

吡那地尔、美托洛尔、谷氨酰胺、胰岛素单独及联合使用对 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用及机制

孙畅¹, 臧婵媛^{1,2}, 吴艳娜¹, 温克¹, 康毅¹, 娄建石^{1*} (1.天津医科大学药理学教研室, 天津 300070; 2.天津医学高等专科学校, 天津 300222)

摘要: 目的 研究吡那地尔(pinacidil, Pin)、美托洛尔(metoprolol, Met)、谷氨酰胺(glutamine, Glu)、胰岛素(insulin, Ins)四药联用对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)所致 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用并探讨其作用机制。方法 将培养的 H9c2 心肌细胞随机分为 7 组, 即①正常对照(Con)组; ②H/R 组; ③Pin 组; ④Met 组; ⑤Glu 组; ⑥Ins 组; ⑦四药联用(PMGI)组。测定各组 H9c2 心肌细胞的存活率; 收集培养液测定乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性; Western 印迹法检测保护性蛋白热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)的表达情况。结果 对于 H/R 损伤的 H9c2 心肌细胞, 四药联用组与药物单用组或 H/R 组相比能明显提高细胞存活率, 保护细胞膜, 减少 LDH 渗漏; 增加抗氧化能力, 提高 SOD 含量; 增加 HSP70 的表达。结论 联合用药组与药物单用组相比保护作用增强。

关键词: 缺氧/复氧损伤; 联合用药; 乳酸脱氢酶; 超氧化物歧化酶; 热休克蛋白

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)03-0191-04

Protective Effects and Mechanism of Pinacidil, Metoprolol, Glutamine, Insulin Single and Combination Therapy on H9c2 Cardiac Myocytes Exposed to Simulated Hypoxia/Reoxygenation

SUN Chang¹, ZANG Chanyuan^{1,2}, WU Yanna¹, WEN Ke¹, KANG Yi¹, LOU Jianshi^{1*} (1.Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Medical College, Tianjin 300222, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate protective effects and mechanism of pinacidil(Pin), metoprolol(Met), glutamine (Glu), insulin(Ins) on H9c2 cardiacmyocytes exposed to simulated hypoxia/reoxygenation(H/R). **METHODS** H9c2 cardiacmyocytes were randomly divided into seven groups: ①control group; ②H/R group; ③Pin group; ④Met group; ⑤Glu group; ⑥Ins group; ⑦Pin + Met + Glu + Ins (PMGI) group. The survival rates of cardiomyocytes were detected. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) in the culture medium were measured. Western blot was performed to examine expression of heat shock protein 70 (HSP70) in cardiomyocytes respectively. **RESULTS** The combination therapy of PMGI can protect the H9c2 cardiac cell membrane caused by hypoxia/reoxygenation injury; increase cell survival rate, decrease LDH leakage, protect cardiac cell against H/R injury through elevating T-SOD and Mn-SOD activity, increase the expression of HSP70. **CONCLUSION** Compared to the individual group, drug combination treatment enhances protective effects.

KEY WORDS: hypoxia/reoxygenation; drug combination; lactate dehydrogenase; superoxide dismutase; heat shock protein

自发现心肌存在内源性的自我保护现象即心肌缺血预适应(myocardial ischemia preconditioning,

MIP)^[1]后, 许多研究对其进行了证实。基于对 MIP 保护机制的认识, 人们用药物激发或模拟机体内

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(No20070062009)

作者简介: 孙畅, 女, 研究生 Tel: 13821764998 E-mail: moneca0214@sina.com
E-mail: jianshilou@163.com

