

理气活血滴丸通过 HIF-1 α 信号通路减轻缺氧复氧诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡

刘田静, 陈向云*, 朱 璨, 汤小芳, 褚春薇, 路雨昕, 李尧锋*

贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 探究理气活血滴丸对大鼠心肌细胞 H9C2 缺氧/复氧 (H/R) 损伤的保护作用及相关信号通路机制。 **方法** 理气活血滴丸 175 mg·kg⁻¹ ig 给予大鼠制备含药血清, ig 给予大鼠去离子水制备空白血清。将生长状态良好的 H9C2 细胞分为 9 组: 对照[10%胎牛血清 (FBS)]组、单给空白血清 (10%空白血清) 组、模型 (10% FBS+H/R 模型) 组、空白血清 (10%空白血清预处理 12 h+H/R 模型) 组、含药血清 (10%含药血清预处理 12 h+H/R 模型) 组、shNC+空白血清 (NC-shRNA 感染+10%空白血清预处理 12 h+H/R 模型) 组、shHIF-1 α +空白血清 (HIF-1 α -shRNA 感染+10%空白血清预处理 12 h+H/R 模型) 组、shNC+含药血清 (NC-shRNA 感染+10%含药血清预处理 12 h+H/R 模型) 组、shHIF-1 α +含药血清 (HIF-1 α -shRNA 感染+10%含药血清预处理 12 h+H/R 模型) 组。重组 shRNA 腺病毒感染 H9C2 细胞 24 h 后, 更换相应培养基预处理 12 h, 随后进行 H/R 处理。酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测心肌酶[乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I (cTnI)]漏出情况, CCK-8 法检测细胞活性, Annexin V-APC/7-AAD 染色流式细胞术分析细胞凋亡情况, Western blotting 检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、裂解型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cleaved Caspase-3)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血红素加氧酶 1 (HO-1) 蛋白表达情况, 免疫荧光观察 HIF-1 α 亚细胞定位并行平均光密度 (AOD) 分析。 **结果** 与单给空白血清组比较, H/R 后空白血清组 H9C2 心肌细胞的培养液中 LDH、CK-MB 和 cTnI 含量显著升高 ($P<0.01$), 细胞活力显著下降 ($P<0.05$)、凋亡率显著增加 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), Bax、cleaved Caspase-3、HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), HIF-1 α 阳性表达定位于细胞质和细胞核, HIF-1 α AOD 显著升高 ($P<0.05$)。与空白血清组比较, 理气活血滴丸含药血清预处理可使 H/R 后心肌细胞的心肌酶 LDH、CK-MB、cTnI 漏出显著减少 ($P<0.05$), 细胞活力显著升高 ($P<0.05$)、凋亡率显著降低 ($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$), Bax、cleaved Caspase-3、HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), HIF-1 α 在细胞质和细胞核都有表达, 但主要定位于细胞核, HIF-1 α AOD 显著降低 ($P<0.05$)。重组腺病毒介导的 HIF-1 α -shRNA 可削弱理气活血滴丸含药血清上述作用 ($P<0.05$)。 **结论** 理气活血滴丸通过调节 HIF-1 α 信号通路减轻 H/R 诱导的心肌细胞凋亡。

关键词: 理气活血滴丸; 心肌细胞; 缺氧复氧损伤; HIF-1 α 信号通路; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)05-1124-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.005

Liqi Huoxue Dripping Pills alleviating H9C2 cell apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation through HIF-1 α signaling pathway

LIU Tianjing, CHEN Xiangyun, ZHU Can, TANG Xiaofang, CHU Chunwei, LU Yuxin, LI Yaofeng

School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Liqi Huoxue Dripping Pill on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury in rat H9C2 myocardial cells and the related signaling pathway mechanisms. **Methods** The rats were given 175 mg·kg⁻¹ of Liqi Huoxue Dripping Pills by intragastric administration to prepare the drug-containing serum, and deionized water was given by intragastric administration to prepare the blank serum. H9C2 cells in good growth condition were divided into nine groups: the control group [10% fetal bovine serum (FBS)], the single administration blank serum group (10% blank serum), the model group (10% FBS + H/R model),

收稿日期: 2024-10-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82360965; 82060770)

作者简介: 刘田静 (1998—), 女, 硕士研究生, 从事中医药防治心血管疾病研究。E-mail: ltj202209@163.com

*通信作者: 陈向云, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治心血管疾病研究。E-mail: chenxiyunxy@163.com

李尧锋, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药活性成分筛选及防治心血管疾病研究。E-mail: lyfengcxy2010@163.com

the blank serum pretreatment group (10% blank serum pretreatment for 12 h + H/R model), the drug-containing serum pretreatment group (10% drug-containing serum pretreatment for 12 h + H/R model), the shNC + blank serum group (NC-shRNA infection + 10% blank serum pretreatment for 12 h + H/R model), the shHIF-1 α + blank serum group (HIF-1 α -shRNA infection + 10% blank serum pretreatment for 12 h + H/R model), the shNC + drug-containing serum group (NC-shRNA infection + 10% drug-containing serum pretreatment for 12 h + H/R model), and the shHIF-1 α + drug-containing serum group (HIF-1 α -shRNA infection + 10% drug-containing serum pretreatment for 12 h + H/R model). After 24 h of infection with recombinant shRNA adenovirus, the H9C2 cells were replaced with the corresponding culture medium for 12 h of pretreatment, followed by H/R treatment. The leakage of myocardial enzymes [lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), and cardiac troponin I (cTnI)] was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), cell viability was detected by CCK-8 method, apoptosis was analyzed by Annexin V-APC/7-AAD staining flow cytometry, and the protein expression of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved caspase-3, HIF-1 α , and heme oxygenase 1 (HO-1) was detected by Western blotting. Immunofluorescence was used to observe the subcellular localization of HIF-1 α and the average optical density (AOD) was analyzed. **Results** Compared with the single administration blank serum group, the content of LDH, CK-MB, and cTnI in the culture medium of H9C2 myocardial cells in the blank serum group after H/R was significantly increased ($P < 0.01$), cell viability was significantly decreased ($P < 0.05$), the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.05$), Bcl-2 protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression of Bax, cleaved caspase-3, HIF-1 α , and HO-1 proteins was significantly increased ($P < 0.05$). HIF-1 α positive expression was located in the cytoplasm and nucleus, and the AOD of HIF-1 α was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the blank serum group, pretreatment with Liqi Huoxue Dropping Pills drug-containing serum could significantly reduce the leakage of myocardial enzymes LDH, CK-MB, and cTnI in H9C2 myocardial cells after H/R ($P < 0.05$), significantly increase cell viability ($P < 0.05$), significantly reduce the apoptosis rate ($P < 0.05$), significantly increase Bcl-2 protein expression ($P < 0.05$), and significantly decrease the expression of Bax, cleaved caspase-3, HIF-1 α , and HO-1 proteins ($P < 0.05$). HIF-1 α was expressed in both the cytoplasm and nucleus, but mainly located in the nucleus, and the AOD of HIF-1 α was significantly decreased ($P < 0.05$). Recombinant-adenovirus-mediated HIF-1 α -shRNA could weaken the above effects of Liqi Huoxue Dropping Pills drug-containing serum ($P < 0.05$). **Conclusion** Liqi Huoxue Dropping Pills alleviating H/R-induced cardiocyte apoptosis by regulating the HIF-1 α signaling pathway.

