

丹参酮 II A 通过调节 ABCE1 抑制缺氧 / 复氧诱导的心肌细胞凋亡和自噬

邢磊 乔炜超

承德市第三人民医院外一科, 河北承德 067000

通信作者: 乔炜超, Email: 291134181@qq.com

【摘要】 目的 探讨丹参酮 II A 对缺氧 / 复氧诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡和自噬的影响及其作用机制。**方法** 取对数生长期 H9C2 心肌细胞, 将其分为空白对照组、缺氧 / 复氧模型组及丹参酮 II A 低、中、高剂量组 (分别于制模后给予 50、100、200 mg/L 丹参酮 II A)。选取治疗效果较好的剂量进行后续研究, 将细胞分为空白对照组、缺氧 / 复氧模型组、丹参酮 II A+pcDNA3.1-NC 组和丹参酮 II A+pcDNA3.1-ABCE1 组, 用过表达质粒 pcDNA3.1-ABCE1 和 pcDNA3.1-NC 转染后进行相应处理。采用细胞增殖与毒性检测试剂盒 (CCK-8) 检测各组 H9C2 细胞活性; 采用流式细胞术检测心肌细胞凋亡率; 采用实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测各组 H9C2 细胞三磷酸腺苷结合盒转运体 E1 (ABCE1)、凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 以及自噬相关蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白轻链 3 (LC3 II / I)、p62 的 mRNA 表达水平; 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组 H9C2 细胞上述指标的蛋白表达水平。**结果** ① 细胞活性及 ABCE1 表达: 丹参酮 II A 可抑制缺氧 / 复氧诱导的 H9C2 细胞活性, 中剂量即可达到显著效果 [(0.95 ± 0.05)% 比 (0.37 ± 0.10)% , $P < 0.01$], ABCE1 的 mRNA 和蛋白表达显著降低 [ABCE1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.02 ± 0.13 比 3.74 ± 0.17, ABCE1 蛋白 (ABCE1/GAPDH): 0.46 ± 0.04 比 0.68 ± 0.07, 均 $P < 0.05$]。② 凋亡相关蛋白表达: 中剂量丹参酮 II A 可抑制缺氧 / 复氧诱导的 H9C2 细胞凋亡 [(28.26 ± 2.52)% 比 (45.27 ± 3.07)% , $P < 0.05$]。与缺氧 / 复氧模型组比较, 中剂量丹参酮 II A 可明显下调缺氧 / 复氧诱导的 H9C2 细胞中 Bax 和 caspase-3 的蛋白表达, 明显上调 Bcl-2 的蛋白表达 [Bax (Bax/GAPDH): 0.28 ± 0.03 比 0.47 ± 0.03, caspase-3 (caspase-3/GAPDH): 0.31 ± 0.02 比 0.44 ± 0.03, Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH): 0.53 ± 0.02 比 0.37 ± 0.05, 均 $P < 0.05$]。③ 自噬相关蛋白表达: 与空白对照组比较, 缺氧 / 复氧模型组细胞 LC3 阳性率明显增加, 丹参酮 II A 中剂量组细胞 LC3 阳性率则明显减少 [(20.67 ± 3.09)% 比 (42.67 ± 3.86)% , $P < 0.01$]。与缺氧 / 复氧模型组比较, 中剂量丹参酮 II A 可以明显下调 Beclin-1、LC3 II / I 和 p62 的蛋白表达 [Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH): 0.27 ± 0.05 比 0.47 ± 0.03, LC3 II / I 比值: 0.24 ± 0.05 比 0.47 ± 0.04, p62 (p62/GAPDH): 0.21 ± 0.03 比 0.48 ± 0.02, 均 $P < 0.05$]。④ 过表达 ABCE1 质粒转染后凋亡和自噬相关蛋白表达: 与丹参酮 II A+pcDNA3.1-NC 组比较, 丹参酮 II A+pcDNA3.1-ABCE1 组 Bax、caspase-3、Beclin-1、LC3 II / I 和 p62 的蛋白表达水平均明显上调, Bcl-2 的蛋白表达水平明显下调。**结论** 100 mg/L 的丹参酮 II A 即可通过调节 ABCE1 的表达水平抑制心肌细胞自噬和凋亡, 从而在缺氧 / 复氧诱导的 H9C2 心肌细胞损伤起到保护作用。

【关键词】 丹参酮 II A; 缺氧 / 复氧损伤; H9C2 心肌细胞; 自噬; 凋亡; 三磷酸腺苷结合盒转运体 E1

基金项目: 河北省承德市科技研究与发展计划项目 (202006A005)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230210-00082

Tanshinone II A inhibits hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis and autophagy by regulating ABCE1

Xing Lei, Qiao Weichao

Department of External Surgery, the Third People's Hospital of Chengde City, Chengde 067000, Hebei, China

