

引用本文:刘皎皎,李粉萍,杨跃青,等.白花蛇舌草提取物对肝癌细胞JNK/p38MARK通路及细胞学行为的影响[J].安徽医药,2022,26(8):1496-1500.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.08.003.

◇ 药学研究 ◇



白花蛇舌草提取物对肝癌细胞JNK/p38MARK通路及细胞学行为的影响

刘皎皎,李粉萍,杨跃青,何瑾瑜,曹雪艳,薛敬东,叶苗青

作者单位:陕西省中医医院肝病科,陕西 西安 710003

通信作者:何瑾瑜,女,副主任医师,研究方向为中西医结合内科,Email:chrisandlm@126.com

基金项目:国家自然科学基金(81373513);2018年国家中医药管理局区域中医(肝病)

诊疗中心培育单位建设项目[国中医药办医政函(2017)39号]

摘要: 目的 研究白花蛇舌草提取物(HDE)对肝癌QGY细胞增殖、凋亡的影响,并探讨其抗肿瘤的可能作用机制。方法 体外培养肝癌QGY细胞,分为对照组:RPMI-1640培养基培养;阳性对照组:全反式维甲酸(AT-RA)(5 μ mol/L);白花蛇舌草提取物(HDE)低、中、高剂量组:分别给予20、40、80 g/L HDE。四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞增殖能力,采用Hoechst33258荧光染色以及流式AnnexinV-FITC/PI双染法检测细胞凋亡率;通过蛋白质印迹法(Western blotting)检测增殖相关蛋白增殖细胞核抗原(PCNA)、凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤基因-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白基因(Bax)、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3(caspase3)及JNK/p38MARK通路相关蛋白水平。结果 24、48 h时QGY细胞增殖抑制率,与对照组[(16.56 $\pm$ 3.15)%、(19.27 $\pm$ 3.33)%]同时时间点比较,20、40、80 g/L HDE组[24 h(33.37 $\pm$ 11.36)%、(47.57 $\pm$ 13.62)%、(59.37 $\pm$ 16.95)%,48 h(36.56 $\pm$ 10.03)%、(50.59 $\pm$ 13.87)%、(63.61 $\pm$ 16.99)%]、阳性对照组[(60.43 $\pm$ 17.09)%、(64.63 $\pm$ 17.15)%]均显著升高($P<0.05$)。与对照组比较,20、40、80 g/L浓度HDE处理后QGY细胞凋亡率、Bax、caspase-3蛋白均显著升高($P<0.05$),PCNA、Bcl-2蛋白、p-JNK/JNK、p-p38/p38表达降低($P<0.05$),且均呈浓度依赖性,80 g/L HDE组细胞凋亡率、Bax、caspase-3、PCNA、Bcl-2蛋白、p-JNK/JNK、p-p38/p38表达与阳性对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 HDE可抑制肝癌QGY细胞增殖,促进QGY细胞凋亡,可能是通过抑制JNK/p38MARK通路活化进而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 白花蛇舌草提取物; 肝肿瘤; c-Jun氨基末端激酶/p38丝裂原活化蛋白激酶通路; QGY细胞株; 增殖; 凋亡

Effects of hedyotis diffusa extract on JNK/p38MARK pathway and cytological behavior of hepatoma cells

LIU Jiaojiao, LI Fenping, YANG Yueqing, HE Jinyu, CAO Xueyan, XUE Jingdong, YE Miaoqing

Author Affiliation: Shaanxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 710003, China

