

行,可考虑给予保留卵巢的机会,但术后需严密随访。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11–30
- 2 郭瑞霞. 年轻妇女子宫内膜癌保留卵巢功能的探讨[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(7):523–524
- 3 曾四元,涂海燕. 子宫内膜癌的放射治疗[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(12):885–888
- 4 魏冬梅. 子宫内膜癌术后辅助放射治疗进展[J]. 实用妇产科杂志, 2008, 24(4):211–213
- 5 何翊姣,彭俊. 子宫内膜增生及早期子宫内膜腺癌行孕激素治疗的临床分析[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(8):155–158
- 6 李林,吴令英. 年龄≤40岁Ⅰ期子宫内膜癌患者保留卵巢的临床分析[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(4):260–263
- 7 毛渝燕,谢幸. 早期子宫内膜癌保守治疗成功并完成生育后的处理探讨[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(12):934–935
- 8 郑明蓉,张竹. 子宫内膜癌患者保留卵巢功能的探讨[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版, 2014, 10(5):565–567
- 9 Lee TS, Lee JY, Kim JW, et al. Outcomes of ovarian preservation in a cohort of premenopausal women with early-stage endometrial cancer: a Korean Gynecologic Oncology Group study [J]. Gynecol Oncol, 2013, 131(2):289–293
- 10 杨越波,曾海涛. 年轻子宫内膜癌患者术中卵巢去留问题探讨[J]. 中国临床实用医学, 2010, 4(2):36–38
- 11 Wright JD, Buck AM. Safety of ovarian preservation in premenopausal women with endometrial cancer [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(8):1214–1219
- 12 Pan Z, Wang X, Zhang X, et al. Retrospective analysis oncoexisting ovarian cancer in 976 patients with clinical stage I endometrial carcinoma [J]. Obstet Gynaecol Res, 2011, 37(4):352–358

(收稿日期:2016-01-19)

(修回日期:2016-03-04)

银杏内酯 B 对 H₂O₂ 诱导 H9C2 心肌细胞损伤保护作用研究

李亮

摘要 目的 研究银杏内酯 B(ginkgolide B, GB)对 H₂O₂ 诱导 H9C2 心肌细胞损伤的保护作用及机制。**方法** 将对数长期的 H9C2 心肌细胞随机分为 4 组:空白对照、H₂O₂ (200 μmol/L) 干预、GB (100 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预、GB (200 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预,每组设 10 个复孔。经药物干预 16h 后观察各组细胞形态,采用 MTT 法检测细胞存活率;检测培养液中心肌酶(AST、CPK、LDH)活性;测定细胞中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性和丙二醛(MDA)含量;酶联免疫法(ELISA)测定培养液中炎性因子(CRP、TNF-α、IL-1、IL-6)含量水平;采用流式细胞术检测细胞凋亡状况并计算细胞凋亡率,采用反转录 PCR(RT-PCR)技术检测细胞中 bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达并计算 bcl-2/Bax 表达比值,Western blot 法检测细胞中 NF-κB 蛋白表达并进行半定量分析。**结果** 与 H₂O₂ 干预组比较,GB (100、200 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组细胞培养液中 AST、CPK 活性和 TNF-α、IL-6、CRP、MDA 含量均显著降低,SOD、CAT 活性显著升高,细胞凋亡率显著降低;bcl-2 mRNA 表达显著上调、Bax mRNA 表达显著下调,bcl-2/Bax 表达比值显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$);其中 GB (200 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组细胞生存状态明显改善、存活率显著升高,LDH 活性、IL-1 含量以及 NF-κB 蛋白表达量显著降低,细胞中 GSH-Px 活性显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** GB 对 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞具有保护作用,作用机制可能与 GB 能够有效改善抗氧化酶活性、抑制氧化应激损伤,上调抑凋亡基因 bcl-2 表达、下调促凋亡基因 Bax 表达,提高 bcl-2/Bax 表达比值,下调 NF-κB 蛋白表达,降低炎性因子含量相关。

