

推断 CA 使神经元细胞 MTT 染色吸光度显著增加的原因是药物增强了活细胞对染料的摄取。

综上所述,本实验证明了从白首乌 C_{21} 甾体总苷中分离得到的单体化合物 CA 具有确定的体内外抗肿瘤活性,并初步证实诱导凋亡是 CA 体外肿瘤细胞毒机制之一,但不是最主要机制。本实验研究了 CA 的体内外抗肿瘤作用及作用机制,同时也为 CA 作用机制的进一步研究提供了线索,为白首乌 C_{21} 甾体苷类抗肿瘤药物的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Lee M K, Yeo H, Kim J, et al. Protection of rat hepatocytes exposed to CCl_4 *in vitro* by cynandione A, a biacetophenone from *Cynanchum wilfordii* [J]. *Pharm Pharmacol*, 2000, 52(3): 341-345.
- [2] Lee M K, Yeo H, Kim J, et al. Cynandione A from *Cynan-*

chum wilfordii protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H_2O_2 , L-glutamate, and kainate [J]. *Neurosci Res*, 2000, 59(2): 259-264.

- [3] 张如松,叶益萍,刘玉兰. 白首乌甾体总苷的体外抗肿瘤作用 [J]. *中草药*, 2000, 31(8): 599-601.
- [4] 张如松,叶益萍,沈月毛,等. 白首乌体外抑制肿瘤细胞的成分研究 [J]. *药学报*, 2000, 35(6): 431-437.
- [5] 王冬艳,张洪泉,李心. 白首乌 C_{21} 甾体苷诱导肝癌细胞凋亡的作用及其机制 [J]. *药学报*, 2007, 42(4): 366-370.
- [6] 毕芳,陶文沂,陆震鸣. 白首乌提取物对小鼠肝癌细胞 H22 的抑制作用 [J]. *中药材*, 2007, 29(11): 1586-1590.
- [7] Zhang R S, Ye Y P, Shen Y M, et al. Two new cytotoxic C_{21} steroidal glucosides from the root of *Cynanchum auriculatum* [J]. *Tetrahedron*, 2000, 56(24): 3875-3879.
- [8] De C J, Candenias A, Lizasoain I, et al. Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation [J]. *Stroke*, 2002, 33(1): 261-267.

羟基红花黄色素 A 缓解大鼠心肌细胞凋亡作用的研究

金 鸣,董宁宁,吴 伟,李金荣,臧宝霞,童 静*

(首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所 药理研究室,北京 100029)

摘要:目的 以整体和离体实验观察羟基红花黄色素 A (HSYA) 缓解心肌细胞凋亡的作用。方法 以异丙肾上腺素 (ISO) 造成大鼠急性性心肌缺血,以 TUNEL 法检测心肌组织细胞凋亡,免疫组化法和 RT-PCR 法观察心肌组织中 bax、bcl-2 基因表达的变化;用缺氧/再复氧模型诱导原代培养心肌细胞凋亡,以 PI 流式细胞法观察凋亡情况,以 Rhodamine 123 荧光法考察线粒体膜电位的变化。结果 60、120、240 mg/kg HSYA ip 给药可以减轻心肌缺血大鼠的线粒体肿胀、核凝集及固缩,降低心肌细胞凋亡率 ($P < 0.01$),下调心肌组织 Bax 蛋白 ($P < 0.05$) 及 bax mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。0.64、1.3、2.5 mmol/L HSYA 可减少缺氧/再复氧造成的细胞凋亡 ($P < 0.05$),且可缓解该损伤造成的心肌线粒体膜电位下降 ($P < 0.05$)。结论 抑制心肌细胞凋亡是 HSYA 缓解心肌缺血的重要机制。

关键词:羟基红花黄色素 A (HSYA); 凋亡; 心肌缺血; 线粒体

中图分类号: R286.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)06-0924-07

Inhibition of hydroxysafflor yellow A against rat cardiomyocyte apoptosis

JIN Ming, DONG Ning-ning, WU Wei, LI Jin-rong, ZANG Bao-xia, TONG Jing

(Department of Pharmacology, Beijing Anzhen Hospital of Capital University of Medical Sciences-Beijing Institute of Heart, Lung, and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of hydroxysafflor yellow A (HSYA) against cardiomyocyte apoptosis. **Methods** Rat myocardial apoptosis was induced by ip isoproterenol (ISO) and then HSYA was ip given to alleviate the apoptosis. Rat neonatal cardiomyocyte apoptosis was triggered by oxygen/ glucose-deprivation/ reperfusion (OGDR) injury. Cardiac tissue was observed by transmission electron microscopy (TEM) and cardiac cell apoptosis was assayed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) staining. Bcl-2 and bax gene expression was observed by immunohistochemical staining and RT-PCR. The effect of HSYA to inhibit cardio myocyte apoptosis was assayed with the Flow Cyto Meter. Rhodamine 123 staining was used to measure the change of mitochondrial membrane potential. **Results** TEM showed that mitochondrion swelling and nucleus pyknosis were alleviated by

