

本研究中发现, 300 例患者中 INR 达标率为 43.67%, 不足 1/2, 提示患者居家治疗期间华法林治疗依从性相对有限, 需针对其 INR 达标影响因素进行针对性干预。

本研究中发现, 年龄、文化程度、患者服药依从性、药师院外指导为患者华法林抗凝治疗中 INR 不达标主要影响因素, 考虑原因为, (1) 年龄: 随患者年龄增长, 其对相关知识认知、理解、记忆能力下降, 随出院时间延长, 用药依从性逐渐下降; 患者年龄大, 自身生命体征稳定性差, 易受疾病状态影响抗凝质量^[6]; (2) 文化程度: 文化程度高, 患者对疾病控制、华法林药物治疗作用理解程度高, 可减少患者药物治疗期间应激情绪, 在保持其血流动力学稳定性基础上, 可保证其药物治疗依从性, 稳定发挥华法林抗凝作用, 因此可提升 INR 达标率; 而文化水平低, 其对相关知识理解能力相对较差, 治疗重视程度低, 因此 INR 达标率相对较低; (3) 人种基因: 不同人种所携带基因特点存在明显差异, 包括凝血酶原基因多态性、环境所致基因突变等, 均可诱发凝血功能差异; (4) 服药依从性: 定期监测患者凝血功能及 INR 水平, 并调节华法林给药剂量, 为患者应用华法林抗凝治疗期间重要环节, 但若患者未能及时监测凝血功能, 未能遵医嘱进行药物剂量调整, 或居家治疗期间以自身认知水平私自进行药物调整, 包括增加药量、减少药量或停药, 会影响 INR 达标率^[7]; (5) 药师院外指导: 药师对药物药理、作用影响因素等了解更为全面, 对患者院外用药指导时可准确回答患者相关疑问, 满足患者院外相关知识认知需求, 保持患者院外理想用药依从性, 因此可提升其 INR

达标率。

综上所述, 患者华法林抗凝治疗中, INR 达标率影响因素与年龄、文化程度、人种基因、患者服药依从性、药师院外指导相关, 需规范 INR 监测, 以保证抗凝质量。同时院外随访中, 临床药师能发挥主观能动性, 与患者保持有效沟通, 提升患者药物自我管理能力和患者真正受益。

[参考文献]

- (1) 李峥嵘, 王娟, 吴芳芳, 等. 华法林抗凝治疗早期国际标准化比值对抗凝强度的预测价值 (J). 药物不良反应杂志, 2019, 21(4): 252-257.
- (2) 伍珊珊, 黄远平, 王耀利, 等. 房颤患者服用华法林抗凝质量的影响因素 (J). 护理学杂志, 2019, 34(11): 9-12.
- (3) 段福彦. 华法林的相互作用及安全应用研究 (J). 中国卫生标准管理, 2014, 5(13): 58-59.
- (4) 许海江, 赵春玲, 杨彦涛, 等. 初始国际标准化比值预测华法林抗凝强度的试验性评价 (J). 国际医药卫生导报, 2020, 26(21): 3253-3256.
- (5) 陈立伟, 韩凌, 骆景光. 老年非瓣膜性房颤合并血栓栓塞并发症的抗凝治疗效果观察 (J). 中国现代药物应用, 2019, 13(10): 33-34.
- (6) 刘焕云, 黄志梅, 丁晓莉, 等. 家庭医生模式对心房颤动患者华法林抗凝治疗的依从性及预后的影响 (J). 心脑血管病防治, 2020, 20(4): 96-98.
- (7) 李哲, 张涤菲, 邹明, 等. 全程化药学监护对房颤患者抗凝治疗的影响 (J). 中国医院药学杂志, 2019, 39(6): 628-631.

