

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.010

山茱萸莫罗昔经 Bcl-2/Bax 通路抗 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤研究

邱清勇¹, 彭 锦¹, 陈 丽¹, 吕 秋¹, 符碧薇^{2△}

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九二八医院心血管内科, 海南 海口 570206; 2. 海南医学院基础医学与生命科学学院, 海南 海口 571199)

摘要:目的 探讨山茱萸莫罗昔经 Bcl-2/Bax 信号通路抗 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤作用。方法 体外培养 H9c2 细胞进行实验, 阴性对照组(A组)加入无血清 DMEM 培养基; 阳性对照组(B组)加入终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 ; 莫罗昔低、中、高剂量组(C_1 组、 C_2 组、 C_3 组)分别加入终质量浓度为 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的山茱萸莫罗昔, 同时给予终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 , 继续培养 24 h 后, 检测 H9c2 细胞增殖和凋亡情况, 同时检测 H9c2 细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、细胞色素 c(Cyt-c)和半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)水平。结果 与 A 组相比, B 组和 C_1 组、 C_2 组、 C_3 组 H9c2 细胞增殖率和 SOD, GSHPx, Bcl-2 水平降低, H9c2 细胞凋亡率和 ROS, MDA, Bax, Cyt-c, Caspase-3 水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 B 组相比, C_1 组、 C_2 组、 C_3 组 H9c2 细胞增殖率和 SOD, GSHPx, Bcl-2 水平升高, H9c2 细胞凋亡率和 ROS, MDA, Bax, Cyt-c, Caspase-3 水平降低, C_1 组、 C_2 组、 C_3 组呈剂量依赖性, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 山茱萸莫罗昔可通过 Bcl-2/Bax 信号通路发挥 H9c2 心肌细胞抗氧化和抗凋亡作用, 可防护 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤。

关键词: 山茱萸莫罗昔; Bcl-2/Bax 信号通路; H9c2 心肌细胞; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)17-0039-05

Anti-Oxidative Stress Effect of *Cornus Officinalis* Morroniside on H9c2 Cardiomyocytes via Bcl-2/Bax Signaling Pathway

QIU Qingyong¹, PENG Jin¹, CHEN Li¹, LYU Qiu¹, FU Biwei²

(1. Department of Cardiovascular Medicine, No. 928 Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Haikou, Hainan, China 570206; 2. School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 571199)

Abstract: Objective To investigate the anti-oxidative stress effect of *Cornus officinalis* morroniside on H9c2 cardiomyocytes via Bcl-2/Bax signaling pathway. **Methods** H9c2 cells were cultured *in vitro*. Serum-free DMEM medium was added to the negative control group (group A). H_2O_2 with final concentration of 200 $\mu\text{mol/L}$ was added to the positive control group (group B). The *Cornus officinalis* morroniside with final concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ were added to the low-dose group (group C_1), the middle dose group (group C_2) and the high-dose group (group C_3) respectively; meanwhile, H_2O_2 with a final concentration of 200 $\mu\text{mol/L}$ was given. After 24 h of continuous culture, the proliferation and apoptosis of H9c2 cells were detected. Simultaneous detection of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx), malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS), B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) in H9c2 cells, Bcl-2 related X protein (Bax), cytochrome C (Cyt-c) and cysteine aspartate proteolytic enzyme 3 (Caspase-3) levels of cysteine was conducted. **Results** Compared with group A, H9c2 cell proliferation rate and SOD, GSHPx, Bcl-2 levels in groups B, C_1 , C_2 , and C_3 , and the apoptosis rate of H9c2 cells and ROS, MDA, Bax, Cyt-c, Caspase-3 level significantly increased ($P < 0.05$); compared with group B, H9c2 cell proliferation rate and SOD, GSHPx, Bcl-2 levels significantly increased in groups C_1 , C_2 , and C_3 , and H9c2 cell apoptosis increased. The mortality rate and the levels of ROS, MDA, Bax, Cyt-c, and Caspase-3 decreased; groups C_1 , C_2 , and C_3 were dose-dependent, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Through the Bcl-2/Bax signaling pathway, *Cornus officinalis* morroniside can play the role of anti-oxidation and anti-apoptosis of H9c2 cardiomyocytes, which has the potential to treat oxidative stress injury induced by H_2O_2 .

