

- Palliat Care, 2011, 17(3): 251-254.
- [8] HE L, XU JM, DAI RP. Dexmedetomidine reduces the incidence of fentanyl-induced cough: a double-blind, randomized, and placebo-controlled study[J]. Ups J Med Sci, 2012, 117(1): 18-21.
- [9] MITRA S, CHOPRA P. Chirality and anaesthetic drugs: A review and an update[J]. Indian J Anaesth, 2011, 55(6): 556-562.
- [10] 梁 治, 贾建立, 张晓青, 等. 右美托咪定对困难气道患者经鼻插管应激反应的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2012, 31(4): 202-205.
- [11] MENDA F, KÖNER O, SAYIN M, *et al.* Dexmedetomidine as an adjunct to anesthetic induction to attenuate hemodynamic response to endotracheal intubation in patients undergoing fast-track CABG[J]. Ann Card Anaesth, 2010, 13(1): 16-21.
- [12] YILDIZ M, TAVLAN A, TUNCER S, *et al.* Effect of dexmedetomidine on haemodynamic responses to laryngoscopy and intubation: perioperative haemodynamics and anaesthetic requirements [J]. Drugs R D, 2006, 7(1): 43-52.
- [13] WIJEYSUNDERA DN, NAIK JS, BEATTIE WS. Alpha-2 adrenergic agonists to prevent perioperative cardiovascular complications: a meta-analysis[J]. Am J Med, 2003, 114(9): 742-752.
- [14] SANDERS RD, MAZE M. Alpha2-adrenoceptor agonists[J]. Curr Opin Investing Drugs, 2007, 8(1): 25-33.
- [15] 王珊珊, 赵 明, 何湘平, 等. 右美托咪啉对高血压患者全麻围插管期应激反应的影响[J]. 江苏医药, 2011, 37(9): 1048-1050.

[文章编号] 1007-7669(2013)05-0371-04

马齿苋总黄酮对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用

卢新华, 黄 煌, 谭 斌, 刘思妤, 谷 彬, 邓华菲, 王桂霞
(湘南学院基础医学部, 湖南 郴州 423000)

[关键词] 马齿苋; 黄酮类; 肌细胞, 心脏; 缺氧/复氧损伤; 抗氧化剂

[摘要] 目的 探讨马齿苋总黄酮 (PTF) 对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧 (H/R) 损伤的保护作用及可能的作用机制。方法 采用培养的 H9c2 心肌细胞株, 分为正常对照组、模型组和 PTF 10、30、100 mg·L⁻¹ 组, 建立 H/R 损伤模型, 在 H9c2 心肌细胞 H/R 前用 PTF 预处理 12 h, 应用 MTT 比色法检测心肌细胞存活率, 测定培养液中肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。结果 与正常对照组相比, 模型组心肌细胞存活数明显减少, 心肌细胞培养液中 CK 和 LDH 释放量增加 ($P < 0.01$), SOD 活性下降、MDA 含量升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, PTF 10、30、100 mg·L⁻¹ 组细胞存活数明显升高, 心肌细胞培养液中 CK、LDH 释放量降低, MDA 含量降低, SOD 活性增加 ($P < 0.01$)。结论 PTF 可减轻心肌细胞 H/R 损伤, 具有心肌细胞保护作用, 其机制可能与提高 SOD 活性、增强抗氧化能力有关。

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A

Protective effects of portulaca total flavone on hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 myocytes

LU Xin-hua, HUANG Huang, TANG Bin, LIU Si-yu, GU Bin, DENG Hua-fei, WANG Gui-

[收稿日期] 2012-08-08 [接受日期] 2013-02-25

[基金项目] 湖南省高校创新平台开放基金项目 (09K107), 湖南省教育厅十二·五重点建设学科基金项目资助, 湖南省心脑血管天然药物研究重点实验室基金项目资助

[作者简介] 卢新华, 男, 教授, 学士, 主要从事天然药物与心脑血管疾病研究, E-mail: xnjnlxh@126.com

xia

(Department of Basic Medicine of Xiangnan University, Chenzhou HU-NAN 423000, China)