*通信作者: 娄建石, 男, 教授, 博导 Tel: (022)23542686

源性活性物质,以呈现 MIP 样保护作用,称为药理性预适应(pharmacological preconditioning, PP)。从而克服了 MIP 的损伤弊端,具有广泛的临床应用价值。值得注意的是,相对于多因素、多途径、多靶点导致的心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI),国内外报道的大多数 PP 仍为单药物、单机制、单方面治疗。所以,针对这种病因与防治的失衡,研究人员开始尝试联合用药防治心肌缺血再灌注损伤。如笔者所在课题组将丁丙诺啡与硝酸甘油进行联合用药^[2]; Yang 等^[3]将抗氧化剂别嘌呤醇与强啡肽合用; Gao 等^[4]将谷胱甘肽乙酯和等量的维生素 C 进行抗缺血再灌注的实验等。以上实验结果证明,药物合用后药效增强,作用互补,剂量减少,不良反应减轻。因此,本实验着眼于心肌缺血再灌注过程,对联合用药增强心肌细胞存活率,增加抗氧化能力,做了进一步探索,以求获得更有效、全面的药物防治措施并探讨及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与分组

H9c2 心肌细胞株(中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心)。将培养的 H9c2 心肌细胞随机分为 7 组,即①对照组(Con);②缺氧/复氧(H/R)组;③吡那地尔(Pin)组;④美托洛尔(Met)组;⑤谷氨酰胺(Glu)组;⑥胰岛素(Ins)组;⑦四药联用(PMGI)组。Con 组换用无血清的 DMEM 培养液培养;H/R 组缺氧培养 180 min,复氧 150 min;其余各组则在缺氧前加入相应的药物预处理 30 min,Pin、Met、Glu 和 Ins 的终浓度分别为 1, 20, 8 mmol·L⁻¹, 0.01 U·L⁻¹。

1.2 药物

吡那地尔、美托洛尔(天津市药物研究院,批号分别为 091007、091203);谷氨酰胺(Amresco,批号:U2009120091);胰岛素(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号:091101)。

1.3 试剂与仪器

南美胎牛血清(Hyclone,批号:NUF0172);胰蛋白酶(Gibco;批号:N200900221);无菌 DMEM 培养液(北京天润善达生物科技有限责任公司);LDH 试剂盒,总 SOD 与分型 SOD 试剂盒,考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);蛋白电泳试剂盒,彩色预染蛋白质 Marker,兔抗大鼠 anti-tubulin,碱性磷酸酶标记的

山羊抗兔 IgG(碧云天生物技术有限公司);兔抗大鼠 anti-HSP70(Santa Cruz, 3097-100)等。HEPA Class 100 型 CO₂ 孵箱(Thermo, USA);VIS-7220 可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);Model 680 型酶标仪(BIO-RAD, USA);Eppendorf 高速冷冻离心机(Hettich Entrifvgen, Germany);电泳仪和电泳槽(BIO-RAD, USA)等。

1.4 方法

1.4.1 模型的建立 将 H9c2 心肌细胞用预先经 95% N₂ + 5% CO₂ 的混合气饱和 1 h 的模拟缺氧液置换正常培养液,后放入通有 95% N₂ + 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱缺氧培养 180 min;再将缺氧后的心肌细胞换用预先用 95% 空气 + 5% CO₂ 饱和的 DMEM 高糖培养基,在正常培养条件下复氧 150 min,建立 H/R 损伤模型。

1.4.2 测定指标

1.4.2.1 细胞存活率 各组给予药物预处理 30 min 后建立损伤模型,MTT 法测定各组细胞存活率,选择 490 nm 波长酶标仪测定每孔光吸收值(OD 值)。测定重复 3 次。

1.4.2.2 测定各组 LDH 活性 收集培养液,按 LDH 试剂盒说明操作,比色法测定各组 LDH 活性。

1.4.2.3 测定各组总 SOD 及分型 SOD 活性 收集培养液,按 SOD 试剂盒说明操作,比色法测定各组总 SOD 及分型 SOD 活性。

1.4.2.4 Western blotting 法检测 HSP70 的表达 倒掉培养液,以预冷 PBS 洗涤 3 次,加入细胞裂解液,细胞刮收集细胞,离心,取上清分装, -20 °C 保存。将蛋白样本进行 SDS 双丙烯酰胺凝胶电泳,电转膜法将胶中蛋白转移至硝酸纤维素膜,封闭硝酸纤维素膜的免疫球蛋白结合位点,一抗 37 °C 孵育 2 h, TBST 冲洗后加入二抗 37 °C 孵育 2 h,加入 BCIP/NBT 显色液 1 min 显色。经显影、定影后观察结果,测定特异性条带光密度值。测定重复 4 次。

