

牦牛血低聚肽对缺氧介导的 H9c2 心肌细胞损伤的保护及其作用机制

Effects of yak blood oligopeptides on hypoxia-induced injury of H9c2 cardiomyocytes protection and its mechanism

肖 岚^{1,2} 李 诚¹ 程小平³ 杜 昕¹

XIAO Lan^{1,2} LI Cheng¹ CHENG Xiao-ping³ DU Xin¹

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川旅游学院食品学院, 四川 成都 610100;

3. 四川高金实业集团有限公司, 四川 遂宁 629000)

(1. Department of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2. Department of Food Science, Sichuan Tourism College, Chengdu, Sichuan 610100, China;

3. Sichuan Gaojing Industrial Group Co., Ltd., Suining, Sichuan 629000, China)

摘要:体外培养 H9c2 心肌细胞建立缺氧损伤模型, 随机分为 5 组($n=6$): 正常对照组、缺氧组、牦牛血低聚肽低、中、高剂量组。结果表明, 缺氧组的细胞存活率显著降低($P<0.01$)、细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)、LDH 释放水平显著升高($P<0.01$)、线粒体膜电位极显著降低($P<0.01$), 表明缺氧对 H9c2 心肌细胞产生了损伤。与缺氧组相比, 牦牛血低聚肽干预组的细胞存活率增加, 细胞凋亡减少以及细胞中 LDH 的释放水平下降, 并呈良好的剂量依赖关系。同时, 牦牛血低聚肽能够抑制线粒体膜电位下降, 提高细胞 T-AOC 水平, 降低 TNF- α 水平, 抑制缺氧介导的细胞色素 C 的释放, 上调抗凋亡蛋白 (Survivin, p-Akt, Akt) 的表达, 降低促凋亡蛋白 (Caspase-3/9) 的活性, 且牦牛血低聚肽也影响编码上述蛋白的 mRNA 水平。以上结果表明: 牦牛血低聚肽对 H9c2 心肌细胞的保护与抑制 PI3K-Akt 信号转导通路、保护细胞线粒体结构功能完整性有密切关系。

关键词: 牦牛血低聚肽; H9c2 心肌细胞; 缺氧; 线粒体; PI3K/Akt 信号通路

Abstract: To investigate the protective effect of yak blood oligopeptides on hypoxic injury of H9c2 cardiomyocytes and its mechanism. The hypoxia injury model was established by culturing H9c2 cardiomyocytes in vitro, randomly divided into 5

groups ($n=6$): normal control group, hypoxia group, low-dose yak blood oligopeptide group, middle-dose yak blood oligopeptide group and high-dose yak blood oligopeptide group. The results showed that: the cell survival rate of hypoxia group was significantly lower than that of control group ($P<0.01$), the rate of apoptosis was significantly increased ($P<0.01$), the release level of LDH was significantly increased ($P<0.01$), mitochondrial membrane potential decreased significantly ($P<0.01$), which showed that hypoxia could cause damage to H9c2 cardiomyocytes. At the same time, compared with the anoxic group, yak blood oligopeptides could inhibit mitochondrial membrane potential decline, improved the T-AOC level of cells, reduced the level of TNF- α , inhibited the release of cytochrome C, upregulated the expression of anti-apoptotic proteins (Survivin, p-Akt, Akt), decreased the activity of apoptosis protein (Caspase-3/9), and affected the level of mRNA encoding of the above protein. The above results showed that the protective effect of yak blood oligopeptides on H9c2 cardiomyocytes was closely related to the inhibition of PI3K-Akt signal transduction pathway and the protection of mitochondrial structural and functional integrity.

Keywords: yak blood oligopeptides; H9c2 cardiomyocytes; hypoxia; mitochondria; PI3K/Akt signaling pathway

基金项目: 四川省科技厅项目(面上)(编号: 2018JY0317)

作者简介: 肖岚, 女, 四川旅游学院副教授, 四川农业大学在读博士研究生。

通信作者: 李诚(1964—), 男, 四川农业大学教授, 博士生导师。
E-mail: lichenglcp@163.com

收稿日期: 2018-09-08

牦牛是中国青藏高原的特殊家畜, 经过世代的自然选择, 牦牛显示出对低氧环境极好的适应性, 这可能与牦牛血液的特殊性有一定关系^[1-3]。本课题组^[4]前期采用枯草芽孢杆菌(SICC1.197)联合碱性蛋白酶制备出牦牛血低聚肽, 利用超滤离心得到分子量 <1 kDa 的牦牛血低聚肽, 并对其体外(还原力、ABTS⁺·清除力、·OH 清除

能力、DPPH·清除能力、总抗氧化力以及脂质过氧化抑制能力)和小鼠体内(丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、总抗氧化能力)的抗氧化能力进行了检测,发现牦牛血低聚肽具有良好的抗氧化能力。姚星辰等^[5]报道牦牛活性蛋白具有显著的延长小鼠抗缺氧时间的作用。牦牛血是否与抗缺氧功能有一定的关联尚未见相关报道。为了解具有抗氧化活性的牦牛血低聚肽是否具有抗缺氧活性,课题组采用高、中、低剂量牦牛血低聚肽对小鼠进行了预试验,常压耐缺氧试验结果显示牦牛血低聚肽对小鼠缺氧耐受力有提高作用并呈剂量依赖性;亚硝酸钠中毒存活试验显示,牦牛血低聚肽能延长缺氧小鼠的生存时间。因此,为了进一步证实牦牛血低聚肽的抗缺氧活性并了解其作用机制,本试验拟体外培养 H9c2 心肌细胞建立缺氧损伤模型,探讨牦牛血低聚肽对心肌细胞缺氧损伤的抑制作用及机制,旨在为进一步研究牦牛血低聚肽对抗缺氧作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牦牛血低聚肽:氨基酸含量 85.25 g/100 g,平均分子量 <1 kDa,实验室自制;