* 收稿日期:2008-10-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30171146); 北京市中医局科技资助项目 (JJ-2006-26)

作者简介:金 鸣(1957—),男,北京人,首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所药理研究室主任,研究员,医学博士,研究方向为中药红花活血化癥作用机制。Tel: (010) 64456308 E-mail: jinzang@public3.bta.net.cn

HSYA treatment. It was shown by TUNEL staining that 60, 120, or 240 mg/kg HSYA decreased the apoptosis rate of cardiomyocyte in rats with myocardial ischemia. In 120 mg/kg HSYA-treated rats, Bax expression was down-regulated compared with NS treated rats. In cultured OGD R cardiomyocytes, HSYA inhibited the decrease in mitochondrial membrane potential. **Conclusion** The mechanisms involved in the cardioprotective effect of HSYA are inhibition of cardiomyocyte apoptosis.

Key words: hydroxysafflor yellow A (HSYA); apoptosis; myocardial ischemia; mitochondrion

红花是菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,为常用活血化瘀中药,性温味辛,入心、肝经,具活血通经、化瘀止痛的功效,临床上以水煎液入药。红花含脂肪酸、黄酮、生物碱等多种成分,红花黄色素是红花的主要水溶性组分,为多种查耳酮类物质的混合物。羟基红花黄色素 A (hydroxy safflor yellow A, HSYA) 为一种查耳酮苷,是红花黄色素中的主要有效成分,其质量分数达生药干质量的 2%^[1],具有抗心肌缺血^[2]、抗凝^[3]、促内皮细胞增殖^[4,5]等心血管系统活性。心肌缺血可造成心肌细胞坏死和凋亡,细胞凋亡早期可表现为线粒体跨膜电位的下降,然后引发一系列凋亡的变化。细胞凋亡与相关基因关系密切,如 *c-myc*、*bax*、*bcl-2*、*P53* 和 *Fas* 等基因对调控细胞凋亡均有重要作用。据报道红花注射液可明显增加大鼠缺血再灌注心肌组织 *Bcl-2* 蛋白表达,降低 *Bax* 蛋白表达^[6];但红花的主要活血化瘀有效成分 HSYA 对缺血心肌细胞凋亡的影响以及对线粒体膜电位的作用均未见报道。本研究以整体和细胞实验从不同水平观察 HSYA 对心肌细胞凋亡的影响,以探讨 HSYA 缓解心肌缺血的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器:瑞典 Schiller 公司产 AT-6 型心电图机;美国 Biometra 产 PCR 扩增仪;UV755B 型紫外分光光度计;日本 Nikon 公司, ECLIPSE 80i 型显微镜。Image Pro Plus 5.0 图像分析系统。Sanyo 公司产 MCO175 型 CO₂ 培养箱;重庆光学仪器厂 XDS-1B 型倒置显微镜;美国 Coulter 公司, EDICS XL 型流式细胞仪;DMIRB + Q500IM LEICA 图像分析系统,德国 Leica 公司产品。

1.2 药品与试剂:HSYA 按大孔树脂-凝胶色谱法自行制备^[7],HPLC 面积归一化法测定其整体实验用 HSYA 质量分数均大于 92%,细胞实验所用 HSYA 质量分数大于 96%,调至 pH 7.4 后除菌滤过备用。盐酸异丙基肾上腺素 (ISO) 为上海大众药业有限公司产原料药;盐酸普萘洛尔 (Propranolol hydrochloride, PPL) 为天津力生制

药股份有限公司产品;1:250 胰蛋白酶,为 Amresco 公司分装;胎牛血清和 MOPS 为华美生物工程公司提供;低糖 DMEM 培养基为 Gibco 产品;高纯 CO₂ 及高纯 N₂ 为北京北氧联合气体有限公司生产;细胞培养瓶为 Corning 公司产品;Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品;DEPC 为 Genview 公司产品;dNTP 和 *r Taq* polymerase 为 Takara 公司产品;随机引物、DNA marker 和 M-MLV 为鼎国生物产品;即用型 SABC 试剂盒,兔抗 IgG (Bax, *Bcl-2*), DAB 显色试剂盒,细胞凋亡检测试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品;Rhodamine 123 为 Sigma 公司产品,以二甲基甲酰胺溶解为 1 mmol/L 使用; β -actin、*Bcl-2*、*Bax* 引物为上海生工生物工程技术有限公司合成,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物:雄性 Wistar 大鼠 200~250 g,北京维通利华公司清洁级动物,合格证号 SCXX (京) 2002-0003。乳鼠为北京安贞医院屏障级动物实验室以北京维通利华公司清洁级动物繁育,雌雄不限。