1.4.3 统计学方法 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS12.0 统计软件处理。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析及多组均数的两两比较。

2 结果

2.1 联合用药对 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤存活率的影响

Con 组的细胞存活率为(96.0 ± 4.0)%; H/R 组细胞存活率明显降低,与 Con 组比较差异具有统

计学意义($P<0.01$)。不同药物处理组的细胞存活率,与 H/R 组相比都有显著增加($P<0.01$)。与药物单用组比较,PMGI 组的细胞存活率亦升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见图 1。

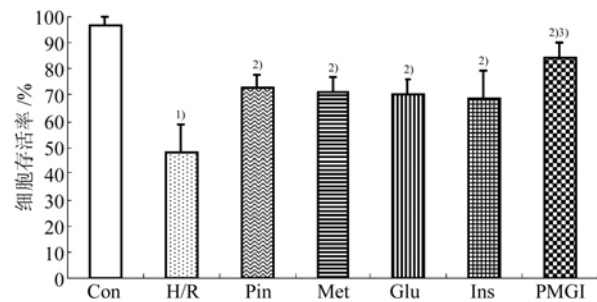


图 1 吡那地尔、美托洛尔、胰岛素和谷氨酰胺单用与联合用药对大鼠 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤后细胞存活率的影响与 Con 组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 H/R 组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与 Pin、Met、Glu、Ins 组比较, ³⁾ $P<0.01$

Fig 1 Effect of Pin, Met, Glu, Ins single and combination treatment on the survival rates of H9c2 cardiac myocytes exposed to simulated hypoxia/reoxygenation Compared with Con group, ¹⁾ $P<0.01$; Compared with H/R group, ²⁾ $P<0.01$; Compared with Pin, Met, Glu, Ins group, ³⁾ $P<0.01$

2.2 PMGI 对 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤的 LDH 活性影响

与 Con 组比较, H/R 组 LDH 活性明显升高($P<0.01$), 不同药物处理组的 LDH 活性显著降低($P<0.01$)。与药物单用组相比, PMGI 组的 LDH 活性亦明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 吡那地尔、美托洛尔、谷氨酰胺和胰岛素单用与联合用药对大鼠 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab 1 Effect of Pin, Met, Glu, Ins single and combination treatment on the activity of LDH in H9c2 cardiac myocytes exposed to simulated hypoxia/reoxygenation($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	LDH 活性/ $U \cdot L^{-1}$
Con	584.1 $\pm$ 17.0
H/R	834.8 $\pm$ 25.4 ¹⁾
Pin	637.8 $\pm$ 15.8 ²⁾
Met	656.3 $\pm$ 21.8 ²⁾
Glu	667.5 $\pm$ 26.5 ²⁾
Ins	703.0 $\pm$ 36.6 ²⁾
PMGI	597.0 $\pm$ 12.7 ^{2) 3)}

注: 与 Con 组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 H/R 组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与 Pin、Met、Glu、Ins 组比较, ³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with Con group, ¹⁾ $P<0.01$; Compared with H/R group, ²⁾ $P<0.01$; Compared with Pin, Met, Glu, Ins group, ³⁾ $P<0.01$

2.3 对 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤的 SOD 活性测定

Con 组的总 SOD 及 Mn-SOD 活性分别为 (53.44 ± 1.22) $U \cdot mL^{-1}$ 和 (20.22 ± 1.47) $U \cdot mL^{-1}$; H/R 组总 SOD 活性明显降低, 与正常对照组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。各药物处理组总 SOD 活性升高, 与 H/R 组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。与药物单用组相比, PMGI 组的总 SOD 活性亦升高, 比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 2。

