

# 马齿苋总黄酮对缺氧/复氧致心肌细胞损伤的影响及机制研究

卢新华\*, 韩瑛, 王桂霞

(湘南学院基础医学部, 湖南 郴州 423000)

**[摘要]** 目的:研究马齿苋总黄酮(PTF)对缺氧/复氧致心肌细胞损伤的影响及机制。方法:利用体外培养的 H9c2 心肌细胞建立缺氧/复氧模型。将培养的心肌细胞分为 5 组:正常对照组、缺氧/复氧损伤模型组、缺氧/复氧损伤加 10 mg·L<sup>-1</sup> PTF 组、缺氧/复氧损伤加 20 mg·L<sup>-1</sup> PTF 组、缺氧/复氧损伤加 40 mg·L<sup>-1</sup> PTF 组。MTT 法检测心肌细胞存活率,荧光分光光度法测定心肌细胞内钙离子浓度,比色法测定心肌细胞培养液中一氧化氮(NO)浓度,流式细胞术检测心肌细胞凋亡率、RT-PCR 检测心肌细胞凋亡基因 Caspase-3 mRNA 的表达。结果:与 A/R 组比较,PTF 组(终质量浓度为 10,20,40 mg·L<sup>-1</sup>)均可明显提高缺氧/复氧损伤的心肌细胞存活率,降低 NO 浓度、细胞内钙离子浓度、细胞凋亡率[(18.25 ± 2.64, P < 0.05), (13.83 ± 1.52, 11.21 ± 1.76, P < 0.01)],PTF 组可有效减少缺氧/复氧损伤心肌细胞内 Caspase-3 mRNA 的表达。结论:PTF 可通过抑制心肌细胞内钙超载、减轻过量 NO 的细胞毒性作用、下调 Caspase-3 表达,从而保护心肌细胞。

**[关键词]** 马齿苋总黄酮; 心肌细胞; 缺氧/复氧; 凋亡; 钙离子; 一氧化氮; Caspase-3

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0226-06

**[doi]** 10.11653/syjf2013220226

## Anti-apoptotic Effects and Mechanisms of Portulaca Total Flavone on Cardiomyocytes after Anoxia/Reoxygenation Injury

LU Xin-hua\*, HAN Ying, WANG Gui-xia

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

**[Abstract]** **Objective:** To study effect of portulaca total flavone (PTF) on H9c2 myocardial cell injury induced by anoxia/reoxygenation (A/R) and its possible mechanism. **Method:** Myocytes cell model of A/R injury

**[收稿日期]** 20130620(002)

**[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;湖南省心脑血管天然药物研究重点实验室基金项目

**[通讯作者]** \* 卢新华,教授,从事药理学教学与科研,Tel:13873508421,E-mail:xnjlx\_h@126.com

- [8] 蔡文娥,张旭东,黄仁彬,等. 玉郎伞多糖对小鼠免疫功能调节作用[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1681.
- [9] 张士军,林军,蒋伟哲,等. 复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒的抑制作用[J]. 中药材,2007,30(2):191.
- [10] Mainimk, Bonic, Lee C K, et al. The role of virus-specific CD8<sup>+</sup> cell in liver damage and viral control during persistent B virus infection [J]. J Exp,2000,191(8):1269.
- [11] 张洪泉,葛慧,李心,等. 参灵益肝颗粒抗乙型肝炎病毒作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(3):244.
- [12] D Lavanchy. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, current and emerging prevention and control measures; a review [J]. J Viral Hepat, 2004, 11(2): 97.
- [13] 黄仁彬,黄权芳,张士军,等. 六月青总皂苷抗鸭乙型肝炎病毒作用研究[J]. 中药药理与临床,2010,26(1):37.
- [14] 黄仁彬,段小群,焦杨,等. 玉郎伞提取物对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用及其机制的研究[J]. 广西医科大学学报,2003,20(6):874.

