

# 玉屏风水煎剂及其组分对大鼠肾脏组织及 HEK-293 细胞 OAT1/3 表达的影响

闻泽强， 李大朗， 宋 珏\*

(安徽医科大学 药学院，安徽 合肥 230032)

**摘要：**目的 探讨玉屏风水煎剂及其组分对大鼠肾脏组织及 HEK-293 细胞 OAT1/3 表达的影响。方法 采用 MTT 法检测玉屏风及其组分水煎剂对 HEK-293 细胞存活率的影响；采用 Western blot 法和 RT-PCR 法检测各组水煎剂对大鼠肾脏及 HEK-293 细胞中 OAT1/3 蛋白及 mRNA 表达的影响。结果 玉屏风、白术、防风水煎剂下调大鼠肾脏和 HEK-293 细胞中 OAT1 蛋白及 mRNA 表达 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，玉屏风及防风水煎剂下调大鼠肾脏及 HEK-293 细胞中 OAT3 蛋白及 mRNA 表达 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，白术水煎剂上调大鼠肾脏及 HEK-293 细胞 OAT3 蛋白及 mRNA 表达 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。黄芪水煎剂对大鼠肾脏及 HEK-293 细胞中 OAT1/3 蛋白表达无抑制作用。结论 玉屏风水煎剂对 OAT1/3 有明显的抑制作用，玉屏风的这种抑制作用可能跟其主要成分白术、防风有关。

**关键词：**玉屏风水煎剂；大鼠肾脏；HEK-293；OAT1/3

中图分类号：R285.5

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2020)06-1457-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.011

## Effects of Yupingfeng Decoction and its components on rat kidney tissue and OAT1/3 expression in HEK-293 cells

WEN Ze-qiang, LI Da-lang, SONG Jue\*

(College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the effects of Yupingfeng Decoction (YPFD) and its components on rat kidney tissue and OAT1/3 expression in HEK-293 cells. **METHODS** The MTT method was used to detect the effects of YPFD and its component on the survival rate of HEK-293 cells, Western blot and RT-PCR were used to detect the effects of decoction on the expression of OAT1/3 protein and mRNA in rat kidney and HEK-293 cells. **RESULTS**

YPFD, and decoctions of Baizhu (*Atractylodis Rhizoma*) and Fangfeng (*Saposhnikoviae Radix*) down-regulated the expression of OAT1 protein and mRNA in rat kidney and HEK-293 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). YPFD, and Fangfeng Decoction down-regulated the expression of OAT3 protein and mRNA in rat kidney and HEK-293 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Baizhu Decoction up-regulated the expression of OAT3 protein and mRNA in rat kidney and HEK-293 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Huangqi (*Astragali Radix*) Decoction had no inhibitory effect on OAT1/3 protein expression in rat kidney and HEK-293 cells. **CONCLUSION** YPFD's obvious inhibition on OAT1/3 may associate with its main components of Baizhu and Fangfeng.