Key words: Liqi Huoxue Dropping Pills; myocardial cells; hypoxia/reoxygenation injury; hypoxia-inducible factor-1 α pathway; apoptosis

急性冠状动脉综合征 (ACS) 是由冠脉急性梗阻所致的心脏危急状态, 是心血管疾病高发病率和死亡率的主要原因^[1-2]。ACS 包括不稳定型心绞痛、急性非 ST 段抬高型心肌梗死和急性 ST 段抬高型心肌梗死。对急性 ST 段抬高型心肌梗死, 临床上常用的治疗措施是恢复冠脉血流。然而, 冠脉再灌注会引起一系列损伤反应, 即心肌缺血再灌注损伤 (MIRI), 这可能导致梗死面积扩大, 严重影响患者预后^[3-4]。因此, 减轻 MIRI 对于提高心脏再灌注治疗的效果至关重要。

研究表明, 理气活血滴丸能够改善缺血再灌注大鼠的左心室结构和功能, 并减轻线粒体损伤, 减少心肌细胞凋亡^[5]; 此外, 研究发现理气活血滴丸通过磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/丝-苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 信号通路缓解 MIRI^[6]。尽管如此, 理气活血滴丸减少心肌细胞凋亡和缓解 MIRI 的具体作用机制尚未完全阐明。网络药理学分析发现理气活血滴丸可能通过调控 PI3K/Akt、缺氧诱导因子 1

(HIF-1)、叉头框 O 蛋白 (FoxO) 等信号通路来治疗心血管疾病^[7]。HIF-1 α 作为参与线粒体氧化应激反应的 HIF-1 的氧敏感亚基, 是 PI3K/Akt 信号通路的重要下游靶蛋白, 并且与缺氧引起的细胞凋亡密切相关^[8-9]。

本研究利用大鼠 H9C2 心肌细胞缺氧复氧 (H/R) 模型来模拟 MIRI, 通过理气活血滴丸含药血清结合重组腺病毒介导的 HIF-1 α 基因的 shRNA 干扰重组腺病毒 (HIF-1 α -shRNA) 预处理, 探究 HIF-1 α 信号通路在理气活血滴丸缓解心肌细胞 MIRI 和减少细胞凋亡中的作用, 以期为理气活血滴丸治疗 MIRI 提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠, 体重 (200 $\pm$ 20) g, 雄性, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 实验动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0014。本研究方案及操作规程经贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会审核通

过(批准编号 20210098)。

1.2 细胞株

大鼠 H9C2 心肌细胞株(货号 CL-0089)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 药品与试剂

理气活血滴丸(组成:大果木姜子、川芎、薤白、艾片,批号 211102)购自贵州民族药业股份有限公司;针对大鼠 *HIF-1 α* 基因的 shRNA 干扰重组腺病毒(*HIF-1 α* -shRNA)与阴性对照腺病毒(NC-shRNA)购自苏州吉玛基因股份有限公司;细胞培养基、Trypsin-EDTA(货号分别为 CM-0089、PB180225)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;大鼠乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(货号分别为 CB10718、CB10461、CB11507)购自上海科艾博生物技术有限公司;CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号 E-CK-A362)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;Annexin V-APC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒(货号 KGA1026)购自江苏凯基生物科技股份有限公司;HIF-1 α 抗体、血红素加氧酶 1(HO-1)抗体、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体、 β -actin 抗体(货号分别为 20960-1-AP、10701-1-AP、26593-1-AP、670267-1-Ig、66009-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;裂解型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cleaved Casepase-3)抗体(货号 AF7022)购自美国 Affinity Biosciences 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的山羊抗大鼠 IgG、Cy3 标记的山羊抗兔 IgG(货号分别为 BA1054、BA1051、BA1032)购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器

Multiskan FC 酶标仪、CellInsight CX7LZR 激光共聚焦显微镜、Forma311 型细胞恒温培养箱、Forma3131 型三气培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);ECLIPSE Ts2 倒置显微镜、DS-Fi3 显微镜(日本 Nikon 公司);CytoFLEX 流式细胞仪(美国 Beckman coulter 公司)。

2 方法

2.1 实验分组和处理

参考本课题组前期研究^[10],175 mg·kg⁻¹ 理气活血滴丸 ig 给予大鼠制备含药血清,ig 给予大鼠去离子水制备空白血清。

将生长状态良好的 H9C2 细胞分为 9 组:对照[10%胎牛血清(FBS)]组、单给空白血清(10%空白血清)组、模型(10%FBS+H/R 模型)组、空白血清(10%空白血清预处理 12 h+H/R 模型)组、含药血清(10%含药血清预处理 12 h+H/R 模型)组、shNC+空白血清(NC-shRNA 感染+10%空白血清预处理 12 h+H/R 模型)组、shHIF-1 α +空白血清(*HIF-1 α* -shRNA 感染+10%空白血清预处理 12 h+H/R 模型)组、shNC+含药血清(NC-shRNA 感染+10%含药血清预处理 12 h+H/R 模型)组、shHIF-1 α +含药血清(*HIF-1 α* -shRNA 感染+10%含药血清预处理 12 h+H/R 模型)组。

H9C2 细胞接种至 24 孔板,每孔 1×10^5 个,将感染复数(MOI)为 100 的重组 shRNA 腺病毒感染 H9C2 细胞,置于 37 °C、5%CO₂ 的培养箱培养 24 h 后,更换相应培养基预处理 12 h。随后进行 H/R 处理:细胞培养基换为 95% N₂ 和 5% CO₂ 预饱和的相应培养基,置于 93% N₂、2% O₂、5% CO₂ 混合气的三气培养箱中缺氧 6 h,随后在常规 CO₂ 培养箱中复氧 12 h^[11]。