Abstract: **Objective** To study the effects of hedyotis diffusa extract (HDE) on the proliferation and apoptosis of hepatoma QGY cells, and to explore the possible mechanism of its anti-tumor effect. **Methods** The QGY cells were cultured in vitro and divided into control group: cultured in RPMI-1640 culture medium; positive control group: all trans retinoic acid (AT-RA) (5 μ mol/L); low, medium and high dose groups of Hedyotis diffusa extract (HDE): 20, 40 and 80 g/L HDE respectively. MTT method was used to detect cell proliferation, Hoechst33258 fluorescence staining and flow Annexin V-FITC/PI double staining were used to detect the apoptosis rate; in addition, the levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), B-lymphoma gene-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein gene (Bax), caspase-3 and JNK/p38MARK pathway related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with those in the control group[(16.56 $\pm$ 3.15)%, (19.27 $\pm$ 3.33)%] at the same time point, the inhibition rate of QGY cell proliferation in 20, 40, 80 g/L HDE groups [24 h(33.37 $\pm$ 11.36)%, (47.57 $\pm$ 13.62)%, (59.37 $\pm$ 16.95)%, 48 h(36.56 $\pm$ 10.03)%, (50.59 $\pm$ 13.87)%, (63.61 $\pm$ 16.99)%] and positive control group[(60.43 $\pm$ 17.09)%, (64.63 $\pm$ 17.15)%] at 24, 48 h increased significantly ($P<0.05$). Compared with those in the control group, the apoptosis rate, Bax and caspase-3 protein of QGY cells after treatment with HDE with concentration of 20, 40 and 80 g/L increased significantly ($P<0.05$), the expressions of PCNA, Bcl-2 protein, p-JNK/JNK, p-p38/p38 decreased ($P<0.05$), and all of them were concentration dependent, while there was no significant difference in apoptosis rate, Bax, Caspase-3, PCNA, Bcl-2 protein, p-JNK/JNK, p-p38/p38 expressions between the 80 g/L HDE group and the positive control group ($P>0.05$). **Conclusion** HDE can inhibit the proliferation of QGY cells of liver cancer and promote the apoptosis of QGY cells, which may play an anti-tumor role by inhibiting the activation of JNK/p38MARK pathway.

Key words: Hedyotis diffusa extract; Liver neoplasms; C-Jun N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathway; QGY cell line; Proliferation; Apoptosis

肝癌是我国常见恶性肿瘤之一,近年来其发病率呈逐渐升高趋势,且在我国肿瘤致死原因中位居第二^[1-2]。目前临床常用的抗肿瘤药物多是以传统的核酸和蛋白质为靶点的细胞毒性药物,具有选择性差、毒性作用强、作用机制单一、易产生耐药性等特点,因此在中药中寻找毒副作用小、疗效显著的抗肿瘤药物已然是国内外学者研究的热点^[3-4]。白花蛇舌草属于茜草科耳草属植物,全草入药,研究表明,白花蛇舌草提取物(hedyotis diffusa extract, HDE)对肝癌 HepG2 细胞有较好的生长抑制及凋亡诱导作用^[5]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路等多种肿瘤(如肝癌)发生发展密切相关,其家族成员 JNK、p38 与细胞分化、凋亡等有关^[6]。然而,有关 HDE 对肝癌细胞 JNK/p38MARK 通路的影响鲜有报道,因此本研究自 2019 年 8 月至 2020 年 4 月通过分析不同浓度 HDE 对肝癌细胞 JNK/p38MARK 通路的影响,探讨 HDE 抗癌的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 肝癌 QGY 细胞株(购买于中国科学院上海生物科学研究所);白花蛇舌草提取物(HDE)(10:1)购自陕西昊辰生物科技有限公司;全反式维甲酸(all-transretinoic acid, AT-RA)(批号 H20093943,纯度 99.99%)购自成都恒瑞医药公司,二甲基亚砜(DMSO,批号 Q2258)购自美国 Sigma 公司,RPMI-1640 培养基(批号 NBC1255)购自美国 Hyclone 公司,10% 胎牛血清(批号 42G5642)购自美国 Gibco 公司,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2-四甲基偶氮噻唑蓝(MTT,批号 M5176)购自美国 Sigma 公司,胰蛋白酶(批号 J1510032)购自广州 Ruka 公司生产;鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA)、凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤基因-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白基因(Bax)、半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶 3(caspase-3)、p-JNK、p-p38、 β 肌动蛋白(β -actin)一抗及羊抗鼠二抗购自赛默飞世尔科技有限公司;AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(货号 HUDY03)购自上海碧云天公司。二氧化碳培养箱购自日本 Sanyo 公司,Hoechst33258 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;酶标仪(型号 HBS-1096C)、凝胶成像系统(型号 Gel Doc1000)购自美国 Bio-Rad 公司;光学显微镜(型号 WMSC-1037)购自上海无陌光学厂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏肝癌 QGY 细胞,培养于含 15% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 g/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,防止细菌污染,培养于 37 °C 饱和湿度、5% 二氧化碳、20% 氧培养箱中,每

