

PC12 细胞活性和凋亡相关基因表达影响的比较[J]. 中成药, 2019, 41(3): 543-548.

[14] Wang S, Hu Y, Tan W, *et al.* Compatibility art of traditional Chinese medicine: from the perspective of herb pairs[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2): 412-423.

[15] 夏春蕾. 分析活血祛瘀和祛风湿类中药配伍治疗骨质增生的效果[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(77): 181.

[16] 马越鸣, 谢 华, 朱世敏, 等. 黄芪甲苷在兔体内的药动学和大鼠的排泄[J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(9): 563-567.

红花黄素 A 调控核受体 TR3 胞内移位抑制氧化应激对心肌细胞的损伤

骆杰炉, 梁 俭, 梁文能*
(广州中医药大学第一附属医院 药学部, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探究红花黄素 A 调控核受体 TR3 胞内移位抑制氧化应激对心肌细胞的损伤。**方法** 利用 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞建立心肌氧化应激模型, 不同浓度红花黄素 A 处理 H₂O₂ 诱导 H9c2 心肌细胞 24 h, CCK-8 法检测心肌细胞存活率, 流式细胞法检测心肌细胞凋亡率, 比色法检测 SOD、MDA 水平, 免疫荧光法观察 TR3 在细胞内的定位, Western blot 法检测 TR3 在细胞核和线粒体表达以及凋亡通路蛋白 Bcl-2、Bax、cl caspase-9 表达。**结果** 与模型组相比, 红花黄素 A 增加 H9c2 心肌细胞存活率, 降低细胞凋亡率, 升高 SOD 水平, 降低 MDA 水平, 促进 Bcl-2 蛋白表达, 抑制 Bax、cl caspase-9 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 呈浓度依赖性。随着红花黄色素 A 的浓度增加, TR3 核受体的移位逐渐减小并聚集在细胞核附近。**结论** 红花黄素 A 能够调控核受体 TR3 从细胞核向线粒体的转移, 并通过抑制线粒体凋亡通路, 从而减轻氧化应激对心肌细胞的损伤。
关键词: 红花黄素 A; TR3 核受体; 氧化应激; 心肌损伤; 线粒体凋亡
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)06-1462-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.012

Safflor yellow A inhibits oxidative stress on cardiomyocyte via regulation of nuclear receptor TR3 localization

LUO Jie-lu, LIANG Jian, LIANG Wen-neng*
(Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated to Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: **AIM** To study safflor yellow A’ s inhibition on oxidative stress of cardiomyocyte via regulation of nuclear receptor TR3 localization. **METHODS** H₂O₂-injured H9c2 myocardial cells were established as myocardial oxidative stress models for 24 h treatment of different concentrations of safflor yellow A. The cells were subjected to tests of the rate of myocardial cell viability by CCK-8 kit, the rate of myocardial cell apoptosis by flow cytometry, the levels of SOD and MDA by colorimetry, TR3 localization in cells by immunofluorescence, TR3 expression in the nucleus and mitochondria and the expression of apoptosis pathway proteins Bcl-2, Bax and cl caspase-9 by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the goupss treated with safflor yellow A shared concentration-dependently increase in the survival rate of H9c2 cardiomyocytes, decrease in the apoptosis rate, reduction in the level of MDA, increase the level of SOD, promotion of the expression of Bcl-2 protein, and inhibition in the expression of Bax and cl caspase-9 protein ($P<0.05$, $P<0.01$). The increase of safflor yellow A concentration brought forth TR3 nuclear receptors’ gradual translocation decrease, and their accumulation near the nucleus. **CONCLUSION** Inhibiting the nuclear receptor TR3 transferring from nucleus to mitochondria and affect-

收稿日期: 2019-11-11
作者简介: 骆杰炉 (1981—), 男, 主管中药师, 研究方向为中药药理学。Tel: 13543437044, E-mail: jazzgz329@qq.com
* 通信作者: 梁文能 (1967—), 男, 副主任中药师, 研究方向为中药药理学。Tel: (020) 36591222, E-mail: 2422274618@qq.com

ing the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress response reduction, safflor yellow A can thus alleviate oxidative stress-induced damage of myocardial cells.

