

# 氧化苦参碱保护醛固酮诱导的心肌细胞损伤作用机制分析

刘小红, 杨李强, 徐旖旎, 张彦燕, 潘迪, 张蓓, 陈妍, 陶玲\*, 沈祥春\*  
(贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室, 贵阳 550025)

**[摘要]** 目的:研究氧化苦参碱(OMT)抑制细胞外信号调节激酶 ERK1/2 磷酸化对醛固酮(ALD)诱导心肌细胞损伤的干预作用。方法:采用胰酶消化与差数贴壁分离纯化原代心肌细胞,免疫细胞化学分析心肌细胞纯度。实验分为空白组、模型组( $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ALD)和 OMT 高( $3.78 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),低剂量( $1.89 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组共 4 组。运用 MTT 法检测细胞存活率,LDH 外漏法测定细胞膜损伤程度,蛋白免疫印迹法分析 p-ERK1/2 及 ERK1/2 蛋白表达,实时荧光定量 PCR 分析 ERK mRNA 表达。结果:OMT 可抑制 ALD 诱导的细胞存活率降低和 LDH 外漏增加;与模型组比较,OMT 预处理后 p-ERK1/2 蛋白表达明显下调。结论:OMT 对 ALD 诱导的心肌细胞损伤具有保护作用,其作用与抑制 ERK1/2 蛋白磷酸化有关。

**[关键词]** 氧化苦参碱; 心肌细胞; 细胞外信号调节激酶; 醛固酮; 磷酸化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0108-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220108

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1347.012.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-22 13:47

**Protective Effects of Oxymatrine on Cardiomyocytes Injury Induced by Aldosterone** LIU Xiao-hong, YANG Li-qiang, XU Yi-ni, ZHANG Yan-yan, PAN Di, ZHANG Bei, CHEN Yan, TAO Ling\*, SHEN Xiang-chun\* (Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe effect of oxymatrine (OMT) on expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in cardiomyocytes induced by aldosterone (ALD). **Method:** Pancreatic enzyme digestion method was used to extract cardiac myocytes and purity of cultured cardiac myocytes was evaluated by immunocytochemistry. Cardiac myocytes were pre-incubated with oxymatrine of high-does and low-does for 1 h, and then exposed to ALD for 24 h. Cell injury was evaluated by MTT assay and LDH leakage. Protein expression of ERK1/2 and phosphorylation-ERK1/2 (p-ERK1/2) was detected by Western blot and ERK mRNA was detected by real time polymerase chain reaction (PCR). **Result:** After co-incubation with OMT could enhance MTT volume and decrease LDH activity in medium induced by ALD, there was significant difference by comparing with model group. Meanwhile, expression of p-ERK1/2 was significantly down-regulated after co-incubation with OMT. **Conclusion:** OMT has an protective effect on cardiac myocytes induced by ALD, its mechanism may be related to inhibition of p-ERK1/2.

**[Key words]** oxymatrine; cardiac myocytes; extracellular signal-regulated kinase; aldosterone; phosphorylation

**[收稿日期]** 20150908(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173586,81560588);教育部新世纪人才支持计划项目(NCET-13-0747);贵州省省长基金项目(黔科教办[2011]28号);贵州省科技基金重点项目(黔科合JZ字[2015]2002);贵州省高等教育科技创新团队项目(黔教合人才团队字[2014]31);贵州省高等学校创新能力提升计划项目(黔教合协同创新字[2013]04);贵州省高层次创新型人才项目(黔科合人才[2015]4029);贵州省科技创新团队项目(黔科合人才团队[2015]4025号)

**[第一作者]** 刘小红,在读硕士,从事心血管药物药理学实验研究,Tel:15285137779,E-mail:573793952@qq.com

**[通讯作者]** \*陶玲,教授,从事天然药物新技术与新技术研究,Tel:0851-88416160,E-mail:649511230@qq.com;

\*沈祥春,教授,博士生导师,从事中药民族药活性及效应机制、心血管系统药物药理研究,Tel:0851-88416149, E-mail:shenxiangchun@126.com

