缺氧 12 h、复氧 8 h。提前 30 min 将不含 EDTA 的胰酶放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 的孵箱中。取皿内上清于离心管中离心,3 000 r/min,3 min。弃上清,皿内 PBS 洗 2 遍,加入 80 μL 胰酶消化 4 min,加入 80 μL 完全培养液终止消化。将液体对应到相应的离心管中,离心,弃上清。PBS 洗 1 遍,离心,弃上清。加入染液,室温孵育 20 min 后,每孔加 1 mL $1\times\text{AV}$ 结合液,流式细胞仪检测凋亡。

2.5 Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达

细胞分为对照组、模型组和 HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组,细胞经过 HSYA 预处理 24 h 和缺氧 12 h、复氧 8 h 后,将细胞取出,PBS 洗 2 次,按照总蛋白提取试剂盒提取蛋白,BCA 测蛋白浓度。蛋白样品上样,105 V、15 min 电泳至上层胶分开后 200 V、40 min 直至电泳结束。15 V、10 min 转至 PVDF 膜,脱脂牛奶封闭 1 h。一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,1 $\times\text{TBST}$ 洗膜 2 $\times$ 10 min。二抗(1:10 000)孵育 1 h,1 $\times\text{TBST}$ 洗膜 3 $\times$ 10 min,之后继续 1 $\times\text{TBST}$ 洗膜 4 $\times$ 10 min。将发光液按照 1:1 配制好,用化学发光成像仪曝光,尽量保持在避光的状态下操作,将成像的条带保存。

2.6 qRT-PCR 检测凋亡因子 mRNA 表达

细胞分为对照组、模型组和 HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组,细胞经过 HSYA 预处理 24 h 和缺氧 12 h、复氧 8 h 后,将细胞取出,PBS 洗 2 遍,用 Trizol 提取 RNA,蛋白核酸测定仪检测 RNA 浓度,使用逆转录试剂盒将 RNA 转录成 cDNA。用 Real-time PCR 试剂盒说明书配制反应体系,每组 3 个复孔。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 预变性;95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 扩增,40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s 延伸。引物序列为 Bcl-2:上游 5'-GTG-GGGTCATGTGTGTGGAGAG-3',下游 5'-CAGAG-ACAGCCAGGAGAAATCAA-3';Bax:上游 5'-AG-GATGCGTCCACCAAGAAGC-3',下游 5'-GGCAA-AGTAGAAAAGGGCGACA-3'; β -actin:上游 5'-CT-ACCTCATGAAGATCCTCACC GA-3',下游 5'-TTC-TCCTTAATGTCACGCACGATT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据分析。

2.7 统计学方法

实验所得数据以 GraphPad Prism 6 统计软件处理分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组数据用 t 检验分析,多组数据用单因素方差分析。

3 结果

3.1 不同缺氧、复氧时间对 EA.hy926 细胞生长情况及活力的影响

与对照组比较,缺氧 8、12 h 后分别复氧 4、8、12 h 均会降低细胞的活力,其中缺氧 12 h 复氧 8 h 后细胞活力下降尤为显著($P<0.001$)。实时图片监测显示,缺氧 12 h 复氧 8 h 后,细胞凋亡较多,密度下降(图 1)。因此后续实验选择造模条件为缺氧 12 h 复氧 8 h。

3.2 不同浓度 HSYA 对缺氧/复氧后 EA.hy926 细胞活力的影响

与模型组比较,HSYA 10、100 $\mu\text{mol/L}$ 预处理后可明显改善缺氧复氧后 EA.hy926 细胞活力,其中以 HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 作用尤为显著($P<0.001$,图 2)。因此选择 HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验细胞预处理浓度。

3.3 HSYA 对缺氧/复氧后 EA.hy926 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测缺氧复氧后 EA.hy926 细胞的凋亡。缺氧 12 h,复氧 8 h 后,细胞凋亡明显升高($P<0.001$)。与模型组比较,HSYA 预处理显著减少了细胞凋亡($P<0.01$),见图 3。

