

# 葡萄籽原花青素对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

张丹丹<sup>1</sup>, 胡书群<sup>2</sup>, 杨荣礼<sup>1</sup>, 张亚洁<sup>3</sup>, 王婧欣<sup>1</sup>, 刘莹<sup>4</sup>, 李雷<sup>5\*</sup>

(1. 徐州医科大学附属医院老年医学科, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医科大学急救研究所, 江苏 徐州 221002; 3. 徐州医科大学附属医院神经内科, 江苏 徐州 221002; 4. 徐州市传染病医院重症医学科, 江苏 徐州 221004; 5. 徐州医科大学附属医院全科医学科, 江苏 徐州 221002)

**摘要:** **目的** 探讨葡萄籽原花青素对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法** 将 135 只小鼠分为假手术组、模型组和葡萄籽原花青素低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg), 灌胃给予相应药物 2 周后, 建立心肌缺血再灌注损伤模型, 6 h 后检测血清肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和心肌组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 水平; TTC 染色观察心肌梗死面积, TUNEL 法检测心肌细胞凋亡, 蛋白免疫印迹法检测心肌组织凋亡相关蛋白 caspase-3、cleaved-caspase-3、JNK 及 p-JNK 表达。**结果** 葡萄籽原花青素可降低小鼠血清心肌酶 CK、LDH 活性, 心肌细胞凋亡率, 心肌梗死面积, 心肌组织 MDA 水平和 cleaved-caspase-3、p-JNK/JNK 蛋白表达 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 增强心肌组织 SOD 活性 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 改善小鼠心肌缺血再灌注损伤。**结论** 葡萄籽原花青素对小鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 其机制可能与抗氧化作用和下调 JNK/caspase-3 信号通路有关。

**关键词:** 葡萄籽原花青素; 心肌缺血再灌注损伤; 活性氧; 细胞凋亡; JNK; caspase-3

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2023)03-0955-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.046

心血管疾病是全球死亡最常见的原因, 而人口增长和老龄化是心血管疾病患病总数增长的主要原因<sup>[1]</sup>。2019 年《急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南》强调, ST 段抬高型心肌梗死患者应最大限度地提高再灌注效率<sup>[2]</sup>, 如溶栓治疗、经皮冠状动脉血管成形术、冠状动脉旁路移植术<sup>[3]</sup>, 但通常伴随心肌缺血再灌注损伤 (MIRI), 表现为再灌注心律失常、心功能下降等, 严重时可出现危及生命的室性心律失常, 导致猝死<sup>[4]</sup>。MIRI 发生的机制包括细胞死亡、炎症、神经体液激活和氧化应激等<sup>[5-6]</sup>, 减轻心肌损伤, 限制 MIRI 引起的梗死组织范围, 对于改善心脏功能至关重要<sup>[7]</sup>。

葡萄籽原花青素具有抗炎、抗病毒和血管舒张作用<sup>[8-9]</sup>。有证据表明葡萄籽原花青素在预防慢性疾病中也有积极的作用<sup>[10-11]</sup>, 但关于其对 MIRI 的保护作用及机制尚不完全明确。本研究采用小鼠 MIRI 模型, 给予不同剂量葡萄籽原花青素干预, 研究其对小鼠 MIRI 的心肌保护作用, 及其对 JNK/caspase-3 信号通路的影响, 探讨其保护机制。

## 1 材料

1.1 动物 清洁级雄性昆明小鼠, 体质量 25~30 g, 购自徐州医科大学实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2015-0009, 饲养在 22~25 ℃ 温控房间, 通风良好, 12 h/12 h 明暗循环, 正常饲喂标准实验用鼠粮, 自由饮水, 适应 1 周后开始实验。

1.2 试剂与药物 葡萄籽原花青素 (天津尖峰天然产物研究开发有限公司, 批号 002-2011075-10, 原花青素含量 95.0%), 用双蒸水溶解, 生理盐水稀释至所需质量浓度。一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色荧光) (上海碧云天生物技术有限公司); 抗荧光衰减封片剂 (大连美仑生物技术有限公司); 磷酸酶抑制剂 (江苏凯基生物科技股份有限公司); GAPDH、cleaved-caspase-3、caspase-3、JNK、p-JNK 一抗、辣根过氧化物酶 HRP 标记的亲纯化山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG 二抗、化学发光液 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 三苯基四氮唑 (TTC) (美国 Sigma 公司); ELISA 检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛

**收稿日期:** 2021-10-07

**基金项目:** 江苏省重点研发计划 (社会发展) 项目 (BE2017641); 江苏省老年健康科研项目 (LK2021015, LR2021009); 徐州市科技项目 (KC21268)

**作者简介:** 张丹丹 (1987—), 女, 硕士, 主治医师, 从事老年心脑血管病基础及临床研究。Tel: 15895292633, E-mail: 675196540@qq.com

**\* 通信作者:** 李雷 (1972—), 男, 博士, 主任医师, 从事老年心脑血管病基础及临床研究。Tel: 13912007971, E-mail: Ligroup-999@126.com

(MDA) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 仪器 5804R 型高速低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); PowerPac™ Basic 蛋白垂直电泳仪、Trans-blot Turbo™ System 转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); Epoch 全波长酶标仪 (美国 BioTek 公司); 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 根据随机数字表法将小鼠分为 5 组, 每组 27 只, 即假手术组、模型组和葡萄籽原花青素低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg), 灌胃给予相应药物 2 周后, 建立小鼠心肌缺血再灌注损伤模型, 6 h 后处死小鼠, 取血及缺血区心肌组织。

2.2 小鼠心肌缺血再灌注模型建立 小鼠用 1% 戊巴比妥钠麻醉, 气管插管, 连接小动物呼吸机控制呼吸 (呼吸频率 120 次/min, 潮气量 2 mL, 吸呼比 1 : 2), 采用 BL-420S 生物机能实验系统连续监测心电图变化。显微镜下开胸, 暴露心脏, 于左心耳下缘约 2 mm 处找到并用丝线结扎左前降支, 左室前壁变白, 心电图 ST 段明显抬高或 T 波抬高 (ST 段≥0.1 mV), 证实冠脉血流被阻断, 表示模型构建成功; 假手术组仅将丝线穿过左前降支下的心肌组织, 不结扎。30 min 后, 假手术组缝合关闭胸腔; 其余各组松开结扎线, 观察心电图 ST 段逐渐下移, 表示恢复血流灌注 (再灌注成功的标志为抬高的 ST 段下降 50% 以上或高 T 波下移), 关闭胸腔。手术成功的小鼠纳入本研究, 心电图异常或在此过程完成前死亡的小鼠排除本实验。

2.3 取材 心肌组织立即冷冻于液氮中, 后转至-80 ℃保存, 用于抗氧化指标检测及蛋白质提取; 血液静置 30 min 后离心取上清, 用于血清心肌酶测定; 24 h 后, 取心脏进行 TTC 染色; 其余心肌组织多聚甲醛灌注固定, 制作石蜡标本。

2.4 血清心肌酶活性及心肌组织氧化指标检测 按照相应试剂盒说明书操作, 检测血清中肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平和心肌组织 SOD 活性、MDA 水平。

2.5 心肌梗死面积检测 术后 24 h 处死小鼠, 取心脏, 用 PBS 缓冲液冲洗, 行冠状切片, 从心尖部开始将心脏等厚切成 5 片, 放入 1% TTC 溶液中, 37 ℃保温 15 min, 4% 多聚甲醛固定 24 h 后拍照。采用 Image J 软件分析心肌梗死面积和心脏总面积, 计算梗死灶所占百分比。

2.6 蛋白免疫印迹法检测凋亡相关蛋白表达 取缺血区组

织 (心室前壁、心尖部), 加入含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 匀浆, 离心后取上清, BCA 法测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液, 100 ℃煮沸 5 min 进行变性。取总蛋白 50 μg, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 4 ℃孵育过夜, 次日洗膜后加入二抗室温孵育 1 h, 洗膜后加入化学发光液, 暗室曝光, 扫描分析条带, 用 Image J 软件统计灰度值, 计算目的蛋白相对表达。

