基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001429

柿叶提取物减轻大鼠心梗后心肌细胞凋亡和心室重塑相关机制研究

黄永洪[1],汪　浩[2],考国营[2],肖　骏[2],张　颖[2]

（1. 重庆市第六人民医院心内科,重庆　400060;2. 重庆市急救医疗中心心内科,重庆　400014）

【摘　要】**目的**:探讨大鼠心梗模型下柿叶提取物对心室重塑的影响及相关机制。**方法**:用 24 只 Sprague Dawley 大鼠结扎左冠状动脉前降支制作心肌梗死大鼠模型,随机分为心肌梗死组(n=8)、柿叶提取物组(n=8)、假手术组(n=8)。6 周后,用 TUNEL 法测定心肌细胞凋亡,免疫印迹法检测心肌 Fas、Caspase-3 蛋白含量,并测定大鼠血流动力学参数和左心室质量指数。**结果**:柿叶提取物组、心肌梗死组左心室质量指数分别为 2.417 ± 0.053、2.514 ± 0.101(F=136.762,P=0.011),明显低于心肌梗死组;柿叶提取物组、心肌梗死组 Fas 分别是 0.342 ± 0.058、0.585 ± 0.059(F=163.991,P=0.000);柿叶提取物组、心肌梗死组 Caspase-3 蛋白水平分别是 0.124 ± 0.019、0.478 ± 0.079(F=183.553,P=0.000),明显低于心肌梗死组。柿叶提取物组、心肌梗死组心肌细胞凋亡指数分别是 1.198 ± 0.171、0.507 ± 0.132(F=93.023,P=0.000),明显低于心肌梗死组。柿叶提取物组左心室舒张末期压(left ventricular end diastolic pressure,LVEDP)明显降低(F=347.661,P=0.000),左心室收缩压(left ventricular systolic pressure,LVSP)明显增加(F=444.949,P=0.000)。**结论**:心肌细胞凋亡参与心肌梗死后心室重塑过程,柿叶提取物可能通过减少凋亡相关蛋白表达抑制心肌细胞凋亡从而预防心室重塑,改善心肌梗死后心脏收缩功能。

【关键词】柿叶提取物;心室重塑;细胞凋亡;心肌梗死

【中图分类号】R544.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-03-19

Alleviation of persimmon leaf extract on post-infarction cardiomyocyte apoptosis and myocardial remodeling in rats

Huang Yonghong[1], *Wang Hao*[2], *Kao Guoying*[2], *Xiao Jun*[2], *Zhang Ying*[2]

(*1. Department of Cardiology, the Sixth People's Hospital of Chongqing;*

2. Department of Cardiology, Chongqing Emergency Medical Center)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect and mechanism of persimmon leaf extract on apoptosis-related protein dependent signal pathway mediated myocardial remodeling after myocardial infarction in rats. ***Methods***: Twenty-four Sprague Dawley rats were established as myocardial infarction model by ligating the left anterior descending coronary artery and were randomized into three groups: myocardial infarction group(n=8), persimmon leaf extract administration group(n=8), sham-operated group(n=8). After six weeks, cardiomyocyte apoptosis was measured by TUNEL, Fas and Caspase-3 protein expression was detected by Western blot and hemodynamics and left ventricular mass index(LVMI) of rats were measured. ***Results***: The LVMI in the persimmon leaf extract group (2.417 ± 0.053) was lower than that in the myocardial infarction group(2.514 ± 0.101)(F=136.762, P=0.011). The Fas in the persimmon leaf extract group and the myocardial infarction group were 0.342 ± 0.058, 0.585 ± 0.059, respectively(F=163.991, P=0.000). The level of Caspase-3 protein in the persimmon leaf extract group(0.124 ± 0.019) was significantly lower than that in the myocardial infarction group(0.478 ± 0.079)(F=183.553, P=0.000). The index of myocardial apoptosis in the persimmon leaf extract group (1.198 ± 0.171) was significantly lower than that in the myocardial infarction group(0.507 ± 0.132)(F=93.023, P=0.000). In the persimmon leaf extract group, the LVEDP was decreased significantly(F=347.661, P=0.000) and the LVSP was increased significantly (F=444.949, P=0.000). ***Conclusion***: Cardiomyocyte apoptosis is involved in myocardial remodeling after myocardial infarction. Persimmon leaf extract can prevent myocardial remo-deling and improve post-infarction systolic function by reducing the expression of apoptosis-related protein and inhibiting the cardiomyocyte apoptosis.