[KEY WORDS] *Portulaca oleracea*; flavones; myocytes, cardiac; hypoxia/reoxygenation injury; antioxidants

[ABSTRACT] AIM To study the protective effects of portulaca total flavone (PTF) on hypoxia/reoxygenation (H/R) injury of H9c2 myocytes and its mechanisms. METHODS H9c2 myocytes were divided into normal control group, model group, and PTF 10, 30, 100 mg·L⁻¹ groups. H/R injury model was established. PTF were given 12 h before H/R for pretreatment. Survival rate was determined by MTT colorimetric method. The levels of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) were determined. And activity of superoxide dismutase (SOD) was also determined. RESULTS Compared with the normal control group, the survival cell number in the model group were obviously decreased ($P < 0.05$). The contents of CK, LDH and MDA were increased. And the activity of SOD was decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the survival cells were increased in PTF 10, 30, 100 mg·L⁻¹ group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), contents of CK, LDH, MDA were decreased, whereas the activity of SOD was increased ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). CONCLUSION PTF has significant cardiomyocytes protective effect against H/R, and the mechanisms may be related to increase the activity of SOD and enhance oxidation resistance.

心肌细胞的缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 是心肌缺血/再灌注损伤的主要病理基础。目前认为, H/R 损伤与缺血再灌注损伤有非常相似之处, 而再灌注损伤与氧自由基、Ca²⁺ 超载和白细胞聚集有关^[1,2]。心肌再灌注损伤是在缺血性损伤的基础上发展而来的, 涉及多种发病机制并影响缺血性疾病的预后, 再灌注损伤可以使可逆性缺血损伤加重, 亦可促进可逆性缺血损伤转化为不可逆性缺血损伤。探索心肌缺血再灌注损伤的机制, 做到既保证尽早恢复缺血组织的血流, 又减轻或防止再灌注损伤的发生, 是缺血性疾病防治中亟待解决的重要课题。

马齿苋为马齿科一年生肉质草本植物马齿苋 (*Portulaca oleracea* L.) 的全草, 是我国常用的传统中药, 也是人们常作蔬菜食用的野菜。现代药理学研究表明: 马齿苋有抗氧化、抗血栓、调血脂^[3]、增加膜脂流动性^[4,5]作用, 马齿苋水提液对衰老模型小鼠心肌线粒体有保护作用, 可通过抑制心肌线粒体磷脂的脂质过氧化和改善呼吸链酶的活性而实现对线粒体的保护作用^[6,7]; 但到目前为止, 国内外尚未见研究马齿苋总黄酮 (portulaca total flavone, PTF) 对心肌损伤保护作用及其机制的文献报道, 本研究采用 H9c2 心肌细胞建立 H/R 模型, 探讨 PTF 对心肌细胞 H/R 的保护作用及其可能的机制, 拓展新的药物功能, 寻找开发更有效地防治心脑血管疾病的药物提供理论依据。

材料与方法

实验细胞株 H9c2 大鼠心肌细胞株购自北京中科院细胞中心。

主要仪器 MCO-15AC 二氧化碳培养箱, 日本三洋公司; CXK41 荧光倒置显微镜, 日本 OLYMPUS; JHT-DDC 超净工作台, 山东省济南洁康设备厂; MK3 酶标仪, 芬兰雷勃公司; TGL-16G-A 台式低温离心机, 上海安亭科学仪器厂; LS-B50L- 立式压力蒸汽灭菌器, 江阴滨江医疗设备有限公司; FA1604 电子分析天平, 上海精密仪器公司。

药品及试剂 PTF 由本实验室自行制备^[8]; 胰蛋白酶, 武汉亚法生物技术公司; DMEM 培养基, Thermor 公司出品; 胎牛血清 (FBS), 浙江杭州四季青公司出品; MTT, Sigma 公司出品; 乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒、考马斯亮蓝法蛋白测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所出品; 其余试剂均为市售分析纯产品。

H9c2 大鼠心肌细胞的培养与实验分组^[9,10] H9c2 心肌细胞株来源于大鼠胚胎期心肌组织, 在 37℃、5%CO₂、含 10% FBS 的 DMEM 培养液中培养, 实验时取对数生长期细胞随机分成五组: (1) 正常对照组: 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养;