KEY WORDS: safflor yellow A; TR3 nuclear receptor; oxidative stress; myocardial injury; mitochondrial apoptosis

氧化应激是心肌缺血后导致病情恶化的关键因素之一,心肌在缺血供氧不足的情况下,由于侧支循环再灌注,在恢复供氧的过程中产生大量氧自由基,超出细胞清除氧化物的能力,从而导致心肌组织进一步损伤和凋亡^[1]。有研究表明,核受体 TR3 (Thyroid-steroid receptor 3, TR3) 的胞内定位与氧化应激对细胞的损伤有着密切关系,TR3 从细胞核移位至线粒体是促进心肌细胞凋亡的重要机制^[2-3]。

红花 *Carthamus tinctorius* L. 属于菊科植物,作为药材最早见于东汉张仲景的《金匱要略》,记载其有活血化瘀、行气通脉的功效^[4]。红花色素是药材红花的主要活性成分,包含有多种水溶性查尔酮成分,其中红花黄色素 A 占比最高,目前已提取制作成单一成分的注射液在临床上主要用于治疗稳定型心绞痛等心血管疾病,具有显著的疗效^[5]。研究表明,红花黄色素 A 能够抑制缺氧再灌注过程中产生的氧自由基的水平,降低氧化应激对心肌细胞的损伤,但其具体作用机制尚未完全明确^[6]。本研究以 H₂O₂ 模拟氧自由基对 H9c2 心肌细胞的氧化应激损伤,研究红花黄色素 A 对 TR3 的胞内定位及凋亡信号通路的影响^[7],进一步阐明红花黄色素 A 保护缺血心肌的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 红花黄素 A (批号 111637-201812,纯度>99.0%)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI,批号 023K1925)、TritonX-100 (批号 118K0177) 购自美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒 (批号 KTC011001 购自日本 Dojindo Lab 公司;高糖 DMEM 培养基 (批号 966185)、特级胎牛血清 (FBS,批号 1315148) 购自美国 Gibco 公司;BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 P0019)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA,批号 S0131)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD,批号 S0101) 检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;AnnexinV-FITC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 BD556547) 购自美国 BD 公司;线粒体/细胞核提取试剂盒 (批号 KGA828) 购于南京凯基生物科技发展有限公司;Bcl-2 (稀释度 1:1 000,批号 15071)、Bax (稀释度 1:

1 000,批号 2772)、TR3 核受体 (稀释度 1:1 000,批号 3960)、cl caspase-9 (稀释度 1:1 000,批号 9504)、β-actin (稀释度 1:1 000,批号 4967) 兔抗鼠一抗、HRP 偶联羊抗兔二抗 (稀释度 1:5 000,批号 7074)、线粒体绿色荧光探针 (MitoTracker® Green FM) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;Alexa Fluor 594 (红色荧光,稀释度 1:400,批号 A00131) 羊抗兔二抗购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞株 鼠源性心肌细胞株 H9c2 由广州中医药大学中药学院药理实验室中心提供。

1.3 仪器 Thermo Forma 3951 细胞培养箱、Sorvall ST 40 台式离心机均购自美国 Thermo 公司;FACS Calibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司);iMark 680 酶标仪、Western blot 转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司);TCS SP8 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 H9c2 心肌细胞培养 用含 10% FBS 高糖 DMEM 培养液,于 37 ℃、5% CO₂、95% 饱和湿度条件下培养细胞。细胞生长满皿约 80% 时进行传代,弃去旧培养液,PBS 冲洗,加入 0.25% 胰酶消化 2~3 min,再加含血清培养液终止消化,用滴管轻轻吹打至细胞从皿底完全脱落,按实验需求接种于培养板或培养瓶内待用。