1.4 HSYA 对大鼠急性心肌缺血的影响

1.4.1 HSYA 缓解大鼠急性心肌缺血所致心肌细胞凋亡:实验动物随机分为 6 组,即对照组、心肌缺血模型组、PPL (4 mg/kg) 组、HSYA 高、中、低剂量 (240、120、60 mg/kg) 组。给药组实验过程:每日 1 次 ip HSYA 或 PPL 30 min 后, sc 10 mg/kg ISO,连续 3 d。第 3 天注射 HSYA 前 ip 20% 乌拉坦 1 g/kg 麻醉大鼠,注射 ISO 前 5 min 和注射后 5 min 分别记录各组动物 II 导心电图以观察是否形成心肌缺血。给予 ISO 后 4 h 腹主动脉取血约 2 mL,开胸迅速摘取心脏,用冷生理盐水冲净其表面血液后除去心尖大部分白色梗死区,留取梗死区边缘和非梗死区的心尖组织并分为 3 部分,第 1 部分以 4% 多聚甲醛固定 24 h 免疫组化染色备用;第 2 部分冷戊二醛固定用于制备电镜样品;第 3 部分剪碎后加入 Trizol Regent 匀浆后 -20℃ 保存以备提取 RNA。对照组以生理盐水 (NS) 代替 ISO 和药物溶液,其他处理均同模型组;模型组以 NS 代替 HSYA,其他处理均同给药组。

1.4.2 心肌组织电镜标本制备及观察:取心肌组织3%戊二醛固定,送中日友好医院电镜室超薄切片,透射电子显微镜下观察照相。

1.4.3 TUNEL 细胞凋亡检测:进行依赖核酸内切酶的末端脱氧核糖核苷酸转移酶(TdT)介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL),取心肌组织4%多聚甲醛固定24 h后脱水包埋制成石蜡切片,然后脱蜡再水合,再以微波加热至枸橼酸修复液沸腾,20 mg/L蛋白酶K 37℃消化5 min,滴加3% H₂O₂反应10 min,再用末端脱氧核糖核苷酸转移酶和地高辛标记的抗地高辛抗体反应混合液进行标记37℃,2 h,加转化物过氧化物酶(Peroxidase, POD)于样本上37℃保温60 min, PBS浸泡2次,每次3 min,样本加POD底物二氨基联苯胺DAB进行显色。最后用苏木素复染,中性树脂封片,倒置显微镜下镜检,阳性细胞可见棕黄色深染细胞核。在高倍镜下选取10个视野,用图像分析软件计算呈阳性细胞数占细胞总数的平均百分率,进行组间比较。

1.4.4 免疫组织化学染色法检测凋亡相关基因Bax、Bcl-2蛋白的表达:取心肌组织4%多聚甲醛固定后,石蜡包埋,切片常规脱蜡,滴加3% H₂O₂,微波加热修复抗原。滴加Bax、Bcl-2一抗(1:200,兔IgG),37℃保温1 h,再滴加生物素化山羊抗兔IgG,37℃保温20 min,滴加链霉亲和素,加底物二氨基联苯胺DAB显色。最后用苏木素复染,中性树脂封片,倒置显微镜下镜检,阳性细胞细胞质被染成棕黄色。在高倍镜下选取10个视野,用图像分析软件计算呈阳性反应的细胞的积分吸光度值,进行组间比较。

1.4.5 Trizol 试剂一步法提取总RNA:心肌组织每5~10 mg加入1 mL Trizol 试剂匀浆,置于1.5 mL离心管内,加入200 μL氯仿振荡,4℃、12 000 ×g离心15 min,取上清液加入0.5 mL异丙醇沉淀,4℃、12 000 ×g离心沉淀15 min,75%乙醇洗1次,0.1% DEPC-H₂O溶解RNA,然后测样品A₂₆₀/A₂₈₀,计算RNA浓度;甲醛变性电泳观察RNA的完整性。

1.4.6 凋亡相关基因bcl-2及bax mRNA表达量的检测:反转录反应:7~8 μL RNA 70℃、10 min,冰浴,加入随机引物2 μL,10 mmol/L dNTP 2 μL,5×反转录缓冲液8 μL, M-MLV 50 U, H₂O补足至总体积40 μL,37℃、5 min,95℃、5 min,得到反转录产物。PCR反应:选取以bcl-2、bax为目的基因的适宜引物(见表1),以β-actin为内对照,进行半

定量PCR反应。体系:反转录产物5~7 μL,10×PCR缓冲液2.5 μL,dNTP 10 mmol/L 2 μL,引物25 pmol, rTaq 1 U, H₂O补足至总体积25 μL。首次循环先在94℃变性5 min,变性、退火、延伸分别为94℃、45 s,56℃、45 s,72℃、45 s,共25个循环。聚合酶链反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并以β-actin为对照,电泳条带经灰度扫描后计算并比较各组bcl-2及bax的相对表达量。

表1 bcl-2及bax引物序列

Table 1 Sequence of primers of bcl-2 and bax

基因	引物序列	片段长度/bp
β-actin	正向:5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'	540
	反向:5'-CAACGTGACACTTCAATGATGG-3'	
bcl-2	正向:5'-TCCATTATAAGCTGTCACAG-3'	350
	反向:5'-GAAAGATTCTCTCCACCAAG-3'	
bax	正向:5'-GCAAGGATGATGTGTGATG-3'	354
	反向:5'-CTCAGCCCATCTTCTTCCAG-3'	

