

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.12.015

实验研究

加味丹参饮含药血清对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达的影响

饶春梅^{1,2}, 成细华^{2*}, 任婷^{1,2}, 孙彦波^{1,3}, 彭霞^{1,3}, 黄政德³

(1. 湖南中医药大学研究生院, 湖南省长沙市岳麓区学士路 300 号, 410208; 2. 湖南中医药大学医学院; 3. 湖南中医药大学中医学院)

摘要 目的 探讨加味丹参饮治疗心肌缺血再灌注损伤的可能作用机制。方法 将体外培养的 H9C2 心肌细胞随机分为 6 组, 每组 6 个复孔。空白血清组在含 15% 空白血清培养液中常规培养 29 h; 缺氧预处理组更换缺氧培养液缺氧 20 min, 复氧 20 min, 再缺氧 20 min 后换为空白血清培养液常规培养 24 h, 缺氧 2 h, 再给氧 3 h; 缺氧/复氧组在含 15% 空白血清培养液中常规培养 24 h, 更换缺氧培养液, 缺氧 2 h, 再给氧 3 h; 含药血清组在含 15% 药物血清中常规培养 24 h, 缺氧 2 h, 再给氧 3 h; 含药血清 + 自噬抑制剂组用 3-甲基腺嘌呤 10 mmol/L 预处理 30 min, 余同含药血清组; 含药血清 + 自噬激动剂组用雷帕霉素 100 nmol/L 预处理 30 min, 余同含药血清组。倒置显微镜观察各组心肌细胞生长及形态变化, 比色法检测各组细胞培养上清液中乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率, 透射电子显微镜观察心肌细胞自噬体形态及数量变化, Western blot 法检测各组自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达。结果 与空白血清组比较, 缺氧/复氧组镜下心肌细胞变性坏死程度增加, 电镜下有少量自噬体, 培养液中 LDH 漏出率增加, Beclin1 蛋白水平增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与缺氧/复氧组比较, 含药血清组及含药血清 + 自噬激动剂组镜下心肌细胞变性坏死程度减轻, 电镜下自噬体数量增多, 培养液中 LDH 漏出率显著降低, LC3 II 及 Beclin1 蛋白表达上升 ($P < 0.05$)。结论 加味丹参饮可能通过上调自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达, 增强细胞自噬, 从而保护损伤的心肌细胞。

关键词 心肌缺血; 加味丹参饮; 再灌注损伤; 心肌细胞; 缺氧/复氧损伤; 自噬

心肌缺血后进行及时的再灌注治疗是当前降低心肌梗死范围最有效的治疗策略, 然而再灌注本身可能导致缺血期已有的损伤加重, 或者对细胞及其细胞器造成新的损伤, 此种现象称为缺血再灌注损伤^[1], 它的存在降低了血运重建相关技术的完整获益, 是临床治疗尚未逾越的难题之一。近年来普遍认为自噬与心肌缺血再灌注损伤的发病过程存在着“双刃剑”的相互作用关系^[2], 因此, 通过调节自噬减轻心肌缺血再灌注损伤成为临床上新的治疗靶点。本课题组前期研究发现, 中药复方加味丹参饮对缺血再灌注损伤心肌细胞具有明显的延迟保

护作用, 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、调节自噬等作用^[3-5]。本研究通过体外观察加味丹参饮含药血清对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞自噬及其相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达的影响, 探讨该方治疗心肌缺血再灌注损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和实验动物

H9C2 大鼠心肌细胞株购自中国科学院上海细胞库。清洁级健康雄性 SD 大鼠 40 只, 8 ~ 10 周龄, 体重 250 ~ 280 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: SYXK (湘) 2013-0005。

1.2 药物

加味丹参饮组成: 丹参 20 g, 黄芪 20 g, 赤芍 10 g, 檀香 6 g, 红花 6 g, 当归 6 g, 川芎 6 g 等, 水煎 2 次, 合并煎液, 过滤浓缩至浓度为 2 g/ml, 置

基金项目: 国家自然科学基金 (81373576, 81503565); 湖南省教育厅项目高等学校科学研究项目 (14B136, 14C0872); 湖南省中医药科研计划项目 (201304); 湖南省科技厅一般项目 (2014SK3034); 湖南省研究生科研创新项目 (2016CX28); 湖南省高校科技创新专项支持建设团队