【Key words】persimmon leaf extract; myocardial remodeling; apoptosis; miocardial infarction

作者介绍:黄永洪,Email:358485864@qq.com,
研究方向:冠心病的基础与临床研究。

通信作者:张　颖,Email:zhangying685150@126.com。

基金项目:重庆市卫生计生委医学科研计划资助项目(编号:2015MSXM218)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1707.042.html (2017-11-28)

心室重塑是各种病因心脏病发展到心力衰竭的必然之路。近来研究表明，心肌细胞的肥大和间质纤维化是心室重塑的必然进程，同时伴有调控心肌细胞凋亡相关基因异常表达，导致心肌细胞凋亡，心力衰竭时心肌细胞凋亡尤其明显。心室重塑的分子生物学机制研究，将为减缓心肌细胞凋亡、治疗心力衰竭及恢复心功能提供新思路。柿叶提取物中含有黄酮、有机酸和香豆素类等化学活性成分，有抗炎、抗氧化、改善血管平滑肌功能、降压、降脂、改善血流动力学等作用，目前已广泛应用于心脑血管病的治疗[1-3]，但其作用机制尚需进一步阐明。本实验通过观察柿叶提取物对心肌梗死后大鼠心肌细胞凋亡及与细胞凋亡相关的 Fas、Caspase-3 蛋白表达的影响，探讨心室重塑的细胞学基础及柿叶提取物防治心肌梗死后心肌细胞凋亡、重塑的药物作用机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所，DAB 显色试剂盒、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司，兔抗大鼠 Fas 及 Caspase-3多克隆抗体购自 Santacruz 公司，细胞凋亡检测试剂盒、蛋白酶 K 购自美国罗氏公司。柿叶提取物采用由广州白云山和记黄埔中药有限公司生产的脑心清片。

1.2 心肌梗死模型复制

24 只 SD 大鼠，雌雄不限，体质量 210~230 g，购自南京市青龙山动物中心，随机分为 3 组：假手术组（Sham 组）、心肌梗死组（AMI 组）、柿叶提取物干预组（PLE 组）。AMI 模型的建立：自左锁骨中线纵向切开皮肤约 2 cm，在第 4 肋间分离肌层暴露心脏，在左心耳与肺动脉圆锥之间下方 2 mm 处结扎左冠状动脉前降支，观察左心室壁颜色和心电图，若结扎区心室壁变为暗红色，心电图 V1、V2、V3 导联即刻出现宽大 QRS 波、病理性 Q 伴 ST 段抬高，并持续 30 min 为结扎成功的标志[4]，Sham 组只穿线不结扎。PLE 组于术后第 1 天起，每天将柿叶提取物[100 mg/(d·kg)]溶于自来水中给心肌梗死的大鼠灌胃，Sham 组、AMI 组饮用等量自来水，相同照明时间。3 组术后连续 3 d 在腹腔内注射青霉素 20 万单位预防感染。喂养 6 周后取材。

