

较低的新生儿。相关报道表示,足月新生儿 PDA 的发生率为 0.057%,明显小于早产儿的 20%,而发病的早产儿中出生体重不足 1.5kg 的患儿占 33.3%。证实胎龄与出生体重是新生儿 PDA 发生的独立危险因素,与本实验结果相一致。

而 Apgar 评分的调查表明,出生时窒息的严重程度对 PDA 发病具有很大的影响,是新生儿 PDA 发病的独立危险因素,国内对其相关研究也证实了这个结论^[10,11]。其原因可能是窒息导致胎儿缺氧而引发 PDA 的发生,出生时对新生儿进行吸氧治疗从本质上对缺氧进行改善,有利于降低新生儿 PDA 的发生。国内外研究报道,产前应用地塞米松可以降低 PDA 的发生率,而使用非甾体抗炎药、合并败血症、甲状腺功能减退都能够增加 PDA 的发生^[12]。

综上所述,胎儿期羊水过少、羊水粪染、宫内缺氧、脐带绕颈、双胎、母孕期感染、母孕期糖尿病和胎儿娩出时 Apgar 评分、吸氧、出生体重、HIE 都是新生儿 PDA 发生的相关危险因素,对临床研究早产儿动脉导管未闭的预防和早期干预起到非常重要的作用和影响。

参考文献

- 刘文龙,胡要飞,李涛.硝普钠对早产兔动脉导管肽磺酰- γ -裂解酶-硫化氢体系的影响[J].中华儿科杂志,2012,50(2):136-140
- 杨文庆,杨长仪,陈涵强.早产儿动脉导管未闭发病机制的研究进展[J].国际儿科学杂志,2010,30(1):26-29

- Hamrick SE,Hansmann G. Patent ductus arteriosus of the preterm infant [J]. Pediatrics, 2010,5: 1020-1030
- Busnardo C,Crestani CC,Tavares RF,*et al.* Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism [J]. Brain Res, 2010, 1344:87-95
- 周更须,付松,刘宇航.危重早产儿动脉导管未闭的床旁外科治疗[J].心肺血管病杂志,2012,4:395-397
- Reese J,Veldman A,Shah L,*et al.* Inadvertent relaxation of the ductus arteriosus by pharmacologic agents that are commonly used in the neonatal period[J]. Seminars in Perinatology, 2010,3:222-230
- Oncel MY,Yurttutan S,Degirmencioglu H. Intravenous paracetamol treatment in the management of patent ductus arteriosus in extremely low birth weight infants[J]. Neonatology, 2013,3:166-169
- Chang HY,Locker J,Lu R,*et al.* Failure of postnatal ductus arteriosus closure in prostaglandin transporter-deficient mice[J]. Circulation, 2010, 121:529-536
- Osipov RM,Robich MP,Feng J,*et al.* Effect of hydrogen sulfide on myocardial protection in the setting of cardioplegia and cardiopulmonary bypass[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2010, 10:506-512
- 蒋少华,陈忠东.动脉导管未闭发病机制及药物治疗研究进展[J].西南国防医药,2010,20(4):448-450
- 朱辉银,余忠琴,李涛.右肺动脉起源于升主动脉并动脉导管未闭一例[J].中华儿科杂志,2014,6(6):128-130
- 刘文龙,李涛.早产与足月兔动脉导管中 CSE/H2S 体系的研究[J].中国现代医学杂志,2011,21(28):3486-3494

(收稿日期:2015-01-20)

(修回日期:2015-01-28)

紫草酸通过抑制凋亡及磷酸化 P65 改善脂多糖对 H9c2 细胞的损伤

朱小琴 华晓芳 李磊 李小艳

摘要 目的 探讨紫草酸对脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)诱导的 H9C2 细胞损伤的保护作用。**方法** 本实验分组为 5 组:对照组、LPS 组、LPS 加紫草酸组(低、中、高剂量)。LPS 浓度为 2mg/ml,紫草酸浓度分别为 5、10、20 μ mol/L。药物干预时间为 12h。用 CCK8 检测药物对细胞存活率影响,用 TUNEL、RT-PCR 及 Western blot 法检测凋亡蛋白及信号通路蛋白的变化。**结果** 紫草酸对 H9C2 细胞具有低毒性,它可以降低胞内凋亡的水平,降低炎症反应,且具有浓度依赖性以及时间依赖性。**结论** 紫草酸可以改善 LPS 诱导 H9C2 细胞损伤。

关键词 紫草酸 H9C2 细胞 凋亡 P65

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.037

Lithospermic Acid Protects H9c2 Cardiomyocyte Induced by Lipopolysaccharides via Attenuates Apoptosis and Phosphorylation of P65.