2.2 细胞存活率检测 将培养好的细胞接种于 96 孔板中,在细胞生长状态良好时,按实验需要进行不同的处理。模型组加入终浓度为 50 μmol/L H₂O₂ 造模,3 个药物组在加入 H₂O₂ 基础上分别加入终浓度为 10、20、40、80 μmol/L 红花黄色素 A,空白组只更换培养基,不作任何处理。各组作用 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 ℃ 孵育 2 h,用酶标仪测定各孔 450 nm 波长 OD。每组设 5 个复孔,细胞存活率 = (OD_{实验组}/OD_{空白组}) × 100%。

2.3 细胞凋亡率检测 将细胞接种于 6 孔板中,分组处理后,弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,每孔加入 0.25% 胰蛋白酶 (不含 EDTA) 于 37 ℃ 消化 2~3 min,每孔加入含血清的培养液终止消化。细胞悬浮液以 1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,

收集细胞。按照试剂盒提供的步骤进行 AnnexinV-FITC/7-AAD 染色，流式细胞仪检测 H9c2 细胞凋亡率。凋亡率=右上象限细胞百分比+右下象限细胞百分比。

2.4 氧化应激水平检测 将 H9c2 心肌细胞接种于 6 孔板中，分组处理后，去除细胞培养液，PBS 洗涤 2 次，加入细胞裂解液作用 30 min 制作细胞匀浆，按 MDA、SOD 检测试剂盒说明书操作检测，按公式将吸光度值换算成 MDA ($\mu\text{mol/g Prot}$) 和 SOD (U/mg Prot)。

2.5 线粒体荧光染色 将培养好的细胞接种于 6 孔板中，分组处理后，去除细胞培养液，加入以细胞培养液 (1 : 1 000) 稀释配制好的 MitoTracker® Green FM 工作液，37 ℃ 孵育 30 min。在染色后，用 PBS 洗涤 3 次，加入 4% 多聚甲醛固定液，室温静置 30 min。

2.6 TR3 荧光免疫染色 将固定好的细胞加入 0.5% TritonX-100 室温破膜 10 min，吸弃 TritonX-100，PBS 洗涤 3 次。5% BSA 在 37 ℃ 下封闭 30 min，吸弃封闭液。3% BSA 稀释一抗，每皿加 200 μL ，4 ℃ 摇床孵育过夜。吸弃各皿一抗，PBS 洗涤 3 次。每孔加入 PBS 稀释的二抗 200 μL ，室温避光在摇床上孵育 60 min。

2.7 细胞核荧光染色 将固定好的细胞以 PBS 洗涤 2 次，加入 DAPI 溶液 (0.5 $\mu\text{mol/L}$)，室温避光轻摇 30 min，弃去染色液，PBS 洗涤后用荧光显微镜在 364 nm 激发波长下观察染色情况。

2.8 线粒体与细胞核提取分离 将细胞接种于 6 孔板中，分组处理后，去除细胞培养液，PBS 洗涤，加入细胞裂解液作用 30 min 制作细胞匀浆，按说明书采用密度梯度分离法在 4 ℃ 下离心操作，先以 2 700 r/min 离心 5 min 沉淀细胞核，上清液转移至梯度溶液中，20 000 r/min 离心 20 min，从浓度梯度交界处吸取线粒体样品。