2.2 ELISA 法检测各组细胞培养液 LDH、CK-MB、cTnI 水平

收集“2.1”项处理后的各组细胞培养液,以 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 取上清,ELISA 法检测上清中 LDH、CK-MB、cTnI 释放情况,严格遵循 ELISA 试剂盒规定操作。

2.3 CCK-8 检测细胞活力

将 H9C2 细胞接种至 96 孔板,每孔 5×10^3 个,细胞分组及处理操作同“2.1”项,设置空白对照组,不接种细胞,其余操作同对照组。复氧结束后加入 10 μ L CCK-8 溶液,细胞培养箱内孵育 2 h,酶标仪检测波长 450 nm 处吸光度(*A*)值,并计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}})$$

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

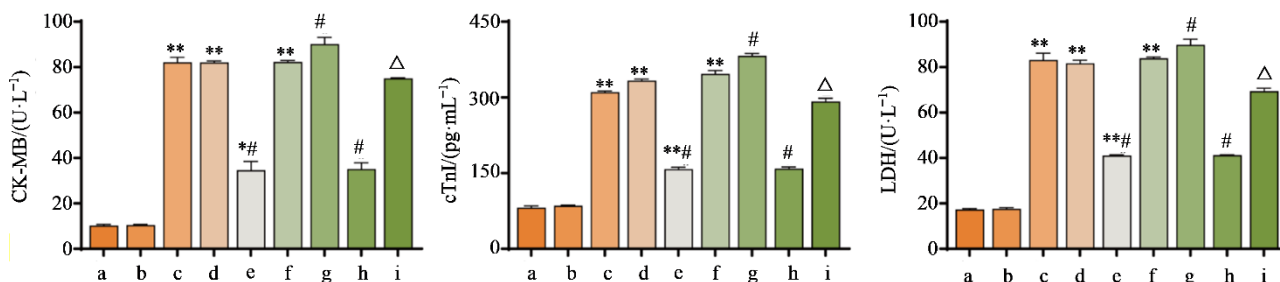
收集“2.1”项处理后的各组 H9C2 细胞经胰酶消化,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬并调整浓度。弃上清加入 Annexin V 结合缓冲液重悬,加入 5 μ L 的 Annexin V-APC 混匀后加入同体积 7-AAD 工作液,室温避光染色 15 min。通过流式细胞仪检测凋亡,细胞凋亡率为右上象限凋亡率与右下象限凋亡率之和。

2.5 Western blotting 检测细胞 Bcl-2、Bax、cleaved Casepase-3、HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达

收集“2.1”项处理后的 H9C2 细胞,使用 RIPA 裂解缓冲液裂解并提取总蛋白。使用 Bradford 法对蛋白进行定量后,将蛋白样本与样品缓冲液混合,煮沸 5 min。通过 8% SDS-PAGE 进行蛋白分离后,使用湿转法将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上。转膜后,5%脱脂牛奶封闭,然后加入 Bcl-2、Bax、cleaved Casepase-3、HIF-1 α 、HO-1 一抗(均按 1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,用 TBST 洗涤膜 3 次,每次 5 min,然后加入相应的二抗,室温下孵育 1 h。洗涤后,ECL 化学发光液显影、曝光拍照。Image J 软件分析目的蛋白条带灰度值,以 β -actin 为内参蛋白,进行相对表达量分析。

2.6 免疫荧光和激光共聚焦分析 HIF-1 α 的定位及表达

多聚甲醛固定液固定经“2.1”项处理的各组细胞,0.5% Triton X-100 室温通透 10 min。封闭液室温封闭 30 min。加入 HIF-1 α (1:100) 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,加入二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h,加入 DAPI 染色液避光 5 min。封片液封片后,激光共聚焦显微镜下采集图像,HIF-1 α 呈现红色荧光,细胞核显示蓝色荧光。IPP6.0 软件测定 HIF-1 α 平均光密度(AOD)。



a-对照组, b-单给空白血清组, c-模型组, d-空白血清组, e-含药血清组, f-shNC+空白血清组, g-shHIF-1 α +空白血清组, h-shNC+含药血清组, i-shHIF-1 α +含药血清组; 与单给空白血清组比较: ** $P<0.01$; 与空白血清组比较: # $P<0.05$; 与含药血清组比较: $\Delta P<0.05$ 。
a-control group, b-single administration blank serum group, c-model group, d-blank serum group, e-drug-containing serum group, f-shNC+blank serum group, g-shHIF-1 α +blank serum group, h-shNC+drug-containing serum group, i-shHIF-1 α +drug-containing serum group; ** $P<0.01$ vs single administration blank serum group; # $P<0.05$ vs blank serum group; $\Delta P<0.05$ vs drug-containing serum group.

图 1 各组 H9C2 心肌细胞培养液中 LDH、CK-MB、cTnI 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Levels of LDH, CK-MB, and cTnI in culture medium of H9C2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 各组细胞增殖活性

结果如图 2 所示,与对照组比较,单给空白血清组细胞存活率无明显差异;与模型组比较,空白血清组细胞存活率无明显差异。与单给空白血清组比较,H/R 造模后空白血清组细胞存活率

2.7 统计方法

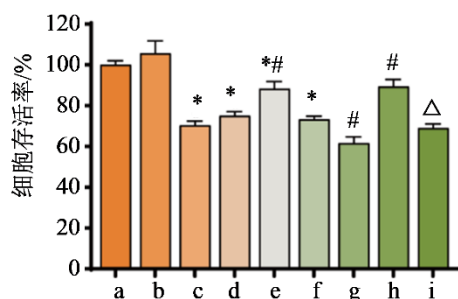
采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验进行组间比较,单因素方差分析进行多组间比较(满足方差齐性假设时采用 LSD 检验,不满足方差齐性假设时采用 Dunnett's T_3 检验)。

