

引用本文:王帅,朱超男,邬鹏宇,等.萝卜硫素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌保护作用及色氨酸-犬尿氨酸通路的影响[J].安徽医药,2023,27(1):60-64.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.01.013.

◇ 药学研究 ◇



萝卜硫素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌保护作用及色氨酸-犬尿氨酸通路的影响

王帅^a,朱超男^b,邬鹏宇^a,崔志成^a,赵长全^a

作者单位:华北理工大学附属医院,^a心脏大血管外科,^b胸外科,河北 唐山 063000

通信作者:邬鹏宇,男,主任医师,研究方向为心肌的缺血再灌注损伤,Email:wupengyu77@163.com

摘要: **目的** 探究萝卜硫素(SFN)对心肌缺血再灌注(I/R)损伤大鼠色氨酸(TRP)-犬尿氨酸(KYN)信号通路及心肌损伤的影响。**方法** 研究于2019年7月至2020年6月进行,将SD雄性大鼠随机分为假手术组(Control)、模型组(I/R)、SFN低(I/R+L SFN)、高(I/R+H SFN)剂量组。术后24 h,ELISA检测各组大鼠血清中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量;HE染色观察各组大鼠心肌组织病理变化;TUNEL检测各组大鼠缺血心肌细胞凋亡情况;HPLC检测各组大鼠心肌组织中TRP、KYN浓度;蛋白质印迹法(Western blotting)检测各组大鼠心肌组织B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、活化胱天蛋白酶3(cleaved -capase3)、吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO)蛋白表达情况。**结果** 与Control组相比,I/R大鼠心肌细胞破碎、坏死,细胞排列不规则,心肌纤维断裂,伴有炎症细胞浸润,血清中炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量、心肌细胞凋亡指数[(32.85 $\pm$ 3.13)比(1.07 $\pm$ 0.08)]、心肌组织TRP[(783.75 $\pm$ 30.32) pmol/L比(402.23 $\pm$ 23.55) pmol/L]、KYN浓度[(567.54 $\pm$ 28.18) pmol/L比(215.31 $\pm$ 20.03) pmol/L]、KYN/TRP比值、cleaved-capase3、Bax、IDO蛋白水平显著升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白水平显著降低($P<0.05$);与I/R相比,I/R+L SFN、I/R+H SFN剂量组心肌细胞上述病理症状明显减轻,大鼠血清中炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量、心肌细胞凋亡指数、心肌组织TRP、KYN浓度、KYN/TRP比值、Bax、cleaved -capase3、IDO蛋白水平依次降低($P<0.05$),Bcl-2蛋白水平显著升高($P<0.05$)。**结论** SFN可减少心肌细胞凋亡,缓解机体炎症反应,对心肌损伤有保护作用可能与TRP-KYN信号通路有关。

关键词: 再灌注损伤; 莱菔硫素; 心肌缺血; 色氨酸-犬尿氨酸信号通路; bcl-2相关X蛋白质; 胱天蛋白酶3; 白细胞介素类; 肿瘤坏死因子 α

Effects of sulforaphane on myocardial protection and tryptophan-kynurenine pathway in rats with myocardial ischemia reperfusion injury

