

# 棉子酚通过干扰氧化应激反应、抑制 JNK/p38 MAPK 信号通路的激活减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤

贾蕾蕾<sup>1,2</sup>, 王爱玲<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究棉子酚(Gossypol)对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用,并对其可能的机制进行初步探讨。方法 SD 雄性大鼠 40 只,随机分成 4 组:空白组、心肌缺血再灌注组(MI/R 组)、Gossypol 高、低剂量组(40、20 mg/L)。采用 Langendorff 法造模,检测 Gossypol 对血流动力学指标的影响及不同时间点各组动物心脏冠脉流出液中心肌酶谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)的含量,检测炎症细胞因子核转录因子(NF)- $\kappa$ B、细胞间黏附分子(ICAM)-1、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 和白介素(IL)-6 生成量,从氧化应激反应、JNK/p38 MAPK 信号通路方面探讨 Gossypol 对早期 MI/R 的保护机制。结果 各组 Gossypol 均可显著改善 MI/R 大鼠的心功能,减少 AST、LDH 释放,增加超氧化物歧化酶的活性,减少丙二醛的产生,减少再灌注的心肌组织中炎症细胞因子生成量。机制研究表明其可能通过清除自由基、抗脂质过氧化、阻断 JNK/p38 MAPK 信号通路途径的激活缓解心脏缺血再灌注所造成的氧化应激损伤和凋亡损伤。结论 Gossypol 对 MI/R 具有保护作用,其机制可能与干扰氧化应激反应及阻断 JNK/p38 MAPK 信号通路途径的激活有关。

**关键词** 棉子酚; 心脏缺血再灌注损伤; 氧化应激反应; JNK/p38 MAPK 信号通路

中图分类号 R 541; R 962

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1424-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.002

号转导通路明显活化,炎症细胞因子大量产生,促进了心肌细胞的凋亡,加重了 MI/R。因此,通过抑制 ROS 产生,阻断 JNK/p38 MAPK 通路的双重作用,可有效减轻 MI/R 后早期的脏器功能损害。

棉子酚(Gossypol)是从棉籽中提取的一种主要多酚成分(图 1),其药理学活性研究<sup>[6]</sup>显示具备“多靶效应”的独特优势,具有显著的抗氧化、抗炎和免疫调节作用。而 Gossypol 对于减轻 MI/R 的作用目前尚未有报道。该研究基于上述基础,旨在通过建立大鼠离体 MI/R 模型,从炎症因子、氧化应激反应及 JNK/p38 MAPK 信号通路方面探讨 Gossypol 对 MI/R 早期心脏损伤的影响及机制。

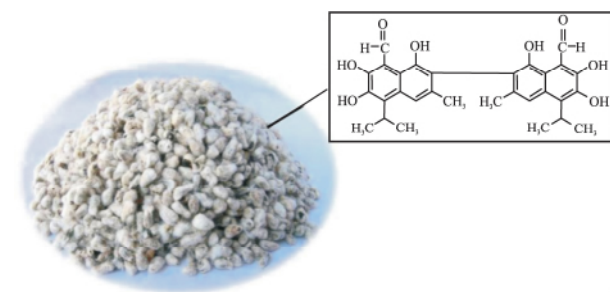


图 1 棉籽及 Gossypol 的化学结构

心脏缺血再灌注损伤(myocardial ischemia/reperfusion injury, MI/R)是临床上多种心血管外科手术的常见并发症。MI/R 的发生和进展中,氧自由基(reactive oxygen species, ROS)大量产生并通过细胞氧化应激反应诱导心肌细胞凋亡、坏死<sup>[1]</sup>。丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路被认为是细胞的存活通道。研究<sup>[2-5]</sup>证明,MI/R 后心肌细胞内 JNK/p38 MAPK 信

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠,重(300 ± 10) g,购自安徽医科大学动物实验中心。

