

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.09.001
文章编号: 1005- 8982 (2017) 09- 0001- 07

基础研究·论著

天麻素抗心肌氧化应激损伤的作用机制研究*

郝帅林¹, 张媛¹, 魏艳杰¹, 李朝阳¹, 肖童¹, 苏琦¹, 苗雨欣¹, 徐菁蔓¹, 郝志梅², 田炜¹
[1. 华北理工大学 医学实验研究中心(国家科技部老年医学国际科技合作基地),
河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学 管理学院, 河北 唐山 063000]

摘要:目的 探讨天麻素在大鼠心肌细胞氧化应激损伤时是否通过线粒体机制发挥心脏保护作用。**方法** 首先使用过氧化氢 H_2O_2 $650 \mu mol/L$ 处理大鼠心脏组织来源的 H9c2 心肌细胞, 复制氧化应激损伤模型。分别使用 50.0、10.0、1.0 和 0.1 $\mu mol/L$ 天麻素预处理, 利用共聚焦显微镜成像技术, 检测线粒体膜电位的变化, 四甲基偶氮唑盐比色法检测天麻素对细胞存活率的影响, Western blot 检测天麻素对糖原合成酶激酶 - 3β (GSK- 3β)、蛋白激酶 - B (Akt) 活性的影响。**结果** 不同浓度的天麻素预处理均能减弱 H_2O_2 引起的四甲基罗丹明乙酯荧光强度降低程度, 且与模型组 0.30 ± 0.25 比较, 10.0 $\mu mol/L$ 天麻素预处理组 0.79 ± 0.08 作用最为明显。天麻素 10.0 $\mu mol/L$ 预处理能提高 H9c2 细胞的存活率, 使 p-GSK- 3β (Ser⁹)、p-Akt (Ser⁴⁷³) 蛋白水平升高, 而磷脂酰肌醇 - 3 激酶 (PI3K) 抑制剂渥曼青霉素可以阻断其发挥作用。**结论** 天麻素能够减轻由 H_2O_2 引发的 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤, 其可能是通过 PI3K/Akt 途径使 GSK- 3β 失活, 抑制 mPTP 开放以发挥心脏保护作用。

关键词: 天麻素; 线粒体通透性转换孔; 氧化应激损伤; 磷脂酰肌醇 - 3 激酶 / 蛋白激酶 - B

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Protective effect of gastrodin against myocardial oxidative stress damage*

Shuai-lin Hao¹, Yuan Zhang¹, Yan-jie Wei¹, Zhao-yang Li¹, Tong Xiao¹,
Qi Su¹, Yu-xin Miao¹, Jing-man Xu¹, Zhi-mei Hao², Wei Tian¹

[1. Medical Experimental Research Center (International Science and Technology Cooperation Base of Geriatric Medicine), North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. College of Management, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China]

Abstract: Objective To investigate whether gastrodin plays a protective role in rat myocardial cell oxidative stress by mitochondrial pathway. **Methods** H_2O_2 ($650 \mu mol/L$) was used to induce oxidative stress injury of H9c2 cells, and the pretreatment concentration of gastrodin was 50.0, 10.0, 1.0 and 0.1 $\mu mol/L$ respectively. Laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to detect mitochondrial membrane potential. MTT method was used to test the effect of gastrodin on cell survival rate. Western blot was used to observe the influences of gastrodin on the activity of glycogen synthase kinase 3β (GSK- 3β) and protein kinase B (Akt). **Results** Pretreatment of gastrodin with different concentrations could prevent the reduction of fluorescence intensity of tetramethylrhodamine ethyl ester caused by H_2O_2 , and the 10.0 $\mu mol/L$ gastrodin pretreatment group had the most obvious effect compared with the model group [0.79 ± 0.08] vs [0.30 ± 0.25]. Pretreatment with gastrodin

收稿日期: 2016-07-05

* 基金项目: 河北省自然科学基金 (No: H2012401036); 河北省高等学校科学技术研究项目 (No: QN20131072); 华北理工大学大学生创新项目 (No: X2016214)

[通信作者] 田炜, E-mail: twzhm@aliyun.com; Tel: 13513451200

(10.0 $\mu\text{mol/L}$) improved the survival rate of H9c2 cells ($P < 0.05$) and increased protein expressions of p-GSK-3 β (Ser⁹) and p-Akt (Ser⁴⁷³); whereas PI3K inhibitor, Wortmannin penicillin (Wort), could block this effect.