2.7 TUNEL 法检测心肌组织凋亡率 取固定的心肌组织, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 烘干, 按照 TUNEL 检测试剂盒说明书进行操作, 最后滴加含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液, 封片后于荧光显微镜下观察。每个样本随机选择 5 个视野, 荧光显微镜 (×200) 下拍照后分析, TUNEL 阳性细胞数与细胞总数的比值作为心肌细胞凋亡率, 并计算平均凋亡率。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 16.0 软件进行处理, 实验数据以 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 方差齐时, 采用 LSD 法检验; 方差不齐时, 采用 Dunnett's T3 法检验, 以  $\alpha=0.05$  为检验水准。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 本实验共使用小鼠 135 只, 造模失败 6 只, 死亡 9 只, 总死亡率 6.67%。其中假手术组麻醉后心电图提示心律失常, 最终室颤死亡 1 只, 术后呼吸衰竭死亡 1 只, 死亡率 7.41%; 模型组造模失败 2 只, 术中严重心律失常致室颤, 死亡 2 只, 死亡率 7.41%; 葡萄籽原花青素低剂量组造模失败 2 只, 术中室颤死亡 1 只, 死亡率 3.70%; 中剂量组造模失败 1 只, 术中心律失常, 最终室颤死亡 2 只, 死亡率 7.41%; 高剂量组造模失败 1 只, 室颤死亡 2 只, 死亡率 7.41%。其余符合要求的动物共 120 只纳入本实验结果中进行统计。

3.2 葡萄籽原花青素对 MIRI 小鼠抗氧化水平的影响 如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌组织 SOD 活性降低 ( $P<0.01$ ), MDA 水平升高 ( $P<0.01$ ), 说明缺血再灌注损伤致心肌抗氧化能力下降; 与模型组比较, 葡萄籽原花青素各剂量组小鼠心肌组织 SOD 活性升高 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), MDA 水平降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 表明葡萄籽原花青素给药后的小鼠心肌组织抗氧化能力增强, 且呈剂量依赖性。

表 1 各组心肌组织 SOD 活性及 MDA 水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> )
假手术组	—	13.87±0.96	2.75±0.24
模型组	—	4.25±0.44**	6.07±0.32**
葡萄籽原花青素低剂量组	50	7.05±0.14 <sup>#</sup>	5.14±0.15 <sup>#</sup>
葡萄籽原花青素中剂量组	100	9.02±0.77 <sup>##</sup>	4.10±0.52 <sup>##</sup>
葡萄籽原花青素高剂量组	200	11.63±0.72 <sup>##</sup>	3.37±0.23 <sup>##</sup>

注: 与假手术组比较, \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup>  $P<0.05$ , <sup>##</sup>  $P<0.01$ 。

3.3 葡萄籽原花青素对 MIRI 小鼠血清心肌酶活性的影响 CK、LDH 活性可间接反应心肌损伤程度, 如表 2 所示,

与假手术组比较, 模型组小鼠血清 CK、LDH 活性升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 葡萄籽原花青素各剂量组均可

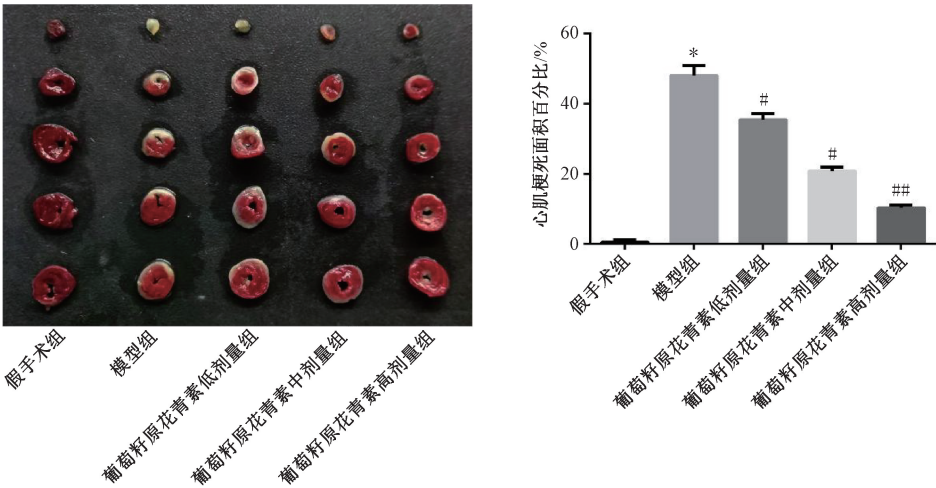
降低血清 LDH、CK 活性 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 表明葡萄籽原花青素给药后的小鼠血清心肌酶活性降低, 且呈剂量依赖性。