WANG Shuai^a, ZHU Chaonan^b, WU Pengyu^a, CUI Zhicheng^a, ZHAO Changquan^a

Author Affiliation:^aDepartment of Cardiovascular Surgery,^bDepartment of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of sulforaphane (SFN) on the tryptophan (TRP)-kynurenine (KYN) signaling pathway and myocardial injury in rats with myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury. **Methods** From July 2019 to June 2020, SD male rats were randomly assigned into sham operation group (Control), model group (I/R), SFN low group (I/R+L SFN), and high group (I/R+H SFN) dose groups. 24h after operation, the serum levels of inflammatory factors interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in each group were detected by ELISA; HE staining was used to observe the pathological changes of rat myocardial tissue; TUNEL was used to detect the apoptosis of ischemic myocardial cells in each group; HPLC was used to detect the concentration of TRP and KYN in rat myocardial tissue; western blot was used to detect the protein expression of B cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), B cell lymphoma-2 (Bcl-2), cleaved cysteine aspartate proteolytic enzyme 3 (cleaved-capase3) and indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) in the myocardial tissue of each group. **Results** Compared with the control group, myocardial cells of I/R rats were broken and necrotic, the cell arrangement was irregular, myocardial fibers were broken, accompanied by inflammatory cell infiltration, and the serum levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α , myocardial cell apoptosis index [(32.85 $\pm$ 3.13) vs. (1.07 $\pm$ 0.08)], myocardial tissue TRP [(783.75 $\pm$ 30.32) pmol/L vs. (402.23 $\pm$ 23.55) pmol/L], KYN concentration [(567.54 $\pm$ 28.18) pmol/L vs. (215.31 $\pm$ 20.03) pmol/L], KYN/TRP ratio, cleaved-capase3, Bax, IDO protein levels were significantly increased ($P<0.05$), Bcl-2 protein levels were significantly reduced ($P<0.05$); Compared with I/R, I/R+L SFN and I/R+H SFN dose groups have significantly reduced the above-mentioned pathological symptoms of cardiomyocytes, the serum levels of inflammatory factors IL-1 β , IL-6, and TNF- α cardiomyocyte apoptosis index, myocardial tissue TRP, KYN concentration, KYN/TRP ratio, Bax, cleaved-capase3, IDO protein levels were

decreased ($P<0.05$), but the Bcl-2 protein levels was increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** SFN can reduce myocardial cell apoptosis, alleviate the body's inflammatory response, and have a protective effect on myocardial injury, which may be related to the TRP-KYN signaling pathway.

Key words: Reperfusion injury; Sulforaphane; Myocardial ischemia; Tryptophan-kynurenine signal; Bcl-2-associated X protein; Caspase 3; Interleukins; Tumor necrosis factor- α

心肌缺血再灌注损伤是心血管疾病在缺血发生后,血流恢复所引起的心肌损伤,是心血管疾病中常见的病理现象,长时间缺血后恢复血液供应时,局部炎症增加,导致继发性损伤^[1-2]。长期缺血再灌注损伤引起的细胞损伤可能导致细胞凋亡、自噬、坏死。因此,研究再灌注损伤诱导的细胞死亡的具体机制,可以对其临床治疗提供新的治疗靶点。萝卜硫素(sulforaphane, SFN)又称莱菔硫素,不仅有良好的抗癌活性,对缺血再灌注诱导的心肌细胞损伤也具有保护作用,但其具体作用机制尚不完全清楚^[3-4]。色氨酸(tryptophan, TRP)是一种必需氨基酸,是神经递质和其他关键的生物合成中间体,在机体代谢功能中起着至关重要的作用^[5]。犬尿氨酸(kynurenine, KYN)途径是哺乳动物TRP代谢的主要途径^[6],研究显示,炎性或应激因子诱导吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)可以激活TRP转化为KYN,参与心血管疾病发生过程^[7],研究报道,TRP/KYN在心肌梗死病人的自身免疫炎症反应有关,抑制TRP/KYN表达可有效缓解心肌损伤^[8]。然而关于TRP/KYN在心肌缺血再灌注损伤中的作用研究报道较少,本研究于2019年7月至2020年6月,通过观察SFN对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌损伤的影响,初步探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠购自北京生命科学研究所动物实验中心,8周龄,体质量250 g左右,合格证号为SYXK(京)2015-0002,适应性饲养1周后,进行后续实验。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 试剂及仪器 苏木-伊红染液(上海舜百生物科技有限公司,货号SBT10001);SFN(成都格纯生物医药有限公司,货号4478-93-7)、白细胞介素(IL)-1 β ELISA试剂盒(货号ml028514)、IL-6 ELISA试剂盒(货号ml102828)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA试剂盒(货号ml002095)均购自上海酶联生物科技有限公司;TUNEL试剂盒(碧云天生物技术研究所,货号C1086);兔源单克隆B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)抗体(货号ab32503)、兔源单克隆B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体(货号ab692)、兔源多克隆活化胱天蛋白酶3

(cleaved -caspase3)抗体(货号ab214430)、兔源单克隆IDO抗体(货号ab235902)均购自abcam公司;生物显微镜(日本尼康公司,型号e200);凝胶成像系统(美国伯乐公司,型号1708280)。