Hoechst 染色结果显示,与对照组比较,模型

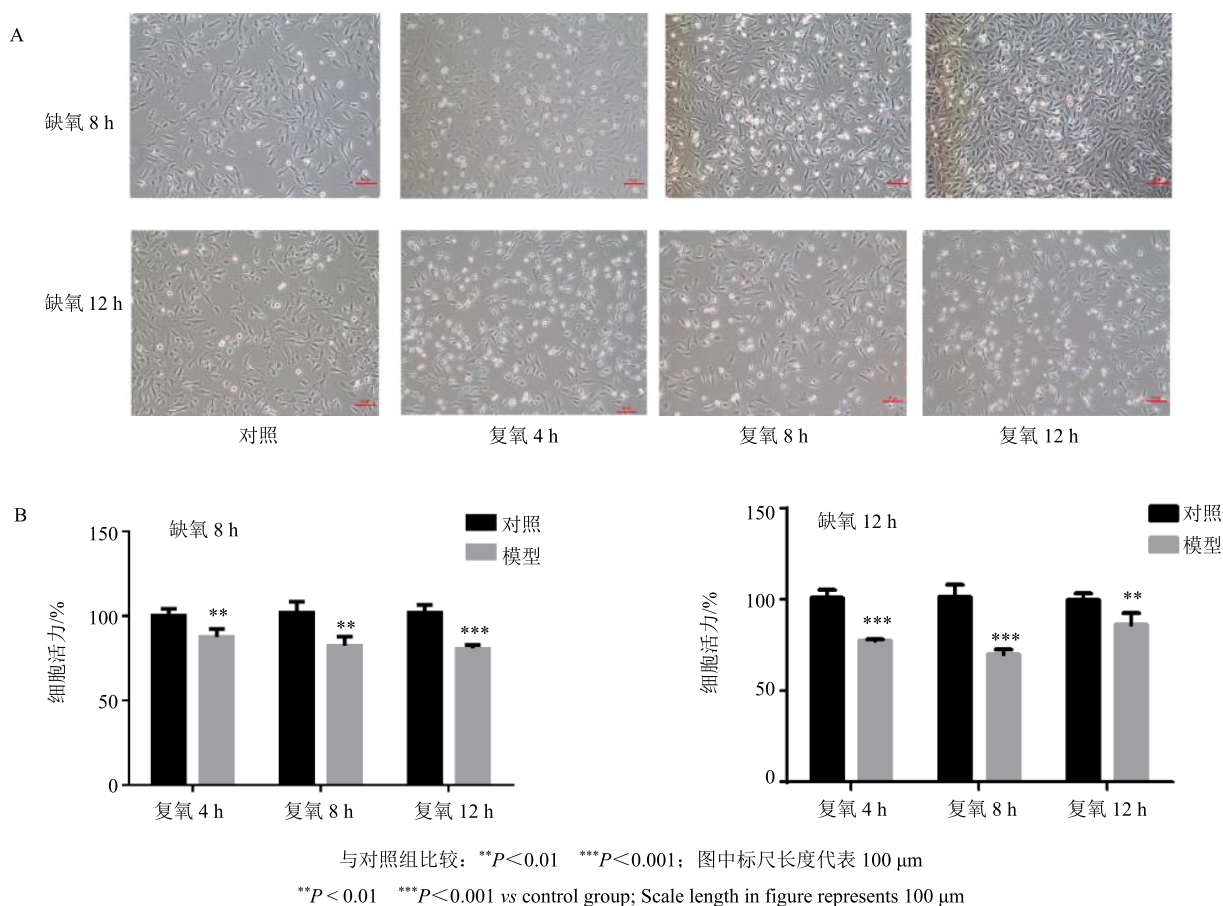
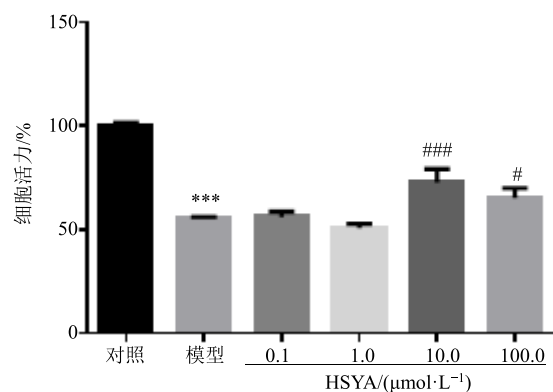


图 1 不同缺氧、复氧时间对 EA.hy926 细胞生长情况 (A) 及活力 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of different hypoxia and reoxygenation time on growth (A) and viability (B) of EA.hy926 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 2 不同浓度 HSYA 对缺氧/复氧后 EA.hy926 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of different concentrations of HSYA on viability of EA.hy926 cells after hypoxia/reoxygenation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组细胞表现为体积明显缩小的深染核形态, 说明缺氧复氧之后细胞凋亡增多。与模型组比较, HSYA