2~3 天更换一次培养液,无菌操作,待细胞生长良好,且达对数生长期时进行后续实验。

1.2.2 药物处理及分组 取“1.2.1”中对数生长期的肝癌 QGY 细胞,以密度为 1×10^4 个/孔接种于接种在 96 孔板中,分为对照组、阳性对照组、低中高 HDE 组。(1)对照组:RPMI-1640 培养基组;(2)阳性对照组:AT-RA($5 \mu\text{mol/L}$);(3)HDE 低、中、高剂量组:分别给予 20、40、80 g/L HDE^[7]。继续培养 48 h。

1.2.3 MTT 法检测 HDE 对 QGY 细胞增殖能力的影响 取“1.2.2”各组 QGY 细胞接种于 96 孔板进行培养,每个孔细胞密度为 1×10^4 个,每组设 6 个复孔,分别于培养 12、24、48 h 后向各孔加入 MTT $20 \mu\text{L}$,继续培养 4 h 后,弃去上清,加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,振荡 10 min,使蓝紫色结晶充分溶解。全自动酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度 A 值。细胞增殖抑制率= $[1 - \text{药物组 A 值} / \text{对照组 A 值}] \times 100\%$ 。

1.2.4 Hoechst33258 荧光染色法检测细胞凋亡形态 收集“1.2.2”中各组细胞,按照 Hoechst33258 荧光染色法说明进行操作,置于荧光显微镜下观察 48 h 时的细胞凋亡形态并拍照。

1.2.5 流式 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测各组 QGY 细胞凋亡情况 取“1.2.2”中各组细胞,严格按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书,胰酶消化细胞后生理盐水洗涤后制成 1×10^6 个/升单细胞悬液,取其中 $100 \mu\text{L}$ 后加入 $5 \mu\text{L}$ AnnexinV-FITC 与 $5 \mu\text{L}$ PI 混合均匀,室温避光孵育 15 min,上流式细胞仪进行检测培养 48 h 各组 QGY 细胞凋亡情况,并通过 Modfir LT 软件分析试验结果。每组设置三个重复。

1.2.6 蛋白质印迹法(Western blotting)检测增殖、凋亡及 JNK/p38MARK 通路相关蛋白表达变化 取“1.2.2”各组细胞,每组均设 3 个重复,PBS 洗涤 2 遍,冰上加裂解液,裂解 30 min,离心取上清,通过蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定细胞总蛋白浓度,经电泳、转膜、封闭后,添加(1:500)鼠抗人 PCNA、Bcl-2、caspase-3、JNK、p-JNK、p-p38、p38 一抗,以 β -actin 为内参,4 °C 过夜后,TBST 洗膜 3 次,添加羊抗鼠二抗(1:5 000)稀释液孵育 2 h,TBST 洗膜,ECL 化学发光法显色后,于凝胶成像仪中观察蛋白表达并保存图像。

1.3 统计学方法 运用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,进行方差齐性检验,组间有差异采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HDE 对肝癌 QGY 细胞增殖的影响 与对照

组比较,24 h时HDE组、阳性对照组 QGY 细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P>0.05$),48、72 h时20、40、80 g/L HDE组、阳性对照组 QGY 细胞增殖抑制率均显著升高($P<0.05$);与阳性对照组比较,80 g/L HDE组 QGY 细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P>0.05$)。随着培养时间的延长,20、40、80 g/L HDE组、阳性对照组 QGY 细胞增殖抑制率显著升高($P<0.05$)。见表1。

表1 QGY 细胞增殖抑制率变化/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	12 h	24 h	48 h
对照组	6	12.23±3.10	16.56±3.15 ^④	19.27±3.33 ^⑤
阳性对照组	6	14.45±3.62	60.43±17.09 ^{①②③④}	64.63±17.15 ^{①②③④⑤}
HDE组	6			
20 g/L		12.36±3.13	33.37±11.36 ^{①④}	36.56±10.03 ^{①④⑤}
40 g/L		13.15±3.17	47.57±13.62 ^{①②④}	50.59±13.87 ^{①②④⑤}
80 g/L		13.78±3.33	59.37±16.95 ^{①②③④}	63.61±16.99 ^{①②③⑤}
F值		0.50	11.48	12.50
P值		0.739	0.000	0.000