DMEM 培养基、血清:美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Caspase 3/9 活性检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒:碧云天生物技术公司;

细胞凋亡检测试剂盒:南京凯基生物科技发展有限公司;

蛋白 marker:北京全式金生物技术有限公司;

乳酸脱氢酶(LDH)测试试剂盒、总抗氧化能力(T-AOC, ABTS 法)测试试剂盒:南京建成生物工程研究所;

大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定试剂盒:武汉伊莱瑞特生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

三气培养箱:HF-100 型,上海力申科学仪器有限公司;

倒置显微镜:IX51 型,奥林巴斯(中国)有限公司;

CO₂ 恒温培养箱:MCO-15AC 型,三洋电机(中国)有限公司;

全自动酶标仪:Multiskan MK3 型,美国 Thermo Scientific 公司;

流式细胞仪:CytoFLEX 型,美国贝克曼库尔特有限公司;

实时荧光定量 PCR 仪:QuantStudio 6 型,美国应用生物系统(ABI)公司。

1.3 细胞株与分组

H9c2 心肌细胞株:生工生物工程(上海)股份有限

公司。

H9c2 细胞(DMEM+10% FBS+1% 双抗)复苏与培养融合至 80%~90% 后,进行细胞毒性试验以及浓度预试验,在此基础上确定牦牛血低聚肽的用量。将 H9c2 细胞分组:正常对照组、缺氧组、牦牛血低聚肽低剂量组(0.05 mg/mL)、牦牛血低聚肽中剂量组(0.4 mg/mL)、牦牛血低聚肽高剂量组(3.2 mg/mL)。

1.4 试验方法

1.4.1 细胞缺氧模型的建立 取对数生长期的细胞,胰酶消化后,用培养基(含 10% FBS+1% 双抗)调整细胞密度到 5×10^4 个/mL,接入 96 孔板,每组 6 个复孔,每孔 100 μ L 细胞悬液,并设置空白孔,在细胞孔周围孔内加入 100 μ L 无菌 PBS,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养过夜,待细胞融合至 70%~80% 后进行分组处理并药物干预。正常对照组常氧条件培养,加药组加药预处理 4 h 后换为缺氧培养基(含 2% FBS)并置于三气培养箱缺氧培养 48 h。

1.4.2 指标测定

(1) CCK-8 法测定细胞存活率:按照 1.4.1 处理细胞,每孔加入 10 μ L CCK8,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,振荡 10 min,酶标仪测定各孔吸光值 OD₄₅₀。

(2) 流式细胞仪检测细胞凋亡:按照 1.4.1 处理细胞,按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒操作说明进行,流式细胞仪上机检测。

(3) 细胞培养上清液中 T-AOC 含量、TNF- α 含量、乳酸脱氢酶(LDH)活性的测定:按照 1.4.1 处理细胞,按照测试试剂盒说明书的要求检测 T-AOC 含量、TNF- α 含量、LDH 活性。

(4) Western Blot 检测细胞中 p-Akt、Akt、Survivin 蛋白表达:按分组要求处理细胞后,提取单层贴壁细胞总蛋白并对蛋白进行定量,蛋白变性,电泳分离并转移至硝酸纤维素(PVDF)膜上,采用 ECL 显色系统进行免疫印迹显色,冲洗胶片,晾干胶片,扫描胶片,用 BandScan 分析胶片灰度值。

(5) 细胞中 Caspase-3 与 Caspase-9 活性:按照 1.4.1 处理细胞,按照试剂盒说明书的要求进行检测。

(6) Western Blot 法测定线粒体和细胞胞质中细胞色素 C 的含量:按照 1.4.1 处理细胞,参考 1.4.2(4) 采用 Western Blot 法测定。

(7) QPCR 检测细胞中 P13K、AKT、Caspase-3、Caspase-9、HIF-1 α 基因表达:按照 1.4.1 处理细胞,实时荧光定量 PCR 检测 mRNA。

(8) 细胞线粒体膜电位的检测:按照 1.4.1 处理细胞后,按照线粒体膜电位检测试剂盒操作说明进行。

1.5 数据处理

试验数据以(均数 $\pm$ 标准差)表示,组间比较采用单

因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。统计分析使用 SPSS 19.0 等软件。

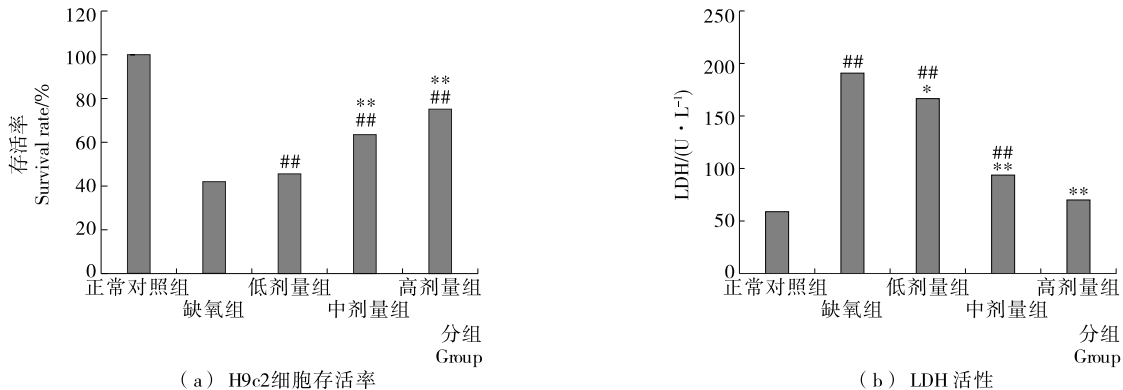
2 结果与分析

2.1 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞存活率和 LDH 释放量的影响

如图 1(a) 所示, 与正常组相比, 持续缺氧 48 h 导致 H9c2 细胞存活率均出现了一定程度的下降, 差异极显著 ($P < 0.01$), 表明 H9c2 细胞缺氧损伤明显。采用高、中、低剂量的牦牛血低聚肽干预缺氧细胞, 能提高缺氧细胞的存活率; 与缺氧组比较, 高、中剂量组对细胞凋亡的抑制作用极显著 ($P < 0.01$)。此结果提示, 牦牛血低聚肽具有改善缺氧 H9c2 细胞存活率的作用, 且存在剂量依