Conclusions Gastrodin can alleviate oxidative stress damage of H9c2 myocardial cells caused by H₂O₂. It may inactivate GSK-3 β through PI3K/Akt pathway, thereby play a cardiac-protective role through inhibition of mPTP opening.

Keywords: gastrodin; mitochondrial permeability transition pore; oxidative stress injury; phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B(Akt)

心肌缺血再灌注损伤 myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 是指在短时间心肌血供中断后,一定时间内恢复血供,原缺血心肌发生较血供恢复前更严重的损伤。目前普遍认为,在再灌注损伤发生、发展过程中,氧化应激是很重要的机制之一^[1]。磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/ 蛋白激酶 B protein kinase B, Akt) 信号途径是氧化应激过程中很重要的一条通路^[2]。

天麻素是从兰科植物天麻的干燥茎块中提炼出含量最高的单体成份,具有抑制心肌细胞凋亡,增加心肌血供,调节血管舒缩功能的作用^[3]。大量动物实验表明,天麻素在 MIRI 中能减少炎症因子、提高超氧化物歧化酶 superoxide dismutase, SOD) 含量、减轻 Ca²⁺ 超载,说明天麻素在 MIRI 病理过程中具有一定的保护作用^[4],但是其具体保护机制尚不明确。因此,本研究采用过氧化氢 H₂O₂ 650 $\mu\text{mol/L}$ 处理来源于大鼠胚胎心脏的 H9c2 心肌细胞,复制氧化应激损伤模型,探讨天麻素是否具有抗心肌缺血再灌注损伤作用,以及该保护作用是否是通过 PI3K/Akt 通路及线粒体保护机制实现的,以期为天麻素的临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

大鼠胚胎心脏组织来源的 H9c2 细胞株购自美国 ATCC 公司。

1.2 试剂与仪器

实验药物天麻素由北京百威灵科技有限公司提供(纯度 >99%), H₂O₂ (批号 STBB6350) 购自美国 Sigma 公司, 荧光染料四甲基罗丹明乙酯 Tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE) 购自美国 Invitrogen 公司, 渥曼青霉素 Wortmannin, Wort) 购自北京索莱宝公司, 兔源单克隆抗体 p-Akt (Ser⁴⁷³)、p-GSK-3 β (Ser⁹) 及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 鼠源微管蛋白 (Tubulin) 多克隆抗体购自北京中

杉金桥生物有限公司, 改良 Eagle 培养基 dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、四甲基偶氮唑盐比色法 [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 细胞增殖及毒性检测试剂盒、聚氰基丙烯酸正丁酯 Butylacrylate, BCA) 蛋白浓度检测试剂盒、电化学发光免疫分析 electrogenerated chemiluminescence, ECL) 发光检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术研究所, 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳 CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Forma 公司, FV 1000 激光扫描共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司, 生物安全柜购自新加坡 ESCO 公司, 5804R 高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司, JY200C 电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司, 酶标仪和半干转运系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗细胞 2 遍, 用 5 ml 含 10% 胎牛血清、双抗的 DMEM 完全培养基重悬 H9c2 细胞并转入 50 ml 培养瓶中, 放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 培养 24~48 h 待细胞贴壁达培养瓶底壁面积 >90% 时, 选生长状态良好的 H9c2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶 200 μl 消化 2 min, 用 10 ml 培养基终止消化, 反复轻轻吹打制成细胞悬液, 传代 2、3 次/周。

1.3.2 实验分组及处理方法 实验共分为两部分。第一部分为天麻素抗心肌氧化应激损伤作用研究, 分为: ① 对照组: 正常心肌细胞不给予任何处理; ② H₂O₂ 组: 只加 H₂O₂ 650 $\mu\text{mol/L}$ 处理 20 min; ③ 天麻素 +H₂O₂ 组: 加入天麻素 (50.0、10.0、1.0 和 0.1 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 20 min, 加入 H₂O₂ 650 $\mu\text{mol/L}$ 处理 20 min。后面的研究中, 天麻素 +H₂O₂ 组均加入天麻素 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理 20 min 后再加入 H₂O₂ 650 $\mu\text{mol/L}$ 处理 20 min; ④ 天麻素组: 只加天麻素 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理 20 min。第二部分为天麻素抗心肌氧化应激损伤的机制研究, 分为: ① H₂O₂ 组: 只加 H₂O₂ 650 $\mu\text{mol/L}$ 处理 20 min; ② 天麻素 +H₂O₂ 组: 加入天麻