关键词 银杏内酯 B H₂O₂ H9C2 心肌细胞 保护

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.018

Protective Effects of Ginkgolide B on H9C2 Cardiomyocytes Impaired by H₂O₂ and Its Mechanism. Li Liang. Department of Cardiac Surgery, Xingtai People's Hospital, Hebei 054031, China

Abstract Objective To investigate the protective effects of Ginkgolide B (GB) on H9C2 cardiomyocytes impaired by H₂O₂ and its mechanism. **Methods** H9C2 cardiomyocytes in logarithmic phase was randomly divided into normal control group, H₂O₂ (200 μg/ml)

作者单位:054031 邢台市人民医院心脏外科

通讯作者:李亮,电子信箱:baill2015@163.com

group, GB(100 μg/ml) + H₂O₂(200 μg/ml) group, GB(200 μg/ml) + H₂O₂(200 μg/ml) group ($n=10$)。Sixteen hours after the drugs were given, the morphology changes was observed by optical microscope, the survival rate was detected by MTT. the activity of AST, CPK, LDH in culture medium were detected, the activity of SOD, GSH-Px, CAT and the content of MDA in cardiomyocytes were determined, the content level of TNF-α, IL-1, IL-6, CRP were detected by ELISA, the cardiomyocytes apoptosis was observed by flow cytometry and the apoptosis rate was calculated, the expression of bcl-2 mRNA, Bax mRNA were detected by RT-PCR, and the ratio of bcl-2/Bax was calculated, the expression of NF-κB protein was determined and semi-quantitative analyzed. **Results** Compared with the H₂O₂ group, the activity of AST, CPK and the content of TNF-α, IL-6, CRP, MDA in culture medium of GB(100, 200 μg/ml) + H₂O₂ groups were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$)。The activity of SOD, CAT in cardiomyocytes were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$)。The apoptosis rate was significantly decreased ($P<0.01$)。The expression of bcl-2 mRNA was significantly up-regulated, the expression of Bax mRNA was significantly down-regulated, and the ratio of bcl-2/Bax were significantly increased ($P<0.01$)。The morphology of cardiomyocytes in GB(200 μg/ml) + H₂O₂ groups was improved and the survival rate was significantly increased ($P<0.01$)。The activity of LDH, the content of IL-1 and the expression of NF-κB protein were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$)。The activity of GSH-Px was significantly increased ($P<0.05$)。**Conclusion** GB had protective effects on H9C2 cardiomyocytes impaired by H₂O₂, which perhaps related to its effects of improving the activity of antioxidant, depressing oxidative stress, up-regulating the expression of bcl-2, down-regulating the expression of Bax, raising the ratio of bcl-2/Bax, down-regulating the expression of NF-κB, lowering the content of inflammatory cytokines.

Key words Ginkgolide B; H₂O₂; H9C2 cardiomyocytes; Protection

急性心肌梗死后溶栓、介入手术治疗以及心脏手术过程中暂时阻断血流,均可引发“缺血再灌注损伤”并发症的发生,严重影响患者愈后。近年来,研究发现再灌后随着氧的大量涌入,氧自由基大量产生而引发广泛的氧化应激损伤和组织炎性反应,以及继发的细胞凋亡,是缺血再灌注损伤发生、发展的重要病理机制^[1~3]。银杏内酯 B(Ginkgolide B, GB)为我国传统中药银杏叶的主要活性成分之一,属于萜内酯类化合物,为血小板活化因子(PAF)拮抗剂,具有抗炎、抗氧化、抗感染等多种药理学作用^[4~6]。本实验通过制备 H₂O₂诱导损伤 H9C2 心肌细胞模型,研究 GB 对 H₂O₂ 损伤 H9C2 心肌细胞的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1. 试验材料、药物和试剂:大鼠 H9C2 心肌细胞株(中国科学院上海细胞库);银杏内酯 B(美国 Sigma 公司,纯度≥90%);DMEM 培养基、小牛血清(美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(DMSO)、甲基四唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司);AST、CPK、LDH 活性检测试剂盒(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);SOD、CAT、GSH-Px 活性检测试剂盒,MDA 含量检测试剂盒,Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术公司);TNF-α、IL-1、IL-6、CRP 酶联免疫(ELISA)检测试剂盒,NF-κB 单克隆抗体(南京建成生物工程研究所);cDNA 反转录试剂盒(上海斯信生物科技有限公司);bcl-2、Bax 引物(上海博亚