赖性。

正常情况下, LDH 主要分布在心肌细胞胞质中, 是不能透过细胞膜进入膜外空间 (如细胞培养液上清液)^[6], 只有当细胞损伤后, LDH 才会释放进入细胞上清液中使其活性升高, 因此, 通过测定细胞上清液中 LDH 的活性可间接反映细胞的损伤程度。由图 1(b) 可知, 缺氧导致 H9c2 细胞培养液上清液中 LDH 的活性极显著升高 ($P < 0.01$), 而牦牛血低聚肽预处理则可降低培养液上清液中 LDH 含量且存在剂量依赖性, 其中高、中剂量组可极显著降低 LDH 活性 ($P < 0.01$)。此结果提示, 牦牛血低聚肽对缺氧心肌细胞的细胞膜显示出良好的保护作用, 且存在剂量依赖性。



与正常对照组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与缺氧组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞存活率及 LDH 活性的影响

Figure 1 Effect of yak blood oligopeptide on hypoxia-induced H9c2 cells viability and LDH activity ($n = 6$)

2.2 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞凋亡的影响

图 2(a) 显示, 正常对照组 H9c2 细胞凋亡不明显 (凋亡率 $< 5\%$); 图 2(b) 显示, 缺氧组 H9c2 细胞凋亡率极显著升高 ($P < 0.01$), 凋亡率 $< 10\%$, 表明缺氧可促进心肌细胞凋亡; 图 2(c) ~ (e) 显示牦牛血低聚肽 3 个剂量组均能减少缺氧介导的 H9c2 细胞凋亡, 且中、高剂量组具有极显著效果 ($P < 0.01$)。这与 2.1 的试验结果相对应, 再次提示牦牛血低聚肽对缺氧导致的心肌细胞损伤具有较好的保护作用。

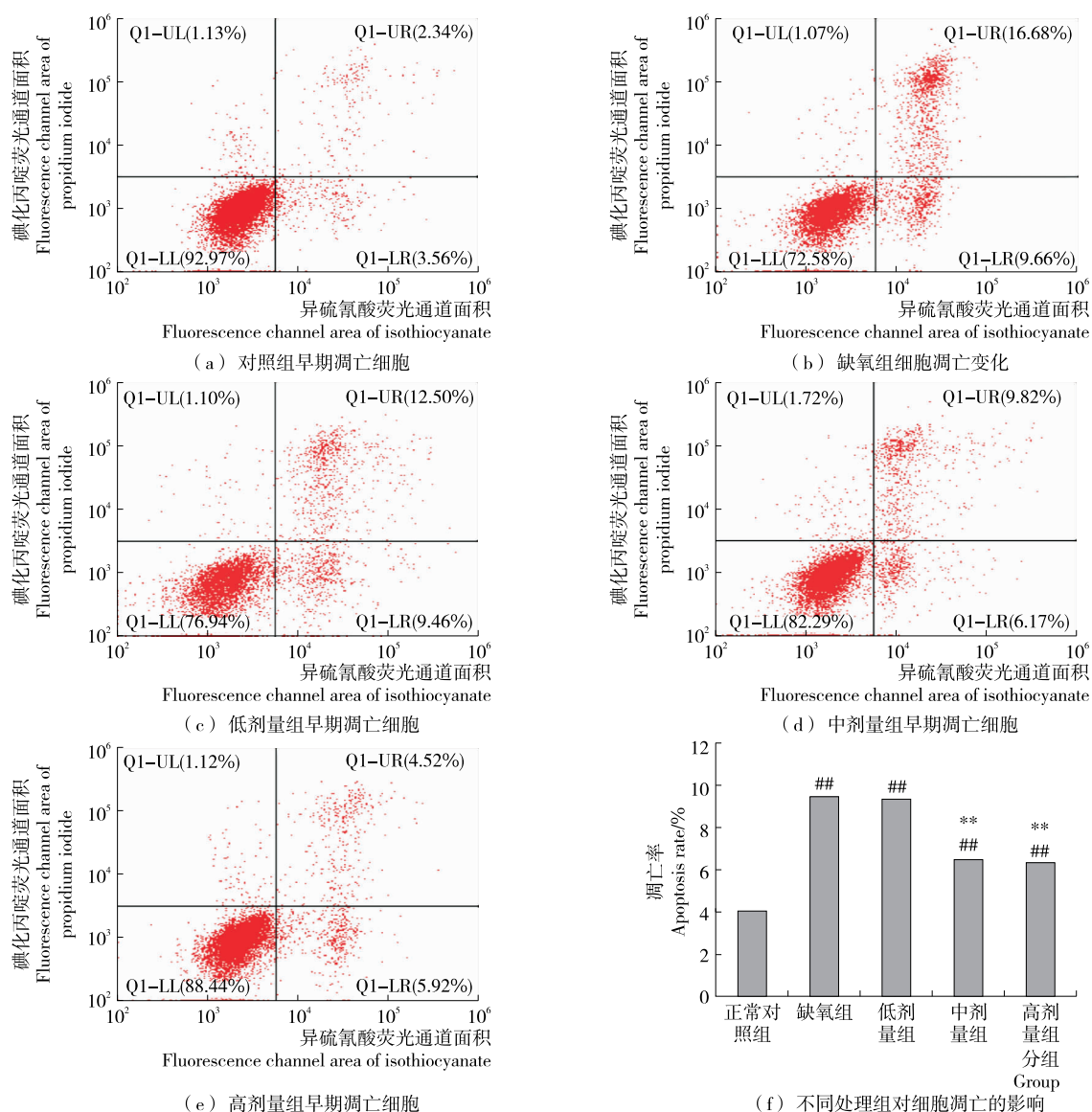
2.3 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体是细胞呼吸的主要场所, 缺氧会诱导线粒体结构和动力学上的改变, 包括线粒体膜电位 (Mitochondrial membrane potential, MMP) 的坍塌、线粒体膜孔道的开放, 从而影响膜内信号物质 (如细胞色素 C) 的释放等^[7], 引起线粒体代谢紊乱, 导致线粒体功能损伤, 进而诱导线粒体形态结构发生改变, 最终导致线粒体膜瓦解, 释放 Caspase 蛋白^[8], 激活下游的凋亡通路^[9], 诱导细胞凋亡^[10]。因此, 线粒体膜电位在凋亡起始过程对防治缺氧相关疾病的发生非常重要。