大量研究资料提示,心肌缺血/再灌注损伤、心肌炎、心力衰竭和心律失常等心血管疾病的发生发展及恶化都与心肌细胞损伤密切相关<sup>[1-2]</sup>。心肌细胞是一种具有兴奋收缩能力的终末期分化细胞,其损伤可导致不可逆的心脏功能障碍。因此,阻止病理状态下的心肌细胞损伤对诸多心脏疾病的治疗与预后具有重要医学意义,其信号转导和调节机制已成为心血管疾病的重要研究方向。研究证实,在心血管疾病的形成过程中,醛固酮(ALD)诱导的心肌细胞凋亡起到了重要作用<sup>[3-4]</sup>。越来越多的证据表明,ALD可通过激活丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号通路来诱导心肌损伤<sup>[5]</sup>。Lee等<sup>[6]</sup>也证实ALD可通过调节c-Jun氨基末端激酶(JNK)和细胞外信号调节激酶(ERK)来诱导心肌细胞凋亡。

氧化苦参碱(OMT)为豆科植物苦参、苦豆子和山豆根等中草药植物中含有的一种喹诺里西啶类生物碱。OMT易溶于水,为无色结晶,相对分子质量264.4。前期研究显示OMT对ALD诱导的心肌细胞损伤具有保护作用<sup>[7]</sup>,但其对MAPK信号通路的研究还未见报道。本实验拟通过ALD建立体外心肌细胞损伤模型,探讨OMT对ALD诱导心肌损伤的保护机制。

## 1 材料

HF90/HF240型二氧化碳孵育箱(上海力申科学仪器有限公司),ELX800型酶联免疫检测仪(美国GE公司),SW-CJ-1F型双面净化工作台(苏州净化设备有限公司),TGLL18K型台式高速冷冻离心机(太仓市医疗器械厂),CFX型凝胶成像系统仪和Universal Hood II型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司)。

醛固酮(ALD),肌动蛋白和肌钙蛋白(英国Abcam公司,批号分别为A9477, ab15263, ab10214);氧化苦参碱(OMT,南京泽郎医药科技有限公司,批号20080210),胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,批号1030E0427),DMEM培养基和胎牛血清(Gibco公司,批号分别为216549,1315148),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所),ERK1/2多克隆抗体和p-ERK1/2多克隆抗体(ImmunoWay公司),通用型SYBR Green超混合液荧光染料(美国Bio-Rad公司),RNA提取试剂盒与RNA逆转录试剂盒(Takara公司),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

SD大鼠新生1~3d乳鼠,动物饲养于无毒塑料盒中,每天更换垫料1次,自由摄食及饮水,室内

温度保持18~22℃,相对湿度50%~70%,自然光照,由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(黔)2012-0001。

## 2 方法

**2.1 原代心肌细胞培养与鉴定** 取1~3d内新生SD乳鼠用75%乙醇消毒皮肤,固定四肢,胸部向上,用眼科剪沿剑突下剪开,暴露心脏,剪取心脏的心尖部分,磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗3次。将心室组织放入安瓿瓶中,用眼科剪将心肌组织剪成约1mm<sup>3</sup>大小的组织块,使用0.08%胰酶于37℃反复消化5~8次,收集上清液,加入含15%胎牛血清的DMEM培养基终止胰酶消化,离心(1000r·min<sup>-1</sup>,7min)加入培养基制成单细胞悬液。将细胞悬液接种于培养瓶内,置于5%CO<sub>2</sub>,37℃培养箱培养,差速贴壁1.5h获得心肌细胞。细胞培养前3天按0.1mmol·L<sup>-1</sup>加入5-溴脱尿苷抑制成纤维细胞的增殖。免疫组化DAB法联合免疫细胞化学染色SP法鉴定心肌细胞特异性肌动蛋白( $\alpha$ -actin)和肌钙蛋白(c-TnT)的表达。

**2.2 分组与药物干预** 试验分为空白组、模型组(1×10<sup>-5</sup>mol·L<sup>-1</sup>ALD)和OMT高(3.78×10<sup>-4</sup>mol·L<sup>-1</sup>),低剂量(1.89×10<sup>-4</sup>mol·L<sup>-1</sup>)组。分离得到的原代心肌细胞以1×10<sup>6</sup>个/mL接种在培养板中,于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,48h后换液,待生长至第4天进行实验。原代心肌细胞先加入各组试验药物预保护1h,加入ALD共同作用24h,收集各组细胞进行相应指标检测。