1.3 指标检测

3 组 SD 大鼠 6 周后腹腔注射麻醉剂，在大鼠颈部腹侧偏右切开皮肤，在胸锁乳突肌内侧分离颈总动脉 1.5 cm，插入已准备好的左室导管，用丝线轻轻扎动脉壁于导管上，稳定后记录平均动脉血压（mean arterial blood pressure，MAP）和心率（heart rate，HR），然后继续插入导管至左心室，导管会随着心脏搏动而明显抖动，稳定后记录左心室收缩压（left ventricular systolic pressure，LVSP）和左心室舒张末期压（left ventricular end diastolic pressure，LVEDP）。迅速开胸取出心脏，盐水洗净，沿冠状沟剪掉左右心房，紧贴室间隔右侧剪下右心室游离壁，剩余部分滤纸吸干，用电子天平称重剩余部分质量为左心室质量，计算左心室质量指数（left ventricular mass index，LVMI）。沿左室最宽处将其分为两部分，一部分放入 10%中性福尔马林固定 24 h，常规脱水、透明石蜡包埋、制作切片，余下部分经液氮速冻后-80 ℃冰箱保存，用于 Fas 及 Caspase-3 蛋白免疫印迹实验。

1.3.1 心肌细胞凋亡检测 采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法（TUNEL 法）对心肌标本进行检测，按试剂盒实验步骤操作，凋亡心肌细胞核呈深浅不一的棕褐色。每张切片随机取 5 个视野，在 200×高倍镜下计凋亡细胞数及细胞总数，算出凋亡指数（apoptosis index，AI），凋亡指数=凋亡细胞核数目/总细胞核数目。

1.3.2 免疫印迹法分析 Fas 及 Caspase-3 蛋白表达 称取约 200 mg 组织在冰浴下充分研磨后加入 1.0 mL 细胞裂解液孵育 30 min，组织匀浆后 4 ℃离心，12 000 g/min 离心 10 min，上清液即所含要测定的蛋白样品。将所有蛋白样品调至等浓度 200 mg/L 上样，把聚丙烯酰胺变性凝胶中的蛋白质电泳转移到硝酸纤维素膜上。放于封闭液中缓慢摇动 1 h，分别加一抗于室温下摇动 2 h，辣根过氧化物酶标记二抗于室温下摇动 1 h，DAB 显色，以凝胶成像系统扫描，Quantity One 1-D 5.4.1 图象分析软件分析图片，总的光密度值作为衡量 Fas 和 Caspase-3 相对含量的指标，重复实验 3 次。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 21.0 软件对所有数据进行统计学分析，计量资料用以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。运用单因素方差分析判断多组间正态计量资料是否存在差异，在总的统计学存在差异的情况下，组间两两分析采用 LSD-t 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 解剖学和血流动力学

与 Sham 组相比：AMI 组和 PLE 组的大鼠左心室质量指数（F=136.762，P=0.011）、LVEDP（F=347.661，P=0.000）明显增加，LVSP（F=444.949，P=0.000）明显降低。PLE 组和 AMI 组相比：左心室质量指数（P=0.000）、LVEDP（P=0.000）明显降低，LVSP（P=0.000）明显增加。PLE 组改善了心室重塑，对HR（F=19.669，P=0.370）、MAP（F=17.850，P=0.147）无明显影响，见表 1。

2.2 心肌细胞凋亡指数

柿叶提取物能明显抑制术后心肌细胞的凋亡：TUNEL 染色结果显示，AMI 组与 Sham 组比较，AI 明显升高（P=0.000）；PLE 组 AI 与 AMI 组比较明显下降（F=93.023，P=0.000），结果如表 2、图 1 所示；凋亡心肌细胞核呈棕黄色，主要分布在梗死区周围，结果如图 2 所示。

表 1 柿叶提取物对 LVMI、血流动力学的影响（n=8）

Tab.1 Effects of persimmon leaf extract on LVMI, hemodynamics and CVF（n=8）

组别	LVMI	HR	MAP	LVSP	LVEDP
Sham 组	1.973 ± 0.036^{ab}	400.625 ± 14.381^{ab}	127.875 ± 3.044^{ab}	166.312 ± 2.080^{ab}	0.542 ± 0.173^{ab}
PLE 组	2.417 ± 0.053^{a}	437.500 ± 12.739	112.500 ± 1.690	133.064 ± 2.603^{a}	2.420 ± 0.430^{a}
AMI 组	2.514 ± 0.101^{b}	444.375 ± 17.500	116.500 ± 8.569	125.136 ± 3.825^{b}	5.461 ± 0.458^{b}
F 值	136.762	19.669	17.850	444.949	347.661
P 值	0.011	0.370	0.147	0.000	0.000