* 通讯作者: 1357655170@qq.com, (0731) 88458710

于 4℃ 冰箱备用。

1.3 主要试剂与仪器

3-甲基腺嘌呤 (3-MA, 批号 S24823-4g)、雷帕霉素 (批号 S17098-400mg) 均购自上海源叶生物科技有限公司; 高糖 DMEM (批号 SH30022.01, Hyclone 公司); 胎牛血清 (货号 10099141, GIBCO 公司); 0.25% 胰酶-EDTA (批号 blz-0193)、青链霉素混合液 (批号 10378)、PBS (批号 blz-0099) 均为 Solarbio 公司产品; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (货号 A020-2, 南京建成生物工程研究所); 兔抗大鼠 LC3 II (货号 3868T) 一抗购自 Cell Signaling Technology 公司; 兔抗大鼠多克隆抗体 Beclin1 (货号 ab62557)、 β -actin (货号 ab8226) 一抗购自 Abcam 公司; PVDF 膜 (货号 10600023)、ECL 化学发光试剂盒 (批号 RPN22323) 均为 Amersham 公司产品。

CO₂ 细胞培养箱 (型号 HF160W, 力康生物医疗科技控股有限公司); 超净工作台 (型号 JB-CJ-2B, 常州普天仪器制造有限公司); 倒置显微镜 (型号 XD-202, 南京江南永新光学有限公司); 低温高速离心机 (型号 5427R, 德国 Eppendorf 公司); 酶标仪 (型号 ELX800, 美国 BioTek 公司); 凝胶成像分析系统 (型号 GelDoc XR System, 美国 Bio-Rad 公司); 蛋白电泳及转膜设备 (型号 Mini-PROTEAN® Tetra Cell 1658001、Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell 170-3930, Bio-Rad 公司); 透射电镜 (型号 H7700, 日立公司)。

1.4 含药血清制备

40 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白血清组和含药血清组, 每组 20 只。含药血清组大鼠给予加味丹参饮 59.28 g/(kg·d) 灌胃, 空白血清组给予等体积蒸馏水灌胃。两组均每日灌胃 2 次, 连续 7 天。末次给药后 1h, 无菌条件下, 腹主动脉插管取血, 室温静置 2h, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清。56℃ 灭活 30 min, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, -80℃ 冰箱保存备用。使用前用 DMEM 培养基稀释成体积分数含药血清。

1.5 缺氧/复氧细胞模型的建立

将 H9C2 大鼠心肌细胞接种于 25 cm² 透气培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基后置于 CO₂ 培养箱, 在 5% CO₂、37℃ 饱和湿度环境中培养, 次日换液, 待细胞汇合率达 80% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液后按 1:3 比例传代, 取对数生长期的细

胞进行实验。参照《药理实验方法学》^[4] 和课题组前期建立模型^[5]: DMEM 培养液用高纯氮气饱和 30 min, 使培养液氧分压低于 4.0 kPa (30 mmHg), 得缺氧培养液。心肌细胞单层换用缺氧培养液后, 培养液内立即充入氮气 (1 L/min 流量) 30 s 以驱除瓶内氧气, 然后塞紧瓶塞密闭培养。缺氧不同时间后可造成心肌细胞不同程度的损害, 按此方法造成心肌细胞缺氧, 缺氧 2 h 后换用正常培养液培养 3 h, 造成再给氧损伤。

1.6 实验药物浓度的筛选

取对数生长期 H9C2 心肌细胞制成单细胞悬液后, 以 5×10^4 个/ml 密度接种于 6 孔板, 每孔 1.5 ml, 贴壁后分为 6 个不同浓度含药血清组即 5%、10%、15%、20%、25%、30% 的 DMEM 培养基, 同时设空白血清组加入等量含正常血清的 DMEM 培养液, 每组 6 个复孔。48 h 后参照文献^[6] 方法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率: 1) 细胞培养液中 LDH 的 OD 值测定: 吸出待测培养孔内的培养液, 以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清后按试剂盒步骤测定各管吸光值 (OD 值); 2) 细胞匀浆中 LDH 的 OD 值测定: 将待测培养孔内的培养液吸出后, 培养孔内加入等量 PBS 液, 用细胞刮板刮取细胞并收集到相应编号的 EP 管内, 在超声波破碎仪上将细胞破碎, 制成细胞匀浆后按试剂盒步骤进行测定各管吸光值 (OD 值); 3) 细胞培养液 LDH 漏出率 (%) = 培养液 OD 值 / (培养液 OD 值 + 细胞匀浆液 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.7 分组及给药