表 2 各组小鼠血清心肌酶 CK、LDH 活性比较 (U/L,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	CK	LDH
假手术组	—	5.29 $\pm$ 0.51	339.13 $\pm$ 43.78
模型组	—	15.52 $\pm$ 0.67**	895.60 $\pm$ 15.23**
葡萄籽原花青素低剂量组	50	14.09 $\pm$ 1.21	750.26 $\pm$ 54.31 <sup>#</sup>
葡萄籽原花青素中剂量组	100	12.43 $\pm$ 1.23 <sup>#</sup>	634.59 $\pm$ 41.23 <sup>#</sup>
葡萄籽原花青素高剂量组	200	9.40 $\pm$ 1.28 <sup>##</sup>	506.07 $\pm$ 15.95 <sup>##</sup>

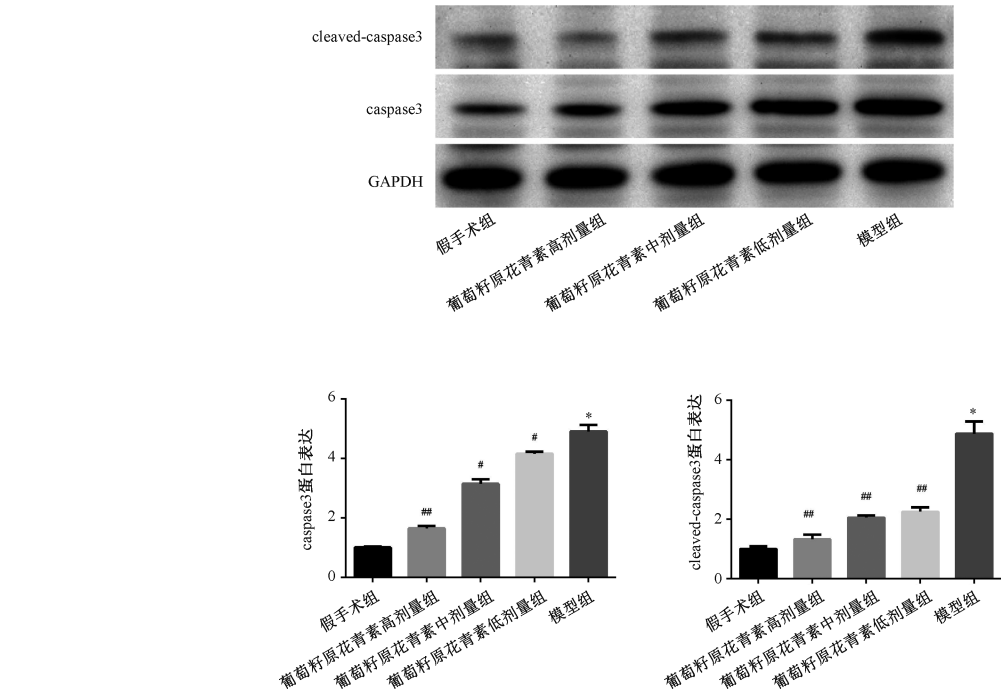
注: 与假手术组比较, \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ 。

3.4 葡萄籽原花青素对 MIRI 小鼠心肌梗死的影响 如图 1



注: 与假手术组比较, \*  $P<0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ 。

图 1 各组小鼠心肌梗死面积 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )



注: 与假手术组比较, \*  $P<0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠心肌组织 caspase-3 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌梗死面积增加 ( $P<0.05$ ), 达 48.1%, 提示造模成功; 与模型组比较, 葡萄籽原花青素低、中、高剂量组小鼠平均心肌梗死面积百分比降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 分别为 35.4%、25.8%、10.3%, 表明葡萄籽原花青素可改善 MIRI 小鼠心肌梗死, 且呈剂量依赖性。