**1.1.2 试剂及来源** Gossypol 购自上海晶纯生化科技股份有限公司;核转录因子  $\kappa$ B (nuclear transcription factor kappa B, NF- $\kappa$ B)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) ELISA 测定试剂盒购自上海拜沃生物科技有限公司;乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、谷草转氨酶(glutamic-oxalacetic transaminase, AST)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,

2017-06-02 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M155)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院心内科,合肥 230022

<sup>2</sup>阜阳市第二人民医院心内科,阜阳 236000

作者简介:贾蕾蕾,女,硕士研究生;

王爱玲,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wangal2014@sohu.com

SOD) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 兔抗人 JNK/p-JNK/p38 MAPK/p38 MAPK 单克隆抗体购自美国 Sanbta Cruz 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 离体心脏 Langendorff 灌流模型制备及动物分组** 灌流模型的制备参考已报道的方法<sup>[7]</sup>。对离体心脏使用 K-H 灌流液灌流 15 min 平衡后, 可进行造模工作。除空白组外, 本实验对于离体心脏首先停灌 25 min, 然后再灌注 30 min, 制备全心缺血再灌注损伤模型。

动物分组: 随机将 40 只成年雄性 SD 大鼠分为 4 组, 包括空白组、MI/R 组、Gossypol 低剂量组 (20 mg/L)、Gossypol 高剂量组 (40 mg/L)。Gossypol 浓度的选择参考文献<sup>[8-9]</sup>报道。除空白组外, 各个实验组在心脏停灌前 15 min 加入各个浓度的含药灌注液, 随后在整个再灌注过程中持续灌注。

**1.2.2 相关血流动力学指标的检测** 采用 BL/420 信号采集系统对再灌注 30 min 后的各实验组血流动力学指标左室内压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室压力最大上升速率 (maximum left ventricular pressure increase rate,  $+dp/dt_{max}$ )、左心室压力下降最大速率 (maximum left ventricular pressure decrease rate,  $-dp/dt_{max}$ ) 进行记录。

**1.2.3 冠脉流出液中 AST、LDH 的检测** 实时取灌流液 (时间点: 给药前 10 min, 再灌注后 5、10、20、30 min) 冻存于  $-80^{\circ}\text{C}$  的冰箱中, 收集完毕后, 采用 LDH、AST 生化试剂盒测定活力, 记录结果。

**1.2.4 心肌组织中 SOD 活性、MDA 含量及炎症因子的检测** 精确称取大鼠心脏组织的重量, 根据大鼠心肌组织的重量按照体积重量比加入 9 倍量的无菌生理盐水, 捻磨, 制成 10% 的心脏组织匀浆, 2 500 r/min 离心 10 min, 加入样本离心, 离心后取上清液, 用生理盐水进行 8 倍稀释后取稀释液 50  $\mu\text{l}$  进行检测。所有操作根据试剂盒说明书要求进行。

**1.2.5 JNK/p38 MAPK 和磷酸化 JNK/p38 MAPK 的表达量的检测** 灌流完毕后, 精确称取左心室缺血心肌 200 mg, 放置到洁净培养皿中, 用手术剪剪碎, 加入预冷的裂解工作液, 于冰浴环境下用玻璃匀浆器上下手动研磨匀浆, 离心, 收集上清, 进行蛋白质定量后电泳, 湿电转膜, 脱脂奶粉配制成 5% 浓度封闭 1 h 后, 加入适量的用 1:200 比例一抗稀释液稀释的一抗抗体密封,  $4^{\circ}\text{C}$  摇床摇荡孵育过夜, 洗