3 结果

3.1 各组细胞培养液中 LDH、CK-MB、cTnI 释放情况

如图 1 所示,与对照组比较,单给空白血清组 LDH、CK-MB、cTnI 水平无明显差异;与模型组比较,空白血清组 LDH、CK-MB、cTnI 水平无明显差异。与单给空白血清组比较,H/R 造模后空白血清组细胞培养基 LDH、CK-MB、cTnI 水平显著升高($P<0.01$);与空白血清组比较,含药血清、shNC+含药血清组 LDH、CK-MB、cTnI 水平显著降低($P<0.05$),shHIF-1 α +空白血清组 LDH、CK-MB、cTnI 水平显著升高($P<0.05$);与含药血清组比较,shHIF-1 α +含药血清组 LDH、CK-MB、cTnI 水平升高($P<0.05$)。结果表明,H/R 损伤后心肌酶漏出增加,心肌细胞损伤加重;理气活血滴丸预处理能够降低 H/R 后心肌酶漏出情况,而腺病毒介导的 HIF-1 α -shRNA 能减弱理气活血滴丸的保护作用。

显著下降($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清、shNC+含药血清组细胞存活率显著升高($P<0.05$),shHIF-1 α +空白血清组细胞活力降低($P<0.05$);与含药血清组比较,shHIF-1 α +含药血清组细胞存活率显著下降($P<0.05$)。结果表明,H/R 降



a-对照组, b-单给空白血清组, c-模型组, d-空白血清组, e-含药血清组, f-shNC+空白血清组, g-shHIF-1 α +空白血清组, h-shNC+含药血清组, i-shHIF-1 α +含药血清组; 与单给空白血清组比较: ** $P < 0.01$; 与空白血清组比较: # $P < 0.05$; 与含药血清组比较: $\Delta P < 0.05$ 。

a-control group, b-single administration blank serum group, c-model group, d-blank serum group, e-drug-containing serum group, f-shNC+blank serum group, g-shHIF-1 α +blank serum group, h-shNC+drug-containing serum group, i-shHIF-1 α +drug-containing serum group; * $P < 0.05$ vs single administration blank serum group; # $P < 0.05$ vs blank serum group; $\Delta P < 0.05$ vs drug-containing serum group.

图 2 各组 H9C2 细胞增殖活性($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Proliferation activity of H9C2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

低细胞活力, 理气活血滴丸预处理能降低 H/R 对细胞活力的抑制作用, 过程受 HIF-1 α 的影响。

3.3 各组细胞凋亡情况

如图 3 所示, 与对照组比较, 单给空白血清组细胞凋亡率无明显差异; 与模型组比较, 空白血清组细胞凋亡率无明显差异。与单给空白血清组比较, H/R 造模后空白血清组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与空白血清组比较, 含药血清、shNC+含药血清组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), shHIF-1 α +空白血清组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与含药血清组比较, shHIF-1 α +含药血清组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明, H/R 引起细胞凋亡, 理气活血滴丸预处理能减轻细胞凋亡, 过程受 HIF-1 α 表达影响。

3.4 各组细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 表达情况

如图 4 所示, 与对照组比较, 单给空白血清组 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达无明显差异; 与模型组比较, 空白血清组 Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达无明显差异。与单给空白血清组比较, H/R 造模后空白血清组 Bcl-2 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$), Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达

显著升高 ($P < 0.05$)。与空白血清组比较, 含药血清和 shNC+含药血清组细胞 Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); shHIF-1 α +空白血清组 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与含药血清组比较, shHIF-1 α +含药血清组细胞 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。结果表明, 腺病毒介导的 HIF-1 α -shRNA 减弱了理气活血滴丸预处理对 H/R 诱导凋亡蛋白水平降低的作用。

3.5 各组细胞中 HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达情况

如图 4 所示, 与对照组比较, 单给空白血清组 HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达无明显差异; 与模型组比较, 空白血清组 HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达无明显差异。与单给空白血清组比较, H/R 造模后空白血清组细胞 HIF-1 α 、HO-1 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与空白血清组比较, 含药血清、shHIF-1 α +空白血清和 shNC+含药血清组细胞 HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$); 与含药血清组比较, shHIF-1 α +含药血清组细胞 HIF-1 α 、HO-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。结果表明, H/R 升高 HIF-1 α 、HO-1 表达水平, 而理气活血滴丸预处理降低 HIF-1 α 、HO-1 表达水平, 腺病毒介导的 HIF-1 α -shRNA 使 HIF-1 α 、HO-1 表达水平更低。

3.6 各组细胞中 HIF-1 α 蛋白定位及定量情况

免疫荧光结合激光共聚焦显微观察分析各组细胞 HIF-1 α 蛋白定位情况, 如图 5 所示, 对照组和单给空白血清组 HIF-1 α 阳性表达较少, 且定位于细胞质; 模型组、空白血清组和 shNC+空白血清组 HIF-1 α 阳性表达较多, 在细胞质和细胞核均有表达; 含药血清和 shNC+含药血清组 HIF-1 α 阳性表达少, 在细胞质和细胞核都有表达, 且主要定位于细胞核; shHIF-1 α +空白血清和 shHIF-1 α +含药血清组 HIF-1 α 阳性表达明显减少。

对各组细胞 HIF-1 α 蛋白免疫荧光图像定量分析结果表明, 与对照组比较, 单给空白血清组 HIF-1 α AOD 无明显差异; 与模型组比较, 空白血清组 HIF-1 α AOD 无明显差异。与单给空白血清组比较, H/R 后空白血清组 HIF-1 α AOD 显著升高 ($P < 0.05$); 与空白血清组比较, 含药血清、shHIF-1 α +空白血清和 shNC+含药血清组 HIF-1 α AOD 均显著降低 ($P < 0.05$); 与含药血清组比较, shHIF-1 α +