本试验观察到持续缺氧处理 H9c2 细胞 48 h, 其 MMP 出现极显著下降 ($P < 0.01$), 而牦牛血低聚肽干预组则可抑制缺氧导致的 MMP 下降, 中剂量组有显著效果 ($P < 0.05$), 而高剂量组的效果极显著 ($P < 0.01$) (图 3)。结果提示, 牦牛血低聚肽可能通过维持缺氧条件下细胞 MMP 的稳定进而减少细胞损伤。

2.4 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞线粒体内细胞色素 C 释放的影响

线粒体损伤是诱发细胞凋亡的主要原因之一^[11]。2.3 的研究结果提示牦牛血低聚肽可显著地提高细胞在缺氧条件下的线粒体膜电位, 保护线粒体结构的完整。故本试验采用 Western Blot 法测定线粒体和细胞胞质中细胞色素 C 的含量, 线粒体细胞色素 C 含量与细胞胞质中细胞色素 C 的含量的比值常被用作反映线粒体结构损伤程度的指标^[12], 结果见图 4。缺氧诱导细胞色素 C 从线粒体中大量的释放, 而细胞胞质中细胞色素 C 含量显著增加, 表现为线粒体中细胞色素 C 含量与细胞胞质中细胞色素 C 的含量的比值极显著下降 ($P < 0.01$), 仅为正常对照组的 50%; 然而, 牦牛血低聚肽预处理则可抑制缺氧 H9c2 细胞线粒体中细胞色素 C 的释放 ($P < 0.01$) 且呈



与正常对照组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与缺氧组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞凋亡的影响

Figure 2 Effect of yak blood oligopeptide on hypoxia-induced H9c2 cells apoptosis ($n = 6$)

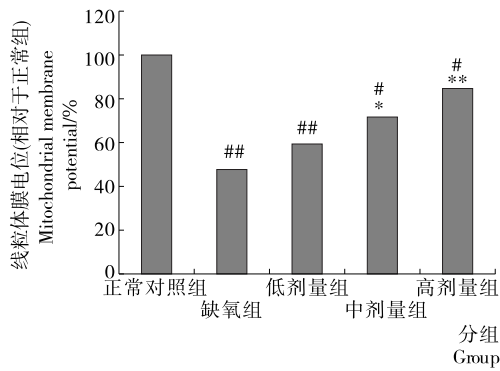
剂量依赖性,进一步提示牦牛血低聚肽对缺氧心肌细胞的保护作用与维持细胞线粒体结构完整性、减少其细胞色素 C 释放有关。

2.5 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞中 p-Akt、Akt、Survivin 蛋白表达的影响

PI3K-Akt 信号通路是一条重要的抗凋亡/促增殖信号途径^[13],文献^[14]证实激活 PI3K-Akt 信号通路在抗凋亡过程中起关键作用。激活 PI3K-Akt 通路促进 Akt 在 Ser473 位点磷酸化后形成 P-Akt,有利于对多下游多个靶点的调控,比如调控凋亡蛋白 Caspase 家族促进抗凋亡机制的活化,增加细胞存活^[15]。如图 5 所示,与正常对照组比较,持续缺氧导致 H9c2 细胞中 p-Akt 蛋白显著过

表达($P < 0.01$);牦牛血低聚肽进一步促进了缺氧细胞中的 p-Akt 蛋白过表达且呈剂量依赖性,其中高、中剂量组过表达最明显($P < 0.01$)。持续缺氧也导致细胞中 Akt 蛋白过表达,但牦牛血低聚肽对缺氧细胞中 Akt 蛋白表达水平无显著影响($P > 0.05$)。计算 p-Akt/Akt 的比值,与正常组相比,缺氧组 p-Akt/Akt 的比值为正常对照组的 5.55%,明显降低($P < 0.01$);与缺氧组相比,牦牛血低聚肽各剂量均能增加 p-Akt/Akt 的水平,分别为正常对照组的 7.6%,35.7%,38.6%,高、中剂量组增加最为明显($P < 0.01$)。结果提示,牦牛血低聚肽对缺氧心肌细胞的保护作用可能与 PI3K-Akt 信号转导通路有关。