涤, 加入适量的按 1:4 000 比例二抗稀释液稀释的辣根过氧化物酶标记抗体, 在摇床上室温下摇荡孵育 1 h, 显影、定影, 用 Epson V200 扫描仪扫描胶片, 分析结果。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 11.5 软件进行分析, 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间数据比较采用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Gossypol 对大鼠离体 MI/R 血流动力学的影响** MI/R 组大鼠心脏离体灌流 30 min 后, 相对于空白组心脏血流动力学指标明显变化, 其中 LVSP 明显降低、LVEDP 明显增高、 $+dp/dt_{max}$  和  $-dp/dt_{max}$  均明显下降, 说明造模成功。用 Gossypol 高、低剂量预灌注后上述指标均明显改善 ( $F = 34.234, 57.528, 133.172, 64.653, P < 0.05$ )。结果说明 Gossypol 可以减轻大鼠离体 MI/R, 改善受损心肌的舒缩功能。见图 2。

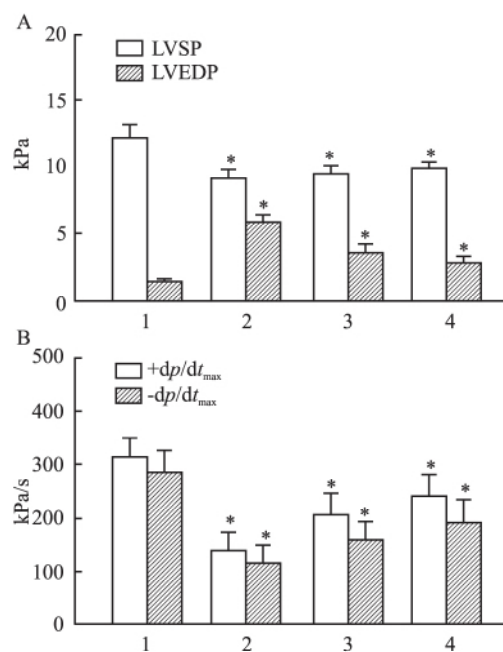


图2 各组大鼠离体 MI/R

30 min 后血流动力学指标变化 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

A: LVSP 和 LVEDP 值; B:  $+dp/dt_{max}$  和  $-dp/dt_{max}$  值; 1: 空白组; 2: MI/R 组; 3: Gossypol 低剂量组; 4: Gossypol 高剂量组; 与空白组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 Gossypol 对心肌酶 AST、LDH 的影响** 通过各个时间点对灌流流出液中心肌酶 AST 检测可以显示, MI/R 组大鼠心肌酶 AST 的活性较空白组显著增加, Gossypol 高、低剂量组再灌注后心肌酶 AST

活性在各时间点显著下降 ( $F_{\text{空白组}} = 73.157, F_{\text{MI/R组}} = 120.326, F_{\text{Gossypol低剂量组}} = 74.627, F_{\text{Gossypol高剂量组}} = 64.382, P < 0.05$ )。灌流流出液中心肌酶 LDH 检测也呈现相同的趋势 ( $F_{\text{空白组}} = 35.482, F_{\text{MI/R组}} = 76.196, F_{\text{Gossypol低剂量组}} = 65.651, F_{\text{Gossypol高剂量组}} = 53.919, P < 0.05$ )。结果说明 Gossypol 预灌注明显减轻心肌细胞的损伤,从而降低心肌酶 AST、LDH 的释放量。见图 3。

