

· 基础研究 ·

大黄素对硫酸吲哚酚诱导的心肌细胞损伤的保护作用

刘 广¹ 郑敏麟² 伞 勤²

摘要 **目的** 观察大黄素对硫酸吲哚酚(IS)诱导的 H9c2 细胞损伤的保护作用,探讨大黄素对尿毒症心肌病细胞模型保护作用的机制。**方法** 体外培养大鼠心肌细胞 H9c2 后,IS 刺激 H9c2 细胞为细胞损伤模型,以大黄素为干预药物,将细胞随机分为空白组,IS 组以及不同浓度大黄素组(20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)。采用 MTT 法测定各组细胞活力,流式细胞术测定各组细胞间的活性氧(ROS)以及细胞凋亡水平,RT-qPCR、Western Blot 检测各组细胞中 Bcl-2、BAX、Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,IS 组细胞活力降低($P<0.01$),ROS 水平及凋亡率升高($P<0.01$),细胞内 BAX、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 及蛋白表达水平升高($P<0.01$),Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平降低($P<0.01$);与 IS 组比较,不同浓度大黄素组细胞活力升高($P<0.05$, $P<0.01$),ROS 水平及凋亡率降低,细胞内 BAX、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 及蛋白表达水平降低($P<0.01$),Bcl-2 mRNA 及蛋白表达水平升高($P<0.01$)。**结论** 大黄素可能通过抗氧化应激以及抑制凋亡等途径对 IS 诱导的心肌损伤起到一定的保护作用。

关键词 大黄素; 硫酸吲哚酚; H9c2 细胞; 凋亡; 氧化应激

Protective Effect of Emodin on Myocardial Cell Injury Induced by Indoxyl Sulfate LIU Guang¹, ZHENG Min-lin², and SAN Qin² *1 Research Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 2 College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122)*

ABSTRACT **Objective** To investigate the mechanism of protective effect of emodin on the cell model of uremia cardiomyopathy by observing the protective effect of emodin on H9c2 cells induced by indoxyl sulfate (IS). **Methods** After culturing rat cardiomyocytes H9c2 *in vitro*, and IS stimulated H9c2 cells as a cell injury model, taking emodin as an intervention drug, the cells were randomly divided into blank group, IS group and emodin groups with different concentrations (20, 40, 60 $\mu\text{mol/L}$). The cell activity in each group was determined using MTT assay; intracellular ROS and apoptosis levels in each group were determined by flow cytometry. The mRNA and protein expression levels of BAX, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in each group were determined by RT-qPCR and Western Blot. **Results** Compared with the blank group, the cell activity decreased ($P<0.01$), the intracellular ROS level and apoptosis rate increased ($P<0.01$), the expression levels of BAX, Caspase-3 and Caspase-9 mRNA and protein increased ($P<0.01$), and the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein decreased ($P<0.01$) in the IS group. Compared with the IS group, in emodin groups with different concentrations, the cell activity increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the intracellular ROS level and apoptosis rate were decreased, the expression levels of BAX, Caspase-3 and Caspase-9 mRNA and protein were significantly decreased ($P<0.01$), and the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein increased ($P<0.01$). **Conclusion** Emodin may have a certain

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(No. 81573855)

作者单位:1. 福建中医药大学中西医结合研究院(福州 350122); 2. 福建中医药大学中西医结合学院(福州 350122)

通讯作者:郑敏麟, Tel: 0591-22861151, E-mail: 809220140@qq.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20201026. 048

protective effect on IS-induced myocardial injury through anti-oxidative stress and inhibiting apoptosis and so on.

KEYWORDS emodin; indoxyl sulfate; H9c2 cells; apoptosis; oxidative stress

慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)是导致心血管疾病发病率增加^[1]的一个危险因素,而传统的心血管危险因素^[2]不足以解释 CKD 患者心血管病的高发生率。研究表明,在心血管疾病进展中尿毒症毒素被认定为是一个关键的危险因素^[3]。而硫酸吲哚酚(indoxyl-sulfate, IS)是一种小分子尿毒症毒素^[4],在 CKD 患者血浆中明显增加,其浓度比健康者高出许多,由于其与白蛋白的高亲和力结合,所以很难通过血液透析有效的去除^[5,6],最终加剧了 CKD 的进展。同时, Fujii H 等^[7]的研究证实了正是由于 IS 在体内的不断积聚,从而促进了机体发生氧化应激,诱导心肌细胞发生损伤,最终加速了心血管疾病的发生。