生物公司)。

2. 主要仪器:WT-IND 型超净工作台(北京王堂蓝翼科技有限公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);超速低温离心机(德国 Eppendorf 公司);FAC-Saria 流式细胞仪(美国 BD 公司);BS-200 全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);UV-3200 PCS 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);VCX750 型超声波细胞破碎仪(美国 SONICS 公司);酶标仪(瑞士 Tecan 公司);DYY-11 型多用电泳仪、JY-SCZ2 电泳槽(北京六一仪器厂)。

3. 细胞的培养与分组:H9C2 心肌细胞经常规复苏后接种于含 15% 胎牛血清、100 g/L 双抗的 DMEM/F12 培养液中,然后置于细胞培养箱(37℃、5% CO₂)中进行培养,每 72 h 换液并传代 1 次;取对数生长期 H9C2 心肌细胞分为 4 组:空白对照组、H₂O₂(200 μmol/L)干预组、GB(100, 200 μmol/L) + H₂O₂(200 μmol/L)干预组,每组设 10 个复孔。经药物干预 16 h 后,检测各指标。

4. 观察细胞形态:参照武艳强等^[7]报道的方法:干预 16 h 后,其弃培养液分别取各组 H9C2 心肌细胞,经 PBS 溶液冲洗 2 次后,每孔加入 200 μl 吉姆萨(Giemsa)染液,使其覆盖孔底,着色 3 min 后,加入 1 ml PBS 溶液浸泡 10 s,弃液取细胞,用去离子水洗至细胞间隙清晰,置通风处晾干,然后通过光学显微镜观察细胞形态。

5. 测定细胞存活率:干预 16 h 后,各组细胞分别

接种于 96 孔板内 ($n=6$) , 每孔加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml) , 37℃ 孵育 4 h 后弃上清, 分别加入 150 μl DMSO, 振荡 15 min, 通过酶标仪检测 490 nm 处 A 值, 然后计算细胞存活率, 公式为: 细胞存活率 (%) = (实验组 A 值 / 空白对照组 A 值) × 100%。

6. 检测培养液中心肌酶活性: 分别取各组细胞培养液, 按照各试剂盒操作方法步骤进行处理后, 通过生化分析仪平行测定各组细胞培养液中 AST、CPK、LDH 活性。

7. 测定细胞内抗氧化酶活性和 MDA 含量: 弃培养液取细胞, 经 PBS 溶液冲洗 2 次后, 每孔加入 2 ml PBS 溶液, 冰浴中破碎处理 30 s, 经 3500 r/min 低温 (4℃) 离心 10 min 取上清液, 然后通过紫外 - 可见分光光度计平行测定各组细胞裂解液中 SOD、CAT、GSH - Px 活性。

8. 测定培养液中炎性因子含量: 经药物干预 16 h 后, 分别取各组细胞培养液并按照各试剂盒操作步骤进行处理, 最后通过酶标仪测定各组细胞培养液中 TNF - α、IL - 1、IL - 6、CRP 含量。

9. 检测细胞凋亡并计算凋亡率: 采用胰酶 (0.25%) 消化细胞, 离心后弃上清液, 经 PBS 溶液将洗涤 2 次后, 按照细胞凋亡检测试剂盒操作方法步骤: 加入 500 μl Binding Buffer、5 μl Annexin V、5 μl PI, 混匀, 室温下避光孵育 10 min 后采用流式细胞仪

进行检测各组细胞凋亡状况并在流式二维图中计算凋亡率。

10. 测定 NF - κB 蛋白表达并进行半定量分析: 取 1.6 制备的细胞裂解提取液, 经 12000 r/min 低温 (4℃) 离心 20 min 后取沉淀, BCA 法进行蛋白定量, 变性后上样、电泳; 待溴酚蓝接近胶底部时停止、转膜、春红溶液染色, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 (NF - κB, β - actin) 4℃ 过夜; 洗膜, 二抗室温摇床上孵育 1 h 后经 ECL 显色, 实验结果应用 Quantity One 软件进行分析。