取对数生长期 H9C2 心肌细胞采用随机数字表法分为 6 组, 每组 6 孔。空白血清组: 在含 15% 空白血清培养液中常规培养 29h; 缺氧预处理组: 更换缺氧培养液缺氧 20 min, 复氧 20 min, 再缺氧 20 min 后换为空白血清培养液常规培养 24 h, 缺氧 2 h, 再给氧 3 h; 缺氧/复氧组: 在含 15% 空白血清培养液中常规培养 24 h, 更换缺氧培养液, 缺氧 2 h, 再给氧 3 h; 含药血清组: 在含 15% 药物血清中常规培养 24 h, 缺氧 2 h, 再给氧 3 h; 含药血清 + 自噬抑制剂组: 3-MA 10 mmol/L 预处理 30 min, 余同含药血清组; 含药血清 + 自噬激动剂组: 雷帕霉素 100 nmol/L 预处理 30 min, 余同含药血清组。

1.8 观察指标及方法

1.8.1 心肌细胞生长及形态变化 倒置显微镜下观察各组细胞生长及形态变化并拍照。

1.8.2 心肌细胞培养液中 LDH 漏出率比较 采用

比色法检测,方法同 1.6 中 LDH 漏出率检测方法。

1.8.3 心肌细胞内自噬体形态及数量 收集各组细胞加入 2.5% 戊二醛溶液固定过夜 (4℃),次日用磷酸盐缓冲液洗涤 4 次,15 min/次,1% 锇酸溶液 4℃ 固定 2 h 后梯度丙酮脱水 (50%、70%、90%、100%),依次经渗透、包埋、聚合、切片、染色等步骤后用透射电镜观察自噬体形态及数量多少。

1.8.4 心肌细胞中自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达 采用 Western blot 法检测,收集细胞,加入 RIPA(细胞裂解液)和 PMSF(蛋白酶抑制剂),冰上裂解细胞 30 min 后,4℃、12000 r/min 离心 5 min,收集上清,BCA 法测定蛋白浓度。用 10%~12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,蛋白分离后在冷却的含 20% 甲醇的转移缓冲液中电泳转移至 PVDF 膜。转移后迅速置于 TBS 液中,随后在室温下含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 1 h,洗涤后用相应的一抗按 1:1000 的比例稀释后 4℃ 孵育过夜,脱色摇床洗膜 3 次 (15 min/次),洗涤后用 ECL 化学发光试剂盒在凝胶成像分析系统显影,分析条带灰度值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件处理数据,结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较方差齐时采用单因素方差分析,方差不齐时采用非参数检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度含药血清对 H9C2 心肌细胞培养液中 LDH 漏出率比较

表 1 示,与空白血清组比较,各浓度含药血清组细胞培养液中 LDH 漏出率均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 10% 含药血清组及 15% 含药血清组间比较 LDH 漏出率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但均较 5%、20%、25%、30% 含药血清

表 1 不同浓度含药血清干预心肌细胞后培养液中乳酸脱氢酶漏出率比较 ($\bar{x} \pm s$)

浓度	样本数	乳酸脱氢酶漏出率
空白血清组	6	11.65 ± 1.87
5% 含药血清组	6	28.88 ± 4.31 ** Δ
10% 含药血清组	6	19.90 ± 2.70 *
15% 含药血清组	6	19.74 ± 2.83 *
20% 含药血清组	6	28.92 ± 5.53 ** Δ
25% 含药血清组	6	35.37 ± 5.44 ** Δ
30% 含药血清组	6	45.82 ± 4.74 ** Δ

注:与空白血清组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 10%、15% 含药血清组比较, $\Delta P < 0.01$

组 LDH 漏出率显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),故选用 15% 含药血清为最佳实验浓度。