预处理组显示细胞核深染形态明显减少 (图 3)。
3.4 HSYA 对缺氧/复氧后 EA.hy926 细胞凋亡因子表达的影响

Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3、Bax 表达均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.001$, 图 4)。与模型组比较, HSYA 预处理后 Bax、cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。

qRT-PCR 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 而 Bax 表达水平虽升高, 但变化不显著 (图 5)。与模型组比较, HSYA 预处理降低了 Bax mRNA 表达水平 ($P < 0.01$), 升高了 Bcl-2 mRNA 表达水平 ($P < 0.001$)。由此证明, HSYA 对缺氧/复氧导致的 EA.hy926 细胞凋亡具有保护作用。

4 讨论

近年来 AMI 在中国的发病率持续增高, 如何有

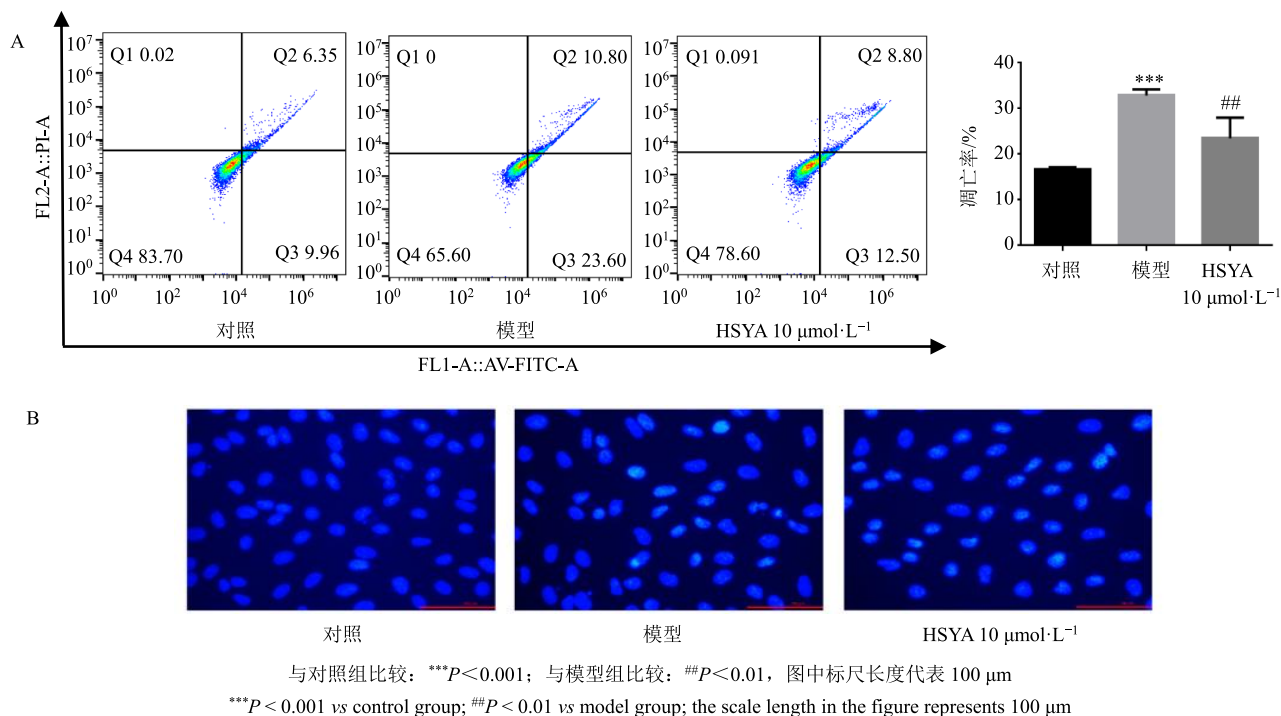


图 3 流式细胞术 (A) 和 Hoechst 染色 (B, $\times 200$) 检测 HSYA 对缺氧/复氧后 EA.hy926 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 3 Effect of HSYA on apoptosis of EA.hy926 cells after hypoxia/reoxygenation detected by flow cytometry (A) and Hoechst staining (B, $\times 200$) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

