基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0932-04

硫化氢对大鼠 MIRI 心肌细胞凋亡的影响及机制研究

李 钢，杨双强

（重庆医科大学附属第一医院胸心外科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨 H_2S 后处理对大鼠心肌缺血-再灌注细胞凋亡及缺氧诱导因子-1α（Hypoxia-inducible factor-1alpha，HIF-1α）/血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）的影响。方法：以硫氢化钠（Sodium hydrosulfide，NaHS）作为外源性 H_2S 供体。健康雄性 SD 大鼠 24 只，随机平均分为 3 组：假手术（Sham）组、缺血再灌注（Ischemia-reperfusion，IR）组、H_2S 后处理组。用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数（Apoptotic index，AI），RT-PCR 法检测心肌组织 HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达，Western blot 检测 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的表达情况。结果：相对于 IR 组，H2S 组心肌细胞 AI 明显下降（$P<0.01$），HIF-1αmRNA 及蛋白表达水平明显增加（分别为 $P<0.01$ 和 $P<0.05$），VEGF mRNA 和蛋白表达水平亦显著增加（均为 $P<0.01$）。结论：H_2S 后处理能促进 HIF-1α/VEGF 的高表达，对心肌缺血-再灌注损伤（Myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI）诱导的心肌细胞凋亡有抑制作用。

【关键词】硫化氢；心肌缺血-再灌注损伤；缺氧诱导因子-1α；血管内皮生长因子；凋亡

【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-19

Effect and mechanism of hydrogen sulfide on MIRI apoptosis in rat hearts

LI Gang, YANG Shuang-qiang

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of hydrogen sulfide postconditioning on myocardial apoptosis and hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Methods*: Sodium hydrosulfide was used as an exogenous donor of hydrogen sulfide. Twenty-four healthy male SD rats were randomly divided into three groups: sham-operation group, simple ischemia-reperfusion group and hydrogen sulfide postconditioning group. The myocardial apoptosis index was detected with TUNEL. Hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor mRNA were observed by RT-PCR. In addition, the expression of hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor proteins were measured by Western blot. *Results*: The myocardial apoptosis index significantly decreased ($P<0.01$), and the mRNA and protein expression levels of hypoxia-inducible factor-1alpha ($P<0.01$, $P<0.05$, respectively) and vascular endothelial growth factor (all $P<0.01$) significantly increased in the hydrogen sulfide postconditioning group compared with the simple ischemia-reperfusion group. *Conclusion*: Hydrogen sulfide postconditioning can promote the high expression of hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor and inhibit myocardial apoptosis induced by the myocardial ischemia-reperfusion injury.

【Key words】hydrogen sulfide; myocardial ischemia-reperfusion injury; hypoxia-inducible factor-1alpha; vascular endothelial growth factor; apoptosis

一直以来，心肌缺血-再灌注损伤（Myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI）就是心血管领域研究的重点和热点问题。大量动物实验和临床观察显示，持续性的心肌缺血会导致严重的组织损伤和细胞凋亡，尽管再灌注后心肌缺血得以缓解，但心肌组织的损伤程度却急剧上升，出现心肌梗死面积持续扩大、严重心律失常、持久性心室收缩功能低下等状况，此种现象即为 MIRI。近年来，硫化氢（Hydrogen sulfide，H_2S）被誉为是继一氧化碳（Carbon monoxide，CO）与一氧化氮（Nitric oxide，NO）后的第 3 种气体信号分子。有研究表明，H_2S 对缺血再灌注损伤（Ischemia-reperfusion injury，IR）心肌具有保护作用，但其具体机制至今仍不明确。本研究采用建立在体大鼠心肌 IR 模型，研究 H_2S 后处理对心肌细胞凋亡及缺氧诱导因子-1α（Hypoxia-inducible factor-1alpha，HIF-1α）/血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）的影响，进一步探讨 H_2S 后处理心肌保护的可能机制。