**KEY WORDS:** Yupingfeng Decoction (YPFD); rat kidney; HEK-293 cells; OAT1/3

复方玉屏风出自宋代医家张松的《究原方》，全方由黄芪、白术、防风3味中药组成，其主要作

用为益气固表止汗、增强免疫<sup>[1]</sup>。现多用于治疗变应性鼻炎、上呼吸道感染等因表虚不固而染风邪

收稿日期：2019-06-04

基金项目：国家自然科学基金（81803868）；安徽高校省级自然科学研究项目（KJ2014A109）；安徽省自然科学基金（1308085 QH153）

作者简介：闻泽强（1993—），男，硕士生，从事药代动力学研究。Tel: 15056069408, E-mail: 1759642140@qq.com

\*通信作者：宋 珏（1979—），女，博士，副教授，从事药代动力学研究。Tel: 13514989335

的患者，及支气管哮喘、慢性荨麻疹等因感染风邪而至病况反复发作的患者，甚至用于治疗因伤风感冒而诱致肾小球肾炎病况反复的患者<sup>[2-3]</sup>。

OATs 属于溶质载体超家族 SLC22，主要是分布在肾小管上皮细胞基底膜侧的转运蛋白，有机阴离子（OAs）可以通过其转运功能被近端小管上皮细胞从血液中吸收<sup>[4-5]</sup>。OATs 转运功能是肾脏排泄机制中非常重要的一步，许多种药物都是通过 OATs 蛋白经肾脏排泄<sup>[6-7]</sup>。在这一排泄过程中，药物可能因为 OATs 表达量或活性受到改变而蓄积在体内或者使其排泄加快，从而改变疗效和毒副作用；抑或是几种药物相互竞争 OATs 而发生药物之间的拮抗作用影响机体<sup>[8-9]</sup>。本课题前期实验<sup>[10]</sup>表明，玉屏风水煎剂中某些组分可能通过抑制黄芪甲苷的排泄，而使其相较于黄芪水煎剂有更好的抗炎免疫作用。因此本实验通过大鼠及 HEK-293 细胞探讨玉屏风及其组分对 OAT1/3 基因及蛋白表达的影响。

## 1 材料

1.1 动物 SD 大鼠，雄性，普通级，体质量  $(225 \pm 30) \text{ g}$ ，购自安徽医科大学动物中心，动物使用许可证号 SYXK (皖) 2017-006。所有的动物均处在稳定舒适的环境中生存，室温控制在 25 ℃ 左右，相对湿度维持在 40% ~ 60%，光照周期 12 h / 12 h，进食及饮水自由，饲养 1 周后用于实验。动物实验的福利要求均符合相关的实验动物管理条例和实验动物伦理的要求。

1.2 细胞株 HEK-293 细胞（货号 SE0059，ACTT 细胞库）购自武汉塞维尔生物科技有限公司，具有稳定表达 OAT1/3 蛋白的功能，用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基培养。

1.3 药物与试剂 黄芪饮片 *Astragalus membranaceus* (Fisch) Beg、白术饮片 (炒) *Atractylodes macrocephala* Koidz. 及 防风饮片 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk 均购自安徽中医药大学第一附属医院，由安徽医科大学药学院研究员吴婷妮鉴定为正品；DMSO（货号 MFCD00002089）、MTT（货号 EZ2411A401）购自美国 Sigma 公司；全蛋白提取试剂盒（强）（货号 BC3710100T）购自北京索莱宝科技有限公司；BCA 蛋白定量检测试剂盒（货号 G2026）购自武汉塞维尔生物科技有限公司；预染蛋白 Marker（货号 26616）、TRIzol Reagent（货号 15596）购自美国 Thermo Scientific 公司； $\beta$ -actin 抗体（货号

AV0402）、OAT1 抗体（货号 AB08214578）、OAT3 抗体（货号 AE081010）购自北京博奥森生物技术有限公司；二抗（山羊抗兔，货号 133599）、二抗（山羊抗鼠，货号 133499）购自北京中山金桥生物有限公司；ECL 超敏化学发光液（货号 161204-34，美国 Advansta 公司）；PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix 试剂盒（货号 RR036Q）、TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II（货号 RR820 A）购自宝日医生物技术（北京）有限公司。

1.4 仪器 Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳槽、PowerPacTM Basic 电泳仪电源、Bioshine ChemiO 4600 电泳仪电源、CFX Connect<sup>TM</sup> 荧光定量 PCR 检测系统均购自美国 Bio-Ead 公司；Multiskan MK3 酶标仪、TE Thermo Cycle 逆转录仪均购自美国 Thermo Scientific 公司。

## 2 方法

2.1 药物制备 参考本课题组前期实验方法<sup>[10]</sup>，将黄芪、白术、防风按照 3 : 1 : 1 (60 g : 20 g : 20 g) 比例混合，加入 6 倍体积超纯水，浸泡 1 h，加热煮至沸，用文火继续煎煮 40 min，趁热用双层纱布过滤；收集滤渣，加入 4 倍体积超纯水按相同的方法继续煎煮 1 次；整合 2 次滤液，加中火继续煎煮成浓缩液，最后将药液定量至质量浓度为 2 g 生药/mL (玉屏风水煎剂) 药液。用相同的方法分别制备黄芪、白术、防风水煎剂（各组水煎剂最终质量浓度为 1.2 g 生药/mL）。

2.2 分组及给药 将大鼠分为正常组、玉屏风组 (10 g 生药/kg)、白术组 (6 g 生药/kg)、防风组 (6 g 生药/kg)、黄芪组 (6 g 生药/kg)，每组 6 只，灌胃给药 1 次/d，连续给药 21 d。取肾脏保存。