Key words: *Cornus officinalis* morroniside; Bcl-2/Bax signaling pathway; H9c2 cardiomyocytes; oxidative stress; apoptosis

氧化应激在心力衰竭、心肌缺血-再灌注损伤、心肌病、动脉粥样硬化、房颤等多种心血管疾病的发病机制中起着至关重要的作用^[1-2]。氧化应激导致活性氧(ROS)的过量产生,是心血管疾病发生的重要因素^[3]。过量的 ROS 不仅可导致心肌细胞氧化-抗氧化平衡系

统失衡,且会导致细胞凋亡^[4-5]。因此,减轻氧化应激和/或直接干预凋亡途径的抑制可为治疗提供潜在的分子靶标^[6]。山茱萸是落叶小乔木山茱萸树上的红色果肉,有非特异性免疫增强功能及抗氧化和抗炎作用^[7]。山茱萸提取物通过改善氧自由基的清除能力和抑制膜的

第一作者:邱清勇,男,大学本科,主治医师,研究方向为心肌细胞氧化应激损伤,(电子信箱)qqy0928@163.com。

[△]通信作者:符碧薇,女,大学本科,实验师,研究方向为基础医学和细胞生物学,(电子信箱)fubiwei3640@163.com。

氧化损伤而对心肌细胞有明显的保护作用^[8]。山茱萸莫罗苷是山茱萸提取物的主要成分之一,是一种良好的抗氧化剂^[9]。本研究中考察了山茱萸莫罗苷通过调节 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)/Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)信号通路发挥 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤的防护作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:CO₂ 培养箱(美国 Thermo Revco 公司);Sunrise 型全自动酶标仪(瑞士 Tecan 公司);BD 垂直电泳仪、BD FACSCanto 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

试剂:山茱萸莫罗苷(上海医科大学天然药物化学教研室,批号为 131035,质量分数大于 98%);30% H₂O₂(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号为 KGF009);改良杜氏伊格尔培养基(DMEM,批号为 C11965500BT);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号为 25200056);四氮唑(MTT,美国 Amresco 公司,批号为 M8180-1);ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号为 CA1020);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx)和丙二醛(MDA)检测试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所(批号分别为 A003-1-2,A001-3-2,E004-1-1);2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA,美国 Sigma 公司,批号为 ml063160);蛋白抽提试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号为 AR0103);Bcl-2、Bax、细胞色素 c(Cyt-c)、半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)和 β-actin 抗体,均购自美国 Santa Cruz 公司(批号分别为 SC-5248,SC-393813,SC-5482,SC-6284,SC-7518);辣根过氧化物酶 HRP 标记亲和纯化山羊抗小鼠 IgG 二抗(武汉艾美捷科技有限公司,批号为 C1313)。

细胞:H9c2 大鼠心肌细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,批号为 131035)。

1.2 细胞培养和分组

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃ 及 5% CO₂ 条件下培养 H9c2 细胞,选择对数生长期细胞进行试验。分为阴性对照组(A 组)、阳性对照组(B 组)、莫罗苷低、中、高剂量组(C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组)。A 组加入无血清 DMEM 培养基;B 组加入终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂;C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组分别加入终质量浓度为 25,50,100 μg/mL 的山茱萸莫罗苷,同时给予终浓度为 200 μmol/L 的 H₂O₂,继续培养 24 h 后进行相关检测^[10-11]。

1.3 检测细胞增殖率

以 5 × 10³/孔接种于 96 孔板中(每孔 200 μL),待细胞融合后,按 1.2 项下方法给予受试物干预 20 h,继续培养 20 h,每孔加入 MTT 50 μL,继续培养 4 h,轻轻

吸取上清液,加入二甲基亚砜(DMSO,每孔 200 μL),室温振荡 10 min,采用酶标仪于 492 nm 波长处测定吸光度(OD 值),计算细胞增殖率[细胞增殖率 = (OD_{实验组} - OD_{空白孔})/(OD_{阴性对照组} - OD_{空白孔})]。

1.4 检测细胞凋亡情况

以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板内(每孔 3 mL),待细胞融合后,按 1.2 项下方法给予受试物干预 24 h,转移至离心管内离心,用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,加入膜联蛋白 V-FITC 和 PI,并将细胞在室温下避光孵育 10 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 检测 SOD,GSHPx,MDA 和 ROS 水平

