

[药 理]

山楂叶总黄酮通过调控 miR-133b 改善缺氧复氧诱导的神经细胞损伤

李丽静¹, 王领弟¹, 吴晓光²
(1. 承德医学院附属医院药学部, 河北 承德 067000; 2. 河北省中药开发与研究重点实验室, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 探讨山楂叶总黄酮通过调控 miR-133b 改善缺氧复氧诱导的神经细胞损伤。**方法** 山楂叶总黄酮 (10、30、90 mg/L) 培养 SH-SY5Y 细胞 24 h 后, 构建缺氧复氧 (H/R) 细胞模型; 将 miR-NC、miR-133b、anti-miR-NC、anti-miR-133b 质粒转染至 SH-SY5Y 细胞 6 h, 加入 90 mg/L 山楂叶总黄酮处理 24 h, 再进行缺氧复氧处理。RT-PCR 检测 miR-133b、*RBMX* mRNA 表达, Western blot 检测 RBMX、Bax、Bcl-2 蛋白表达, 采用试剂盒分别检测 LDH、SOD、MDA 水平, 流式细胞术检测细胞凋亡, 双荧光素酶报告基因实验检测荧光活性。**结果** 预处理 SH-SY5Y 细胞, 山楂叶总黄酮能上调 H/R 诱导的神经细胞 SOD 水平, 下调 LDH、MDA 水平, 抑制 Bax、*RBMX* 表达及细胞凋亡率, 促进 Bcl-2、miR-133b 表达 ($P<0.05$), 与 H/R 诱导的神经细胞过表达 miR-133b 结果一致。且 miR-133b 靶向调控 *RBMX* 的表达, 抑制 miR-133b 表达逆转了山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞损伤的改善作用。**结论** 山楂叶总黄酮通过调控 miR-133b 靶向调控 *RBMX* 的表达改善缺氧复氧诱导的神经细胞损伤。

关键词: 山楂叶总黄酮; miR-133b; *RBMX*; 神经细胞损伤; 缺氧复氧

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)06-1443-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.009

Effects of hawthorn leaf flavonoids on improvement of hypoxia-reoxygenation-induced neuronal damage via miR-133b regulation

LI Li-jing¹, WANG Ling-di¹, WU Xiao-guang²
(1. Department of Pharmacy, The Hospital Affiliated to Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Hebei Provincial Key Laboratory for Development and Research of Traditional Chinese Medicine, Chengde 067000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of hawthorn leaf flavonoids (HLF) on improvement of hypoxia-reoxygenation-induced neuronal damage via miR-133b regulation. **METHODS** HLF (10, 30, 90 mg/L) cultured SH-SY5Y cells for 24 h were induced into hypoxia-reoxygenation (H/R) cell models. The SH-SY5Y cells were then transfected with miR-NC, miR-133b, anti-miR-NC, or anti-miR-133b plasmids for 6 h, respectively, and treated with 90 mg/L HLF for 24 h, followed by H/R. Their detections of expression of miR-133b and *RBMX* mRNA by RT-PCR, expression of RBMX, Bax, and Bcl-2 protein by Western blot were performed. The levels of LDH, SOD, and MDA were determined by the kit. The determinations of cell apoptosis by flow cytometry, fluorescent activity by dual luciferase reporter gene experiment were carried out as well. **RESULTS** SH-SY5Y cells pre-treated with HLF shared up-regulated H/R-induced neuronal SOD levels, down-regulated LDH, MDA levels, inhibited Bax, *RBMX* expression and apoptosis rate, promoted Bcl-2, miR-133b expression ($P<0.05$), which was consistent with the results of mir-133b overexpression in H/R-induced nerve cells. Moreover, miR-133b targeted the regulation of *RBMX* expression, and inhibition of miR-133b expression reversed the protective effect of hawthorn leaf flavonoids on neuronal damage induced by H/R. **CONCLUSION** HLF can improve H/R-induced neuronal damage by regulating the expression of *RBMX* via miR-133b regulation.

收稿日期: 2019-12-11
基金项目: 河北省高等学校科学研究课题计划 (QN2014103)
作者简介: 李丽静 (1983—), 女, 硕士, 主管药师, 从事医院药学研究。Tel: 13833417636

KEY WORDS: hawthorn leaves flavonoids (HLF); miR-133b; RBMX; nerve cell injury; hypoxia reoxygenation (H/R)