**2.3 MTT法检测细胞存活率** 将心肌细胞悬液接种于96孔板中,待生长至第4天时弃去培养基,加入无血清DMEM或各含药的无血清DMEM培养1h,加入ALD共同培养24h,每孔加入5g·L<sup>-1</sup>MTT溶液20μL,37℃继续培养4h后弃掉上清液,每孔加入二甲基亚砷150μL,震荡10min,结晶充分溶解后,于490nm处测定各孔吸光度A。根据(A<sub>实验组</sub>-A<sub>空白组</sub>)/(A<sub>正常组</sub>-A<sub>空白组</sub>)×100%计算各组细胞存活率。

**2.4 LDH外漏法检测细胞损伤** 细胞加药作用后,吸取各处理组上清液20μL,根据LDH活性测定试剂盒说明进行操作。通过上清液中LDH活性可检测细胞损伤程度,按(A<sub>测定</sub>-A<sub>空白</sub>)/(A<sub>对照</sub>-A<sub>空白</sub>)×对照品浓度×1000计算LDH活性。

**2.5 Western blot法检测p-ERK1/2和总ERK1/2蛋白表达** 原代培养细胞用预冷PBS洗2次,加入裂解液在冰上裂解30min提取总蛋白。BCA蛋白

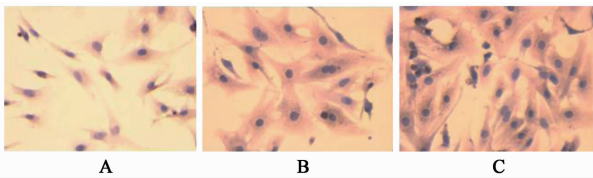
定量试剂盒测定蛋白质浓度。每孔上样蛋白总质量 35  $\mu\text{g}$ , 总体积 30  $\mu\text{L}$ , 用 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 经湿转法转至聚偏氟乙烯膜上, 1% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 一抗 (1:1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 增强化学发光法 (ECL) 显影。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为参照, 结果用灰度值比值表示。

**2.6 实时荧光定量 PCR 法检测 ERK mRNA 表达**  
用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 取总 RNA 1  $\mu\text{g}$  进行逆转录反应, 取逆转录产物 2  $\mu\text{L}$  进行 PCR 扩增反应。ERK 引物序列为上游 5'-GTGGAGGGAA GAGAGGGAAG-3', 下游 5'-ATGAGCAAGGGAAA TGGATG-3', 产物长度 131 bp; GAPDH 引物序列为上游 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3', 产物长度 105 bp。根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法, 以 GAPDH 为参照进行 ERK mRNA 表达的相对定量分析。

**2.7 统计学分析** 数据均采用 SPSS 17.0 统计学软件分析, 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异比较采用多个样本均数比较的单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义,  $P < 0.01$  为差异具有显著统计学意义。

### 3 结果

**3.1 原代心肌细胞鉴定** 肌动蛋白和肌钙蛋白是心肌细胞特异性表达蛋白, 经免疫细胞化学染色后, 心肌细胞核染成蓝紫色, 细胞浆出现棕黄色颗粒, 见图 1。随机选取 5 个视野分别记录细胞总数和阳性细胞数, 用 (阳性细胞总数/细胞总数)  $\times 100\%$  计算心肌细胞纯度。结果显示 95% 以上的细胞呈阳性反应, 表明该方法培养的心肌细胞可以满足后续实验要求。



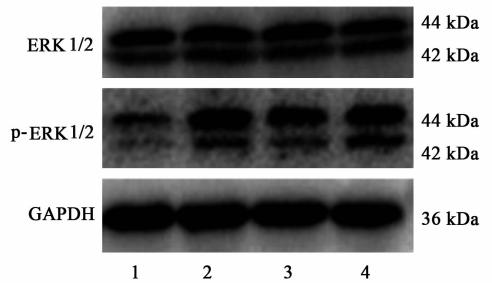
A. 空白组; B. 心肌肌动蛋白; C. 肌钙蛋白  
图 1 心肌细胞鉴定 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 1 Cardiomyocyte identification by immunocytochemistry (IHC,  $\times 400$ )

