

通心络对大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡的影响

位 庚¹ 李红蓉¹ 刘红利² 姚 兵³ 陈 檬³ 梁俊清³ 贾振华⁴ 吴以岭¹

摘要 目的 探讨通心络(Tongxinluo, TXL)对同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)诱导大鼠心肌微血管内皮细胞内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)致细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 采用植块法原代培养大鼠心肌微血管内皮细胞,倒置显微镜观察细胞形态并通过 CD31 免疫荧光法对培养的大鼠心肌微血管内皮细胞进行辨别、鉴定。取 2~4 代生长良好的大鼠心肌微血管内皮细胞,采用免疫荧光法检测葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)表达以确定 Hcy 最佳作用时间。后续实验分为 5 组:空白对照组、Hcy 诱导组(Hcy 10 mmol/L, 10 h)、Hcy + TXL 组(Hcy 10 mmol/L + TXL 400 μ g/mL)、Hcy + LY294002 组(Hcy 10 mmol/L + LY294002 5 μ mol/L, LY294002 为 PI3K 抑制剂)及 Hcy + LY294002 + TXL 组(Hcy 10 mmol/L + LY294002 5 μ mol/L + TXL 400 μ g/mL)。采用流式细胞仪检测大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡率,实时荧光定量反转录 PCR(Real-Time Reverse Transcription PCR, RT-PCR)及 Western blot 法检测 GRP78、C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-12(cysteinyI aspartate specific proteinase-12, Caspase-12) mRNA 及蛋白表达,Western blot 法检测磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase, P-PI3K)、总磷脂酰肌醇 3-激酶(total phosphatidylinositol 3-kinase, T-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylation of kinase B, P-Akt)及总的蛋白激酶 B(total kinase B, T-Akt)蛋白表达。**结果** 确定 Hcy 作用时间为 10 h。与空白对照组比较, Hcy 诱导组细胞凋亡率(22.77%)升高, GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 及蛋白表达升高, P-PI3K 和 P-Akt 蛋白表达降低, P-PI3K/T-PI3K 及 P-Akt/T-Akt 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 Hcy 诱导组比较, Hcy + TXL 组细胞凋亡率(10.17%)降低, GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 及蛋白表达降低, P-PI3K 和 P-Akt 蛋白表达升高, P-PI3K/T-PI3K 及 P-Akt/T-Akt 升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 Hcy + TXL 组比较, Hcy + TXL + LY294002 组细胞凋亡率(17.9%)升高, GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 及蛋白表达升高, P-PI3K 和 P-Akt 蛋白表达降低, P-PI3K/T-PI3K 及 P-Akt/T-Akt 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 通心络可抑制 Hcy 诱导的 ERS 致大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡,其机制可能与激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词 通心络;同型半胱氨酸;内质网应激;大鼠心肌微血管内皮细胞;细胞凋亡;磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

Effect of Tongxinluo on Apoptosis of Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells WEI Geng¹, LI Hong-rong¹, LIU Hong-li², YAO Bing³, CHEN Meng³, LIANG Jun-qing³, JIA Zhen-hua⁴, and WU Yi-ling¹ 1 Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017); 2 Graduate School, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing (210023); 3 Hebei Yiling Institute of Pharmaceuticals, Shijiazhuang (050035); 4 Department of Cardiology, Yiling Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang (050091)

ABSTRACT Objective To observe the protective effects of Tongxinluo (TXL) on apoptosis of rat cardiac microvascular endothelial cells (RCMECs) resulting from homocysteine (Hcy) induced endo-

基金项目:国家重点基础研究发展计划(No. 2012CB518600)

作者单位:1.河北医科大学研究生院(石家庄 050017);2.南京中医药大学研究生院(南京 210023);3.河北以岭医药研究院(石家庄 050035);4.河北医科大学附属以岭医院心内科(石家庄 050091)

通讯作者:吴以岭, Tel: 0311-66703020, E-mail: weitcm@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.06.0709

plasmic reticulum stress (ERS), and to determine the signaling pathway behind its protection. Methods Primary cultured RCMECs were isolated from neonatal rats using tissue explant method. The morphology of RCMECs was observed using inverted microscope, identified and differentiated by CD31 immunofluorescence method. Selected were well growing 2nd–4th generations of RCMECs. The optimal action time was determined by detecting the expression of glucose regulated protein 78 (GRP78) using immunofluorescence method. In the next experiment RCMECs were divided into 5 groups, i.e., the blank control group, the Hcy induced group (Hcy 10 mmol/L, 10 h), the Hcy + TXL group (Hcy 10 mmol/L + TXL 400 μ g/mL), the Hcy + LY294002 group (Hcy 10 mmol/L + LY294002 5 μ mol/L, LY294002 as the inhibitor of PI3K), the Hcy + LY294002 + TXL group (Hcy 10 mmol/L + LY294002 5 μ mol/L + TXL 400 μ g/mL). The apoptosis rate of RCMECs was detected by flow cytometry. mRNA and protein expressions of GRP78, C/EBP homologous protein (CHOP), and cysteinyl aspartate specific proteinase-12 (caspase12) were detected by real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot respectively. Expression levels of phosphorylation of phosphatidylinositol 3-kinase (P-PI3K), total phosphatidylinositol 3-kinase (T-PI3K), phosphorylation of kinase B (P-Akt), and total kinase B (T-Akt) were detected by Western blot. Results Ten hours Hcy action time was determined. Compared with the blank control group, the apoptosis rate was increased (22.77%), mRNA and protein expressions of GRP78, CHOP, and Caspase-12 were increased, protein expressions of P-PI3K and P-Akt, ratios of P-PI3K/T-PI3K and P-Akt/T-Akt were decreased in the Hcy induced group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Hcy induced group, the apoptosis rate was decreased (10.17%), mRNA and protein expressions of GRP78, CHOP, and Caspase-12 were decreased, and expression levels of P-PI3K, P-Akt, P-PI3K/T-PI3K, and P-Akt/T-Akt were increased in the Hcy + TXL group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Hcy + TXL group, the apoptosis rate was increased (17.9%), mRNA and protein expressions of GRP78, CHOP, and Caspase-12 were increased, expression levels of P-PI3K and P-Akt, ratios of P-PI3K/T-PI3K and P-Akt/T-Akt were decreased in the Hcy + TXL + LY294002 group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion TXL could inhibit the apoptosis of RCMECs resulting from Hcy-induced ERS and its mechanism might be associated with activating PI3K/Akt signaling pathway.