缺氧缺血性脑损伤是临床常见的一大类中枢神经系统疾病, 有较高的发病率和死亡率, 其主要机制是脑缺血引起神经细胞凋亡, 从而造成脑的相应区域的功能障碍^[1]。寻找抑制缺氧缺血后神经细胞凋亡的有效药物, 对改善缺血性脑损伤尤为重要。近年来, 研究发现中药具有抗脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的作用, 探讨中药抑制神经细胞凋亡的作用机制具有重要意义^[2]。山楂叶总黄酮是从山楂叶中提取的黄酮类化合物, 在心、脑血管以及其他方面具有很好的药理作用^[3]。有报道发现山楂叶总黄酮可抑制神经元凋亡, 改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能^[4]。山楂叶总黄酮还能通过上调 Bcl-2/Bax 比值、下调 caspase-3 表达抑制心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡^[5]。有研究发现在缺氧复氧诱导的心肌细胞中 miR-133b-5p 下调表达, 上调其表达能抑制缺氧复氧诱导的细胞凋亡^[6]。X-连锁的 RNA 结合基序蛋白 (RNA Binding Motif protein, X-Linked, RBMX) 位于人类 X 染色体上, 对大脑发育至关重要^[7]。脊髓损伤后 RBMX 表达增加, 且在脊髓损伤后神经元的凋亡、星形胶质细胞的增殖过程中发挥重要作用^[8]。然而山楂叶总黄酮、miR-133b-5p 对缺氧复氧诱导的神经细胞损伤的影响及其机制尚不清楚, 本实验旨在研究山楂叶总黄酮、miR-133b-5p 对缺氧复氧诱导的神经细胞损伤的影响及其机制是否与 RBMX 有关。

1 材料

1.1 细胞株 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自中国科学院上海细胞库, 于 10% FBS 高糖 DMEM 培养基, 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养细胞。

1.2 药物与试剂 山楂叶总黄酮购自西安斯诺特生物技术有限公司; 胎牛血清 (FBS, 货号 16000-044)、胰蛋白酶 (货号 25200-056)、DMEM 培养液 (货号 C11965500BT) 购自美国 Gibco 公司; 反转录试剂盒 (货号 RR037A)、实时荧光定量试剂盒 (货号 RR092C) 购自日本 Takara 公司; Trizol 试剂盒 (货号 15596026)、LipofectamineTM2000 转染试剂 (货号 11668-019) 购自美国 Invitrogen 公司; 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒 (货号 23235)、二甲基亚砷 (DMSO, 货号 D8418-50ML)、RIPA 蛋白裂解液 (货号 YB20101ES60) 购自美国 Sigma 公司; 聚偏二氟乙

烯膜 (PVDF, 货号 044080) 购自美国 Alfa 公司; 十二烷基硫酸钠, 钠盐-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (dodecyl sulfate, sodium salt-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) (货号 P0012A) 购自北京碧云天生物科技有限公司; 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 和碘化丙锭 (PI) 试剂盒 (货号 CA1020)、LDH 试剂盒 (货号 BC0685)、SOD 试剂盒 (货号 BC0170)、MDA 试剂盒 (货号 BC0025) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 兔抗人 Bax 多克隆抗体 (货号 XYB343Hu01)、兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体 (货号 XYA778Mu01)、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体 (货号 xyKF703) 购自上海信裕生物科技有限公司; 兔抗人 RBMX 多克隆抗体 (货号 LS-C170358)、山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP, 货号 SE134) 购自上海恒斐生物技术有限公司; miR-NC、miR-133b、anti-miR-NC、anti-miR-133b、WT-RBMX 和 MUT-RBMX 载体质粒购自金瑞斯生物科技公司。

1.3 仪器 CO₂ 细胞培养箱购自美国 Precision Scientific 公司; LightCycler480 荧光定量 PCR 仪购自美国 Roche 公司; Thermo FC 酶标仪购自美国 Thermo 公司; FACS caliber 流式细胞仪、PowerPac 蛋白电泳仪、Gel Doc XR+凝胶显示系统购自美国 BD 公司。

2 方法

2.1 H/R 模型建立 将神经细胞用无血清低糖的 DMEM 培养基培养, 置于持续充入 95% N₂、5% CO₂ 的密闭缺氧培养箱中缺氧处理 2 h, 然后更换为含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 37 ℃、5% CO₂ 的无菌箱中继续培养 6 h。

2.2 细胞转染及分组 山楂叶总黄酮低、中、高剂量 (10、30、90 mg/L) 培养 SH-SY5Y 细胞 24 h, 进行 H/R 处理。将 miR-NC、miR-133b、anti-miR-NC、anti-miR-133b 质粒转染至 SH-SY5Y 细胞中分别记为 miR-NC 组、miR-133b 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-133b 组。miR-NC、miR-133b 质粒转染至 SH-SY5Y 细胞 6 h, 进行缺氧复氧处理, 记为 H/R+miR-NC 组、H/R+miR-133b 组。将 anti-miR-NC、anti-miR-133b 转染至 SH-SY5Y 细胞 6 h, 90 mg/L 山楂叶总黄酮处理 24 h, 再进行 H/R 处理, 记为山楂叶总黄酮+anti-miR-NC 组, 山楂