作者单位:445000 恩施土家族苗族自治州中心医院内科心血管病中心(朱小琴、华晓芳);430060 武汉大学人民医院(李磊、李小艳)

Zhu Xiaolin, Hua Xiaofang, Li Lei, et al. The Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Huber 445000, China

Abstract Objective To investigate the effect of lithospermic acid on H9C2 cell injury by LPS. **Methods** The study had 5 groups; control, LPS, LPS and lithospermic acid (high, middle, low). Concentration of LPS was 2mg/ml, and concentration of lithospermic acid were 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$. The intervention time of lithospermic acid was 12h. The cell survival rate detected by CCK8. The signal pathway way, inflammatory cytokines and apoptosis makers detected by TUNEL, RT-PCR and western blot after dealing with experimental factors designed. **Results** Lithospermic acid on H9C2 cells had low toxicity. It can reduce the level of inflammatory cytokines, apoptosis makers in the concentration-depended and time-depended. **Conclusion** Lithospermic acid attenuated apoptosis in H9C2 cell by induced by LPS.

Key words Lithospermic acid; H9C2 cells; Apoptosis; P65

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是细菌内毒素的主要成分, 可以通过激活凝血、补体激肽系统等释放多种炎性介质和细胞因子, 直接损伤心肌细胞, 而引起心血管功能的异常。紫草酸是丹参中提取的一种水溶性化合物, 近年来, 关于紫草酸的研究日益增多, 已涉及多种临床疾病。例如, 有研究者证实, 紫草酸通过抗氧化作用, 改善大鼠自发性肥胖型糖尿病引起的视网膜病变^[1]。另有研究者报道指出, 紫草酸可保护小肠缺血再灌注损伤。此外, 多项研究证实紫草酸具有抗氧化、抗癌、抗凋亡等作用。而目前紫草酸对细菌诱导的心肌细胞损伤的保护作用研究尚少, 因此, 本实验拟采用 LPS 刺激大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞, 诱导 H9c2 细胞损伤, 探讨紫草酸对损伤 H9c2 细胞的保护作用及其作用机制。

材料与方 法

1. 试剂与仪器: 紫草酸 (200mg, 纯度 > 98%) 购自上海纯优生物有限公司, 胰蛋白酶消化液 (Gibco 公司)、新生小牛血清 (Gibco 公司)、DMEM 培养基 (Corning Cellgro 公司)、青-链霉素 (Hyclone 公司)、细胞计数仪 (Invitrogen 公司)、TUNEL 试剂盒 (Chemicon, Temecula, CA 公司)、Cleave-caspase 3 抗体 (CST 公司)、反转录试剂盒 (Roche 公司)。

2. H9c2 细胞培养和实验分组: (1) H9c2 细胞购: 自于中国科学院细胞库, 用含 10% 小牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DEME 培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。细胞传至 3~5 代, 用 0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液并转移到培养板上, 进行以下 CCK8 检测、RT-PCR 检测、TUNEL 检测和 Western blot 法检测, 并按以下方案进行分组。参照笔者以前的实验方法, 将细胞分为 5 组: ①单纯 LPS 组 (2mg/ml LPS): 饥饿 18h 后, 给予 LPS 刺激 12h; ②LPS 加低剂量紫草酸组 (2mg/ml LPS + 5 $\mu\text{mol/L}$ 紫草酸); ③LPS 加中剂量紫草酸组 (2mg/ml LPS + 10 $\mu\text{mol/L}$ 紫草酸); ④LPS 加高剂量紫草酸组 (2mg/ml LPS +