素 10 μ mol/L 预处理 20 min,加入 H₂O₂ 650 μ mol/L 处理 20 min;② PI3K 抑制剂(Wort)+天麻素+H₂O₂ 组:加入 PI3K 抑制剂 100 nmd/L 处理 10 min,天麻素 10 μ mol/L 处理 20 min,H₂O₂ 650 μ mol/L 处理 20 min;③ 抑制剂(Wort)组:只加抑制剂 100 nmd/L 处理 10 min。

1.3.3 检测线粒体膜电位 将生长密度达 80%~90%、状态良好的细胞置于超净工作台内,重复上述细胞培养步骤,胰酶消化后,用完全培养基悬浮后移到 50 ml 离心管,在低速离心机上 1000 r/min 离心 5 min,弃上清液后用新的完全培养基重悬,混合均匀后传入共聚焦专用小皿,每个小皿 2 ml,培养 24 h,实验前弃去培养基,用 PBS 冲洗 3 次,然后用台式液 2 ml 氯化钠 140.0 mmd/L,氯化钾 6.0 mmd/L,氯化镁 1.0 mmd/L,氯化钙 1.0 mmd/L,乙烷磺酸 5.0 mmd/L,葡萄糖 5.8 mmd/L,pH=7.4)于培养箱中继续培养 2 h。加入特异性荧光标记物 TMRE 100 nmd/L,2 μ l 孵育 20 min,上镜观察,使用 Delta T open Dish Systems 特殊恒温装置使温度维持在 37℃。激发光波长和发射光波长分别为 543 和 560 nm。镜下观察不同时间红色荧光的变化,采集 H₂O₂ 处理前及处理 20 min 后图像,并使用 Image J 软件对其荧光强度进行统计学分析。

1.3.4 MTT 法检测细胞的存活率 选取对数生长期且细胞状态良好的细胞重复细胞培养步骤,待其消化、离心重新悬浮后进行细胞计数,稀释为 1 \times 10⁴ 个/ml,96 孔板加入 100 μ l/孔,约 1000 个细胞,培养 24~48 h,待其长到 75%左右后按照各组要求处理,处理后把液体全部吸出,PBS 冲洗,重新加入完全培养基 100 μ l,MTT 溶液 10 μ l,在细胞培养箱内继续培养 4 h 后加入二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO) 150 μ l,15 min 后显微镜下观察到蓝色结晶物完全溶解,用酶标仪在 570 nm 处测定每孔光密度值。计算细胞的存活率,细胞存活率(%)=实验组光密度(optical density,OD)值/对照组 OD 值 \times 100%。

1.3.5 Western blot 检测 p-Akt(Ser⁴⁷³)和 p-GSK-3 β (Ser⁹)蛋白表达 细胞培养 48 h 后弃培养基,PBS 冲洗 2 遍,台式液孵育 2 h,根据分组分别进行处理,PBS 冲洗 3 次,加入 40 μ l 裂解液冰上裂解 30 min,收集细胞于 Eppendorf 管中,超声破碎 15 s,4℃、12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,使用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)法进行蛋白定量。

以 50 μ g/孔上样,进行电泳并转膜,使用 10%脱脂奶粉室温摇床慢摇封闭 2 h,孵育 p-Akt(Ser⁴⁷³)和 p-GSK-3 β (Ser⁹)相对应的一抗(1:1 000 稀释),4℃摇床慢摇过夜(8~12 h),Tris-HCl 缓冲盐溶液洗 3 次,10 min/次,加相应二抗(1:1 000 稀释)室温摇床慢摇 2 h,Tris-HCl 缓冲盐溶液洗 3 次,10 min/次,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)荧光显色,用 Image J 进行灰度扫描及定量分析。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较用完全随机设计的单因素方差(One-way,ANOVA)分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 天麻素对心肌细胞氧化应激损伤的影响