[文章编号] 1007-0893(2021)14-0019-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.14.007

白藜芦醇对氧糖剥夺过程中 H9C2 细胞的保护机制

傅晓丹 谢果晋

(东莞市滨海湾中心医院, 广东 东莞 523900)

[摘要] 目的: 白藜芦醇是一种具有生物活性的多酚类物质, 生物学功能目前尚不清楚。本研究旨在探讨白藜芦醇对氧糖剥夺 (OGD) 过程中心肌细胞损伤的保护机制。方法: 采用大鼠心肌细胞 H9C2 细胞, 建立 OGD 模型; 经白藜芦醇干预后, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的表达量, 细胞活性检测试剂盒 (CCK8) 检测细胞活性, Westernbolt、免疫荧光检测铁死亡相关蛋白的变化情况。结果: 白藜芦醇能增强 OGD 诱导 H9C2 细胞中 SOD 的表达水平, 降低 MDA 的表达, 增强细胞活性, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时白藜芦醇也能够显著提高铁死亡相关蛋白谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 和铁蛋白重链 1 (FTH1) 的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 白藜芦醇通过降低氧化应激水平和减轻铁死亡来保护 OGD 条件下心肌细胞损伤。白藜芦醇可以作为一种预防心肌缺血/再灌注 (I/R) 损伤的潜在药物。

[关键词] 心肌缺血再灌注; 氧糖剥夺过程; 白藜芦醇; 氧化应激; 铁死亡

[中图分类号] R 285 [文献标识码] A

[收稿日期] 2021-05-09

[作者简介] 傅晓丹, 女, 主治医师, 主要从事心内科工作。

The protective mechanism of resveratrol on H9C2 cells under oxygen-glucose deprivation

FU Xiao-dan, XIE Guo-jin

(Dongguan Binhaiwan Central Hospital, Guangdong Dongguan 523900)

(Abstract) **Objective** Resveratrol is a kind of polyphenols with biological activity, but its biological function is still unclear. This study aimed to investigate the protective effect of Res on myocardial I/R injury and to explore its potential mechanism. **Methods** H9c2 cells were used for the in vitro experiments and oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model was established. After resveratrol treatment, the expression levels of SOD and MDA were detected by ELISA, the cell activity was detected by CCK8, and the changes of iron death related proteins were detected by Western-bolt and immunofluorescence. **Results** Resveratrol could enhance the activity and decrease oxidative stress ($P < 0.05$); Meanwhile, the expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and ferritin heavy chain 1 (FTH1) were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Resveratrol protects against myocardial I/R injury via reducing oxidative stress and attenuating ferroptosis. Resveratrol could be a potential agent to the prevention of myocardial I/R injury.

(Key Words) Myocardial ischemia-reperfusion; Oxyglycan deprivation process; Resveratrol; Oxidative stress; Ferroptosis

缺血性心脏病已成为严重威胁人类生命健康的疾病之一，深入了解心肌缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤的发病机制对疾病的诊疗具有十分重要的意义。白藜芦醇 (resveratrol) 是一种具有较强生物活性的天然多酚。它具有抗氧化、抗肿瘤和抑制炎症等多种生物学功能^[1]。大量研究表明白藜芦醇通过改善氧化应激、细胞凋亡和自噬、内质网应激等参与对心肌保护作用^[2-4]。然而，白藜芦醇在 I/R 中的作用机制尚不清楚。本研究旨在探讨白藜芦醇对氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 过程中心肌细胞损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

白藜芦醇购自于上海源叶生物，大鼠心肌细胞 (H9C2 细胞株) 购自于上海生科院细胞库，超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、丙二醛 (maleic dialdehyde, MDA) 检测试剂盒均购自南京建成，胎牛血清购自 Gibco，谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1) 以及内参抗体均购自于武汉博士德生物科技有限公司。

1.2 主要仪器

CO₂ 细胞培养箱 (Thermo, USA)，酶标仪 (Thermo, USA)，倒置荧光显微镜 (Nikon, Japan)，离心机 (Thermo, USA)，超净工作台 (苏州净化)，蛋白转膜系统 (Bio-rad, USA)

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将 H9C2 细胞复苏后，传 2~3 代，取对数期 H9C2 细胞 5×10^4 · 孔⁻¹ 接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后，弃去原有培养基，加入含 100 μmol · L⁻¹ 白藜芦醇低糖无血清 DMEM 培养基，将 6 孔板转移到缺氧培养箱中 (1% O₂, 5% CO₂ 和 94% N₂)，37 °C 孵育 2 h，取出六孔板换上完全培养基继续培养 24 h，同时设立正常细胞作为空白对照组。

1.3.2 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 SOD、MDA 含量，收集各组细胞上清，按照南京建成公司的 ELISA 检测试剂盒说明书进行检测。

1.3.3 细胞活性检测 将制备好的细胞悬液加入 96 孔板中培养 24 h，经不同条件处理后加入细胞活性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 溶液，室温培养 4 h。在 450 nm 处检测光密度 A (OD) 值。