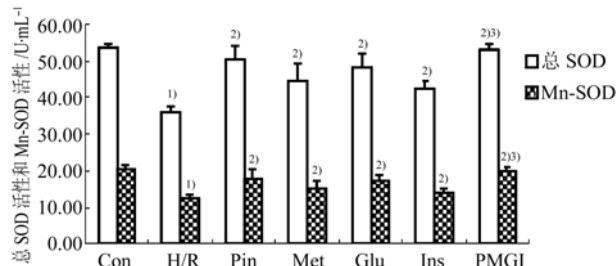


图 2 吡那地尔、美托洛尔、谷氨酰胺和胰岛素单用与联合用药对大鼠 H9c2 心肌细胞总 SOD 活性和 Mn-SOD 活性的影响

与 Con 组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 H/R 组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与 Pin、Met、Glu、Ins 组比较, ³⁾ $P<0.05$

Fig 2 Effect of Pin, Met, Glu, Ins single and combination treatment on the activity of T-SOD and Mn-SOD in H9c2 cardiac myocytes exposed to simulated hypoxia/reoxygenation Compared with Con group, ¹⁾ $P<0.01$; Compared with H/R group, ²⁾ $P<0.01$; Compared with Pin, Met, Glu, Ins group, ³⁾ $P<0.05$

2.4 PMGI 对 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤 HSP70 表达的影响

不同药物处理组的 HSP70 表达, 与 H/R 损伤组相比都有显著增加($P<0.01$); 与药物单用组相比, PMGI 组 HSP70 表达亦明显增加($P<0.05$)。结果见表 2 和图 3。

表 2 HSP70 和 Tubulin 蛋白 Western 印迹条带光密度值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 2 Western blot band optical density of HSP70 and Tubulin($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	HSP70	Tubulin	HSP70/Con/%
Con	10.2 $\pm$ 1.2	38.4 $\pm$ 3.3	100.0 $\pm$ 11.9
H/R	20.7 $\pm$ 2.1 ¹⁾	29.4 $\pm$ 2.6 ¹⁾	203.3 $\pm$ 21.2 ¹⁾
Pin	42.2 $\pm$ 4.7 ²⁾	33.6 $\pm$ 2.5 ²⁾	412.7 $\pm$ 46.7 ²⁾
Met	43.2 $\pm$ 4.9 ²⁾	36.2 $\pm$ 1.6 ²⁾	422.1 $\pm$ 47.9 ²⁾
Glu	56.8 $\pm$ 5.2 ²⁾	32.7 $\pm$ 1.1 ²⁾	554.9 $\pm$ 52.3 ²⁾
Ins	44.1 $\pm$ 3.9 ²⁾	30.7 $\pm$ 3.7 ²⁾	431.3 $\pm$ 39.0 ²⁾
PMGI	71.7 $\pm$ 6.3 ^{2) 3)}	37.9 $\pm$ 4.9 ^{2) 3)}	700.5 $\pm$ 62.6 ^{2) 3)}

注: 与 Con 组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 H/R 组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与 Pin、Met、Glu、Ins 组比较, ³⁾ $P<0.01$

Note: Compared with Con group, ¹⁾ $P<0.01$; Compared with H/R group, ²⁾ $P<0.01$; Compared with Pin, Met, Glu, Ins group, ³⁾ $P<0.01$

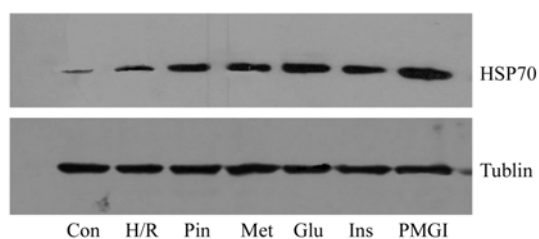


图3 大鼠 H9c2 心肌细胞 HSP70 和 Tubulin 蛋白的 Western blot 结果

Fig 3 Western Blot analysis of HSP70 and Tubulin in the H9c2 cardiac myocytes

3 讨论

MIRI 的相关因素主要有: 氧自由基、钙超载、血管内皮细胞、细胞凋亡、NO、补体、核因子等。以上因素在多阶段, 多靶点参与损伤过程, 且作用机制复杂交错。本实验选用 Pin、Met、Glu 和 Ins 作用于心肌缺血再灌注损伤的不同阶段和靶点, 旨在综合保护心肌细胞。