叶总黄酮+anti-miR-133b 组。

2.3 RT-PCR 检测细胞 miR-133b、*RBMX* mRNA 表达 正常组、模型组、山楂叶总黄酮（低、中、高剂量）组、H/R + miR-NC 组、H/R + miR-133b 组、山楂叶总黄酮+anti-miR-NC 组，山楂叶总黄酮+anti-miR-133b 组细胞继续培养 48 h，提取各组细胞总 RNA，将 RNA 反转录为 cDNA，依据荧光定量试剂盒说明，miR-133b、*RBMX* 分别以 *U6* 和 *GAPDH* 为内参进行 PCR 扩增，循环条件为 95 ℃、30 s，60 ℃、30 s；72 ℃、30 s，共 40 个循环；60 ℃延长5 min。每个样品重复 3 次，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相对表达量。

2.4 Western blot 法检测 *RBMX*、Bax、Bcl-2 蛋白表达 各组细胞继续培养 48 h，加入 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 30 min；4 ℃、12 000 *g* 离心 15 min，取上清。BCA 试剂盒测定蛋白样品浓度后进行 SDS-PAGE，电泳结束后，将蛋白电转至 PVDF 膜上，50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h；分别加入兔抗人 Bax 多克隆抗体、兔抗人 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗人 *RBMX* 多克隆抗体、兔抗人 *GAPDH* 多克隆抗体，4 ℃ 过夜；洗膜后，加入二抗山羊抗兔 IgG-HRP，室温孵育 2 h；TBST 洗膜 3 次，10 min/次。在暗室中曝光显影，再浸入定影，最后洗去残液晾干，将胶片用 Quantity One 凝胶分析软件处理，测定各组蛋白条带的灰度值，以目的条带和 *GAPDH* 条带的比值作为蛋白表达，实验重复 3 次。

2.5 检测 LDH、SOD、MDA 水平 各组细胞继续培养 48 h，取细胞培养上清液，按照 LDH 试剂盒说明书检测细胞培养液中 LDH 水平；细胞培养 48 h 后，去除培养基，用 PBS 洗 3 遍，细胞裂解、离心，取上清，按照试剂盒说明书进行操作检测细胞中 SOD、MDA 水平，每组重复 3 次。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 各组细胞继续培

养 48 h，胰蛋白酶消化，4 ℃、300 *g* 离心 10 min。预冷 PBS 洗涤后重悬。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书，分别加入 5 μL annexin V-FITC 和 10 μL PI，轻轻混匀后室温避光孵育 15 min，流式细胞仪检测激发波长 488 nm 和发射波长 530 nm 处的荧光强度，实验重复 3 次。

2.7 荧光素酶报告基因实验检测 miR-133b 对 *RBMX* 的靶向调控 TargetScan 数据库显示 *RBMX* 3'UTR 区域有 miR-133b 结合位点。构建野生型和突变型基因靶点 *RBMX* 的 3'UTR 荧光素酶表达载体（WT-*RBMX* 和 MUT-*RBMX*），取对数生长期 SH-SY5Y 细胞接种于 24 孔板（1×10³/孔），待细胞生长至 80% 汇合时，用 Lipofectamine™ 2 000 分别将 WT-*RBMX* 和 MUT-*RBMX* 质粒转染到 SH-SY5Y，同时分别转染 miR-133b 和 miR-NC 质粒。依据说明书要求，使用荧光素酶报告基因检测仪进行双荧光素酶报告实验测定。实验结果以荧光素酶活性和 Renilla 活性的比值进行统计学分析，实验重复 3 次。

2.8 统计学分析 实验中每个样本均重复 3 次，每次设 3 个复孔。使用 SPSS 22.0 进行统计分析，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞损伤的影响 与正常组相比，模型组 LDH、MDA 水平升高，SOD 水平降低，Bcl-2 蛋白表达降低，Bax 蛋白表达升高，细胞凋亡率升高（ $P<0.05$ ）；与模型组相比，山楂叶总黄酮低、中、高剂量组 LDH、MDA 水平降低，SOD 水平升高，Bcl-2 蛋白表达升高，Bax 蛋白表达降低，细胞凋亡率降低（ $P<0.05$ ），呈浓度依赖性，见表 1、图 1。山楂叶总黄酮可改善 H/R 诱导的神经细胞损伤。

表 1 山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞损伤的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）
Tab.1 Effects of HLF on H/R-induced neuronal injury（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