[责任编辑 聂淑琴]

was established *in vitro* cultured. The cell viability was measured with MTT, Intracellular calcium concentration was determined by Fluorespectrophotometry, nitric oxide (NO) concentration were detected using colorimetric method, using flow cytometry to detect myocardial cell apoptosis rate, myocardial cell apoptosis gene expression of Caspase-3 mRNA detected by RT-PCR. **Result:** Compared with the A/R group, after pretreatment with 10, 20 and 40 mg·L<sup>-1</sup> PTF, PTF groups can significantly improve anoxia/reoxygenation injury of myocardial cell survival rate, reduce the concentration of NO, intracellular calcium ion concentration, the cell apoptosis rate ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), PTF groups can effectively reduce hypoxia/reoxygenation injury of myocardial Caspase-3 mRNA expression in the cell. **Conclusion:** PTF can protect the myocardial cells with inhibit myocardial intracellular calcium overload, reducing excessive NO cytotoxic effect and downgrading of caspase 3 mRNA expression.

[ **Key words** ] portulaca total flavone (PTF); myocardial cell; anoxia/reoxygenation (A/R); apoptosis; Ca<sup>2+</sup>; NO; Caspase-3

心肌细胞的缺氧/复氧 (anoxia/reoxygenation, A/R) 是心肌缺血/再灌注损伤的主要病理基础。目前认为, A/R 损伤与缺血再灌注损伤的实质有非常相似之处, 而再灌注损伤与氧自由基、Ca<sup>2+</sup> 超载和白细胞聚集有关<sup>[1-2]</sup>。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、降血脂<sup>[3]</sup>、增加膜脂流动性<sup>[4-5]</sup> 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<sup>[6-7]</sup>; 本课题组研究证实, PTF 可使缺氧复氧损伤后心肌细胞乳酸脱氢酶 (LDH), 肌酸激酶 (CK) 漏出明显减少, 丙二醛 (MDA) 含量降低, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性提高, 表明 PTF 可保护心肌细胞膜的完整性, 降低细胞损伤和提高细胞抗损伤能力, 减轻缺血再灌注损伤<sup>[8]</sup>。本文研究采用 H9c2 心肌细胞建立 A/R 模型, 探讨 PTF 对 A/R 致心肌细胞损伤的影响及其作用机制, 拓展新的药物功能, 寻找开发更有效的防治心脑血管疾病的药物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** H9c2 大鼠心肌细胞株购自北京中科院细胞中心。

**1.1.2 仪器** MCO-15AC 二氧化碳培养箱 (日本三

洋公司), CXK41 型荧光倒置显微镜 (日本 OLYMPUS), JHT-DDC 超净工作台 (山东省济南洁康设备厂), TGL-16G-A 型台式低温离心机 (上海安亭科学仪器厂), LS-B50L-I 型立式压力蒸汽灭菌器 (江阴滨江医疗设备有限公司), FA1604 型电子分析天平 (上海精密仪器公司), MK3 酶标仪 (雷勃公司), FACSC 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 970CRT 型荧光分光光度计 (上海精密科学仪器公司), PCR EDC-810 型梯度 PCR 仪 (北京东胜创新有限公司), Tanon360 型凝胶成像系统 (Tanon 公司), DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器厂), UPC-III-40 型优普纯水系统 (成都超纯科技有限公司)。

**1.1.3 试剂及药品** PTF 按笔者实验室过去的方法制备 (脱脂、醇提、聚酰胺树脂柱色谱分离纯化)<sup>[9-11]</sup>; 胰蛋白酶, 武汉亚法生物技术公司; DMEM 培养基, Thermo 公司出品; 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum FBS), 浙江天杭公司产品; Fura-2/AM, Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒, 碧云天公司产品; TRIZOL Reagent、第一链 cDNA 合成试剂盒, 天根公司产品; MTT (Sigma 公司) NO 试剂盒, 南京建成公司产品; 琼脂糖, 西班牙产品; 其余试剂均为市售分析纯产品。

