

白藜芦醇逆转过氧化氢引起的心肌细胞损伤研究

李玉梅

作者单位: 黑龙江省齐齐哈尔市中医医院 心内科 161000

【摘要】 目的 研究白藜芦醇是否能够逆转过氧化氢(H₂O₂)引起的心肌细胞损伤。方法 培养心肌 H9C2 细胞,应用不同浓度过氧化氢(100μM、200μM、300μM、400μM)构建细胞损伤模型,并用 25μM、50μM、100μM 白藜芦醇处理损伤的心肌细胞 6 小时后进行后续实验。应用 MTT 检测细胞活性;应用实时定量聚合酶链式反应(PCR)检测凋亡相关基因 Bax、Bcl₂ 的表达情况;应用乳酸脱氢酶(LDH)含量检测试剂盒检测上清中 LDH 水平;应用丙二醛(MDA)含量检测试剂盒检测 MDA 水平;应用超氧化物歧化酶(SOD)含量检测试剂盒检测 SOD 水平。结果 不同浓度过氧化氢降低心肌细胞活性,其中 400μM 最显著;此外 25μM、50μM、100μM 白藜芦醇能够提高 H₂O₂ 引起的心肌细胞活性降低;PCR 实验结果表明 25μM、50μM、100μM 白藜芦醇能够逆转 H₂O₂ 引起的 Bax 基因表达上调,而逆转 H₂O₂ 引起的 Bcl₂ 基因表达下调;试剂盒检测实验结果表明 25μM、50μM、100μM 白藜芦醇能够逆转 H₂O₂ 引起的心肌细胞分泌 LDH、MDA,而提高 H₂O₂ 引起的心肌细胞分泌 SOD 减少。结论 白藜芦醇能够逆转过氧化氢引起的心肌细胞损伤。

【关键词】 白藜芦醇 过氧化氢 心肌细胞 损伤 急性心肌梗死

doi: 10.3969/j.issn.1672-2671.2020.03.012

Resveratrol Reverses Myocardial Cell Damage Induced by Hydrogen Peroxide(Li Yumei. Qiqihar hospital of traditional Chinese medicine, Heilongjiang 161000, China.)

【Abstract】 Objective To investigate whether resveratrol could reverse myocardial cell damage caused by hydrogen peroxide (H₂O₂). **Methods** Myocardial H9C2 cells were cultured and different concentrations of hydrogen peroxide(100μM, 200μM, 300μM, 400μM) were applied to construct injured cell models. Then, the injured myocardial cells were treated with 25μM, 50μM, 100μM resveratrol for 6 hours. Then, follow-up experiments were performed. MTT was used to detect cell activity. Real-time quantitative polymerase chain reaction(PCR) was used to detect the expression of apoptosis-related genes Bax and Bcl₂. Lactate dehydrogenase(LDH) content detection kit was used to detect LDH levels in the supernatant. Dialdehyde(MDA) content detection kit detects MDA level. Superoxide dismutase(SOD) content detection kit is used to detect the SOD level. **Results** Different concentrations of hydrogen peroxide reduced the activity of cardiomyocytes, of which 400μM was the most significant. In addition, 25μM, 50μM and 100μM resveratrol could increase the decrease of myocardial cell activity caused by H₂O₂. PCR experiments showed that 25μM, 50μM, 100μM resveratrol can reverse the up-regulation of Bax gene expression caused by H₂O₂, and reverse the down-regulation of Bcl₂ gene expression caused by H₂O₂. The test results of the kit show that 25μM, 50μM, 100μM resveratrol can reverse the myocardial cell secretion caused by H₂O₂. LDH, MDA and increase H₂O₂ caused by cardiac muscle cells to reduce SOD secretion. **Conclusion** Resveratrol can reverse the damage of cardiomyocytes caused by hydrogen peroxide.