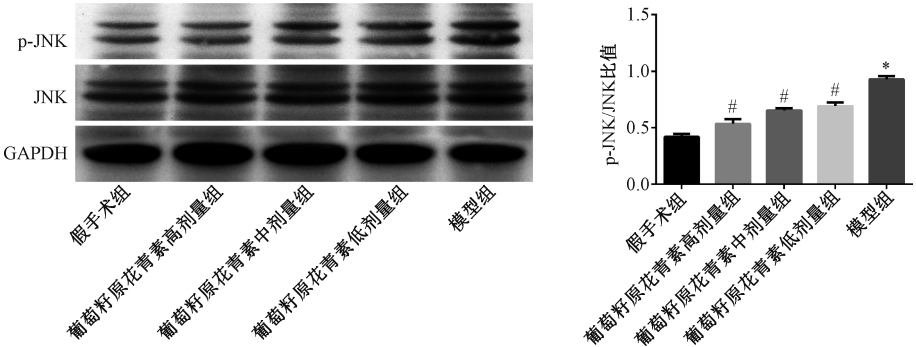
3.5 葡萄籽原花青素对 MIRI 小鼠心肌组织 caspase-3 蛋白表达的影响 如图 2 所示, 与假手术组比较, 模型组 cleaved-caspase-3、caspase-3 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 葡萄籽原花青素各剂量 cleaved-caspase-3、caspase-3 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 表明葡萄籽原花青素可下调小鼠因缺血再灌注引起的凋亡相关蛋白 cleaved-caspase-3、caspase-3 的表达。



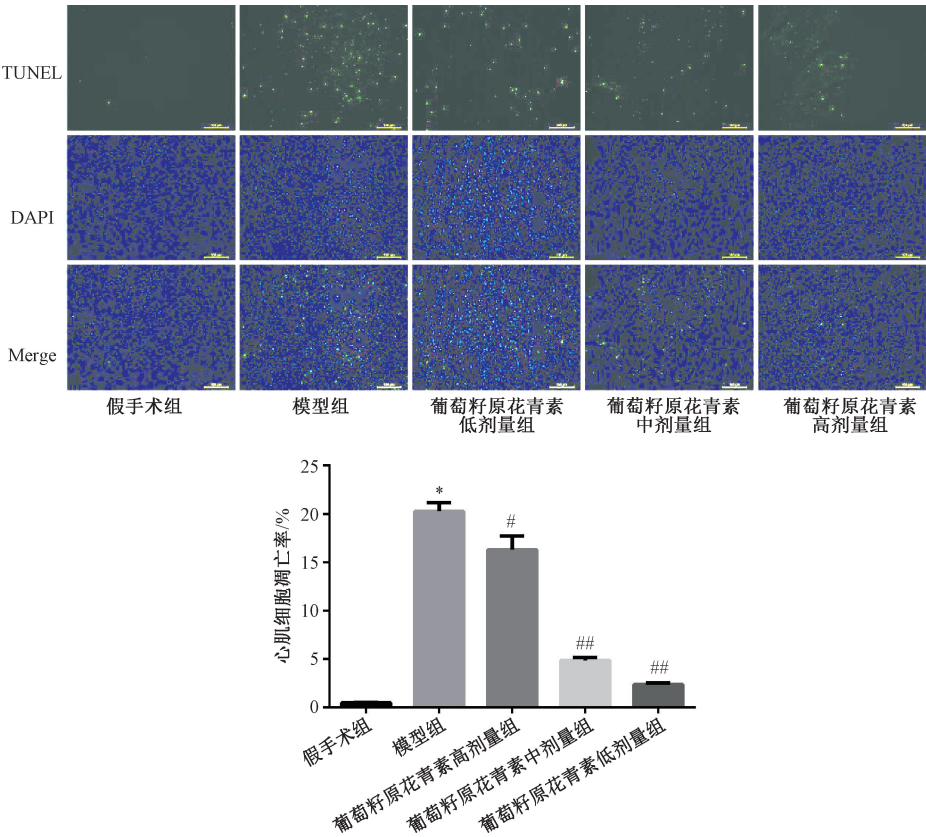
3.6 葡萄籽原花青素对 MIRI 小鼠心肌组织 p-JNK/JNK 蛋白表达的影响 如图 3 所示,与假手术组比较,模型组小鼠心肌组织 p-JNK/JNK 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,葡萄籽原花青素各剂量组小鼠心肌组织 p-JNK/JNK 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )。

3.7 葡萄籽原花青素对 MIRI 小鼠心肌细胞凋亡的影响

如图 4 所示,与假手术组比较,模型组心肌细胞凋亡率升高 ( $P<0.05$ ),达 20.3%;与模型组比较,葡萄籽原花青素低、中、高剂量组小鼠心肌细胞凋亡率降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),分别为 13.2%、4.8%、2.4%,表明葡萄籽原花青素可抑制小鼠缺血再灌注后的心肌细胞凋亡,且呈剂量依赖性。