**1.2 H9c2 大鼠心肌细胞的培养与实验分组**  
H9c2 心肌细胞株来源于大鼠胚胎期心肌组织, 在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、含 10% 胎牛血清 (FBS) DMEM 培养液中培养, 实验时取对数生长期细胞随机分成 5 组, 实验分组: ① 正常对照组: 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养; ② A/R 损伤模型组: 缺氧 3 h, 复氧 2.5 h; ③ PTF 组: 缺氧前 30 min 分别加入 PTF 终质量浓度为 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> 与细胞孵育 30 min, 然后依次进行缺氧 3 h, 复氧 2.5 h; 正常对照组, A/R 损伤模型组, 加入等量的 PBS, 每组 10 个

样本。

**1.3 心肌细胞 A/R 损伤模型的建立** 模拟缺氧液 (NaCl 137.0 mmol·L<sup>-1</sup>, KCl 12.0 mmol·L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mmol·L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.9 mmol·L<sup>-1</sup>, HEPES 4.0 mmol·L<sup>-1</sup>, 乳酸钠 20.0 mmol·L<sup>-1</sup>, 各成分溶于三蒸水中, 调 pH 6.8, 过滤除菌; 用高纯度氮气饱和 30 min。实验时弃去原培养液, 用缺氧液漂洗细胞 2 次, 换高浓度氮气饱和的缺氧液, 再向瓶内充氮气 60 s, 以驱除瓶内氧气, 密闭培养 3 h 后换用经 0.95 O<sub>2</sub> + 0.05 CO<sub>2</sub> 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 A/R 损伤模型。

**1.4 MTT 法测定心肌细胞存活率** 实验时按 2 × 10<sup>4</sup> 个/mL 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·L<sup>-1</sup> MTT 20 μL, 放于培养箱中继续培养 4 h 后弃培养液, 每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 150 μL, 震荡 10 min, 用酶标仪比色, 检测 490 nm 处的吸光度 (A), 以无细胞孔为空白对照, 每组 10 个复孔, 重复 3 次。以对照组为 100%。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{各实验组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{正常对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$$

**1.5 心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> [(Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>] 浓度测定**<sup>[12-13]</sup>

取细胞密度为 3 × 10<sup>5</sup> 个/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL。当心肌细胞融合达到 30% ~ 40% 时培养液更换为含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 48 h, 使细胞同步化后分为以下 6 组: ①正常对照组: DMEM + 20% FBS, ②氨氯地平 (Amlodipine) 组: 同对照组, 缺氧前 30 min 加入 Amlodipine 20 mg·L<sup>-1</sup> (终质量浓度); ③PTF 组: 同对照组, 缺氧前 30 min 加入 20 mg·L<sup>-1</sup> (终质量浓度) PTF 溶液; ④A/R 损伤模型组: 缺氧 3 h, 复氧 2.5 h; ⑤PTF + A/R 组: 缺氧前 30 min 分别加入 PTF 10, 20, 40 mg·L<sup>-1</sup> (终质量浓度) 与细胞孵育 30 min, 然后依次进行缺氧 3 h, 复氧 2.5 h; ⑥Amlodipine + A/R 组: 缺氧前 30 min 加入 Amlodipine 20 mg·L<sup>-1</sup> (终质量浓度) 与细胞孵

育 30 min, 然后依次进行缺氧 3 h, 复氧 2.5 h。复氧结束后, 将各组细胞直接刮离并移至离心管中, 1 000 r·min<sup>-1</sup>, 5 min, 弃上清, 以冷 PBS 4 mL 混悬细胞, Fura-2/AM 用 DMSO 配成 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 将培养的 VSMC 加入 5 μmol·L<sup>-1</sup> 的 Fura-2/AM 负载, 37 °C 恒温振荡孵育 30 min, 然后用不含 FBS 的 DMEM 培养液冲洗 3 次除去残存于细胞外的 Fura-2/AM, 用 970PRT 荧光分光光度计进行荧光强度测定, 激发波长 340, 380 nm, 发射波长 510 nm, 激发光栅 5 nm, 发射光栅 10 nm, 采样间隔 2 s。按下式计算细胞内钙离子浓度:  $[Ca^{2+}]_i = K_d \times F_0 / F_s \times (R - R_{max}) / (R_{max} - R)$ 。