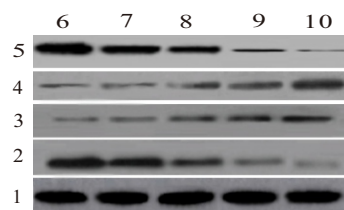
注:①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与HDE(20 g/L)组比较, $P<0.05$ 。③与HDE(40 g/L)组比较, $P<0.05$ 。④与24 h比较, $P<0.05$ 。⑤与48 h比较, $P<0.05$ 。

2.2 细胞形态学观察 对照组 QGY 细胞呈浅蓝色荧光,颜色分布均匀。经不同浓度的HDE处理后的QGY细胞72 h后均呈现出明显的凋亡特征,随着浓度的增加,细胞数量逐渐减少,呈现浓缩致密的固缩形态或颗粒状态的凋亡细胞数增加,细胞核染色质聚集,断裂成块状,并伴有明显的细胞碎片形成。见图1。

2.3 不同浓度HDE对肝癌QGY细胞凋亡率的影响 与对照组(4.65±0.91)%相比,不同浓度HDE组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),且随HDE浓度(20、40、80 g/L)升高细胞凋亡率逐渐升高[(15.83±3.11)%、(17.27±3.25)%、(20.69±4.03)%, $P<0.05$];与阳性对照组(20.73±4.05)%相比,HDE为80 g/L

时,细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 不同浓度HDE处理对肝癌QGY细胞增殖、凋亡相关蛋白表达影响 与对照组相比,HDE组PCNA、Bcl-2蛋白表达降低($P<0.05$),Bax、caspase-3蛋白表达升高($P<0.05$),且呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,HDE为80 g/L时,PCNA、Bcl-2、Bax、caspase-3蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2,表2。



注:1—β肌动蛋白(β-actin);2—B淋巴细胞瘤基因-2(Bcl-2);3—Bcl-2相关X蛋白基因(Bax);4—半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3(caspase-3);5—增殖细胞核抗原(PCNA);6—对照组;7—HDE(20 g/L)组;8—HDE(40 g/L)组;9—HDE(80 g/L)组;10—阳性对照组。

图2 不同浓度HDE处理对肝癌QGY细胞增殖、凋亡相关蛋白表达

2.5 不同浓度HDE处理对JNK/p38MARK通路相关蛋白表达影响 与对照组相比,HDE组p-JNK、p-p38蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),且呈剂量依赖;与阳性对照组相比,HDE浓度为80 g/L时,p-JNK、p-p38蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3、表3。

3 讨论

我国是肝癌高发国家之一,肝癌死亡率占我国全部恶性肿瘤死亡率的19%左右^[8]。肝癌发病确切分子机制尚不清楚,多认为是多因素(如多基因突变、多条细胞信号传导通路、肿瘤新生血管生成异常等)、多环节过程^[9-10]。目前,分子靶向治疗肝癌取得了一定成效,但化学抗肿瘤药物研发成本昂贵且有较大的毒副作用^[11-12],因此从天然产物及中草药中挖掘低毒、高效抗肿瘤药物意义重大。