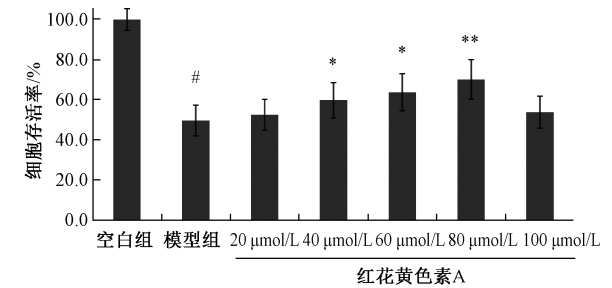
2.9 Western blot 法检测蛋白表达 按照“2.8”项下方法分离线粒体和细胞核，加入预冷的裂解液作用 30 min，以微孔过滤器去除细胞碎片等杂质，取上清液，BCA 法测定蛋白浓度。用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白，然后转移到聚偏二氟乙烯膜上，5% BSA 封闭 90 min，加入稀释好的一抗，在 4 ℃ 条件下孵育过夜。TBST 洗膜后，加入二抗，37 ℃ 孵育 1 h，洗涤 2 次，ECL 发光试剂显影，采用凝胶成像系统软件分析胶片中蛋白条带组的灰度面积，将空白组各蛋白与内参 $\beta\text{-actin}$ 的

比值设为基准值 1.0，其余各组蛋白均除以基准值的计算相对表达量。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行分析，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK- q 检验，以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞存活率的影响 如图 1 所示，与模型组比较，细胞存活率随红花黄色素 A 浓度 (40~80 $\mu\text{mol/L}$) 增加而逐渐升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，但当红花黄色素 A 浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时，细胞存活率开始下降，表明此时药物浓度过高，对细胞的培养环境产生影响，不利于细胞生长，因此后续实验仅以 40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度作进一步研究。



注：与空白组比较，# $P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞存活率的影响
Fig.1 Effects of safflor yellow A on the survival rate of H9c2 cells

3.2 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞凋亡率的影响 与空白组相比，模型组凋亡率增加 ($P<0.05$)；与模型组比较，红花黄色素 A 组细胞凋亡率下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)，呈浓度依赖性。见表 1、图 2。

表 1 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab.1 Effects of safflor yellow A on the apoptosis rate of H9c2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	凋亡率/%
空白组	4.9±1.2
模型组	33.5±6.1 [#]
40 $\mu\text{mol/L}$ 红花黄色素 A 组	24.7±4.3 [*]
60 $\mu\text{mol/L}$ 红花黄色素 A 组	16.4±3.2 [*]
80 $\mu\text{mol/L}$ 红花黄色素 A 组	10.6±1.5 ^{**}

注：与空白组比较，# $P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.3 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞氧化应激水平的影响 与空白组比较，模型组 SOD 水平降低，而

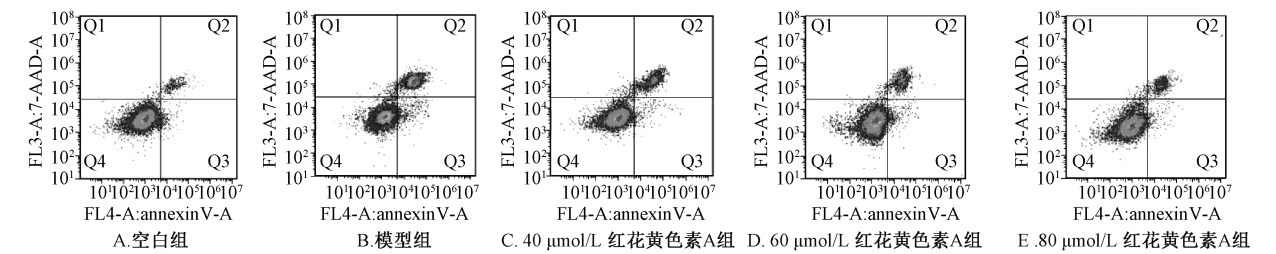


图 2 流式细胞检测各组细胞的凋亡率

Fig. 2 Apoptosis rate of cells in each group by flow cytometry

MDA 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 红花黄色素 A 组 SOD 水平升高, MDA 水平下降