2.1.1 天麻素对心肌细胞线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,mPTP)开放的影响 激光共聚焦显微镜结果显示,与对照组(0.92 \pm 0.07)比较,H₂O₂ 组处理后 TMRE 荧光强度(0.30 \pm 0.08)降低,提示 650 μ mol/L H₂O₂ 可以使 mPTP 开放,引起线粒体损伤。而不同浓度 0.1、1.0、10.0 和 50.0 μ mol/L)天麻素预处理后的荧光强度值[分别为(0.40 \pm 0.13)(0.66 \pm 0.15)(0.79 \pm 0.08)和(0.51 \pm 0.07)]与 H₂O₂ 组比较,可以不同程度地减弱 H₂O₂ 引起的 TMRE 荧光强度降低程度,经方差分析,差异有统计学意义($F=26.062,P=0.000$),说明天麻素能够减轻由 650 μ mol/L H₂O₂ 引起的线粒体损伤,且天麻素浓度为 10.0 μ mol/L 时,该保护作用最为显著。见附表和图 1。

2.1.2 天麻素对心肌细胞存活率的影响 MTT 法测定心肌细胞的存活率结果显示,各组的 OD 值比较,经方差分析,差异有统计学意义($F=45.844,P=0.000$)。H₂O₂ 组(0.56 \pm 0.05)与对照组(0.75 \pm 0.06)比较,差异有统计学意义($t=12.246,P=0.000$),H₂O₂ 组心肌细胞的存活率下降。天麻素 10.0 μ mol/L)+H₂O₂ 组(0.64 \pm 0.03)与 H₂O₂ 组比较,差异有统计学意义($t=11.629,P=0.000$),天麻素 10.0 μ mol/L)+H₂O₂ 组心肌细胞的存活率较高。天麻素组(0.76 \pm 0.06)与 H₂O₂ 组比较,差异有统计学意义($t=13.659,P=0.000$),天麻素组心肌细胞的存活率较高。表明天麻素具有抗心肌细胞氧化应激损伤保护作用。

附表 各组 TMRE 荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度比值	t_1 值	P_1 值	t_2 值	P_2 值
对照组 $n=9$	0.92± 0.07	-	-	-	-
H ₂ O ₂ 组 $n=8$	0.30± 0.08	11.635	0.000	-	-
天麻素 0.1μ mol/L)+H ₂ O ₂ 组 $n=10$	0.40± 0.13	2.339	0.021	3.316	0.000
天麻素 1.0μ mol/L)+H ₂ O ₂ 组 $n=10$	0.66± 0.15	2.063	0.042	6.326	0.000
天麻素 10.0μ mol/L)+H ₂ O ₂ 组 $n=9$	0.79± 0.08	2.936	0.004	12.276	0.000
天麻素 50.0μ mol/L)+H ₂ O ₂ 组 $n=8$	0.51± 0.07	2.346	0.020	5.369	0.000

注: t_1 、 P_1 : 与对照组比较; t_2 、 P_2 : 与 H₂O₂ 组比较

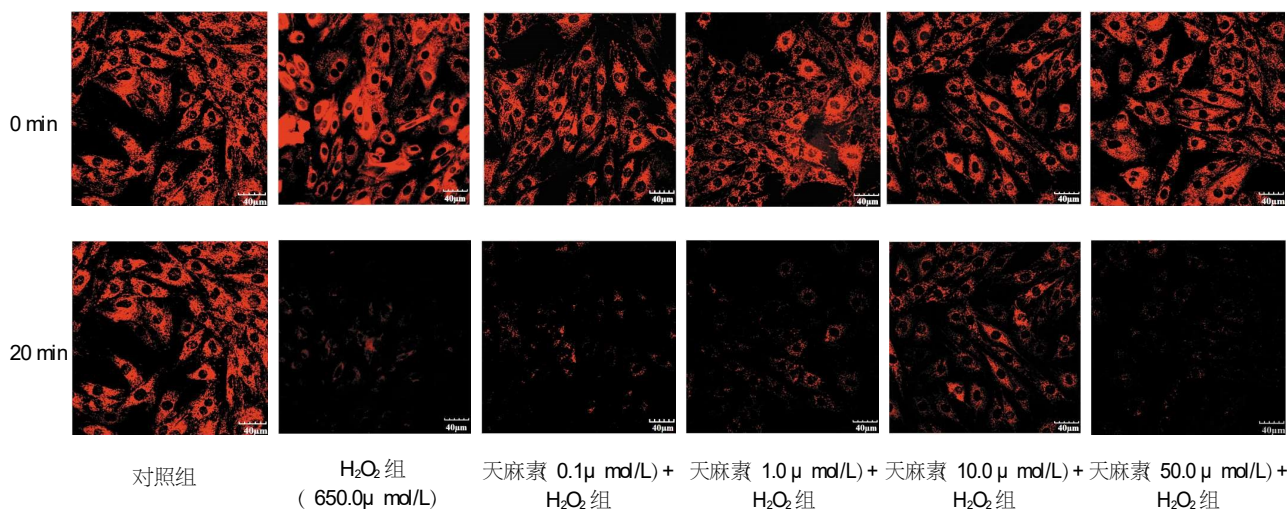


图 1 不同浓度天麻素对 TMRE 荧光强度的影响 ($\times 40$)