11. 统计学方法: 运用 SPSS 15.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. GB 对 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞形态的影响: 通过 Giemsa 染色法观察发现: 空白对照组 H9C2 心肌细胞呈短梭型紧密生长、贴壁较牢, 细胞形态和生长状态均未见异常; H₂O₂ 干预组 H9C2 心肌细胞呈收缩变圆, 生长密度降低, 片状脱落, 胞核固缩呈深蓝色等病理性形态学变化; 与 H₂O₂ 干预组比较, GB 干预组细胞形态和生存状态均呈不同程度好转, 且 GB(200 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组效果优于 GB(100 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组, 结果见图 1。

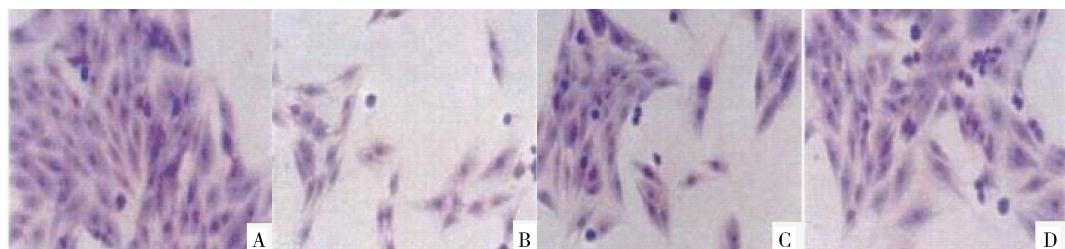


图 1 GB 对 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞形态的影响 (Giemsa 染色, $\times 200$)

A. 空白对照组; B. H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组; C. GB (100 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组;
D. GB (200 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组

2. GB 对 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞存活率的影响: H₂O₂ 干预组 H9C2 心肌细胞存活率较空白对照组显著降低 ($P < 0.01$); 而与 H₂O₂ 干预组比较, GB(200 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组 H9C2 心肌细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$); GB(200 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组心肌细胞存活率显著高于 GB(100 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

表 1 GB 对 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	存活率 (%)
空白对照组	10	97.2 ± 2.6
H ₂ O ₂ (200 μmol/L) 干预组	10	35.4 ± 8.1 *
GB (100 μmol/L) + H ₂ O ₂ (200 μmol/L) 干预组	10	48.6 ± 7.5
GB (200 μmol/L) + H ₂ O ₂ (200 μmol/L) 干预组	10	76.3 ± 10.2 #△

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组比较, # $P < 0.01$; 与 GB (100 μmol/L) + H₂O₂ (200 μmol/L) 干预组比较, △ $P < 0.01$ 。

3. GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞培养液中心肌酶活性的影响: H_2O_2 干预组 H9C2 心肌细胞培养液中 AST、CPK、LDH 活性显著升高 ($P < 0.01$) ; 与 H_2O_2 干预组比较, GB (100、200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 H9C2 心肌细胞培养液中 AST、

CPK、LDH 活性均显著降低, ($P < 0.05$, $P < 0.01$) ; GB (200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 AST 含量较 GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 CPK 含量和 LDH 含量显著降低 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 2 GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞培养液中心肌酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST (U/ml)	CPK (U/ml)	LDH (U/L)
空白对照组	10	22.3 ± 4.1	1.41 ± 0.37	524.0 ± 73.8
H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	35.8 ± 6.7 *	2.79 ± 0.62 *	916.2 ± 135.7 *
GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	27.0 ± 5.4 #	2.13 ± 0.55 ##	748.1 ± 109.4 #
GB (200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	24.2 ± 4.6 ##	1.72 ± 0.49 ##Δ	663.7 ± 85.9 ##Δ

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组比较, Δ $P < 0.01$

4. GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞中抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响: H_2O_2 干预组 H9C2 心肌细胞中抗氧化酶 (SOD、CAT、GSH-Px) 活性显著降低且 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$) ; 与 H_2O_2 干预组比较, GB (100、200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 H9C2 心肌细胞中 SOD、CAT 活性显著升高且 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 GB