2.3 MTT 实验 参考文献 [11]。将细胞悬液接种在 96 孔板 (100  $\mu\text{L}$ /孔， $0.5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ /孔)，边加细胞悬液边吹打以确保每孔细胞数均等，培养 6 h 贴壁，各组给予不同质量浓度药物 (0、50、60、70、80、90、100 mg 生药/mL)，药物处理 24 h；每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT，避光孵育 4 h，弃去上清液；每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO，放置摇床上震荡 10 min，用酶标仪检测 490 nm 处 OD，每组设 3 个复孔取平均值进行计算。细胞存活率 =  $[ (OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) ] \times 100\%$ 。

2.4 Western blot 法检测 OAT1/3 蛋白表达 参考文献 [12]。大鼠肾脏及细胞样品总蛋白的提取按

照全蛋白提取试剂盒步骤进行提取，采用 BCA 蛋白定量检测试剂盒对样品进行定量。配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶进行电泳，80 V 恒压电泳 30 min，电压 120 V 电泳 70 min；转膜设置为 200 mA 恒流；一抗（OAT1 为 3 : 7 000，OAT3 为 3 : 7 000，β-actin 为 1 : 4 000）孵育过夜，次日加入二抗（1 : 4 000）孵育 1 h，最后放置于凝胶成像仪内发光采图，通过 Image-Pro Plus 6.0 测定其灰度值，采用 β-actin 作为内参进行相对定量比较。

**2.5 RT-PCR 法检测 OAT1/3 mRNA 表达** 参考文献 [13]。大鼠肾脏及细胞总 RNA 的提取按照 RNA 提取试剂盒进行提取，使用 Nanodrop 2000 检

测 RNA 的浓度及纯度。按照 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒进行逆转录，反应条件为 37 °C、14 min，85 °C、30 s，1 个循环。PCR 反应进行扩增，反应体系为 10 μL，所需正反向引物各加入 0.3 μL，无酶水 1.4 μL，cDNA 3 μL，TB Green™ Premix Ex Taq™ II 5 μL；所需引物序列如表 1，每个待检基因重复做 3 个反应孔。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s，然后进入循环阶段，每个循环包括 95 °C 变性 15 s，60 °C 退火 60 s，60 °C 延伸到 95 °C，每 15 s 升温 0.3 °C，共 40 个循环。组织 RNA 以 GAPDH 作为内参，细胞 RNA 则以 ACTB 作为内参，用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算目的基因的相对表达。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因名称	正向(5'-3')	反向(5'-3')	长度/bp
SLC22A6(rOAT1)	GCCTATGGGGCACCTTGATT	TACCAGCGGGCTGACTCAAT	167
SLC22A8(rOAT3)	CAGTCTCCAATGACACCCAG	GATCGACTGGGCCATCTCCT	139
GAPDH	TGCTATGTCGCTAGACTTCG	GTTGCATAGAGGTCTTACGG	240
SLC22A6(hOAT1)	CATCTACGGTGCTGTTCTGTGG	ACTCTGGTGCTCTGTTGCTGTC	167
SLC22A8(hOAT3)	CCCCAATATCATCTACGGGATC	CCAGTTTCCAGGTCTTCGATA	139
ACTB	CCTGGCACCCAGCACAAT	GGGCGGACTCGTCATAC	144

**2.6 统计学分析** 采用 GraphPad Prism7 软件来分析，数据以  $(\bar{x} \pm s)$  来表示，多组间比较采用方差分析，以  $P \leq 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 不同浓度药物对 HEK-293 细胞存活率的影响

表 2 不同浓度药物对 HEK-293 细胞存活率的影响 ( $n=3$ )Tab. 2 Effects of different concentrations of drugs on the survival rate of HEK-293 cells ( $n=3$ )