Corresponding author: Qiao Weichao, Email: 291134181@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of tanshinone II A on apoptosis and autophagy induced by hypoxia/reoxygenation in H9C2 cardiomyocytes and its mechanism. **Methods** H9C2 cardiomyocytes in logarithmic growth phase were divided into control group, hypoxia/reoxygenation model group and tanshinone II A low-dose, medium-dose and high-dose groups (50, 100, 200 mg/L tanshinone II A were treated after hypoxia/reoxygenation respectively). The dose with good therapeutic effect was selected for follow-up study. The cells were divided into control group, hypoxia/reoxygenation model group, tanshinone II A+pcDNA3.1-NC group and tanshinone II A+pcDNA3.1-ABCE1 group. The cells were transfected with the overexpressed plasmids pcDNA3.1-ABCE1 and pcDNA3.1-NC and then treated accordingly. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect H9C2 cell activity in each group. The apoptosis rate of cardiomyocytes was detected by flow cytometry. The ATP-binding cassette transporter E1 (ABCE1), apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax, caspase-3, autophagy-related proteins Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3 II / I) and p62 mRNA expression level of H9C2 cells in each group were detected by real-time fluorescence

quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). The protein expression levels of the above indexes in H9C2 cells were detected by Western blotting. **Results** ① Cell activity and ABCE1 expression: tanshinone II A inhibited the activity of H9C2 cells induced by hypoxia/reoxygenation, and the effect was significant at medium-dose [(0.95±0.05)% vs. (0.37±0.10)%, $P < 0.01$], mRNA and protein expression of ABCE1 were significantly reduced [ABCE1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.02±0.13 vs. 3.74±0.17, ABCE1 protein (ABCE1/GAPDH): 0.46±0.04 vs. 0.68±0.07, both $P < 0.05$]. ② Expression of apoptosis-related proteins: medium-dose of tanshinone II A inhibited the apoptosis of H9C2 cells induced by hypoxia/reoxygenation [apoptosis rate: (28.26±2.52)% vs. (45.27±3.07)%, $P < 0.05$]. Compared with the hypoxia/reoxygenation model group, medium-dose of tanshinone II A significantly down-regulated the protein expression of Bax and caspase-3 in H9C2 cells induced by hypoxia/reoxygenation, and significantly up-regulated the protein expression of Bcl-2 [Bax (Bax/GAPDH): 0.28±0.03 vs. 0.47±0.03, caspase-3 (caspase-3/GAPDH): 0.31±0.02 vs. 0.44±0.03, Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH): 0.53±0.02 vs. 0.37±0.05, all $P < 0.05$]. ③ Expression of autophagy-related proteins: compared with the control group, the positive rate of LC3 in the hypoxia/reoxygenation model group was significantly increased, while the positive rate of LC3 in the medium-dose of tanshinone II A group was significantly decreased [(20.67±3.09)% vs. (42.67±3.86)%, $P < 0.01$]. Compared with hypoxia/reoxygenation model group, medium-dose of tanshinone II A significantly down-regulated Beclin-1, LC3 II/I and p62 protein expressions [Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH): 0.27±0.05 vs. 0.47±0.03, LC3 II/I ratio: 0.24±0.05 vs. 0.47±0.04, p62 (p62/GAPDH): 0.21±0.03 vs. 0.48±0.02, all $P < 0.05$]. ④ Expression of apoptosis and autophagy related proteins after transfection with overexpressed ABCE1 plasmid: compared with tanshinone II A+pcDNA3.1-NC group, the protein expression levels of Bax, caspase-3, Beclin-1, LC3 II/I and p62 in tanshinone II A+pcDNA3.1-ABCE1 group were significantly up-regulated, while the protein expression level of Bcl-2 was significantly down-regulated. **Conclusions** 100 mg/L tanshinone II A could inhibit autophagy and apoptosis of cardiomyocytes by regulating the expression level of ABCE1. So, it protects H9C2 cardiomyocytes injury induced by hypoxia/reoxygenation.

【Key words】 Tanshinone II A; Hypoxia/reoxygenation injury; H9C2 cardiomyocyte; Autophagy; Apoptosis; ATP-binding cassette transporter E1

Fund program : Science and Technology Research and Development Program of Chengde City (202006A005)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230210-00082

经皮冠状动脉介入治疗是缺血性心脏病 (ischemic heart disease, IHD) 的有效方法。及时恢复缺血心肌再灌注可最大限度减少心肌损伤^[1]。但随之产生的心肌缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是导致不良心脏事件的主要原因, 心肌 I/R 损伤以代谢紊乱、局部炎症反应、细胞死亡及心脏重构和功能障碍为特征^[2-3]。