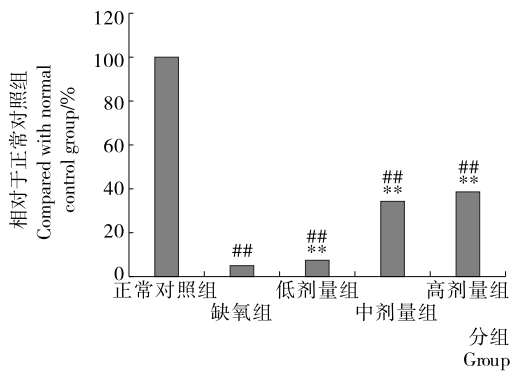
存活素蛋白(Survivin)具有抑制细胞凋亡和调节细



与正常对照组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与缺氧组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图3 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响

Figure 3 Effect of yak blood oligopeptide on mitochondrial membrane potential of hypoxia H9c2 cells ($n=6$)



与正常对照组相比, ## $P < 0.01$; 与缺氧组相比, ** $P < 0.01$

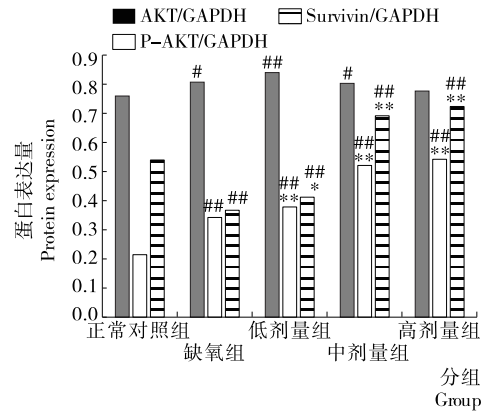
图4 牦牛血低聚肽对缺氧条件下 H9c2 细胞线粒体内细胞色素 C 释放的影响

Figure 4 Effect of yak blood oligopeptide on cytochrome C release from mitochondria of hypoxia-induced H9c2 cells ($n=6$)

胞周期的双重功能^[16-17]。与正常对照组比较,缺氧诱导 Survivin 蛋白表达量显著下降($P < 0.01$);而牦牛血低聚肽干预缺氧 H9c2 细胞可剂量依耐性地促进 Survivin 蛋白表达水平提高,其中高、中剂量组增加最明显($P < 0.01$)。

2.6 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞中 Caspase-3 与 Caspase-9 表达的影响

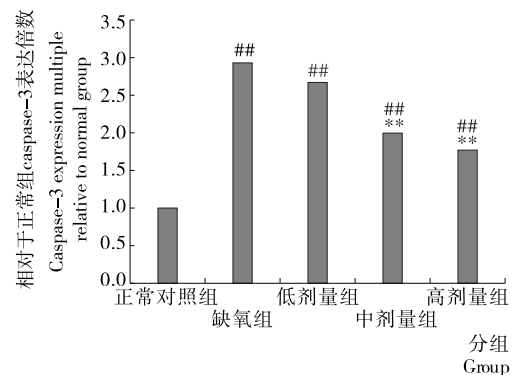
调控细胞凋亡的蛋白分布在线粒体外膜上^[12],主要包括抑制细胞凋亡的蛋白^[18]和促进细胞凋亡的蛋白,具有维持或破坏线粒体膜完整性的作用^[19]。正常情况下,这两类蛋白的表达量处于相对平衡的状态,当缺氧诱导细胞时,促凋亡蛋白会过表达而破坏线粒体,进而促进细胞凋亡发生^[20],而当抑制细胞凋亡蛋白表达量较高时,可抑制细胞凋亡。如图6所示,与正常对照组比较,持续缺氧导致 H9c2 细胞中凋亡蛋白 Caspase-3 [图6(a)]以及



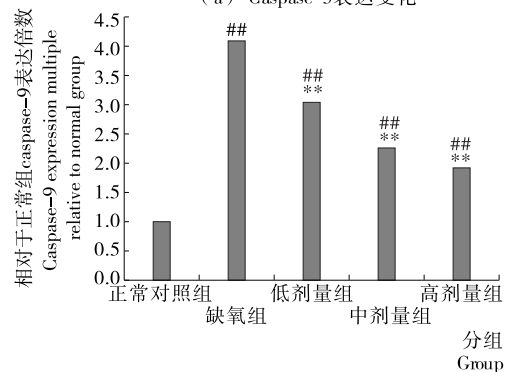
与正常对照组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与缺氧组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图5 牦牛血低聚肽对缺氧条件下 H9c2 细胞中 p-Akt、Akt、Survivin 蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of yak blood oligopeptide on expression of p-Akt, Akt and Survivin proteins in hypoxia-induced H9c2 cells ($n=6$)



(a) Caspase-3 表达变化



(b) Caspase-9 表达变化

与正常对照组相比, ## $P < 0.01$; 与缺氧组相比, ** $P < 0.01$

图6 牦牛血低聚肽对缺氧条件下 H9c2 细胞中 Caspase-3 与 Caspase-9 表达的影响

Figure 6 Effect of yak blood oligopeptide on expression of Caspase-3 and Caspase-9 proteins in hypoxia-induced H9c2 cells ($n=6$)

Caspase-9[图 6(b)]极显著过表达($P<0.01$);而牦牛血低聚肽干预则可剂量依赖性地下调这 2 个凋亡蛋白的表达,其中高、中剂量组减少最明显($P<0.01$)。此结果提示,抑制缺氧条件下凋亡蛋白 Caspase-3/-9 蛋白的表达有可能是牦牛血低聚肽发挥细胞缺氧损伤保护作用的机制之一。

2.7 牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 细胞中 P13K、Akt、Caspase-3、Caspase-9、HIF-1 α 基因表达的影响