作者介绍：李 钢（1981-），男，硕士，研究方向：心肌保护。

通信作者：杨双强，男，教授，Email：yysqiang@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

健康雄性 SD 大鼠，体重(270±30) g，SPF 级，购自第三军医大学实验动物中心；硫氢化钠(Sodium hydrosulfide，NaHS)(Sigma 公司，美国)；兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体、兔抗鼠 HIF-1α 多克隆抗体(Santa Cruz 公司，美国)；小鼠抗 β-actin 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠和抗兔 IgG、DAB 试剂盒(北京中杉公司)；TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(Roche 公司)；RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司)；BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究所)；其余化学试剂为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药方法 SD 大鼠 24 只随机分为 3 组，每组 8 只。Sham 组：左冠状动脉前降支下挂线，但不结扎，持续观察 270 min；IR 组：结扎左冠状动脉前降支 30 min，于再灌注前5 min经腹腔注射生理盐水1 ml；H_2S组：手术操作同IR组，于再灌注前 5 min 给予 NaHS 160 μmol/kg，用生理盐水稀释至 1 ml 后经腹腔注射。

1.2.2 大鼠 MIRI 模型建立 SD 大鼠称重后，腹腔注射 2% 的戊巴比妥钠麻醉(0.23 ml/100 g)，仰卧固定于操作台，用针形电极插入大鼠右前肢和左、右后肢，记录标准Ⅱ导联心电图。颈部皮肤消毒后行正中切口 2.0~2.5 cm，仔细分离皮下筋膜和肌肉，注意不要钳夹或撕裂颌下腺体，以免出血；顿性分离颈部肌群，轻拉开并于气管下穿线牵引，于第 3、4 气管软骨环处用眼科剪横向剪约 2 mm 的切口，用连接呼吸机的钝头粗针行气管插管(呼吸频率 80 次/min，吸呼比 1:2，潮气量 3 ml/100 g)。结扎左冠状动脉前降支建立心肌 IR 模型。胸部消毒，皮肤穿线备缝合时用，以左胸第 3 肋间为手术切口。沿手术切口依次切开皮肤、胸大肌，暴露肋骨。在大鼠胸骨左缘 2~3 mm、第 2~4 肋间行纵行切口，压迫或结扎肋间动脉，用自制拉钩将胸腺与肋骨拉开，分离胸腺，暴露心脏，用小镊子轻轻撕开纤维心包与浆膜心包壁层，暴露左心耳，平左心耳前角下缘 2 mm 处进针，经左冠状动脉下浅层于对侧室间隔出针，穿用 5-0 医用双针尼龙线，以备结扎，稳定 10 min 后将一直径约 2 mm 的硅胶管置于冠脉表面，拉线推管，使胶管压迫冠脉造成心肌缺血，缺血 30 min 后放松结扎线使冠脉再通 4 h。整个实验过程中连续记录标准肢体Ⅱ导联心电图。模型制备成功标准：结扎后标准肢体Ⅱ导联心电图 S-T 段抬高(≥0.1 mV)和(或)T 波高耸或倒置呈弓背向上单向曲线，肉眼观察结扎线以下心肌颜色苍白、左心室被动跳动等，对心电图和心尖颜色无变化者淘汰。

1.2.3 心肌细胞凋亡检测 再灌注结束后，快速将大鼠心脏剪下，冰生理盐水漂洗，切取冠状动脉左前降支供血区域的左室标本置于 4%多聚甲醛液中固定 24~48 h，制作石蜡包埋，每组各取 2 个不相连的切片，用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法按试剂盒说明进行组织切片细胞凋亡的原位检测。显微镜下观察，正常心肌细胞核呈蓝色，凋亡细胞核呈深浅不一的棕黄色。每张切片于凋亡细胞分布区域各取 10 个高倍(×400)视野作半定量测定，以心肌凋亡细胞数占总心肌细胞数的百分比作为心肌细胞凋亡指数(Apoptotic index，AI)，以百分数(%) 表示。