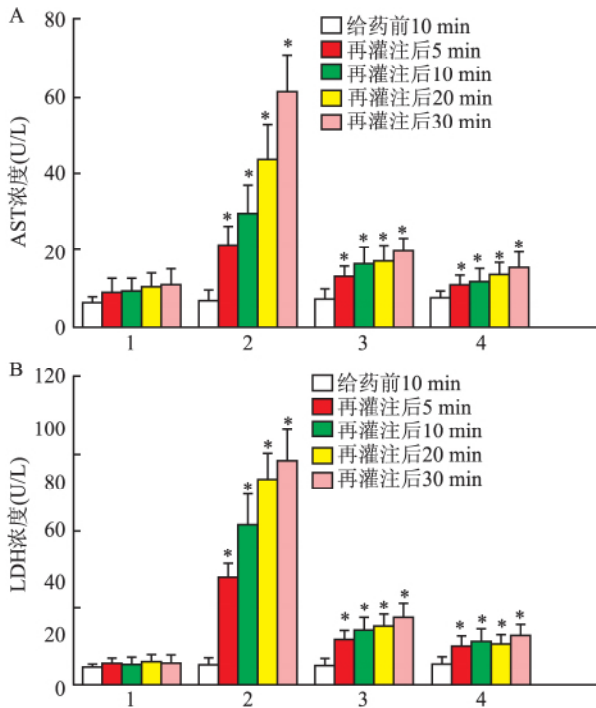


图3 各时间点实验大鼠灌流

流出液中心肌酶 AST、LDH 的变化 ( $n = 10 \bar{x} \pm s$ )

A: AST; B: LDH; 1: 空白组; 2: MI/R 组; 3: Gossypol 低剂量组; 4: Gossypol 高剂量组; 与空白组比较: \*  $P < 0.05$

**2.5 Gossypol 对离体大鼠 MI/R 心肌组织 MDA 含量和 SOD 活性的影响** 研究显示 MI/R 时,心肌组织中 MDA 含量增加,与心肌功能的改变相一致 ( $F = 16.274, P < 0.05$ )。同时,心肌组织中 SOD 活力下降,下降的程度与心肌功能恶化的程度也相一致 ( $F = 24.656, P < 0.05$ )。这说明心肌 MI/R 能够造成心肌组织内 ROS 大量生成积累,使得内源性抗氧化物消耗不断增多,组织细胞清除 ROS 的能力显著下降,进一步加重了心脏损害。在缺血用 Gossypol 预处理,能明显降低心肌组织的 MDA 的含量,增加心肌组织中 SOD 活力,说明 Gossypol 能够抑制由此激发的脂质过氧化反应,增加 ROS 的清除作用,从而减少 ROS 生成,减轻缺血再灌注后的心脏

损伤。见图 4。

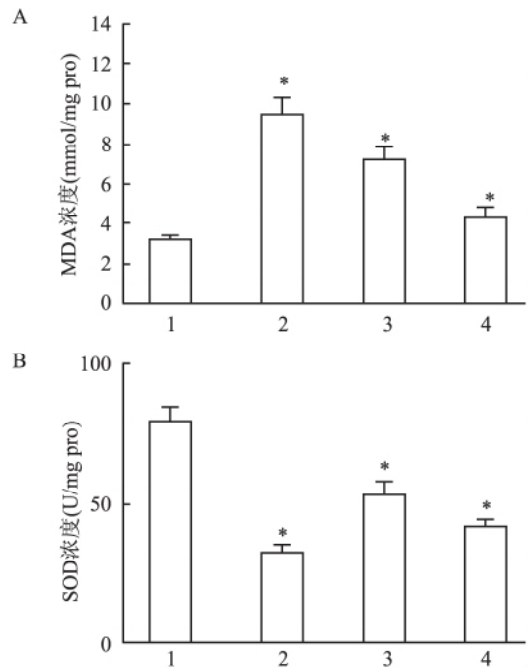


图4 各组心肌组织匀浆 MDA 和 SOD 含量的比较 ( $n = 10 \bar{x} \pm s$ )

A: MDA 含量; B: SOD 含量; 1: 空白组; 2: MI/R 组; 3: Gossypol 低剂量组; 4: Gossypol 高剂量组; 与空白组比较: \*  $P < 0.05$

**2.6 Gossypol 对离体大鼠 MI/R 心肌组织炎症因子产生的影响** 心肌细胞分泌炎症细胞因子  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 ICAM-1 等是反应 MI/R 后发生炎症反应重要标志物。与空白组相比,MI/R 组、Gossypol 低剂量组、Gossypol 高剂量组大鼠心脏组织炎症因子包括  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 ICAM-1 含量均升高 ( $F = 23.876、14.008、21.372、51.067, P < 0.05$ )。表明 MI/R 后早期心肌组织细胞释放大量的炎症细胞因子。对比 MI/R 组、Gossypol 低剂量组、Gossypol 高剂量组,结果显示随着预处理的 Gossypol 的量的增多,炎症细胞因子的释放量呈剂量依赖性减少。见图 5。