KEYWORDS Tongxinluo; homocysteine; endoplasmic reticulum stress; rat cardiac microvascular endothelial cell; apoptosis; phosphatidylinositol 3 kinase/kinase B

大量临床和实验研究已经证实,高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)已成为动脉粥样硬化、急性心肌梗死、冠状动脉病变、脑卒中等发病的独立危险因素^[1-3]。血管内皮细胞凋亡在心脑血管疾病的发展过程中起着非常重要的作用,而同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)可诱发血管内皮细胞凋亡^[4],其具体机制尚不清楚。因此,探讨 Hcy 诱导血管内皮细胞的凋亡机制具有十分重要的意义。通心络在心血管疾病的防治中效果显著,与其具有改善血管内皮功能、抗凋亡等作用有关^[5]。本研究采用体外培养的大鼠心肌微血管内皮细胞(rat cardiac microvascular endothelial cells, RCMECs)建立 Hcy 诱导内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)损伤模型,在基因及蛋白水平观察 ERS 指标葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein78, GRP78)、C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous

protein, CHOP)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-12 (cysteinyl aspartate specific proteinase-12, Caspase-12)的表达,探讨通心络是否通过减轻 ERS 来降低 RCMECs 凋亡。另外通过磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)的特异性抑制剂 LY294002 干预,进一步分析通心络是否通过 PI3K/Akt 信号转导途径抑制 ERS 发挥作用。

材料与方法

1 实验动物 2 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 10 只,体重(30 $\pm$ 5)g,由北京富豪实验动物养殖中心提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2011-0012。

2 实验药物 通心络(Tongxinluo, TXL,由人参、水蛭、全蝎、麝香、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、酸枣仁、檀香、降香、乳香及冰片组成,每克药粉含生药 1.47 g)药粉,石家庄以岭药业股份有限公司生产,批号:S-130901。

3 主要试剂及仪器 DL-Homocysteine(美国 Sigma 公司,批号:H4628);内皮细胞培养套装(美国 ScienCell 公司,批号:1001),内含内皮细胞基础培养基(ECM)、内皮生长因子补充剂(ECGS)、青霉素/链霉素双抗生素(P/S)、胎牛血清(FBS);磷酸盐缓冲液(美国 HyClone 公司,批号:SH30256.01B);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:KGA108);CD31 小鼠抗大鼠单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab119339);GRP78、CHOP、Caspase-12 引物均购自上海生工生物公司;RNA 提取试剂 Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司,批号:15596-026);反转录试剂盒(美国 Fermentas 公司,批号:K1622);荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Fermentas 公司,批号:K0221);PI3K p85(phospho Y607)兔抗大鼠多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab182651);PI3K 兔抗大鼠多克隆抗体(美国 CST 公司,批号:4292s);PI3K p85(phospho Y607)兔抗大鼠多克隆抗体、Akt1(phosphor S473)兔抗大鼠单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab182651);Akt1/2/3 兔抗大鼠单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab179463);GRP78 兔抗大鼠多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab81283);CHOP 小鼠抗大鼠单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab11419);Caspase-12 兔抗大鼠多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号:ab62484);DyLight 488 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体和 DyLight 488 标记的羊抗兔 IgG 抗体(美国 Abcam 公司);PI3K 特异性抑制剂 LY294002(美国 Selleck 公司,批号:S1105)。

3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);SW-CJ-2FD 洁净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);PrimoVert 倒置显微镜(德国 Zeiss 公司);VCX 超声破碎仪(美国 Sonics 公司);Avant1 J-26XP 台式离心机(美国 Beckman 公司);FACS Aria III 超速流式细胞分选系统(美国 BD 公司);C10281 自动细胞计数仪(美国 Invitrogen 公司);Operetta 高通量高内涵细胞分析系统(美国 PerkinELmer 公司);ABI 7300 Real-Time PCR System(美国 ABI 公司);UVP 凝胶扫描系统(美国 UVP 公司);电转膜仪、半干转膜仪、垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

4 实验药物配制 参照文献[6]。称取 TXL 药粉溶于无血清 ECM 培养基,超声促溶 20 min,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,用 0.22 μ m

微孔滤器过滤除菌,将所得沉淀于 60 $^{\circ}$ C 加热烘干,计算实际溶于无血清 ECM 培养基药物重量,制备成 10 mg/mL TXL 贮存液,分装后 -20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

5 实验分组、干预方法、检测指标及方法

5.1 原代 RCMECs 分离和培养 采用植块法分离和培养原代 RCMECs,参照参考文献[7]方法并加以适当改进,取大鼠颈椎脱臼法处死,75%酒精浸泡消毒约 2 min,无菌超净台内沿胸骨剪开胸腔,将心脏剪下,4 $^{\circ}$ C 预冷 PBS 缓冲液冲洗心脏污渍,剪除上部的大血管和心房组织,轻柔撕除心外膜及心内膜,将剔除干净的心室肌组织剪成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 组织块。将心室肌组织小块均匀贴附于直径 10 cm 培养皿底壁,培养皿预先以 1 mL FBS 润湿底壁,尽量使组织块均匀分布于培养皿底壁,将培养皿置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。4 h 后组织块紧贴于培养皿底,此时加入含有 5% FBS、1% ECGS 和 1% P/S 的 ECM 培养基 7~8 mL,放入培养箱中继续培养 72 h,这时组织块周围有一定量的梭形、多角型或星型细胞爬出,吸管轻轻吸去组织块。细胞换液继续培养待生长至 80% 汇合状态,以 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取第 2~4 代用于实验。