2.2 各组心肌细胞生长及形态变化

倒置显微镜下,空白血清组细胞贴壁生长,呈梭形,折光性大,培养液中见极少量的细胞悬浮;而缺氧/复氧组镜下见大量细胞悬浮,细胞形态不规则,折光性降低,细胞间空隙增大,胞质中有空泡及颗粒;缺氧预处理组、含药血清组及含药血清 + 自噬激动剂组细胞形态较缺氧/复氧组明显改善,表现为细胞较大部分呈梭形,少量形态不规则,折光性良好,细胞间无明显间隙,胞质中散见少量颗粒样物质,培养液中有少量细胞悬浮;而含药血清 + 自噬抑制剂组细胞形态与缺氧/复氧组相似,可见大量细胞悬浮,细胞间空隙增大,细胞少量呈梭形,较大部分呈不规则形,胞质内有颗粒样物质,细胞折光性降低。

2.3 各组心肌细胞培养液中乳酸脱氢酶漏出率比较

表 2 示,与空白血清组比较,各组细胞培养液中 LDH 漏出率均升高 ($P < 0.05$)。与缺氧/复氧组比较,缺氧预处理组、含药血清组及含药血清 + 自噬激动剂组细胞培养液中 LDH 漏出率均显著降低 ($P < 0.05$),而含药血清 + 自噬抑制剂组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组心肌细胞培养液中乳酸脱氢酶漏出率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	漏出率
空白血清组	6	11.76 ± 2.03
缺氧预处理组	6	17.90 ± 3.95 * Δ
缺氧/复氧组	6	26.37 ± 4.69 *
含药血清组	6	17.97 ± 2.42 * Δ
含药血清 + 自噬抑制剂组	6	25.99 ± 4.54 *
含药血清 + 自噬激动剂组	6	18.32 ± 3.84 * Δ

注:与空白血清组比较,* $P < 0.05$;与缺氧/复氧组比较, $\Delta P < 0.05$

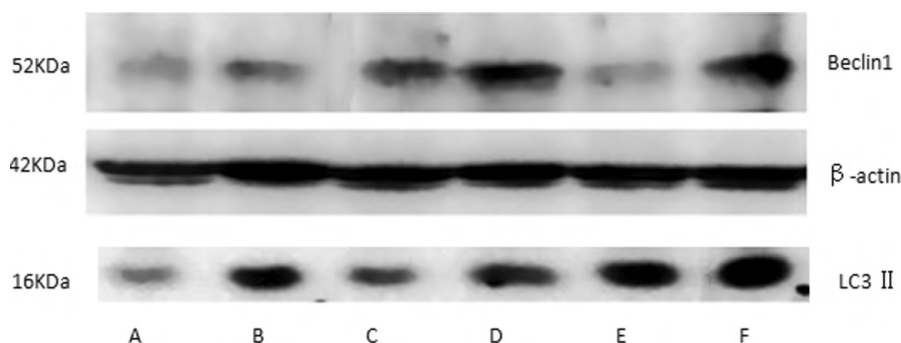
2.4 各组心肌细胞内自噬体形态及数量比较

透射电子显微镜下,空白血清组核仁完整,胞浆内见少量脂肪滴,未见明显自噬体形成;缺氧 2 h,复氧 3 h (缺氧/复氧组) 后胞浆内脂肪滴增多,并出现少量包含胞质内容物的膜状结构 (自噬体);予含药血清预处理及缺氧预处理后自噬体数量增多,其中含药血清组可见包含胞质内容物的双层膜状结构;加用自噬激动剂后自噬体数目进一步增加,予自噬抑制剂后自噬体数量减少,且出现大量脂滴。

表 3 各组心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	LC3 II	Beclin1
空白血清组	3	0.2421 $\pm$ 0.0156	0.2314 $\pm$ 0.0178
缺氧预处理组	3	0.4709 $\pm$ 0.0239 * Δ	0.3146 $\pm$ 0.0209
缺氧/复氧组	3	0.3255 $\pm$ 0.0208	0.4874 $\pm$ 0.0373 **
含药血清组	3	0.5914 $\pm$ 0.0507 * Δ	0.6529 $\pm$ 0.0624 ** Δ
含药血清 + 自噬抑制剂组	3	0.6776 $\pm$ 0.0707 * Δ	0.3413 $\pm$ 0.0142 *
含药血清 + 自噬激动剂组	3	0.9578 $\pm$ 0.1093 * Δ	0.8948 $\pm$ 0.1057 ** Δ