**1.6 心肌细胞 NO 浓度的测定** 硝酸还原酶法测定心肌细胞培养液中一氧化氮 (NO) 浓度。实验分 5 组, 各组分别在 3 h 缺氧 2.5 h 复氧结束后, 取上清液按试剂盒操作步骤测定 NO 的含量。

**1.7 流式细胞术检测细胞凋亡** 实验时按 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL 细胞密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 待细胞完全贴壁后, 进行实验分组与模型建立 (同 1.4, 1.5)。复氧结束后按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒方法操作。最后加入 190 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞, 加入 10 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置 10 min, 随即进行流式细胞检测。

**1.8 RT-PCR 检测凋亡相关基因 Caspase-3 mRNA 表达** 实验时按 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL 细胞密度接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 待细胞完全贴壁后, 按 1.4, 1.5 进行实验。复氧结束后, PBS 冲洗, 按照 TransZol 常规方法提取总 RNA 后 260/280 nm 波长处检测其浓度, 取 10 μL RNA 进行逆转录合成 cDNA。GAPD h, Caspase-3 引物序列及产物片段大小见图 1。

PCR 反应体系如下 (25 μL): 反应液 2 × Taq Masremix 12.5 μL, 上游引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, 下游引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, cDNA 1 μL, DEPC 水 9.5 μL。按照上述顺序加样, 混匀, 放入 PCR 仪中扩增。

基因名称	引物序列正义链	引物序列反义链	产物长度
GAPD h	5'-tgctcgtgtgaagtccagag-3'	5'-tcaccatctccaggagcgag-3'	648 bp
Caspase-3	5'-atggaagcgaatcaatggac-3'	5'-tgctcagaagcacacaaac-3'	298 bp

预变性	变性	退火		延伸	延伸	保温
		Caspase-3	GAPD h			
95 °C	95 °C	61 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
4 min	30 s	30 s	30 s	1 min	10 min	

30 个循环

图 1 RT-PCR 检测凋亡相关基因 Caspase-3 mRNA 表达的反应参数

配制 2% 的琼脂糖胶,加 PCR 产物 5  $\mu\text{L}$ ,电泳 100 V,60 min,凝胶成像分析系统对目的 DNA 条带进行灰度扫描,分析每条基因条带的  $V$  值( $V = \text{平均} A/\text{条带面积}$ )。计算各样本 Caspase-3 强度与内参的比值( $\text{RV} = V_{\text{Caspase-3}}/V_{\text{GAPDH}}$ ),其比值反映 Caspase-3 mRNA 相对表达水平。

**1.9 统计学方法** 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数间比较采用  $t$  检验,所有统计分析均使用 SPSS 16.0 软件包计算分析。 $P < 0.05$  为具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 PFT 对 A/R 损伤心肌细胞存活率的作用** 与正常组比较,心肌细胞 A/R 损伤后存活率明显下降( $P < 0.01$ )表明心肌细胞明显损伤;与模型组比较,PFT 高、中、低剂量组心肌细胞存活率明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),而且存在明显的剂量效应关系,表明 PFT 可明显提高心肌细胞存活率。结果见表 1。

**2.2 PTF 对正常心肌细胞内钙离子  $[(\text{Ca}^{2+})_i]$  浓度的影响** 正常对照组与 PTF 组( $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的心肌细胞内钙离子浓度比较接近,其差异无显著性意义;PTF 组与 Amlodipine 组的心肌细胞内钙离子浓度比较接近,其差异无显著性意义。结果见表 2。

表 1 PFT 对 A/R 损伤心肌细胞存活率的作用( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	细胞存活率 $/\%$
正常对照	-	$0.684 \pm 0.123$	100
h/R	-	$0.287 \pm 0.054^{1)}$	$42.14 \pm 3.82^{1)}$
h/R + PFT	10	$0.412 \pm 0.047^{2)}$	$60.23 \pm 4.26^{2)}$
	30	$0.495 \pm 0.076^{3)}$	$72.36 \pm 5.27^{3)}$
	100	$0.587 \pm 0.051^{3)}$	$85.81 \pm 4.84^{3)}$