5.2 原代 RCMECs 鉴定 参照参考文献[8],倒置显微镜下观察细胞形态,采用细胞免疫荧光法检测 RCMECs 胞膜上内皮细胞特异性抗原 CD31 表达。将原代培养的细胞消化后,接种于 96 孔板中,约 1~2 d 后细胞生长铺满皿底,弃上清,4% 多聚甲醛固定 10 min,PBS 冲洗 3 次,0.5% Triton X-100 孵育细胞 5 min;PBS 冲洗 3 次后用封闭液(LI-COR blocking buffer)室温封闭细胞 30 min;加入 1:200 稀释的 CD31 一抗孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜,DyLight 488 标记的荧光二抗 1:200 稀释室温避光孵育 1 h,甘油封片后高通量高内涵细胞分析系统检测 CD31 表达。

5.3 免疫荧光法检测 GRP78 蛋白表达 采用高通量高内涵细胞分析系统检测 GRP78 蛋白免疫荧光强度。实验分为 7 组:(1)空白对照组:RCMECs 正常培养;(2)Hcy 5 h 组:培养液中加入终浓度为 10 mmol/L Hcy 培养 5 h;(3)Hcy 5 h + TXL 组:培养液中加入终浓度为 400 μ g/mL TXL 与 RCMECs 共同孵育 4 h,再加入终浓度为 10 mmol/L Hcy 培养 5 h;(4)Hcy 10 h 组:培养液中加入终浓度为 10 mmol/L Hcy 培养 10 h;(5)Hcy 10 h + TXL 组:培养液中加入终浓度为 400 μ g/mL TXL 与 RCMECs 共同孵育 4 h,再加入终浓度为 10 mmol/L Hcy 培养 10 h;(6)Hcy 20 h 组:培养液中加入终浓度为

10 mmol/L Hcy 培养 10 h;(7)Hcy 20 h + TXL 组:培养液中加入终浓度为 400 μg/mL TXL 与 RCMECs 共同孵育 4 h,再加入终浓度为 10 mmol/L Hcy 培养 20 h.以每孔 1×10^4 cells 接种于 96 孔板中,每组 3 个复孔,用含有 5% FBS、1% ECGS 和 1% P/S 的 0.1 mL ECM 培养。置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,吸弃上清,空白对照组换无血清的 ECM 基础培养基,其余各组按上述方案进行干预。各组细胞干预到规定的时间后,吸弃上清,预冷的 PBS 冲洗 3 次,立即加入 4% 多聚甲醛固定液,室温固定 15 min;PBS 冲洗 3 次,洗涤残留固定液,0.5% Triton X-100 孵育细胞 5 min;PBS 冲洗 3 次洗去通透溶液,之后用封闭液 (LI-COR blocking buffer) 室温封闭细胞 30 min;分别加入 1:200 的 GRP78 兔抗大鼠多克隆抗体,4 ℃ 过夜;PBS 冲洗 3 次,再分别加入 1:200 稀释的羊抗兔多克隆荧光二抗室温避光孵育 1 h;PBS 冲洗 3 次后,90% 甘油封闭。采用高通量高内涵细胞分析系统检测,目的蛋白免疫荧光强度以实验组与空白对照组免疫荧光强度比值进行统计分析。

5.4 实验分组及干预方法 根据 GRP78 的免疫荧光检测结果,后续实验分为 5 组。(1)空白对照组:RCMECs 正常培养;(2)Hcy 诱导组:培养液中加入终浓度为 10 mmol/L Hcy 培养 10 h;(3)Hcy + TXL 组:培养液中加入终浓度为 400 μg/mL TXL 与 RCMECs 共同孵育 4 h,再加入终浓度为 10 mmol/L Hcy 培养 10 h;(4)Hcy + LY294002 组:培养液中加入终浓度为 5 μmol/L LY294002 与 RCMECs 共同孵育 30 min,再加入终浓度 10 mmol/L Hcy 培养 10 h;(5)Hcy + LY294002 + TXL 组:培养液中加入终浓度为 5 μmol/L LY294002 与 RCMECs 共同孵育 30 min,然后加入终浓度为 400 μg/mL TXL 与 RCMECs 共同孵育 4 h,再加入终浓度 10 mmol/L Hcy 培养 10 h。

5.5 RCMECs 凋亡率测定 采用 Annexin V-FITC/PI 双标记染色法检测 RCMECs 凋亡率。原代培养的 RCMECs 第 3 代,种于直径 6 cm 皿内,各组细胞相应处理 10 h 后每皿待测细胞为 $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ cells。用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,800 r/min 离心 2 min,弃去上清。用 PBS 冲洗细胞 2 次,轻轻吹打使细胞悬浮,800 r/min 离心 2 min,弃去上清。加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μL Propidium Iodide,轻轻混匀,室温避光反应 10 min。在 1 h 内用流式细胞仪检测。细胞凋亡率 (%) = (晚调细胞数 + 早调细胞

数)/细胞总数 × 100%。

5.6 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 表达检测 采用实时荧光定量反转录 PCR (Real-Time Reverse Transcription PCR, RT-PCR) 法。取第 3 代生长良好的 RCMECs,以每皿 4×10^5 cells 接种于 6 cm 细胞培养皿内,各组细胞相应处理 10 h 后,Trizol 试剂提取总 RNA。用紫外分光光度计检测总 RNA 完整性及纯度,并用 M-MLV 逆转录酶系统和随机引物逆转录。以 β-actin 作为内参照基因,分别与各组比较,得到目的基因表达的相对定量值 (RQ 值),将 RQ 值用于统计分析,引物序列见表 1。