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与缺氧/复氧组比较, $\Delta P < 0.05$



注: A, 空白血清组; B, 缺氧预处理组; C, 缺氧/复氧组; D, 含药血清组; E, 含药血清 + 自噬抑制剂组; F, 含药血清 + 自噬激动剂组

图 1 各组心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 电泳图

2.5 各组心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达比较

表 3 示, 与空白血清组比较, 除缺氧/复氧组外, 其他各组 LC3 II 相对表达量均升高 ($P < 0.05$)。与缺氧/复氧组比较, 缺氧预处理组、含药血清组、含药血清 + 自噬抑制剂组及含药血清 + 自噬激动剂组 LC3 II 相对表达量均升高 ($P < 0.05$)。与空白血清组比较, 除缺氧预处理组外, 其余各组 Beclin1 蛋白相对表达量均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与缺氧/复氧组比较, 含药血清组及含药血清 + 自噬激动剂组 Beclin1 蛋白相对表达量进一步升高 ($P < 0.05$)。各组心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 电泳图见图 1。

3 讨论

自噬是一种普遍存在于真核生物中的进化上高度保守的细胞降解过程, 此过程可缓解多种胁迫条件对细胞的不利作用, 对生物体的存活、分化、发育及内环境稳态的维持具有重要意义, 且广泛参与机体包括感染、肿瘤、神经退行性病变、心肌缺血再灌注损伤等在内的多种病理生理过程^[8]。1976 年 Sybers 等^[9]首次报道了自噬在糖氧剥夺/复糖复氧的离体胎鼠心脏中被诱导。Decker 等^[10]观察到自噬在缺血再灌注过程中上调, 且在再灌注过程中心肌细胞内的许多自噬泡内含有受损伤的线粒体,

提示自噬上调可清除受损线粒体, 从而发挥细胞保护作用。有研究进一步观察到了自噬与缺血预适应间的联系, 证实了缺血预适应引起的心脏保护作用部分经由自噬途径介导^[11-12]。本研究结果表明, 体外培养 H9C2 心肌细胞缺氧 2 h, 再给氧 3 h 后自噬泡增多, 但心肌细胞损伤加重, 予加味丹参饮预处理 24 h 后再予缺氧再给氧处理, 自噬泡结构进一步增多, 并伴随心肌细胞生长及损伤程度改善, 提示加味丹参饮预处理上调自噬水平对缺氧/复氧损伤 H9C2 心肌细胞起到保护作用。此外, 本研究探讨了缺氧预处理在缺氧/复氧模型中的作用, 结果显示造模前予 H9C2 心肌细胞 3 次短暂的缺氧/复氧处理后细胞的损伤程度减轻, 电镜下自噬泡增多, 自噬体标志性蛋白 LC3 II 表达增加, 但增加程度不及含药血清 + 自噬激动剂组及含药血清组, 且 Beclin1 表达较空白血清组无差异, 提示缺氧预处理介导的心肌保护作用部分可能由自噬介导。

自噬是受到基因严密调控的连续动态过程, 自噬体的形成由自噬相关基因及蛋白的介导及调控, LC3 II 定位于前自噬体和自噬体, 随自噬体膜的增多而增多, LC3 II 的含量与自噬泡的数量呈正相关, 在某种程度上反应了细胞的自噬活性^[13]。Beclin1 与 III 型磷脂酰肌醇-3-激酶 (Vps34) 形成 Beclin1/Vps34 复合物, 3-甲基腺嘌呤可通过干扰

Beclin1 复合物中 hVps34 的活性来抑制自噬^[4]。本研究显示,含药血清组 LC3 II 及 Beclin1 蛋白表达较缺氧/复氧组增加,加用自噬激动剂雷帕霉素后表达水平进一步上升,予自噬抑制剂处理后 Beclin1 表达显著下调,此结果与电子显微镜下自噬泡数量变化相一致,表明含药血清预处理可上调自噬水平。