组别	LDH/(U·L ⁻¹)	SOD(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	凋亡率/%	Bcl-2	Bax
正常组	96.12±9.32	39.41±3.84	1.02±0.09	6.47±0.69	0.69±0.06	0.31±0.03
模型组	476.32±28.31 [*]	11.32±1.23 [*]	5.63±0.57 [*]	28.63±2.81 [*]	0.23±0.03 [*]	0.76±0.07 [*]
山楂叶总黄酮低剂量组	367.65±25.63 [#]	16.27±1.63 [#]	3.87±0.36 [#]	22.53±2.14 [#]	0.35±0.04 [#]	0.64±0.05 [#]
山楂叶总黄酮中剂量组	259.31±23.13 ^{#&}	21.32±1.98 ^{#&}	2.37±0.24 ^{#&}	15.98±1.53 ^{#&}	0.46±0.04 ^{#&}	0.51±0.04 ^{#&}
山楂叶总黄酮高剂量组	143.26±13.41 ^{#&▲}	32.14±2.74 ^{#&▲}	1.54±0.16 ^{#&▲}	12.36±1.15 ^{#&▲}	0.58±0.05 ^{#&▲}	0.39±0.03 ^{#&▲}

注：与正常组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与山楂叶总黄酮低剂量组比较，[&] $P<0.05$ ；山楂叶总黄酮中剂量组比较，[▲] $P<0.05$ 。

3.2 山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞中 miR-133b、*RBMX* 表达的影响 与正常组相比，模型组 miR-133b 表达降低，*RBMX* mRNA 和蛋白表达升高（ $P<0.05$ ）；与模型组相比，山楂叶总黄酮低、

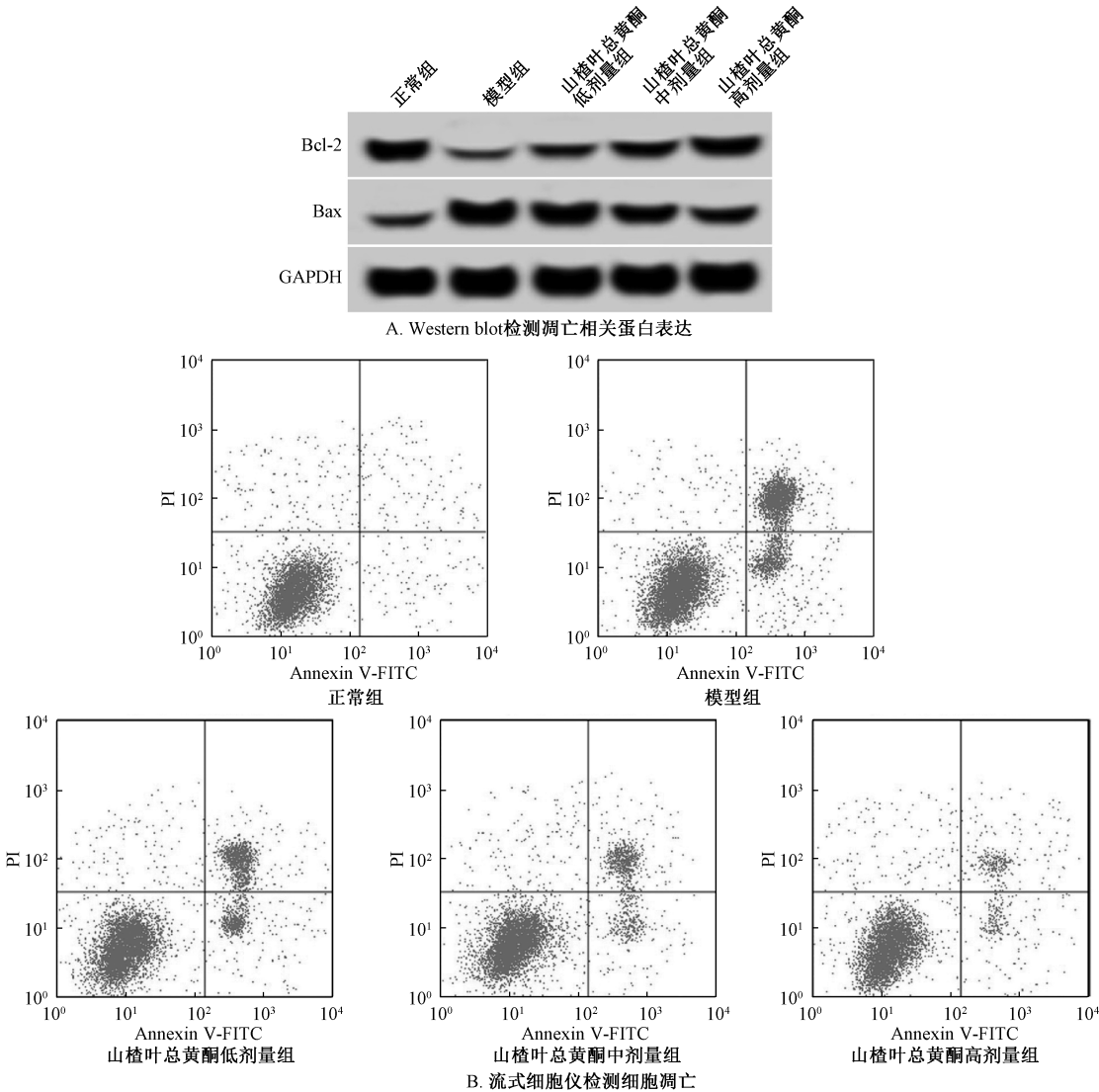


图 1 山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞凋亡的影响
Fig. 1 Effects of HLF on H/R-induced neuronal apoptosis

