

藜本内酯抑制血管紧张素 II 诱导的心肌肥大及其作用机制

黄美松¹, 刘鹏², 王诗才¹, 胡阳黔^{2*}

(1. 十堰市中西医结合医院, 湖北 十堰 442011;

2. 湖北医药学院 附属东风医院, 湖北 十堰 442008)

[摘要] **目的:**研究藜本内酯(LIG)对血管紧张素 II (Ang II) 诱导新生大鼠心肌细胞肥大的影响,并探讨其作用机制。**方法:**分离纯化 SD 大鼠心肌细胞后进行原代培养;将培养的心肌细胞经 Ang II (0.5 mg·L⁻¹) 诱导和不同质量浓度 LIG (20, 40, 80 mg·L⁻¹) 作用 1~3 d,另设空白组,在倒置显微镜下观察细胞形态,测定细胞表面积;运用 BCA 蛋白浓度测定方法测定各组心肌细胞中总蛋白含量;流式细胞术测定各组心肌细胞凋亡率;蛋白质免疫印迹(Western blot)测定各组心肌细胞中 p53, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况。**结果:**与空白组比较,原代培养的新生大鼠心肌细胞经 Ang II 诱导后细胞形态发生明显变化,心肌细胞出现肥大效应,细胞表面积和细胞总蛋白含量明显增加($P < 0.05$),细胞凋亡率明显上升($P < 0.05$),诱导凋亡 p53 和 Bax 蛋白表达明显上升而抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显降低($P < 0.05$);与 Ang II 单独作用组比较,不同浓度 LIG 和 Ang II 联合作用能够明显抑制心肌细胞肥大效应,细胞表面积、细胞总蛋白含量及细胞凋亡均逐渐下降并呈剂量依赖效应($P < 0.05$)。**结论:**LIG 能够抑制由 Ang II 诱导的心肌细胞肥大,并可能通过诱导 Bcl-2 蛋白表达,抑制 p53, Bax 蛋白表达而降低细胞凋亡率发挥作用。

[关键词] 心血管疾病; 藜本内酯; 血管紧张素 II; 心肌肥大; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0150-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130150

Ligustilide Inhibits Ang II C-induced Cardiac Myocytes Hypertrophy

HUANG Mei-song¹, LIU Peng², WANG Shi-cai¹, HU Yang-qian^{2*}

(1. *Shiyan Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Shiyan 442011, China;*

2. *The Affiliated Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442008, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ligustilide (LIG) on angiotensin II (Ang II)-induced cardiac myocytes hypertrophy and its mechanism in neonatal rats. **Method:** Myocardial cells of SD rats were isolated and purified for primary culture. The cultured myocardial cells were induced by Ang II (0.5 mg·L⁻¹) and treated with LIG (various concentrations: 20, 40, 80 mg·L⁻¹) for 1 to 3 days. Another blank group was established. Then the cells morphology was observed under inverted microscope and the cells surface area was determined. Total intracellular protein levels were detected by using commercial BCA protein kit and the rate of apoptosis was determined by flow cytometer. The protein expression levels of p53, Bcl-2 and Bax in myocardial cells were determined by Western blot. **Result:** As compared with the blank group, the cell morphology was obviously changed after exposure to Ang II; hypertrophy effect was present in myocardial cells, the cells surface area, total protein levels, and apoptosis rate were increased significantly ($P < 0.05$). The protein expression levels of p53 and Bax were increased significantly, and the protein expression level of Bcl-2 was decreased significantly ($P < 0.05$). As compared with Ang II alone group, the combination effect of LIG with different concentrations and Ang II can ameliorate the Ang II-induced hypertrophy of neonatal rat myocardial cells, the cells surface area, total protein levels and apoptosis rate were decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion:** LIG can

[收稿日期] 20150210(020)

[第一作者] 黄美松,主治医师,从事心血管内分泌治疗相关研究, Tel:0719-8615143, Email:hms8687352@sina.com.cn

[通讯作者] * 胡阳黔, 硕士, 主任医师, 从事心衰疾病病理学研究, Tel:0719-8272546, E-mail:huyangqian999@163.com