心肌缺血再灌注损伤属于中医学“胸痹”范畴。陈可冀院士提出冠心病的主要病机为“心气瘀阻、血脉不通”,倡导以活血化瘀法为主治疗冠心病^[5]。本实验所用加味丹参饮即以补气活血立法组方,方中以丹参、黄芪补气活血,为君药;当归、赤芍、川芎、生地黄、红花活血化瘀、养血和脉,为臣药;佐以少量芳香温通之檀香,行气通络止痛。本研究结果提示,加味丹参饮预处理对缺氧/复氧损伤 H9C2 心肌细胞具有延迟保护作用,该机制可能与其上调自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达、诱导自噬相关。但本实验所采用的电镜观察自噬泡结构及 Western blot 法检测自噬相关蛋白的方法,虽能较好地阐明自噬的形成,但对自噬活性即自噬通量检测不够深入,仍需进一步完善自噬相关研究方法。

参考文献

- [1] YELLON DM, HAUSENLOY DJ. Myocardial reperfusion injury [J]. N Engl J Med, 2007, 357(11): 1121-1135.
- [2] YI C, MA M, RAN L, ZHENG J, et al. Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation [J]. Science, 2012, 27(336): 474-477.
- [3] 王庆高,黄政德,肖健,等. 加味丹参饮预处理对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的延迟保护作用及对蛋白激酶 C 的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(10): 953-955.
- [4] 李鑫辉,黄政德,喻嵘,等. 加味丹参饮对血瘀证家兔缺

血再灌注损伤心肌细胞凋亡影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(4): 21-23.

- [5] 彭霞,黄政德,成细华,等. 加味丹参饮预处理调控自噬相关基因 Beclin-1 和 Atg5 表达抗大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(7): 20-24.
- [6] 徐叔云,卞如濂. 药理实验方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 45.
- [7] 洪庆涛,宋岳涛,唐一鹏,等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用 [J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(1): 89-92.
- [8] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease. [J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.
- [9] SYBERS HD, INGWALL J, DELUCA M. Autophagy in cardiac myocytes [J]. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab, 1976, 12: 453-463.
- [10] DECKER RS, WILDENTHAL K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes [J]. Am J Pathol, 1980, 98(2): 425-444.
- [11] DOSENKO VE, NAGIBIN VS, TUMANOVSKAYA LV, et al. Proteasomal proteolysis in anoxia-reoxygenation, preconditioning and postconditioning of isolated cardiomyocytes [J]. Pathophysiology, 2006, 13(2): 119-125.
- [12] PARK HK, CHU K, JUNG KH, et al. Autophagy is involved in the ischemic preconditioning [J]. Neurosci Lett, 2009, 451(1): 16-19.
- [13] KLIONSKY DJ, ABDELMOHSEN K, ABEDIN MJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. Autophagy, 2016, 12(1): 1-222.
- [14] PETIOT A, OGIERDENIS E, BLOMMAART EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275(2): 992-998.
- [15] 陈可冀,徐浩. 活血化瘀方药的合理应用与深入研究 [J]. 中日友好医院学报, 2005, 19(6): 323-324.

Impact of Serum Containing *Jiawei Danshen Yin* (加味丹参饮) on Expressions of Hypoxia/ Reoxygenation H9C2 Cardiac Muscle Cell Autophagy Related Protein LC3 II and Beclin1

RAO Chunmei^{1,2}, CHENG Xihua², REN Ting^{1,2}, SUN Yanbo^{1,3}, PENG Xia^{1,3}, HUANG Zhengde³

(1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. Medical School, Hunan University of Chinese Medicine; 3. Chinese Medicine School, Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Jiawei Danshen Yin* (加味丹参饮) in treating cardiac reperfusion injury. **Methods** H9C2 cardiac muscle cells in vitro were randomized into 6 groups, with 6 multiple pores in each group. The blank serum group was cultured in culture medium containing 15% of blank serum for 29 h. The hypoxia preconditioning group was cultured in hypoxia medium for 20 min, and then was given oxygen for 20 min, following another hypoxia culture for 20 min. After then the cells were moved into blank serum medium and routinely cultured for 24 h, following cultured in hypoxic medium for 2 h, and then given oxygen for 3 h. The hypoxia/reoxygenation group was cultured in culture medium containing 15% of blank serum for 24 h, then was moved into