1.3 实验方法

1.3.1 心肌缺血再灌注损伤大鼠模型构建及实验分组 将SD雄性大鼠随机分为四组,假手术(Control)组、模型(I/R)组、SFN低(I/R+L SFN)、高(I/R+H SFN)剂量组,每组10只。I/R+L SFN、I/R+H SFN组术前2 h自尾静脉分别注射SFN 5 mg/kg、10 mg/kg, Control、I/R组注射等量生理盐水^[4,9]。除Control外,其他大鼠参考文献[10]制备心肌缺血再灌注损伤模型,用10%水合氯醛溶液(4 mL/kg)腹腔注射麻醉,大鼠四肢皮下连接心电图电极,实验全程记录II导联心电图。打开大鼠胸腔,用0号缝合针线在冠动脉左前降支下结扎,当结扎部位以下心肌颜色变暗且心电图ST段升高,则表明心肌缺血成功,结扎30 min后,剪开缝合线再灌注2 h,缺血区域的心肌颜色变红,T波波幅开始回落、ST段下降1/2以上,则再灌注成功。Control大鼠手术中只在左侧冠状动脉的前降支下穿线,不结扎。

1.3.2 标本采集 术后24 h后,采集各组大鼠尾静脉血5 mL,1 800 r/min离心10 min取血清,储存于-80℃冰箱待测;腹腔注射10%水合氯醛麻醉,处死大鼠,分离心肌组织,剪取约1.0 g用于提取组织蛋白,储存在-80℃冰箱中备用,剩余心肌组织用4%多聚甲醛溶液固定,做常规石蜡切片,备用。

1.3.3 各组大鼠血清中炎症因子检测 取“1.3.2”中血清,用ELISA试剂盒分别检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量,具体操作步骤参考其说明书。

1.3.4 HE染色观察 各组大鼠心肌组织病理变化将“1.3.2”中常规石蜡切片,脱蜡至水化,行HE染色,每张切片选取5个视野,光学显微镜下观察心肌组织病理学改变。

1.3.5 原位末端标记技术(TUNEL)检测 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 将“1.3.2”中常规石蜡切片,脱蜡至水化,PBS漂洗3次,血清封闭30 min,加TUNEL工作液,避光孵育1 h,具体操作步骤参考TUNEL试剂盒说明书进行,凋亡细胞为阳性其细胞核呈棕黄色或褐色,在荧光显微镜下观察细胞凋亡数

目,用 Image Pro Plus 软件进行分析,每张切片选取 5 个视野,根据公式凋亡指数=凋亡细胞/总细胞数 $\times$ 100%,记录各组大鼠心肌细胞凋亡情况。

1.3.6 检测各组大鼠心肌组织中 TRP、KYN 浓度 取“1.3.2”中各组大鼠心肌组织 0.5 g 冰浴进行研磨匀浆,离心取上清液置于透析带内,加透析液,于 4℃摇床透析 36 h,取透析液 100 μ L 于离心管中,离心 14 000 r/min,10 min,取上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤后,用高效液相色谱仪进行分析,色谱柱为 Agilent TC-C₁₈(250 mm $\times$ 5 mm,5 μ m),乙腈为流动相,流速 1.0 mL/min,在紫外波长为 280 nm 检测 TRP 色谱,紫外波长为 360 nm 检测 KYN 色谱,根据 TRP、KYN 标准曲线,计算 TRP、KYN 浓度及 KYN/TRP 比值。

1.3.7 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2、cleaved-caspase3、IDO 蛋白表达情况 取“1.3.2”中各组大鼠心肌组织 0.5 g 提取蛋白,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,取 50 μ g 蛋白变性,进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、孵育一抗(抗 Bax、Bcl-2、cleaved -caspase3、IDO、GAPDH 抗体,1:1 000)4℃过夜,次日加二抗(1:5 000),室温孵育 2 h,加 ECL 化学发光剂进行显色,用 GAPDH 作内参,Image J 软件进行灰度分析。