以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板内(每孔 3 mL),待细胞融合后,按 1.2 项下方法给予受试物干预 24 h,收集细胞,3 000 g 离心 10 min,弃培养基,加入 2 mL 磷酸盐缓冲液,用细胞超声破碎仪处理 30 s,12 000 g 离心 10 min,收集上清液,按试剂盒说明书检测细胞中 SOD,GSHPx,MDA 活性;采用 DCFH-DA 探针联合酶标仪法检测细胞内 ROS 水平,按 1.2 项下方法给予受试物干预 24 h,弃培养基,分别加入 DCFH-DA(每孔 10 μmol/L),在 37℃ 下孵育 60 min,采用流式细胞仪检测 ROS 表达水平。

1.6 检测 Bcl-2,Bax,Cyt-c 和 Caspase-3 水平

以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板内(每孔 3 mL),待细胞融合后,按 1.2 项下方法给予受试物干预 24 h,收集细胞,3 000 g 离心 10 min 弃培养基,根据细胞量加入细胞蛋白抽提液,SDS-PAGE 进行电泳,每孔上样量为 20 μg,将印迹转移到聚偏氟乙烯膜上,用 5% 脱脂牛奶在室温下封膜 1 h,将膜与 Bcl-2(1:200)、Bax(1:500)、Cyt-c(1:300)、Caspase-3(1:200)和 β-actin(1:1 000)抗体进行孵育,4℃ 过夜,将二抗(1:5 000)在室温下孵育 30 min,进行显色,采集图像,通过 Image Lab™ 软件(Bio-Rad)获取信号,并估计强度,以 β-actin 作为内对照。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件分析。试验结果采用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),用单因素方差分析进行判断,组间两两比较用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 H9c2 细胞增殖和细胞凋亡的影响

与 A 组相比,B 组和 C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组 H9c2 细胞增殖率降低,H9c2 细胞凋亡率增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 B 组相比,C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组 H9c2 细胞增殖率增加,H9c2 细胞凋亡率降低,且呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 1 和图 1。

2.2 对 ROS 水平的影响

与 A 组相比,B 组、C₁ 组、C₂ 组、C₃ 组 H9c2 细胞中

表1 山茱萸莫罗苕对H9c2细胞增殖和凋亡情况及ROS水平的影响($\bar{X} \pm s, \%$)

组别	细胞增殖率	细胞凋亡率	ROS
A组	100.00 ± 6.28	0.12 ± 0.05	34.89 ± 5.29
B组	51.07 ± 7.12 ^a	4.59 ± 0.63 ^a	79.25 ± 10.81 ^a
C ₁ 组	64.28 ± 13.50 ^{ab}	3.52 ± 0.51 ^{ab}	64.82 ± 7.08 ^{ab}
C ₂ 组	76.26 ± 6.93 ^{abc}	2.41 ± 0.40 ^{abc}	56.27 ± 8.24 ^{abc}
C ₃ 组	84.73 ± 11.27 ^{abcd}	1.50 ± 0.37 ^{abcd}	42.18 ± 5.61 ^{abcd}

注:与A组比较,^a $P < 0.05$;与B组比较,^b $P < 0.05$;与C₁组比较,^c $P < 0.05$;与C₂组比较,^d $P < 0.05$ 。下表同。

ROS水平增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与B组相比,C₁组、C₂组、C₃组H9c2细胞中ROS水平降低,且呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表1和图2。

2.3 对SOD, GSHPx, MDA水平的影响

与A组相比,B组、C₁组、C₂组、C₃组H9c2细胞中SOD和GSHPx水平降低,H9c2细胞中MDA水平增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与B组相比,C₁组、C₂

组、C₃组H9c2细胞中SOD和GSHPx水平增加,H9c2细胞中MDA水平降低,且呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表2。

2.4 对Bcl-2, Bax, Cyt-c, Caspase-3水平的影响

与A组相比,B组、C₁组、C₂组、C₃组H9c2细胞中Bcl-2水平降低,H9c2细胞中Bax, Cyt-c, Caspase-3水平增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与B组相比,C₁组、C₂组、C₃组H9c2细胞中Bcl-2水平增加,H9c2细胞中Bax, Cyt-c, Caspase-3水平降低,且呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表3和图3。