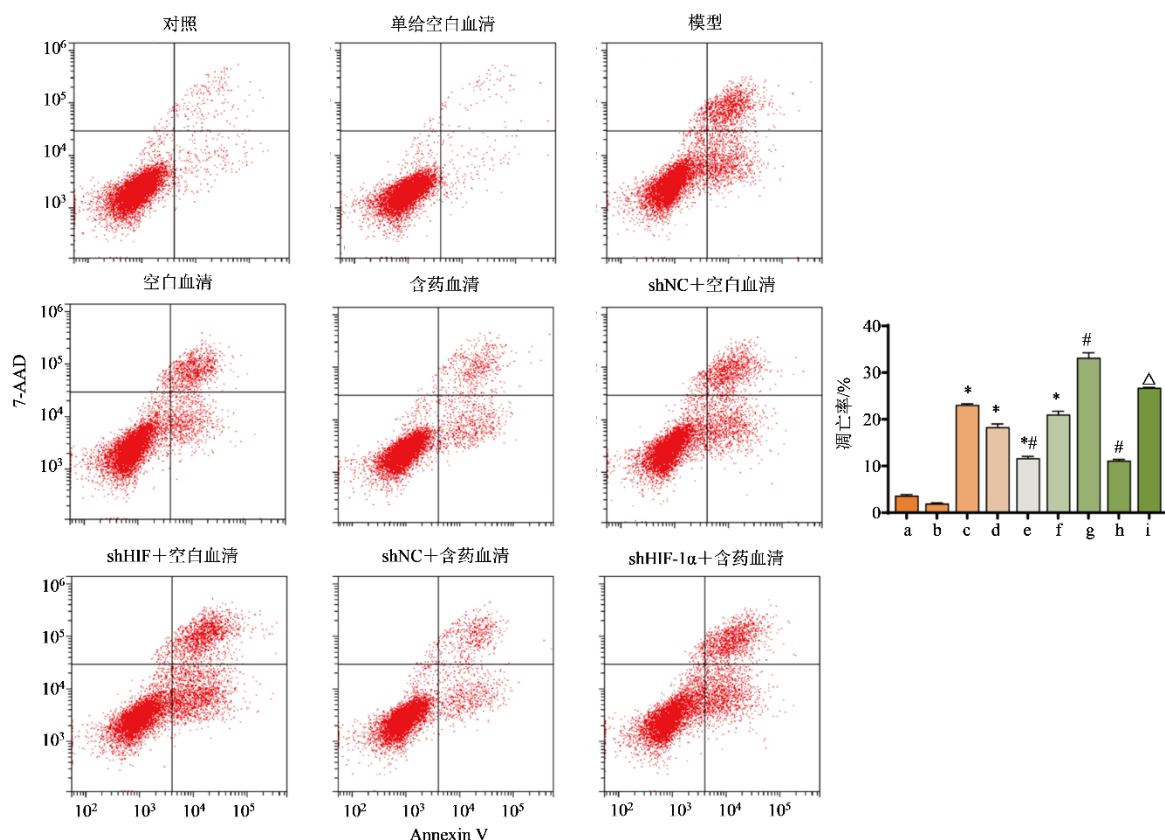


图 3 各组 H9C2 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

a-对照组, b-单给空白血清组, c-模型组, d-空白血清组, e-含药血清组, f-shNC+空白血清组, g-shHIF-1α+空白血清组, h-shNC+含药血清组, i-shHIF-1α+含药血清组; 与单给空白血清组比较: * $P<0.05$; 与空白血清组比较: # $P<0.05$; 与含药血清组比较: △ $P<0.05$ 。

a-control group, b-single administration blank serum group, c-model group, d-blank serum group, e-drug-containing serum group, f-shNC+blank serum group, g-shHIF-1α+blank serum group, h-shNC+drug-containing serum group, i-shHIF-1α+drug-containing serum group; * $P<0.05$ vs single administration blank serum group; # $P<0.05$ vs blank serum group; △ $P<0.05$ vs drug-containing serum group.

Fig. 3 Apoptosis rates of H9C2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

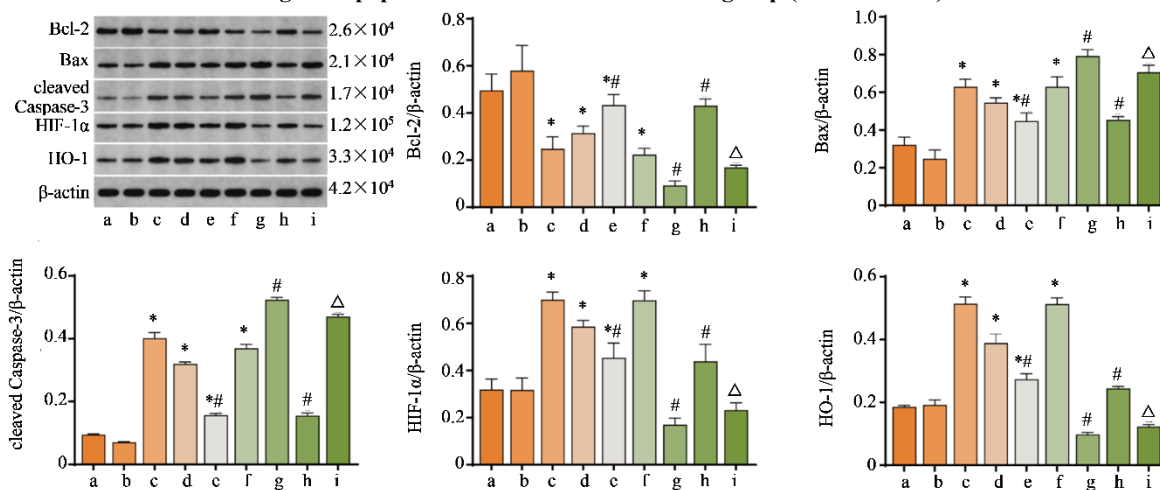


图 4 各组细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、HIF-1α、HO-1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

a-对照组, b-单给空白血清组, c-模型组, d-空白血清组, e-含药血清组, f-shNC+空白血清组, g-shHIF-1α+空白血清组, h-shNC+含药血清组, i-shHIF-1α+含药血清组; 与单给空白血清组比较: * $P<0.05$; 与空白血清组比较: # $P<0.05$; 与含药血清组比较: △ $P<0.05$ 。

a-control group, b-single administration blank serum group, c-model group, d-blank serum group, e-drug-containing serum group, f-shNC+blank serum group, g-shHIF-1α+blank serum group, h-shNC+drug-containing serum group, i-shHIF-1α+drug-containing serum group; * $P<0.05$ vs single administration blank serum group; # $P<0.05$ vs blank serum group; △ $P<0.05$ vs drug-containing serum group.