大黄素是中药大黄的主要活性成分,且有多种药理作用,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤^[8-10]等多种作用。课题组前期研究也发现大黄素能够降低尿毒症大鼠血清肌酐尿素氮水平,与此同时还提高了血清中超氧化物歧化酶水平,降低了丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平^[11]。近几年来,有研究证明大黄素对心血管病变有了明显的疗效,刘波^[12]的研究证实了大黄素能够通过抑制心肌细胞凋亡从而减轻心肌损伤。然而有关大黄素对尿毒症心肌病影响的报道仍属于空白。本研究观察大黄素干预对 IS 诱导的 H9c2 细胞损伤的影响,探讨 IS 对 H9c2 细胞的影响及大黄素的保护作用。

材料与方法

1 细胞株 大鼠心肌细胞 H9c2 (批号: CBP60588)购于科学院上海细胞库。

2 药物 大黄素(分子式: $C_{15}H_{10}O_5$, 分子量 270.24, 纯度 $\geq 98\%$, 索莱宝, 批号: E8390); IS (分子式: $C_8H_6NO_4SK$, 分子量 251.30, Sigma, 批号: I3875)。

3 主要试剂及仪器 MTT 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号: AR1156); ROS 试剂盒(南京建成, 批号: E004-1-1); Annexing-PI 检测试剂盒(美国 BD 公司, 批号: 556547); DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司, 批号: SH30023.01B); 0.25% 胰蛋白酶(Hyclone 公司, 批号: SH30042.01B); 胎牛血清(Gibco 公司, 批号: 10270106); RNeasy Mini Kit (Qiagen 公司, 批号: 74104); Revertaid First

Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific 公司, 批号: K1622); RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司, 批号: AR0102); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(批号: AR0138), 蛋白上样缓冲液(批号: AR1112-10), 电泳液(批号: AR1144), 转膜液(批号: AR1150), TBS(批号: AR0193), 一抗、二抗稀释液(批号: AR1017)均购自武汉博士德生物工程有限公司; BAX 抗体(Abcam 公司, 批号: ab32503); BCL-2 抗体(Abcam 公司, 批号: ab196495); Caspase-3 抗体(Cell Signaling Technology 公司, 批号: 9662); Caspase-9 抗体(Cell Signaling Technology 公司, 批号: 9508); 二氧化碳培养箱(美国赛默飞世尔科技公司, 型号: Cytoperm2); 荧光倒置显微镜(日本尼康公司, 型号: TS-100F); 酶标仪(BioTek 公司, 型号: Bio-TEKELx800); 流式细胞仪(美国赛默飞世尔科技公司, 型号: Attune NxT); 超高灵敏度化学发光成像系统(Bio-Rad 公司, 型号: ChemiDoc XRS+); 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司, 型号: 7900)。

4 细胞培养 将 H9c2 细胞培养在 DMEM/F12 培养基(10%胎牛血清)中,并在含有 5% CO_2 , 37 °C 培养箱中培养。在细胞长至培养瓶的 80%~90%时,进行细胞传代,随后取对数生长期细胞进行实验。

5 细胞活力的测定 首先将细胞从培养瓶中消化下来,制成单细胞悬液,经过细胞计数后,利用完全培养基稀释至 3×10^4 个/mL 的细胞悬液,然后按照每孔 100 μ L 的标准加入到 96 孔板中,放入培养箱中培养,当细胞长到 60%~70%时分为空白组、IS 组、大黄素组。空白组细胞不作处理,IS 组分别加入 125、250、500、1 000 μ mol/L 浓度的 IS,大黄素组预先加入 20、40、60、80 μ mol/L 浓度的大黄素,预干预 24 h 后,加入 IS 继续培养 24 h,然后各孔都加入 10 μ L MTT 溶液,放入培养箱孵育 4 h,然后加入 DMSO,在酶标仪吸光度 570 nm 测量 OD 值。细胞活力 = (实验组 OD 值/空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