【Key words】 resveratrol, hydrogen peroxide, cardiomyocytes, injury, acute myocardial infarction

近年来,冠心病及其所诱发的急性心肌梗死的发病率逐年上升,已经发展成为危害人类生命健康的主要疾病之一^[1]。目前,临床上采用的治疗方法并不能完全缓解缺血症状。据报道,心肌细胞损伤是重要的病理基础,心肌细胞损伤会影响心脏正常功能,形成恶性循环,加重疾病的进程^[2-4]。

白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种天然非黄酮类的多酚类化合物,别名芪三酚,广泛存在于蓼科植物虎杖、豆科植物花生、葡萄科植物葡萄等多种植物中^[5]。白藜芦醇具有多种活性功能,如抗炎、抗菌、抗癌和抗氧化等药理活性,可预防肿瘤、降低血小板凝聚,并预防心血管疾病等^[6]。据报道,白藜芦醇对缺血再灌注心肌损伤和糖尿病心肌病变等多种心肌损伤具有明确的保护作用,但过氧化氢引起的心肌损伤有关的研究较少^[7-9]。本研究利用过氧化氢构建心肌细胞损伤模

型,观察白藜芦醇对过氧化氢(H₂O₂)引起心肌细胞损伤的保护作用。

1. 材料与方 法

1.1 细胞与细胞培养 心肌 H9C2 细胞购自北京北纳创联生物技术研究院。采用含 10% 胎牛血清(Invitrogen, 美国)的 DMEM 培养液(Hyclone, 美国)中培养,并置于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱(Thermo, 美国)中。实验中所有细胞为对数期的细胞。待细胞汇合度达到 90% 时,采用 0.25% 的胰蛋白酶(碧云天, 中国)进行消化和传代。

1.2 构建心肌细胞损伤模型 将 H₂O₂ 原液(Fresenius Kabi, 中国)用 PBS(索莱宝, 中国)配制成浓度为 10mM 的母液,再用 DMEM 培养基将母液配制成不同浓度的溶液,并加入每孔中。分组分别为对照组、100μM H₂O₂ 组、200μM H₂O₂ 组、

300 μ M H₂O₂ 组、400 μ M H₂O₂ 组,处理 6 小时后进行后续实验。

1.3 白藜芦醇处理 白藜芦醇购自美国 Sigma 公司,溶解于 DMSO 溶液中,使母液浓度达到 100mM。处理前将其溶于 DMEM 培养液中达到工作液浓度,混匀后使用。用 25 μ M、50 μ M、100 μ M 白藜芦醇处理损伤的心肌细胞 6 小时后,用于后续实验。

1.4 MTT 实验 心肌 H9C2 细胞按照 2000 个/孔的密度接种于 96 孔板,构建损伤模型及白藜芦醇加药处理后,每孔加入 20 μ l 添加 MTT 溶液,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 小时。4 小时后,弃净上清,加入 100 μ l 的 DMSO 溶液,在摇床上晃动 3 分钟,待结晶物溶解后,置于酶标仪(TECAN,瑞士)中检测吸光度值,波长为 490nm。

1.5 实时定量聚合酶链式(PCR)反应 应用 TRIzol 试剂(Invitrogen,美国)提取细胞总 RNA,应用 14 μ l RNA、2 μ l Enzyme mix、4 μ l 5 \times RT 缓冲液(Takala 公司,中国)合将 RNA 逆转录成 cDNA,逆转录反应条件为:42 $^{\circ}$ C 与 95 $^{\circ}$ C 分别反应 60 分钟与 5 分钟。应用 2 \times PCR 反应混合物 10 μ l,20 \times SYBR 1 μ l,cDNA 1 μ l,引物 0.5 μ l,H₂O 7.5 μ l,进行实时定量 PCR,PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 分钟,95 $^{\circ}$ C 10 秒,60 $^{\circ}$ C 1 分钟,循环 40 次。目的基因 Bcl₂ 和 Bax 的相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法。

1.6 LDH、MDA、SOD 水平检测 取细胞培养液上清,应用乳酸脱氢酶(LDH)含量检测试剂盒(Sigma,美国),采用二硝基苯胍显色法检测上清中 LDH 水平;应用丙二醛(MDA)含量检测试剂盒(碧云天,中国),采用硫代巴比妥酸法检测 MDA 水平;应用超氧化物歧化酶(SOD)含量检测试剂盒(碧云天,中国),采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD。所有步骤参照试剂盒说明书。