2.1.3 天麻素对 p- Akt (Ser⁴⁷³) 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示, p- Akt (Ser⁴⁷³) 蛋白在对照组、H₂O₂ 组、天麻素 +H₂O₂ 组表达为 (100.0± 14.1)、(45.0± 10.2) 和 (69.0± 8.2) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=4.630, P=0.022$)。与对照组比较, H₂O₂ 组的 p- Akt (Ser⁴⁷³) 表达下降 ($P<0.05$), 而天麻素 (10.0μ mol/L) 预处理能够减轻 H₂O₂ 降低 Akt 活性的作用 ($P<0.05$)。提示 Akt 可能参与天麻素抗心肌细胞氧化应激损伤保护作用。见图 2。

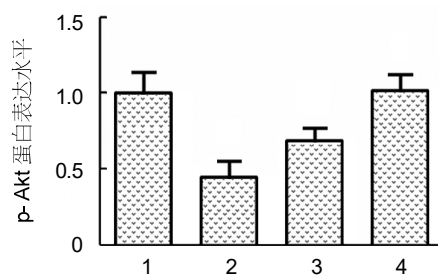
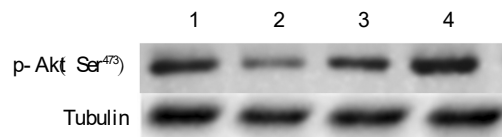
2.1.4 天麻素对 p- GSK- 3β (Ser⁹) 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示, p- GSK- 3β (Ser⁹) 蛋白在对照组、H₂O₂ 组、天麻素 +H₂O₂ 组表达为 (105.0± 12.4) (47.0± 8.1) 和 (73.0± 11.2) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=6.326, P=0.000$)。与对照组比较, H₂O₂ 组的 p- GSK- 3β (Ser⁹) 表达降低 ($P<0.05$)。相对于 H₂O₂ 组, 天麻素 10μ mol/L)+H₂O₂ 组 p- GSK- 3β (Ser⁹) 的表达增加 ($P<0.05$)。提示天麻素可能通过提高 GSK- 3β 的磷酸化水平来对抗由 H₂O₂ 引起的心肌细胞线粒体损伤。见图 3。

2.2 天麻素对 PI3K/Akt 信号转导通路的影响

2.2.1 PI3K 抑制剂对天麻素线粒体保护作用的影响

激光共聚焦结果显示, 各组 TMRE 荧光强度比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=18.162, P=0.000$)。天麻素 10.0μ mol/L)+H₂O₂ 组 (0.79± 0.08) 与 H₂O₂ 组 (0.30± 0.08) 比较, 差异有统计学意义 ($t =$

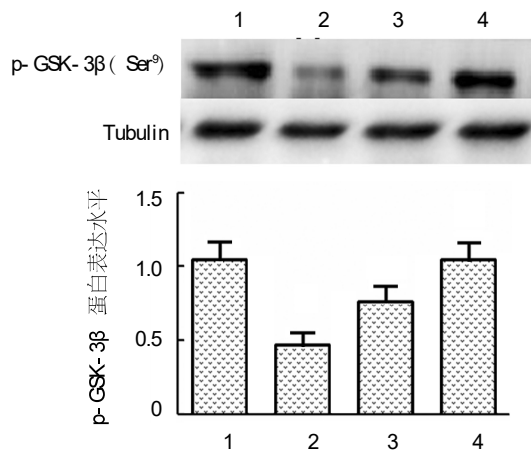


1: 对照组; 2: H₂O₂ 组; 3: 天麻素 10.0μ mol/L)+H₂O₂ 组; 4: 天麻素组

图 2 检测 p-Akt (Ser⁴⁷³) 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

16.723, $P=0.000$), 10.0 μ ml/L 天麻素可以对抗 H₂O₂ 引起的 TMRE 荧光强度降低, 而发挥线粒体保护作用。PI3K 抑制剂 Wort+ 天麻素 10.0 μ ml/L)+H₂O₂ 组 (0.33 \pm 0.20) 与天麻素 10.0 μ ml/L)+H₂O₂ 组比较, 差异有统计学意义 ($t=14.325, P=0.000$)。Wort 组与天麻素 10.0 μ ml/L)+H₂O₂ 组比较, 差异有统计学意义 ($t=8.326, P=0.000$), 说明 Wort 可以阻断天麻素的保护作用, 提示天麻素是通过 PI3K/Akt 信号转导通路发挥抗心肌细胞氧化应激损伤线粒体保护作用的。见图 4。