6 流式细胞术测定各组细胞中 ROS 水平 将干预后的各组细胞先利用 PBS 清洗一遍,再加入胰酶将细胞消化下来,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 吹打,重悬细胞,1 500 r/min 离心 5 min,离心后再将上清液倒掉,加入无菌 PBS 制成细胞悬液,

按照南京建成 ROS 试剂盒步骤,上流式细胞仪进行检测。

7 AnnexinV-PI 染色观察各组间细胞凋亡情况 将干预后的各组细胞先利用 PBS 清洗一遍,再加入胰酶将细胞消化下来,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 吹打,重悬细胞,1 500 r/min 离心 5 min,离心后再将上清液倒掉,加入 500 μ L Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC,混匀后,室温孵育 15 min,孵育完成后再加入 5 μ L PI 染色,最后利用流式细胞仪进行检测,分析。

8 RT-qPCR 检测各组细胞间 Bcl-2、BAX、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平 将干预后的各组细胞先利用 PBS 清洗一遍,每个培养瓶加入 2 mL Trizol,反复吹打,充分混匀后,室温孵育 5 min,孵育后加入 400 μ L 氯仿,剧烈震荡后室温静置 5 min,随后 12 000 r/min 离心 15 min,离心后取上清液,随后加入 500 μ L 异丙醇,静置 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀即为 RNA,测定 RNA 浓度后,利用反转录酶将 mRNA 反转录成 cDNA,冰上操作,按照 Thermo 公司 Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书,在无菌无核酸酶的 PCR 管中依次加入反应液,在振荡器上充分混匀,离心,于梯度 PCR 仪上 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,70 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应,将逆转录反应产物置于 -80 $^{\circ}$ C 备用。随后以 cDNA 为模板,建立 RT-qPCR 反应体系。PCR 引物序列、产物长度如表 1。然后设定反应程序。结果分析,以 GAPDH 为内参,校正每个样品的 C_t 值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数),mRNA 的表达量。 $\Delta\Delta C_t$ = 各组 ($C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}$) - 对照组 ($C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}$), $2^{-\Delta\Delta C_t}$ = 各组基因表达量/对照组基因表达量。得 ΔC_t 值。以 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算各组目的基因表达。

表 1 引物序列

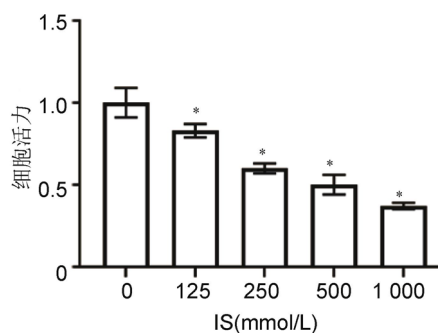
基因名称	引物序列	引物长度 (bp)
BAX	5'-AGTTTGACGGTGAGCTGGTA-3' 5'-GCCTCGGCCTGCCGCAAGCCT-3'	148
Bcl-2	5'-AGATACAAAGTTGATGGATGCTA-3' 5'-TCTTGGTTTGATATGAATTAGAG-3'	151
Caspase-3	5'-GCTGGGGAGGGACGGACTG-3' 5'-TGCCACGAATCTGTAATCC-3'	93
Caspase-9	5'-CTATCCAGCTGATGCCTCTC-3' 5'-TAGCTTTGCCTTTATCTCGAA-3'	162
GAPDH	5'-CAACGGGAAACCCATCACCA-3' 5'-ACGCCAGTGACTCCACGACAT-3'	138

9 Western Blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、BAX、Caspase-3、Caspase-9 表达水平 将干预后的各组细胞先利用 PBS 清洗一遍,再加入胰酶将细胞消化下来,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 吹打,重悬细胞,1 500 r/min 离心 5 min,离心后再将上清液倒掉,加入裂解液,在振荡器上充分震荡,然后冰上孵育 30 min,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,即为细胞蛋白样品。随后加入蛋白上样缓冲液,在 100 $^{\circ}$ C 沸水中加热 5 min,让蛋白充分变性,随后将样品加入到聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电泳完成后转膜,转膜完成后,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,最后加一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第二天将膜从一抗中取出,TBST 清洗 3 次,每次 10 min,清洗完成后,加入二抗孵育室温孵育 1 h,孵育完成后再用 TBST 清洗 3 次,最后用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行成像分析数据。