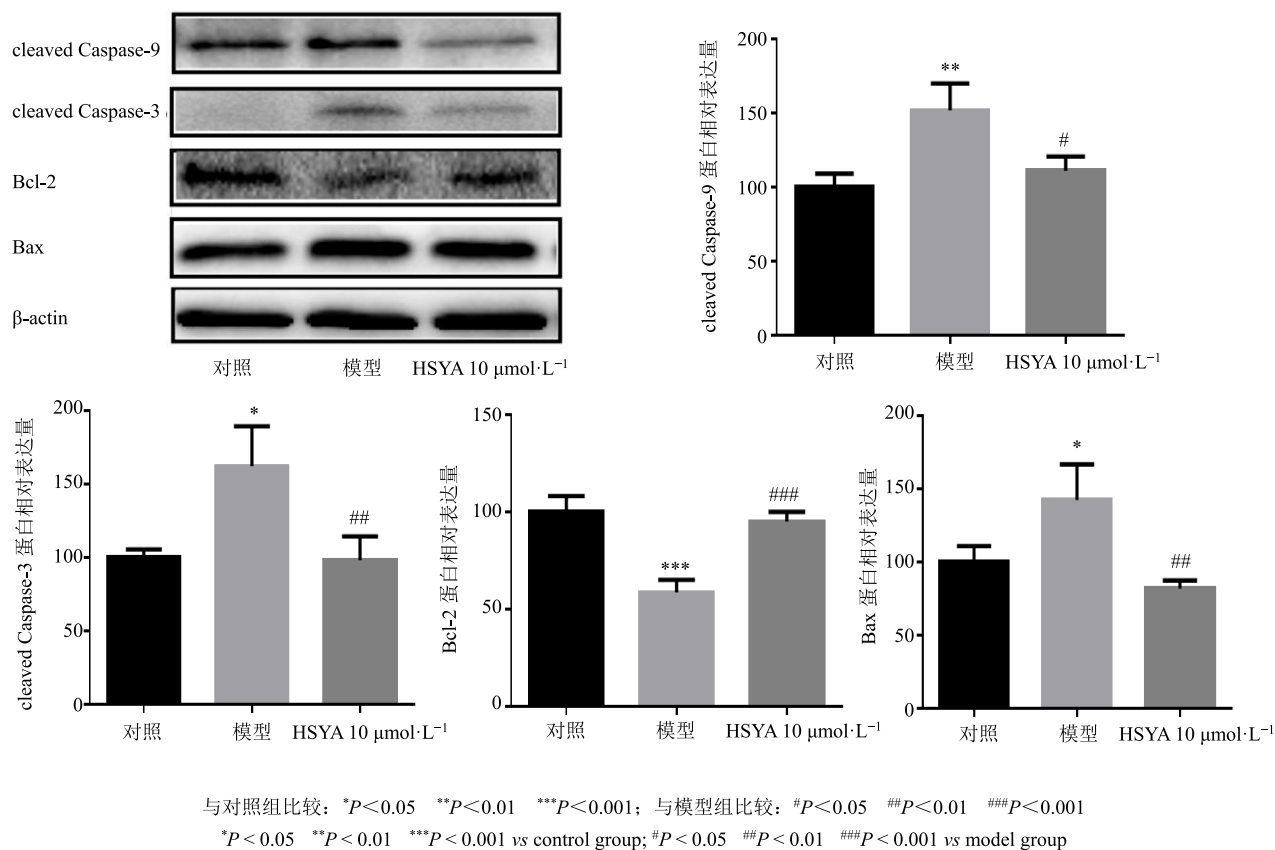


图 4 HSYA 对缺氧/复氧后 EA.hy926 细胞凋亡因子蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 4 Effects of HSYA on expression of apoptotic factors protein in EA.hy926 cells after hypoxia/reoxygenation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

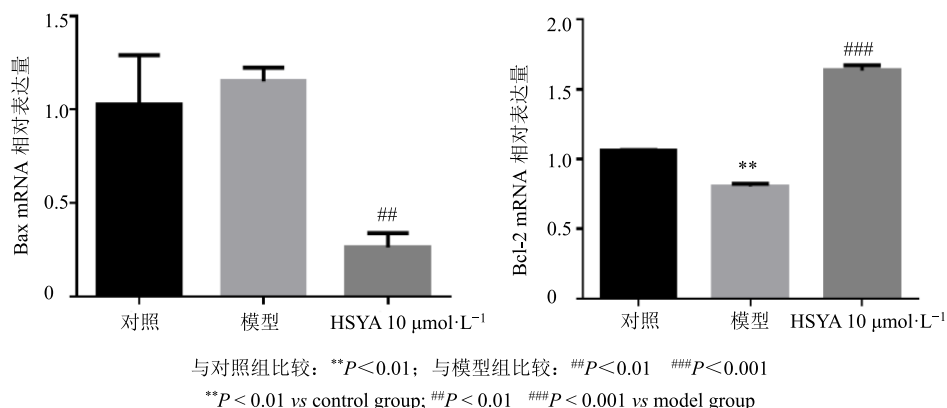


图 5 HSYA 对缺氧/复氧后 EA.hy926 细胞凋亡因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of HSYA on mRNA expression of apoptotic factors in EA.hy926 cells after hypoxia/reoxygenation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