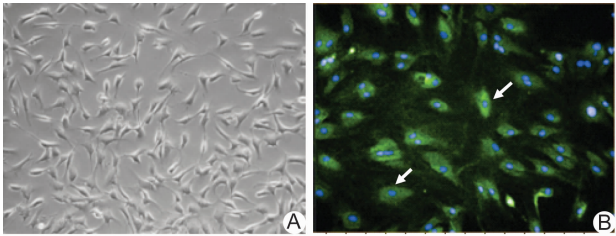
表 1 引物序列		
基因	引物序列	产物大小 (bp)
GRP78	上游 5'-TCTGCTTGATGTGTGTCTCTT-3'	146
	下游 5'-TGATTGTTACGGTGGGCTG-3'	
CHOP	上游 5'-AGTCTCTGCCTTTTCGCCTT-3'	133
	下游 5'-TCTTCCTCTTCGTTTCCTGG-3'	
Caspase-12	上游 5'-TGAGGAATGTGTGTTGAGCC-3'	143
	下游 5'-GTTTGGAAATGAAGAGAGAGGCC-3'	
β-actin	上游 5'-GGTCATACCAATTGGCA-3'	105
	下游 5'-GAGTTGAAGGTAGTTTCGTGGA-3'	

5.7 P-PI3k、T-PI3K、P-Akt、T-Akt、GRP78、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。取第 3 代生长良好的 RCMECs,以每皿 4×10^5 cells 接种于 6 cm 皿内,各组相应处理 10 h 后,加入 40 μL 细胞裂解液于冰上充分裂解 20 min,超声破碎后 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,收集上清取 2 μL 进行蛋白定量后,取等量蛋白样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转膜后封闭,与一抗结合,4 ℃ 过夜后洗膜,与二抗结合,洗膜后用化学发光法检测,以 GAPDH 作为内参,以各目的蛋白吸光度值与 GAPDH 吸光度值的比值进行统计分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著差法,若方差不齐采用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

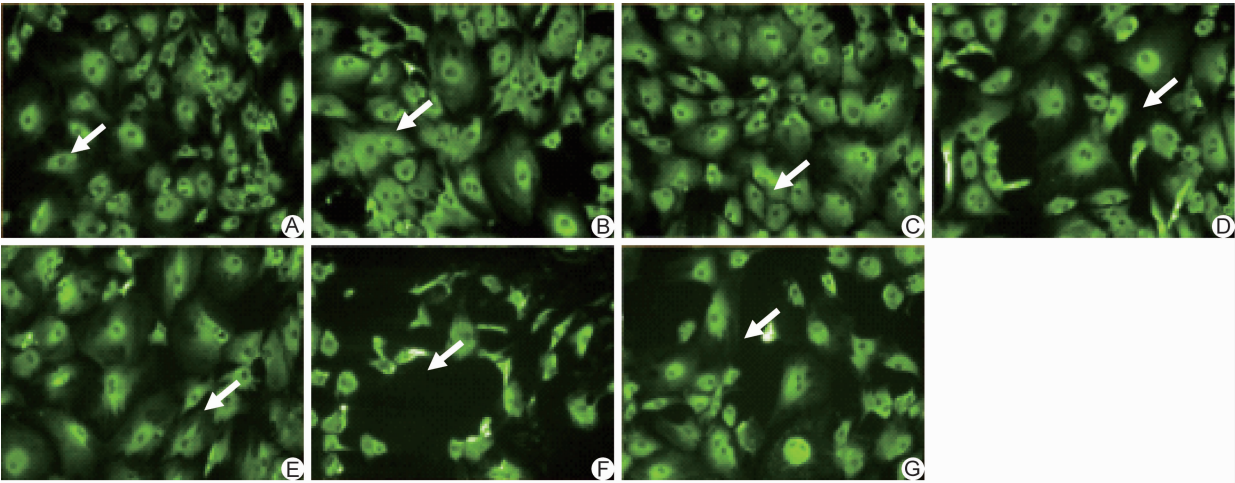
1 RCMECs 形态及鉴定 (图 1) 植块法分离的 RCMECs 培养至第 2 ~ 3 日时,可见未融合状态下单个微血管内皮细胞呈梭形、星型或多角形,去除组织块继续培养至第 5 日时,可见细胞汇合成铺路石样。CD31 免疫荧光鉴定结果显示所提取的 RCMECs 纯度大于 95%。



注:A 为内皮细胞生长;B 为 CD31 免疫荧光染色结果;箭头所示为典型 CD31 蛋白染色

图 1 RCMECs 生长及 CD31 免疫荧光染色结果 (×200)

2 各组 RCMECs GRP78 蛋白表达比较(表 2, 图 2) 与空白对照组比较,Hcy 5 h 组 GRP78 蛋白免疫荧光强度无明显变化($P>0.05$),Hcy 10 h 组及 Hcy 20 h 组 GRP78 蛋白免疫荧光强度升高($P<0.01$)。与 Hcy 10 h 组比较,Hcy 10 h + TXL 组 GRP78 蛋白免疫荧光强度降低($P<0.01$)。与 Hcy 20 h 组比较,Hcy 20 h + TXL 组 GRP78 蛋白免疫荧光强度降低($P<0.01$)。



注:A 为空白对照组;B 为 Hcy 5 h 组;C 为 Hcy 5 h + TXL 组;D 为 Hcy 10 h 组;E 为 Hcy 10 h + TXL 组;F 为 Hcy 20 h 组;G 为 Hcy 20 h + TXL 组;箭头所示为典型 GRP78 蛋白染色