20 $\mu\text{mol/L}$ 紫草酸)。2~5 组均为饥饿 18h 后加入 LPS, 并给予不同剂量浓度的紫草酸, 刺激 12h; ⑤对照组: 饥饿 18h 后, 给予 PBS 刺激。(2) CCK8 检测: 制备单细胞悬液, 以每孔 100 μl 的体积转移至 96 孔板中, 在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 24h 后加入 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ (浓度筛选参照以往文献报道) 梯度浓度的紫草酸药物, 继续孵育 12h 后, 向每孔加入 10 μl CCK8 溶液, 孵育 2~4h 后用酶标仪测定细胞在 450nm 处的吸光度。结果以药物组/对照组的百分比表示。(3) RT-PCR 检测: 将 H9c2 细胞传代至 6 孔板, 培养 12h 并进行 18h 的饥饿刺激后, 按照上述分组进行加药, 加药 12h 后收样, 每孔加入 1ml 的 Trizol 后进行 mRNA 提取, 按照罗氏试剂盒说明进行反转录。RT-PCR 按照罗氏试剂盒说明进行 mRNA 半定量检测, 检测的标志物为 IL-1、IL-6、TNF- α 。(4) TUNEL 检测: 将 H9c2 细胞传代于 24 孔板, 培养 12h 后, 饥饿 18h, 按照上述分组进行加药, 12h 后 PBS 洗涤 3 遍, 用 1% 的多聚甲醛进行固定, 按照 TUNEL 试剂盒说明进行染色, 用 DAPI 进行染核并封片。倒置显微镜拍照, 用 IPP 6.0 软件进行 MERGE, 并进行数量统计分析。(5) Western blot 法检测: 细胞用 100mm 的培养皿进行培养, 加药刺激 12h 后收集细胞, 加入细胞裂解液进行裂解, 用 BCA 蛋白定量法进行蛋白定量。内参蛋白为 GAPDH, 检测指标为 P-P65, C-caspase3。

3. 统计学方法: 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 本组间计量资料使用 One-way ANOVA 法分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CCK8 检测: 通过 CCK8 检测不同浓度紫草酸与 LPS 对细胞的毒性。实验结果表示方式: 细胞存活率 = 药物处理组的吸光度值/对照组的吸光度值 $\times$ 100%。结果显示如图 1, 加了 LPS 后在 40 $\mu\text{mol/L}$ 的

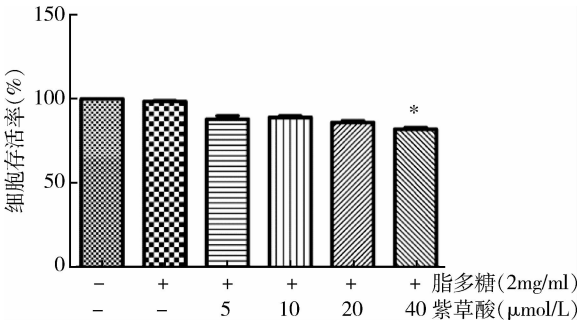


图 1 CCK8 结果

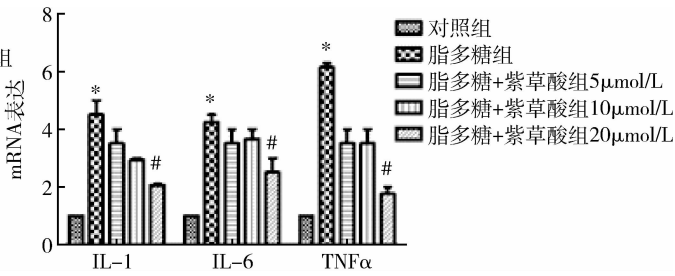
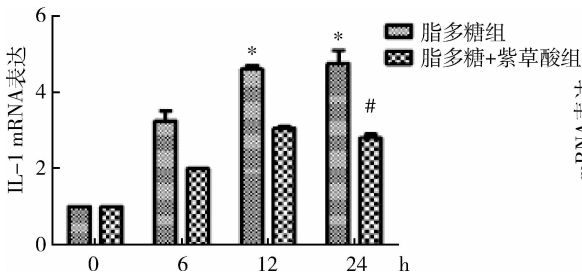