注：a，与 AMI 组比较，P<0.05；b，与 PLE 组比较，P<0.01

表 2 柿叶提取物对细胞凋亡、Fas、Caspase-3 蛋白含量的影响（n=8）

Tab.2 Comparison of persimmon leaf extract on cardiomyocyte apoptosis, Fas and Caspase-3 protein（n=8）

组别	Fas/β-actin	Caspase-3/β-actin	AI（%）
Sham组	0.126 ± 0.040	0.055 ± 0.011	0.296 ± 0.103
AMI组	0.585 ± 0.053^{c}	0.478 ± 0.079^{c}	1.198 ± 0.171^{c}
PLE组	0.342 ± 0.058^{ab}	0.124 ± 0.019^{ab}	0.507 ± 0.132^{ab}
F 值	163.991	183.553	93.023
P 值	0.000	0.000	0.000

注：a，与 Sham 组比较，P=0.000；b：与 AMI 组比较，P = 0.0 0 0；c：与 Sham 组比较，P = 0.000

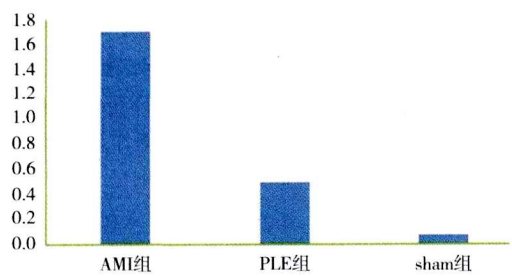
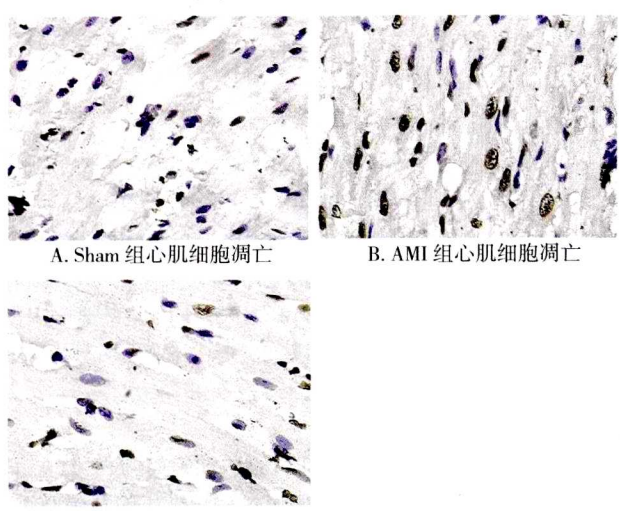


图 1 柿叶提取物对心肌细胞凋亡的影响(细胞凋亡指数)

Fig.1 Effects of persimmon leaf extract on cardiomyocyte apoptosis(apoptosis index)



A. Sham 组心肌细胞凋亡　B. AMI 组心肌细胞凋亡

C. PLE 组心肌细胞凋亡

图 2 柿叶提取物对心肌细胞凋亡的影响

Fig.2 Effects of persimmon leaf extract on cardiomyocyte apoptosis

2.3 Fas 和 Caspase-3 蛋白表达

Western blot 结果显示，与 Sham 组比较，AMI 组心肌组织中 Fas 及 Caspase-3 蛋白表达明显增强（F=163.991，P=0.000）；PLE 组与 AMI 组比较，Fas 及 Caspase-3 蛋白表达明显降低（F=183.553，P=0.000），结果如图 3 所示。