中、高剂量组 miR-133b 表达升高, *RBMX* mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.05$), 呈浓度依赖性, 见图 2、表 2。山楂叶总黄酮抑制 H/R 诱导的神经细胞中 *RBMX* 表达, 促进 miR-133b 表达。

表 2 山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞中 miR-133b 和 *RBMX* 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Effects of HLF on expression of miR-133b and *RBMX* in H/R-induced neurons ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	miR-133b	<i>RBMX</i>	<i>RBMX</i>
正常组	1.01±0.09	1.00±0.09	0.41±0.04
模型组	0.33±0.03 [*]	2.74±0.28 [*]	0.89±0.06 [*]
山楂叶总黄酮低剂量组	0.46±0.05 [#]	2.23±0.22 [#]	0.74±0.06 [#]
山楂叶总黄酮中剂量组	0.59±0.06 [△]	1.84±0.17 [△]	0.63±0.04 [△]
山楂叶总黄酮高剂量组	0.73±0.07 [△]	1.46±0.14 [△]	0.52±0.04 [△]

注:与正常组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与山楂叶总黄酮低剂量组比较,[△] $P<0.05$;山楂叶总黄酮中剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

合位点 (图 3A)。荧光素酶报告基因检测实验结果显示 (表 3), 相较于 miR-NC 组, miR-133b 组 WT-*RBMX* 的神经细胞荧光素酶活性降低 ($P<0.05$); 而 MUT-*RBMX* 的神经细胞荧光素酶活

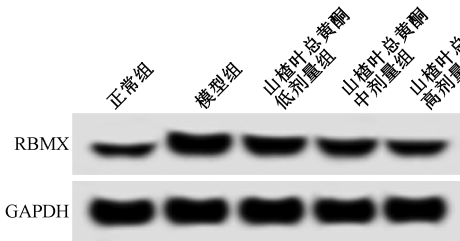


图 2 Western blot 检测 *RBMX* 蛋白表达
Fig. 2 Expression of *RBMX* protein by Western blot

3.3 miR-133b 靶向调控 *RBMX* 的表达 通过 TargetScan 数据库预测到 *RBMX* 与 miR-133b 存在结
1446

性差异无统计学意义。Western blot 检测结果显示 (图 3B、表 4), 相较于 miR-NC 组, miR-133b 组 RBMX 表达降低; 而相较于 anti-miR-NC 组, anti-

miR-133b 组 RBMX 表达水平升高 ($P<0.05$)。miR-133b 靶向调控 RBMX 的表达。

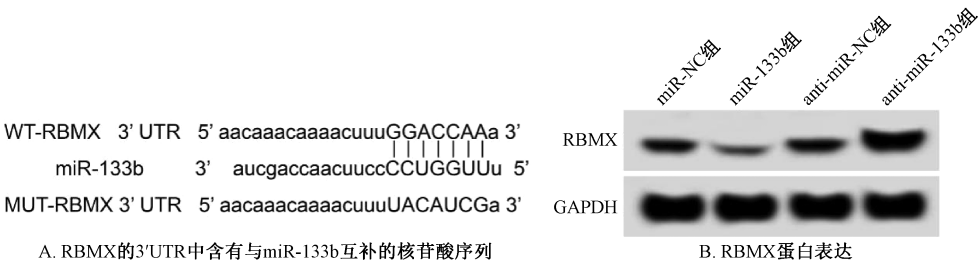


图 3 miR-133b 靶向调控 RBMX 的表达
Fig. 3 miR-133b target regulation on RBMX expression

表 3 双荧光素酶报告实验 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 3 Dual luciferase reporter experiment ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	WT-RBMX	MUT-RBMX
miR-NC	1.01±0.09	1.00±0.08
miR-133b	0.34±0.04*	1.04±0.09

注:与 miR-NC 组比较, * $P<0.05$ 。

表 4 miR-133b 调控 RBMX 蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 4 miR-133b regulation on the expression of RBMX protein ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	RBMX
miR-NC 组	0.43±0.04
miR-133b 组	0.21±0.03*
anti-miR-NC 组	0.42±0.03
anti-miR-133b 组	0.85±0.08 [#]