3 讨论

山茱萸是山茱萸科植物除去种子的成熟果实,其提取物主要成分包括类黄酮、莫罗苕、三萜、多酚和多糖,具有补血固精、补益肝肾、调气、补虚、明目、强身等功效。药理学研究表明,山茱萸乙醇提取物通过提高清除氧自由基和抑制膜氧化损伤的能力,对心肌细胞有显著保护作用^[12]。大量的体内外研究表明,莫罗苕有抗癌、抗氧化剂、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗病毒等功效。氧化

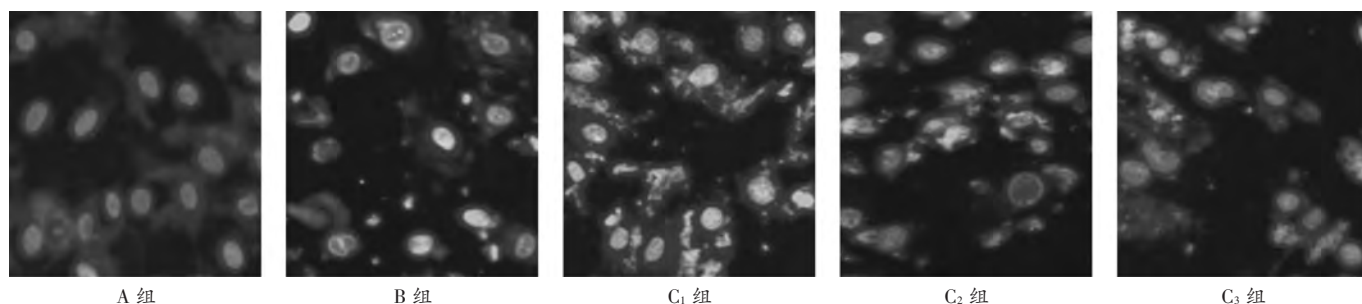


图1 山茱萸莫罗苕对H9c2细胞凋亡的影响

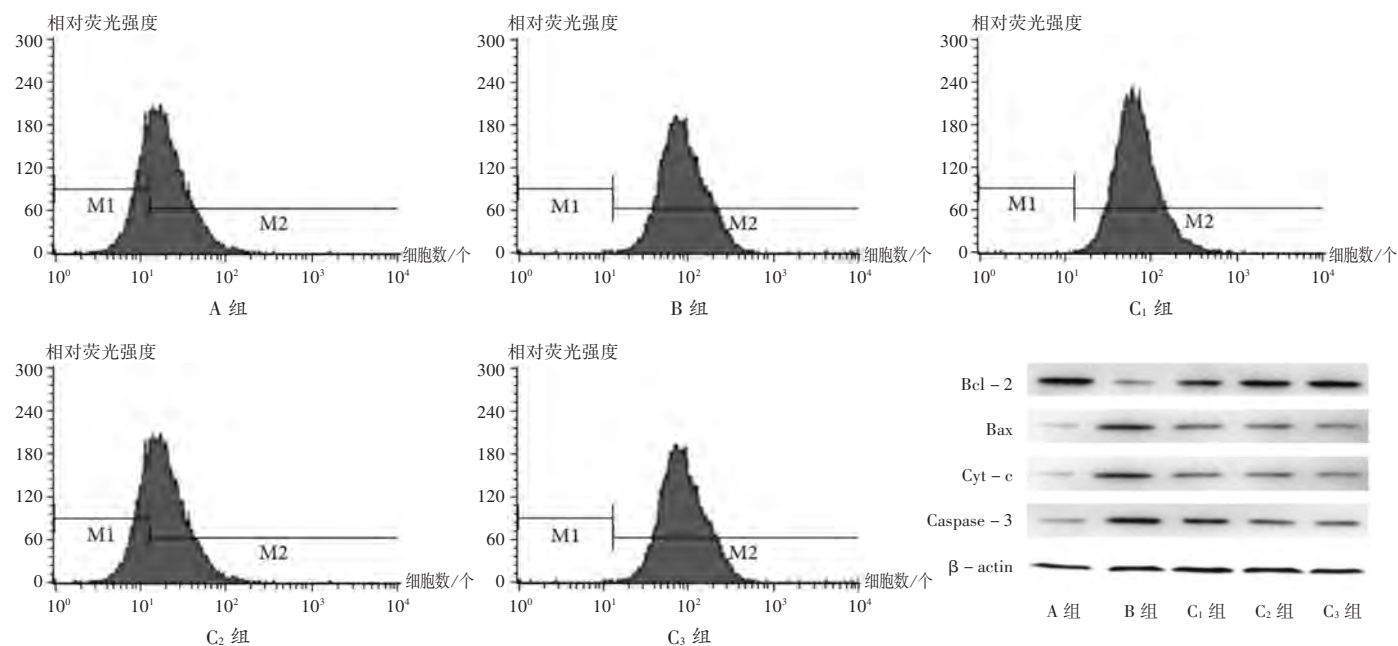


图2 山茱萸莫罗苕对H9c2细胞中ROS水平的影响

图3 山茱萸莫罗苕对H9c2细胞中Bcl-2, Bax, Cyt-c, Caspase-3水平的影响

表2 山茱萸莫罗昔对 H9c2 细胞中 SOD, GSHPx, MDA 水平的影响 ($\bar{X} \pm s$)

组别	SOD(U/L)	GSHPx(U/mg)	MDA(nmol/mL)
A 组	257.29 ± 18.29	143.91 ± 17.48	17.47 ± 3.59
B 组	173.04 ± 17.20 ^a	31.52 ± 7.64 ^a	69.28 ± 14.12 ^a
C ₁ 组	192.05 ± 14.28 ^{ab}	72.17 ± 9.66 ^{ab}	44.52 ± 8.30 ^{ab}
C ₂ 组	216.37 ± 22.52 ^{abc}	94.08 ± 15.72 ^{abc}	32.60 ± 6.38 ^{abc}
C ₃ 组	233.18 ± 10.51 ^{abcd}	120.57 ± 8.40 ^{abcd}	21.29 ± 7.67 ^{abcd}

表3 山茱萸莫罗昔对 H9c2 细胞中 Bcl-2, Bax, Cyt-c, Caspase-3 水平的影响 ($\bar{X} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Cyt-c	Caspase-3
A 组	0.93 ± 0.14	0.16 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.22 ± 0.04