1.4 统计学方法 用 SPSS 22.0 软件进行分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFN 减少血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的生成 I/R 组较 Control IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高(均 $P < 0.05$);I/R+L SFN、I/R+H SFN 组较 I/R 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著降低,且呈剂量依赖($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 SFN 减轻对大鼠心肌组织病理症状 Control 大鼠心肌细胞形态结构完整,排列整齐,纤维结构排列规则;与 Control 相比,I/R 组大鼠心肌细胞破碎、坏死,细胞排列不规则,心肌纤维断裂,伴有炎

表 1 SFN 对大鼠血清中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的影响(μ g/L, $\bar{x} \pm s$)

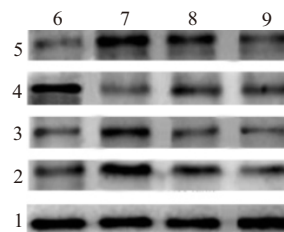
组别	鼠数	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Control	10	116.84 $\pm$ 10.05	398.76 $\pm$ 20.31	210.04 $\pm$ 12.56
I/R	10	297.32 $\pm$ 13.12 ^①	657.34 $\pm$ 25.17 ^①	483.16 $\pm$ 20.31 ^①
I/R+L SFN	10	235.13 $\pm$ 14.24 ^{①②}	595.16 $\pm$ 30.02 ^{①②}	376.42 $\pm$ 28.23 ^{①②}
I/R+H SFN	10	208.76 $\pm$ 16.56 ^{①②③}	482.34 $\pm$ 30.55 ^{①②③}	287.39 $\pm$ 27.05 ^{①②③}
<i>F</i> 值		299.59	184.74	263.48
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Control 为假手术组,I/R 为模型组,I/R+L SFN 为萝卜硫素低剂量组,I/R+H SFN 为萝卜硫素高剂量组。

①与 Control 组相比, $P < 0.05$ 。②与 I/R 组相比, $P < 0.05$ 。③与 I/R+L SFN 组相比, $P < 0.05$ 。

性细胞浸润;与 I/R 组相比,I/R+L SFN、I/R+H SFN 组大鼠心肌细胞上述病理症状明显减轻。见图 1。

2.3 SFN 减少大鼠心肌细胞凋亡 与 Control 相比,I/R 组大鼠心肌细胞凋亡指数显著升高($P < 0.05$),心肌组织 Bax、IDO、cleaved -caspase3 蛋白水平显著升高($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白水平显著降低($P < 0.05$;图 4);与 I/R 组相比,I/R+L SFN、I/R+H SFN 组大鼠心肌细胞凋亡指数依次降低($P < 0.05$),心肌组织 Bax、cleaved -caspase3、IDO 蛋白水平显著降低($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白水平显著升高($P < 0.05$),见图 2,3,表 2。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—吡哆胺 2,3-双加氧酶(IDO);3—活化胱天蛋白酶 3(cleaved -caspase3);4—B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2);5—B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax);6—假手术组(Control);7—模型组(I/R);8—萝卜硫素低剂量组(I/R+L SFN);9—萝卜硫素高剂量组(I/R+H SFN)。

图 3 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2、cleaved -caspase3、IDO 蛋白表达

表 2 SFN 对大鼠心肌组织 Bax、Bcl2、caspase3、IDO 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	凋亡指数	Bax	Bcl2	cleaved -caspase3	IDO
Control	10	1.07 $\pm$ 0.08	0.67 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.02
I/R	10	32.85 $\pm$ 3.13 ^①	0.95 $\pm$ 0.03 ^①	0.66 $\pm$ 0.04 ^①	0.92 $\pm$ 0.02 ^①	1.02 $\pm$ 0.04 ^①
I/R+L SFN	10	21.32 $\pm$ 2.57 ^{①②}	0.86 $\pm$ 0.03 ^{①②}	0.72 $\pm$ 0.03 ^{①②}	0.84 $\pm$ 0.03 ^{①②}	0.97 $\pm$ 0.03 ^{①②}
I/R+H SFN	10	16.64 $\pm$ 1.02 ^{①②③}	0.77 $\pm$ 0.02 ^{①②③}	0.87 $\pm$ 0.02 ^{①②③}	0.73 $\pm$ 0.02 ^{①②③}	0.91 $\pm$ 0.01 ^{①②③}
<i>F</i> 值		397.37	151.84	168.62	182.93	80.44
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:Control 为假手术组,I/R 为模型组,I/R+L SFN 为萝卜硫素低剂量组,I/R+H SFN 为萝卜硫素高剂量组,Bax 为 B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白,Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2,cleaved -caspase3 为活化胱天蛋白酶 3,IDO 为吡哆胺 2,3-双加氧酶。