实验结果显示: 对于 H/R 损伤的 H9c2 心肌细胞, PMGI 组与药物单用组相比能提高细胞存活率, 达到 $(84.5 \pm 5.8)\%$; 保护其细胞膜, LDH 渗漏量为 $(597.0 \pm 12.7) \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, 药物单用组为 $(637.8 \pm 15.8) \sim (703.0 \pm 36.6) \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, PMGI 组较单用组明显降低; 增加抗氧化能力, 提高总 SOD 和 Mn-SOD 含量; 增加 HSP70 的表达, 为空白组的 $(700.5 \pm 62.6)\%$, 比单用组高出近一倍。

PMGI 的保护机制: Met 一方面通过抑制心肌细胞 β 受体, 减慢心率、抑制心肌收缩力, 减少细胞代谢, 缓解氧供求失衡和随后的能量失调和氧自由基损伤^[5-6]。Glu 一方面通过保持和增加组织细胞内抗氧化物质还原型谷胱甘肽的储备, 从而减轻细胞受反应性氧类(reactive oxygen species, ROS)介导的损伤, 稳定细胞膜和蛋白质结构^[7]; 另一方面通过促进热休克转录因子(HSF-1)的磷酸化和增加 HSP70 的表达。Pin 作为 ATP-1 敏感性钾通道的开放剂, 激活缺血预适应途径, 限制了 Ca^{2+} 内流, 减少心肌细胞内线粒体等超微结构的破坏和心肌酶的漏出^[8-9]。Ins 通过磷脂酰肌醇-3-激酶信号通路可降低 FFA 诱导的 ROS 生成^[10]; 激活 PI3K/Akt 通路, 加速 HSP70

转录和表达^[11]。

HSP70 的保护作用: “分子伴侣”作用; 保护内皮细胞; 保护 SOD 等抗氧化自由基酶; 抑制细胞因子介导的炎症反应; 抗细胞凋亡等。

综上所述, PMGI 通过抗氧化自由基, 减少细胞内钙超载, 保护细胞膜, 增加抗氧化物 SOD 和保护性蛋白 HSP70 等途径, 提高了单独用药的保护效果, 增加心肌细胞存活率。

本实验是基于离体心肌细胞水平, 尚未在整体动物水平得以验证, 有待于下一步工作继续研究。

REFERENCES

- [1] MURPHY E, STEENBERGEN C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(2): 581-609.
- [2] KONG Y J, LIU Y X, LOU J S. The pharmacological preconditioning of nitroglycerin and buprenorphine used in combination against myocardial ischemia in rats [J]. *Chin Pharm Bull(药学通报)*, 2003, 19(12): 1370-1374.
- [3] YANG C S, TSAI P J, CHOU S T, et al. The roles of reactive oxygen species and endogenous opioid peptides in ischemia induced arrhythmia of isolated rat hearts [J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18(3): 593-598.
- [4] GAO F, YAO CL, GAO E. Enhancement of glutathione cardioprotection by ascorbic acid in myocardial reperfusion injury [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 301(12): 543-550.
- [5] ZHANG H J, XU X G, ZHANG D H, et al. The protective effectiveness of intracoronary metoprolol for intervention-related myocardial Injury [J]. *J Pract Med(实用医学杂志)*, 2009, 4(32): 13-14.
- [6] GHEORGHIAD E M, GOLDSTEIN S. β -Blockers in the post-myocardial infarction patient [J]. *Circulation*, 2002, 106(4): 394-398.
- [7] MA X, LI Y C. Glutamine against myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志)*, 2007, 15(11): 873-875.
- [8] SHEN Y, LIANG Z X. Effects of pinacidil postconditioning on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志)*, 2009, 7(5): 561-563.
- [9] KOWALTOWSKI A J, SEETHARAMAN S, PAUCEK P, et al. Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K^+ channel of heart mitochondria [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(2): H6492-57.
- [10] LU Z Q. The effect of Insulin to cardiovascular system [J]. *Drug Evaluation*, 2008, 5(8): 361-366.
- [11] WANG Z, JING H, XU B. Cardioprotection of insulin during ischemia-reperfusion [J]. *J Med Postgraduates(医学研究生学报)*, 2006, 19(5): 420-423.

收稿日期: 2011-07-24