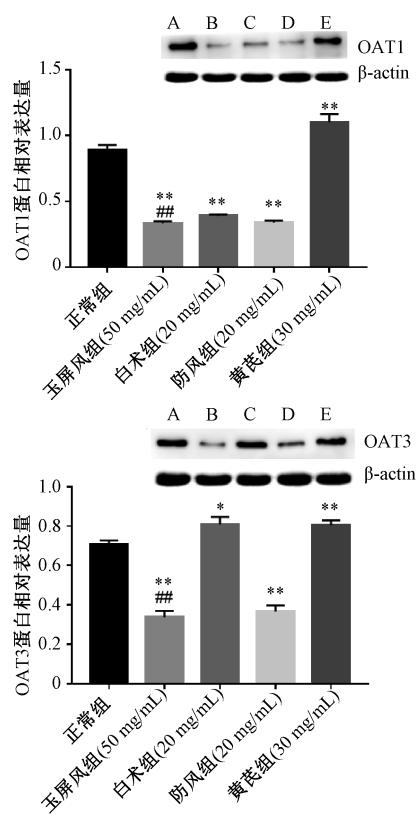
水煎液浓度/(mg 生药·mL <sup>-1</sup> )	黄芪	白术	防风	玉屏风
50	96.61	98.45	140.99	126.05
60	89.51	90.38	107.49	121.27
70	72.67	77.88	95.18	107.41
80	68.11	73.67	63.32	71.21
90	58.47	61.28	43.02	29.15
100	42.37	34.62	4.95	10.87

**3.2 玉屏风水煎剂对 HEK-293 细胞 OAT1/3 蛋白表达的影响** 如图 1 所示，与正常组比较，玉屏风、白术、防风水煎剂能抑制 HEK-293 细胞 OAT1 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )，黄芪水煎剂促进 HEK-293 细胞 OAT1 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )，并且玉屏风组相较于黄芪组 OAT1 蛋白表达下调 ( $P < 0.01$ )；与正常组比较，玉屏风、防风水煎剂能抑制 HEK-293 细胞 OAT3 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )，白术、黄芪水煎剂能促进 OAT3 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )，并

响 如表 2 所示，随着各药物浓度增加 HEK-293 细胞存活率逐渐下降，黄芪、白术 24 h 安全给药浓度为 0~60 mg 生药/mL，玉屏风组、防风组 24 h 安全给药浓度为 0~70 mg 生药/mL。

且玉屏风组相较于黄芪组 OAT3 蛋白表达下调 ( $P < 0.01$ )。

**3.3 玉屏风水煎剂对 HEK-293 细胞 OAT1/3 mRNA 表达的影响** 如图 2 所示，与正常组比较，玉屏风、白术、防风水煎剂能抑制 HEK-293 细胞 OAT1 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )，玉屏风、防风水煎剂能抑制 HEK-293 细胞 OAT3 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )，白术、黄芪水煎剂能促进 HEK-293 细胞 OAT3 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；与黄芪



注: A~E 为正常组、玉屏风组 (50 mg/mL)、白术组 (20 mg/mL)、防风组 (20 mg/mL)、黄芪组 (30 mg/mL)。与正常组比较,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ; 与黄芪组比较,  $\# P < 0.05$ ,  $\#\# P < 0.01$ 。

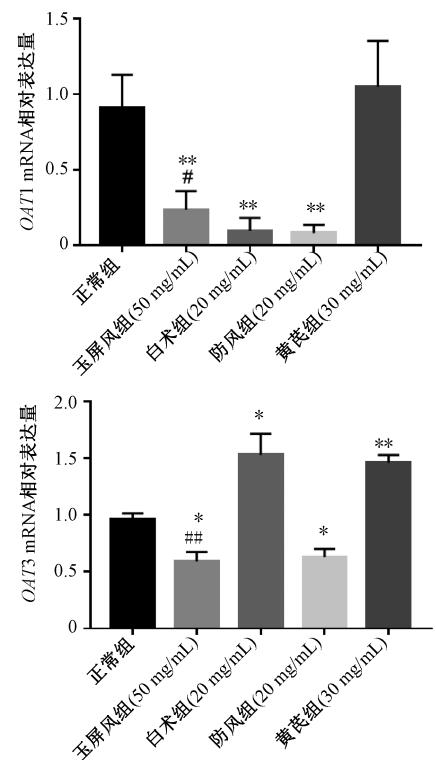
**图1 玉屏风水煎剂对HEK-293细胞OAT1/3蛋白表达的影响 ( $n=3$ )**