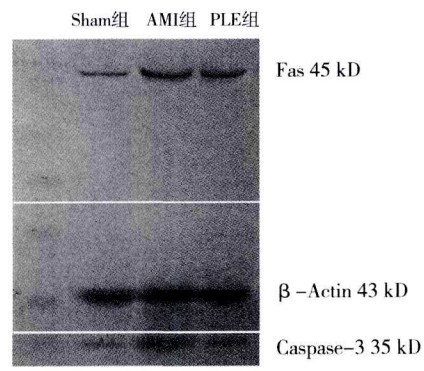


图 3 柿叶提取物对 Fas、Caspase-3 蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of persimmon leaf extract on Fas and Caspase-3 protein expression

3 讨 论

心室重塑是各种病因心脏病发展到心力衰竭的必然之路。心室重塑导致心脏腔室扩大，心脏质量增加，心室壁的顺应性降低，舒张功能减退；心室重塑还影响心肌细胞力的产生和传递，导致收缩功能受到损害，最后发展为难治性心力衰竭[5]。心室重塑中出现心肌细胞肥大和间质纤维化，与心肌细胞凋亡和相关基因表达异常相关。细胞凋亡是一种具有生理性、选择性的程序性死亡，在许多组织的细胞生长、结构调控中起重要作用。目前已肯定心肌细胞凋亡是多种病因所致，是左室肥厚形成以及心肌肥厚向心力衰竭转化的重要病理生理学基础之一[6-10]。

基因调控的细胞程序性死亡导致细胞凋亡，涉及一系列基因的激活、表达和调控。作为一种重要

的促凋亡基因，Fas 基因易受活性氧族的激活而促进细胞凋亡。Fas 基因表达的 Fas 蛋白是重要的促凋亡因子，Fas 蛋白与 Fas 配体（FasL）结合后，在氧化应激条件下可启动凋亡程序，在体内直接激活细胞凋亡的死亡信号转导系统，递次激活 Fas 相关死亡结构域蛋白（FADD）的死亡效应区，并同时结合 Caspase-8 效应蛋白，Caspase-8 再顺序激活其下游的效应蛋白 Caspase-3，诱导细胞凋亡。Caspase-3 是凋亡信号级联转导途径下游的关键性效应蛋白，是细胞启动凋亡程序的效应分子。作为细胞凋亡程序中的关键蛋白酶，在氧化应激条件下，Caspase-3 被激活后可以激活脱氧核糖核酸酶（CAD），触发DNA 降解，诱发细胞凋亡。抑制 Caspase-3 酶活性或拮抗 Caspase-3 功能均可使细胞凋亡程序受抑。所以细胞是否发生凋亡，关键在于细胞质中活化 Caspase-3 的表达量[11-13]。

随着医学技术的不断进步，肺叶提取物对心脑血管影响的研究也有了深层次的发现，具有抗炎、抗氧化、清除氧自由基作用；同时可以改善血管平滑肌、保护血管内皮，有抗血小板聚集作用、抗动脉粥样硬化的作用；对缺血及再灌注损伤有保护作用；还有降压、降血糖等作用[14-16]。国内学者孙懿等[17]研究显示柿叶黄酮能通过提高缺血再灌注离体大鼠心肌细胞中超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、Na^+，K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶的活性，减少天门冬氨酸转氨酶（aspartic transaminase，AST）、肌酸激酶（creatine kinase，CK）、乳酸脱氢酶（lactic dehydrogenase，LDH）的释放以及心肌组织丙二醛（malondialdehyde，MAD）的产生，增强氧自由基清除系统的功能，减轻心肌细胞钙超载，从而减轻心肌细胞变性坏死。黄仁彬[18]研究发现柿叶黄酮可能通过抑制脂质过氧化损伤、保护三磷酸腺苷酶（adenosine triphosphatase，ATP）酶活性、降低游离脂肪酸（free fatty acids，NEFA）含量、提高一氧化碳合成酶（carbon monoxide synthetase，TNOS）活性、改善心功能和抑制心肌细胞凋亡。对犬心肌缺血再灌注损伤具有明显的保护作用。另一研究发现[19]柿叶黄酮可通过降低模型鼠肾组织转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）表达，抑制肾组织纤维化，改善肾脏病理损伤。而 TGF-β 也是已知的促进心肌细胞增殖分化的主要生长因子，在心肌细胞的增殖分化及心肌梗死后心室重塑中促进心肌细胞的肥大起了重要的作用。在本实验中，肺叶提取物也可能通过抑制心肌梗死大鼠 Fas 和 Caspase-3 凋亡蛋白表达（图 3，表 2），从而抑制心肌细胞凋亡（图 1、2），改善心室重塑，使左心室质量降低，并且增加心肌收缩及舒张功能。