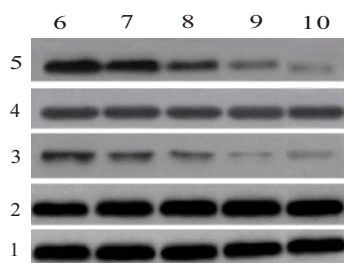
白花蛇舌草是茜草科植物,具有清热解毒、利

表2 不同浓度HDE处理对肝癌QGY细胞增殖、凋亡相关蛋白表达影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	PCNA	Bax	caspase-3	Bcl-2
对照组	6	1.08±0.23	0.19±0.04	0.22±0.05	0.93±0.18
阳性对照组	6	0.39±0.07 ^{①②③}	0.41±0.08 ^{①②③}	0.90±0.15 ^{①②③}	0.21±0.03 ^{①②③}
HDE组	6				
20 g/L		0.96±0.19 ^①	0.22±0.05 ^①	0.35±0.07 ^①	0.87±0.17 ^①
40 g/L		0.85±0.17 ^{①②}	0.28±0.06 ^{①②}	0.55±0.11 ^{①②}	0.59±0.11 ^{①②}
80 g/L		0.46±0.09 ^{①②③}	0.39±0.08 ^{①②③}	0.89±0.15 ^{①②③}	0.23±0.04 ^{①②③}
F值		21.58	14.30	44.41	45.96
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:PCNA为增殖细胞核抗原,Bax为Bcl-2相关X蛋白基因,caspase-3为半胱氨酰天冬氨酸特异性蛋白酶3,Bcl-2为B淋巴细胞瘤基因-2。

①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与HDE(20 g/L)组比较, $P<0.05$ 。③与HDE(40 g/L)组比较, $P<0.05$ 。



注:1— β 肌动蛋白(β -actin);2—p38;3—p-p38;4—JNK;5—p-JNK;6—对照组;7—HDE(20 g/L)组;8—HDE(40 g/L)组;9—HDE(80 g/L)组;10—阳性对照组。

图3 不同浓度HDE处理对JNK/p38MAPK通路相关蛋白表达影响

表3 不同浓度HDE处理对JNK/p38MAPK通路相关蛋白表达影响

组别	例数	p-JNK/JNK	p-p38/p38
对照组	6	1.07±0.22	0.82±0.16
阳性对照组	6	0.42±0.08 ^{①②③}	0.20±0.04 ^{①②③}
HDE组	6		
20 g/L		0.96±0.19 ^①	0.77±0.15 ^①
40 g/L		0.87±0.18 ^{①②}	0.53±0.10 ^{①②}
80 g/L		0.43±0.09 ^{①②③}	0.22±0.05 ^{①②③}
F值		21.24	41.51
P值		<0.001	<0.001

注:①与对照组比较, $P<0.05$ 。②与HDE(20 g/L)组比较, $P<0.05$ 。③与HDE(40 g/L)组比较, $P<0.05$ 。

尿消肿等作用,研究表明其对多种肿瘤细胞株具有诱导凋亡作用^[13]。本研究发现当不同浓度HDE作用于肝癌细胞株QGY,处12 h时,细胞增殖抑制率与对照组差异无统计学意义,可能此时药物还未发生作用,当处理24 h、48 h时,细胞增殖抑制率随浓度升高而增高,提示HDE可抑制肝癌QGY细胞增殖,且随HDE浓度的增加增殖抑制率升高。细胞凋亡是一个错综复杂过程,有较多蛋白、基因参与细胞凋亡启动及执行过程,在肿瘤进展中发挥重要作用^[14]。本研究通过Hoechst33258荧光染色法观察得到,各浓度HDE处理细胞48 h后均呈现出明显的凋亡特征,随着浓度增加,细胞数量逐渐减少,呈现浓缩致密的固缩形态或颗粒状态的凋亡细胞数增加,细胞核染色质聚集,断裂成块状,并伴有明显的细胞碎片形成。双染试验中不同浓度HDE处理后QGY细胞凋亡率均显著升高,且呈浓度依赖性,80 g/L HDE对QGY细胞凋亡率的影响与阳性对照组相当,提示HDE可诱导HDE细胞凋亡。PCNA是一种酸性核蛋白,对调节DNA的复制意义重大,其与细胞增殖密切相关,表达水平可在肿瘤癌变组织中显著上升^[15]。Bcl-2是一种原癌基因,能抑制细胞凋亡^[16]。Bax是Bcl-2家族中最主要的促进凋亡蛋白^[17]。caspase3是凋亡途径关键执行者^[18]。本研究

进一步探究显示,HDE处理组PCNA、Bcl-2蛋白表达降低,Bax、caspase-3蛋白表达升高,且呈剂量依赖性,提示HDE可抑制肝癌QGY细胞增殖、诱导凋亡。