自噬是一种保守的细胞内容物降解过程, 对维持细胞内环境稳态、细胞防御和细胞适应不利环境至关重要^[4-5]。自噬不仅可以使细胞循环氨基酸, 还可以清除受损的细胞器, 从而消除氧化应激, 并允许细胞重塑以维持生存^[6]; 同时, 在压力超负荷和心肌 I/R 损伤等应激条件下, 自噬在心肌中迅速激活^[7-8]。但自噬受损也会触发心肌细胞死亡, 在再灌注阶段, 由于血液的重新供应, 大量活性氧产生及钙离子 (Ca^{2+}) 超载等原因引起自噬相关蛋白 Beclin-1 激活, 进而导致心肌细胞自噬过度增强, 加重心肌细胞的损伤, 甚至出现细胞坏死, 凋亡则是心肌 I/R 损伤和功能障碍的重要机制, 凋亡相关蛋白 (如 Bcl-2、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 和 p53) 在心肌 I/R 损伤中发挥重要作用^[9]。因此, 探索心肌细胞自噬的机制可能为心肌 I/R 损伤的治疗提供新的思路。

丹参作为临床常用中药, 具有活血祛瘀、通经止痛等功效, 其有效成分为丹参酮 II A, 丹参酮 II A 对缺血引起的多种心脑血管疾病具有防治作用^[10], 但其机制还需要进一步阐明。因此, 本实验拟在缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞中模拟心肌 I/R 损伤的体外模型, 进一步探究丹参酮 II A 对心肌 I/R 损伤的治疗作用及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及分组: H9C2 心肌细胞购自中国科学院上海细胞库。将 H9C2 心肌细胞分别为空白对照组、缺氧/复氧模型组及丹参酮 II A 低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/L)。选取丹参酮 II A 治疗效果较好的剂量进行后续研究, 将细胞分为空白对照组、缺氧/复氧模型组、丹参酮 II A+pcDNA3.1-NC 组和丹参酮 II A+pcDNA3.1-ABCE1 组, 过表达质粒 pcDNA3.1-ABCE1 和 pcDNA3.1-NC 转染后分别给予相应处理。

1.2 缺氧/复氧细胞模型制备: 取对数生长期 H9C2 心肌细胞, 胰酶消化后收集细胞, 用 DMEM 培养液制成细胞悬液, 细胞密度 $5 \times 10^7/L$, 接种于培养板中培养 24 h。各组药物处理 24 h 后, 将心肌细胞置于 1% O_2 、94% N_2 和 5% CO_2 的培养箱中孵育 4 h, 然后将细胞转移至 DMEM 基础培养基于 21% 氧浓

度的培养箱中继续孵育 6 h, 制备 H9C2 心肌细胞缺氧/复氧模型。

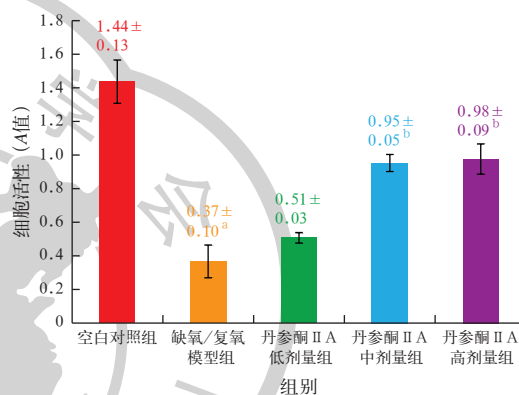
1.3 观察指标: 取对数生长期的 H9C2 细胞进行下列实验。① 细胞活性检测: 取培养 12 h 的 H9C2 细胞, 每孔加 10 μ L 细胞增殖与毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育箱继续培养 4 h, 采用酶标仪测定各组细胞波长 450 nm 处的吸光度 (A) 值。② 三磷酸腺苷结合盒转运体 E1 (ATP-binding cassette transporter E1, ABCE1) mRNA 表达检测: 采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR) 测定 ABCE1 mRNA 的相对表达水平。③ 采用流式细胞术检测 H9C2 细胞凋亡情况。④ 用免疫荧光染色法检测细胞自噬情况, 在荧光显微镜下观察各组细胞自噬双标腺病毒 RFP-GFP-微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 阳性信号。⑤ 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测细胞凋亡和自噬相关蛋白表达, 用凝胶成像系统 Image J 软件测定凋亡和自噬相关蛋白条带灰度值, 以目的蛋白和内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的灰度值比值作为目的蛋白的表达量。

1.4 统计学处理: 所有实验均重复 3 次。用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较采用双尾未配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