1.2.4 心肌组织总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测 HIF-1α 和 VEGF mRNA 水平 严格按照 RT-PCR 试剂盒提取各组心肌组织总 RNA，测定 D_{260}/D_{280} 值，计算 RNA 的纯度。使用 PrimeScript RT reagent Kit 快速反转录合成 cDNA，所有操作严格按照说明书进行。RT-PCR HIF-1α、VEGF、β-actin 引物(表 1)使用前稀释成 20 μmol/L，-20℃保存。50 μl 体系中加入 DNA Taq 25 μl，HIF-1α 上游和下游引物各 2 μl，cDNA 模板 2 μl，灭菌水 19 μl。反应条件：94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，共 30 个循环。VEGF 的反应体系和条件同 HIF-1α 一致。利用 Quantity One 凝胶电泳分析软件进行 PCR 电泳条带光密度 (Optical density，OD) 分析，β-actin 为内参，比较各组 mRNA 的相对表达情况。相对 mRNA 含量=HIF-1α 或 VEGF 的 OD/内参 β-actin 的 OD × 100%。

表 1 各基因引物序列、产物大小及溶解温度

基因	引物序列	产物大小 (bp)	溶解温度 (℃)
HIF-1α	正义：cagacagagcaggaaagagagtc	247	60.2
	反义：ccaagaaagcgacatagtaggg		58.1
VEGF	正义：cactggaccctggctttactg	330	59.8
	反义：ctctcctatgtgctggctttg		57.8
β-actin	正义：cctgaagtaccccattgaacac	562	58.1
	反义：ctcattgccgatagtgatgacc		58.1

1.2.5 心肌组织总蛋白的提取及 Western blot 检测 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达水平 严格按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书提取各组心肌组织总蛋白并测定蛋白浓度。常规法进行 Western blot 检测，HIF-1α 抗体(1:300)、VEGF 抗体(1:200)，β-actin 抗体(1:300)，二抗(均为 1:2 000)，ECL 显影。利用 Gel-PRO ANALYZER 凝胶定量分析软件分析蛋白电泳条带亮度，即累积光密度(Integrated optical density，IOD)，β-actin 为内参，比较各组蛋白的相对表达情况。相对蛋白含量=HIF-1α 或 VEGF 的 IOD/内参 β-actin 的 IOD × 100%。

1.3 统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用统计软件 SPSS 17.0 进行单因素方差分析，各指标间进行直线相关分析，以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结 果

2.1 心肌细胞凋亡

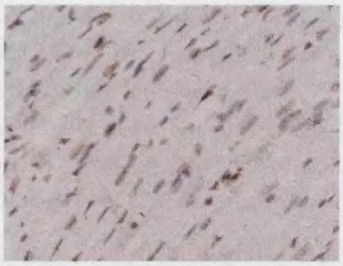
TUNEL 染色阳性的细胞核呈棕褐色，Sham 组大鼠心肌仅见极少染色阳性细胞核(图 1)，IR 组凋亡细胞较 Sham 组明显增多($P<0.01$，图 2)，H_2S 组 TUNEL 染色阳性心肌细胞核

也较 Sham 组明显增多($P<0.01$)，但显著少于 IR 组($P<0.01$，图 3)，各组心肌细胞凋亡指数变化(表 2)。



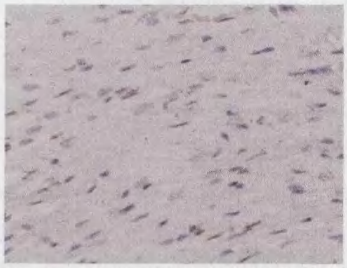
常氧条件下，心肌组织中凋亡细胞很少，TUNEL 染色阳性的心肌细胞核极少(×400)