表 2 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞氧化应激水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	MDA/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{g Prot}^{-1}$)	SOD/ ($\text{U}\cdot\text{mg Prot}^{-1}$)
空白组	20.48 $\pm$ 3.92	53.11 $\pm$ 8.50
模型组	54.65 $\pm$ 8.01 [#]	30.59 $\pm$ 5.52 [#]
40 $\mu\text{mol/L}$ 红花黄色素 A 组	46.34 $\pm$ 7.53 [*]	35.97 $\pm$ 6.35 [*]
60 $\mu\text{mol/L}$ 红花黄色素 A 组	37.80 $\pm$ 5.12 [*]	42.25 $\pm$ 5.97 [*]
80 $\mu\text{mol/L}$ 红花黄色素 A 组	29.37 $\pm$ 4.61 ^{**}	48.95 $\pm$ 6.24 ^{**}

注: 与空白组比较,[#] $P<0.05$; 与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

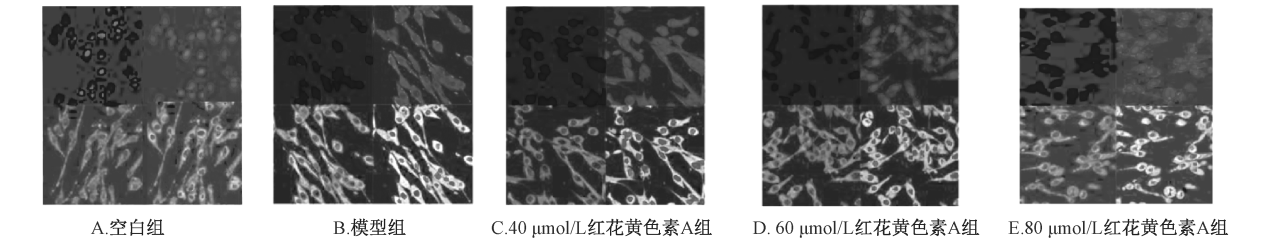


图 3 各组 TR3 核受体的细胞内定位

Fig. 3 Intracellular localization of TR3 nuclear receptors in each group

3.5 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞 Bax、Bcl-2、cl caspase-9、TR3 蛋白表达影响 与空白组相比, 模型组 Bax、cl caspase-9 蛋白表达增加 ($P<0.05$), 而 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 线粒体上 TR3 蛋白表达比细胞核更高 ($P<0.05$)。与模型组相比, 红花黄色素 A 组 Bax、cl caspase-9 蛋白表达下降, Bcl-2 蛋白表达上升, 线粒体上 TR3 蛋白表达减少, 而细胞核上的 TR3 蛋白表达增加 ($P<0.05, P<0.01$)。见图 4。