本试验检测了 5 个与缺氧细胞凋亡相关的基因,结果见表 1。持续缺氧导致 H9c2 细胞中的 Caspase-3/-9 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$);而牦牛血低聚肽预处理组则可下调这 2 个凋亡基因的表达,其中高剂量组减少最明显($P<0.01$);Caspase-3/-9 的 mRNA 表达水平的变化趋势与 2.5 测定的蛋白结果对应。结果提示,牦牛血低聚肽可通过抑制凋亡蛋白及其 mRNA 的表达从而发挥保护心肌细胞 H9c2 的作用。

与正常对照组相比,缺氧导致 H9c2 细胞中 P13K 的 mRNA 表达水平升高($P<0.05$),而 Akt 的 mRNA 表达水平降低,但无显著差异($P>0.05$);牦牛血低聚肽各剂

量均能促进缺氧细胞 P13K 的 mRNA 表达水平的增加,其中高剂量组增加最明显($P<0.01$),而对缺氧细胞中 Akt 的 mRNA 表达水平无显著影响($P>0.05$);P13K-Akt 信号通路的 mRNA 表达水平的变化趋势与 2.5 测定的蛋白结果对应。

低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)是机体调控低氧反应基因的核心转录因子^[21],HIF-1 α 的 mRNA 表达水平升高可启动对多个下游低氧反应基因的调控^[22],介导与缺氧有关的各种生理反应^[23],有利于细胞适应低氧环境^[24]。由表 1 可知,心肌细胞持续缺氧 48 h 诱导 H9c2 细胞中 HIF-1 α 的 mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$),原因是缺氧抑制了 PHD(脯氨酰羟化酶)活性导致 HIF-1 α 的脯氨酰残基羟化受到抑制,进而抑制 HIF-1 α 与肿瘤抑制蛋白 VHL 结合,使 HIF-1 α 的 mRNA 表达呈指数方式增长^[25]。本研究结果显示,牦牛血低聚肽干预缺氧细胞能剂量依耐性地增加 HIF-1 α 的 mRNA 表达水平,其中高、中剂量组增加最明显($P<0.01$)。结果提示,牦牛血低聚肽可通过诱导 HIF-1 α 的 mRNA 表达水平升高进而提高细胞低氧适应性。

表 1 牦牛血低聚肽对缺氧条件下 H9c2 细胞中 P13K、Akt、Caspase-3、Caspase-9 以及 HIF-1 α 基因表达的影响[†]

Table 1 Effect of yak blood oligopeptide on expression of P13K, Akt, Caspase-3, Caspase-9 and HIF-1 α mRNA in hypoxia-induced H9c2 cells

分组	Rat P13K	Rat Akt	Rat Caspase-3	Rat Caspase-9	Rat HIF-1 α
正常对照组	1.067 $\pm$ 0.088	1.118 $\pm$ 0.102	1.045 $\pm$ 0.178	1.020 $\pm$ 0.093	1.286 $\pm$ 0.253
缺氧组	1.804 $\pm$ 0.181 [#]	1.036 $\pm$ 0.090	3.404 $\pm$ 0.135 [#]	4.320 $\pm$ 0.173 [#]	45.958 $\pm$ 4.471 [#]
低剂量组	1.847 $\pm$ 0.119 [#]	0.983 $\pm$ 0.210	2.514 $\pm$ 0.256 [#]	3.422 $\pm$ 0.272 [#]	47.988 $\pm$ 5.070 [#]
中剂量组	2.103 $\pm$ 0.179 [#]	1.039 $\pm$ 0.040	2.109 $\pm$ 0.221 [#]	2.032 $\pm$ 0.255 [#]	60.113 $\pm$ 3.119 [#]
高剂量组	2.607 $\pm$ 0.167 [#]	1.039 $\pm$ 0.179	1.618 $\pm$ 0.136 [#]	1.662 $\pm$ 0.076 [#]	65.012 $\pm$ 3.416 [#]

[†] 与正常对照组相比,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与缺氧组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

2.8 牦牛血低聚肽对细胞培养上清液中 T-AOC、TNF- α 的影响

缺氧诱导心肌细胞能量代谢紊乱、氧自由基增多,进而促进细胞膜脂质过氧化而导致细胞损伤,引起细胞凋亡^[26],因此,总抗氧化能力(T-AOC,ABTS 法)的强弱直接影响心肌细胞的存活状态,反映心肌细胞受损伤的程度。如表 2 所示,与对照组比较,缺氧组上清液的 T-AOC 极显著降低($P<0.01$),而牦牛血低聚肽可提高心肌细胞上清液的 T-AOC 且显现出质量浓度依赖性($P<0.01$),提示牦牛血低聚肽可减少细胞氧自由基、减少胞内脂质过氧化物的产生^[27],从而保护心肌细胞。

由细胞外信号导致的细胞凋亡称为死亡受体途径^[28],又称外源性凋亡途径。TNFR-I 和 TNFR-II 是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族中的 2 个受体亚型^[29],可介导细胞凋亡^[30]。TNFR-I 经过三聚体化后可激活 Caspase 途径进而诱导细胞凋亡;TNFR-II 的激活可抑制

表 2 牦牛血低聚肽对细胞培养上清液中 T-AOC、TNF- α 的影响[†]

Table 2 Effect of yak blood oligopeptide on T-AOC and TNF-alpha in cell culture supernatant

分组	TNF- α /(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	T-AOC/(U $\cdot$ mL ⁻¹)
正常对照组	58.242 $\pm$ 11.003	0.720 $\pm$ 0.031
缺氧组	235.002 $\pm$ 17.050 [#]	0.150 $\pm$ 0.011 [#]
低剂量组	191.024 $\pm$ 11.855 [#]	0.180 $\pm$ 0.008 [#]
中剂量组	121.189 $\pm$ 10.290 [#]	0.504 $\pm$ 0.016 [#]
高剂量组	82.958 $\pm$ 8.967 [#]	0.571 $\pm$ 0.016 [#]