**Fig. 1 Effects of YPFD on the expression of OAT1/3 protein in HEK-293 cells ( $n=3$ )**

组相比较, 玉屏风组 *OAT1/3* mRNA 表达下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )。

**3.4 玉屏风水煎剂对大鼠肾组织中OAT1/3蛋白表达的影响** 如图3所示, 与正常组比较, 玉屏风、防风、白术水煎剂抑制大鼠肾组织 OAT1 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 玉屏风组相较于黄芪组 OAT1 蛋白表达下降 ( $P < 0.01$ ); 与正常组比较, 玉屏风水煎剂抑制大鼠肾组织 OAT3 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 而白术水煎剂促进大鼠肾组织 OAT3 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。

**3.5 玉屏风水煎剂对大鼠肾组织中OAT1/3 mRNA表达的影响** 如图4所示, 与正常组比较, 玉屏风、防风水煎剂抑制大鼠肾组织 *OAT1*mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ); 玉屏风、防风水煎剂抑制大鼠肾组织 *OAT3* mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ), 而白术水煎剂促进大鼠肾组织 *OAT3* mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。与黄芪组比较, 玉屏风组 *OAT1/3* mRNA 表达下降 ( $P < 0.01$ )。



注: 与正常组比较,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ; 与黄芪组比较,  $\# P < 0.05$ ,  $\#\# P < 0.01$ 。

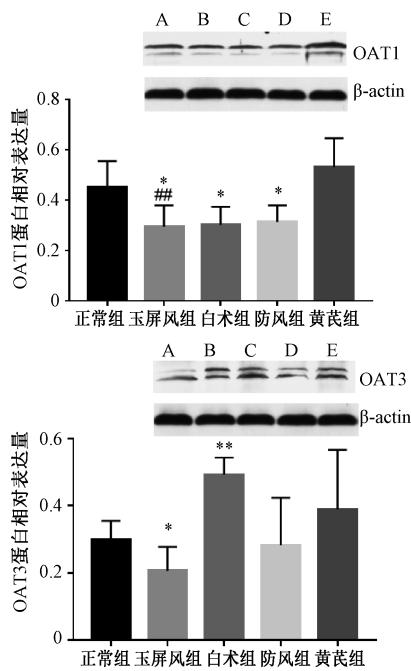
**图2 玉屏风及水煎剂对HEK-293细胞*OAT1/3* mRNA表达的影响 ( $n=3$ )**

**Fig. 2 Effects of YPFD on the expression of *OAT1/3* mRNA in HEK-293 cells ( $n=3$ )**

#### 4 讨论

方剂配伍是中医临床治疗疾病的主要用药方式, 临床实践表明, 中药复方往往比单一的中药材产生更好的疗效和更低的毒性作用<sup>[14-15]</sup>。本课题组前期实验研究<sup>[10]</sup>显示, 白术+黄芪配伍组相较于黄芪组用药, 能明显增加其主要成分黄芪甲苷在大鼠体内 AUC、 $t_{1/2}$ , 降低黄芪甲苷的清除率。提示这种由药物相互作用引起的药动学的改变可能与黄芪甲苷体内排泄有关。由黄芪甲苷的结构解析可以判断黄芪甲苷在体内可能以阴离子的形式存在, 有研究<sup>[16]</sup>表明, 肾脏排泄是黄芪甲苷的重要排泄途径, 协同效应可能与黄芪甲苷肾脏排泄过程的变化有关。*OAT1/3*蛋白在调节肾脏排泄及内源性和外源性有机阴离子(包括各种药物及其代谢物)的再吸收方面起着很重要的作用。因此本课题考察了玉屏风及其组分黄芪、白术、防风水煎剂对大鼠肾脏及 HEK-293 细胞中 OATs 的 2 个亚型 OAT1 和 OAT3 的蛋白和基因表达的影响。

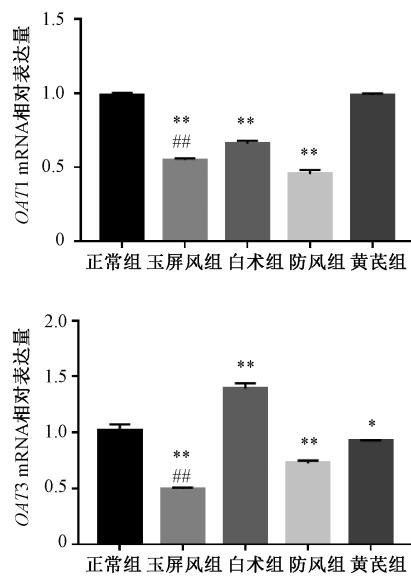
根据大鼠肾组织 Western blot 结果显示, 与正



注: A~E 为正常组、玉屏风组、白术组、防风组、黄芪组。与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与黄芪组比较, ##  $P < 0.01$ 。