注:与 miR-NC 组比较, * $P<0.05$; 与 anti-miR-NC 组比较, [#] $P<0.05$ 。

3.4 miR-133b 过表达对 H/R 诱导的神经细胞损伤的影响 与正常组相比, 模型组 LDH、MDA 水平升高, SOD 水平降低, miR-133b、Bcl-2 表达降

低, Bax 蛋白表达升高, 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$); 与 H/R+miR-NC 组相比, H/R+miR-133b 组 LDH、MDA 水平降低, SOD 水平升高, miR-133b、Bcl-2 表达升高, Bax 蛋白表达降低, 细胞凋亡率降低 ($P<0.05$) (图 4、表 5)。miR-133b 过表达保护 H/R 诱导的神经细胞损伤。

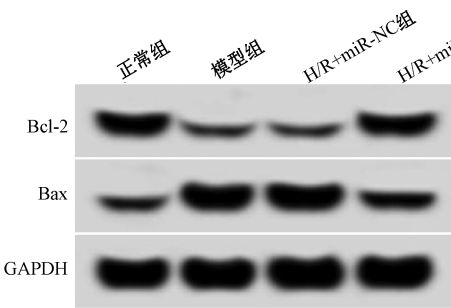


图 4 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达
Fig. 4 Expression of apoptosis-related proteins by Western blot

表 5 miR-133b 过表达对 H/R 诱导的神经细胞损伤的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 5 Effect of miR-133b overexpression on H/R-induced neuronal injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	miR-133b	LDH/(U·L ⁻¹)	SOD(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	凋亡率/%	Bcl-2	Bax
正常组	1.02±0.09	99.65±9.32	43.16±4.38	0.96±0.09	7.62±0.73	0.68±0.06	0.32±0.03
模型组	0.36±0.03*	459.36±26.31*	13.25±1.33*	5.54±0.53*	26.54±2.58*	0.22±0.03*	0.77±0.07*
H/R+miR-NC	0.34±0.04	466.54±22.67	12.74±1.28	5.61±0.55	27.32±2.71	0.21±0.03	0.79±0.08
H/R+miR-133b	0.82±0.08 [#]	168.42±16.35 [#]	37.65±3.68 [#]	1.78±0.17 [#]	14.69±1.43 [#]	0.56±0.05 [#]	0.43±0.04 [#]

注:与正常组比较, * $P<0.05$; 与 H/R+miR-NC 组比较, [#] $P<0.05$ 。

3.5 抑制 miR-133b 表达逆转了山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞损伤的作用 与模型组相比, 山楂叶总黄酮高剂量组 LDH、MDA 水平降低, SOD 水平升高, miR-133b、Bcl-2 蛋白表达升高, RBMX、Bax 蛋白表达降低, 细胞凋亡率降低 ($P<0.05$); 与山楂叶总黄酮+anti-miR-NC 组相比, 山楂叶总黄酮+anti-miR-133b 组 LDH、MDA 水平升

高, SOD 水平降低, miR-133b、Bcl-2 表达降低, RBMX、Bax 蛋白表达升高, 细胞凋亡率升高 ($P<0.05$), 见表 6、图 5。抑制 miR-133b 表达逆转了山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞损伤的改善作用。

4 讨论
脑缺血再灌注会产生大量氧自由基和有毒活性

表 6 抑制 miR-133b 表达逆转了山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞损伤的作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Inhibited miR-133b expression on reversing HLF effect to H/R-induced neuronal injury ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	miR-133b	RBMX	LDH/ (U·L ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)	凋亡率/ %	Bcl-2	Bax
模型组	1.01±0.09	0.86±0.08	473.15±29.84	11.65±1.25	5.71±0.52	27.36±2.71	0.22±0.03	0.77±0.06
山楂叶总黄酮高剂量组	2.46±0.24 [*]	0.37±0.03 [*]	152.39±15.66 [*]	34.15±3.48 [*]	1.49±0.15 [*]	11.54±1.16 [*]	0.57±0.05 [*]	0.38±0.03 [*]
山楂叶总黄酮+anti-miR-NC 组	2.51±0.25	0.35±0.03	146.32±14.58	37.61±3.59	1.43±0.14	10.69±1.08	0.59±0.06	0.36±0.04
山楂叶总黄酮+anti-miR-133b 组	1.52±0.15 [#]	0.74±0.07 [#]	423.64±27.14 [#]	16.32±1.68 [#]	5.19±0.51 [#]	23.14±2.31 [#]	0.34±0.03 [#]	0.65±0.06 [#]

注:与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与山楂叶总黄酮+anti-miR-NC 组比较,[#] $P<0.05$ 。