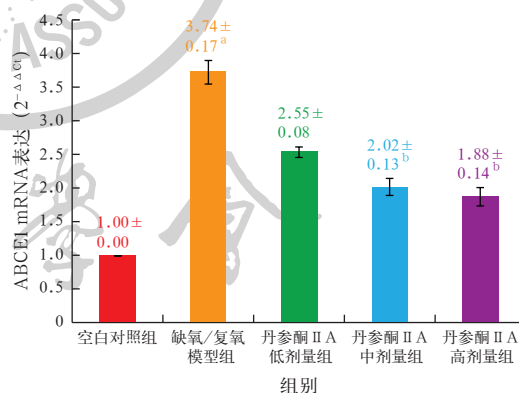
2.1 丹参酮 II A 对心肌细胞的保护作用及下调 ABCE1 表达: 光镜下显示 (图 1), 缺氧/复氧模型组细胞活性较差, 心肌细胞明显肿胀, 核皱缩; 不同剂量丹参酮 II A 处理后, 心肌细胞状态明显好转, 肿胀减少。CCK-8 法检测结果显示 (图 2), 与空白对照组比较, 缺氧/复氧模型组细胞活性受到明显抑制 ($P < 0.01$); 不同剂量丹参酮 II A 组细胞活性明显增

加, 呈剂量依赖性, 其中中剂量和高剂量组效果显著 (均 $P < 0.01$)。上述结果提示丹参酮 II A 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞具有保护作用。RT-qPCR 结果显示 (图 3), 与空白对照组比较, 缺氧/复氧模型组 ABCE1 mRNA 表达水平明显上调 ($P < 0.01$); 丹参酮 II A 处理后, ABCE1 mRNA 表达水平较缺氧/复氧模型组降低, 呈剂量依赖性, 其中中剂量和高剂量组差异显著 (均 $P < 0.01$)。Western blotting 检测结果也显示 (图 4), 丹参酮 II A 可以显著降低 ABCE1 蛋白表达水平 (均 $P < 0.05$)。



注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与缺氧/复氧模型组比较, ^b $P < 0.01$

图 2 各组 H9C2 细胞的细胞活性比较



注: ABCE1 为三磷酸腺苷结合盒转运体 E1; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与缺氧/复氧模型组比较, ^b $P < 0.01$

图 3 各组 H9C2 细胞 ABCE1 mRNA 表达水平比较

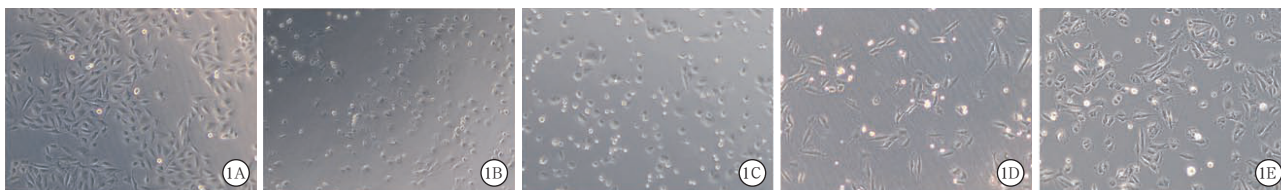
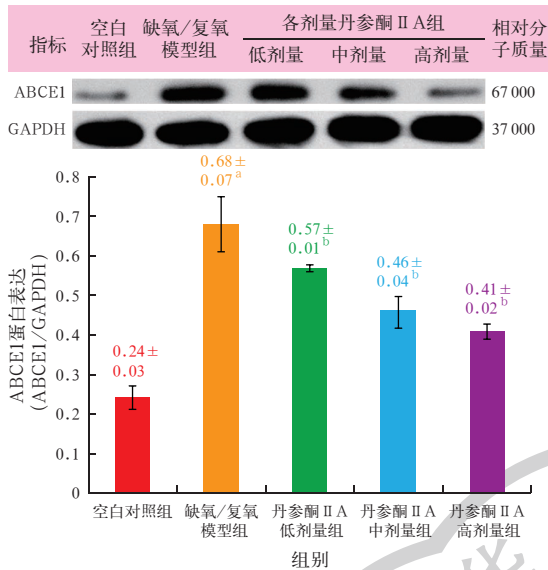


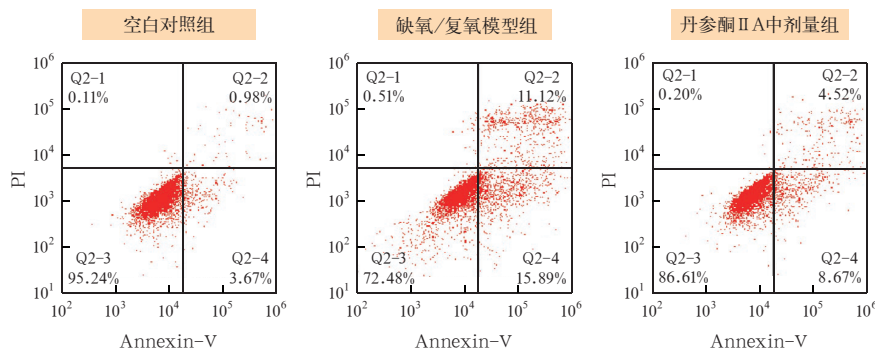
图 1 光镜下观察各组 H9C2 细胞形态 空白对照组 (A) 细胞形态正常, 活性好; 缺氧/复氧模型组 (B) 细胞减少, 且梭形细胞明显增多; 低、中、高剂量丹参酮 II A 处理后, 心肌细胞状态明显改善, 梭形细胞减少 (C ~ E), 其中中剂量组和高剂量组改善明显 低倍放大