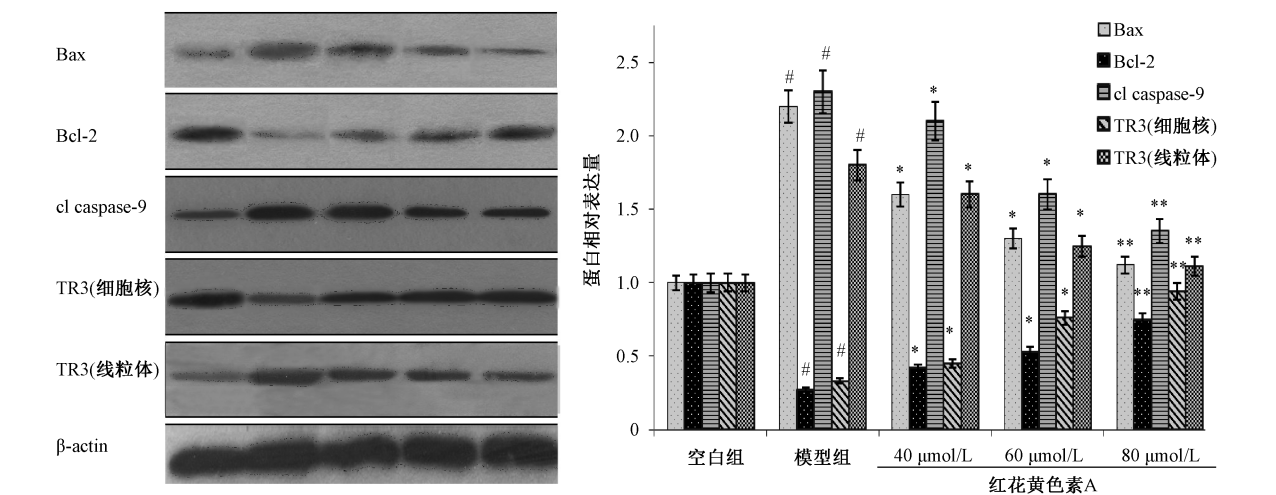
4 讨论

TR3 属于甲状腺激素受体超家族, 由于其配体尚未确定, 因此被归类为孤儿受体。TR3 在细胞中的表达可受到多种因素影响, 包括炎症因子、生长

($P<0.05, P<0.01$), 呈浓度依赖性。见表 2。

3.4 TR3 核受体的细胞内定位 以下每一组细胞的染色图像均分别以 3 种不同波长的发生光通过共聚焦显微镜进行拍摄, 其中左上方小图为 DAPI 着色的细胞核, 右上方小图为荧光单抗结合的 TR3 核受体, 左下方小图为附着荧光探针的线粒体, 右下方小图为前 3 个图片的叠加成像。从图 3 可观察到, 相对于空白组, 模型组 TR3 核受体开始从细胞核扩散移位, 并与线粒体的位置重叠, 而随着红花黄色素 A 的浓度增加, TR3 核受体的移位逐渐减小并聚集在细胞核附近, 较少与线粒体位置重叠。

因子和应激反应。TR3 具有多种生理功能, 可通过表达调节、翻译后修饰及亚细胞定位发挥各种不同的生理作用, 包括细胞增殖、分化、生长、凋亡、代谢及免疫。关于 TR3 的研究较多涉及肿瘤学方面, 研究表明其对多种肿瘤细胞的生长增殖均可产生促进作用; 而在神经元和心肌等正常细胞中, 在缺氧再灌注并产生氧化损伤的情况下, TR3 则充当诱导细胞凋亡的关键因子, 促使凋亡通路的执行^[8]。研究指出, TR3 之所以能够产生截然相反的生物效应与其在细胞内的定位密切相关, 在细胞核内 TR3 可通过激活 DNA 转录而促进细胞的增殖和生长, 是大多数肿瘤细胞过度增殖、转移、耐药的关键因素之一^[9], 但对于正常组织的细胞, 在



注：与空白组比较，# $P<0.05$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 4 红花黄色素 A 对 H9c2 细胞 Bax、Bcl-2、cl caspase-9、TR3 蛋白表达影响

Fig. 4 Effects of safflor yellow A on Bax, Bcl-2, cl caspase-9 and TR3 protein expression in H9c2

外界有害因素的刺激下，TR3 转移离开细胞核则可诱导细胞凋亡。有学者研究报道，在离体心肌细胞应激损伤模型中，TR3 从胞核到线粒体的转位是开启细胞凋亡通路的重要机制，当其定位于线粒体上，可与 Bcl-2 结合引起构象变化，同时上调 Bax 的表达，从而激活细胞质中的 cl caspase-9，启动线粒体凋亡途径导致细胞死亡^[10]。当细胞处于应激损伤的状态下 TR3 离开细胞核的机制尚未完全清晰，目前有研究指出 TR3 离开细胞核的过程与 MAPK（有丝分裂原激活的蛋白激酶）通路密切相关，MAPK 的信号通路可促进 TR3 的磷酸化使其与 DNA 分离转移至核外的细胞器^[2]。