(2) 模型组: 缺氧 3 h, 复氧 2.5 h; (3) PTF 低、中、高浓度组, 分别在制模前给予相应终浓度为 10、30 和 100 mg·L⁻¹ 的 PTF 预处理 12 h, 然后缺氧 3 h, 复氧 2.5 h 处理。

心肌细胞 H/R 损伤模型的建立 模拟缺氧液 (137.0 mmol·L⁻¹ NaCl, 12.0 mmol·L⁻¹ KCl, 0.49 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.9 mmol·L⁻¹ CaCl₂·H₂O, 4.0 mmol·L⁻¹ HEPES, 20.0 mmol·L⁻¹ 乳酸钠; 各成分溶于三蒸水中, 调 pH 值到 6.2, 过滤除菌) 用高纯度氮气饱和 30 min, 置换培养瓶中的正常含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 再向瓶内充氮气 30 s, 以驱除瓶内氧气, 密闭培养 3 h 后换用经 95% O₂ + 5% CO₂ 饱和的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在正常培养条件下培养 2.5 h, 建立 H/R 损伤模型。

MTT 法测定心肌细胞存活率 实验时按 2 × 10⁴ 个·mL⁻¹ 细胞密度接种于 96 孔板, 复氧结束后吸弃培养液, 每孔加入 DMEM 培养液 180 μL, 5 mg·mL⁻¹ MTT 20 μL, 放于培养箱中继续培养 4 h 后弃培养液, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μL, 震荡 10 min, 用酶标仪比色, 检测 490 nm 处的吸光度值, 以无细胞孔为空白对照, 每组 6 个复孔, 重复 3 次。以对照组为 100%。细胞存活率 (%) = (各实验组 D 值 - 空白对照组 D 值) / (正常对照组 D 值 - 空白对照组 D 值) × 100%。

样本制备及指标测定 复氧结束后吸取细胞上清液, 按试剂盒说明书进行, LDH 活力计算公式: LDH 活力 = [(测定管 D 值 - 对照管 D 值) / (标准管 D 值 - 空白管 D 值)] × 标准管浓度 × n × 1 000。CK 活力计算公式: CK 活力 = [7.449 1 × (测定管 D 值 - 测定空白管 D 值 - 0.071 6)], 7.449 1、0.071 6 是系数。MDA 含量计算公式: MDA 含量 = [(测定管 D 值 - 测定空白管 D 值) / (标准管 D 值 - 标准管空白管 D 值)] × 标准品浓度。SOD 活性计算公式: SOD 活性 = (对照管 D 值 - 测定管 D 值) / 对照管 D 值 ÷ 50% × 反应体系的稀释倍数 × 样本测试前的稀释倍数。

统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用 SPASS 13.0 软件包进行, 组间均数比较采用方差分析。P < 0.05 为有显著差异。

结 果

PFT 对 H/R 损伤心肌细胞存活率的作用 与正常对照组比较, 心肌细胞 H/R 损伤后存活率明显下

降 (P < 0.01); 与模型组比较, PFT 高、中、低浓度组心肌细胞存活率明显增加 (P < 0.05 或 P < 0.01), 而且存在明显的浓度依赖性, 见表 1。

表 1 马齿苋总黄酮 (PFT) 对缺氧/复氧损伤心肌细胞存活率的影响

组别	D 值	n = 6, $\bar{x} \pm s$ 生存率/%
正常对照	0.684 ± 0.123	100
模型	0.287 ± 0.054 ^c	42.14 ± 3.82 ^c
PFT 10 mg·L ⁻¹	0.412 ± 0.047 ^{ab}	60.23 ± 4.26 ^{ab}
PFT 30 mg·L ⁻¹	0.495 ± 0.076 ^f	72.36 ± 5.27 ^f
PFT 100 mg·L ⁻¹	0.587 ± 0.051 ^h	85.81 ± 4.84 ^h

经方差分析: 与正常对照组比较, ^cP < 0.01; 与模型组比较, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01; 与 PFT 30 mg·L⁻¹ 组比较, ^hP < 0.05