ABCE1 为三磷酸腺苷结合盒转运体 E1, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$;与缺氧/复氧模型组比较, ^b $P < 0.05$

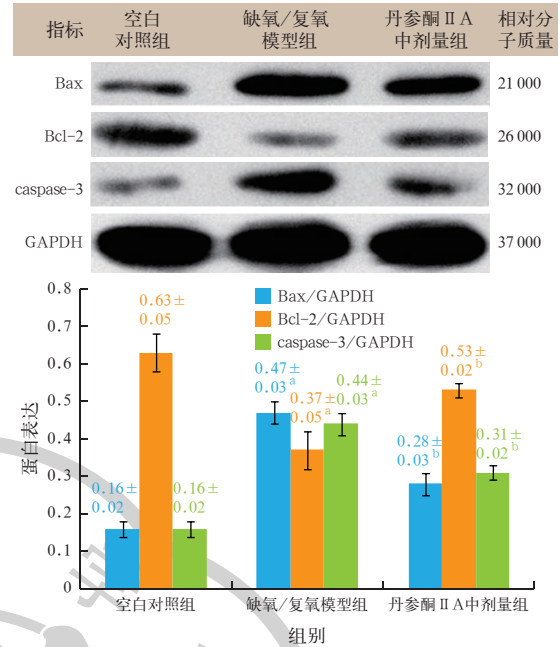
图4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组 H9C2 细胞 ABCE1 蛋白表达

2.2 丹参酮 II A 抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡:流式细胞术检测结果显示(图 5),缺氧/复氧模型组细胞凋亡水平较空白对照组明显增加[(45.27 ± 3.07)% 比 (11.07 ± 1.82)%, $P < 0.01$];丹参酮 II A 中剂量组细胞凋亡水平较缺氧/复氧模型组明显减少[(28.26 ± 2.52)% 比 (45.27 ± 3.07)%, $P < 0.05$]。Western blotting 检测结果显示(图 6),与空白对照组比较,缺氧/复氧模型组细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 caspase-3 的蛋白表达水平明显上调, Bcl-2 的蛋白表达水平明显下调(均 $P < 0.05$);中剂量丹参酮 II A 处理后, H9C2 细胞 Bax 和 caspase-3 的蛋白表达水平显著下调, Bcl-2 的蛋白表达水平明显上调(均 $P < 0.05$)。上述结果提示丹参酮 II A 能抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡。



注: Annexin-V 为膜联蛋白 V, PI 为碘化丙啶

图5 流式细胞仪检测各组 H9C2 细胞的细胞凋亡水平



caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$;与缺氧/复氧模型组比较, ^b $P < 0.05$

图6 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组 H9C2 细胞凋亡相关蛋白表达

2.3 丹参酮 II A 抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞自噬:免疫荧光染色结果显示(图 7),与空白对照组比较,缺氧/复氧模型组心肌细胞 LC3 阳性信号显著增加, LC3 阳性率明显升高[(42.67 ± 3.86)% 比 (12.67 ± 1.25)%, $P < 0.01$];丹参酮 II A 中剂量组心肌细胞 LC3 阳性信号明显减少, LC3 阳性率明显降低[(20.67 ± 3.09)% 比 (42.67 ± 3.86)%, $P < 0.01$]。Western blotting 检测结果显示(图 8),与缺氧/复氧模型组比较,丹参酮 II A 中剂量组心肌细胞 Beclin-1, LC3 II / I 和 p62 蛋白表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$)。上述结果提示丹参酮 II A 可以显著抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞自噬水平。

2.4 过表达 ABCE1 可以部分逆转丹参酮 II A 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和自噬的抑制作用(表 1; 图 9):过表达 ABCE1 质粒转染后, Western blotting 检测结果显示,与丹参酮 II A + pcDNA3.1-NC 组比较,丹参酮 II A + pcDNA3.1-ABCE1 组细胞 ABCE1 表达水平显著上调 ($P < 0.05$),证实 pcDNA3.1-ABCE1 转染成功。