2.2.2 Wort 对 p- Akt (Ser⁴⁷³) 和 p- GSK- 3 β (Ser⁹) 表达的影响 Western blot 检测结果显示, 在 H₂O₂ 组、天麻素 (10.0 μ ml/L)+H₂O₂ 组、Wort+ 天麻素



1:对照组;2:H₂O₂组;3:天麻素 10.0 μ ml/L)+H₂O₂组;4:天麻素组
图 3 p-GSK-3 β (Ser⁹) 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

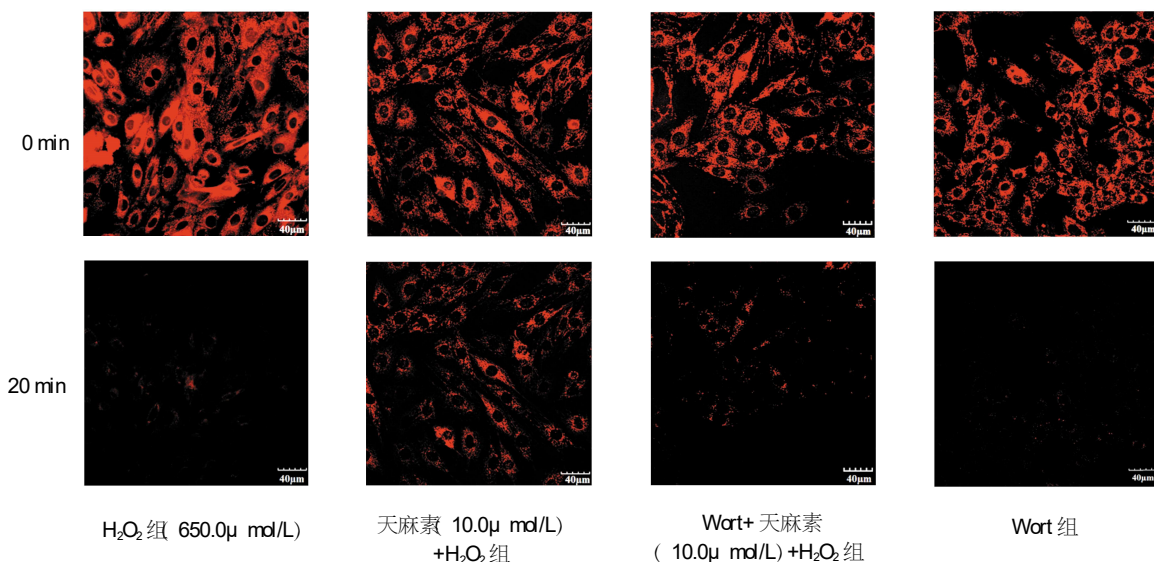
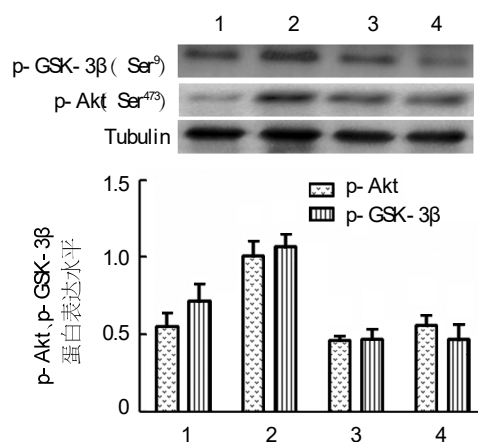


图 4 Wort 对天麻素保护 TMRE 荧光强度作用的影响 ($\times 40$)