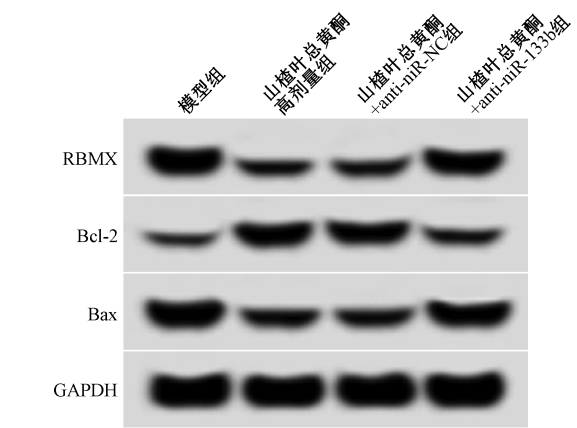


图 5 Western blot 检测 RBMX 和凋亡相关蛋白表达

Fig. 5 RBMX and apoptosis-related protein expression by Western blot

氧,造成氧化应激反应从而导致细胞凋亡,而细胞凋亡可导致脑缺血性神经损伤,中药在预防和治疗缺血再灌注损伤和神经性疾病中扮演重要角色^[9]。研究报道山楂叶总黄酮可降低缺氧再给氧后 LDH、MDA 水平,提高 SOD 水平从而增强细胞抗氧化作用,减少自由基及脂质过氧化物导致的细胞膜损伤,抑制缺氧再给氧损伤心肌细胞凋亡,从而改善心肌细胞缺氧再给氧损伤^[10]。山楂叶总黄酮还能降低 caspase-3 表达,改善 H₂O₂ 诱导的乳鼠心肌细胞氧化应激和细胞凋亡^[11]。此外,山楂叶总黄酮可提高脑组织中 SOD 活性,降低 MDA 及 NO 含量,从而减轻脑缺血再灌注神经细胞损伤^[12]。本实验结果显示,山楂叶总黄酮可提高 H/R 诱导的神经细胞中 SOD 水平,降低 LDH、MDA 水平,降低细胞凋亡率。说明,山楂叶总黄酮可保护 H/R 诱导的神经细胞损伤,其可能与提高细胞内的抗氧化能力有关。

据报道 miRNA 参与缺血性脑卒中的氧化应激、细胞凋亡、再灌注损伤等病理生理过程,miRNA 对早期干预治疗缺血性脑卒中有一定意义^[13]。研究^[14]发现上调 miR-133b 能降低神经细胞凋亡,保护甲基苯丙胺诱导的神经损伤。过表达 miR-133b

可增加心肌细胞活力,降低 LDH 活性及心肌细胞凋亡率,减轻心力衰竭大鼠心肌缺血再灌注损伤^[15]。本实验结果显示,miR-133b 过表达也可提高 H/R 诱导的神经细胞中 SOD 水平,降低 LDH、MDA 水平,降低细胞凋亡率。说明 miR-133b 过表达能改善 H/R 诱导的神经细胞损伤。还有研究报道吗啡预处理通过上调 miR-133b-5p,进一步抑制靶基因 *Fas* 表达,从而减轻心肌细胞缺血再灌注缺氧再给氧损伤^[16]。本实验结果显示,山楂叶总黄酮可提高 miR-133b 的表达,而抑制 miR-133b 表达逆转了山楂叶总黄酮对 H/R 诱导的神经细胞损伤的保护作用。说明山楂叶总黄酮可能通过调控 miR-133b 表达改善 H/R 诱导的神经细胞损伤。

研究发现 RBMX 与人乳腺癌促凋亡基因 *Bax* 正相关,可能参与细胞凋亡^[17]。RBMX 是 DNA 抵御外来损伤的重要因素,是一种肿瘤抑制因子^[18-19]。光损伤后 RBMX 在视网膜中的表达增加, RBMX 可能在视网膜光损伤后神经节细胞的凋亡过程中发挥重要作用^[20]。本实验结果显示,山楂叶总黄酮可降低 RBMX 的表达,且 miR-133b 靶向调控 RBMX 的表达。提示山楂叶总黄酮可能通过调控 miR-133b,进而下调 RBMX 的表达,改善 H/R 诱导的神经细胞损伤。

综上所述,山楂叶总黄酮及过表达 miR-133b 对缺氧复氧诱导的神经细胞损伤有保护作用,其机制可能与下调 RBMX 表达及提高抗氧化能力有关。

参考文献:

[1] 谢凤姣,张丽娟. 缺氧缺血性脑损伤细胞凋亡的研究进展 [J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(8): 1152-1155.

[2] 马丙祥,陈恬恬,王怡珍. 中药抑制神经细胞凋亡作用的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(11): 1241-1243.

[3] 马琳,李六水. 山楂叶总黄酮的药理作用研究进展 [J]. 天津药学, 2017, 29(5): 65-68.