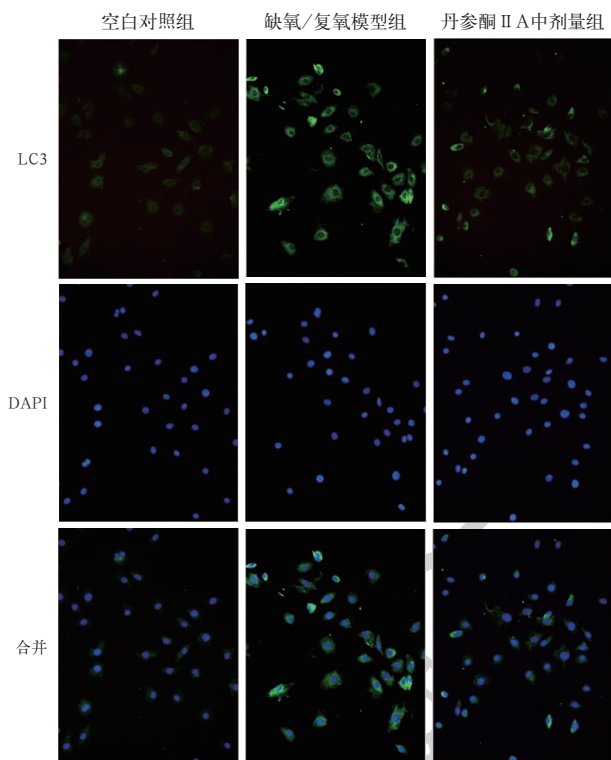


图7 荧光显微镜下观察各组 H9C2 细胞微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 阳性信号 LC3 阳性信号呈绿色, 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 标记细胞核呈蓝色。空白对照组心肌细胞 LC3 阳性信号减少; 缺氧/复氧模型组心肌细胞 LC3 阳性信号显著增加; 丹参酮 II A 中剂量组心肌细胞 LC3 阳性信号较缺氧/复氧模型组减弱 免疫荧光染色 低倍放大

Western blotting 检测结果显示, 与丹参酮 II A+pcDNA.1-NC 组比较, 丹参酮 II A+pcDNA.1-ABCE1 组心肌细胞 Bax、caspase-3、Beclin-1、LC3 II/I 和 p62 的蛋白表达水平均明显上调, Becl-2 的蛋白表达水平明显降低(均 $P < 0.05$)。上述结果提示, 过表达 ABCE1 可以部分逆转丹参酮 II A 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡和自噬的抑制作用。

3 讨论

目前, 对于 IHD, 现代医学采用的经皮冠状动脉介入治疗及血管重建可显著改善患者心肌缺血的症状和预后^[11]。但是, 血液恢复供应的同时, 瞬时的氧化应激和心肌细胞代谢失衡可导致严重的心肌

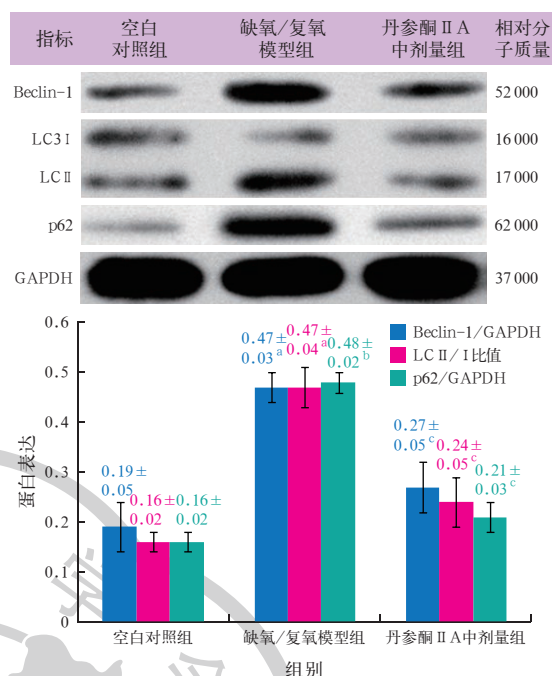


图8 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组 H9C2 细胞自噬相关蛋白表达
Beclin-1 为自噬相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与缺氧/复氧模型组比较, ^c $P < 0.05$

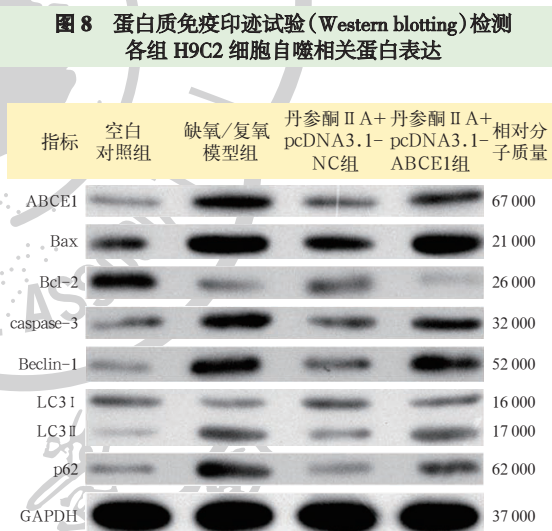


图9 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组 H9C2 细胞凋亡和自噬相关蛋白表达
ABCE1 为三磷酸腺苷结合盒转运体 E1, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, Beclin-1 为自噬相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