1.5 HSYA对乳鼠心肌细胞的影响:

1.5.1 乳鼠心肌细胞的原代培养:1~3日龄Wistar大鼠乳鼠,无菌条件下剪取心室肌,含糖PBS(Na₂HPO₄ 4.3 mmol/L、NaCl 137 mmol/L、KCl 2.7 mmol/L、KH₂PO₄ 1.4 mmol/L、葡萄糖5.6 mmol/L, pH 7.4)洗去血迹剪碎后加入0.25%胰酶消化液37℃水浴振荡1 h,吸出细胞悬液后再加入半量消化液继续消化0.5 h,合并两次的细胞悬液200目细胞筛滤过,78 ×g离心8 min弃上清,加入含15%胎牛血清及2 000 IU/L青霉素的低糖DMEM培养液,放入37℃、5% CO₂的培养箱中差速贴壁1.5~2 h。调整细胞数量为3×10⁵/L,接种至25 cm²培养瓶,放入37℃、5% CO₂的培养箱中培养,2~3 d换培养液1次,在显微镜下观察细胞贴壁生长情况及搏动情况。

1.5.2 HSYA缓解乳鼠心肌细胞缺糖缺氧再复氧损伤:HSYA+缺糖缺氧/再复氧组:取乳鼠心肌原代培养细胞,以预先用高纯N₂(99.9%)饱和无糖台氏液(NaCl 137 mmol/L、KCl 2.7 mmol/L、CaCl₂ 1.8 mmol/L、MgCl₂ 0.49 mmol/L、NaH₂PO₄ 0.42 mmol/L、NaHCO₃ 11.9 mmol/L)置换正常培养液后,加入HSYA(总体积不到10 μL),于培养瓶中通入高纯N₂30 s,盖紧培养瓶盖,37℃缺氧放置3 h,而后以含有与缺氧反应时相同剂量HSYA的含糖台氏液(无糖台氏液+葡萄糖11.1 mmol/L)置换前述含HSYA的无糖台氏液,旋开培养瓶盖,置37℃空气浴复氧20 h即完成反应。缺糖缺氧/再复氧组:实验过程中不加HSYA,其余均同

HSYA + 缺糖缺氧/再复氧组。对照组:以不含 HSYA 的含糖台氏液代替无糖台氏液,且不通 N_2 , 其余均同 HSYA + 缺糖缺氧/再复氧组。上述实验结束后取心肌细胞进行各项检测。

1.5.3 PI 染色流式细胞术检测心肌细胞凋亡比率:取缺糖缺氧/再复氧处理的心肌细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁和长的心肌细胞, PBS 洗涤, $80 \times g$ 离心 5 min 去上清,加入预冷的 70% 乙醇混匀固定后 PBS 重悬,再加入终质量浓度为 25 mg/L 的 RNase 去除 RNA,加终质量浓度 50 mg/L 的 PI 染色 $37^\circ C$, 30 min, 过 300 目筛后以流式细胞仪 ($\lambda_e 488 \text{ nm}/\lambda_m 525 \text{ nm}$) 检测。 G_1 峰前的亚二倍体峰即为凋亡峰,峰面积的变化反映心肌细胞凋亡百分率的变化。

1.5.4 线粒体跨膜电位检测:取缺糖缺氧/再复氧处理的心肌细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁生长的心肌细胞, PBS 洗涤,用 PBS 调整至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 加入荧光探针 Rhodamine 123 使终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$, $37^\circ C$ 孵育 30 min, $80 \times g$ 离心 5 min 去上清, PBS 洗涤沉淀, $80 \times g$ 离心 5 min 去上清,加入 PBS 重新悬浮细胞。设激发波长 450 nm,发射波长 520 nm,以流式细胞仪检测 Rhodamine 123 嵌入线粒体膜后荧光强度变化以反映线粒体膜电位的变化。以线粒体膜电位比值 ($VR = \text{样品线粒体膜电位}/\text{对照组线粒体膜电位}$) 较客观地反映线粒体膜电位的变化。膜电位数据均为 3 次平行实验的均值。

1.6 统计学方法:应用 SPSS 10.0 软件包,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本的比较采用单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 HSYA 对缺血损伤大鼠心肌组织超微结构的影响:本实验动物处死前记录 II 导联心电图的结果表明,第 3 天注射 ISO 后 5 min 心肌缺血组动物 ST 抬高为 $(0.12 \pm 0.14) \text{ mV}$,明显高于对照组的 $(0.00 \pm 0.00) \text{ mV}$ ($P < 0.001$),提示大鼠已形成心肌缺血。图 1 结果表明,正常大鼠的心肌纤维排列整齐,肌丝和肌小节结构清晰,线粒体形状大小均匀;心肌缺血模型组大鼠则可见心肌细胞明显肿胀,心肌纤维异常收缩,排列紊乱,肌丝、肌节溶解破坏,胞核周边凝集,线粒体肿胀,出现空泡,嵴融合;PPL 组大鼠可见心肌肌丝偶断,线粒体和肌纤维排列较整齐,核较完整;60 mg/kg HSYA 组心肌部分肌丝断裂,线粒体排列欠整齐,部分肿胀,稍好于心肌缺血模型组;120 mg/kg HSYA 组心肌肌丝排列欠整