MAPK通路是一种重要的肿瘤信号转导通路,通常由JNK、p38通路和细胞外信号调节激酶等通路组成^[19-20]。贾蕾蕾、王爱玲^[21]研究结果显示,棉子酚可能通过MARK信号通路中ERK、p38的激活,缓解再灌注心肌组织氧化应激损伤及凋亡损伤。本研究HDE处理后,p-JNK、p-p38蛋白表达水平均显著降低,且随HDE浓度的增加而降低,猜测HDE能显著抑制JNK、p38蛋白磷酸化,抑制JNK、p38信号通路激活,进而发挥抑制QGY细胞增殖、促进QGY细胞凋亡的抗肿瘤作用。

综上所述,HDE能抑制人肝癌细胞株QGY细胞增殖,促进QGY细胞凋亡,可能是通抑制JNK、p38MAPK信号通路活化实现的。但本研究也存在一定不足,肝癌是多途径过程,抑制MAPK通路激活可能仅为其中一条途径,对HDE抑制QGY细胞增殖,促进凋亡的潜在机制尚有待进一步探索。

(本文图1见插图8-1)

参考文献

- [1] DEBANJAN D, LAURA A, HAYATO N, et al. Liver cancer initiation requires p53 inhibition by cd44-enhanced growth factor signaling[J]. Cancer Cell, 2018, 33(6):1061-1077
- [2] TAKEHIRO N, HIDETOSHI E, HIROSHI W, et al. Short-term surgical outcomes of minimally invasive repeat hepatectomy for recurrent liver cancer[J]. Surg Endosc, 2018, 32(1):46-52.
- [3] 程春旭, 高颜茹. 抗肿瘤药物作用机制的研究进展[J]. 吉林医学, 2009, 30(23):3080-3083.
- [4] VERHEUL HMW, QIAN DZ, CARDUCCI MA, et al. Sequence-dependent antitumor effects of differentiation agents in combination with cell cycle-dependent cytotoxic drugs[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60(3):329-339.
- [5] 田雪飞, 肖竺, 郭永良, 等. 归肝经中药对肝癌HepG2细胞增殖抑制及凋亡诱导作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(4):199-202.
- [6] CUI Y, JIANG L, SHAO Y, et al. Anti-alcohol liver disease effect of gentiana macrophyllae extract through MAPK/JNK/p38 pathway[J]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71(2):240-250.
- [7] 刘岩, 张春阳, 张大田, 等. 白花蛇舌草提取物诱导人肾癌GRC-1细胞凋亡及抑制血管生成的实验研究[J]. 山东医药, 2011, 51(8):97-98.
- [8] BUAMAH PK, HARRIS R, JAMES OF, et al. Lentil-lectin-reactive alpha-fetoprotein in the differential diagnosis of benign and malignant liver disease[J]. Clin Chem, 1986, 32(11):2083-2084.
- [9] SU YC, FENG YH, WU HT, et al. Elov16 is a negative clinical predictor for liver cancer and knockdown of Elov16 reduces murine liver cancer progression[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):

- 6586-6590.
- [10] CAO J, WEI R, YAO S. Matrine has pro-apoptotic effects on liver cancer by triggering mitochondrial fission and activating Mst1-JNK signalling pathways[J]. J Physiol Sci, 2019, 69(2): 185-198.
- [11] CHEN L, YANG XL. TRIM11 cooperates with HSF1 to suppress the anti-tumor effect of proteotoxic stress drugs[J]. Cell Cycle, 2019, 18(1): 60-68.
- [12] VERDEL BM, VAN PUIJENBROEK EP, SOUVEREIN PC, et al. Drug-related nephrotoxic and ototoxic reactions: a link through a predictive mechanistic commonality[J]. Drug Saf, 2008, 31(10): 877-884.
- [13] 侯山岭. 中药白花蛇舌草化学成分及药理活性研究进展[J]. 中医临床研究, 2018, 10(6): 140-141.
- [14] 丁大伟, 章永红. 以细胞凋亡通路为靶点的抗肿瘤中药研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(1): 239-241.
- [15] HARA K, UCHIDA M, TAGATA R, et al. Structure of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bound to an APIM peptide reveals the universality of PCNA interaction[J]. Acta Crystallographica, 2018, 74(4): 214-221.
- [16] 魏炜, 朱新江, 陈舒晨, 等. 凋亡相关基因与弥漫大B细胞淋巴瘤相关性的研究进展[J]. 白血病·淋巴瘤, 2019, 28(5): 314-318.
- [17] DAI Z, LAI JR. Isolation of synthetic antibodies against bcl-2-associated X protein (BAX)[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1877(38): 351-357.
- [18] ZHAO T, FU Y, SUN H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia[J]. IUBMB Life, 2018, 70(1): 60-70.
- [19] 熊婉媛, 侯怀晶, 于晓辉, 等. 肝细胞癌的发生、发展与p38MAPK信号通路关系的研究进展[J]. 肝脏, 2018, 23(8): 736-739.
- [20] 孙琳, 李侠. 环境因素经 MAPK 信号通路介导细胞凋亡的研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2018, 36(10): 796-800.
- [21] 贾蕾蕾, 王爱玲. 棉子酚通过干扰氧化应激反应、抑制 JNK/p38 MAPK 信号通路的激活减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(10): 1424-1429.
- (收稿日期: 2020-06-23, 修回日期: 2020-08-09)