效的治疗心肌梗死是亟待解决的问题。AMI 对人类身体健康具有重大威胁, AMI 后 30 min, 部分心肌细胞开始发生不可逆坏死, 因此, AMI 有效治疗的时间非常短暂, 使得许多患者因无法得到及时有效的治疗致使病情加重, 数据显示 AMI 后心力衰竭的发生率仍居高不下^[8]。AMI 后尽早恢复相关部位的血液供应能够缩小心肌梗死范围, 降低病死率, 但同时缺血后心肌再灌注可能造成心肌细胞的严重损伤^[9], 如 AMI 后采取的经皮冠状动脉介入治疗和溶栓治疗后可能会出现缺血再灌注损伤, 因此, 如何避免缺血再灌注损伤是当前面临的重要问题。

心肌缺血再灌注损伤, 是指在病理损伤过程中, 心肌细胞在一段时间内出现缺血, 当血液恢复供应后, 出现较灌注前更为严重的损伤, 如心律失常、心肌梗死面积加大等。心肌缺血再灌注损伤属于中医“胸痹”范畴, 其主要病机为心脉瘀阻、闭塞不通。多由血瘀, 寒凝、痰浊等邪浊伤及正气, 引起正气亏虚, 致使气血瘀滞、闭阻心脉; 又可虚实夹杂, 相兼为病。胡华等^[10]认为, 心肌缺血再灌注损伤中心肌细胞短暂缺血后恢复供血可对机体气血造成“破血”损伤, 不仅损伤脏腑之气还可加重血脉瘀阻。同时杜武勋等^[11]强调血瘀作为心肌缺血再灌注损伤的基本病机, 在治疗中, 应以活血化瘀为主, 兼顾他症, 以图标本兼治。

HSYA 作为红花中最具代表性的活性成分, 是具有单查耳酮苷类结构的化合物^[12-13]。已有的研究提示 HSYA 具有扩张血管、降低血压、改善器官供血、抗凝血、抗炎等药理作用, 可能对细胞损伤具有保护作用^[5]。当前药物预处理治疗心肌缺血再灌注损伤已经越来越引起人们的注意, 通过药物预处理

使细胞内产生具有内源性保护的物质^[14], 从而减少心肌缺血再灌注造成的机体损伤。HSYA 联合黄芪甲苷预处理对心肌梗死能够起到保护作用^[15], 且 HSYA 预处理可以通过线粒体机制抗缺氧复氧损伤^[16]。

心肌缺血时会诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的自分泌上调, 并作用于血管内皮细胞, 通过各种途径诱发细胞凋亡。Scarabelli 等^[17]研究发现, 当冠脉闭塞导致心肌缺血缺氧, 一些微小冠脉血管内皮细胞会最先发生凋亡, 同时释放可溶性促凋亡介质促进周围心肌细胞凋亡。因此, 及时的控制血管内皮细胞凋亡成为减轻心肌缺血缺氧损伤的重要途径, 但缺氧复氧后内皮细胞的凋亡机制目前尚不清楚。因此, 本研究探讨了 HSYA 对缺氧复氧诱导的 EA.hy926 细胞凋亡的作用机制。

已有研究表明, Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡的重要调节因子, Bcl-2 和 Bax 在心肌缺血再灌注损伤和修复过程中起重要作用^[18]。Bcl-2 是一种抑制细胞凋亡的抗细胞凋亡因子^[19], 而 Bax 促进细胞凋亡^[20]。因此, Bcl-2/Bax 在一定程度上与组织损伤的减少有关^[21]。Caspase 家族在细胞凋亡中发挥巨大的作用, Caspase-9 作为凋亡启动因子在级联反应的上游, 是在其他蛋白的辅助下自我活化并激活下游的 Caspase, 完成级联反应。Caspase-3 是细胞凋亡的执行者之一, 其活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[22], 最终诱导细胞凋亡^[23]。本研究发现, 缺氧 12 h 复氧 8 h 会使细胞凋亡增多, 进一步检测表明凋亡因子 Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达升高, 抗凋亡因子 Bcl-2 表达降低。而 HSYA 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理后细胞凋亡减少, Bax、cleaved

Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达水平降低, Bcl-2 表达水平升高。表明 HSYA 可以通过抑制内皮细胞凋亡来减轻缺氧复氧损伤。

综上所述, HSYA 预处理对缺氧复氧导致的 EA.hy926 细胞凋亡具有明显的改善作用。在已有的理论基础之上本实验进一步探讨了其作用的关键机制, 为 HSYA 治疗心肌缺血再灌注损伤提供了实验依据。

参考文献

- [1] 乔锐, 朱贤光, 项学军, 等. 急性冠脉综合征患者降钙素原水平和血管内超声特点的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(5): 1100-1102.
- [2] Mitsos S, Katsanos K, Koletsis E, *et al.* Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: Basic biological concepts and focus on latest clinical trials [J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(1): 1-22.
- [3] 李辉, 朱天民. 心机缺血再灌注损伤中医病因病机浅识 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 434-435.
- [4] 张东, 金艳. 对心肌再灌注损伤的中医病机探讨 [J]. 内蒙古中医药, 2003, 22(5): 1-2.
- [5] 刘飞, 邓云, 段春寒. 中药红花抗脑缺血损伤作用机制的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(1): 151-154.
- [6] 沈冰冰, 张松, 朱启仁, 等. 羟基红花黄色素 A 减轻大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4): 480-484.
- [7] He S, Wang X, Zhong Y, *et al.* Hesperetin post-treatment prevents rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury *in vitro* via activating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.003.
- [8] 刘维海, 袁有才, 常青, 等. 丹参注射液临床不良反应报告的案例分析和讨论 [J]. 中医药导报, 2017, 23(7): 80-82.
- [9] 陈启龙, 王海昌, 孙冬冬. 心肌梗死后左室重构发病机制进展 [J]. 心脏杂志, 2018, 30(2): 222-224.
- [10] 胡华, 黄政德, 周德生. 活血化瘀法防治心机缺血再灌注损伤的研究思路 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(12): 1310-1316.
- [11] 杜武勋, 刘长玉, 刘梅, 等. 热瘀痰湿毒与急性心肌梗死发病机理的探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(4): 427-428.
- [12] 李辉, 康品方, 宣玲, 等. 核因子- κ B 信号通路与缺血性心脏病关系的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(12): 3051-3054.
- [13] Zanin R F, Bergamin L S, Morrone F B, *et al.* Pathological concentrations of homocysteine increases IL-1 β production in macrophages in a P2X7, NF- κ B, and erk-dependent manner [J]. *Purinerg Signal*, 2015, 11(4): 463-470.
- [14] Kositprapa C, Ockaili R A, Kukreja R C. Bradykinin B2 receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(7): 1355-1362.
- [15] 苏宁, 卢芬萍, 朱明明, 等. 黄芩甲苷联合羟基红花黄色素 A 对小鼠心肌梗死的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 98-103.
- [16] 刘伊娜, 朱健华, 吴翔, 等. 羟基红花黄色素 A 抗心肌细胞缺氧复氧损伤的线粒体相关机制 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2013, 23(4): 313-316.
- [17] Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, *et al.* Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2001, 104(3): 253-256.
- [18] Lu Q, Li Z G, Zhou N, *et al.* Impact of citrate pretreatment on ventricular arrhythmia and myocardial capase-3 expression in ischemia/reperfusion injury [J]. *Genet Mol Res*, 2016, doi: 10.4238/gmr15048848.
- [19] Chen L, Cheng L, Wei X B, *et al.* Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against dopaminergic neuronal apoptosis via activation of PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway in 6-OHDA-induced Parkinson's disease mice [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(4): 1141-1150.
- [20] Marisa G, Celeste R, Maria Saveria G M, *et al.* Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.011.
- [21] Bhat S K, Joshi M B, Ullah A, *et al.* Serine proteinases from Bothrops snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis [J]. *Toxicon*, 2016, 124(15): 63-72.
- [22] Cryns V, Yuan J. Protease to die for [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(11): 1551-1570.
- [23] Jiao S J, Zhu H C, He P, *et al.* Betulinic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.028.