[†] 与正常对照组相比,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与缺氧组相比,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

NF κ B 的活性进而减少炎症因子 TNF- α 的释放,减少细胞凋亡^[31]。本试验结果显示,缺氧组 H9c2 细胞上清液中 TNF- α 含量极显著增高($P<0.01$);牦牛血低聚肽 3 个

剂量组均能剂量依耐性地降低缺氧 H9c2 细胞上清液中 TNF- α 含量,其中高剂量组效果最明显($P<0.01$)。结果提示,牦牛血低聚肽可通过死亡受体途径减少 TNF- α 含量而发挥对心肌细胞缺氧损伤的保护作用。

3 结论

牦牛血低聚肽能够剂量依赖性地提高缺氧(37 °C, 5% O₂)条件下大鼠 H9c2 心肌细胞的存活率、降低其凋亡率以及 LDH 的释放,表现出良好的缺氧细胞损伤防护功效。牦牛血低聚肽对缺氧 H9c2 大鼠心肌细胞的保护作用可能与其清除细胞氧自由基、抗细胞膜脂质过氧化;抑制线粒体膜电位降低、抑制线粒体中细胞色素 C 的释放、增加细胞中抗凋亡蛋白(Survivin)的表达、抑制凋亡蛋白(Caspase-3、Caspase-9)的表达、介导 PI3K-Akt 信号通路以及影响编码上述蛋白的 mRNA 水平有关。在牦牛血低聚肽作用下抗缺氧相关蛋白之间的关联和变化关系有待于在分子水平进一步研究。

参考文献

- [1] 魏雅萍, 张才骏. 大通家牦牛及含野血牦牛血清亲血色蛋白多态性的比较研究[J]. 国外畜牧学: 草食家畜, 1996(1): 22-23.
- [2] 张才骏, 马凤莲, 李黎, 等. 互助白牦牛血液蛋白质多态性的研究[J]. 青海畜牧兽医杂志, 1996, 26(3): 9-11.
- [3] 魏雅萍. 大通家牦牛及含野血牦牛血清运铁蛋白多态性的比较研究[J]. 甘肃畜牧兽医, 1997, 27(5): 18-19.
- [4] 杜昕. 菌酶联合制备牦牛血抗氧化肽及其分离纯化的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016: 2-4.
- [5] 姚星辰, 许博林, 铁军, 等. 牦牛活性蛋白对小鼠抗缺氧抗疲劳能力及血糖的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(11): 2 637-2 639.
- [6] BOUNDA G A, ZHOU Wang, WANG Dan-dan, et al. Rhein elicits in vitro cytotoxicity in primary human liver HL-7702 cells by inducing apoptosis through mitochondria-mediated pathway[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, DOI:10.1155/2015/329831.
- [7] ZANELLI S A, TRIMMER P A, SOLENSKI N J. Nitric oxide impairs mitochondrial movement in cortical neurons during hypoxia[J]. Journal of Neurochemistry, 2006, 97(3): 724-736.
- [8] HERRMANN J M, RIEMER J. The intermembrane space of mitochondria[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2010, 13(9): 1 341-1 358.
- [9] JEZEK P, PLECITA-HLAVATA L. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2009, 41: 1 790-1 804.
- [10] ZWINGMANN C, BUTTERWORTH R. An update on the role of brain glutamine synthesis and its relation to cell-specific energy metabolism in the hyperammonemic brain: Further studies using NMR spectroscopy [J]. Neurochemistry International, 2005, 47(1/2): 19-30.
- [11] HEISKANEN K M, BHAT M B, WANG Hsing-wen, et al. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome C release during apoptosis in PC6 Cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(9): 5 654-5 658.
- [12] ADRAIN C, MARTIN S J. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(6): 390-397.
- [13] VARA J Á F, CASADO E, DE CASTRO J, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer[J]. Cancer Treatment Reviews, 2004, 30(2): 193-204.
- [14] LIAO Ping, SUN Gui-bo, ZHANG Chan, et al. Bauhinia championii flavone attenuates hypoxia-reoxygenation induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by improving mitochondrial dysfunction [J]. Molecules, 2016, 21(11): 1 469.
- [15] COIMBRA-COSTA D, ALVA N, DURAN M, et al. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain[J]. Redox Biology, 2017, 12: 216-225.
- [16] ALTRERI D C. Targeting survivin in cancer[J]. Cancer Letters, 2013, 332(2S): 225-228.
- [17] CONWAY E M, ZWERTS F, VAN EYGEN V, et al. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: Molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation[J]. The American Journal of Pathology, 2003, 163(3): 935-946.
- [18] HSU S Y, HSUEH A. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm [J]. Physiological Reviews, 2000, 80(2): 593-614.
- [19] DANIAL N N. BAD: undertaker by night, candyman by day[J]. Oncogene, 2008, 27: S53-S70.
- [20] PARIKH N, KOSHY C, DHAYABARAN V, et al. The N-terminus and alpha-5, alpha-6 helices of the pro-apoptotic protein Bax, modulate functional interactions with the anti-apoptotic protein Bcl-XL [J]. BMC Cell Biology, 2007, 8(16): 1-16.
- [21] KE Qing-dong, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. Molecular pharmacology, 2006, 70(5): 1 469-1 480.
- [22] ZHANG Xiao-li, YAN Zhen-wen, SHENG Wei-wen, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 ameliorates postischemic renal injury via inducible nitric oxide synthase[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2011, 358(1/2): 287-295.
- [23] SEMENZA G L. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease[J]. Respiratory Research, 2000, 1(3): 159-162.