图 1　Sham 组 TUNEL 染色



缺血再灌注后，心肌组织中凋亡细胞增多明显，TUNEL 染色阳性的心肌细胞核较 Sham 组显著增多(×400)

图 2　IR 组 TUNEL 染色



H_2S 后处理后，心肌组织中凋亡细胞减少明显，TUNEL 染色阳性的心肌细胞核较 IR 组显著减少(×400)

图 3　H_2S 组 TUNEL 染色

表 2　TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡($\bar{x}\pm s$，n=5)

	Sham组	IR 组	H_2S 组
阳性心肌细胞核数	11.50 ± 1.27	82.42 ± 2.39**	39.90 ± 2.94**##
AI(%)	5.04 ± 0.54	36.39 ± 0.69**	17.52 ± 1.02**##

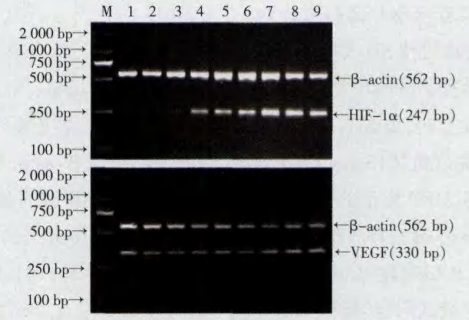
注：*，$P<0.05$，与 Sham 组比较；**，$P<0.01$，与 Sham 组比较。#，$P<0.05$，与 IR 组比较；##，$P<0.01$，与 IR 组比较

2.2　各组心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达情况

H_2S 组心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达水平较 Sham 组和 IR 组显著升高($P<0.01$)，IR 组 HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达水平亦高于 Sham 组(分别为 $P<0.01$ 和 $P<0.05$)(表 3，图 4)。

2.3　各组心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达情况

H_2S 组心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达水平较 Sham 组显著升高(均为 $P<0.01$)；与 IR 组相比，H_2S 组 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达水平亦明显升高(分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$)(表 4、图 5)。



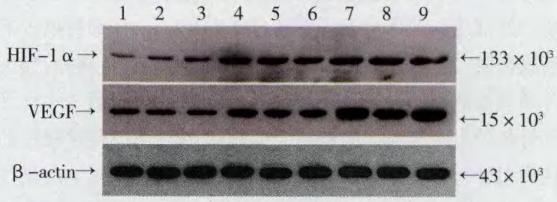
M. 标准；1~3. Sham 组；4~6. IR 组；7~9. H_2S 组

图 4　RT-PCR 检测 H_2S 后处理对 HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达的影响

表 3　各组心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达情况($\bar{x}\pm s$，n=3)

	Sham组	IR 组	H_2S 组
HIF-1α/β-actin	62.67 ± 3.22	87.33 ± 2.31**	99.67 ± 1.53**##
VEGF/β-actin	67.33 ± 5.13	78.00 ± 4.36*	100.67 ± 3.51**##

注：*，$P<0.05$，与 Sham 组比较；**，$P<0.01$，与 Sham 组比较。#，$P<0.05$，与 IR 组比较；##，$P<0.01$，与 IR 组比较



1~3. Sham 组；4~6. IR 组；7~9. H_2S 组

图 5　Western blot 检测 H_2S 后处理对 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达的影响

表 4　各组心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达情况($\bar{x}\pm s$，n=3)

	Sham组	IR 组	H_2S 组
HIF-1α/β-actin	15.33 ± 6.03	45.33 ± 8.39*	78.00 ± 17.35**#
VEGF/β-actin	55.00 ± 3.00	74.33 ± 3.79*	137.67 ± 15.50**##

注：*，$P<0.05$，与 Sham 组比较；**，$P<0.01$，与 Sham 组比较。#，$P<0.05$，与 IR 组比较；##，$P<0.01$，与 IR 组比较