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 A/R 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 PTF 对心肌细胞 A/R 损伤后细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$(\text{Ca}^{2+})_i / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照	-	$132.24 \pm 17.64$
Amlodipine	20	$129.70 \pm 15.73$
PTF	20	$137.45 \pm 20.17$
A/R	-	$693.85 \pm 46.27^{1)}$
PTF + A/R	10	$531.47 \pm 34.82^{2)}$
	20	$458.61 \pm 42.51^{3)}$
	40	$319.53 \pm 38.24^{3)}$
Amlodipine + A/R	20	$281.32 \pm 35.63^{3)}$

**2.3 PTF 对心肌细胞 A/R 损伤后细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响** 结果显示,A/R 组心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较正常对照组明显增高( $P < 0.01$ ),表明 A/R 损伤后细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显升高,出现  $\text{Ca}^{2+}$  超载;PTF 组心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显低于 A/R 组( $P < 0.05, P < 0.01$ ),说明 PTF 可以缓解 A/R 损伤后心肌细胞内钙超载,减轻损伤。结果见表 2。

**2.4 心肌细胞 NO 浓度** 结果显示,A/R 组 NO 浓度较正常对照组明显增高( $P < 0.01$ ),而 PTF 组 NO 浓度明显低于 A/R 组( $P < 0.05, P < 0.01$ ),说明 PTF 可以降低或抑制 A/R 损伤后 NO 浓度,减轻损伤。结果见表 3。

**2.5 PTF 对缺氧/复氧诱导心肌细胞凋亡率的影响** 流式细胞仪检测结果显示,与 control 组比较,A/R 组细胞凋亡率差异非常显著,具有统计学意义( $P < 0.01$ );与 A/R 组比较,PTF 低、中、高剂量组均可明显降低心肌细胞凋亡率( $P < 0.05, P < 0.01$ ),其差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明 PTF 可有效降低缺氧/复氧损伤的 H9c2 心肌细胞的凋亡率,且具有一定的浓度依赖性(表 4)。

表 3 PTF 对心肌细胞 A/R 损伤后细胞内 NO 浓度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照	-	$64.53 \pm 4.22$
A/R	-	$143.62 \pm 9.42^{1)}$
A/R + PFT	10	$112.23 \pm 6.15^{2)}$
	20	$91.17 \pm 4.48^{3)}$
	40	$78.61 \pm 5.27^{3)}$

表 4 PTF 对缺氧/复氧诱导心肌细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

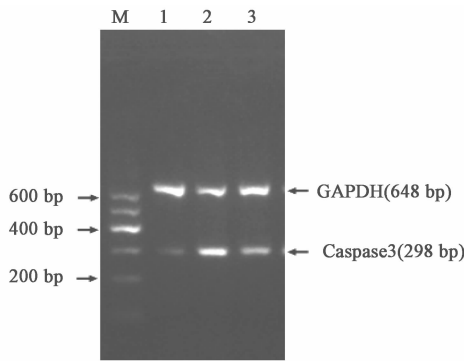
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/ $\%$
正常对照	-	$7.67 \pm 0.83$
A/R	-	$39.29 \pm 3.78^{1)}$
PTF	10	$18.25 \pm 2.64^{2)}$
	20	$13.83 \pm 1.52^{3)}$
	40	$11.21 \pm 1.76^{3)}$

**2.6 PTF 对大鼠 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤细胞内凋亡相关基因 Caspase-3 mRNA 表达的影响** 结果显示,与 C 组比较,A/R 组细胞 Caspase-3 mRNA 的表达差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),PTF 组可减少心肌细胞 Caspase-3 mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),说明 PTF 可有效减少缺氧/复氧损伤的 h9c2 心肌细胞内 Caspase-3 mRNA 的表达(表 5,图 2)。