B 组	0.27 ± 0.03 ^a	0.59 ± 0.10 ^a	0.48 ± 0.06 ^a	0.76 ± 0.08 ^a
C ₁ 组	0.42 ± 0.08 ^{ab}	0.33 ± 0.05 ^{ab}	0.29 ± 0.04 ^{ab}	0.49 ± 0.08 ^{ab}
C ₂ 组	0.51 ± 0.07 ^{abc}	0.28 ± 0.05 ^{abc}	0.21 ± 0.02 ^{abc}	0.40 ± 0.05 ^{abc}
C ₃ 组	0.80 ± 0.13 ^{abcd}	0.21 ± 0.02 ^{abcd}	0.17 ± 0.03 ^{abcd}	0.31 ± 0.02 ^{abcd}

应激在各种心血管疾病的发病机制中起重要作用^[13]。山茱萸莫罗昔对心肌细胞氧化应激损伤的作用尚未阐明。氧化应激损伤过程中,心肌细胞凋亡常与 ROS 的过量产生有关,抑制氧化损伤和氧化应激诱导的细胞凋亡是心血管疾病的重要干预策略^[14]。本研究中采用 H9c2 心肌细胞,与 H₂O₂ 孵育,建立氧化应激损伤模型,研究山茱萸莫罗昔的保护作用及其作用机制。通过 MTT 法确定细胞活力。H₂O₂ 孵育 24 h 后, A 组细胞增殖率降低;经山茱萸莫罗昔预处理后,细胞增殖率明显升高,表明山茱萸莫罗昔可保护心肌细胞免受 H₂O₂ 诱导损伤。

氧气是心肌细胞的关键必需物质,通常伴随着线粒体呼吸作用产生的潜在危险的 ROS。钙离子超载的发生和过量 ROS 的产生在氧化应激过程中有相互的因果关系^[15]。氧化应激产生的过量 ROS 可能会破坏膜结构,增加膜通透性,消耗细胞内三磷酸腺苷(TP),并导致大量 Ca²⁺ 流入细胞外及细胞内钙超载,进一步加剧 ROS 的产生^[16]。氧化剂和抗氧化剂间的平衡在维持正常的生物学功能中起着至关重要的作用。外源性刺激会破坏体内的平衡,引起体内 ROS 的过度积累,并诱发多种疾病。尽管脂质过氧化产物可间接反映氧化应激条件下 ROS 的生成,但细胞抗氧化酶(如 SOD, GSH-Px)可降低细胞内 ROS 含量^[17]。本研究结果显示,山茱萸莫罗昔预处理可减少 MDA 和 ROS 的产生,并提高 SOD 和 GSH-Px 的活性。山茱萸莫罗昔的作用可能部分归因于改善了氧化剂和抗氧化剂系统的平衡。