中药红花为一年生或者一年两生菊科植物药材，原产自西亚和欧洲等地区，现中国河南和新疆等地均有种植，一般以管状花入药，属珍贵药材资源。据中医药古籍《汤液本草》记载，红花性温、味辛，阴中之阳，无毒，归入心、肝经。《本草汇言》记载，红花为化瘀、行血、活血、调血之药，可治胸闷心痛、口唇青紫、血滞经闭、产后瘀阻、跌打损伤等瘀血证诸症^[11]。现代天然药物化学研究表明，红花中具有治疗心血管疾病的药效成分，主要为黄酮类化合物，包括红花黄素 A、红花黄素 B、山柰酚苷、槲皮素苷、木犀草素、芦丁等物质，其中水溶性查尔酮类化合物红花黄色素 A 是主要药效组分^[12]。红花黄色素 A 有明显增加冠脉血流量，改善心肌供血作用，其单成分注射液和复方注射液血必净在临床上常作为冠心病或冠脉支架术后的辅助用药。从化学结构分析，红花黄色素 A

带有多个酚羟基，因而具有良好的还原性，研究表明，红花黄色素 A 能有效降低心肌缺血-再灌注模型血浆中乳酸脱氢酶（LDH）和丙二醛（MDA）水平，提高过氧化物歧化酶（SOD）活性，加速自由基的消除，从而产生良好的抗氧化作用^[13]。氧化应激损伤心肌细胞的机制与 MAPK 通路密切相关，细胞实验研究表明在 H_2O_2 建立的氧化损伤模型中，MAPK 通路相关的蛋白均参与到促进细胞凋亡的过程，而抗氧化能力较强的天然化合物包括黄酮和皂苷，皆可调控 MAPK 通路而对模型细胞产生保护作用^[14-15]。综合本文各项实验结果和相关文献的研究结论进行分析，可以初步推测红花黄色素 A 抑制氧化应激对心肌损伤的机制是通过降低氧自由基对细胞器的脂质成分和蛋白的氧化损伤，抑制 MAPK 通路诱导 TR3 受体离开细胞核移位至线粒体，抑制其与 Bcl-2 结合，逆转 Bax 与 Bcl-2 的表达比例，降低下游凋亡蛋白 caspase-9 的活化，阻滞细胞线粒体损伤介导的凋亡程序执行，从而发挥保护心肌细胞的作用^[16]。

核受体 TR3 移位离开细胞核后，除了定位于线粒体还可以结合到内质网上，这是 TR3 介导细胞凋亡的另一重要途径。研究表明，氧自由基可通过该途径引起内质网应激反应，使内质网应激内部蛋白质发生错误折叠并过度聚集，同时又促进内质网大量释放 Ca^{2+} ，造成胞浆内钙离子超载，激活钙依赖性蛋白酶 Calpain，最终触发 caspase 12 诱导的凋亡程序^[17-18]。红花黄色素 A 能否通过影响内质网应激介导的凋亡程序也产生抑制氧化应激对心肌细胞的

损伤作用，这将会是本课题组的下一个研究重点。

参考文献:

[1] Bartz R R, Suliman H B, Piantadosi C A. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 291.

[2] 孔瑞瑞. 应激致心肌细胞凋亡过程中 TR3 移位线粒体的分子调控机制[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.

[3] Cheng Z, Völkers M, Din S, *et al.* Mitochondrial translocation of Nur77 mediates cardiomyocyte apoptosis[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(17): 2179-88.

[4] 艾 华, 刘海英, 王守岩. 《金匱要略》瘀血证研究[J]. 吉林中医药, 2009, 29(5): 454-455.

[5] 陈可冀, 付长庚, 丛伟红, 等. 红花黄色素临床应用中国专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(10): 1167-1173.

[6] Duan J L, Wang J W, Guan Y, *et al.* Safflor yellow A protects neonatal rat cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury *in vitro*[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 487-95.

[7] 刘善新. 羟基红花黄素 A 对缺氧/复氧诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.

[8] Niu G, Lu L, Gan J, *et al.* Dual roles of orphan nuclear receptor TR3/Nur77/NGFI-B in mediating cell survival and apoptosis[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2014, 31(3): 219-58.