表 1 各组 H9C2 细胞凋亡和自噬相关蛋白的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	ABCE1 蛋白 (孔)	Bax 蛋白 (Bax/GAPDH)	Bcl-2 蛋白 (Bcl-2/GAPDH)	caspase-3 蛋白 (caspase-3/GAPDH)	Beclin-1 蛋白 (Beclin-1/GAPDH)	LC3 II/I 比值	p62 蛋白 (p62/GAPDH)
空白对照组	3	0.16 ± 0.024	0.16 ± 0.02	0.63 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
缺氧/复氧模型组	3	0.55 ± 0.06 ^a	0.47 ± 0.03 ^b	0.37 ± 0.05 ^b	0.44 ± 0.03 ^b	0.47 ± 0.03 ^b	0.47 ± 0.04 ^b	0.48 ± 0.02 ^b
丹参酮 II A+pcDNA3.1-NC 组	3	0.28 ± 0.03 ^c	0.28 ± 0.03 ^c	0.53 ± 0.02 ^c	0.31 ± 0.02 ^c	0.27 ± 0.05 ^c	0.24 ± 0.05 ^c	0.21 ± 0.03 ^c
丹参酮 II A+pcDNA3.1-ABCE1 组	3	0.49 ± 0.03 ^d	0.45 ± 0.03 ^d	0.33 ± 0.03 ^d	0.42 ± 0.05 ^d	0.47 ± 0.04 ^d	0.38 ± 0.03 ^d	0.44 ± 0.06 ^d

注: ABCE1 为三磷酸腺苷结合盒转运体 E1, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, Beclin-1 为自噬相关蛋白, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与缺氧/复氧模型组比较, ^c $P < 0.05$; 与丹参酮 II A+pcDNA3.1-NC 组比较, ^d $P < 0.05$

I/R 损伤^[12]。本研究显示, H9C2 心肌细胞在缺氧/复氧诱导下, 细胞生长活性降低, 凋亡率增加, 表明心肌细胞 I/R 损伤模型建立成功; 给予丹参酮 II A 干预后, 心肌细胞活性明显改善, 且呈剂量依赖性, 中剂量和高剂量组效果均较好, 故选择中剂量丹参酮 II A 进行后续研究。结果显示, 丹参酮 II A 可以抑制细胞自噬和凋亡水平, 下调 ABCE1 的表达水平, 在缺氧/复氧诱导的心肌细胞中发挥保护作用。

心肌缺血期间, 心肌细胞由于代谢失衡引起能量供应缺乏而发生坏死和凋亡, caspase-3 是细胞凋亡的关键起始基因, caspase-3 的激活标志着细胞凋亡开始执行且不可逆转^[11]。再灌注时期, 心肌细胞恢复了能量供应, 产生大量氧自由基, 引起自噬的过度激活, 越来越多的证据表明, 在再灌注期间过度的自噬会导致心肌细胞不可逆的损伤, 最终导致细胞死亡^[13-15]。最近的研究也表明, 在再灌注过程中, 加速自噬可引起心肌细胞损伤, 进而促进细胞死亡^[16]。Beclin-1 和 Bcl-2 是调控自噬的关键蛋白, 且 Bcl-2 是自噬和凋亡的中央调控因子, 两者的平衡状态是调控自噬与凋亡相互反馈作用的关键因素。在再灌注过程中, Beclin-1 的表达量明显增多, 致 Bcl-2 与 Beclin-1 表达失衡, 则 Bcl-2 的下调可通过激动 Beclin-1 来激活自噬, 又加速心肌细胞死亡。因此, 心肌 I/R 损伤的再灌注期主要表现为心肌自噬的过度激活及其引起的细胞凋亡加重。本研究显示, 丹参酮 II A 可以显著抑制 p62 和 Beclin-1 的表达水平, 抑制自噬; 同时丹参酮 II A 可以明显抑制 caspase-3 和 Bax 蛋白的表达水平, 减缓缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡。