**2.7 Gossypol 对离体大鼠 MI/R 心肌组织 JNK/p38 MAPK 和磷酸化 JNK/p38 MAPK 的表达量的影响** 与空白组相比,不同浓度的 Gossypol 预处理的 JNK/p38 MAPK 和磷酸化 JNK/p38 MAPK 的表达均低于 MI/R 组,其中以 Gossypol 高剂量组预处理后 JNK/p38 MAPK 和磷酸化 JNK/p38 MAPK 的表达减少最为明显,提示 Gossypol 可以抑制 JNK/p38 MAPK 的活化,进而减轻由此介导的心肌损伤后的炎症反应与细胞凋亡。见图 6。

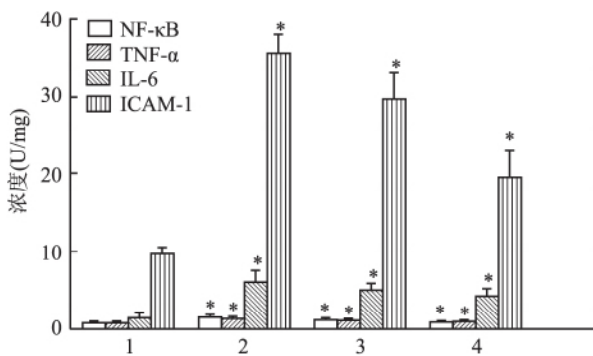


图5 心肌组织炎症因子 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平变化  
1: 空白组; 2: MI/R 组; 3: Gossypol 低剂量组; 4: Gossypol 高剂量组; 与空白组比较: \*  $P < 0.05$

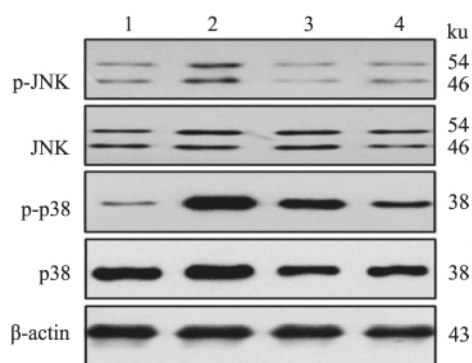


图6 Gossypol 对离体大鼠心肌组织中 JNK 和 p38 MAPK 磷酸化的影响

1: 空白组; 2: MI/R 组; 3: Gossypol 低剂量组; 4: Gossypol 高剂量组

### 3 讨论

MI/R 损伤的主要表征之一是心肌收缩功能低下以及舒张功能不良。在临床上检测心肌舒缩功能的常用指标包括 LVSP、LVEDP 和  $\pm dp/dt_{max}$ 。本实验研究显示,模型组再灌注 30 min 后,血液动力学指标 LVSP 呈现明显降低, LVEDP 则显著增高,与此同时,  $\pm dp/dt_{max}$  值明显下降,说明心肌收缩功能低下,发生了 MI/R 损伤。Gossypol 高、低剂量组 LVSP、LVEDP 和  $\pm dp/dt_{max}$  的值明显改善,说明给药后受损心肌的收舒功能呈恢复的趋势, Gossypol 对 MI/R 损伤具有一定的保护作用。

心肌酶是心肌细胞缺血低氧时发生明显变化的重要标志物,其中 LDH 和 AST 的检测常作为 MI/R 损伤诊断和愈后的指标<sup>[10-12]</sup>。LDH 是心肌细胞中的特异性酶,存在于心肌细胞胞质中,细胞损伤时候会大量释放入血,其外漏程度直接反映 MI/R 损伤程度。AST 是广泛存在于人体组织细胞中的一种