表 5 PTF 对大鼠 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤细胞内凋亡  
相关基因 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{RV}_{\text{Caspase-3}}$
正常对照	-	0.441 ± 0.015
A/R	-	0.639 ± 0.062 <sup>2)</sup>
PTF	40	0.513 ± 0.047 <sup>1,3)</sup>

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 A/R 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。



1. Control; 2. A/R; 3. A/R + PTF 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 PTF 对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤细胞内凋亡  
相关基因 Caspase-3 mRNA 表达的影响

### 3 讨论

临床上冠状动脉旁路移植术 (CABG)、心血管  
栓塞再通术等均涉及到心肌缺血再灌注损伤,且发  
病常常多见于中老年人。现已证明,氧自由基的形  
成、细胞死亡和凋亡、钙超载是心肌缺氧/复氧引起  
细胞损伤的关键环节和主要机制。目前普遍认为干  
预心肌细胞凋亡对防治心肌缺血再灌注损伤有重要  
意义。

缺血再灌注过程中,心肌细胞凋亡的发生很可  
能与缺血/再灌注损伤所致的细胞钙超载及氧自由  
基作用有关。心肌缺氧/复氧损伤后,细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -  
ATPase 的活性发生改变<sup>[14-15]</sup>,使  $\text{Ca}^{2+}$  大量进入  
细胞内,致钙超载。细胞内钙离子增加使线粒体 ATP  
生成减少,进一步影响心肌细胞代谢。同时,细胞内  
游离钙离子的增加激活磷脂酶、蛋白酶、核酸内切酶  
等钙依赖性蛋白水解酶,直接损害细胞质膜,分解细  
胞骨架和核酸,或通过氧自由基大量增加,间接损害  
细胞功能,引起心肌细胞能量耗竭直至不可逆损  
伤<sup>[16-17]</sup>。本实验采用缺氧缺糖-复氧复糖溶液制备  
心肌细胞损伤模型,是为了更接近模拟整体动物的  
心肌缺血-再灌注损伤过程。研究结果显示,心肌  
细胞缺氧 3 h,复氧 2.5 h 后细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度大量增  
加,表明缺氧/复氧后引发了钙超载,其可能发生机  
制是:①心肌细胞缺氧时,氧供和氧化底物减少,

ATP 生成障碍,则 ATP 依赖性的肌纤维膜钙泵功能  
降低,导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  清除能力下降,致细胞内  
 $\text{Ca}^{2+}$  超载;而  $\text{Ca}^{2+}$  超载可进一步损伤线粒体,导致  
线粒体呼吸功能受损,加重 ATP 生成障碍,从而形  
成恶性循环。②缺氧导致心肌细胞内 pH 上升,细  
胞加强  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  交换,以减轻酸中毒程度,但细胞内  
 $\text{Na}^+$  浓度升高又可激活  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  交换,反过来引起  
细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高。

本实验研究发现,在缺氧/复氧前加入 PTF 进  
行预处理后,细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显低于缺氧/复  
氧组,提示 PTF 预处理能有效减轻缺氧/复氧后细  
胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  超载,可能是由于:PTF 抑制心肌细胞  
膜 L-型钙通道,逆转缺氧/复氧损伤所致的细胞内  
钙超载,减轻细胞膜损伤,此作用也可认为 PTF 具  
有钙离子通道阻断作用,但其具体机制有待进一步  
探讨。结果还显示,缺氧/复氧组 NO 分泌量明显高  
于正常对照组,可能与 iNOS 活性增高,导致 NO 合  
成的持续增加有关。此时,NO 作为细胞毒性介质,  
与  $\text{O}^{-2}$  相互作用生成 ONOOH,诱导线粒体受损,导  
致细胞凋亡和死亡。PTF 各剂量组均能显著地降低  
NO 水平,并呈剂量依赖性,从而达到缓解特定病理  
性损害的作用。