2.4　各指标相关性分析

心肌组织 HIF-1α 与 VEGF mRNA 和蛋白相对含量相关分析发现，对应两者间呈正相关(分别为 r=0.801，$P<0.01$；r=0.822，$P<0.01$)。IR 组和 H_2S 组的 HIF-1α mRNA 和蛋白相对含量与AI相关分析发现，两者间呈负相关(分别为r=-0.963，$P<0.01$；r=-0.843，$P<0.05$)；IR 组和 H_2S 组的 VEGF mRNA 和蛋白相对含量与 AI 相关分析发现，两者间亦呈负相关(分别为 r=-0.971，$P<0.01$；r=-0.957，$P<0.01$)。

3 讨 论

近年来，H_2S 越来越受到人们的青睐，作为新的气体信号分子，它具有众多特性，如分子量小、能自由通过胞膜、作用可以不依赖于与之对应的膜受体等。在生物体内，H_2S 受体内代谢途径的调控，可由内源性酶催化生成，广泛参与了机体多种生理和病理过程。大多数哺乳动物自身均能产生 H_2S，产生率较高的是心血管系统、肝、肾和脑[1]。大量研究均已证实[2-7] H_2S 具有扩张冠脉、提高心肌灌注、降低心脏前后负荷、调节心功能、减少心肌梗死面积、抗氧化、抑制炎症等功能，但其对 MIRI 的具体保护机制仍未阐明。H_2S 后处理是药物后处理的一种，即在长时间的组织缺血后，于再灌注开始前的几分钟内用药，通过药物干预来缓解器官的 IR 损伤。有文献报道[8]，药物后处理也能够模拟缺血后处理的心肌保护作用，其保护作用机制与缺血后处理相似，但药物后处理更具有临床应用价值，为器官再灌注损伤的治疗提供了新的途径。

HIF-1 是在缺血缺氧条件下哺乳动物组织细胞产生的一种核转录因子，属于转录因子碱性螺旋环螺旋超家族成员，它以异源二聚体形式存在，包括 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚基。其中，HIF-1α 是 HIF-1 的活性亚基和氧调节亚基，在缺氧时广泛表达于各种组织细胞，如肝、肾、肺、脑、心和许多细胞系等，在缺血、缺氧的适应性反应中起核心作用，是公认的内源性保护机制的始动因子和共同途径。在常氧条件下，HIF-1α 亚基在不断合成的同时又不断通过泛素-蛋白酶途径迅速被降解[9]。在低氧条件下，HIF-1α 降解被明显抑制，在细胞浆内逐渐积聚并向细胞核内转移，与 HIF-1β 结合成有活性的 HIF-1 分子，成为缺氧适应反应的一个重要中介因子，在基因转录的调控中起主导作用。缺氧时 HIF-1α 可在缺血区及其周围聚积，并与其下游靶基因 VEGF[10]的缺氧反应元件（Hypoxia response element，HRE）结合，促进 VEGF 转录和表达，并增加缺氧情况下 VEGF mRNA 的稳定性[11]；进一步促使 VEGF 与血管内皮细胞表面的 VEGF 受体结合而产生一系列生物学效应，促进内皮细胞的有丝分裂，血管增生，侧支循环建立，从而使缺血组织血流量增加，提高对缺血缺氧的耐受，减少细胞凋亡与坏死，以达到挽救缺血缺氧区濒死组织的目的。但是，正常心脏组织中的 VEGF 表达较少，缺血缺氧时心肌组织中的 VEGF 表达则明显增加，然而这种短暂的内源性 VEGF 的升高以及后续的血管新生和侧支循环的建立还远远不能满足缺血组织对血氧的需要，因此如何增加缺血区域的血供就成了我们面临的一大难题。已有多项研究证实[9,11-16]在心肌缺血缺氧时，机体一般通过上调 HIF-1α 的表达，进而使其下游靶基因表达增加，从而发挥心肌保护作用。