(200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$) ; GB (200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 SOD 和 GSH-Px 活性较 GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组显著升高 ($P < 0.05$), MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

表 3 GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞中抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
空白对照组	10	115.9 ± 17.2	32.7 ± 6.1	3.72 ± 0.98	6.18 ± 1.47
H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	63.4 ± 12.8 *	19.0 ± 5.2 *	1.88 ± 0.75 *	10.92 ± 2.15 *
GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	85.7 ± 16.5 #	24.1 ± 6.3 #	2.06 ± 0.94	7.80 ± 1.93 ##
GB (200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	96.3 ± 22.7 ##Δ	28.5 ± 7.4 ##	2.43 ± 1.02 ##Δ	6.94 ± 1.58 ##Δ

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组比较, Δ $P < 0.05$

5. GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞培养液中炎性因子含量的影响: H_2O_2 干预组 H9C2 心肌细胞培养液中 TNF-α、IL-1、IL-6、CRP 含量水平均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) ; GB (100、200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 H9C2 心肌细胞培养液中 TNF-α、IL-6、CRP

含量水平显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 GB (200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 IL-1 含量显著降低 ($P < 0.05$) ; 与 GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组比较, GB (200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组 TNF-α、IL-6、CRP 含量水平显著降低 ($P < 0.05$), 结果见表 4。

表 4 GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞培养液中炎性因子的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α ($\mu\text{g/L}$)	IL-1 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	CRP (mg/L)
空白对照组	10	1.35 ± 0.29	109.5 ± 11.7	61.3 ± 8.5	4.8 ± 1.6
H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	2.74 ± 0.51 **	176.2 ± 20.6 *	125.6 ± 17.2 **	18.3 ± 5.4 **
GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	1.82 ± 0.46 ##	154.3 ± 18.5	98.4 ± 21.0 #	13.9 ± 4.2 #
GB (200 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组	10	1.51 ± 0.40 ##Δ	137.9 ± 17.2 Δ	80.3 ± 15.7 ##Δ	9.7 ± 4.5 ##ΔΔ

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 GB (100 $\mu\text{mol/L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 干预组比较, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$

6. GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞凋亡的影响:通过流式细胞仪分析发现,空白对照组 H9C2 心肌细胞仅存在极少量的凋亡细胞,而 H_2O_2 干预组凋亡细胞数量明显增多;而与 H_2O_2 干预组比较,GB 干预组细胞凋亡状况明显好转,且 GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组效果优于 GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组,结果见图 2。通过计算并

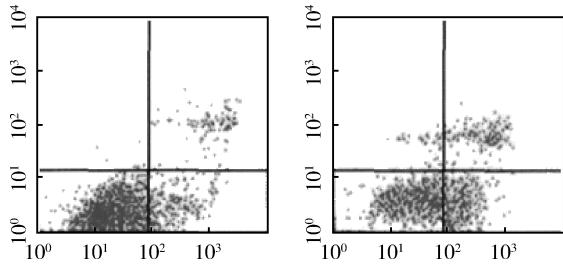


图 2 GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞凋亡的影响

A. 空白对照组; B. H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组; C. GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组;
D. GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组

表 5 GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率(%)
空白对照组	10	4.8 ± 2.1
H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组	10	43.3 ± 7.5 *
GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组	10	28.7 ± 6.2 #
GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组	10	16.0 ± 4.3 #Δ

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组比较, # $P < 0.01$; 与 GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组比较, #Δ $P < 0.01$

7. GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响:通过 Western blot 法检测并进行半定量分析发现: H_2O_2 干预组 H9C2 心肌细胞中 NF- κ B 蛋白表达量较空白对照组显著增高($P < 0.01$);而与 H_2O_2 干预组比较, GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组细胞中 NF- κ B 蛋白表达量显著降低($P < 0.01$);且 GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组细胞中 NF- κ B 蛋白表达量较 GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组显著降低($P < 0.05$),结果见图 3 和表 6。

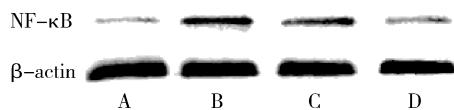


图 3 GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响

A. 空白对照组; B. H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组; C. GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组; D. GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组