①与 Control 组相比, $P < 0.05$ 。②与 I/R 组相比, $P < 0.05$ 。③与 I/R+L SFN 组相比, $P < 0.05$ 。

2.4 SFN降低大鼠心肌组织TRP、KYN表达水平 与Control相比,I/R组大鼠心肌组织TRP、KYN浓度、KYN/TRP比值显著升高($P<0.05$);与I/R组相比,I/R+L SFN、I/R+H SFN组大鼠心肌组织TRP、KYN浓度、KYN/TRP比值依次降低($P<0.05$)。见表3。

表3 SFN对大鼠心肌组织TRP、KYN的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	TRP/(pmol/L)	KYN/(pmol/L)	KYN/TRP比值
Control	10	402.23±23.55	215.31±20.03	0.54±0.03
I/R	10	783.75±30.32 ^①	567.54±28.18 ^①	0.72±0.02 ^①
I/R+L SFN	10	654.62±28.35 ^{①②}	446.57±25.46 ^{①②}	0.68±0.02 ^{①②}
I/R+H SFN	10	527.30±27.09 ^{①②③}	312.73±23.28 ^{①②③}	0.59±0.01 ^{①②③}
F值		358.13	397.56	150.19
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Control为假手术组,I/R为模型组,I/R+L SFN为萝卜硫素低剂量组,I/R+H SFN为萝卜硫素高剂量组,TRP为色氨酸,KYN为大尿氨酸。

①与Control组相比, $P<0.05$ 。②与I/R组相比, $P<0.05$ 。③与I/R+L SFN组相比, $P<0.05$ 。

3 讨论

再灌注是治疗缺血性心脏病的主要方法,但再灌注会引起组织的持续损伤,心肌细胞的凋亡和炎症反应是心肌缺血再灌注损伤的关键过程^[11]。心肌缺血再灌注损伤发病机制较为复杂,研究显示,再灌注损伤是由于炎症细胞因子表达增加引起的,IL-1 β 、IL-6是促进炎症因子,TNF- α 是一种细胞信号转导蛋白,可促进炎症介质的表达,共同调控机体炎症反应^[12]。本研究发现,I/R组较Control大鼠心肌细胞破碎、坏死,细胞排列不规则,心肌纤维断裂,伴有炎性细胞浸润,血清中炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著升高,与申震等^[13]研究结果一致,提示心肌缺血再灌注引起心肌组织发生炎症反应和损伤。因此,改善心肌缺血再灌注在缺血性心脏病的治疗中具有重要意义。SFN是一种异硫氰酸酯,具有抗氧化活性,对心血管疾病有治疗作用。Bonetto等^[14]研究显示,SFN能够减轻炎症反应,调节局部缺血后心室功能。本研究发现,SFN治疗后较I/R组大鼠心肌细胞上述病理症状明显减轻,血清中炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量依次降低,提示SFN可以抑制炎症因子分泌,缓解心肌组织炎症反应和心肌损伤。

细胞凋亡是促炎性程序性细胞死亡,抑制细胞凋亡可以减轻再灌注损伤^[15]。Bcl-2是抑制细胞凋亡因子,Bax通过激活cleaved -capase3引起细胞凋亡,在细胞凋亡过程中起着重要作用^[16]。Peng等^[17]研究显示,SFN可以抑制细胞凋亡,对心肌具有保护

作用。本研究发现,与I/R组相比,SFN治疗后较I/R组大鼠心肌细胞凋亡指数、促凋亡相关蛋白Bax、cleaved -capase3表达显著降低,抑凋亡蛋白Bcl-2表达显著升高,提示SFN通过调控凋亡相关蛋白表达,抑制心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡。