10 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 t 检验,两组及两组以上样本采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

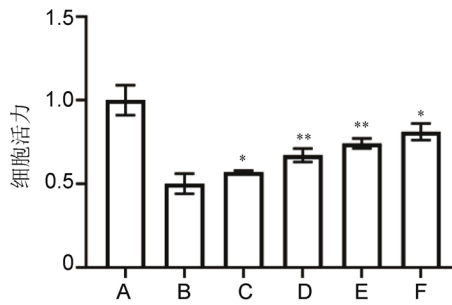
1 IS 对 H9c2 细胞活力的影响(图 1) 与空白组比较,IS 在 125、250、500、1 000 μ mol/L 作用下,均有抑制细胞活力的作用 ($P < 0.01$)。当 IS 浓度为 500 μ mol/L,细胞相对活力最接近 50%,故后续选用这个浓度作为细胞造模浓度。



注:与空白组比较,* $P < 0.01$

图 1 IS 对 H9c2 细胞活力的影响

2 大黄素治疗后对 H9c2 细胞活力的影响(图 2) 与 IS 组比较,在经过不同浓度大黄素预处理后,细胞活力明显提升 ($P < 0.05$),由于随着大黄素浓度的升高,细胞活力也随之升高,考虑到太高的浓度在人体内可能难以发挥其作用,所以选用 20、40、60 μ mol/L 这 3 个浓度选为干预药物的浓度。



注:A 为空白组;B 为 IS 组;C 为大黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组;D 为大黄素 40 $\mu\text{mol/L}$ 组;E 为大黄素 60 $\mu\text{mol/L}$ 组;F 为大黄素 80 $\mu\text{mol/L}$ 组;与 IS 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 各组细胞活力比较

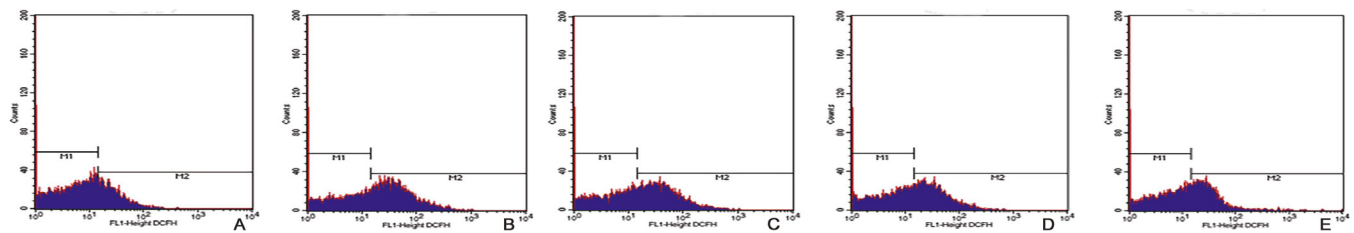
3 各组细胞中 ROS 水平比较(图 3,表 2) 与空白组比较,IS 组 H9c2 细胞 ROS 水平升高 ($P<0.01$);与 IS 组比较,大黄素 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组 H9c2 细胞 ROS 水平下降 ($P<0.01$)。

表 2 各组细胞中 ROS 水平比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ROS
空白	3	24.57 $\pm$ 5.90
IS	3	61.63 $\pm$ 11.20*
大黄素 20 $\mu\text{mol/L}$	3	50.17 $\pm$ 1.52 Δ
大黄素 40 $\mu\text{mol/L}$	3	46.21 $\pm$ 1.10 Δ
大黄素 60 $\mu\text{mol/L}$	3	40.32 $\pm$ 2.47 Δ

注:与空白组比较, * $P<0.01$;与 IS 组比较, Δ $P<0.01$

4 各组细胞凋亡率比较(图 4,表 3) 与空白组比较,IS 组 H9c2 细胞总凋亡率升高 ($P<0.01$);与 IS 组比较,大黄素 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组 H9c2 细胞总凋亡率下降 ($P<0.01$)。



注:A 为空白组;B 为 IS 组;C 为大黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 组;D 为大黄素 40 $\mu\text{mol/L}$ 组;E 为大黄素 60 $\mu\text{mol/L}$ 组;下图同