注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ 。  
图 3 各组小鼠心肌组织 JNK/p-JNK 蛋白表达



注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

图 4 各组小鼠心肌细胞凋亡情况

4 讨论

心肌缺血再灌注损伤可导致心功能紊乱、心肌细胞凋亡、心肌梗死范围扩大。一旦心肌细胞受损或死亡,在再灌注过程中,细胞内的酶(如 CK、LDH)就会释放到血流中,因此检测血清 CK、LDH 活性可以间接反映心肌损伤的

程度。  
葡萄籽原花青素富含酚羟基,具有较强的自由基清除能力,可拮抗各种原因所致的氧化应激状态,保护脏器功能。体外研究表明,100 mg/L 葡萄籽原花青素对超氧阴离子和羟自由基的抑制率为 78%~81%,明显高于维生素 C

(12%~19%) 和维生素 E (36%~44%)<sup>[12]</sup>。葡萄籽原花青素在肝、肾、心、脾和大脑等多个靶器官中均具有生物利用度。研究发现,连续 2 周给予 400 mg/kg 葡萄籽原花青素能降低氟中毒昆明小鼠肝组织 MDA 水平,增加 GSH-Px、SOD 活性<sup>[13]</sup>;葡萄籽原花青素还可通过整合 ROS 增强抗氧化来降低脂质过氧化<sup>[14]</sup>,即使用纯度较低的原花青素(37%),也可增加高胆固醇诱导的大鼠心脏组织 SOD、CAT 活性和 GSH 水平<sup>[14]</sup>,保护心脏功能。

除抗氧化作用外,葡萄籽原花青素也可通过更直接的方式发挥保护作用,如抗凋亡等<sup>[15]</sup>。研究发现,100 mg/L 葡萄籽原花青素预处理可使 300 μg/mL 烟草诱导的细胞凋亡率降低 85%<sup>[16]</sup>。当发生缺血再灌注时,JNK 磷酸化激活,转移到细胞核内使其下游作用底物 c-Jun 磷酸化,激活 caspase-3,caspase-3 被活化为 cleaved-caspase-3,导致细胞凋亡,这是心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡的重要信号通路之一<sup>[17]</sup>,阻断 JNK 则可抑制 caspase-3 表达。已有研究发现,乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 可通过调节 JNK/caspase-3 信号通路减轻线粒体相关的细胞凋亡,对缺血性脑损伤发挥神经保护作用<sup>[18]</sup>。调控 Akt/JNK3/caspase-3 信号通路对脑缺血/再灌注损伤大鼠具有保护作用<sup>[19-20]</sup>。因此,葡萄籽原花青素也可能通过 JNK/caspase-3 信号通路调控细胞凋亡,发挥心肌保护作用。

本研究结果显示,葡萄籽原花青素能增强抗氧化因子 SOD 活性,降低血清心肌酶 CK、LDH 活性、MDA 水平、caspase-3、cleaved-caspase-3、p-JNK/JNK 蛋白表达,抑制心肌细胞凋亡,改善心肌梗死,并呈剂量依赖性。提示葡萄籽原花青素可能通过下调 JNK/caspase-3 表达,抑制心肌细胞凋亡,并通过增强抗氧化作用,抑制体内超氧阴离子和羟自由基的生成,减轻氧化应激,降低血清心肌酶 CK、LDH 活性,最终改善心肌梗死,发挥对心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

参考文献:

[ 1 ] Roth G A, Mensah G A, Johnson C O, *et al.* Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 study[J] . *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76 (25): 2982-3021.

[ 2 ] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南 (2019) [J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(10): 766-783.

[ 3 ] Ye Y C, Yang M, Zhang S Y, *et al.* Percutaneous coronary intervention versus cardiac bypass surgery for left main coronary artery disease: A trial sequential analysis [ J ]. *Medicine ( Baltimore )*, 2017, 96(41): e8115.

[ 4 ] Bonnemeier H, Hartmann F, Wiegand U K, *et al.* Course and prognostic implications of QT interval and QT interval variability after primary coronary angioplasty in acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(1): 44-50.