(10.0 μ ml/L)+H₂O₂ 组、Wort 组中, p- Akt (Ser⁴⁷³) 蛋白表达分别为 (55.0 \pm 9.1) (101.0 \pm 10.1) (46.0 \pm 3.2) 和 (56.00 \pm 7.2) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=9.316, P=0.000$)。p- GSK- 3 β (Ser⁹) 蛋白表达分别为 (72.0 \pm 11.2) (107.0 \pm 8.0) (47.00 \pm 7.1) 和 47.0 \pm 10.1) %, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=12.337, P=0.011$)。相对于 H₂O₂ 组, 天麻素 10 μ ml/L)+H₂O₂ 组的 p- Akt (Ser⁴⁷³) 和 p- GSK- 3 β (Ser⁹) 蛋白表达增强 ($P<0.05$); 而与天麻素 10 μ ml/L)+H₂O₂ 组比较, 加入 PI3K 抑制剂 Wort 后, p- Akt (Ser⁴⁷³) 和 p- GSK- 3 β (Ser⁹) 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。说明天麻素可能是通过 PI3K/Akt 通路调控 GSK- 3 β 活性, 对 H₂O₂ 引起的心肌细胞氧化应激损伤发挥保护作用。见图 5。



1:H₂O₂组;2:天麻素 10.0 μ ml/L)+H₂O₂组;3:Wort+ 天麻素 (10.0 μ ml/L)+H₂O₂组;4:Wort 组
图 5 Wort 对天麻素升高 p-Akt (Ser⁴⁷³) 和 p-GSK-3 β (Ser⁹) 的影响

3 讨论

天麻素作为名贵药材天麻的有效成分之一,具有抗炎、抗衰老、镇静等作用^[9]。研究发现,天麻素在脑缺血再灌注损伤中能发挥抗炎、抗氧化的作用^[9],并且在同样具有复杂病理过程的心肌缺血再灌注损伤中也发挥着类似作用^[7]。本研究中 MTT 结果显示,天麻素能增加心肌 H9c2 细胞的存活率,发挥抗氧化应激损伤保护作用。

mPTP 的本质是心肌细胞线粒体膜上的一种跨膜多孔蛋白,在正常生理状态下,mPTP 呈关闭状态。MIRI 过程中,缺血、缺氧、氧化应激等机制可诱发 mPTP 开放,改变线粒体的通透性,导致细胞凋亡或者坏死,因此在 MIRI 过程中 mPTP 的开放成为诱导细胞死亡的重要机制^[9]。实验研究证明腺苷^[9]、红景天苷^[10]等均通过阻止 mPTP 的开放抑制心肌细胞坏死而发挥心肌保护作用。本研究激光扫描共聚焦显微镜结果也表明,天麻素能够对抗 H₂O₂ 引起的细胞线粒体膜电位降低,抑制氧化应激引起的 mPTP 开放,减轻心肌细胞线粒体的损伤,证明天麻素也通过线粒体机制发挥心肌保护作用。

GSK-3 β 是 mPTP 上游重要的调控因子,广泛分布于所有的真核细胞中,主要调节心脏糖原合成酶,GSK-3 β 失活会丧失对下游因子的调控能力,在 MIRI 过程中扮演重要角色^[11]。黄芪甲苷^[12]、白藜芦醇^[13]等中药材就是通过上调 p-GSK-3 β 的表达,抑制 mPTP 的开放,发挥抗氧化应激心肌保护作用。本研究结果显示,天麻素能够对抗 H₂O₂ 作用,使 p-GSK-3 β (Ser⁹) 的表达增加,说明天麻素可能是通过上调 GSK-3 β (Ser⁹) 的磷酸化水平,从而抑制 mPTP 开放,发挥心肌保护作用。

PI3K 属于信号转导蛋白质酶类的一个保守家族,主要调节细胞的增殖、分化、凋亡、生存,是下游信号分子 Akt 的首要调节节点^[14]。Akt 作为信号通路的调节器,其活化后可以促进下游因子 GSK-3 β 的磷酸化,同时 PI3K/Akt 作为体内重要的通路,在细胞活化、炎症反应、趋化性及凋亡等多种生物反应中扮演着重要角色^[15-17],在 MIRI 过程中有阻止 mPTP 开放、减少细胞凋亡的作用^[18-19]。本研究结果也显示,天麻素可以对抗 H₂O₂ 作用,使 p-Akt (Ser⁴⁷³) 的表达增加,当加入 PI3K 抑制剂 Wort 后,不但天麻素使 p-Akt (Ser⁴⁷³) 表达增加的作用消失,而且天麻素使 p-GSK-3 β (Ser⁹) 表达增加,以及抑制 mPTP 开放的