图 3 各组细胞 ROS 水平比较

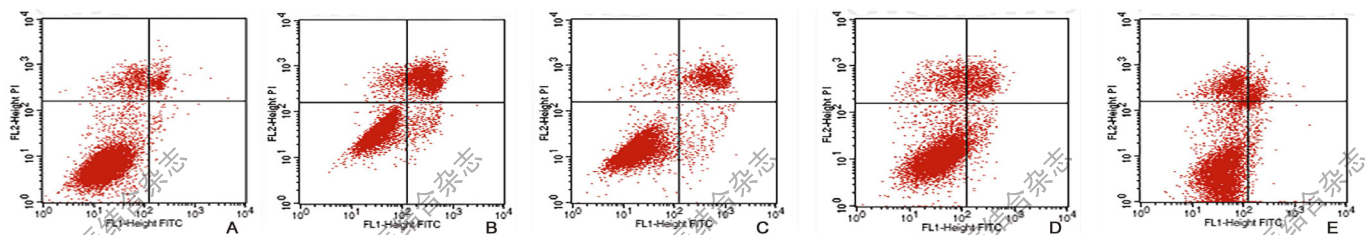


图 4 各组细胞凋亡情况

表 3 各组细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	凋亡率
空白	3	4.56 $\pm$ 0.17
IS	3	26.75 $\pm$ 5.11*
大黄素 20 $\mu\text{mol/L}$	3	14.77 $\pm$ 0.12 Δ
大黄素 40 $\mu\text{mol/L}$	3	11.66 $\pm$ 1.37 Δ
大黄素 60 $\mu\text{mol/L}$	3	8.33 $\pm$ 0.20 Δ

注:与空白组比较, * $P<0.01$;与 IS 组比较, Δ $P<0.01$

5 各组细胞 BAX、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平比较(表 4) 与空白组比较,IS 组 H9c2 细胞 BAX、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平升高 ($P<0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平下降 ($P<0.01$);与 IS 组比较,大黄素 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组 BAX、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平下降 ($P<0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平升高 ($P<0.01$)。

6 各组细胞间 BAX、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达比较(图 5,表 5) 与空白组比较,IS 组 H9c2 细胞 BAX、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平升高 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达下降 ($P<0.01$);与 IS 组比较,大黄素 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 组 BAX、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平下降 ($P<0.01$);Bcl-2 蛋白表达水平升高 ($P<0.01$)。

讨 论

现代研究表明,大黄素能够通过抑制血管平滑肌细胞内 ROS 水平,减少细胞的凋亡,来起到保护心血管系统的作用^[13]。而本课题组在前期的研究中已经发现大黄能够改善尿毒症大鼠的心肾功能^[14],为了更加深入的研究大黄对尿毒症中心血管疾病的保护作用,

表 4 各组细胞 BAX、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BAX	Bcl-2	Caspase-3	Caspase-9
空白	3	0.99±0.02	1.00±0.03	1.00±0.01	1.00±0.02
IS	3	4.04±0.06 [*]	0.59±0.01 [*]	2.68±0.09 [*]	2.66±0.11 [*]
大黄素 20 μmol/L	3	2.98±0.21 [△]	0.78±0.03 [△]	1.83±0.11 [△]	1.88±0.02 [△]
大黄素 40 μmol/L	3	2.91±0.05 [△]	0.88±0.09 [△]	1.73±0.13 [△]	1.66±0.06 [△]
大黄素 60 μmol/L	3	2.60±0.04 [△]	1.01±0.02 [△]	1.37±0.04 [△]	1.28±0.01 [△]

注:与空白组比较,^{*} $P < 0.01$;与 IS 组比较,[△] $P < 0.01$ 表 5 各组细胞 BAX、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BAX	Bcl-2	Caspase-3	Caspase-9
空白	3	0.29±0.02	0.64±0.01	0.33±0.01	0.28±0.03
IS	3	0.62±0.03 [*]	0.35±0.05 [*]	0.63±0.09 [*]	0.57±0.04 [*]
大黄素 20 μmol/L	3	0.52±0.01 [△]	0.43±0.07 [△]	0.52±0.05 [△]	0.47±0.06 [△]
大黄素 40 μmol/L	3	0.47±0.01 [△]	0.51±0.08 [△]	0.43±0.07 [△]	0.43±0.04 [△]
大黄素 60 μmol/L	3	0.37±0.03 [△]	0.55±0.10 [△]	0.38±0.03 [△]	0.35±0.01 [△]