酶,心肌细胞中的含量最多,同 LDH 一样,在心肌损伤时,大量释放入血。本研究结果显示,经 Gossypol 处理的离体大鼠心脏冠脉流出液中 LDH 和 AST 的含量均降低,并呈剂量依赖性,说明 Gossypol 能显著减轻 MI/R 损伤,对心肌细胞有保护作用,进而减少心肌细胞中心肌酶 AST 和 LDH 的释放。

ROS 的强大氧化活性对所有的生物分子都有损伤作用,尤其是通过脂质过氧化损伤细胞最为严重。研究<sup>[13]</sup>表明,心肌缺血时,ROS 大量生成, SOD 水平下降,大量 ROS 通过不饱和脂肪酸作用引发脂质过氧化反应生成过量的 MDA,最终通过多种途径造成细胞结构的破坏,导致 MI/R 损伤的发生。除此之外,ROS 还可促进  $Ca^{2+}$  超载,  $Ca^{2+}$  超载反过来促进自由基的产生,协同导致 MI/R 损伤<sup>[14]</sup>。基于 Gossypol 多羟基的结构,本研究选择 SOD 和 MDA 量的变化评价了心脏缺血再灌注过程中的脂质过氧化及 Gossypol 的抗脂质过氧化作用。结果显示, Gossypol 可提高心肌组织中 SOD 活性,降低 MDA 含量。表明 Gossypol 通过清除 ROS 起到减轻 MI/R 损伤的作用,抗氧化应激反应可能是 Gossypol 对 MI/R 损伤保护作用的机制。

炎症反应在 MI/R 过程中扮演着十分重要的角色。MI/R 时,心肌细胞会分泌趋化因子 MCP 等、炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 等,进而激活相应补体<sup>[15]</sup>。与此同时,黏附因子 ICAM 等在 ROS 和细胞因子表达上调。最终,在细胞因子、趋化因子和黏附因子共同作用下,导致白细胞活化、消耗和补充,进而增强了 ROS 和细胞因子对组织细胞的损伤作用。本研究中,模型组心肌组织中炎症因子 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量均增加,说明 MI/R 过程中出现炎症反应。Gossypol 低剂量组和 Gossypol 高剂量组心肌组织中炎症因子 NF- $\kappa$ B、ICAM-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量均降低,表明 Gossypol 能有效阻止炎症因子引发的炎症级联反应,减轻 MI/R。因此,抗炎作用也可能是 Gossypol 对 MI/R 损伤保护作用的机制之一。

MAPKs 是真核细胞内一组主要包括 p38 MAPK、细胞外调节蛋白激酶(ERK)和 JNK 三种形式的丝/苏氨酸蛋白激酶,其在静息状态时主要散在分布于细胞质,在缺血再灌注、氧化应激、细胞因子等诸多刺激因素作用下,激活后的 MAPKs 信号蛋白转移至细胞核内,与其相应底物结合发生反应,直接作用或通过激活 NF- $\kappa$ B、AP-1 并与特异 DNA 序列结合,从而启动转录过程,将细胞外刺激信号传导入

核,调节效应基因的表达及蛋白质合成,参与组织炎症反应、细胞增殖与凋亡和免疫反应等病理生理过程。其形成相对独立而又相互联系的信号传递网络。目前通常推测 ERK 通过激活抗凋亡信号转导通路促进细胞存活,而 JNK 和 p38 MAPK 活化与细胞死亡有关<sup>[2-3]</sup>。本研究结果显示,不同浓度 Gossypol 预处理组的 JNK/p38 MAPK 和磷酸化 JNK/p38 MAPK 的表达均低于空白组,其中以 Gossypol 高剂量组预处理后 JNK/p38 MAPK 和磷酸化 JNK/p38 MAPK 的表达减少最为明显,提示 Gossypol 可以抑制 JNK/p38 MAPK 的活化,进而减轻由此介导的心肌细胞损伤后炎症反应与细胞凋亡。