1.7 统计学方法 所有数据均表示为(均数 \pm 标准差),所有实验结果均重复至少 3 次,数据均采用 Graphpad 软件进行处理,两组间比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 时,认为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 不同浓度 H₂O₂ 对心肌细胞活性的损伤作用 心肌 H9C2 细胞给予不同浓度 H₂O₂,分组为对照组、100 μ M H₂O₂ 组、200 μ M H₂O₂ 组、300 μ M H₂O₂ 组、400 μ M H₂O₂ 组,处理 6 小时后进行 MTT 实验,检测不同浓度 H₂O₂ 对心肌细胞活性的损伤作用。结果表明,不同浓度 H₂O₂ 显著损伤心肌细胞活性,400 μ M H₂O₂ 效果最为显著(见图 1)。

2.2 白藜芦醇逆转 H₂O₂ 引起的心肌细胞活性降低 心肌 H9C2 细胞给予 400 μ M H₂O₂,并给予不同浓度(25 μ M、50 μ M、100 μ M)白藜芦醇,处理 6 小时后进行 MTT 实验,检测白藜芦醇是否能够逆转 H₂O₂ 引起的心肌细胞活性降低。结果表明,25 μ M、50 μ M、100 μ M 白藜芦醇能够提高 H₂O₂ 引起的心肌细胞活性降低(见图 2)。

2.3 白藜芦醇逆转 H₂O₂ 引起的心肌细胞凋亡 心肌 H9C2 细胞给予 400 μ M H₂O₂,并给予不同浓度(25 μ M、50 μ M、100 μ M)白藜芦醇,处理 6 小时后进行 MTT 实验,检测白藜芦

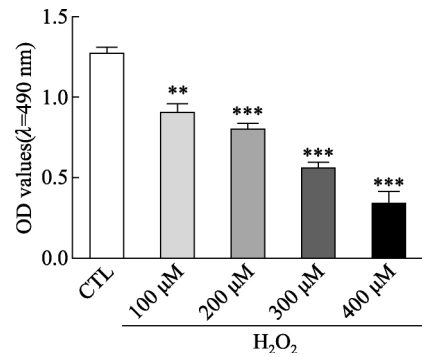


图 1 不同浓度 H₂O₂ 降低心肌细胞活性

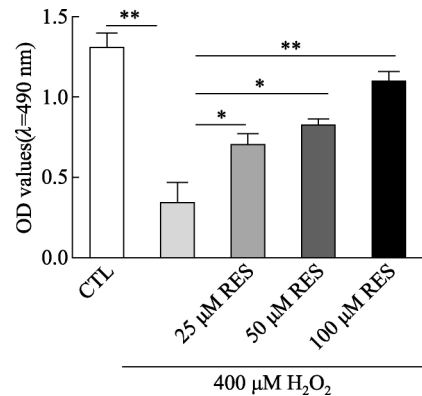


图 2 白藜芦醇提高 H₂O₂ 引起的心肌细胞活性降低

醇是否能够逆转 H₂O₂ 引起的心肌细胞凋亡。PCR 实验结果表明,25 μ M、50 μ M、100 μ M 白藜芦醇能够逆转 H₂O₂ 引起的 Bax 基因表达上调,而逆转 H₂O₂ 引起的 Bcl₂ 基因表达下调,提示 H₂O₂ 能够引起心肌细胞发生凋亡,而 25 μ M、50 μ M、100 μ M 白藜芦醇能够抑制 H₂O₂ 引起的心肌细胞凋亡(图 3A 和 3B)。

2.4 白藜芦醇对心肌细胞分泌 LDH、MDA、SOD 的影响 心肌 H9C2 细胞给予 400 μ M H₂O₂,并给予不同浓度(25 μ M、50 μ M、100 μ M)白藜芦醇,处理 6 小时后进行 MTT 实验,检测白藜芦醇是否能够调控心肌细胞分泌 LDH、MDA、SOD。结果表明,25 μ M、50 μ M、100 μ M 白藜芦醇能够逆转 H₂O₂ 引起的心肌细胞分泌 LDH、MDA,而提高 H₂O₂ 引起的心肌细胞分泌 SOD 减少,说明过氧化氢能够诱导心肌细胞氧化损伤,而白藜芦醇能够逆转这种损伤(见图 4)。