细胞凋亡是多种心血管疾病发生、发展的细胞学基础，包括心肌细胞、平滑肌细胞以及血管内皮细胞等都存在凋亡现象，这些细胞在各种刺激因子的诱导下参与了心血管疾病的生理病理过程。Fliss 研究发现[17]，细胞凋亡有着重要的病理学意义，可能是再灌注损伤发病机制中的一个重要环节；同时还指出以细胞坏死和凋亡为特征的心肌细胞损伤是 MIRI 的特征之一。心肌细胞凋亡时可出现众多病理特征，如细胞水肿、膜通透性增加、肌纤维断裂、微血管损伤等现象。由此可见，心肌细胞凋亡已成为 MIRI 后影响心脏结构和功能恢复的主要因素。有研究表明[18]，在离体灌流大鼠心脏再灌注初期即可发生心肌细胞凋亡，抑制凋亡有助于心脏功能的恢复。

通过本实验，我们发现 Sham 组心肌组织 AI 较低，IR 组心肌组织 AI 较 Sham 组明显升高（$P<0.01$），提示 IR 能促进心肌组织中心肌细胞凋亡；而 H_2S 组心肌组织 AI 较 IR 组显著降低（$P<0.01$），这提示 H_2S 后处理能明显抑制心肌细胞凋亡。进一步实验还发现，Sham 组心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF 的表达较少；缺血再灌注损伤后，二者表达水平上调；但同 IR 组比较，H_2S 组 HIF-1α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平明显增多，提示 H_2S 后处理能显著增强 IR 损伤心肌组织中 HIF-1α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达；同时，通过各指标相关性分析发现，HIF-1α 与 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达呈正相关（分别为 $r=0.801$，$P<0.01$；$r=0.822$，$P<0.01$），提示 HIF-1α/VEGF mRNA 和蛋白表达的上调具有一致性；而 HIF-1α/VEGF mRNA 和蛋白高表达与心肌组织 AI 均成负相关（分别为 $r=-0.963$，$P<0.01$；$r=-0.843$，$P<0.05$ 和 $r=-0.971$，$P<0.01$；$r=-0.957$，$P<0.01$），这提示 HIF-1α/VEGF 的高表达可明显抑制心肌细胞凋亡，进而缓解 MIRI。

由此可见，H_2S 后处理可促进 HIF-1α/VEGF 的高表达，对 MIRI 诱导的心肌细胞凋亡有抑制作用。当然，H_2S 作为新的气体信号分子，有望为预防和治疗 MIRI 的开辟一条崭新的途径，但其心肌保护作用及其相关机制等问题还有待更深层次的研究。

参 考 文 献

[1] Doeller J E, Isbell T S, Benavides G, et al. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues[J]. Anal Biochem, 2005, 341(1): 40-51.

[2] Pan T T, Feng Z N, Lee S W, et al. Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2006, 40(1): 119-130.

[3] Bian J S, Yong Q C, Pan T T, et al. Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(2): 670-678.

[4] Hu X, Li T, Bi S, et al. Possible role of hydrogen sulfide on the preservation of donor rat hearts[J]. Transplant Proc, 2007, 39 (10): 3024-3029.

[5] Zhang Z, Huang H, Liu P, et al. Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening KATP channels[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2007, 85(12): 1248-1253.

[6] Zhu Y Z, Wang Z J, Ho P, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats[J]. J Appl Physiol,

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)08-0936-04

雄黄抗人肝癌 BEL-7402 细胞作用

黄姣娥[1],戴支凯[2]

(桂林医学院 1. 护理学院护理学实验教学中心;2. 药学院药理学教研室,桂林 541004)