[9] Lee S O, Li X, Khan S, *et al.* Targeting NR4A1 (TR3) in

cancer cells and tumors[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(2): 195-206.

[10] Wang W J, Wang Y, Chen H Z, *et al.* Orphan nuclear receptor TR3 acts in autophagic cell death via mitochondrial signaling pathway[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 133-40.

[11] 吴振华. 中药红花研究进展的概述[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(34): 33-34.

[12] 刘世军, 唐志书, 崔春利, 等. 中药红花化学成分的研究进展[J]. 河南中医, 2017, 37(1): 168-171.

[13] 沈冰冰, 张 松, 朱启仁, 等. 羟基红花黄色素 A 减轻大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4): 480-484.

[14] 周凤华, 潘芸芸, 崔小冰, 等. ERK1/2 与 p38 信号通路介导三七皂苷 R1 抗 H₂O₂ 致心肌细胞损伤作用[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 17-20.

[15] 周艳峰. 芦丁抑制 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞氧化损伤和凋亡及其机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.

[16] Zhou D, Qu Z, Wang H, *et al.* The effect of hydroxy safflower yellow A on coronary heart disease through Bcl-2/Bax and PPAR- γ [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 520-526.

[17] 王丽娜, 梅 玉, 苗艳芳, 等. 羟基红花黄色素 A 抗心肌缺血-再灌注损伤作用与钙超载相关性研究[J]. 北华大学学报(自然科学版), 2018, 19(4): 465-468.

[18] Liang B, Song X, Liu G, *et al.* Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(13): 2833-2844.

川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞增殖分化的影响

刘 星¹, 李丽娟², 彭莉萍¹, 魏妮娜¹, 刘银花¹, 许佳伟¹, 黎善铭¹
(1. 遵义医科大学珠海校区, 广东 珠海 519041; 2. 香洲区人民医院 妇产科, 广东 珠海 519040)

摘要: **目的** 探讨川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞增殖分化的影响。**方法** 体外建立神经干细胞培养体系, 川续断皂苷 VI 含药血清(高、中、低浓度)处理神经干细胞 72 h。CCK-8 和 BrdU 法检测 NSCs 增殖; 细胞免疫荧光检测 NSCs 分化; DAPI 染色检测 NSCs 的凋亡; RT-PCR 和 Western blot 分别检测 mRNA 和蛋白表达。**结果** 川续断皂苷 VI 含药血清(高、中、低浓度)对 NSCs 增殖无影响 ($P>0.05$)。川续断皂苷 VI 含药血清(高、中浓度)促进神经干细胞分化 ($P<0.05$), 促进 *Notch1*、*Tublin*、*caspase-3* mRNA 表达 ($P<0.05$), 抑制 *Jagged1*、*Hes1*、*Sox2*、*Pax6* mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$); 高浓度川续断皂苷 VI 含药血清促进神经干细胞凋亡 ($P<0.05$), 促进 *GFAP* mRNA 表达 ($P<0.05$), 抑制 *Ngn1* mRNA 表达 ($P<0.01$)。中浓度川续断皂苷 VI 含药血清促进 *Tublin* 蛋白及 *Ngn1* mRNA 表达, 抑制 *GFAP*、*Jagged1* 蛋白及 *GFAP* mRNA 表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 而对 *caspase-3* 蛋白表达无影响。**结论** 中浓度川续断皂苷 VI 含药血清通过抑制 *Jagged1* 的表达, 阻断 *Notch* 信号通路, 诱导 NSCs 向神经元方向分化。

关键词: 川续断皂苷 VI; 含药血清; 神经干细胞; 增殖; 分化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)06-1467-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.013

收稿日期: 2019-08-26
基金项目: 珠海市重点实验室开放课题 (ZYKL-2016K7); 国家级大学生创新创业训练项目 (201610661030)
作者简介: 刘 星 (1983—), 女, 博士, 高级实验师, 从事中药药理作用研究。Tel: (0756) 7623361, E-mail: liuxingas@126.com