3. 结论

急性心肌梗死作为心血管病最严重的病变之一,患者总体死亡率呈上升趋势,严重危害患者的生命安全,影响了患者的生活质量^[10]。急性心梗后缺氧诱导的心肌细胞损伤是导致心脏功能受损的最重要细胞学基础^[11,12]。因此,本研究利用过氧化氢构建心肌细胞损伤模型,观察白藜芦醇对过氧化氢(H₂O₂)引起的心肌细胞损伤的保护作用。

本研究中,MTT 实验表明,不同浓度(100 μ M、200 μ M、300 μ M、400 μ M)H₂O₂ 显著损伤心肌细胞活性,400 μ M H₂O₂

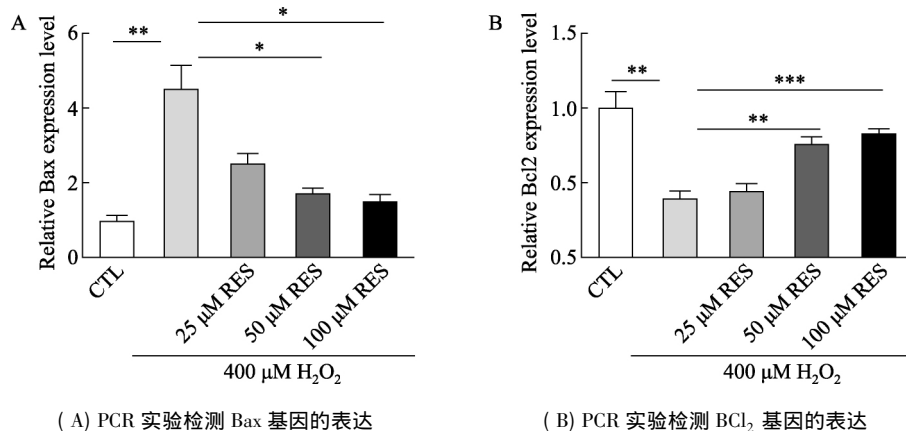


图 3 白藜芦醇抑制 H₂O₂ 引起的心肌细胞凋亡

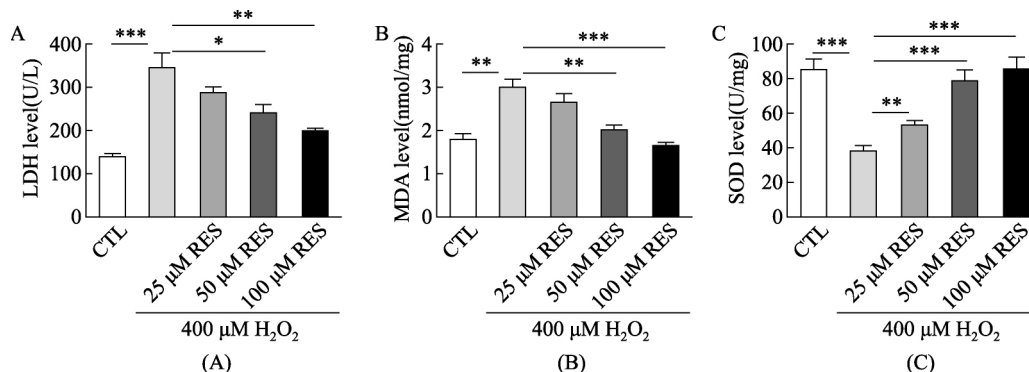


图 4 白藜芦醇调控心肌细胞分泌 LDH、MDA、SOD

效果最为显著。此外 25 μM、50 μM、100 μM 白藜芦醇能够提高 H₂O₂ 引起的心肌细胞活性降低。PCR 实验结果表明，25 μM、50 μM、100 μM 白藜芦醇能够逆转 H₂O₂ 引起的 Bax 基因表达上调，而逆转 H₂O₂ 引起的 Bcl₂ 基因表达下调，提示 H₂O₂ 能够引起心肌细胞发生凋亡，而 25 μM、50 μM、100 μM 白藜芦醇能够抑制 H₂O₂ 引起的心肌细胞凋亡。试剂盒检测实验表明 25 μM、50 μM、100 μM 白藜芦醇能够逆转 H₂O₂ 引起的心肌细胞分泌 LDH、MDA，而提高 H₂O₂ 引起的心肌细胞分泌 SOD 减少，说明过氧化氢能够诱导心肌细胞氧化损伤，而白藜芦醇能够逆转这种损伤。

综上所述，白藜芦醇能够逆转过氧化氢引起的心肌细胞损伤，对其产生保护作用，在后续实验中我们将进一步探讨白藜芦醇发挥保护作用的具体机制。

参 考 文 献

- 1 李兵. 丹参多酚酸盐对过氧化氢所致乳鼠心肌细胞损伤保护作用的研究[J]. 中医药信息, 2016, 33(5): 7-11.
- 2 史婷婷, 白建平, 梁月琴, 等. 芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 666-671.
- 3 刘艳霞, 顾云, 辛毅, 等. 大鼠急性心肌缺血再灌注损伤诱导细胞凋亡的实验研究[J]. 心肺血管病杂志, 2009, 28(3): 191-

- 194-217.
- 4 薛玉刚, 程锦, 曾广伟, 等. miR-214 对过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(17): 1692-1695.
- 5 朱华芳, 毛承誉, 曾华甦, 等. 白藜芦醇通过 Nrf2 途径发挥抗冠状动脉粥样硬化及心肌细胞保护作用[J]. 中国药师, 2019, 22(1): 10-14.
- 6 祁琨, 仲剑克, 张帆. 白藜芦醇通过 TLR4 通路对 H9C2 细胞高糖缺氧/复氧损伤的作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(13): 1972-1975.
- 7 杨新娟. 白藜芦醇对脓毒症大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 51-54.