引用本文: 廖文筠, 张莹莹, 陈睦虎, 等. 辅酶 Q10 对脓毒血症休克大鼠血管平滑肌细胞功能的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(8): 1500-1504. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.08.004.

◇ 药学研究 ◇



辅酶 Q10 对脓毒血症休克大鼠血管平滑肌细胞功能的影响

廖文筠^a, 张莹莹^b, 陈睦虎^a, 刘英^a, 刘济滔^a, 阳凤^a, 彭林^a, 尹德锋^a, 钟武^a

作者单位: 西南医科大学附属医院, ^a急诊医学部, ^b老年医学科, 四川 泸州 646000

通信作者: 钟武, 男, 主任医师, 研究方向为周围血管疾病及急危重症医学, Email: zhongwu2876@sina.com

基金项目: 西南医科大学省级青年基金资助项目(0903-00031063); 泸州市科技局创新苗子资助项目(17254)

摘要: **目的** 探讨辅酶 Q10 对脓毒血症休克大鼠血管平滑肌细胞功能的影响及其作用机制研究。**方法** 采用 SD 大鼠尾静脉注射脂多糖(LPS)的方法建立脓毒血症休克动物模型, 分离取出主动脉, 0.2% 胶原酶消化分离平滑肌细胞(SMCs), 自然纯化及差速贴壁纯化血管平滑肌细胞, 将分离后的 SMC 分别接种到 96 孔板中, 分为 4 组, 分别为正常对照组、正常对照组+辅酶 Q10、LPS 组、LPS+辅酶 Q10 组, 分别检测 4 组的增殖和氧化应激产物产生情况, 在 6、12、24、48 h 后分别检测正常对照组、正常对照组+辅酶 Q10、LPS 组、LPS+辅酶 Q10 组 SMCs 丙二醛水平, 在 48 h 后检测 α -肌动蛋白(α -actin)、骨桥蛋白(OPN)的相对表达量。**结果** 随时间推移, LPS 组中 SMC 细胞凋亡和氧化应激产物均较正常对照组增多, 在 48 h 时达到峰值, 分别增多 11.4 倍和 5.6 倍; LPS+辅酶 Q10 组中氧化应激产物较 LPS 组减少近 50%; 在 48 h 时辅酶 Q10 在正常培养环境下对 SMC 的 α -actin、OPN 蛋白的相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$), 而对脓毒血症休克 SD 大鼠分离的 SMC 可以明显减低氧化应激产物的生成及上调 α -actin 蛋白的相对表达量近 1.57 倍, 下调 OPN 蛋白的相对表达量 1.17 倍。**结论** 由 LPS 所致的脓毒血症休克的发病机制与血管中膜平滑肌细胞表型改变密切相关, 辅酶 Q10 可明显减低氧化应激产物的生成及上调 α -actin 蛋白的相对表达量, 缓解了因 LPS 所致脓毒血症休克的血管病理化转变。收缩型平滑肌细胞是正常情况下血管壁的重要组成部分, 而疾病病理血管则表现为合成型, 为脓毒血症休克的病理性血管形成提供理论基础。

关键词: 休克, 脓毒性; 辅酶 Q10; 血管平滑肌细胞; 氧化应激; α -肌动蛋白