作用均被阻断,说明 PI3K/Akt 通路不但参与天麻素增加 p-GSK-3 β (Ser⁹) 表达,抑制 mPTP 开放的抗氧化应激心肌保护作用,而且还是该作用的重要调控因素。

综上所述,天麻素预处理可以通过减轻 H₂O₂ 引起的 H9c2 心肌细胞线粒体损伤,发挥抗氧化应激损伤保护作用,该作用可能是通过 PI3K/Akt 途径使 GSK-3 β 失活,进而抑制 mPTP 开放来实现的。

参 考 文 献:

- [1] JI L, FU F, ZHANG L, et al. Insulin attenuates myocardial ischemia reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(4): 871-880.
- [2] WU Q L, SHEN T, MA H, et al. Sufentanil preconditioning protects the myocardium from ischemia-reperfusion via PI3K/Akt-GSK-3 β pathway[J]. *J Surg Res*, 2012, 178(2): 563-570.
- [3] 孙中吉, 王辉. 天麻素注射液的药理作用和临床应用[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(4): 1011-1013.
- [4] 位凯, 王飞, 张瑾, 等. 天麻素预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的可能机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(6): 756-758.
- [5] 李诺利, 庞邦斌, 银胜高, 等. 天麻中成药制剂临床研究概况[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(19): 226-229.
- [6] PENG Z, WANG S, CHEN G, et al. Gastrodin alleviates cerebral ischemic damage in mice by improving anti-oxidant and anti-inflammation activities and inhibiting apoptosis pathway[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(4): 661-673.
- [7] YARDAN T, ERENLER A K, BAYDIN A, et al. Usefulness of S100B protein in neurological disorders[J]. *J Pak Med Assoc*, 2011, 61(3): 276-281.
- [8] LEE J, GIORDANO S, ZHANG J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling[J]. *Biochem J*, 2012, 441(2): 523-540.
- [9] XI J, MCLINTOSH R, SHEN X, et al. Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(5): 684-690.
- [10] 尹敬, 田炜, 魏建强, 等. 红景天苷对 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用及机制研究[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(9): 2100-2107.
- [11] HALESTRAP A P, CLARKE S J, JAVADOV S A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 372-385.
- [12] 贺永贵, 郑桓, 张国彬, 等. 黄芪甲苷对 H₂O₂ 所致大鼠心肌细胞线粒体损伤的保护作用及其机制研究[J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(17): 1519-1523.
- [13] 沈志嘉, 郑桓, 费硕, 等. 白藜芦醇对 H9c2 心肌细胞抗氧化应激损伤的内质网应激机制研究[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(1): 74-78.
- [14] LIAO Y, HUNG M C. Review article physiological regulation of

- Akt activity and stability[J]. *Am J Transl Res*, 2010, 2(1): 19-42.
- [15] CANTLY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [16] LEE Y, LEE J, BYEON SE, et al. Functional role of Akt in macrophage-mediated innate immunity[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011, 1(16): 517-530.
- [17] ZHANG W J, WEI H, HAGEN T, et al. Alpha-lipoic acid attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(10): 4077-4082.
- [18] HAUSENLOY D J, TSANG A, MOCANU M M, et al. Ischemic preconditioning protects by activating pro-survival kinases at reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(2): 971-976.
- [19] EFTHYMIIOU C A, MOCANU M M, YELLON D M. Atorvastatin and myocardial reperfusion injury: novel pleiotropic effect implicating multiple pro-survival signaling[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 45(3): 247-252.

(童颖丹 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于1991年, 期刊号 ISSN 1005-8982/ CN 43-1225/R, 半月刊, 系中国科技论文统计源期刊、北京大学图书馆中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE(A-))及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发行。本刊是中华人民共和国教育部主管的国家级综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学肝胆肠外科研究中心主办, 中南大学湘雅医院承办。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在3000字以内; 病例报告类论文字数控制在800字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件2个月内内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志2本。

投稿细则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词3~5个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小5 cm × 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用10条以上, 以近5年文献为主。引用期刊的格式为: 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码; 引用书籍的格式为: 著者. 书名. 版次. 出版地: 出版社, 年份: 起止页码; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过3名者, 则在3名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5。英文格式: SZEMAN B, NAGY G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. <i>Orv Hetil</i> , 2012, 153(9): 323-329。
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明(参考文献35条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 基础研究·论著、临床研究·论著、新进展研究·论著需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。