2.3 心肌细胞肥大效应观察 将生长状态良好的心肌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化计数后以细胞密度为 4.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 后弃掉培养基,按实验步骤 2.2 项中加药方式加入药物处理,作用 48 h 后用倒置显微镜观察细胞形态学变化,拍照。

2.4 心肌细胞表面积测定 将生长状态良好的心肌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后以细胞密度为 4.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h。吸去培养液,同实验步骤 2.2 项加药方式加入处理因素继续作用 48 h。用 PBS 轻柔清洗 3 次;每孔加入 4% 多聚甲醛 100 μL 固定 10 min, PBS 清洗细胞;每孔加入 0.1% Triton 100 μL 室温作用 5 min,以增大细胞膜的通透性, PBS 清洗细胞 3 次;每孔加入 1% BSA 100 μL 于 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 30 min;吸去 1% BSA,每孔加入 α -肌动蛋白抗体 (1:50, 1% BSA 稀释) 50 μL , 阴性对照用一个孔为 PBS 代替一抗,把 96 孔板置于湿盒内 4 $^\circ\text{C}$ 过夜,清洗细胞;加入罗丹明标记的二抗 (1:300, 1% BSA 稀释) 50 μL , 室温避光孵育 1 h;洗涤细胞后加入 DAPI 溶液 50 μL 进行细胞核染色,室温避光染色 10 min,清洗细胞;每孔加入 PBS 50 μL , 在荧光显微镜下观察和拍照。随机选择 10 个心肌细胞,运用 NIH 图像软件计算心肌细胞的表面积。

2.5 心肌细胞中总蛋白浓度测定 将生长状态良好的心肌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后以细胞密度为 3×10^5 个/孔接种于 24 孔板中,培养 24 h。吸去培养液,同实验步骤 2.2 项加药方式加入处理因素继续作用 48 h。收集细胞,用 PBS 洗涤 3 次,每组经细胞计数,选择 1×10^6 个细胞,加入细胞裂解液 RIPA (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.5, 150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS) 混匀,冰浴条件下超声破碎,冰上放置 30 min,然后 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min,收集上清,按照 BCA 蛋白浓度检测试剂盒说明书测定每组细胞中总蛋白浓度。

2.6 心肌细胞凋亡检测 将生长状态良好的心肌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后以细胞密度为 3×10^5 个/孔接种于 24 孔板中,培养 24 h。吸去培养液,同实验步骤 2.2 项加药方式加入处理因素继续作用 48 h。然后用 PBS 洗涤 3 次,用无 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,离心收集细胞,按照 Annexin-V/PI 试剂盒说明书操作,先加入 Binding buffer 500 μL 重悬细胞,再加入 FITC 标记的