实验已证实柿叶提取物具有活血化瘀、抑制血小板聚集、降低血液黏滞度、改善全身微循环、清除氧自由基、改善组织缺氧、抗炎抗氧化等作用，现已广泛应用于临床疾病的治疗，但其应用机制需进一步探讨。肺叶提取物通过多种途径改善心室重塑、改善心功能、保护靶器官、副作用小，值得临床深入研究。

参 考 文 献

[1] Xie C，Xie Z，Xu X，et al. Persimmon（Diospyros kaki L.）leaves：a review on traditional uses，phytochemistry and pharmacological properties[J]. J Ethnopharmacol，2015，163：229-240.

[2] Ashry OM，Hussein EM，Abd El-Azime AS，et al. Restorative role of persimmon leaf（Diospyros kaki）to gamma irradiation-induced oxidative stress and tissue injury in rats[J]. Int J Radiat Biol，2017，93（3）：324-329.

[3] Kim AH，Kim HJ，Ryu R，et al. A mixture of ethanol extracts of persimmon leaf and Citrus junos Sieb improves blood coagulation parameters and ameliorates lipid metabolism disturbances caused by diet-induced obesity in C57BL/6J mice[J]. J Microbiol Biotechnol，2016，26（2）：295-308.

[4] 魏 伟，吴希美，李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京：人民卫生出版社，2010：1052-1053.

[5] Anderson KP，Walker R，Urie P，et al. Myocardial electrical propagation inpatients with idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. J Clin Invest，1993，92（1）：122-140.

[6] 赵智明，郭 寒，焦东东，等. 美托洛尔对异丙基肾上腺素诱导心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学，2010，39（9）：1039-1045.

[7] 郭 佳，肖传实，白 瑞，等. 脂联素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报，2012，28（7）：930-933.

[8] 上官海娟，徐 江，官洪山，等. 当归对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心室重塑的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志，2008，15（1）：39-48.

[9] Prech M，Marszatek A，Schröder J，et al. Apoptosis as a mechanism for the elimination of cardiomyocytes after acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol，2010，10（5）：1240-1245.

[10] Liang T，Zhang Y，Yin S，et al. Cardio-protecteffect of qiliqiangxin capsule on left ventricular remodeling，dysfunction andapoptosis in heart failure rats after chronic myocardial infarction[J]. Am J Transl Res，2016，8（5）：2047-2058.

[11] 高天舒，韩晓晴，尹慧丝. 补中益气汤对甲状腺功能减退大鼠心肌细胞凋亡及 Fas，FasL 和 Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. 中国实验

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001448

GRASP65的表达对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响

易永芬[1]，张婉玉[1]，彭豆豆[1]，罗　祎[2]

（1. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心，重庆　400016；
2. 重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆　400016）