心肌细胞凋亡的发生还可能与组织中抗细胞凋  
亡基因与促凋亡基因的表达失衡有关,同时也受细  
胞周围的刺激信号所诱导或抑制。目前普遍认为  
Caspase-3 是凋亡中的关键蛋白酶,在细胞凋亡的执  
行阶段,Caspase-3 负责底物的蛋白水解,同时  
Caspase-3 可激活其他许多 Caspase<sup>[18-19]</sup>。本研究发  
现,在缺氧/复氧后,心肌细胞凋亡率明显增加,  
Caspase-3 mRNA 表达明显增强,证实了缺氧/复  
氧损伤是心肌细胞凋亡的重要诱发因素,心肌细胞  
相关基因的表达在缺血-再灌注的心肌细胞凋亡中起  
着重要的作用。应用 PTF 预处理后,心肌细胞凋  
亡率明显降低,同时 Caspase-3 mRNA 表达明显减少,  
结果表明 PTF 可以通过抑制 Caspase-3 激活,降  
低心肌细胞凋亡率,从而减轻缺氧/复氧所致心肌  
细胞损伤。

综上所述,心肌细胞在发生急性缺氧/复氧损伤  
后,心肌细胞生存率明显降低、细胞凋亡率明显增  
加、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加、细胞上清液中 NO 的分  
泌也增加,凋亡的发生与细胞内钙超载、NO 增多、  
Caspase-3 mRNA 表达增多是相关的。缺氧/复氧前  
给予 PTF 预处理,能提高心肌细胞生存率、降低细  
胞凋亡率,减轻细胞内钙超载,减少 NO 的分泌。

实验表明 PTF 可明显减轻缺氧/复氧致心肌细胞损伤,其作用机制可能与抑制细胞内钙超载,减轻过量 NO 的细胞毒性作用、抑制 Caspase-3 mRNA 表达有关。

### [参考文献]

[1] 张英,黄维义,林燕.姜黄素抗心肌缺血/再灌注损伤作用及其机制研究[J].中国现代医学杂志,2007,17(22):2736.

[2] 李欣志,刘建勋.缺血/再灌注过程中心肌细胞自噬研究进展[J].中国药理学通报,2008,24(6):704.

[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.

[4] 陈承杰.马齿苋提取物抗缺氧作用及其机制的研究[D].上海:第二军医大学,2010.

[5] 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].中国药学杂志,2004,39(8):58.

[6] 欧芹,魏晓东.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.

[7] 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.

[8] 卢新华,黄煌,谭斌,等.马齿苋总黄酮对缺血再灌注心肌细胞损伤的保护作用[J].湘南学院学报:医学版,2012,14(4):1.

[9] 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.

[10] 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].中国药学杂志,2004,39(8):587.

[11] 曹跃,王丽,周翎,等.火绒草中总黄酮的纯化工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):38.

[12] 张均田.现代药理实验方法[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:1318.

[13] 刘遂心,李彤,孙明.左旋氨氯地平对缺氧心肌细胞钙信号系统的影响[J].中国新药与临床杂志,2005,24(4):281.

[14] 吴锦波,吴平生.心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J].医学综述,2011,17(19):2961.

[15] 宝鲁尔.心肌缺血再灌注损伤发生机制研究进展[J].内蒙古民族大学学报,2009,15(2):126.

[16] 樊凯芳,梁晓东,李晓亮,等.三化汤对脑缺血再灌注大鼠脑组织胞质附着蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):216.

[17] Kovacevic M, Simic O, Jonjic N, et al. Apoptosis and cardiopulmonary bypass [J]. Card Surge, 2007, 22B:129.

[18] Marciniak S, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease [J]. Physiol Rev, 2006,86:1133.

[19] 蒋胜兰,朱丹妮,余伯阳,等.生脉注射液对人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤保护的主要活性部位研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(13):88.

[责任编辑 邹晓翠]

## 《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医药科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2014 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www.ejcm.com.cn](http://www.ejcm.com.cn) 或 [www.中国中药杂志.com](http://www.中国中药杂志.com)。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。