比较细胞凋亡率发现: H_2O_2 干预组 H9C2 心肌细胞凋亡率较空白对照组显著升高($P < 0.01$);而与 H_2O_2 干预组比较, GB(100、200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$);且 GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组细胞凋亡率较 GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组显著降低($P < 0.01$),结果见表 5。

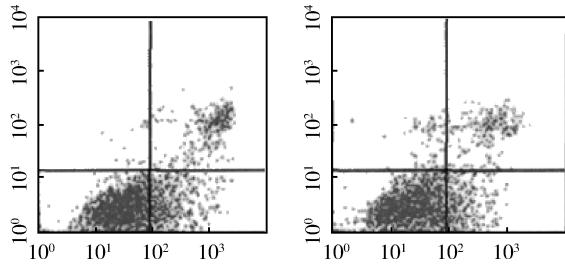


表 6 GB 对 H_2O_2 诱导损伤 H9C2 心肌细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NF- κ B/ β -actin
空白对照组	10	0.21 ± 0.04
H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组	10	0.47 ± 0.09 *
GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组	10	0.40 ± 0.10
GB(200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组	10	0.29 ± 0.06 #Δ

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组比较, # $P < 0.01$; 与 GB(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) + H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 干预组比较, #Δ $P < 0.05$

讨 论

缺血再灌注损伤的病理机制非常复杂,与氧化应激、炎性反应以及继发的细胞凋亡均有关系,为研发抑制缺血再灌注损伤的新型药物以及制定治疗方案的切入点^[1~3]。

Lartigue 等^[8]研究发现,正常生理状态下,体内生成的氧自由基在 SOD 的催化作用下能够被还原生成过氧化氢,并在 CAT 或 GSH-Px 的催化作用下进一步还原生成对人无害的水和氧^[9]。所以,SOD、CAT 和 GSH-Px 三者的活性直接反应机体抗氧化能力。此外,细胞膜极易受氧自由基的攻击发生脂质过氧化而生成丙二醛(MDA),所以血清中 MDA 的含量能够间接反映心肌细胞损伤程度。并且当细胞膜受氧自由基攻击而受损后,将导致细胞中心肌酶(AST、CPK、LDH)迅速释放入血,到时血清中 AST、CPK、LDH 活力陡然增高,血清中三者的活性水平能够敏

感地反映心肌细胞受损程度,所以临幊上将血清中心肌酶活性作为诊断早期心功能损伤的常用生化指标;而氧化应激损伤对细胞膜的破坏将直接影响细胞的生存状态。本实验通过制备 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞模型进行研究发现,经 GB 干预能够有效改善 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞生存状态,改善抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活性、降低培养液中 MDA 和心肌酶(AST、CPK、LDH)含量,其中 GB(200 μmol/L)干预组对抗氧化酶活性的改善作用和降低心肌酶的作用优于 GB(100 μmol/L)干预组($P < 0.05, P < 0.01$),提示 GB 具有剂量依赖性地降低 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞氧化应激损伤的作用。

炎性因子水平是临幊上诊断炎症发生的中药指标,其中 TNF-α 是体内非常最重要的一种炎性细胞因子,在炎症发生、发展过程中发挥着重要的作用,其含量水平能够反映 H₂O₂ 损伤乳鼠心肌细胞炎症损伤程度;IL-1 和 IL-6 为另两种主要的炎性因子,它不但自身能够介导炎症的发生,还能够促进 TNF-α 的生成^[10];CRP 的升高程度能够反应炎性组织的大小或活动性,在急性炎症和感染时,CRP 与疾病活动性有良好的相关性。本实验研究发现,经 GB 干预能够有效降低细胞培养液中炎性因子(TNF-α、IL-1、IL-6、CRP)含量,其中 GB(200 μmol/L)干预组 TNF-α、IL-6、CRP 含量均显著低于 GB(100 μmol/L)干预组($P < 0.05, P < 0.01$),提示 GB 具有剂量依赖性地抑制 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞炎性反应的作用。