MI/R 涉及活性 ROS 的产生、钙超载、中性粒细胞浸润、细胞凋亡以及血管内皮损伤等多种病理生理学过程,并且有众多炎症介质和免疫因子的参与,其机制十分复杂。本实验研究表明 Gossypol 通过改善离体心脏血流动力学,降低受损心肌酶的释放,提高心肌组织中 SOD 活性,降低 MDA 含量,同时抑制 JNK/p38 MAPK 信号通路的激活,抑制炎症因子的释放,从而发挥对 MI/R 损伤心肌的保护作用。这一研究结果首次揭示了 Gossypol 对缺血心肌的保护作用及其机制,为以 Gossypol 作为先导化合物的药物开发和临床应用提供了实验依据。

### 参考文献

[1] Ozgur R, Turkan I, Uzilday B, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(5): 1377-90.

[2] Hommes D W, Peppelenbosch M P, van Deventer S J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets [J]. *Gut*, 2003, 52(1): 144-51.

[3] Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1754(1-2): 253-62.

[4] Pandya N, Santani D, Jain S. Role of mitogen-activated protein (MAP) kinases in cardiovascular diseases [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2005, 23(3): 247-54.

[5] Gerits N, Kostenko S, Moens U. *In vivo* functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice [J]. *Transgenic Res*, 2007, 16(3): 281-314.

[6] Tian X, Ruan J, Huang J, et al. Gossypol: phytoalexin of cotton [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(2): 122-9.

[7] 王小晓,王幼平,余海滨,等. 大鼠 Langendorff 离体心脏灌流模型的制备经验及其影响因素分析 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(6): 184-6.

[8] 苏晓灵,程彦斌,王 嵘,等. 维拉帕米对缺血再灌注损伤心肌保护机制的探讨 [J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19(7): 412-5.

[9] Bian F, Jiang H, Man M, et al. Dietary gossypol suppressed postprandial TOR signaling and elevated ER stress pathways in turbot (*Scophthalmus maximus L.*) [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 312(1): E37-E47.

[10] 吴 庆. 急性心肌梗死、心绞痛患者血清心肌酶谱分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2002, 37(2): 163-4.

[11] Parihar P, Parihar M S. Metabolic enzymes dysregulation in heart failure: the prospective therapy [J]. *Heart Fail Rev*, 2017, 22(1): 109-21.

[12] 杨照新,常鹏环,姚茂忠. cTnI、AST 及 CK 在鉴别诊断大鼠骨骼肌与心肌损伤应用价值的比较 [J]. *海南医学院学报*, 2013, 19(9): 1165-7.

[13] Ansley D M, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart [J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 232-41.

[14] 张艳君,张 敏,郑 梅,等. 氧化应激对肌浆网钙摄取功能的影响 [J]. *河北医科大学学报*, 2007, 28(5): 324-8.

[15] Ruparelia N, Chai J T, Fisher E A, et al. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(3): 133-44.

## Gossypol alleviates isolated heart ischemia/reperfusion injury in rats by interfering with the oxidative stress response and suppressing the JNK/p38 MAPK signal pathway

Jia Leilei<sup>1,2</sup>, Wang Ailing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Dept of Cardiology, The Second People's Hospital of Fuyang, Fuyang 236000)

**Abstract Objective** To investigate the protective effect and possible mechanism of Gossypol on isolated myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods** 40 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: Blank group, heart ischemia reperfusion group (MI/R group), high and low-dose Gossypol group (40,

网络出版时间: 2017-7-29 12:00 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.003.html>