Annexin-V 和 PI 各 5 μL 混匀,室温下避光孵育 15 min,运用流式细胞仪测定细胞凋亡。

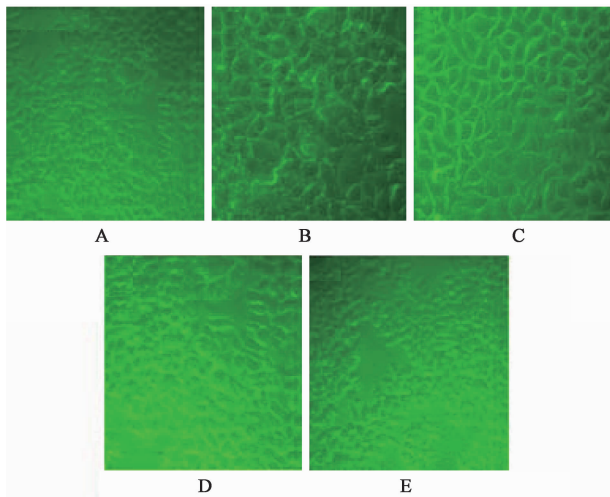
2.7 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 将生长状态良好的心肌细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化,计数后以细胞密度为 7×10^6 个/孔接种于 10 cm 细胞培养皿中,培养 24 h。吸去培养液,同实验步骤 2.2 项式加药方式加入处理因素继续作用 24 h。然后用 PBS 洗涤 3 次,0.25% 胰蛋白酶消化细胞,离心收集细胞。细胞经离心、重悬于 RIPA 细胞裂解液中,超声破碎,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 $^\circ\text{C}$ 离心 10 min,按照 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。将总蛋白 50 μg 进行 SDS-PAGE,转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,孵育一抗 (p53 抗体 1:1 000, Bax 抗体 1:2 000, Bcl-2 抗体 1:2 000 和 β -actin 抗体 1:3 000), 4 $^\circ\text{C}$ 过夜。TBST 洗膜、加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h。照片经增强型化学发光试剂 (ECL) 后扫描,蛋白表达灰度值经 Quantity-One 软件分析。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行相关数据分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用 T 检验或单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 Ang II 诱导的心肌细胞形态学的影响 单独用 Ang II 处理的心肌细胞形态发生显著变化,细胞膨胀,细胞内容物增多,出现颗粒状物质,细胞发生不规则状态,细胞贴壁不牢;当加入 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LIG 时,可以看到规则状态的细胞形态,细胞颗粒状物质减少,但是细胞体积明显增大;当 LIG 质量浓度为 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,心肌细胞体积与 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LIG 处理组比较明显变小,但仍大于空白组,细胞中无颗粒状物质出现,显微镜下能观察到清晰的细胞轮廓;当 LIG 质量浓度为 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,心肌细胞在细胞形态,体积与空白组比较无明显差异,细胞生长状态良好,贴壁性牢固。见图 1。

3.2 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大效应及心肌细胞表面积的影响 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 单独作用心肌细胞 48 h 后,细胞表面积明显增加,与空白组比较存在极显著差异 ($P < 0.01$);当加入 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LIG 后,细胞表面积减小,与 Ang II 单独作用组比较存在显著差异 ($P < 0.05$),但细胞表面积仍大于空白组;当 LIG 质量浓度为 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞表面积显著减小,与 Ang II 单独作用组比较存在极显著差异 ($P < 0.01$),但 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LIG + Ang II 处理组的细



A. 空白组; B. Ang II 组; C. Ang II + 20 mg·L⁻¹ LIG 组; D. Ang II + 40 mg·L⁻¹ LIG 组; E. Ang II + 80 mg·L⁻¹ LIG 组(图 2~6 同)

图 1 LIG 对 Ang II 诱导的心肌细胞形态学的影响(×200)
Fig. 1 Effects of LIG on morphology change of myocardial cells induced by Ang II(×200)

胞表面积仍大于空白组;而 80 mg·L⁻¹ LIG + Ang II 处理组的细胞表面积与空白组比较无显著性差异。见图 2,3。

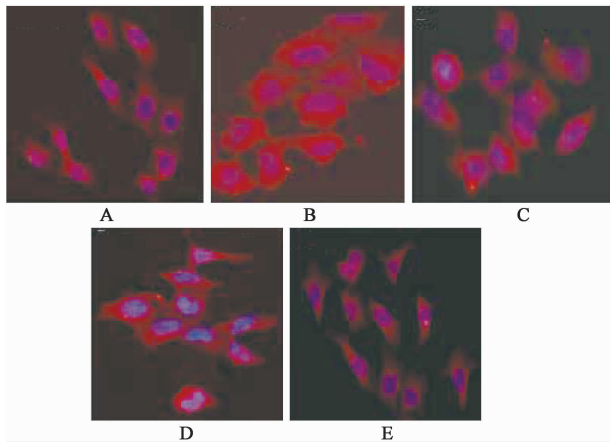
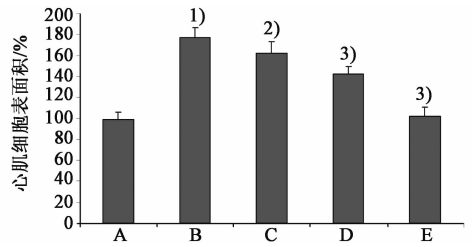