**图3 玉屏风水煎剂大鼠肾组织中OAT1/3蛋白表达的影响 (n=5)**

**Fig. 3 Effects of YPFD on OAT1/3 protein expression in kidney tissue of rats (n=5)**



注: 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与黄芪组比较, ##  $P < 0.01$ 。

**图4 玉屏风水煎剂对大鼠肾组织中OAT1/3 mRNA表达的影响 (n=5)**

**Fig. 4 Effects of YPFD on OAT1/3 mRNA expression in kidney tissue of rats (n=5)**

常组和黄芪组相比, 玉屏风组的OAT1/3蛋白表达出现显著降低, 这与检测OAT1/3 mRNA表达结果相同。而且HEK-293细胞中OAT1/3蛋白及mRNA

表达调节作用与动物体内相似。这些实验结果结合前期药动学实验结果足以表明, 玉屏风可能通过下调肾脏中OAT1/3 mRNA表达, 降低OAT1/3蛋白表达, 从而减少体内黄芪甲苷的肾脏排泄, 提高其生物利用度。玉屏风和防风药物毒性很低, 在一定的剂量使用范围内比较安全, 对OATs抑制作用显著, 因此, 在玉屏风、防风联合其它药物使用时, 应当考虑药物相互作用而产生毒副作用。

玉屏风对有机阴离子家族OAT1、OAT3蛋白抑制作用可能与其组方内黄芪甲苷生物利用度增高、药效增强有关。但它们对OAT1/3蛋白和基因所产生抑制作用的机理尚不明确, 以及对肾脏其它药物转运体的影响有待更进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 李红念, 梅全喜, 戴卫波, 等. 玉屏风散的临床应用与药理作用研究进展[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(2): 284-287.
- [2] 宋美卿. 玉屏风散的现代研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(S1): 93-95.
- [3] 周巍, 袁嘉丽, 佟晓琳, 等. 玉屏风散的免疫调节作用及机制研究概况[J]. 甘肃中医学院学报, 2015, 32(1): 67-69.
- [4] Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 413-435.
- [5] 王雪, 张宥德. 决明子对有机阴离子转运体的抑制及其对汞致急性肾损伤的保护机制[C]//中国毒理学会第七次全国会员代表大会暨中国毒理学会第六次中青年学者科技论坛论文摘要. 重庆: 中国毒理学会, 2018: 2.
- [6] 李发双, 李玲, 高丽辉. 有机阴离子转运蛋白研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(10): 931-934.
- [7] Burckhardt G, Burckhardt B C. *In vitro* and *in vivo* evidence of the importance of organic anion transporters (OATs) in drug therapy[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011(201): 29-104.
- [8] VanWert A L, Gionfriddo M R, Sweet D H. Organic anion transporters: discovery, pharmacology, regulation and roles in pathophysiology[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2010, 31(1): 1-71.
- [9] 宋必卫, 周彦君. 有机阴离子转运蛋白的研究进展[J]. 生理科学进展, 2012, 43(1): 11-16.
- [10] 宋珏. 基于量效关系分析的复方玉屏风抗炎免疫作用及配伍机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
- [11] 郭秋言, 徐一, 雷志钧. 荔枝草提取物外抗单纯疱疹病毒I型的研究[J]. 中成药, 2018, 40(4): 946-949.
- [12] 邵丽芳. 热处理、UVB辐射后HSP72和P53的变化对黑素细胞功能影响的实验研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [13] 耿卢婧, 李岑, 夏政华, 等. 佐太、β-HgS、HgCl<sub>2</sub>对

- 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在大鼠的排泄[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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、c1 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、c1 caspase-9 蛋白表达 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 呈浓度依赖性。随着红花黄素 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** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 c1 caspase-9 by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the groups 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 c1 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