- 8 Ma JQ, Chen ZW, Ma YJ, et al. MicroRNA-49a attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating NHE-1 expression and decreasing calcium overload[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2): 1747-1758.
- 9 Jiang Y, Feng YP, Tang LX, et al. The protective role of NR4A3 in acute myocardial infarction by suppressing inflammatory responses via JAK2-STAT3/NF-κB pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 517(4): 697-702.
- 10 Di Chiara A, Clagnan E, Valent F. Epidemiology and mortality in an Italian region after the adoption of the universal definition of myocardial infarction[J]. Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.), 2019(11): 12.

老年甲状腺功能减退症患者甲状腺功能与心肌酶的相关性研究

李 翔 祁 梅

作者单位: 大连市第五人民医院 内分泌科 116021

【摘要】 目的 分析老年甲状腺功能减退症(简称甲减)患者甲状腺功能与心肌酶的相关性。方法 将 2018 年 2 月至 2019 年 10 月大连市第五人民医院内分泌科收治的 71 例老年甲减患者设为观察组,选择同期在体检中心行健康体检的 70 例老年人作为对照组。两组患者均检测甲状腺功能(FT3、FT4、TSH)和心肌酶(LDH、CK、CK-MB、 α -HBDH),比较两组患者各项指标的差异,分析甲状腺功能与心肌酶相关性。结果 观察组 FT3、FT4 分别为(2.02 ± 0.41) pmol/L、(3.98 ± 0.64) pmol/L,明显低于对照组的(4.82 ± 1.26) pmol/L、(13.61 ± 3.72) pmol/L($P < 0.05$),观察组的 TSH 为(21.19 ± 3.73) U/L,明显高于对照组的(3.16 ± 0.82) U/L($P < 0.05$)。观察组的 LDH、CK、CK-MB 和 α -HBDH 分别为(172.12 ± 26.81) U/L、(203.48 ± 35.04) U/L、(22.12 ± 3.47) U/L 和(1743.08 ± 20.14) U/L,明显高于对照组的(64.95 ± 10.46) U/L、(63.06 ± 9.52) U/L、(11.75 ± 2.64) U/L 和(83.91 ± 13.52) U/L($P < 0.05$)。Pearson 相关性分析显示 LDH、CK、CK-MB、 α -HBDH 与 FT3 和 FT4 呈负相关,与 TSH 呈正相关。结论 老年甲减患者心肌酶各项指标明显升高,且与甲状腺功能具有明显相关性。检测心肌酶有助于评估老年甲减患者的病情及继发心脏损害情况。