凋亡是细胞死亡途径的程序性和主动模式,在正常的生理或病理环境中受其自身基因调控, H₂O₂ 处理的 H9c2 细胞可促进细胞凋亡^[18]。本研究中, H₂O₂ 诱导的细胞凋亡形态发生变化,通过 PI 和 DAPI 染色观察到细胞萎缩、染色质浓缩和出现凋亡小体。同时,山茱萸莫罗

昔可能对 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡有保护作用。

由于其与氧化应激损伤和细胞凋亡的潜在相关性,在氧化应激过程中,多种作用机制可引起心肌损伤。ROS 直接或通过 Bcl-2/Bax 信号通路引起细胞损伤^[19]。Bcl-2/Bax 是线粒体稳态的主要调节因子;其通过稳定细胞膜完整性和抑制线粒体通透性转换孔(MPTP)的开放来阻止 Cyt-c 从线粒体释放,从而起到抗凋亡作用,促凋亡分子 Bax 通过 MPTP 孔的开放来促进 Cyt-c 从线粒体释放^[20-21]。Cyt-c 可与凋亡蛋白酶活化因子 1(Apaf-1)、半胱天冬酶原-9(Procaspase-9)结合形成复杂的凋亡小体,激活 Caspase-3 级联反应,诱导细胞凋亡^[22]。因此, Bcl-2/Bax 的降低导致线粒体内孔隙的形成,并导致线粒体内的小分子流出,山茱萸莫罗昔预处理可通过降低 Bax, Cyt-c, Caspase-3 的表达,增加 Bcl-2 的合成来抑制细胞凋亡。

综上所述,山茱萸莫罗昔对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤具有一定的保护作用,其作用机制与 Bcl-2/Bax 细胞信号通路有关。可能具有预防和治疗 H₂O₂ 引起的心肌细胞氧化应激损伤的潜力,但尚需大量的研究进行论证。

参考文献:

- [1] 李世柏, 刘俊, 吴智胜. 银杏叶胶囊联合尼可地尔治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛疗效评价[J]. 中国药业, 2019, 28(11): 77-80.
- [2] AL-RAWI NH, SHAHID AM. Oxidative stress, antioxidants, and lipid profile in the serum and saliva of individuals with coronary heart disease: Is there a link with periodontal health? [J]. Minerva Stomatol, 2017, 66(5): 212-225.
- [3] TOKITSU T, YAMAMOTO E, HIRATA Y, et al. Clinical Significance of Reactive Oxygen Species (ROS) in Heart Failure with Reduced Left Ventricular Ejection Fraction (HFrEF) Patients[J]. J Cardiac Failure, 2016, 22(9): S165.
- [4] PALIWAL S, KAKKAR A, SHARMA R, et al. Differential reduction of reactive oxygen species by human tissue-specific mesenchymal stem cells from different donors under oxidative stress[J]. J Biosci, 2017, 42(3): 373-382.
- [5] LIN JF, TSAI TF, YANG SC, et al. Benzyl isothiocyanate induces reactive oxygen species-initiated autophagy and apoptosis in human prostate cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 20220-20234.
- [6] IMAM F, AL-HARBI NO, AL-HARBI MM, et al. Apremilast prevent doxorubicin-induced apoptosis and inflammation in heart through inhibition of oxidative stress mediated activation of NF-κB signaling pathways[J]. Pharmacol Rep, 2018, 70(5): 993-1000.
- [7] 金钊, 秦凯华, 叶俏波, 等. 山茱萸对附子“温通心阳”作用的增效减毒作用研究[J]. 中药材, 2015, 38(3): 576-579.
- [8] 冀麟麟, 王欣, 钟祥健, 等. 山茱萸的化学成分及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(5): 137-143.
- [9] 韩根利, 刘宏胜, 王树森, 等. RP-HPLC 法同时测定山茱萸