## miRNA-331 对大肠癌细胞 HCT116 生物学功能的影响

胡明高<sup>1,2</sup>, 余昌俊<sup>1</sup>, 陈昌裕<sup>3</sup>, 郑强<sup>1</sup>, 康伟彪<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 miRNA-331 对大肠癌细胞 HCT116 增殖、迁移和侵袭等生物学功能的影响。方法 将 HCT116 细胞转染 miRNA-331 mimics 后, 通过 MTT 实验、克隆形成实验检测 miRNA-331 对大肠癌细胞增殖的影响; Transwell 实验检测 miRNA-331 对 HCT116 细胞迁移和侵袭的影响。结果 转染 miRNA-331 mimics 的 HCT116 细胞在 MTT 实验中第 1 天~第 5 天的吸光度值与对照组相比显著减低; 克隆形成实验中 转染 miRNA-331 mimics 后, HCT116 细胞形成克隆的能力被削弱; Transwell 实验显示, 与阴性对照相比, 转染 miRNA-331 mimics 后, HCT116 细胞的迁移能力明显下降。结论 miRNA-331 表达上调可抑制 HCT116 细胞的增殖、迁移能力, 表明 miRNA-331 有潜在的抑癌作用。

**关键词** miRNA-331; 结直肠肿瘤; 肿瘤抑制

**中图分类号** R 735.34

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)10-1429-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.003

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长度约 22nt 的内源性非编码小分子 RNA, 其通过与靶

mRNA 的 3' 非翻译区完全或不完全配对来降解 mRNA 或阻断其翻译, 在细胞的分化、增殖、凋亡、浸润、迁移等方面起着重要作用。近年研究<sup>[1]</sup>显示, miRNA 在大肠癌中存在异常表达, 在大肠癌发生、发展过程中起着正性或负性调节作用。已有研究<sup>[2-5]</sup>表明 miRNA-331 在胃癌、原发性肝癌、前列腺癌、宫颈癌等恶性肿瘤的发生和发展中起着调控作用, 但 miRNA-331 对大肠癌基因的调控作用少有报道。该研究拟通过分析 miRNA-331 对肠癌细胞 HCT116 的增殖、迁移及侵袭等生物学功能的影响, 为进一步探讨 miRNA-331 在大肠癌诊断及治疗中意义提供依据。

### 1 材料与方法

**1.1 主要材料和试剂** 大肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学技术大学生命科学院朱涛教授实验室; DMEM 培养液、胎牛血清、青、链霉素、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司; 苏木精染色液购自福州迈新 Maxim 生物技术有限公司; 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇、EDTA、DMSO 购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.2 细胞培养** HCT116 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行培养, 孵育在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中常规培养。每 1~2 d 更换培养液, 当细胞的融合度达 80%~90% 时进行细胞传代。

2017-05-25 接收

基金项目: 安徽省科技计划项目(编号: 3101005002598)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院胃肠外科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 中国人民解放军海军安庆医院普外科, 安庆 246003

<sup>3</sup> 安徽省中医院普外科, 合肥 230022

作者简介: 胡明高, 男, 硕士研究生;

余昌俊, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yuchangjun321@163.com

20 mg/L)。The model of the myocardial ischemia/reperfusion injury were established using the Langendorff method. The hemodynamics indexes, cardiac enzymes AST and LDH, inflammatory cytokines (NF- $\kappa$ B, ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-6) were measured. The effect and mechanism of Gossypol on early-stage MI/R of the oxidative stress response and the JNK/p38 MAPK signal pathway were investigated. **Results** Experimental results showed that Gossypol could significantly improve the functional capacity of the heart, reduce the contents of AST, LDH and inflammatory cytokines in reperfused heart tissue, and increase superoxide dismutase levels to protect the heart. The mechanism of this substance may involve anti-lipid peroxidation and inhibition of p38 kinase phosphorylation and JNK, and reduction of oxidative stress injury and apoptosis damage induced by MI/R. **Conclusion** This study confirm that Gossypol exerts extensive anti-MI/R effects. Its mechanism may be related to the interfering with the oxidative stress response and suppressing the JNK/p38 MAPK signal pathway.

**Key words** Gossypol; myocardial ischemia/reperfusion injury; oxidative stress response; JNK/p38 MAPK signal pathway