PFT 对 H/R 损伤心肌细胞损伤的作用 与正常对照组比较, 模型组 LDH、CK 的释放量和 MDA 含量明显增多, 有非常显著差异 (P < 0.01); 与模型组比较, 给予 PFT 10、30、100 mg·L⁻¹ 后, LDH、CK 的释放量和 MDA 含量明显减少, 而且存在明显的浓度依赖性, 见表 2。

表 2 马齿苋总黄酮 (PFT) 对缺氧/复氧损伤心肌细胞乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 释放量和丙二醛 (MDA) 含量的影响

组别	LDH/U·L ⁻¹	CK/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
正常对照	947.3 ± 7.54	36.6 ± 3.20	9.25 ± 0.67
模型	1 346.2 ± 16.68 ^e	47.9 ± 5.48 ^e	14.94 ± 1.34 ^e
PFT 10 mg·L ⁻¹	1 224.6 ± 11.47 ^{ab}	44.7 ± 6.74 ^{ab}	12.56 ± 0.79 ^{ab}
PFT 30 mg·L ⁻¹	1 103.7 ± 14.51 ^f	41.4 ± 5.58 ^f	10.78 ± 0.45 ^f
PFT 100 mg·L ⁻¹	1 006.7 ± 17.30 ^h	38.8 ± 4.62 ^h	9.42 ± 0.53 ^h

经方差分析: 与正常对照组比较, ^eP < 0.01; 与模型组比较, ^aP > 0.05, ^bP < 0.05, ^fP < 0.01; 与 PFT 30 mg·L⁻¹ 组比较, ^hP < 0.05

PFT 对 H/R 损伤心肌细胞 MDA 的含量及 SOD 活性的影响 正常对照组 SOD 活性为 (133.72 ± 0.73) U·mL⁻¹, 模型组为 (121.26 ± 0.92) U·mL⁻¹, 与正常对照组相比有非常显著差异 (P < 0.01); PFT 10、30、100 mg·L⁻¹ 组 SOD 活性分别为 (124.34 ± 1.16) U·mL⁻¹、(127.12 ± 0.69) U·mL⁻¹ 和 (131.93 ± 0.86) U·mL⁻¹, 与模型组相比均有显著差异 (P < 0.05 或 P < 0.01), 且呈明显的浓度依赖性。

讨 论

心肌缺血/再灌注不仅是缺血性心肌病最为常见的并发症, 也是严重创伤后心肌功能受损形成心脏与其他脏器功能不全或衰竭的重要原因。在心肌细胞缺氧和再灌注过程中, 由于心肌局部缺血缺氧, 心肌细胞膜受损、能量代谢障碍; 再

灌注时,随着大量氧的灌入,氧自由基大量增加,细胞膜脂质过氧化,生物膜损伤,导致细胞内钙超载,造成心肌细胞线粒体损伤^[11,12]。本实验利用培养 H9c2 心肌细胞,建立 H/R 模型,以心肌细胞培养液中 LDH、CK 漏出量作为判断心肌细胞损伤的重要指标,心肌细胞胞内酶 LDH、CK 漏出量的多少反映心肌细胞的损伤程度。结果显示,模型组心肌细胞活力明显降低,心肌细胞中的 LDH、CK 漏出量增多,表明心肌细胞明显损伤;应用 PFT 预处理后培养液中的 LDH、CK 漏出量明显减少,结果表明 PFT 可通过减轻 H/R 所致的心肌细胞生物膜的脂质过氧化反应,减轻心肌细胞损伤,而发挥其对心肌细胞 H/R 损伤的保护作用,且存在一定的剂量依赖性。