**3.2 OMT 保护 ALD 诱导的心肌细胞损伤** 与空白组比较, 模型组 ALD 处理 24 h 后, 导致细胞存活率降至 78.06%, 通过 OMT 高、低浓度预处理 1 h 后, 心肌细胞的存活率从 78.06% 分别提高到 87.1% 和

85.8%。LDH 漏出率是一种检测细胞损伤的生物标记物, 空白组、模型组及 OMT 高、低剂量组的 LDH 外漏量分别为 70.08, 101.97, 79.72, 84.65。ALD 作用后, 与空白组相比 LDH 漏出显著增加。OMT 预处理后, LDH 漏出显著降低。

**3.3 OMT 对 ALD 诱导心肌细胞表达 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的影响** Western blot 结果显示与空白组相比, 模型组 p-ERK1/2 的表达显著上调, 从 100% 上调到 156.75%, 提示其可促进 p-ERK1/2 增加。与模型组相比, OMT 高、低剂量组可明显抑制 p-ERK1/2 的表达, 从 156.75% 分别下调到 117.30%, 127.25%。另外, 总 ERK1/2 蛋白表达结果显示, 空白组、模型组及 OMT 高、低剂量组间均无明显差异, 分别为 100.00%, 99.57%, 101.46%, 100.35%。提示 OMT 保护 ALD 诱导的心肌细胞损伤可能是通过降低 ERK1/2 磷酸化来介导。见图 2。



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 高剂量组; 4. 低剂量组

图 2 不同剂量组氧化苦参碱对醛固酮诱导心肌细胞 p-ERK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of oxymatrine on p-ERK1/2 and ERK1/2 protein levels in cardiac myocytes induced by aldosterone

**3.4 OMT 对 ALD 诱导心肌细胞 ERK mRNA 表达的影响** 实时荧光定量结果显示空白组、模型组及 OMT 高、低剂量组的 ERK mRNA 分别为 1.00, 0.95, 0.98, 1.01, 各组之间均未见明显差异, 说明各给药组对 ERK 的影响并不通过基因水平。

### 4 讨论

医疗科技的进步与临床治疗手段的丰富, 使恶性心血管事件导致的死亡率降低, 然而心肌细胞凋亡、成纤维细胞异变 (增殖与肌纤维化) 及细胞外基质病变导致的心力衰竭 (CHF) 逐步成为心脏疾病演变的病理结果和主要死亡原因。研究证实心肌细胞损伤与凋亡可显著促进心脏衰竭的发生和发展, 故防止心肌细胞损伤在心血管疾病的治疗中具有重要意义<sup>[2]</sup>。

ALD 是肾素-血管紧张素-ALD 系统的重要组成

成分,其在心血管疾病的形成中起着重要的病理、生理作用。研究证实 ALD 可呈剂量依赖性地诱导心肌细胞凋亡<sup>[7]</sup>。ALD 诱导的心肌细胞损伤机制与 MAPK 家族密切相关<sup>[8-9]</sup>。MAPK 级联信号转导途径存在于所有真核生物中,是细胞外各种信号刺激引起细胞分化、增殖和凋亡等多种反应的共同汇聚点或中枢。而 ERK 通路是其重要的组成部分,ERK 参与细胞生长、发育、增殖、分化及细胞间的功能同步和细胞恶性转化等多种生理、病理过程。当细胞受到外界相应物质刺激后,继而激活 Ras/有丝分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调控激酶(MAPK/ERK)途径,激活的 ERK 停留在胞质中,促进细胞质靶蛋白磷酸化或调节其他蛋白激酶的活性,同时可使细胞骨架成分磷酸化,调节细胞形态及骨架的重分布,如果被激活的 ERK 进入细胞核,则会通过磷酸化转录因子,调控基因的表达<sup>[10-12]</sup>。Rude 等<sup>[13]</sup>证实 ALD 可诱导心肌细胞中 ERK 磷酸化增加,进而调控相关凋亡基因的表达。