图 2 炎症因子 mRNA 改变

3. TUNEL 染色结果: 细胞进行处理后进行 TUNEL 染色, 用倒置显微镜进行拍照, 照片 TUNEL 染色与 DAPI 染核使用软件 IPP6.0 软件使得两种染

色合并后, 得出结果见图 3。LPS 刺激心肌细胞 TUNEL 阳性细胞增多, 凋亡加重; 紫草酸能够降低 TUNEL 阳性细胞, 改善心肌细胞的凋亡。

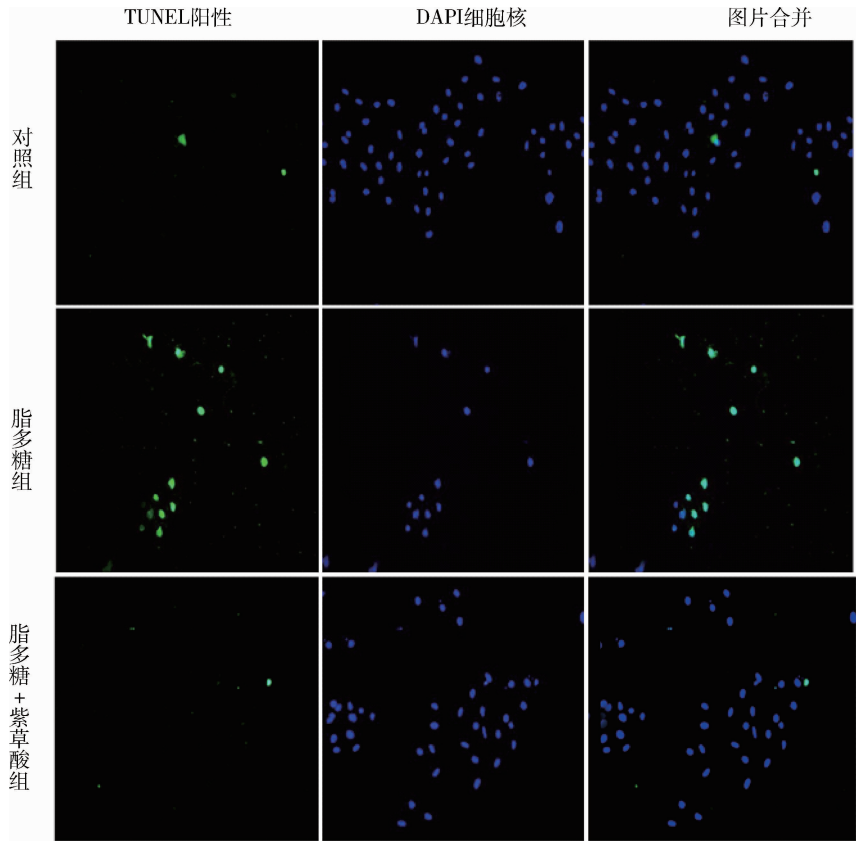


图 3 TUNEL 染色

4. Western blot 法检测结果:检测磷酸化 P65 以及凋亡蛋白,发现 LPS 刺激心肌细胞后,引起 P - P65 磷酸化水平上调,加入紫草酸后 P - P65 磷酸化水平有所下降。同样在 LPS 刺激下调亡蛋白 C - caspase3 同样表达增多,紫草酸能够降低这种上调(图 4)。