[ 5 ] Hausenloy D J, Yellon D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target[J] . *J Clin Invest*, 2013,

123(1): 92-100.

[ 6 ] Toldo S, Mauro A G, Cutter Z, *et al.* Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury[J] . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1553-H1568.

[ 7 ] Ferdinandy P, Hausenloy D J, Heusch G, *et al.* Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning[J]. *Pharmacol Rev*, 2014, 66(4): 1142-1174.

[ 8 ] Neilson A P, O'Keefe S F, Bolling B W. High-molecular-weight proanthocyanidins in foods: Overcoming analytical challenges in pursuit of novel dietary bioactive components [ J ]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2016, 7: 43-64.

[ 9 ] Zhu F. Proanthocyanidins in cereals and pseudocereals[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(10): 1521-1533.

[ 10 ] Zhang L, Wang Y J, Li D X, *et al.* The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins[J]. *Food Funct*, 2016, 7(3): 1273-1281.

[ 11 ] Bagchi D, Swaroop A, Preuss H G, *et al.* Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview [ J ] . *Mutat Res*, 2014, 768: 69-73.

[ 12 ] Bagchi D, Garg A, Krohn R L, *et al.* Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro* [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* , 1997, 95(2): 179-189.

[ 13 ] Niu Q, He P, Xu S Z, *et al.* Fluoride-induced iron overload contributes to hepatic oxidative damage in mouse and the protective role of grape seed proanthocyanidin extract [ J ]. *J Toxicol Sci*, 2018, 43(5): 311-319.

[ 14 ] Thiruchenduran M, Vijayan N A, Sawaminathan J K, *et al.* Protective effect of grape seed proanthocyanidins against cholesterol cholic acid diet-induced hypercholesterolemia in rats [ J ] . *Cardiovasc Pathol*, 2011, 20(6): 361-368.

[ 15 ] Weseler A R, Bast A. Masquelier's grape seed extract: from basic flavonoid research to a well-characterized food supplement with health benefits[J]. *Nutr J*, 2017, 16(1): 5.

[ 16 ] Bagchi M, Balmoori J, Bggchi D, *et al.* Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes [ J ]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26 ( 7-8 ) : 992-1000.

[ 17 ] Wu L, Liu X Y, Wang L X, *et al.* Exendin-4 protects HUVECs from tunicamycin-induced apoptosis *via* inhibiting the IRE1a/JNK/caspase-3 pathway [ J ]. *Endocrine* , 2017, 55 ( 3 ) : 764-772.

[ 18 ] Xia P P, Zhang F, Yuan Y J, *et al.* ALDH 2 conferred neuroprotection on cerebral ischemic injury by alleviating mitochondria-related apoptosis through JNK/caspase-3 signing pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(8): 1303-1323.

[ 19 ] Qi D S, Tao J H, Zhang L Q, *et al.* Neuroprotection of Cilostazol against ischemia/reperfusion-induced cognitive deficits

through inhibiting JNK3/caspase-3 by enhancing Akt1 [J].  
*Brain Res*, 2016, 1653: 67-74.

[20] Zhang M, Yan H, Li S, *et al.* Rosmarinic acid protects rat  
hippocampal neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury  
via the Akt/JNK3/caspase-3 signaling pathway [J]. *Brain Res*,  
2017, 1657: 9-15.

姜黄素对食管癌细胞中 5-FU 化疗敏感性的影响

秦文兵<sup>1</sup>, 李瑞佳<sup>1</sup>, 张月丽<sup>2</sup>  
(1. 西安市第八医院药剂科, 陕西 西安 710000; 2. 郑州大学附属郑州中心医院临床药学科, 河南 郑州 450007)