【关键词】 老年 甲状腺功能减退症 甲状腺功能 心肌酶

doi: 10.3969/j.issn.1672-2671.2020.03.013

甲状腺功能减退症(简称甲减)是一种因多种因素导致甲状腺激素合成、分泌或生物效应不足而引起的全身代谢减低综合征,90%以上患者为原发性甲减^[1]。甲状腺激素可对机体多个组织器官产生生物学效应,其中心脏作为甲状腺激素重要靶器官之一^[2],甲状腺激素水平长期过高可导致心肌细胞产生损伤,而甲减患者出现心肌酶谱升高时,临床常误诊为心脏疾病,尤其是老年患者^[3]。因此,本研究同时检测老年甲减患者和健康体检者的甲状腺功能和心肌酶谱,旨在探讨甲状腺功能和心肌酶的相关性。

1. 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 2 月至 2019 年 10 月大连市第五人民医院内分泌科收治的老年甲减患者 71 例作为观察组,均符合《中国甲状腺疾病诊治指南》中关于甲减的诊断标准^[4]。男性 12 例,女性 59 例,年龄 62 ~ 73 岁,平均年龄为(68.57 ± 4.82)岁;所有患者近 1 个月内均无感染性疾病,无心脏病及心肌病、无肝肾功能不全。选择同期在体检中心行健康体检者 70 例作为对照组,男性 11 例,女性 59 例,年龄 61 ~ 72 岁,平均年龄为(68.05 ± 5.17)岁。两组患者性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经院伦理委员会批准,所有患者均知情并自愿参加。

1.2 方法 所有受试者均空腹 8 ~ 10 小时后,于清晨抽取静脉血 6ml,离心(3000r/min)10 分钟后取血清,采用罗氏公司

生产的 COBASE 602 型全自动化学发光仪检测甲状腺功能,包括游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)及促甲状腺激素(TSH),试剂盒由罗氏公司提供,严格按照说明书操作。采用美国贝克曼 DXI800 全自动生化分析仪检测心肌酶,包括乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和 α 羟丁酸脱氢酶(α -HBDH),试剂盒由美国贝克曼公司提供,严格按照说明书操作。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件处理分析数据,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料比较采用独立样本 t 检验。计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 Pearson 分析甲状腺功能与心肌酶的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 两组 FT3、FT4 和 TSH 水平比较 观察组的 FT3、FT4 水平明显低于对照组,而 TSH 水平明显高于对照组,两组 FT3、FT4 和 TSH 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组 FT3、FT4 和 TSH 水平比较

组别	FT3(pmol/L)	FT4(pmol/L)	TSH(U/L)
对照组	4.82 ± 1.26	13.61 ± 3.72	3.16 ± 0.82
观察组	2.02 ± 0.41	3.98 ± 0.64	21.19 ± 3.73
t	17.794	21.494	-39.767
P	0.000	0.000	0.000

作者简介:李翔,副主任医师,研究方向:内分泌及代谢病学。

11 Hu H, Wu JW, Yu XF, et al. Long non-coding RNA MALAT1 enhances the apoptosis of cardiomyocytes through autophagy inhibition by regulating TSC2-mTOR signaling[J]. Biol Res 2019, 52(1):58.
12 Li X, Mikrani R, Li CY, et al. An epicardial delivery of nitroglycerine

by active hydraulic ventricular support drug delivery system improves cardiac function in a rat model[J]. Drug Deliv Transl Res 2020, 10(1):23-33.

收稿日期:2020-3-10