TRP-KYN是机体色氨酸分解代谢的主要途径,参与免疫性疾病、神经精神性疾病、心血管疾病等疾病的发生^[18-19]。IDO是KYN途径催化TRP降解的限速酶,由促炎性刺激和T辅助细胞相关细胞因子TNF- α 、IL-6等诱导参与细胞凋亡^[20]。研究显示,TRP-KYN通过调控巨噬细胞、T细胞、B细胞等免疫细胞介导炎症、免疫激活等反应在心肌缺血再灌注损伤等心血管疾病中发挥重要作用^[21]。杨梦等^[22]研究发现,通过调节大鼠体内氨基酸代谢、能量代谢及氧化应激反应,可以有效缓解高血压心力衰竭大鼠尿液代谢的异常。Baumgartner等^[23]研究显示,通过TRP-KYN介导的信号传导是参与调节血管炎症的重要机制。本研究发现,I/R组较Control大鼠心肌组织TRP、KYN浓度、KYN/TRP比值、IDO蛋白表达显著升高,SFN治疗后较I/R组大鼠心肌组织TRP、KYN浓度、KYN/TRP比值、IDO蛋白表达依次降低,提示TRP、KYN浓度、KYN/TRP比值和IDO蛋白表达与心肌缺血再灌注损伤有关,SFN可以抑制IDO、TRP、KYN、KYN/TRP表达,推测SFN可能通过抑制TRP-KYN信号通路,减少心肌细胞凋亡,缓解机体炎症反应,对心肌损伤有保护作用。

综上所述,SFN可能通过抑制TRP-KYN信号通路,缓解机体炎症反应,减少心肌细胞凋亡,对心肌损伤有保护作用,但其具体作用机制仍需进一步研究,补充SFN对心肌梗死损伤等多方面进行补充验证。

(本文图1,2见插图1-3)

参考文献

- [1] CHI HJ, CHEN ML, YANG XC, et al. Progress in therapies for myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(15):1712-1721.
- [2] SHIN B, COWAN DB, EMANI SM, et al. Mitochondrial transplantation in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 11(982):595-619.
- [3] 朱涛,王永翠.萝卜硫素通过Traf6/TAK1信号通路介导人胃癌细胞凋亡的机制研究[J].天津中医药,2018,35(9):710-713.
- [4] 李玉慈,王玲,罗丹,等.萝卜硫素调控JAK2/STAT3信号通路抑制缺血再灌注心肌细胞损伤的保护机制[J].中国现代应用药学,2018,35(4):552-555.
- [5] KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA J, GAȚAREK P, CHIRUMBOLO S, et al. How important is tryptophan in human health? [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2019, 59(1):72-88.
- [6] GAO J, XU K, LIU H, et al. Impact of the gut microbiota on in-