hypoxia medium and cultured in hypoxia condition for 2 h, then in oxygenation condition for 3 h. The serum containing medicine group was cultured in culture medium containing 15% of medicine serum in normal condition for 24 h, and then was in hypoxia condition for 2 h, following in oxygenation condition for another 3 h. The serum containing medicine + autophagy inhibitor group was preconditioned by 10 mmol/L 3-methyladenine for 30 min; the following treatment steps were the same as the serum containing medicine group. The serum containing medicine + autophagy agonist group was preconditioned by 100 nmol/L rapamycin for 30 min; the other treatment steps were the same as the serum containing medicine group. Growth and form changes of cardiac muscle cells in each group were examined with inverted microscope. The leakage rate of lactate dehydrogenase (LDH) in cell culture supernatant in each group was detected with colorimetric method. The form and number changes of myocardial cell autophagosome were examined with transmission electron microscope. The expressions of autophagy related protein LC3 II and Beclin1 in each group were detected with Western blot method. **Results** Compared with that in the blank serum group, the degree of degeneration and necrosis of myocardial cells increased under microscope, there were a few autophagosome under electron microscope, the leakage rate of LDH in medium increased, and the level of Beclin1 protein increased in the hypoxia/reoxygenation group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the hypoxia/reoxygenation group, the degree of degeneration and necrosis of myocardial cells decreased, the number of autophagosome increased under electron microscope, the leakage rate of LDH in medium decreased obviously, and the expressions of LC3 II and Beclin1 protein increased in the serum containing medicine group and the serum containing medicine + autophagy agonist group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Jiawei Danshen Yin* might strengthen autophagy by up-regulate the expressions of autophagy related protein LC3 II and Beclin1 to protect injured cardiac muscle cells.

Keywords ischemia myocardial; *Jiawei Danshen Yin* (加味丹参饮); reperfusion injury; cardiac muscle cell; hypoxia/reoxygenation injury; autophagy

(收稿日期: 2016-12-25; 修回日期: 2017-02-24)

编辑: 邓 媛

(上接第 1042 页)

Investigation of Traditional Chinese Medicine Constitution in 300 Children of Different Ages with Bronchial Asthma

LIU Tongkun, SUN Yanshu, FEI Lijun

(Puyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Henan 457000)

ABSTRACT **Objective** To investigate distribution rules of traditional Chinese medicine (TCM) constitution pattern in children of different ages with bronchial asthma. **Methods** Three hundred children were randomly selected from 874 children with bronchial asthma at clinical remission stage or non acute attack stage. The selected child patients were divided into three age groups: 8 months to 3 years, 3 + years to 6 years, and 6 + to 12 years. Their TCM constitution was judged with questionnaire investigation. The combined condition of constitution and acute onset factors of asthma, as well as the constitution rules were analyzed. **Results** In 300 children with bronchial asthma, there were 67.33% with Qi obstruction constitution, 27.33% with Yang deficiency constitution, and 5.33% with Yin deficiency constitution. Most of the patients were with combined constitution. Among them Yang deficiency and Qi deficiency constitution combined with phlegm and dampness constitution and specific endowment constitution were common in children of 8 months to 3 years old; Qi deficiency with phlegm and dampness constitution, and specific endowment constitution were common in children of 3 + years to 6 years old; Qi deficiency with phlegm and dampness constitution, dampness and heat constitution, and specific endowment constitution were common in children of 6 + to 12 years old. It was also found that the acute onset factors were different in children of different ages with bronchial asthma. **Conclusion** Qi deficiency constitution is more common in children with bronchial asthma. In older child patients, Yang deficiency constitution becomes less common, while Yin deficiency constitution is gradually more popular. In combined constitution, phlegm and dampness constitution, and specific endowment are the most common ones. In older child patients, more children are combined with dampness and heat constitution, and gradually combined more Qi obstruction and blood stagnation constitution.

Keywords bronchial asthma; children; traditional Chinese medicine constitution

(收稿日期: 2017-02-14; 修回日期: 2017-03-22)

编辑: 柴倩云