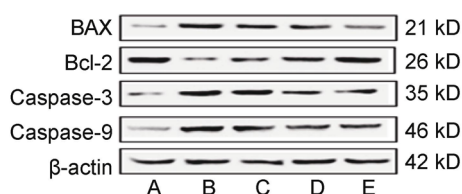
注:与空白组比较,^{*} $P < 0.01$;与 IS 组比较,[△] $P < 0.01$ 

图 5 各组细胞 BAX、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白条带图

本文将利用尿毒素 IS 干预 H9c2 心肌细胞作为细胞模型,再观察大黄素对其诱导的细胞损伤的保护作用。

近年来越来越多证据表明,尿毒症在心血管疾病的进展中起着至关重要的作用,CKD 患者中由于肾脏的排泄功能下降,使得尿毒症毒素不断的积累,最终引发了心血管疾病的发生^[15]。其中 IS 是一种因肾损伤导致的排泄障碍而在全身循环中逐渐累积的尿毒症毒素。IS 除了参与 CKD 疾病进展以外,对 CKD 及终末期肾脏疾病患者的心血管疾病有着明显的恶化作用^[16]。Lin CJ 等^[17]研究表明,血清中 IS 的水平是预测晚期 CKD 患者心血管疾病发生的一个最有价值的指标。

正是由于 IS 在尿毒症中心血管疾病中的独特作用,越来越多学者开始对 IS 对心血管系统疾病产生的影响进行更加深入的研究。近年来,IS 所引起的氧化应激损伤成为了一个热门的话题。Yang K 等^[18]研究证实了 IS 能够诱导心肌细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的增高,从而引发心肌细胞的凋亡,最终导致心血管疾病的发生。ROS 具有很强的氧化性,能够破坏细胞内的结构及功能并造成细胞损伤,最后引发细胞凋亡^[19],而引起细胞凋亡的途径有很多,比如内质网应激,线粒体凋亡途径,以及死亡

受体途径,但其中与 ROS 最密切相关的就是线粒体凋亡途径^[20]。Bcl-2 蛋白家族是调控线粒体凋亡途径的重要蛋白,其中 Bcl-2 是公认的抑制细胞凋亡的蛋白,存在于线粒体外膜上,可通过抑制氧化应激来起到抑制细胞凋亡的作用,不仅如此,Bcl-2 蛋白还可以通过稳定线粒体膜电位,减少细胞色素 C 的释放来起到抑制细胞凋亡的作用;而 BAX 则是一个公认的能够促进细胞凋亡的蛋白,它通常存在于线粒体的外膜及内质网上,可以通过改变细胞膜的通透性,释放细胞色素 C,最终引发细胞凋亡^[21,22]。所以许多现代研究都把 Bcl-2 与 BAX 在细胞内的水平当做是细胞发生凋亡过程中的关键。除了 Bcl-2 蛋白家族之外,Caspase 家族在细胞凋亡中也扮演着至关重要的角色,处于上端的凋亡启动因子 Caspase-9 通过与细胞色素 C 因子的结合,激活 Caspase-3,从而发生级联反应,通过降解染色体的方式使凋亡小体形成而引发凋亡。Caspase-3 位于细胞胞浆内,本身并不具有生物学功能,只有被相关因子激活后才能释放活性小体而发挥凋亡作用。当 Caspase-3 一旦被唤醒,预示着细胞凋亡程序进入到不可逆的状态^[23,24]。

基于上述理论,笔者的初步研究结果证实,大黄素降低 IS 所引起的细胞内 ROS 水平的升高,从而达到抑制细胞凋亡的目的。在此基础上,笔者进一步对线粒体凋亡途径上的相关基因及蛋白做了更加深入的检测,发现与 IS 组比较,大黄素能够升高 Bcl-2 蛋白及基因的表达,降低 BAX 蛋白及基因的表达,不仅如此,在大黄素的干预下,Caspase-3、Caspase-9 的基因及蛋白表达量也相应的降低。体现了大黄素很有可能是通过抑制线粒体凋亡途径来起到保护 IS 所引起的心