【摘 要】目的:观察雄黄体外抗人肝癌 BEL-7402 细胞作用和作用机制。方法:采用 MTS 法和细胞克隆实验法观察雄黄对 BEL-7402 细胞增殖的影响,应用 PI/Hoechest33258 双染法和流式细胞仪检测细胞凋亡,荧光分光光度计检测细胞内钙和线粒体膜电位。结果:与阴性对照组比,雄黄能剂量依赖性地抑制 BEL-7402 细胞的生长和克隆形成。雄黄作用后,BEL-7402 细胞出现了凋亡形态学改变如染色质浓缩等;流式细胞仪检测显示,雄黄能剂量依赖性地诱导细胞凋亡,其中,225 μg/ml 雄黄引起 BEL-7402 细胞凋亡的百分率为(28.6±4.6)%。与阴性对照组比,雄黄作用后,BEL-7402 细胞的细胞内钙升高和线粒体膜电位降低。结论:雄黄具有一定的抗肿瘤作用,其作用机制与升高细胞内钙、降低细胞线粒体膜电位并诱导细胞凋亡有关。

【关键词】雄黄;人肝癌细胞系 BEL-7402;抗肿瘤作用

【中国图书分类法分类号】R961 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-14

Anticancer effect of realgar on human hepatocarcinoma cell line BEL-7402

HUANG Jiao-e[1], DAI Zhi-kai[2]

(1. Nursing Experimental Teaching Center of Nursing College; 2. Department of Pharmacology, Pharmaceutical College, Guilin Medical College)

【Abstract】*Objective*: To investigate anticancer effect of realgar on human hepatocarcinoma cell line BEL-7402 *in vitro*. *Methods*: MTS assay and colony formation assay were used to elucidate the antiproliferative effect of realgar on BEL-7402 cells. PI/Hoechest33258 double dying and flow cytometer were carried out for cell apoptosis detection. Intercellular calcium concentration and mitochondrial membrane potential were detected using spectrofluorophotometer. *Results*: Realgar inhibited cell growth and colony formation of BEL-7402 cells in a dose-dependent manner when comparing with control group. Morphological changes chromatin condense of cell apoptosis were observed in realgar treated BEL-7402 cells, and a dose-dependent apoptosis was

作者介绍:黄姣娥(1971-),女,讲师,研究方向:中药药理。

通信作者:戴支凯,男,副教授,Email: dzhk110@126.com。

2007,102(1):261-268.

[7] Pan L L, Liu X H, Gong Q H, et al. S-Propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in H9c2 cells involved in a hydrogen sulfide-dependent mechanism[J]. Amino Acids, 2011, 41(1): 205-215.

[8] Lu J, Zang W J, Yu X J, et al. Effects of postconditioning of adenosine and acetylcholineon the ischemic isolated rat ventricular myocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 549(1-3): 133-139.

[9] Chun Y S, Kim M S, Park J W. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha[J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(5): 581-588.

[10] Semenza G L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(19-20): 853-859.

[11] Liu L X, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelia growth factor mRNA by hypoxia inducible factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(4)908-914.

[12] Semenza G L. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents [J]. Drug Discov Today, 2007, 12(19-20): 853-859.

[13] Date T, Mochizuki S, Belanger A J, et al. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(2): C314-C320.

[14] Parisi Q, Biondi-Zoccai G G, Abbate A, et al. Hypoxia inducible factor-1 expression mediates myocardial response to ischemia late after acute myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2005, 99(2): 337-339.

[15] Tipoe G L, Lau T Y, Nanji A A, et al. Expression and functions of vasoactive substances regulated by hypoxia-inducible factor-1 in chronic hypoxemia[J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Cbem, 2006, 4(3): 199-218.

[16] Zampino M, Yuzhakova M, Hansen J, et al. Sex-related dimorphic response of HIF-1alpha expression in myocardial ischemia[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(2): H957-H964.

[17] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. Circ Res, 1996, 79(5): 949-956.

[18] Musat-Marcu S, Gunter H E, Jugdutt B I, et al. Inhibition of apoptosis after ischemia-reperfusion in rat myocardium by cycloheximide[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(5): 1073-1082.

(责任编辑:关蕴良)