图 2 免疫荧光法检测 GRP78 蛋白表达 (DyLight 488 标记染色法,×200)

表 2 各组 RCMECs GRP78 蛋白免疫
荧光强度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	GRP78
空白对照	3	1.000 ± 0.042
Hcy 5 h	3	1.020 ± 0.033
Hcy 5 h + TXL	3	0.996 ± 0.022
Hcy 10 h	3	1.231 ± 0.026 *
Hcy 10 h + TXL	3	1.110 ± 0.030 Δ
Hcy 20 h	3	1.712 ± 0.048 *
Hcy 20 h + TXL	3	1.613 ± 0.025 Δ

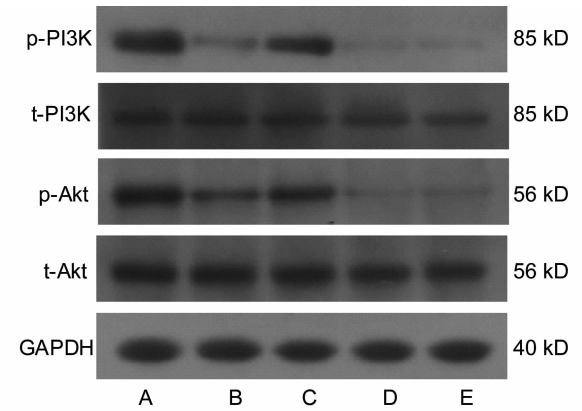
注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与 Hcy 10 h 组比较, $\Delta P<0.01$;与 Hcy 20 h 组比较, $\Delta P<0.01$

3 各组 RCMECs P-PI3K、T-PI3K、P-Akt 和 T-Akt 蛋白表达比较(表 3,图 3) 与空白对照组比较,Hcy 诱导组 P-PI3K、P-PI3K/T-PI3K、P-Akt 和 P-Akt/T-Akt 均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与 Hcy 诱导组比较,Hcy + TXL 组 P-PI3K、P-PI3K/T-PI3K、P-Akt 和 P-Akt/T-Akt 均升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 Hcy + TXL 组比较,Hcy + LY294002 组及 Hcy + LY294002 + TXL 组 P-PI3K、P-PI3K/T-PI3K、P-Akt 和 P-Akt/T-Akt 均降低($P<0.01$)。

表 3 各组 RCMECs P-PI3K、T-PI3K、P-Akt 和 T-Akt 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	P-PI3K	T-PI3K	P-PI3K/T-PI3K	P-Akt	T-Akt	P-Akt/T-Akt
空白对照	3	0.557 ± 0.036	0.835 ± 0.014	0.666 ± 0.036	0.774 ± 0.090	0.986 ± 0.049	0.784 ± 0.081
Hcy 诱导	3	0.290 ± 0.031 **	0.825 ± 0.048	0.352 ± 0.031 **	0.262 ± 0.031 **	0.976 ± 0.021	0.269 ± 0.036 *
Hcy + TXL	3	0.463 ± 0.040 $\Delta\Delta$	0.821 ± 0.028	0.565 ± 0.054 $\Delta\Delta$	0.566 ± 0.054 $\Delta\Delta$	1.015 ± 0.052	0.558 ± 0.057 Δ
Hcy + LY294002	3	0.100 ± 0.009 Δ	0.833 ± 0.043	0.117 ± 0.015 Δ	0.101 ± 0.014 Δ	0.991 ± 0.029	0.102 ± 0.012 Δ
Hcy + LY294002 + TXL	3	0.105 ± 0.007 Δ	0.847 ± 0.023	0.124 ± 0.005 Δ	0.103 ± 0.013 Δ	0.974 ± 0.072	0.106 ± 0.016 Δ

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 Hcy 诱导组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与 Hcy + TXL 组比较, $\Delta P<0.01$



注:A 为空白对照组;B 为 Hcy 诱导组;C 为 Hcy + TXL 组;D 为 Hcy + LY294002 组;E 为 Hcy + LY294002 + TXL 组

图 3 各组 RCMECs P-PI3K、T-PI3K、P-Akt 和 T-Akt 蛋白表达电泳图

4 各组 RCMECs 凋亡率比较(表 4,图 4) 与空白对照组比较,Hcy 诱导组凋亡率升高 ($P < 0.01$)。与 Hcy 诱导组比较,Hcy + TXL 组、Hcy + LY294002 + TXL 组凋亡率降低($P < 0.01$)。与 Hcy + TXL 组比较,Hcy + LY294002 + TXL 组凋亡率升高($P < 0.01$)。