细胞凋亡是一种有多种基因参与调控的程序化死亡过程,氧化应激损伤是其重要的诱发因素之一^[11]。NF-κB 为多效能核转录因子,常态下,NF-κB 以无活性形式存在于胞质中;而当细胞受到外界因素刺激时,NF-κB 将暴露出核定位信号并进入胞核内,调控靶基因的转录与表达。Zhang 等^[12]研究发现,制 NF-κB 激活能够对抗氧化应激诱导的心肌细胞凋亡,证实 NF-κB 激活与氧化应激诱导的心肌细胞凋亡密切相关。本实验研究发现,经 GB 干预能够有效降低 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞凋亡率并下调 NF-κB 蛋白表达,且 GB(200 μmol/L)干预组细胞凋亡率和 NF-κB 蛋白表达量均显著低于 GB(100 μmol/L)干预组($P < 0.05, P < 0.01$),提示 GB 可能通过下调 NF-κB 蛋白表达而对 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞凋亡起到剂量依赖性的抑制作用。

总之,经 GB 干预能够有效改善 H₂O₂ 诱导损伤 H9C2 心肌细胞生存状态、减轻细胞损伤、抑制炎性反应、降低细胞凋亡率并提高细胞存活率,提示 GB 对 H₂O₂ 诱导 H9C2 心肌细胞损伤具有保护作用;其作用机制可能与 GB 能够有效改善抗氧化酶活性、提高氧自由基清除能力、降低氧化应激损伤,下调促凋亡蛋白 NF-κB 表达以及抑制炎性反应有关。

参考文献

- 王知斌,翟亚东,苏晓琳,等.二氢槲皮素对 H2O2 诱导 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用[J].中医药信息,2014,31(4):16-19
- 冯星,孙磊,郭彩霞,等.过氧化氢致 H9c2 大鼠心肌细胞 DNA 损伤作用[J].中国公共卫生,2009,25(3):296-297
- 杨翠,任建勋,吴红金,等.人参皂苷 Rb1 经 ERK1/2 对 H₂O₂ 诱导的乳鼠心肌细胞损伤的保护作用[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(2):207-209
- Nie ZG, Peng SY, Wang WJ. Effects of Ginkgolide B on lipopolysaccharide - induced TNF - alpha production in mouse peritoneal macrophages and NF - κB activation in rat pleural polymorphonuclear leukocytes[J]. Acta Pharm Sin, 2004, 39(6): 415 - 418
- Zhou LE, Wang WJ, Bai JY, et al. Effects of Ginkgolide B on arachidonic acid metabolizing enzymes and level of intracellular calcium in rat polymorphonuclear leukocytes[J]. Acta Pharm Sin, 2001, 36(2): 92 - 95
- Kitamoto S, Egashira K. Endothelial dysfunction and coronary atherosclerosis[J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2004, 4(1): 13 - 22
- 武艳强,王慧娟,冯社军,等.水飞蓟宾对 H₂O₂ 诱导大鼠 H9C2 心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J].现代药物与临幊,2015,30(5):503-508
- Lartigue A, Burlat B, Coutard B, et al. The megavirus chilensis Cu, Zn - superoxide dismutase: the first viral structure of a typical CCS - independent hyperstable dimeric enzyme[J]. J Virol, 2014, 2588(14): 254 - 261
- Jin Y, Liu K, Peng J, et al. Rhizoma dioscoreae nipponicae polysaccharides protect HUVECs from H₂O₂ - induced injury by regulating PPARγ factor and the NADPH oxidase/ROS - NF - κB signal pathway[J]. Toxicol Lett, 2014, 232(1): 149 - 158
- 李荣,李俊,胡成穆.橙皮苷对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用及机制[J].中国药理学通报,2008,24(4):794-796
- 陈良金,石孟琼,贺海波,等.珠子参总皂苷对 H₂O₂ 诱导新生大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(8):860-867
- Zhang Q, Huang WD, Lv XY, et al. Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide - induced apoptosis through NF - κB and mitochondria - mediated signaling [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 654 (2): 142 - 149

(收稿日期:2015-11-01)

(修回日期:2015-12-18)