1.3.4 免疫荧光检测 将处理好的细胞，首先用 4% 多聚甲醛固定 10 min，磷酸盐吐温缓冲液 (phosphate buffer saline tween, PBST) 清洗 3 次，每次 3 min；然后 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h，加入一抗，4 °C 孵育过夜，PBST 清洗 3 次，再加入二抗，室温孵育 1 h，PBST 清洗 3 遍后，加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液，孵育 5 min，立即在倒置荧光显微镜下观察。

1.3.5 Western blot 检测 收集各个组的细胞，用细胞组织快速裂解液 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 提取细胞总蛋白，聚氰基丙烯酸正丁酯 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白浓度后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gelelectrophoresis, PAGE) 电泳，转膜后，脱脂奶粉室温封闭 1 h，孵育一抗，二抗，化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 进行显影。

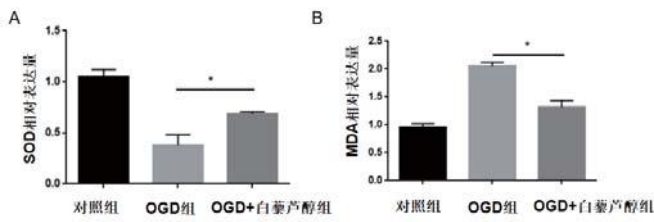
1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行方差分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间的比较采用单因素方差分析 (one-one ANOVA) 进行评估， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 OGD 损伤 H9C2 细胞中 SOD、MDA 的表达影响

白藜芦醇处理 OGD 损伤的 H9C2 细胞后，利用 ELISA 检测 SOD、MDA 的变化情况，结果显示，白藜芦醇能够增强 SOD 的表达、抑制 MDA 的含量，与 OGD 组比较，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 1。



A: SOD 表达变化; B: MDA 表达变化

图1 白藜芦醇对 OGD 损伤 H9C2 细胞中 SOD、MDA 的表达影响

2.2 白藜芦醇对 OGD 损伤 H9C2 细胞活性的影响

白藜芦醇处理 OGD 损伤的 H9C2 细胞后, 利用 CCK-8 检测细胞活性; 结果显示, 经白藜芦醇治疗后, 细胞活性明显高于 OGD 损伤组, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 见图 2。

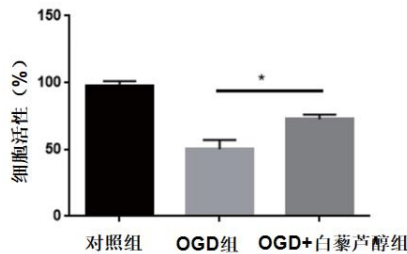


图2 CCK-8 检测白藜芦醇对 OGD 损伤 H9C2 细胞活性的影响

2.3 免疫荧光检测白藜芦醇对 OGD 损伤 H9C2 细胞中 GPX4 蛋白表达影响

OGD 损伤 H9C2 细胞后, 经白藜芦醇处理后, 免疫荧光检测铁死亡相关蛋白 GPX4 的变化, DAPI 染色细胞核, Merge 作为叠加图; 结果显示白藜芦醇能够显著提高 GPX4 的表达, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 见图 3。

2.4 Westernblot 检测白藜芦醇对 OGD 损伤 H9C2 细胞中 GPX4、FTH1 蛋白表达影响

为了进一步验证白藜芦醇对 OGD 损伤 H9C2 细胞后铁死亡相关蛋白的情况, 利用 Westernblot 检测了 GPX4、FTH1 蛋白的变化; 结果显示, 白藜芦醇上调了 GPX4、FTH1 蛋白的变化, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 见图 4。

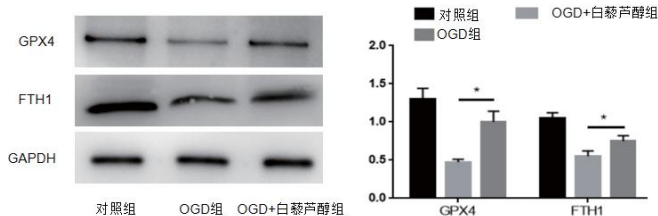


图4 Westernblot 检测铁死亡相关蛋白的变化

3 讨论

心肌 I/R 损伤的发病机制十分复杂, 目前研究发现过氧化物过度生成、细胞内钙离子过量、生理代谢紊乱、线粒体功能障碍等多个生物学过程和信号通路参与该病的进展 [5], 这些机制之间存在着许多联系, 而铁死亡同样在心肌 I/R 损伤中发挥重要作用。铁死亡的特异性抑制剂铁蛋白-1