图 2 LIG 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大效应的影响(×400)
Fig. 2 Effects of LIG on myocardial cells hypertrophy induced by Ang II(×400)

3.3 对心肌细胞蛋白合成的影响 Ang II 单独作用心肌细胞 48 h 后细胞中蛋白浓度显著增加,与空白组比较具有极显著性差异($P < 0.01$);当分别加入不同质量浓度的 LIG(20,40,80 mg·L⁻¹)时,心肌细胞中蛋白浓度逐渐降低,并呈浓度依赖效应,其中,LIG 质量浓度为 20 mg·L⁻¹时,心肌细胞中蛋白浓度与 Ang II 单独作用组细胞中蛋白浓度比较具有显著差异($P < 0.05$);当 LIG 质量浓度为 40 mg·L⁻¹和 80 mg·L⁻¹时呈极显著差异($P < 0.01$),但是,0.5 mg·L⁻¹Ang II + 80 mg·L⁻¹ LIG 处理组细胞表面积与空



与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 Ang II 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (图 4,6 同)

图 3 LIG 对心肌细胞表面积的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 3 Effects of LIG on myocardial cells surface area($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

白组比较无统计学意义。上述结果表明,Ang II 能促进心肌细胞中蛋白质的合成,而 LIG 能抑制蛋白质的抵抗 Ang II 的这一生物学功能。见图 4。

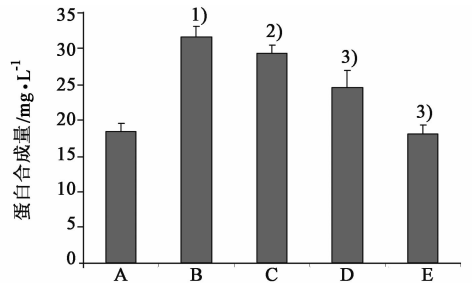


图 4 LIG 对心肌细胞蛋白合成的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 4 Effect of LIG on protein synthesis of myocardial cells($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.4 对心肌细胞凋亡的影响 心肌细胞经 Ang II 单独作用时,其细胞凋亡率为(43.62 ± 4.45)%,当分别加入 20,40,80 mg·L⁻¹ LIG 时,其细胞凋亡率逐渐下降分别为(27.93 ± 3.86)%,(20.64 ± 4.12)%,(3.29 ± 3.21)%,研究结果表明,Ang II 能显著诱导心肌细胞发生凋亡($P < 0.05$);LIG 能抑制由 Ang II 诱导心肌细胞的凋亡,且随着 LIG 浓度的增加心肌细胞凋亡率逐渐降低,并呈一定的剂量-效应关系($P < 0.05$)。见图 5。

3.5 对心肌细胞中 Bcl-2, Bax 和 p53 蛋白表达水平的影响 Ang II 单独作用心肌细胞后,Bax 和 p53 蛋白表达量显著增加,与空白组比较存在极显著差异($P < 0.01$);当加入不同浓度的 LIG(20,40,80 mg·L⁻¹)后 Bax 和 p53 蛋白表达量逐渐降低,并呈剂量依赖效应,与 Ang II 单独作用组比较存在统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。相反,Ang II 单独作用组 Bcl-2 蛋白表达量显著减少,与空白组比较存在极显著差异($P < 0.05$);当加入 20,40,80 mg·L⁻¹的 LIG 后 Bcl-2 蛋白表达量逐渐增加,并呈剂量依赖效应,与 Ang II 单独作用组比较存在统计学意义($P <$