Fig. 4 Protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, HIF-1α, and HO-1 in cells of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

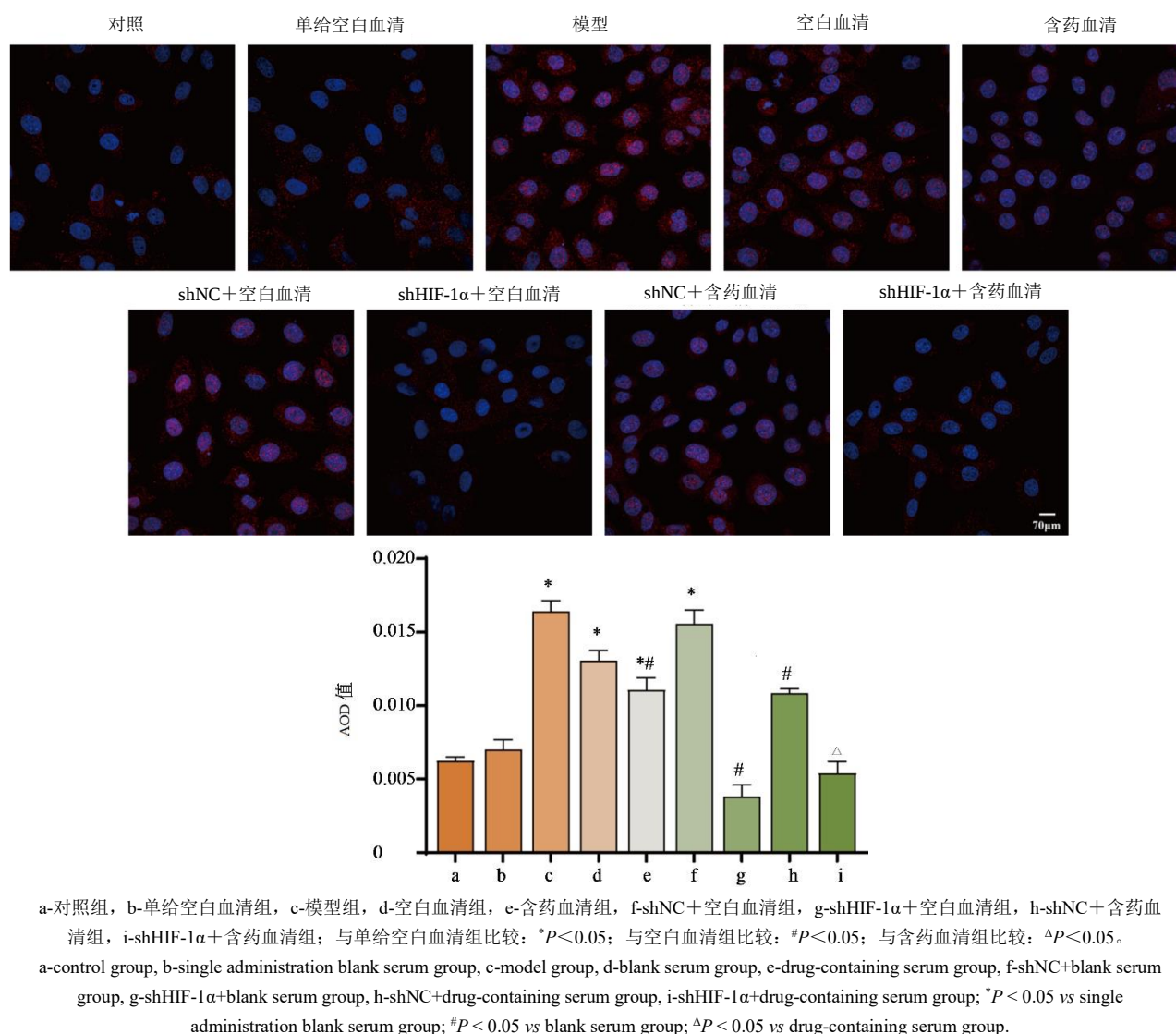


图 5 各组细胞中 HIF-1α 定位情况 (×600, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Localization of HIF-1α in cells of each group (×600, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

含药血清组 HIF-1α AOD 显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

MIRI 是冠状动脉再通或心脏移植后常见术后并发症, 通常会导致心肌结构和功能障碍、心脏电生理异常, 从而显著影响患者长期预后^[12]。现代中医将其归为心系病症, 具体表现同“胸痹”“心痛”。《金匱要略》中对其病机概括为“阳微阴弦”, 即心阳不足、阴寒凝滞。《素问·调经论》云: “寒气积于胸中而不泻, 不泻则温气去, 寒独留则血凝涩, 凝则脉不通”; 《医学原理》云: “心痛未有不由气滞而致者”。故胸阳不振、阴寒凝滞、气滞血瘀是其常见病理机制^[13-14]。理气活血滴丸是根据中医药理论和贵州苗族民间验方制成的一种中药复方制剂, 其君药大果木姜子, 温阳行气; 臣药川芎, 则能活血行

气止痛, 与君药合用, 增强复方理气活血之功; 薤白, 通阳散结, 行气导滞, 配合君药增强通阳宽胸之效; 艾片, 开窍醒神, 清热止痛, 引药达病所, 为佐使药。综合各药力, 本方具有温阳宽胸、理气活血功效, 现用于心阳不足, 气滞血瘀型冠心病、心绞痛, 具有良好疗效^[15-16]。

本研究基于 HIF-1α 信号通路和细胞凋亡, 探究理气活血滴丸含药血清减轻 H/R 诱导心肌细胞损伤的作用机制。研究发现, 理气活血滴丸含药血清预处理能减少 H/R 诱导的 H9C2 细胞心肌酶(LDH、CK-MB、cTnI^[17-19]) 漏出, 减轻心肌细胞损伤, 提高 H/R 后 H9C2 细胞活力, 抑制 H/R 损伤后心肌细胞凋亡; 此外, HIF-1α 参与理气活血滴丸含药血清减轻 H/R 诱导心肌细胞凋亡和损伤的作用。

H/R 损伤病理过程特征在于线粒体功能障碍, 这影响细胞的能量代谢并促进了细胞凋亡^[20-21]。Bcl-2 和 Bax 是调控细胞凋亡的关键蛋白, 其中 Bcl-2 抑制凋亡, 而 Bax 促进凋亡^[22]。Bax 的激活导致线粒体膜通透性增加, 细胞色素 C 释放增多, 进而激活 Caspase 3 切割生成 cleaved Caspase-3, 驱动细胞凋亡^[23]。本研究发现理气活血滴丸含药血清预处理能升高 Bcl-2 蛋白表达, 降低 Bax 与 cleaved Caspase-3 蛋白表达, 减少 H/R 后心肌细胞凋亡。此外通过腺病毒介导的 *HIF-1 α -shRNA* 干扰抑制其作用效果, 表明 HIF-1 α 在理气活血滴丸抑制 H/R 诱导的 H9C2 细胞凋亡中扮演着重要角色。

HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 亚基组成的二聚体, 氧敏感亚基 HIF-1 α 可介导细胞对缺氧的适应性反应^[24], 可调控 *HO-1*、血管内皮生长因子 (*VEGF*)、诱导型 NO 合酶等基因表达, 以应答低氧环境^[25]。在常氧状态下, HIF-1 α 会被脯氨酸羟化酶 (PHD) 羟基化, 羟基化的 HIF-1 α 被冯希佩尔-林道蛋白 (VHL) 泛素结合酶 E3 识别, 并促进泛素化和随后的蛋白酶体降解^[26]。低氧时, PHD 活性受到抑制, 随后 HIF-1 α 的羟基化减少、降解受到抑制, HIF-1 α 积累并与 HIF-1 β 结合, 进入细胞核, 结合缺氧反应元件, 启动 *HO-1* 基因的表达^[27]。*HO-1* 催化血红素分解, 释放 CO、Fe²⁺ 和胆红素等抗氧化成分, 这些物质能够中和氧化应激并抑制细胞凋亡, 从而有助于保护心脏免受损伤^[28-29]。

多项研究发现 HIF-1 α 在低氧诱导的细胞损伤保护和细胞凋亡中扮演着不同角色。Ube2s 稳定的 β -连环蛋白通过激活 HIF-1 α 信号进而保护心肌缺血/再灌注损伤^[30]。Wang 等^[31]研究结果显示过表达 HIF-1 α 对 H/R 诱导的心肌细胞凋亡起到短期保护作用, 这可能与升高 Bcl-2/Bax 及其下游保护性蛋白 VEGF、髓细胞白血病 1、环氧合酶-2、一氧化氮合酶水平有关。Malhotra 等^[32]研究发现特异性过表达 HIF-1 α 则会促进缺氧诱导的 H9C2 细胞凋亡, 以及升高缺氧条件下肾上皮 HK-2 细胞凋亡蛋白 Bax 表达水平。过表达 HIF-1 α 可能诱导过量的细胞死亡因子 Bcl-2/腺病毒 E1B19kDa 结合蛋白 3, 引起过度的线粒体自噬, 触发 Caspase 依赖的凋亡途径, 引发心肌细胞凋亡^[33]; 或激活肿瘤抑制蛋白 p53 促进心肌细胞凋亡^[34]。另外, siRNA 转染介导的 HIF-1 α 过低表达可加重 H/R 诱导的心肌细胞凋亡, 表明缺氧条件下 HIF-1 α 的激活对于减少心肌细胞

凋亡是有必要的^[35]。这些研究提示 HIF-1 α 水平的升高对于缓解 H/R 损伤并不完全有益, HIF-1 α 过低表达对 H/R 诱导的心肌细胞损伤是无益的。另外研究发现稳定 HIF-1 α 及其下游调控蛋白表达可减少缺氧诱导的心肌细胞凋亡^[36], 以及增强急性心肌缺血和再灌注损伤期间心肌缺血性损伤的耐受性^[37]。本研究中 H9C2 细胞 H/R 处理后细胞凋亡增加, HIF-1 α 表达显著升高, 且定位在细胞质和细胞核中。而理气活血滴丸含药血清预处理可降低 H/R 诱导 H9C2 细胞 HIF-1 α 、HO-1 的高表达, 减少细胞凋亡, 但其表达水平仍较空白血清组高, 且 HIF-1 α 入核增多, 平均 *A* 值降低。此外利用腺病毒介导的 shRNA 干扰 HIF-1 α 表达后, H/R 处理的 H9C2 细胞凋亡显著增加, 也削弱了理气活血滴丸含药血清抑制凋亡的作用。表明在细胞中 HIF-1 α 的表达水平对 H/R 的适应具有双向性, 而理气活血滴丸能够稳定 HIF-1 α 在适度范围内表达。

然而, 当前研究尚未充分阐明理气活血滴丸含药血清预处理后 H/R 损伤导致 HIF-1 α 入核增多的机制, 以及 HIF-1 α 在细胞核内如何通过转录调控机制影响细胞凋亡的具体过程。有待深入研究这一调控网络, 以更全面地阐释理气活血滴丸对缺血再灌注心肌细胞的保护作用及分子机制。

理气活血滴丸含药血清预处理可减少 H/R 诱导的 H9C2 细胞心肌酶 (LDH、CK-MB、cTnI) 漏出, 增强细胞活力, 减少细胞凋亡, 保护心肌细胞 H/R 损伤, 该作用机制与其调控 HIF-1 α /HO-1 信号通路有关。这将为理气活血滴丸在心脏再灌注治疗围手术期的应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xu C C, Yu B K, Zhao X, et al. Valosin containing protein as a specific biomarker for predicting the development of acute coronary syndrome and its complication [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 803532.
- [2] Scavone M, Bozzi S, Mencarini T, et al. Platelet adhesion and thrombus formation in microchannels: The effect of assay-dependent variables [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 750.
- [3] Piper H M, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 38(2): 291-300.
- [4] Heusch G, Gersh B J. The pathophysiology of acute

- myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: A continual challenge [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(11): 774-784.
- [5] 李尧锋, 陈向云, 彭芳, 等. 苗药理气活血滴丸对心肌缺血再灌注大鼠左室肌细胞损伤的防护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(3): 157-161.
- Li Y F, Chen X Y, Peng F, et al. Protective effect of liqihuoxue dripping pill on left ventricular myocytes injury in rats with myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2018, 34(3): 157-161.
- [6] Zhan J Y, Zhang Y, Zhong X, et al. Liqi Huoxue dripping pill protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in rats [J]. *Tradit Med Res*, 2023, 8(4): 21.
- [7] 张建永, 杨沙, 陈宽, 等. 基于网络药理学的理气活血滴丸治疗心血管疾病作用机制研究 [J]. *中药材*, 2019, 42(5): 1139-1145.
- Zhang J Y, Yang S, Chen K, et al. Study on mechanism of liqi Huoxue dropping pills on treatment of cardiovascular disease by network pharmacology [J]. *J Chin Med Mater*, 2019, 42(5): 1139-1145.
- [8] Carmeliet P, Dor Y, Herbert J M, et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis [J]. *Nature*, 1998, 394(6692): 485-490.
- [9] Yang M F, Zhang X Y, Liu Q, et al. Network pharmacology, molecular docking, and untargeted metabolomics reveal molecular mechanisms of multi-targets effects of Qingfei Tongluo Plaster improving respiratory syncytial virus pneumonia[J]. *Chinese Herbal Medicines (CHM)*, 2024, 16(4): 638-655
- [10] 毛涵, 刘田静, 杨长福, 等. 理气活血滴丸含药血清对 ISO 诱导乳鼠心脏成纤维细胞转分化的影响及其机制研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(2): 146-152.
- Mao H, Liu T J, Yang C F, et al. Study on the effects and mechanism of Liqi Huoxue Drop Pill-containing serum on ISO-induced transdifferentiation of suckling rat cardiac fibroblasts [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2024, 44(2): 146-152.
- [11] Ge L, Cai Y, Ying F, et al. miR-181c-5p exacerbates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis via targeting PTPN4 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1957920.
- [12] Luo H Q, Song S, Chen Y, et al. Inhibitor 1 of protein phosphatase 1 regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II to alleviate oxidative stress in hypoxia-reoxygenation injury of cardiomyocytes [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2193019.
- [13] 李冀, 丁莹, 王呈祥, 等. 浅谈心肌缺血再灌注损伤的中医新进展 [J]. *中医药学报*, 2016, 44(2): 105-107.
- Li J, Ding Y, Wang C X, et al. New progress of traditional Chinese medicine in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2016, 44(2): 105-107.
- [14] 曹蛟, 张杼惠, 刘建和. 从中医“阳气亏虚, 痰瘀内阻”理论探讨中医药防治心肌缺血再灌注损伤的机制 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(2): 510-515.
- Cao J, Zhang Z H, Liu J H. Discussion on the mechanism of myocardial ischemia-reperfusion injury in traditional Chinese medicine from the theory of “deficiency of Yang Qi, phlegm and blood stasis blocking the viscera” [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2021, 23(2): 510-515.
- [15] 史铭, 陈国庆. 理气活血滴丸对气滞血瘀型冠心病心绞痛患者内皮功能及炎症反应的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(28): 3167-3169.
- Shi M, Chen G Q. Effect of liqi Huoxue dropping pills on endothelial function and inflammatory reaction in patients with angina pectoris of coronary heart disease with qi stagnation and blood stasis [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*, 2018, 27(28): 3167-3169.
- [16] 陈可冀, 吴宗贵, 王晓峰, 等. 理气活血滴丸治疗冠心病稳定型心绞痛中国专家共识 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(17): 2441-2444.
- Chen K j, Wu Z g, Wang X f, et al. Experts consensus on liqi Huoxue drop pill for the treatment of stable angina pectoris due to coronary heart disease [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2018, 16(17): 2441-2444.
- [17] 孙芳, 杜凯, 杨露, 等. 右美托咪定联合舒芬太尼对老年心脏瓣膜置换术患者 H-FABP、CK-MB、cTnI 等指标水平及认知功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(23): 5706-5709.
- Sun F, Du K, Yang L, et al. Influence of dexmedetomidine combined with sufentanil on the levels of indicators such as H-FABP, CK-MB, and cTnI and cognitive function in elderly patients undergoing cardiac valve replacement [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(23): 5706-5709.
- [18] 赵德刚. 血清总 CK、CKMB 质量/总 CK 在心血管疾病中的表达及意义 [J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(23): 3477-3479, 3484.
- Zhao D G. Expression and significance of serum total CK and CKMB mass/total CK in cardiovascular diseases [J]. *Lab Med Clin*, 2023, 20(23): 3477-3479, 3484.
- [19] 方洁, 徐信, 马超, 等. 替罗非班联合肾上腺素对老年 AMI 患者 PCI 术后转归的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(15): 3585-3588.
- Fang J, Xu X, Ma C, et al. Effect of tirofiban combined with epinephrine on the prognosis of elderly AMI patients

- after PCI [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(15): 3585-3588.
- [20] Li C Y, Jackson R M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(2): C227-C241.
- [21] Saikumar P, Dong Z, Weinberg J M, et al. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3341-3349.
- [22] Chao D T, Korsmeyer S J. BCL-2 family: Regulators of cell death [J]. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16: 395-419.
- [23] Feng Y, Clayton J, Yake W, et al. Resveratrol derivative, trans-3, 5, 4'-trimethoxystilbene sensitizes osteosarcoma cells to apoptosis via ROS-induced caspases activation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8840692.
- [24] Yang R, Chen H, Xing L, et al. Hypoxia-induced circWSB1 promotes breast cancer progression through destabilizing p53 by interacting with USP10 [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 88.
- [25] Suleiman J B, Mohamed M, Abu Bakar A B, et al. Therapeutic effects of bee bread on obesity-induced testicular-derived oxidative stress, inflammation, and apoptosis in high-fat diet obese rat model [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(2): 255.
- [26] Zhao C Q, Chen J, Cheng L P, et al. Deficiency of HIF-1 α enhances influenza A virus replication by promoting autophagy in alveolar type II epithelial cells [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 691-706.
- [27] Li W J, Xiang Z D, Xing Y X, et al. Mitochondria bridge HIF signaling and ferroptosis blockage in acute kidney injury [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 308.
- [28] Hui Y, Zhao Y L, Ma N, et al. M3-mAChR stimulation exerts anti-apoptotic effect via activating the HIF-1 α /HO-1/VEGF signaling pathway in H9c2 rat ventricular cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 60(5): 474-482.
- [29] Jia S H, Zhang H, Li L, et al. Shogaol potentiates sevoflurane mediated neuroprotection against ischemia/reperfusion-induced brain injury via regulating apoptotic proteins and PI3K/Akt/mTOR/s6K signalling and HIF-1 α /HO-1 expression [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(9): 5002-5010.
- [30] Chen X, Wang C Y, Yang P, et al. Ube2s-stabilized β -catenin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating HIF-1 α signaling [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(7): 5716-5732.
- [31] Wang S Y, Shao X, Li X X, et al. HIF-1 α may provide only short-term protection against ischemia-reperfusion injury in Sprague-Dawley myocardial cultures [J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 4(4): 579-583.
- [32] Malhotra R, Tyson D W, Rosevear H M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2008, 8: 9.
- [33] Feng C C, Lin C C, Lai Y P, et al. Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1 α -IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP3 expression [J]. *Growth Factors*, 2016, 34(3/4): 73-86.
- [34] 李帅, 秦旭平. 血管新生的双向信号调控 [J]. *生命的化学*, 2020, 40(10): 1833-1839.
- Li S, Qin X P. The signaling pathway in the angiogenesis control [J]. *Chem Life*, 2020, 40(10): 1833-1839.
- [35] Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: New developments in an old debate [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(5): 696-703.
- [36] Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: New developments in an old debate [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(5): 696-703.
- [37] Lee J W, Ko J, Ju C, et al. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(6): 1-13.

[责任编辑 兰新新]