(ferritin-1, Fer-1), 可以通过调节 TLR4/TRIF/IFN-α 信号通路显著减少心肌细胞死亡, 改善缺血再灌注损伤; 而抑制铁死亡对心肌 I/R 诱导的大鼠和 OGD 条件下的 H9C2 细胞有保护作用 [6]。这些都说明铁死亡可能参与了心肌缺血再灌注损伤。铁死亡是一个由多种分子调控的生物学过程, 主要引起线粒体萎缩、破碎甚至消失; 从生物化学角度看, 细胞内谷胱甘肽耗尽, 抑制 GPX4 的活性, 导致脂质过氧化物不能被 GPX4 催化还原, 最终引起脂质过氧化物增加以及铁离子超载, 造成细胞发生铁死亡。在本研究中, OGD 条件下的 H9C2 细胞, 活性率水平和铁含量明显增加, GPX4、FTH1 水平显著降低, 提示发生铁死亡, 这与先前的研究结果一致。

白藜芦醇是一种非黄酮类多酚类物质, 具有良好的生物学活性。白藜芦醇的生物学机制尚不完全清楚, 但人们已经认识到白藜芦醇具有较强的抗氧化作用 [7]。心肌细胞在正常情况下主要通过糖的有氧分解获得能量, 在体外进行氧糖剥夺可以近似模拟心肌缺血的环境; 白藜芦醇可以减轻大鼠心肌缺血再灌注中损伤, 并通过激活 VEGF-β / 抗氧化信号通路保护心肌细胞; 另外, 白藜芦醇还可以通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路以及氧化应激反应来降低血管紧张素 II 诱导的心肌肥厚。在本研究中, 笔者发现白藜芦醇可以有效降低心肌细胞中的氧化应激水平, 增强 SOD 的表达, 降低 MDA 的产生; 此外, 还发现白藜芦醇还能上调 GPX4、FTH1 的表达, 表明白藜芦醇可通过抑制铁死亡改善心肌 I/R 损伤。

综上所述, 本研究证实了在 OGD 诱导的 H9C2 细胞中, 白藜芦醇能够抑制心肌细胞的氧化应激反应, 改善铁死亡, 从而提高细胞活性。本研究确定了白藜芦醇对 OGD 过程中心肌细胞损伤的保护作用, 为防治心肌 I/R 损伤提供了新的视角, 同时为研究心肌 I/R 损伤的机制和潜在靶点提供了新的理论依据。

[参考文献]

- (1) Pastor RF, Restani P, Di Lorenzo C, et al. Resveratrol, human health and winemaking perspectives. Crit Rev Food Sci Nutr (J). 2019, 59(8): 1237-1255.
- (2) He Y, Fu Y, Xi M, et al. Zn²⁺ and mPTP mediate resveratrol-induced myocardial protection from endoplasmic reticulum stress (J). Metallomics, 2020, 12(2): 290-300.
- (3) Chen C, Zou LX, Lin QY, et al. Resveratrol as a new inhibitor of immunoproteasome prevents PTEN degradation and attenuates cardiac hypertrophy after pressure overload (J). Redox Biol, 2019, 20(1): 390-401.
- (4) 王汝朋, 刘延国, 李广平. 白藜芦醇与心血管疾病研究进展 (J). 中华老年医学杂志, 2018, 37(6): 709-714.
- (5) He Z, Ma C, Yu T, et al. Activation mechanisms and multifaceted effects of mast cells in ischemia reperfusion injury (J). Exp Cell Res, 2019, 376(2): 227-235.
- (6) 钟桂玲, 李文祥, 王贺, 等. 普罗布考经 Nrf2/Gpx4 途径抑制铁死亡保护 H9C2 心肌细胞 (J). 广西医科大学学报, 2021, 38(3): 462-467.
- (7) 牛培勤, 郭传勇. 白藜芦醇药理作用的研究进展 (J). 医药导报, 2006, 25(6): 155-157.