齐,部分肌丝断裂,线粒体排列欠整齐,轻微肿胀,但明显好于心肌缺血模型组;240 mg/kg HSYA 组心肌肌丝排列整齐,线粒体排列较整齐,轻微肿胀,核完整。表明 HSYA 可抑制 ISO 诱导的大鼠心肌缺血所致细胞超微结构改变,进而可能起到保护心肌生理功能的作用。

2.2 HSYA 对细胞凋亡 TUNEL 染色的影响:图 2 所示,以 TUNEL 染色法观察 HSYA 对心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响,对照组心肌组织排列整齐,细胞核蓝染,核质均匀。而心肌缺血模型组细胞核黄染较多,且有的细胞核出现空泡或核固缩。HSYA 组和 PPL 组心肌组织排列并不似对照组那样整齐,但细胞核黄染较心肌缺血模型组明显减少,且核质较均匀。经 TUNEL 染色所显示的凋亡比率结果可见,心肌缺血模型组凋亡比率较对照组明显增高 ($P < 0.01$),而 HSYA 组和 PPL 组较心肌缺血模型组凋亡比率明显降低,见表 2。

2.3 HSYA 对心肌组织中凋亡相关基因 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响:由表 2 结果可见,心肌缺血模型组 Bax 的表达量较对照组明显提高 ($P < 0.01$),而 HSYA 组和 PPL 组 Bax 表达量则较心肌缺血模型组有降低趋势,特别是 120 mg/kg HSYA 组明显降低。与对照组比较,其余各组的 Bcl-2 表达量均见升高趋势,HSYA 组和 PPL 组 Bcl-2 表达量较心肌缺血模型组有增高趋势,但无统计学意义。

2.4 HSYA 对心肌组织 bcl-2 及 bax mRNA 表达量的影响:由表 3 结果可见,心肌缺血模型组 bax mRNA 的表达量较对照组明显升高 ($P < 0.01$),而 HSYA 组和 PPL 组较心肌缺血模型组 bax mRNA 表达量降低,且 HSYA 120、240 mg/kg 及 PPL 4 mg/kg 组的差异有统计学意义。与对照组比较,其余各组的 bcl-2 表达量均见升高,且 HSYA 组较心肌缺血模型 bcl-2 表达量有升高趋势,但无统计学意义。

2.5 HSYA 对缺糖缺氧/再复氧损伤心肌细胞凋亡比率与线粒体跨膜电位的作用:表 4 结果可见,缺糖缺氧/再复氧使心肌细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$),HSYA 可明显抑制缺糖缺氧/复氧所致心肌细胞凋亡 ($P < 0.05, 0.01$)。对照组心肌细胞膜电位较高,经缺糖缺氧/再复氧损伤后的心肌细胞膜电位降低,提示线粒体膜出现去极化。不同剂量的 HSYA 组膜电位降低情况均有明显缓解,提示 HSYA 可缓解线粒体膜电位的下降。