[4] 毛晓霞,夏爱华,吴晓光,等. 山楂叶总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡和 c-fos, c-jun 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 174-177.

[5] 袁芳. 山楂叶总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细

胞凋亡及 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(8): 42-45.

[6] 韩正怡, 何淑芳, 朱海娟, 等. 微小 RNA-133b-5p 在缺氧复氧诱发大鼠心肌细胞凋亡中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(6): 740-743.

[7] Tsend-Ayush E, O'Sullivan L A, Grützner F S, *et al.* RBMX gene is essential for brain development in zebrafish[J]. *Dev Dyn*, 2005, 234(3): 682-688.

[8] 张金龙. RBMX 在大鼠脊髓损伤后的表达[D]. 南通: 南通大学, 2014.

[9] 朱 晶, 万 丽, 徐 玮, 等. 人参首乌方对缺氧复氧诱导的皮质神经细胞凋亡的影响[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1): 77-83.

[10] 闵 清, 白育庭, 余 薇, 等. 山楂叶总黄酮对缺氧再给氧心肌细胞的保护作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1): 30-33.

[11] 袁 芳. 山楂叶总黄酮对 H₂O₂ 诱导乳鼠心肌细胞氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(4): 368-371; 405.

[12] 纪影实, 李 红, 曲极冰, 等. 山楂叶总黄酮对脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(21): 2743-2746.

[13] 陈颖添, 汤永红. miRNA 与缺血性脑卒中的关系进展研究[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(11): 177-178.

[14] 刘海莉, 李 涛, 王洪杰, 等. miR-133b 在甲基苯丙胺诱导 PC12 细胞凋亡中的调控作用[J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2018, 39(1): 26-33.

[15] 潘永露. ERK 信号通路 with microRNA-133b-5p 在吗啡预处理减轻心力衰竭大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用及其机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.

[16] 程 洁. 吗啡预处理通过调控 miR-133b-5p 减轻心肌细胞缺氧再给氧损伤的作用及机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.

[17] Martínez-Arribas F, Agudo D, Pollán M, *et al.* Positive correlation between the expression of X-chromosome RBM genes (RBMX, RBM3, RBM10) and the proapoptotic Bax gene in human breast cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(6): 1275-1282.

[18] Adamson B, Smogorzewska A, Sigoillot F D, *et al.* A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(3): 318-328.

[19] Shin K H, Kim R H, Kim R H, *et al.* HnRNP G elicits tumor-suppressive activity in part by upregulating the expression of Txnip[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(4): 880-885.

[20] 戴 明. RBMX 在大鼠视网膜光损伤后的表达[D]. 南通: 南通大学, 2015.

葫芦素 B 通过调控 HERG1 对膀胱癌细胞增殖、迁移侵袭和放射敏感性的影响

董建设¹, 李 豪¹, 赵俊峰¹, 陈瑞廷¹, 张林超¹, 贾占奎²
(1. 河南省中医院 泌尿外科, 河南 郑州 450000; 2. 郑州大学第一附属医院 泌尿外科, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨葫芦素 B 通过调控 HERG1 对膀胱癌细胞增殖、迁移侵袭和放射敏感性的影响。**方法** 葫芦素 B (0.1、1、10 μmol/L) 处理膀胱癌细胞 48 h; 将 si-NC、si-HERG1、pcDNA、pcDNA-HERG1 转染至 T24 细胞; 经 pcDNA、pcDNA-HERG1 转染后, 分别加入 10 μg/mL 葫芦素 B 培养 48 h。MMT 法检测各组细胞增殖情况; Transwell 评估细胞的迁移和侵袭变化; 细胞克隆形成实验测定细胞放射敏感性; RT-PCR 检测 T24 细胞 *HERG1* mRNA 表达; Western blot 法检测蛋白表达。**结果** 葫芦素 B 抑制 T24 细胞增殖、迁移、侵袭, *HERG1* mRNA 及蛋白表达, 呈浓度依赖型 ($P<0.05$); 增强 T24 细胞的放射敏感性。抑制 HERG1 表达可抑制 T24 细胞的增殖、迁移和侵袭, 增强其放射敏感性 ($P<0.05$)。过表达 HERG1 逆转了葫芦素 B 抑制 T24 细胞增殖、迁移和侵袭和放疗增敏的作用。**结论** 葫芦素 B 能抑制膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭能力, 并且增强细胞的放射敏感性, 机制可能与调控 *HERG1* 基因有关。

关键词: 葫芦素 B; HERG1; 膀胱癌; 放射敏感性; 增殖; 迁移侵袭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)06-1449-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.010

收稿日期: 2019-09-26
作者简介: 董建设 (1979—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中西医结合泌尿外科男科。Tel: 13838055805, E-mail: sygm163@163.com