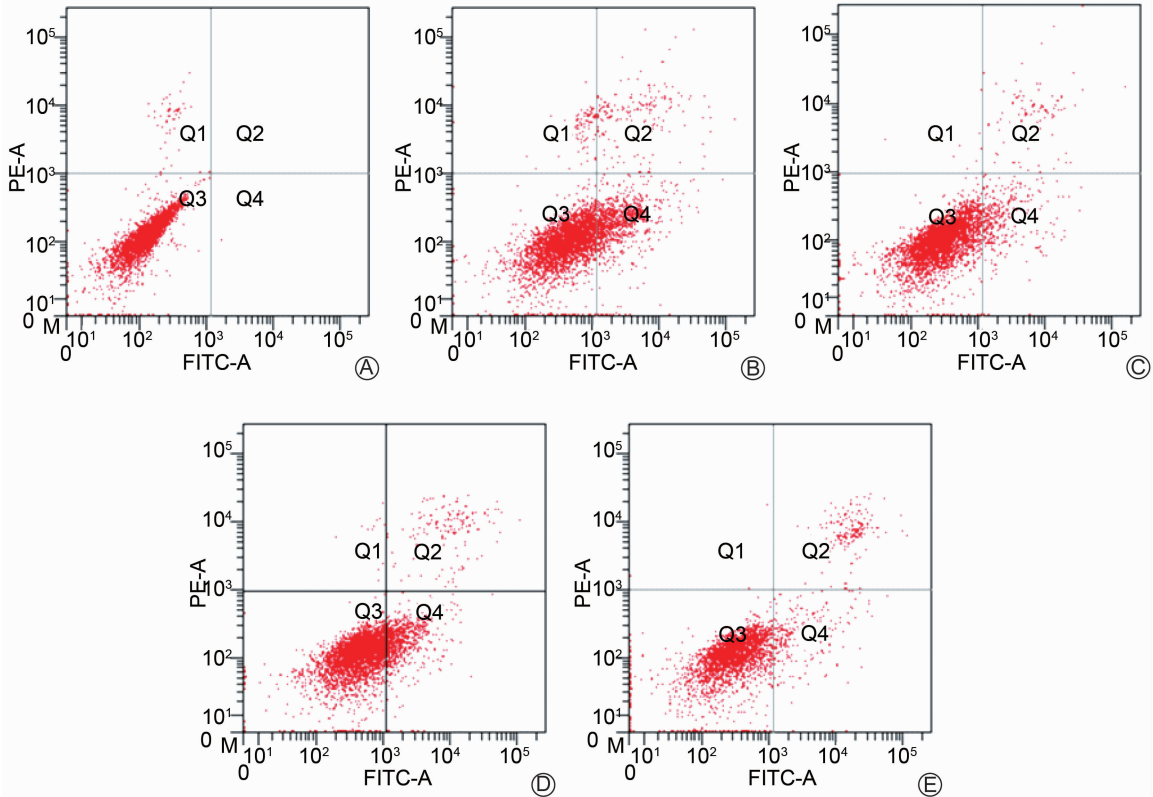
表 4 各组 RCMECs 凋亡率比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率
空白对照	3	0.13 $\pm$ 0.06
Hcy 诱导	3	22.77 $\pm$ 2.66 *
Hcy + TXL	3	10.17 $\pm$ 0.60 Δ
Hcy + LY294002	3	22.43 $\pm$ 1.55
Hcy + LY294002 + TXL	3	17.90 $\pm$ 1.39 $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与 Hcy 诱导组比较, $\Delta P < 0.01$;与 Hcy + TXL 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

5 各组 RCMECs GRP78、CHOP 及 Caspase-12 mRNA 表达比较(表 5,图 5) 与空白对照组比较,Hcy 诱导组 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。与 Hcy 诱导组比较,Hcy + TXL 组、Hcy + LY294002 + TXL 组 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 表达降低($P < 0.01$)。与 Hcy + TXL 组比较,Hcy + LY294002 + TXL 组 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 表达升高($P < 0.01$)。

6 各组 RCMECs GRP78、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达比较(表 6,图 6) 与空白对照组比较,Hcy 诱导组 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 蛋白表



注:A 为空白对照组;B 为 Hcy 诱导组;C 为 Hcy + TXL 组;D 为 Hcy + LY294002 组;E 为 Hcy + LY294002 + TXL 组

图 4 各组流式细胞图 (Annexin V-FITC/PI 双标记染色法)

表 5 各组 RCMECs GRP78、CHOP 及 Caspase-12 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

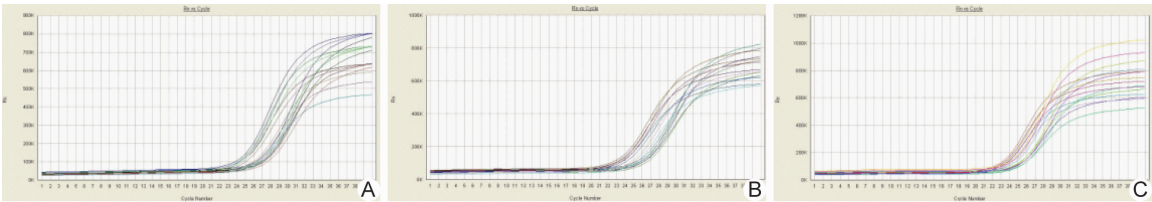
组别	n	GRP78	CHOP	Caspase-12
空白对照	3	1.015 ± 0.046	1.013 ± 0.033	1.014 ± 0.039
Hcy 诱导	3	4.076 ± 0.244 *	5.567 ± 0.025 *	3.811 ± 0.174 *
Hcy + TXL	3	1.776 ± 0.135 Δ	1.942 ± 0.117 Δ	1.919 ± 0.153 Δ
Hcy + LY294002	3	3.794 ± 0.248	4.772 ± 0.312	3.611 ± 0.278
Hcy + LY294002 + TXL	3	2.613 ± 0.066 $\Delta\Delta$	3.173 ± 0.184 $\Delta\Delta$	2.628 ± 0.128 $\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与 Hcy 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 Hcy + TXL 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 6 各组 RCMECs GRP78、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GRP78	CHOP	Caspase-12
空白对照	3	0.445 ± 0.028	0.365 ± 0.044	0.261 ± 0.030
Hcy 诱导	3	1.091 ± 0.037 *	0.957 ± 0.089 *	0.578 ± 0.040 *
Hcy + TXL	3	0.756 ± 0.041 $\Delta\Delta$	0.472 ± 0.029 $\Delta\Delta$	0.305 ± 0.017 $\Delta\Delta$
Hcy + LY294002	3	1.106 ± 0.049	0.989 ± 0.110	0.562 ± 0.066
Hcy + LY294002 + TXL	3	0.936 ± 0.053 $\Delta\Delta\Delta$	0.789 ± 0.032 $\Delta\Delta$	0.455 ± 0.040 $\Delta\Delta\Delta$