以往研究证实 OMT 可呈剂量依赖性地延长小鼠异体移植心肌的存活期且可明显降低整体动物心率,延长 P-R 和 QT 间期,减慢右心房自动节律<sup>[14]</sup>,且对大鼠冠脉结扎诱发急性心肌梗死具有保护作用<sup>[15]</sup>。在 OMT 抑制胃癌细胞增殖试验中发现,加入 OMT 后癌细胞 ERK 磷酸化显著上调<sup>[16]</sup>。本文研究显示 OMT 对 ALD 诱导的心肌细胞损伤具有保护作用,其可显著提高细胞存活率并降低细胞 LDH 外漏量。与模型组相比,加入 OMT 预保护后,心肌细胞 p-ERK1/2 水平明显降低,而总 ERK1/2 蛋白表达无明显变化。实时荧光定量 PCR 结果显示各组 ERK mRNA 表达无显著差异,进一步说明 OMT 对 ERK 信号通路的影响是通过介导其蛋白表达,而不影响基因过程。综上所述,OMT 对 ALD 诱导的心肌细胞损伤的保护作用与 p-ERK1/2 水平上调有关。但 OMT 在体内保护心肌细胞的作用机制还有待进一步研究证实。

#### [参考文献]

[1] 王羿,徐旖旎,江滢,等.环维黄杨星 D 对高交感活性诱导心肌细胞损伤的保护作用[J].中药材,2014,37(9):1632-1635.  
[2] Wang L, Qian L. Mir-24 regulates intrinsic apoptosis pathway in mouse cardiomyocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e85389.  
[3] 杨进刚,杜兰芳.醛固酮与心血管疾病[J].心血管病学进展,2007,28(1):21-22.

[4] 常连庆,谢晓华.醛固酮诱导心肌肥大的机制[J].高血压杂志,2013,11(5):415-418.  
[5] Wang Q, Cui W, Zhang H L, et al. Atorvastatin suppresses aldosterone-induced neonatal rat cardiac fibroblast proliferation by inhibiting ERK1/2 in the genomic pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2013, 61(6):520-527.  
[6] Lee Y S, Kim J A, Kim K L, et al. Aldosterone upregulates connective tissue growth factor gene expression via p38 MAPK pathway and mineralocorticoid receptor in ventricular myocytes[J]. J Korean Med Sci, 2004, 19(6):805-811.  
[7] Xiao T T, Wang Y Y, Zhang Y, et al. Similar to spironolactone, oxymatrine is protective in aldosterone-induced cardiomyocyte injury via inhibition of calpain and apoptosis-inducing factor signaling[J]. PLoS one, 2014, 9(2):e88856.  
[8] Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, et al. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor *in vivo* [J]. Hypertension, 2013, 61(2):361-367.  
[9] Gajjala P R, Sanati M, Jankowski J. Cellular and molecular mechanisms of chronic kidney disease with diabetes mellitus and cardiovascular diseases as its comorbidities[J]. Front Immunol, 2015, doi:10.3389/fimmu.2015.00340.  
[10] Ulm S, Liu W, Zi M, et al. Targeted deletion of ERK2 in cardiomyocytes attenuates hypertrophic response but provokes pathological stress induced cardiac dysfunction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2014, 72:104-116.  
[11] 马莲环,刘建. ERK1/2 的研究进展[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2005, 25(3):279-281.  
[12] 陈新宇,蔡虎志,史微,等.温阳振衰颗粒对阿霉素诱导慢性心衰兔心肌细胞外信号调节激酶 5 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(1):14-18.  
[13] Rude M K, Duhaney T A, Kuster G M, et al. Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes [J]. Hypertension, 2005, 46(3):555-561.  
[14] 吴琴,高云.氧化苦参碱药理作用的分子机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6):759-761.  
[15] 王恒,吉杨丹,徐旖旎,等.氧化苦参碱对大鼠冠脉结扎诱发急性心肌梗死的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 2012, 18(4):154-157.  
[16] 陈晓峡,向小庆,叶红.苦参碱及氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11):361-364.

[责任编辑 刘德文]