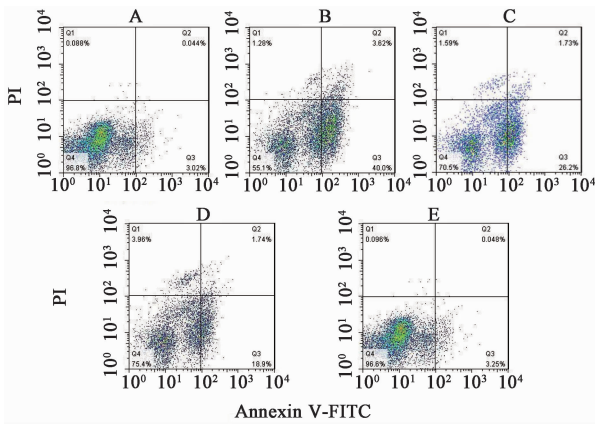


图 5 LIG 对心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effects of LIG on myocardial cells apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

0.05, $P < 0.01$)。上述结果表明, Ang II 可促进促凋亡蛋白 p53 和 Bax 的表达, 抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 而 LIG 能抵抗 Ang II 的这一生物学功能。见图 6。

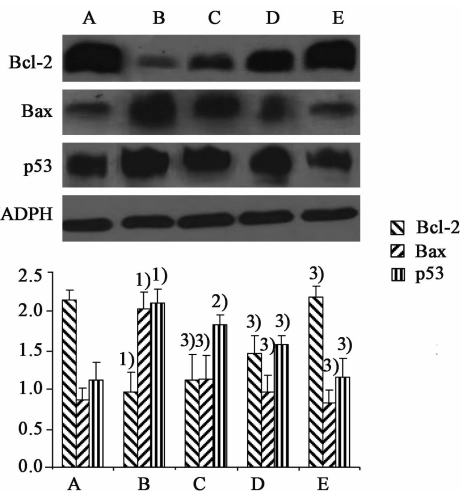


图 6 LIG 对心肌细胞中 Bcl-2, Bax 和 p53 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effects of LIG on expression of Bcl-2, Bax, p53 protein of myocardial cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

有研究表明早期心肌肥大反应可对机体产生有利的代偿反应, 然而持续的心肌肥大往往会导致心力衰竭是心脏病死亡率和发病率最主要的原因之一, 同时心肌肥大也是心脏功能逐渐衰竭最显著的特征^[12]。目前, 心肌肥大已被用于预测心力衰竭导致心脏病死亡率的独立危险因素, 各种物理或化学因素包括机械拉伸, 内皮素-1, Ang II 均能引起心脏病患者心肌肥大的, 但其具体作用机制仍不完全清楚^[13]。相关研究表明在小鼠发生心肌肥大时, 丹参和川芎能够抑制左心室的形成, 可利用丹参、川芎、

黄芪等中药复方抑制心肌细胞肥大效应来治疗心肌衰竭疾病, 但关于藁本内酯 LIG 具体在心肌肥大导致心肌衰竭防治中发挥作用尚少未^[14]。Ang II 是一种心肌细胞肥大诱导剂, 前期研究发现 Ang II 作用新生小鼠心肌细胞 48 h 后, 细胞表面积和细胞中总蛋白含量均能显著增加, 诱发心肌细胞肥大效应^[15]。本研究用 Ang II 作用鼠心肌细胞发现其可以诱导心肌细胞肥大, 成功建立心肌细胞肥大模型。随后在不同浓度的 LIG 作用下, 发现 LIG 能显著抑制 Ang II 作用下心肌细胞总蛋白含量和表面积且呈剂量依赖效应, 说明 LIG 能显著抑制心肌细胞的肥大效应。