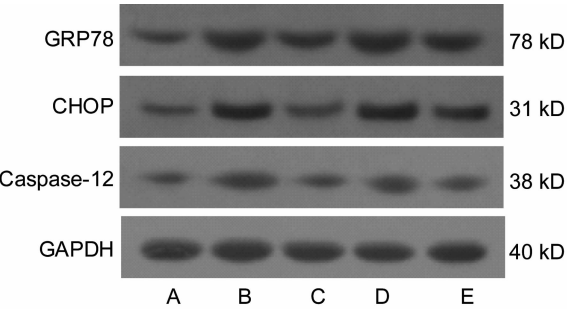
注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与 Hcy 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 Hcy + TXL 组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$



注:A 为 GRP78 RT-PCR 扩增曲线;B 为 CHOP RT-PCR 扩增曲线;C 为 Caspase-12 RT-PCR 扩增曲线

图 5 实时荧光定量反转录 PCR 扩增曲线图

达升高($P < 0.01$)。与 Hcy 诱导组比较,Hcy + TXL 组及 Hcy + LY294002 + TXL 组 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 蛋白表达降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与 Hcy + TXL 组比较,Hcy + LY294002 + TXL 组 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 蛋白表达升高($P < 0.01$)。



注:A 为空白对照组;B 为 Hcy 诱导组;C 为 Hcy + TXL 组;D 为 Hcy + LY294002 组;E 为 Hcy + LY294002 + TXL 组

图 6 各组 RCMECs GRP78、CHOP 及 Caspase-12 蛋白表达电泳图

讨 论

HHcy 是血管性疾病发生的独立危险因素,中医

学根据其临床发病特点归属为“胸痹”、“心痛”、“真心痛”、“眩晕”、“中风”等病证范畴^[9]。心肌微血管位于循环系统的末梢,管壁主要由一层内皮细胞和基膜组成,在血管性疾病的发生过程中,微血管病变的发生要早于其供养的大血管,所以微血管内皮细胞的作用越来越受到人们的重视。基于中医学脉络与中小血管,孙络与微血管、微循环具有高度相关性,提出“脉络—血管系统病”^[10],血液中增高的 Hcy 可以刺激血管壁引起血管的损伤,因此 HHcy 属于脉络学说研究的范畴。“络以通为用”为脉络病变的总体治疗原则, TXL 是在中医学络病理论指导下研制而成的中药复方制剂,由人参、水蛭、全蝎、麝虫、蜈蚣、降香、冰片等组成,具有益气、活血、化瘀通络等功效。大量实验已证实, TXL 具有降脂、抗炎、保护内皮细胞、抑制内皮细胞凋亡、抑制稳定斑块、解除痉挛和保护心脑血管组织等作用^[11-14],本课题组前期动物实验也证实 TXL 可明显改善 Hcy 诱发的血管内皮细胞功能障碍^[15]。ERS 是诱发凋亡的途径之一,已证实在许多细胞损伤中存在,但 TXL 对于能否改善 ERS 引起的凋亡尚未见报道。

细胞发生 ERS 反应是一种自我保护机制,以恢复内质网稳态,但是过强或长时间的 ERS 反应可引起细

胞凋亡。内质网分子伴侣 GRP78 对维持内质网稳态起着重要作用,在 ERS 反应发生时其表达量明显上调,被广泛用作 ERS 的标志^[16]。过度持久的 ERS 能通过激活 CHOP/GADD153、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、Caspase-12 三条通路诱导细胞凋亡。CHOP 对 ERS 最为敏感,是 ERS 特异的一个转录因子,在生理情况下表达很低,但在 ERS 过程中 CHOP 被显著诱导激活,可直接调节核内靶基因,增加细胞对 ERS 介导凋亡的敏感性^[17]。而且有研究表明,Caspase-12 仅特异性地与 ERS 相关,与其他途径介导的细胞凋亡无关^[18]。所以 ERS 所致的细胞凋亡与 CHOP 和 Caspase-12 关系密切,故也可作为 ERS 的标志^[19,20]。ERS 参与了心脑血管疾病的发生发展,其诱导的血管内皮细胞凋亡在这个过程中起着非常重要的作用,所以本研究观察 TXL 对 Hcy 诱导的 RCMECs GRP78、CHOP 和 Caspase-12 表达的影响,以进一步探讨 TXL 抑制内皮细胞凋亡的作用机制。

高通量高内涵技术在细胞模型上应用非常成熟,该技术通过自动显微摄像和图像自动分析,全景式准确、快速、目标导向性的定量检测细胞包括复杂的解剖学结构和生化特性在内的各种表型^[21],这种技术所得出的结果,可为后续的实验研究提供准确的基本数据。本研究首先选用该技术检测 ERS 的标志蛋白 GRP78 的免疫荧光强度,发现细胞造模后 GRP78 的荧光强度从 10 h 开始升高,20 h 进一步升高,说明 Hcy 诱导的 RCMECs 产生了 ERS, TXL 对以上两组细胞干预后,荧光强度均有所下降,结合对细胞形态及融合度的观察,以 Hcy 10 h + TXL 组效果更为显著,故后续的指标检测时间定为 10 h。本实验 Hcy 诱导 RCMECs 后 GRP78、CHOP 和 Caspase-12 mRNA 和蛋白表达均显著升高,表明 Hcy 不但诱导 RCMECs 产生了 ERS,并且激活了 ERS 特有的凋亡通路,流式细胞仪检测细胞凋亡率增高,表明 Hcy 诱导的 ERS 导致了细胞的凋亡。与 Hcy 诱导组比较,加入 TXL 预处理后,其凋亡率和 ERS 标志物的表达均明显降低,表明 TXL 对 RCMECs 凋亡有延缓作用,并且这种保护作用是通过减轻 ERS 实现的。PI3K/Akt 通路是细胞内非常重要的信号转导通路,参与细胞增殖、分化、凋亡等生理功能的调节。Akt 是此通路的重要靶蛋白,多种因子都可以激活 PI3K/Akt 信号通路,使 Akt 磷酸化,磷酸化的 Akt 向内质网、线粒体和细胞核移位,作用于靶蛋白,激活细胞的抗凋亡机制,以减少细胞凋亡。近年来有研究显示 PI3K/Akt 信号转导通路在多种细胞抵抗 ERS 诱导的凋亡中起重