PFT 具有稳定生物膜、抗氧化、清除自由基以及保护心肌的作用。在本实验中,模型组与正常对照组相比,心肌细胞存活率明显下降,SOD 活性明显降低,脂质过氧化产物 MDA 含量明显增加,表明脂质过氧化较剧烈,细胞已严重损伤;与模型组比较,PFT 各浓度组心肌细胞存活率和 SOD 活性明显升高,而 MDA 含量明显降低,表明 PFT 可降低心肌细胞脂质过氧化反应,提高心肌细胞清除超氧阴离子的能力。结果提示 PFT 可能通过提高机体 SOD 活性,增强机体对氧自由基的清除能力,减轻细胞膜脂质过氧化反应,提高心肌细胞存活率,而发挥对心肌细胞 H/R 损伤的保护作用,PFT 是否通过其他机制保护心肌细胞,还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 齐娜,廖迎,张贵林. 心肌缺血再灌注损伤及药物治疗研究进展[J]. 华夏医学, 2007, 20(1): 170-172.
- [2] 刘胜中,杨双强. 心肌缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2007, 4(1): 88-90.
- [3] 岳文田,董立魏,李敏,等. 马齿苋的抗氧化作用及其机制研究[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(12): 1434-1436.
- [4] 卢新华,关章顺,何军山,等. 马齿苋总黄酮对氧自由基引发人红细胞膜损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(8): 587-589.
- [5] 卢新华,关章顺,何军山,等. 马齿苋总黄酮对人红细胞膜封闭能力的影响[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(1): 31-32.
- [6] 王丹,欧芹,魏晓东,等. 马齿苋水提液对 D-半乳糖致衰老模型小鼠心肌线粒体的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(8): 949-950.
- [7] 欧芹,魏晓东,王丹,等. 马齿苋水提液对 D-半乳糖致衰老模型小鼠心肌线粒体的保护作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(8): 1570-1572.
- [8] 卢新华,关章顺,何军山,等. 马齿苋抗氧化有效成分的研究[J]. 上海中医药大学学报, 2004, 18(1): 56-58.
- [9] 林国威,林春,郑伟. 环维黄杨星 D 对培养大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(10): 1341-1345.
- [10] 刘丹,何明,易波,等. Pim-3 对抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(3): 321-325.
- [11] 廖新学,杨春涛,杨战利,等. 硫化氢对抗化学性缺氧的心肌细胞损伤及机制[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 1012-1016.
- [12] 高玲,王焱林,王成夫,等. 氯沙坦对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(2): 89-92.

2013年全国医药学术交流暨临床药学与药学服务研究进展培训班通知 为探究适合我国医药卫生体制改革形势的医药药理学发展思路,分享临床药学与药学服务经验,经中国药理学会研究,决定于2013年8月下旬在山东省青岛市召开2013年全国医药学术交流暨临床药学与药学服务研究进展培训班,会议主题为:医药卫生体制改革形势下临床药学发展的新思路。届时将邀请国内知名药学专家作相关专题讲座。本次会议由中国药理学会主持,《医药导报》编辑部承办。与会代表可获得国家级 类继续教育学分 10 分 [项目编号: 2013-13-01-068 (国)],并颁发论文证书。现将有关事宜通知如下。

1 会议主要内容 ① 药品真实世界研究及患者注册登记; ② 国内外开展临床药学经验介绍; ③ 临床药学科建设的实践与体会; ④ 新的医疗形势下临床药学的发展与思考; ⑤ 我国医院药学信息化的现状与探索; ⑥ 基因导向的个体化给药在医院临床药学中的展望; ⑦ 医疗机构药事风险管理; ⑧ 临床药师培训的思考; ⑨ 网络环境下临床药学信息检索的思路与方法。
2 会议时间、地点与收费 2013年8月23~26日,青岛花园大酒店(青岛市市南区彰化路6号。会务费及资料费共980元,食宿费自理。为保证会议代表住宿,务请邮寄预定床位费300元(报到时一并开发票),并请详细填写会议回执寄回《医药导报》编辑部,或发 E-mail: yydbxy@163.com。回执截止时间: 2013年7月15日。)

《医药导报》编辑部地址: 武汉市解放大道 1095 号同济医院《医药导报》编辑部, 邮编: 430030, 联系电话: 027-83663559, 83643083。E-mail: yydbxy@163.com; 联系人: 谢裕。青岛花园大酒店联系人: 徐进常 13863970091, 0532-83990777, 0532-83990888)。

中国药理学会
2013年4月1日