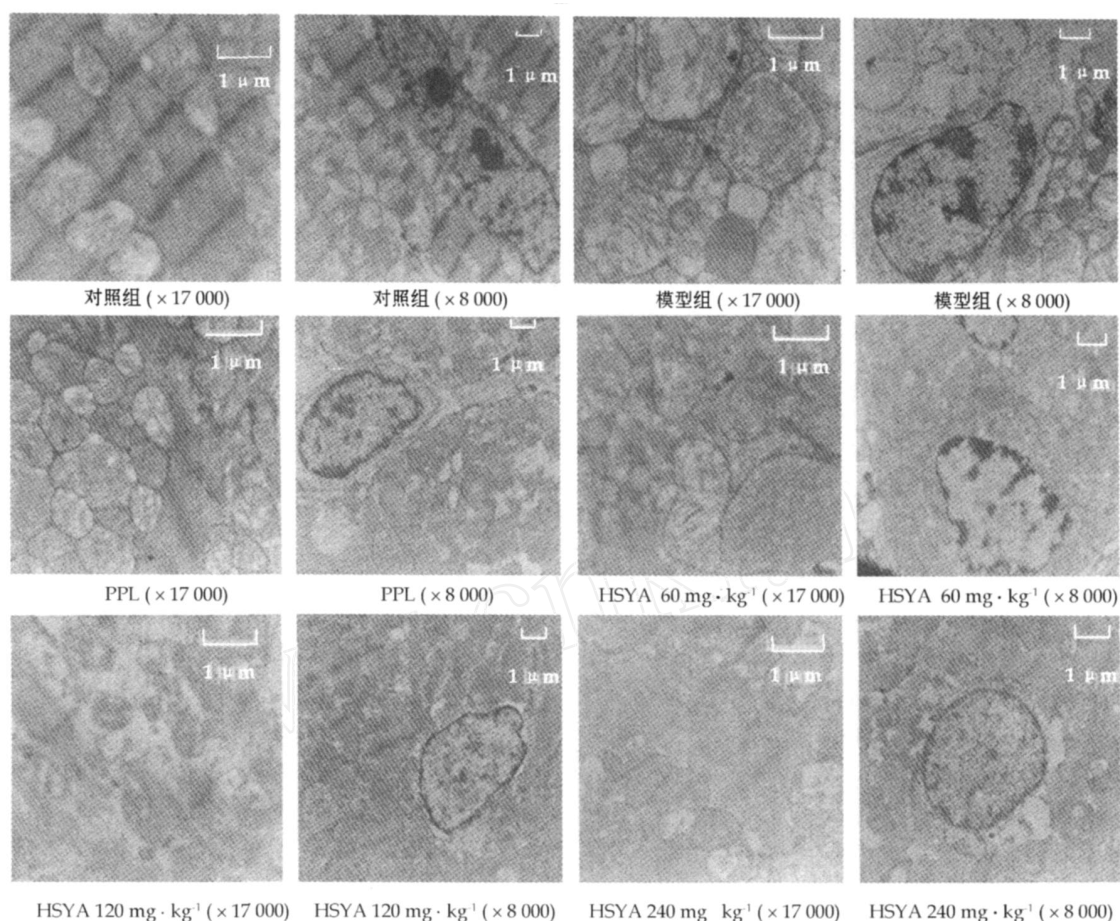


图1 HSYA对心肌缺血大鼠心肌超微结构的影响

Fig. 1 Effect of HSYA on ultra structure of myocardium in rat with myocardial ischemia

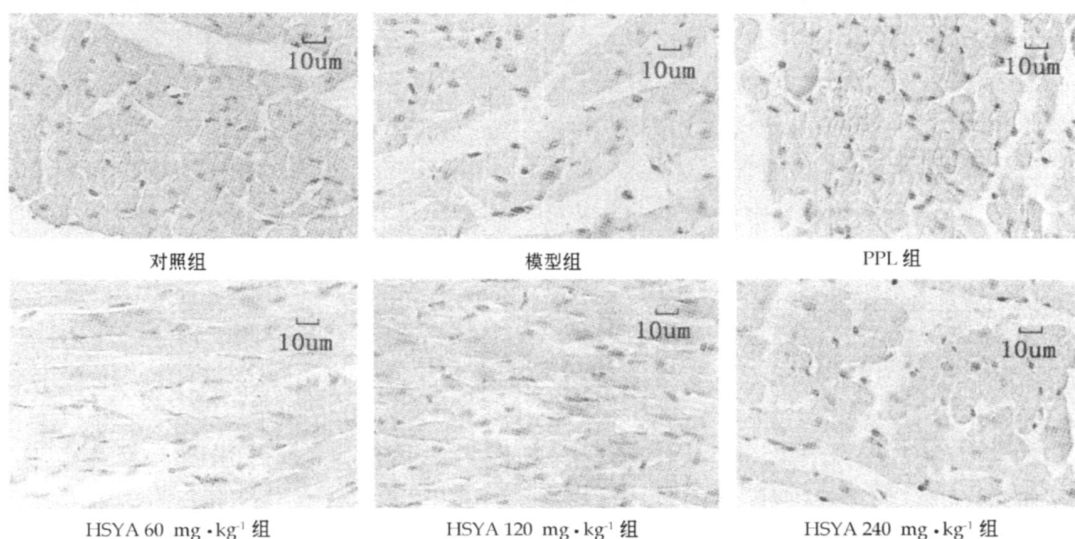


图2 HSYA对心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of HSYA on cardiomyocyte apoptosis in rat with myocardial ischemia

3 讨论

细胞中存在着促细胞凋亡基因、抑制细胞凋亡基因和细胞凋亡过程中表达的基因,其综合作用调控着细胞凋亡的过程。Bcl-2 基因家族是调节细胞

凋亡的主要基因家族,现已发现的成员有 Bcl-2、Bcl-X1、Bcl-Xs、Bax 及 Mcl-1 等。其中 Bax 蛋白可通过孔道形成增加线粒体外膜通透性促进凋亡,而 Bcl-2 则可与 Bax 结合抑制其作用而缓解凋亡。线