**摘要:** **目的** 探讨姜黄素对食管癌细胞中 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 化疗敏感性的影响。**方法** 选取食管癌细胞 EC-9706 和 EC-109, 单独给予 5-FU 或联合姜黄素干预后, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖, RT-qPCR 法检测 *miR-590-3p* 表达, Western blot 法检测 Wnt-2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达。**结果** 姜黄素能够抑制食管癌 EC-9706 和 EC-109 细胞的增殖 ( $P<0.05$ ), 并呈剂量依赖性。姜黄素能够增强食管癌细胞 EC-9706 和 EC-109 对 5-FU 的敏感性, 降低其  $IC_{50}$  值 ( $P<0.01$ )。*miR-590-3p* 在食管癌细胞系中低表达; 过表达 *miR-590-3p* 能够抑制食管癌细胞的增殖, 并增加 EC-9706 和 EC-109 细胞对 5-FU 的敏感性, 降低其  $IC_{50}$  值 ( $P<0.01$ )。姜黄素能够增加食管癌细胞中 *miR-590-3p* 的表达; 抑制 *miR-590-3p* 的表达能够逆转姜黄素对食管癌细胞增殖的影响。姜黄素能够通过调节 *miR-590-3p* 表达抑制 Wnt-2、 $\beta$ -catenin 蛋白表达 ( $P<0.01$ )。**结论** 姜黄素能够增加 5-FU 对食管癌的化疗敏感性, 其机制可能是通过调控 *miR-590-3p* 表达从而抑制 Wnt-2/ $\beta$ -catenin 通路的活性。

**关键词:** 姜黄素; 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 食管癌细胞 EC-9706; *miR-590-3p*; 食管癌细胞 EC-109; Wnt-2/ $\beta$ -catenin 信号通路

中图分类号: R285.5                      文献标志码: B                      文章编号: 1001-1528(2023)03-0960-05  
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.03.047

食管癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 虽然近年来食管癌的治疗取得了很大进展, 但患者的总生存率和五年生存率仍较低<sup>[1]</sup>。手术是食管癌治疗的首选, 但超过4/5的食管癌患者在确诊时已失去根治性手术的机会<sup>[2-3]</sup>, 放化疗维持是中晚期食管癌患者的主要治疗方式<sup>[4]</sup>。新的靶向药物如 Pembrolizumab 已于 2019 年获得 FDA 批准用于食管癌患者的治疗, 但只能用于 PD-L1 阳性症状患者<sup>[5]</sup>。因此, 基于 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的化疗方案仍是食管癌治疗的重要手段<sup>[6]</sup>, 但 5-FU 对正常细胞的毒性及耐药性限制了其临床应用。因此, 如何提高食管癌对 5-FU 的敏感性仍是亟待解决的难题。

姜黄素是从姜黄科植物根茎中提取出的一种酸性多酚类物质, 具有抗肿瘤、抗炎、等多种药理作用<sup>[7-8]</sup>。研究发现, 姜黄素能够抑制食管癌细胞的增殖、凋亡等生理功能<sup>[9-10]</sup>, 但在食管癌中, 姜黄素对 5-FU 的化疗敏感性及其作用机制的研究尚不明确。因此, 本研究以食管癌细胞 EC-9706 和 EC-109 为研究对象, 评价姜黄素对食管癌细胞活

性的作用及其对 5-FU 化疗敏感性的影响。

**1 材料**

1.1 细胞株 人食管癌细胞株 EC-9706、EC-109 和正常食管上皮细胞 Het-1A 均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 试剂与药物 姜黄素 (批号 110823-201405)、5-FU (批号 L1903080) (美国 Sigma 公司); 胎牛血清、PRMI 1640 (批号 WH0021F211) (美国 HyClone 公司); CCK-8 试剂盒 (批号 KGA317)、蛋白提取试剂盒、ECL 发光试剂盒 (批号 P0018FS) (上海碧云天生物技术有限公司); 逆转录试剂盒 (批号 0522011)、PCR 试剂盒 (批号 05225807) (美国 Thermo Scientific 公司); *miR-NC*、*miR-590-3p* 模拟物、*miR-590-3p* 抑制物、PCR 引物 (上海吉马制药技术有限公司); 一抗 anti-Wnt-2 (批号 ab190222)、anti- $\beta$ -catenin (批号 ab32572)、二抗 (批号 ab172730) (英国 Abcam 公司)。

1.3 仪器 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 电泳及成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置显微镜

收稿日期: 2021-01-07  
基金项目: 河南省科技攻关项目 (212102310121); 河南省医学科技攻关联合共建项目 (LHGJ20191039, LHGJ20210072)  
作者简介: 秦文兵 (1966—), 男, 副主任药师, 研究方向为中药药理学。Tel: 13991339566, E-mail: 13991339566@163.com  
网络出版日期: 2022-03-28  
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220325.1658.006.html>