【摘　要】目的：探讨高尔基体堆叠蛋白 65（Golgi reassembly stacking protein 65，GRASP65）在体外对人胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响。**方法**：首先，通过 Western blot 和 RT-qRCR 鉴别低分化胃癌细胞 MKN-45、中分化胃癌细胞 SGC-7901、高分化胃癌细胞 MKN-28 和正常胃黏膜细胞 GES-1 中 GRASP65 蛋白和 mRNA 的表达量。然后，用 siRNA 干扰技术通过 Lipofectamine 2000 瞬时转染下调和 MKN-45 细胞中 GRASP65 的表达量。用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染后各组细胞中 GRASP65 的蛋白和 mRNA 表达量以证实转染成功。最后，用 CCK-8、流式细胞术、Transwell 迁移和侵袭实验检测转染后的各组胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的改变。**结果**：Western blot 和 qRT-RCR 结果显示 MKN-45 细胞和 SGC-7901 细胞中 GRASP65 的蛋白和 mRNA 表达量明显高于 MKN-28 细胞和 GES-1 细胞中 GRASP65 蛋白和 mRNA 表达量（$P<0.05$），故选择低分化胃癌细胞 MKN-45 作为实验细胞株来下调 GRASP65 的表达量。qRT-PCR 和 Western blot 结果证明转染成功，转染组 GRASP65 的 mRNA 和蛋白表达量与阴性对照组和空白对照组对比有统计学意义（$P<0.05$）。CCK-8、流式细胞术、Transwell 迁移和侵袭实验均证明，下调 MKN-45 细胞的 GRASP65 的表达量可抑制胃癌细胞 MKN-45 体外增殖、迁移和侵袭能力，并促进细胞凋亡。**结论**：下调 GRASP65 的表达可明显减弱胃癌细胞的体外增殖能力，同时促进胃癌细胞的凋亡、体外侵袭和迁移。

【关键词】GRASP65；siRNA；增殖；凋亡；迁移；侵袭

【中图分类号】R735.2　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2017-03-15

Effect of GRASP65 expression on proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer cells

Yi Yongfen[1], *Zhang Wanyu*[1], *Peng Doudou*[1], *Luo Yi*[2]

(*1. Department of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Cancer, Chongqing Medical University*;
2. Department of Gynaecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of GRASP65 expression on proliferation, apoptosis, migration and invasion of gastric cancer cells in vitro. ***Methods***: First, Western blot and qRT-PCR were carried out in three different differentiated gastric cancer cells (MKN-45, SGC-7901, MKN-28) and normal gastric mucosa cells (GES-1) to test the expression of GRASP65 protein and mRNA. Then, siRNA interference technique was used through Lipofectamine 2000 to transient transfection MKN-45 cells to knock-down GRAPS65 expression. Western blot and qRT-PCR were used to test GRAPS65 expression and confirm transfection success. Finally, CCK-8, flow cytometry, Transwell migration and

作者介绍：易永芬，Email：yiyongfen1953@aliyun.com，
研究方向：肿瘤病理学，
通信作者：罗　祎，Email：smileyi@163.com。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1749.080.html（2017-11-28）

方剂学杂志，2012，18(10)：236-242.

[12] 陈月桥，王　丽，武建华. 细胞凋亡信号传导途径研究进展[J]. 中国实用医药，2007，2(33)：186-187.

[13] Predescu SA，Zhang J，Bardita C，et al. Mouse lung fibroblast resistance to fas-mediated apoptosis is dependent on the baculoviral inhibitor of apoptosis protein 4 and the cellular FLICE-inhibitory protein [J]. Front Physiol，2017，8：128.

[14] 周鑫党，王丽莉，韩　璐，等. 柿叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药，2014，45(21)：3195-3203.

[15] 陈英珠，白卫娜，时　玮，等. 柿叶黄酮对 ApoE 缺失小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性的影响[J]. 中国老年学杂志，2015，35(1)：183-184.

[16] 王明贤，胡思进. 柿叶黄酮对高脂血症大鼠血管内皮细胞功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(13)：242-244.

[17] 孙　懿，谭宏棣，蓝晓步，等. 柿叶黄酮对离体大鼠心脏缺血再灌注损伤的干预作用[J]. 时珍国医国药，2009，20(11)：F0003-0004.

[18] 黄仁彬. 玉郎伞黄酮和柿子叶黄酮对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[D]. 南宁：广西医科大学，2010：62-69.

[19] 马新博，宫汝飞，石学魁，等. 柿叶黄酮对阿霉素肾病鼠肾组织转化生长因子-β1 和结缔组织生长因子表达的影响[J]. 广东医学，2013，34(12)：1809-1812.

（责任编辑：冉明会）