- testinal immunity mediated by tryptophan metabolism[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8:13-24.
- [7] LABADIE BW, BAO R, LUKE JJ. Reimagining IDO pathway inhibition in cancer immunotherapy via downstream focus on the tryptophan-kynurenine-aryl hydrocarbon axis[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(5):1462-1471.
- [8] 苏旭. 色氨酸/犬尿氨酸代谢途径在ST段抬高型心肌梗死患者中的预后研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2019: 1-61.
- [9] 李云鹏, 杨玉丹, 郭胜存, 等. 萝卜硫素对脓毒症小鼠心肌损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(8): 1106-1110.
- [10] 刘俊宏, 王昌权, 夏涛, 等. 荳蔻花提取物对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2019, 30(1): 68-72.
- [11] LUO T, ZENG X, YANG W, et al. Treatment with metformin prevents myocardial ischemia-reperfusion injury via STEAP4 signaling pathway[J]. Anatol J Cardiol, 2019, 21(5):261-271.
- [12] WANG HW, LIU HJ, CAO H, et al. Diosgenin protects rats from myocardial inflammatory injury induced by ischemia-reperfusion[J]. Med Sci Monit, 2018, 12(24):246-253.
- [13] 申震, 朱付平, 刘天举, 等. 桃红四物液对大鼠肢体缺血-再灌注损伤TNF- α 、IL-1 β 、IL-6表达的影响研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4):790-793.
- [14] BONETTO JH, FERNANDES RO, SEOLIN BG, et al. Sulforaphane improves oxidative status without attenuating the inflammatory response or cardiac impairment induced by ischemia-reperfusion in rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(5):508-516.
- [15] 李兵. 丹参多酚酸盐对大鼠心肌缺血再灌注后心肌细胞凋亡的抑制作用及机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(2):192-195.
- [16] YE B, CHEN X, DAI S, et al. Emodin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting gasdermin D-mediated pyroptosis in cardiomyocytes[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 25(13):975-990.
- [17] PENG N, JIN L, HE A, et al. Effect of sulphoraphane on newborn mouse cardiomyocytes undergoing ischaemia/reperfusion injury[J]. Pharm Biol, 2019, 57(1):753-759.
- [18] LEBLHUBER F, STEINER K, SCHUETZ B, et al. Probiotic supplementation in patients with alzheimer's dementia - an explorative intervention study[J]. Curr Alzheimer Res, 2018, 15(12): 1106-1113.
- [19] 唐悦恒, 董慧. 犬尿氨酸途径与2型糖尿病的相关性研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(10):1909-1914.
- [20] WANG Y, HU GF, WANG ZH. The status of immunosuppression in patients with stage III B or IV non-small-cell lung cancer correlates with the clinical characteristics and response to chemotherapy[J]. Onco Targets Ther, 2017, 19(10):3557-3566.
- [21] SONG P, RAMPRASATH, WANG H, et al. Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(16):2899-2916.
- [22] 杨梦, 胡志希, 李琳, 等. 参麦注射液对高血压心力衰竭模型大鼠尿液代谢组学的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(4): 334-339.
- [23] BAUMGARTNER R, BERG M, MATIC L, et al. Evidence that a deviation in the kynurenine pathway aggravates atherosclerotic disease in humans[J]. J Intern Med, 2020, 289(1):53-68.

(收稿日期:2020-10-22,修回日期:2020-11-13)

引用本文:杨晓玲,赖丽金,谭桂兰.千金藤素调控肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的实验研究[J].安徽医药,2023,27(1):64-68.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.01.014.

◇ 药学研究 ◇



千金藤素调控肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的实验研究

杨晓玲,赖丽金,谭桂兰

作者单位:深圳市龙华区人民医院全科医学,广东 深圳 518000

摘要: **目的** 探讨千金藤素对肝癌细胞 HepG2 增殖、凋亡的影响和机制。**方法** 2020年1—6月,从上海通派生物科技有限公司购入肝癌细胞 HepG2,用千金藤素(20 $\mu\text{mol/L}$)处理肝癌细胞 HepG2,MTT 方法测定增殖活性,PI 单染法检测细胞周期,Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡,蛋白质印迹法(Western blotting)检测细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、p21、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、活化胱天蛋白酶 3(cleaved caspase-3)、核因子 κB p65(NF- κB p65)蛋白表达。用 NF- κB 信号激活剂和千金藤素联合处理肝癌细胞,检测细胞增殖、周期、凋亡变化。**结果** 千金藤素处理后的肝癌细胞增殖活性下降,细胞 G_0/G_1 期比例 $[(65.81\pm 3.73)\% \text{ 比 } (50.61\pm 4.17)\%]$ 升高,细胞凋亡率 $[(13.47\pm 1.58)\% \text{ 比 } (2.18\pm 0.12)\%]$ 升高,细胞中 p21、Bax、cleaved-caspase-3 蛋白水平升高,cyclin D1 蛋白水平下降,NF- κB p65 蛋白水平 $(0.19\pm 0.02 \text{ 比 } 0.36\pm 0.05)$ 降低。NF- κB 信号激活剂处理可以提高千金藤素条件下肝癌细胞增殖活性 $(0.46\pm 0.03 \text{ 比 } 0.35\pm 0.04)$,减少 G_0/G_1 期比例,降低细胞凋亡率,降低细胞中 p21、Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平,提高细胞中 cyclin D1 和 NF- κB p65 蛋白水平。**结论** 千金藤素抑制肝癌细胞增殖,阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡,作用机制与抑制 NF- κB 信号激活有关。

关键词: 肝肿瘤; HepG2 细胞; 癌基因蛋白质 p65(gag-jun); 千金藤素; NF- κB 信号; 凋亡