(下转第 188 页)

3 结论

本研究以女贞子总黄酮含量为指标,在单因素试验的基础上运用 Box-Behenken 试验设计原理,进行响应面分析,得到超声辅助提取总黄酮的最佳方案为:提取时间 110 min、提取功率 640 W、乙醇体积分数 60%、液料比 65:1 (mL/g),经试验验证提取的女贞子总黄酮含量平均值为 47.40 mg/g,与理论值基本一致。大量研究^[20]证实,植物黄酮有较好的抗氧化作用。因此通过体外抗氧化活性氧研究,适当剂量的女贞子黄酮能够显著抑制小鼠红细胞溶血($P<0.05$),抑制率最高为 39.05%;能够显著抑制小鼠肝线粒体 MDA 生成($P<0.05$),抑制率最高为 53.24%;能够显著抑制肝组织匀浆中 MDA 生成($P<0.05$)。上述表明,本研究优化的女贞子黄酮提取工艺,可获得抗氧化能力较高的黄酮类物质,具有较好的开发利用价值。

参考文献

- [1] 刘静,赵海霞,袁丁,等.女贞子及其有效成分延缓衰老作用的研究进展[J].时珍国医国药,2016(12):2974-2977.
- [2] 女贞子 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定[J].中草药,2017(20):4198-4202.
- [3] 全会娟,胡魁伟,康琛,等.近十五年中女贞子研究进展[J].中国实用医药,2009,4(36):1-5.
- [4] 曹兰秀,周永学,顿宝生,等.女贞子总黄酮对高脂模型大鼠脂代谢的影响[J].医学争鸣,2009(20):2129-2132.
- [5] 王晓洁,盛东峰.不同溶剂对女贞子黄酮提取效果和抑菌活性的影响[J].北方园艺,2014(9):137-139.
- [6] 戴一,宋祖荣,夏莲凤,等.女贞子酒抗氧化活性及相关成分浸出率测定[J].食品与发酵工业,2014,40(11):154-159.
- [7] 芳芳,王凤忠.植物黄酮醇提取方法研究进展[J].食品工业科技,2018,39(7):323-328,334.

- [8] 石峰,陈雨,张亚琴,等.泽泻总三萜超声辅助提取工艺优化[J].食品与机械,2018,34(3):175-179.
- [9] 曹兰秀,周永学,顿宝生,等.女贞子总黄酮对高脂模型小鼠脂代谢的分子靶点的研究[J].中成药,2010,32(10):1789-1790.
- [10] 曹兰秀.女贞子总黄酮对 HepG2 细胞脂代谢调节作用的研究[J].国际中医中药杂志,2010,32(3):205-206.
- [11] STEVENS J F, MIRANDA C L, WOLTERS K R, et al. Identification and in Vitro Biological Activities of Hop Proanthocyanidins: Inhibition of nNOS Activity and Scavenging of Reactive Nitrogen Species[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(12): 3435-3443.
- [12] HONG You-yu, BIN Lin-zhi. Antioxidant effect of Ganoderma polysaccharide peptide [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2003, 38(2): 85-88.
- [13] 余晓红,朱雪梅,李凤伟,等.芦苇叶黄酮类提取物体内体外抗氧化性研究[J].食品科学,2015,36(1):209-213.
- [14] 陈婷,徐文斌,洪怡蓝,等.响应面法优化甜叶菊残渣中总黄酮提取工艺及抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(18):52-57.
- [15] 林士惠,易运红,龙梓,等.超声波辅助提取香蕉叶多糖工艺的优化[J].南方农业学报,2014,45(2):295-298.
- [16] 罗磊,张冰洁,朱文学,等.响应面法优化超声辅助提取金银花叶黄酮工艺及其抗氧化活性[J].食品科学,2016,37(6):13-19.
- [17] 刘亚敏,刘玉民,马明,等.枫香树叶总黄酮提取工艺优化及含量动态变化[J].食品科学,2010,31(4):35-38.
- [18] 薛自萍,曹建康,姜微波.枣果皮中酚类物质提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].农业工程学报,2009,25(S1):153-158.
- [19] 林启训.枇杷叶黄酮类化合物的水浸提工艺研究[J].农业工程学报,2005,21(7):190-193.
- [20] 张慧,张云,房燕茹,等.植物黄酮类化合物的药理活性研究进展[J].石化技术,2017,24(6):211.

(上接第 165 页)

- [24] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends in Molecular Medicine, 2001, 7(8): 345-350.
- [25] 楚秉泉.西藏芫菁的抗缺氧功能成分分离及其作用机制研究[D].杭州:浙江大学,2017:65-67.
- [26] 郑晓佳,余婷,张华,等.表没食子儿茶素没食子酸酯对心肌细胞缺氧/复氧损伤的抑制作用及其机制[J].中国药理学通报,2017,33(11):1584-1588.
- [27] 庞晓斌,谢欣梅,赵清辉,等.红景天苷对人肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响[J].中国药理学杂志,2014,49(3):195-198.
- [28] LIN Yi-huang, FANG Lian-hua, DU Guan-hua, et al. Pro-

- gress in regulation of RhoA in myocardial ischemia/reperfusion[J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(10): 1336-1339.
- [29] ANJANA B, BHARAT B. Aggarwal. Receptor-Mediated Choreography of Life and Death[J]. Journal of Clinical Immunology, 2003, 23(5): 317-332.
- [30] BARFOLOMEEV E, GONCHAROV T, FEDOROVA A V, et al. c-IAP and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor α (TNF α) induced NF κ B activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(34): 12429-12434.
- [31] RAUERT H, WICOVSKY A, MÜLLER N, et al. Membrane Tumor Necrosis Factor (TNF) Induces p100 Processing via TNF Receptor-2 (TNFR2) [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(10): 7394-7404.