表 2 HSYA 对心肌缺血大鼠心肌 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达及 TUNEL 着色细胞阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of HSYA on Bax and Bcl-2 protein expression in myocardium and TUNEL positive rate of rats with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Bax	Bcl-2	TUNEL 阳性细胞/%
对照	-	80.093 ± 6.740	76.278 ± 4.711	0.49 ± 0.24
模型	-	135.609 ± 28.846 $\Delta\Delta$	112.561 ± 21.405 $\Delta\Delta$	4.36 ± 2.00 $\Delta\Delta$
HSYA	60	108.632 ± 12.149	109.134 ± 9.510	0.21 ± 0.10 ^{**}
	120	117.380 ± 21.641 [*]	113.083 ± 16.485	0.38 ± 0.20 ^{**}
	240	122.902 ± 18.642	123.353 ± 9.567	0.75 ± 0.26 ^{**}
PPL	4	115.397 ± 22.266	126.211 ± 7.317	0.66 ± 0.43 ^{**}

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 3 HSYA 对心肌缺血大鼠心肌 bax 和 bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 3 Effect of HSYA on bax and bcl-2 mRNA expression in myocardium of rats with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	bax/ β -actin	bcl-2/ β -actin
对照	-	0.80 ± 0.49	0.38 ± 0.21
模型	-	1.86 ± 0.21 $\Delta\Delta$	0.55 ± 0.40
HSYA	60	1.59 ± 0.53	0.56 ± 0.61
	120	1.34 ± 0.18 ^{**}	0.77 ± 0.47
	240	1.33 ± 0.21 ^{**}	0.98 ± 0.49
PPL	4	1.35 ± 0.26 ^{**}	0.52 ± 0.40

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 4 HSYA 对缺氧缺血/再复氧损伤心肌细胞凋亡率及线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of HSYA on apoptosis rate and mitochondrion membrane potential of cardiomyocytes injured by oxygen-glucose deprivation/ reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	C/(mmol·L ⁻¹)	凋亡率/%	VR
对照	-	3.94 ± 1.66	1.000 ± 0.078
缺氧缺血/再复氧	-	7.53 ± 2.55 $\Delta\Delta$	0.785 ± 0.046 $\Delta\Delta$
HSYA	0.64	3.51 ± 1.55 ^{**}	0.890 ± 0.117
	1.3	3.73 ± 1.44 ^{**}	0.971 ± 0.127 [*]
	2.5	4.81 ± 1.73 [*]	0.969 ± 0.155 [*]

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$;

与缺氧缺血/再复氧组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs oxygen-glucose deprivation/ reperfusion group

粒体与细胞凋亡的关系是目前研究的热点,而众多因子引起线粒体膜通透性的增高为引发细胞凋亡的重要环节。线粒体内膜的低通透性和离子浓度梯度的存在是维持跨膜电位的基础。跨膜电位下降为细

胞凋亡的早期变化,许多诱导剂引发细胞凋亡时均可见线粒体膜电位的下降,一旦线粒体跨膜电位崩溃,则细胞凋亡不可逆转。线粒体被激活时,膜通透性增加,膜电位下降,细胞色素 C、Smac (second mitochondria-derived activator of caspase)、凋亡诱导因子和核酸内切酶 G 等细胞凋亡蛋白释放到胞质中,细胞色素 C 迅速与 Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor 1) 结合,引起 caspase-9 的活化,紧接着 caspase-3、caspase-6、caspase-7 被激活,导致细胞凋亡。线粒体释放的 Smac 等因子可以通过去除凋亡蛋白抑制剂直接活化效应器 caspase, AIF 转移至胞核迅速引起染色质凝聚,而核酸内切酶 G 可以通过切割染色质 DNA 引起 DNA 的断裂,这些作用都诱发了细胞的凋亡^[8,9]。Rh123 是一种亲脂性阳离子荧光染料,可结合到线粒体基质,其荧光的增强或减弱可反映线粒体内膜电位的变化。本实验结果表明,正常心肌细胞线粒体膜电位较高,缺氧缺血再复氧损伤后线粒体膜电位减低,不同剂量的 HSYA 组膜电位下降均有明显缓解,提示保护线粒体、改善能量代谢可能为 HSYA 缓解心肌细胞缺血所诱导的凋亡的重要机制。另外发现 HSYA 可抑制 ISO 造成的心肌缺血模型大鼠心肌组织 bax mRNA 表达量的增加,提示 HSYA 可通过影响凋亡相关基因的表达变化缓解心肌缺血导致的心肌细胞凋亡。

ISO 是 β 受体激动剂,其诱发的大鼠急性心肌缺血与 β 肾上腺素受体激动、促进心肌收缩和耗氧量增加有关。本研究 TUNEL 染色结果表明,HSYA 处理组和 PPL 处理组较心肌缺血组凋亡比率明显降低,提示 HSYA 可缓解 ISO 引起心肌缺血所诱导的心肌细胞凋亡。本实验结果表明,HSYA 和 PPL 均可减轻 ISO 所造成的心肌细胞排列紊乱和线粒体肿胀,而 PPL 为 β 受体阻滞剂,且发现 HSYA 具 β 受体拮抗作用^[10],提示 HSYA 可通过拮抗 β 受体减轻心肌细胞损伤,这可能也是其缓解 ISO 所致心肌缺血的机制之一。