肌细胞损伤的作用。

利益冲突：该论文不涉及任何性质或类型的利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Guo J, Lu L, Hua Y, et al. Vasculopathy in the setting of cardiorenal syndrome: roles of protein-bound uremic toxins[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313(1): H1-H13.
- [2] Hung SC, Kuo KL, Wu CC, et al. Indoxyl sulfate: a novel cardiovascular risk factor in chronic kidney disease[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(2): e005022.
- [3] Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration and interindividual variability[J]. *Kidney Int*, 2003, 63(5): 1934-1943.
- [4] 吴逸如, 刁宗礼, 刘文虎. 硫酸吡啶酚对肾脏和心血管毒性作用的研究新进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2015, 14(1): 69-72.
- [5] Ikegaya K, Nokihara K, Yasuhara T. Characterization of sulfhydryl heterogeneity in human serum albumin and recombinant human serum albumin for clinical use[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(11): 2232-2236.
- [6] Duranton F, Cohen G, De Smet R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(7): 1258-1270.
- [7] Fujii H, Nishijima F, Goto S, et al. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(7): 2089-2095.
- [8] 勾晓梅, 李雪丽, 隋源, 等. 大黄素对烟曲霉菌性角膜炎模型大鼠的抗炎作用机制研究[J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(9): 1466-1469.
- [9] 张丽, 孙耀, 刘宝华, 等. 大黄素对高脂饮食小鼠肾皮质氧化应激的影响[J]. *山西医科大学学报*, 2019, 50(3): 271-275.
- [10] 袁向飞, 谢俊木子, 谭晓华. 大黄及其有效成分抗肿瘤的研究进展[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2018, 24(3): 363-366.
- [11] 郑敏麟, 骆丹岚, 阮诗玮. 益肾降浊冲剂对慢性肾功能衰竭肾脏的保护作用及其对肾脏自由基、肾小管 Caspase-3 和 Caspase-9 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(8): 3460-3464.
- [12] 刘波. 大黄素对重症急性胰腺炎大鼠心肌损伤的干预及作用机制的研究[D]. 辽宁: 辽宁医学院, 2013.
- [13] 王翔飞. 大黄素抑制血管平滑肌细胞增殖机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2005.
- [14] 郑敏麟, 阮诗玮. 线粒体与慢性肾衰竭毒素所致肾外脏器损害相关性的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(12): 2662-2666.
- [15] 许玲玲, 鲁明军, 郭涛, 等. 丹参酮 II A 对硫酸吡啶酚诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(20): 5040-5043.
- [16] Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, et al. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(14): 1771-1779.
- [17] Lin CJ, Liu HL, Pan CF, et al. Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease[J]. *Arch Med Res*, 2012, 43(6): 451-456.
- [18] Yang K, Xu X, Nie L, et al. Indoxyl sulfate induces oxidative stress and hypertrophy in cardiomyocytes by inhibiting the AMPK/UCP2 signaling pathway[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 234(2): 110-119.
- [19] 宋琳, 朴钟源, 张丽梅, 等. 五味子醇甲对 Aβ₁₋₄₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞的 RAGE-ROS-凋亡通路的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(4): 44-47, 267.
- [20] 芦新, 杨波. 黄芪多糖对心肌细胞缺氧复氧过程中细胞损伤、线粒体途径凋亡的影响[J]. *海南医学院学报*, 2017, 23(24): 3338-3341.
- [21] 费智敏, 袁洁, 张珏. 脑瘤一号方联合替莫唑胺对裸鼠脑胶质瘤模型 MGMT、BAX 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(12): 1477-1482.
- [22] 柯秀慧, 董瑞娟, 葛东宇, 等. 慈姑多糖对非酒精性脂肪肝病肝损伤的保护作用[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(10): 4796-4799.
- [23] 张红艳. 胡黄连苷 II 抑制线粒体细胞色素 C 信号通路发挥神经保护作用[D]. 青岛: 青岛大学, 2017.
- [24] 王新陆, 崔琳, 王幼平, 等. 参附益心方对血管紧张素 II 诱导 H9c2 心肌细胞凋亡及线粒体含量、膜电位的影响[J]. *中医杂志*, 2019, 60(21): 1854-1860.

(收稿: 2019-12-17 在线: 2020-12-29)

责任编辑: 白 霞