要作用^[22,23]。本研究发现, TXL 显著改善 Hcy 损伤引起的 P-Akt 的表达降低,给予 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 后, TXL 未显示出对 P-Akt 的改善作用,提示 TXL 激活了 PI3K/Akt 通路; Hcy + LY294002 + TXL 组凋亡率及 ERS 标志物的表达量介于 Hcy 诱导组和 Hcy + TXL 组之间,即 LY294002 可能部分消除了 TXL 的保护作用,表明 TXL 对 Hcy 诱导的 ERS 致 RCMECs 凋亡的保护作用,可能部分是通过激活 PI3K/Akt 途径实现的。

本实验就 TXL 抑制 Hcy 诱导 ERS 致 RCMECs 凋亡作用及机制做了初步的研究和探讨, TXL 为复方中成药,作用机制复杂,其是否可以通过其他信号通路调控 ERS 诱导的凋亡,对于其他细胞是否有相同的作用机制等问题尚有待于进一步的研究发现。

参 考 文 献

- [1] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes [J]. JAMA, 1995, 274(13): 1049-1057.
- [2] Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, et al. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 72(2): 324-332.
- [3] Tehlivets O. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: is its conversion to s-adenosyl-L-homocysteine the key to deregulated lipid metabolism? [J]. J Lipids, 2011: 702853.
- [4] Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, et al. Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia [J]. J Cell Biochem, 2006, 98(5): 1150-1162.
- [5] 刘红利, 郎艳松, 王宏涛. 通心络胶囊治疗心血管疾病研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(15): 1769-1772.
- [6] 庞洁, 梁俊清, 王志鑫, 等. 津力达联合通心络对高糖诱导胰岛微血管内皮细胞损伤干预作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(3): 430-435.
- [7] Nishida M, Carley WW, Gerritsen ME, et al. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1993, 264(2 Pt 2): H639-H652.
- [8] 朱凌偶, 王时俊, 丁雪峰. 两种大鼠心肌微血管内皮细胞缺氧模型建立方法的比较 [J]. 临床心血管病杂志, 2014, 30(9): 815-818.
- [9] 韦启志, 陈少玫. 高同型半胱氨酸血症的中医证素初探 [J]. 新中医, 2010, 42(3): 3-5.
- [10] 吴以岭主编. 络论 [M]. 北京: 中国科学技术出版社,

2010;60-64.

- [11] Liu Y, Tang GH, Sun YH, et al. The protective role of Tongxinluo on blood brain barrier after ischemia/reperfusion brain injury[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(2): 632-639.
- [12] Chen L, Wang X, Chen X, et al. Tongxinluo attenuates neuronal loss and enhances neurogenesis and angiogenesis in the ipsilateral thalamus and improves neurological outcome after focal cortical infarction in hypertensive rats[J]. Evid-Based Complement Alternat, 2014, 32(4): 533-546.
- [13] Ma LY, Liu XL, Lu HX, et al. Traditional Chinese medication Tongxinluo inhibits inflammatory angiogenesis via Bmx/NF- κ B/MAPK pathways[J]. Eur Heart J, 2015, 17(Suppl B): B13-B22.
- [14] Cui H, Li X, Li N, et al. Induction of autophagy by Tongxinluo through the MEK/ERK pathway protects human cardiac microvascular endothelial cells from hypoxia/reoxygenation injury[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 64(2): 180-190.
- [15] 梁俊清, 吴以岭, 徐海波, 等. 同型半胱氨酸对血管内皮功能的影响及通心络超微粉的干预作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2008, 24(1): 66-70.
- [16] Chen JC, Wu ML, Huang KC, et al. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression[J]. Cardiovasc Res, 2008, 80(1): 138-150.
- [17] 姚树桐, 刘秀华, 王家富. 缺血后处理抑制缺血再灌注大鼠心肌内质网应激相关凋亡[J]. 微循环学杂志, 2008, 18(3): 16-19.
- [18] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. Nature, 2000, 403(6765): 98-103.
- [19] Guan D, Xu Y, Yang M, et al. N-acetyl cysteine and penicillamine induce apoptosis via the ER stress response-signaling pathway[J]. Mol Carcinog, 2010, 49(1): 68-74.
- [20] Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, et al. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 34287-34294.
- [21] 程肖蕊, 周文霞, 张永祥. 网络药理学实验研究相关技术[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(2): 131-137.
- [22] Gao X, Zhang H, Takahashi T, et al. The Akt signaling pathway contributes to postconditioning's protection against stroke; the protection is associated with the MAPK and PKC pathways[J]. J Neurochem, 2008, 105(3): 943-955.
- [23] Hyoda K, Hosoi T, Horie N, et al. PI3K-Akt inactivation induced CHOP expression in endoplasmic reticulum-stressed cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1): 286-290.

(收稿:2015-11-28 修回:2016-03-09)

第二十次全国儿科中西医结合学术会议通知

为推动我国中西医结合儿科学发展,进步与创新,中国中西医结合学会儿科专业委员会定于2016年8月12—14日在陕西省西安市召开第二十次全国儿科中西医结合学术会议。本次大会以丰富的内容和多样的形式进行学术交流和讨论,并举行论文征集及优秀论文评选活动。诚挚欢迎儿科相关医护人员踊跃参加。会议具体内容及相关参会事宜可通过登录中国中西医结合学会网站获取(www.caim.org.cn)。