红花黄色素作为治疗冠心病心肌缺血的药物已经上市,虽然目前对于其缓解心肌缺血的研究已有不少报道,但由于中药的复杂性,对于红花黄色素中各种成分的作用机制还应该进行更细致的研究。多组分多靶点的协同作用是中药作用的特点,从各个角度深入分析研究中药有效成分的作用机制并对其进行综合分析,对于指导临床用药,对于发展中医理论,具有重要的理论与现实意义。

参考文献:

- [1] 杨日丽, 刘 静. HPLC法测定红花中羟基红花黄色素A含量的研究[J]. 广东化工, 2007, 34(7): 112-114.
- [2] 王 天, 傅风华, 韩 冰, 等. 羟基红花黄色素A对实验性心肌梗死大鼠的保护作用及机制[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1853-1856.
- [3] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 羟基红花黄色素A抗凝作用研究[J]. 中草药, 2007, 38(5): 741-743.
- [4] 张 岭, 宋 艳, 李长龄, 等. 羟基红花黄色素A对常氧/低氧犬胸主动脉内皮细胞增殖的影响[J]. 中草药, 2008, 39(1): 90-93.
- [5] 张 岭, 宋 艳, 李长龄, 等. 羟基红花黄色素A促内皮细胞增殖的机制研究[J]. 中草药, 2008, 39(3): 403-408.
- [6] 明章根, 蒋建刚, 刘复兴. 红花注射液对大鼠缺血再灌注心肌组织 Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响[J]. 咸宁医学院学报, 2002, 16(2): 81-84.
- [7] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 大孔树脂-凝胶层析法大规模制备纯品羟基红花黄色素A[J]. 心肺血管病杂志, 2008, 27(6): 363-365.
- [8] Rupinder S K, Gurpreet A K, Manjeet S. Cell suicide and caspases[J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 46(6): 383-393.
- [9] Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death[J]. *Drug Metab Rev*, 2007, 39(2-3): 443-455.
- [10] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 红花黄色素及羟基红花黄色素A对 Pindolol- β 受体结合力的影响[J]. 心肺血管病杂志, 2008, 27(5): 301-303.

梔子和地黄环烯醚萜类成分抗炎作用的虚拟评价

邢 洁^{1,2}, 徐为人^{2*}, 刘 鹏², 刘冰妮², 符海霞^{1,2}, 刘 巍², 王玉丽², 汤立达³

- (1. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070; 2. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193;
3. 天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 研究理论评价方法的合理性,对梔子和地黄内所含的环烯醚萜类化合物的抗炎作用可能机制进行虚拟评价。方法 选择炎症相关的 39 个受体晶体结构,利用 Schrödinger 软件计算小分子、受体活性位点的描述指标和对接结果,考察对接得分中的非特异成分。结果 配体的非特异得分与其分子特征描述符存在明显的相关性,主要包括 $chilv_C$ 、 $PEOE_VSA-5$ 、 $SlogP_VSA3$ 、 $SlogP_VSA5$ 4 个指标。分子经过评价后发现代号为 M7、M9、M11 的环烯醚萜类化合物与抗炎类受体双特异性促分裂原活化蛋白激酶的结合较好。结论 阐明了分子特征描述符与非特异性得分的相关性模型,提出了选择性作用的分级评价标准,揭示了部分环烯醚萜类成分可能的机制。

关键词: 梔子; 地黄; 环烯醚萜类; 抗炎作用; 虚拟评价; 非特异性评分

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)06-0930-06

Virtual evaluation on anti-inflammatory activity of iridoids from cape jasmine fruit and adhesive rehmannia root

XING Jie^{1,2}, XU Wei-ren², LIU Peng², LIU Bing-ni², Fu Hai-xia^{1,2}, LIU Wei²,
WANG Yu-li², TANG Li-da³

- (1. School of Fundamental Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China;
3. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To improve the theoretical evaluation method and elucidate the anti-inflammatory mechanisms of iridoids from adhesive rehmannia root and cape jasmine fruit. **Methods** Thirty-nine crystal structures of proteins related inflammation were used as the receptors for calculation. The descriptors for active site of receptors and molecules were calculated by Schrödinger software package. The docking calculation was carried out with Glide standard method and score. **Results** The no-specific score of ligand obviously correlated with molecular descriptors, including $chilv_C$, $PEOE_VES-5$, $SlogP_VSA3$, and $SlogP_VSA5$. After virtual evaluation, M7, M9, and M11 of iridoids were found to have a potential binding ability with dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase. **Conclusion** The no-specific score could be predicted with the related model of molecular descriptors. With the improved grading standards, the possible anti-inflammatory mechanism of iridoids could be discovered.

* 收稿日期: 2008-12-17

基金项目: 科技部支撑项目 (2007BA141B01); 天津市支撑项目 (07ZCKFSH00300)

作者简介: 邢 洁, 女, 内蒙古人, 硕士研究生, 研究方向为新药设计和筛选。E-mail: xingyaojun@163.com

* 通讯作者 徐为人 Tel: (022) 23003529 E-mail: xwrtj@yahoo.com.cn