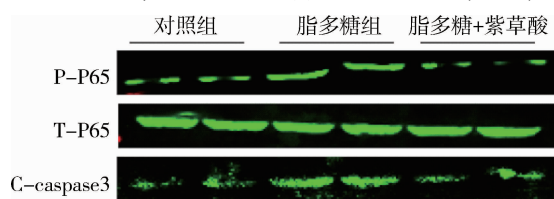


图 4 Western blot 法检测蛋白水平改变

讨 论

炎症反应参与心肌梗死、心肌疾病、心力衰竭等多个心脏疾病的病理生理过程。虽然内源性炎症反应是感染及损伤的应激反应,但是持续长时间的炎症会使心肌细胞损失,心脏功能失调。已有研究证实炎症参与心力衰竭的进展。所以降低炎症反应对于改善心功能心力衰竭进展具有有利的意义。细菌感染引起炎症因子表达增多,活性增强,不同程度地影响心脏的功能。严重时引起败血症导致较为严重的不可逆转的心脏损伤。本研究中数据可以证明紫草酸可以降低 LPS 引起的细胞炎症因子的表达,降低磷酸化 P65 的活性,并且能够降低心肌细胞的凋亡蛋白 C - caspase3 的表达。说明紫草酸能够抑制凋亡抑制炎症,保护 LPS 对心肌细胞的损伤。紫草酸是丹参重要提取物,具有多种生物活性,包括自由基清除、抑制脂质过氧化反应活化一些转录因子。有研究证实,紫草酸能够改善糖尿病肾病,能够抑制新生血管内膜的生成,并且能够通过抑制凋亡以及 Nrf2 - HO - 1 和 Sirt1 信号通路保护胰腺 β 细胞^[2-4]。关于炎症方面,研究证明紫草酸可以通过其抗氧化抗炎的功能改善糖尿病引起的视网膜病变^[1]。紫草酸在抗炎、抗凋亡方面有着重要的作用。

LPS 来自革兰阴性菌细胞壁,对全身细胞均能引起较强烈的炎症反应,能够上调炎症细胞因子。对于 LPS 引起的系统炎症反应,容易导致多器官脏器衰竭,引起较高的病死率^[5,6]。败血症患者心功能紊乱也是病死率较高的主要原因。国外已有研究证明慢性心力衰竭患者血清中 LPS 升高。控制好炎症能够

很好地改善心脏功能紊乱以及败血症引起的死亡。LPS 引起的炎症反应能够刺激信号通路以及炎症因子的改变^[3]。这些炎症因子以 TNF - α 、IL - 1、IL - 6 为代表。磷酸化 P65 是介导炎症反应的一个重要的转录因子,LPS 刺激使得磷酸化 P65 表达增高,炎症反应增强,而紫草酸抑制其磷酸化水平。在炎症方面对心肌细胞具有保护作用^[4]。细胞凋亡使得心肌细胞数量减少,是左心室功能恶化的重要原因。近期关于 LPS 引起凋亡的改变研究,涉及多个临床疾病。本研究中紫草酸降低了 TUNEL 阳性的细胞数量,降低了凋亡执行蛋白 C - caspase3 的表达量,证明紫草酸能够通过抑制凋亡改善 LPS 对心肌细胞的损伤。

紫草酸通过抑制 P - P65 以及凋亡蛋白保护由 LPS 引起的心肌细胞损伤,为临床预防及治疗提供一定的理论基础,但其发生、发展机制十分复杂,具体病理发生发展机制尚需要开展进一步研究。

参考文献

- 1 Jin CJ, Yu SH, Wang XM, *et al.* The effect of lithospermic acid, an antioxidant, on development of diabetic retinopathy in spontaneously obese diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e98232
- 2 Lee BW, Chun SW, Kim SH, *et al.* Lithospermic acid B protects beta - cells from cytokine - induced apoptosis by alleviating apoptotic pathways and activating anti - apoptotic pathways of Nrf2 - HO - 1 and Sirt1 [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 252(1):47 - 54
- 3 Magi S, Nasti AA, Gratteri S, *et al.* Gram - negative endotoxin lipopolysaccharide induces cardiac hypertrophy: Detrimental role of Na(+) - Ca(2 +) exchanger [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2015, 746(4):31 - 40
- 4 Bullon P, Roman - Malo L, Marin - Aguilar F, *et al.* Lipophilic antioxidants prevent lipopolysaccharide - induced mitochondrial dysfunction through mitochondrial biogenesis improvement [J]. *Pharmacological Research*, 2014, 91(2):1 - 8
- 5 Odkhuu E, Mendjargal A, Koide N, *et al.* Lipopolysaccharide down-regulates the expression of p53 through activation of MDM2 and enhances activation of nuclear factor - kappa B [J]. *Immunobiology*, 2015, 220(1):136 - 141
- 6 邢智辰,王金宏,侯晓彤. 中性粒细胞和单核细胞在脓毒症相关急性肺损伤聚集和来源差异的研究 [J]. *中华实验和临床感染病杂志*, 2014, 7(8):303 - 307

(收稿日期:2015 - 01 - 23)

(修回日期:2015 - 01 - 27)