ABCE1 是一种新型的调节病毒感染的核糖核酸内切酶抑制剂, 研究显示, 其在 mRNA 翻译中起着至关重要的作用, 提示 ABCE1 与癌症等疾病的进展有关^[17-18]。但是 ABCE1 在心血管疾病中的作用鲜见报道。本研究显示, 丹参酮 II A 可以显著抑制缺氧/复氧诱导的 H9C2 心肌细胞中 ABCE1 表达水平的上调趋势, 故推测丹参酮 II A 抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞自噬和凋亡作用可能与 ABCE1 的表达有密切关系; 同时, 过表达 ABCE1 可逆转丹参酮 II A 对缺氧/复氧诱导的心肌细胞的保护作用。

综上所述, 本研究显示, 100 mg/L 丹参酮 II A 即可通过调控 ABCE1 的表达水平, 抑制自噬和凋亡, 减缓心肌细胞损伤, 从而对缺氧/复氧损伤的 H9C2 心肌细胞起到保护作用。本研究的不足在于未阐明

丹参酮 II A 调节 ABCE1 与自噬和凋亡之间的信号通路, 后续研究中将揭示 ABCE1 与心肌细胞自噬和凋亡的调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Krittanawong C, Hahn J, Kayani W, et al. Fibrinolytic therapy in patients with acute ST-elevation myocardial infarction [J]. *Interv Cardiol Clin*, 2021, 10 (3): 381-390. DOI: 10.1016/j.iccl.2021.03.011.
- [2] Zhou ML, Yu YF, Luo XX, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutics from a mitochondria-centric perspective [J]. *Cardiology*, 2021, 146 (6): 781-792. DOI: 10.1159/000518879.
- [3] 李娜, 黄煜, 何庆. RIP3 在心肌细胞坏死中的作用及其机制 [J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31 (8): 1045-1047. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.028.
- [4] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176 (1-2): 11-42. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.048.
- [5] 李珊, 王艳玲, 黄冬林, 等. 血必净通过调控自噬减轻脓毒症炎症反应和肺损伤的实验研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2022, 29 (4): 412-416. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2022.04.006.
- [6] Xing YH, Wei XQ, Liu YC, et al. Autophagy inhibition mediated by MCOLN1/TRPML1 suppresses cancer metastasis via regulating a ROS-driven TP53/p53 pathway [J]. *Autophagy*, 2022, 18 (8): 1932-1954. DOI: 10.1080/15548627.2021.2008752.
- [7] Yao L, Chen HG, Wu QH, et al. Hydrogen-rich saline alleviates inflammation and apoptosis in myocardial I/R injury via PINK-mediated autophagy [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44 (3): 1048-1062. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4264.
- [8] Wang L, Lyu XB, Tian J, et al. Cardioprotective effect of Nec-1 in rats subjected to MI/R: downregulation of autophagy-like cell death [J]. *Cardiovasc Ther*, 2021, 2021: 9956814. DOI: 10.1155/2021/9956814.
- [9] Yan RN, Gao W, Chen WJ, et al. rTFPI protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury through inhibiting autophagy and the class III PI3K/Beclin-1 pathway [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2023, 81 (1): 97-104. DOI: 10.1007/s12013-022-01113-0.
- [10] 李春霞, 余洁, 陆远富, 等. 丹参酮类心脑血管保护作用与机制的研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 35 (8): 542-546. DOI: 10.14109/j.cnki.xyylc.2016.08.004.
- [11] 柴军武, 薛奋龙, 王凯, 等. 心脏移植后他克莫司预防急性排斥效果的研究 [J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2017, 5 (5): 355-358. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2017.05.09.
- [12] 孙侠, 赵倩茹, 袁伟. 心肌线粒体能量代谢在心血管疾病中的研究进展 [J]. *中国心血管杂志*, 2022, 27 (1): 90-93. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5410.2022.01.017.
- [13] 孙超. 基于自噬和 PI3K-Akt-mTOR 信号转导通路研究缺血预处理对糖尿病心肌缺血/再灌注损伤的保护作用 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [14] 徐秋林. 自噬在心肌缺血-再灌注损伤中的不同作用 [D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [15] Zuo Z, Zuo PF, Sheng ZL, et al. Tetramethylpazine attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through modulation of autophagy [J]. *Life Sci*, 2019, 239: 117016. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117016.
- [16] Huang J, Qing W, Pan YS. NPAS2 ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via CX3CL1 pathways and regulating autophagy [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13 (16): 20569-20584. DOI: 10.18632/aging.203445.
- [17] Pillar N, Polsky AL, Shomron N. Dual inhibition of ABCE1 and LCP1 by microRNA-96 results in an additive effect in breast cancer mouse model [J]. *Oncotarget*, 2019, 10 (21): 2086-2094. DOI: 10.18632/oncotarget.26747.
- [18] Seborova K, Vaclavikova R, Soucek P, et al. Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses [J]. *Cancer Med*, 2019, 8 (2): 606-616. DOI: 10.1002/cam4.1964.

(收稿日期: 2023-02-10)