有研究表明细胞凋亡与左心室细胞过度肥大密切相关^[8]。心肌细胞肥大的过程中细胞凋亡和细胞增殖也在同时发生, 细胞的增殖、凋亡和细胞肥大在在左室重塑过程中彼此之间相互联系, 相互影响^[10-11]。心肌细胞过度肥大会转向细胞凋亡, 进而导致心肌衰竭诱发心血管疾病, 因此心肌肥大和细胞凋亡在心力衰竭等心血管疾病中密切相关^[16]。Bcl-2 蛋白是一种抗凋亡蛋白, 其功能在于抑制细胞凋亡, 而 Bax 蛋白是一种促凋亡蛋白, 正常生理条件下促进细胞凋亡。细胞是否发生凋亡取决于 Bcl-2/Bax, 当 Bcl-2 蛋白表达量高于 Bax 蛋白时细胞凋亡被抑制, 反之亦然^[9]。p53 基因表达产物在细胞凋亡过程中发挥着重要作用, 研究表明 p53 基因通过上调 Bax 蛋白和下调 Bcl-2 蛋白的表达而使细胞发生凋亡, p53 基因过表达不仅能激活细胞凋亡通路, 而且还能抑制细胞周期由 G₁ 期进入 S 期^[17]。为进一步揭示 LIG 在心肌肥大中发挥的作用, 本研究检测了不同浓度 LIG 的作用下心肌细胞的凋亡率变化以及凋亡相关 p53, Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况。研究发现, 单独 Ang II 作用时, 心肌细胞凋亡率显著上升而相应抑制凋亡 Bcl-2 蛋白表达显著降低而促凋亡 Bax, p53 蛋白表达显著上升; 而 LIG 作用于心肌肥大的细胞, 随着作用浓度的升高, 其细胞凋亡率能够逐渐下降, 而 Bcl-2 蛋白表达逐渐上升, Bax 和 p53 蛋白表达逐渐下降, 说明 LIG 能通过抑制 p53 和 Bax 蛋白的表达以及促进 Bcl-2 蛋白表达降低 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡。

综上所述, 本研究发现 LIG 具有防治心肌肥大的功能, 而 LIG 的这一功能可能通过抑制心肌细胞凋亡而实现。但是 LIG 预防和治疗心肌肥大具体作用机制值得深入研究。通过本研究对于揭示 LIG 在心肌肥大诱导的心力衰竭相关心血管疾病防治中的

药理作用具有重要价值,为 LIG 的进一步研究开发提供依据。

[参考文献]

[1] 吉国辉,江斌,朱怡洁,等.不同前处理方法对川芎药材中藜本内酯含量的影响[J].食品与药品,2014,16(1):15-17.

[2] 左爱华,王莉,肖红斌.藜本内酯药理学和药代动力学研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(22):3350-3353.

[3] Peng B, Zhao P, Lu Y P, et al. Z-ligustilide activates the Nrf2/HO-1 pathway and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. Brain research, 2013, 1520(4): 168-177.

[4] 林乔,赵爱国,陈建南,等.藜本内酯的镇痛抗炎作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):165-168.

[5] 王迎超,黄怡,王毅,等.Z-藜本内酯对人脐静脉内皮细胞保护作用及其机制研究[J].中草药,2013,44(9):1157-1161.

[6] Lu Q, Qiu T Q, Yang H. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 542(1): 136-140.

[7] 张磊,李兴平,雷玲,等.丹参,黄芪,玄参对内毒素缓释致热大鼠TLR4/NF- κ B信号通路活化的影响[J].中药药理与临床,2014,30(1):73-75.

[8] 郭万刚,余志斌,谢满江.蛋白激酶C δ 可能参与肥大心肌细胞转向凋亡[J].生理学报,2006,58(3):269-274.

[9] Rueda J O V, Palomeque J, Mattiazzi A. Early apoptosis in different models of cardiac hypertrophy induced by high renin-angiotensin system activity involves CaMKII[J]. J Appl Physiol, 2012, 112(12): 2110-2120.

[10] Sun B, Huo R, Sheng Y, et al. Bone morphogenetic

protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy [J]. Hypertension, 2013, 61 (2): 352-360.

[11] Kwak H B, Song W, Lawler J M. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart[J]. FASEB J, 2006, 20(6): 791-793.

[12] Kazakov A, Müller P, Jagoda P, et al. Endothelial nitric oxide synthase of the bone marrow regulates myocardial hypertrophy, fibrosis, and angiogenesis[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(3): 397-405.

[13] 睦荣燕,王万辉,连磊凡,等.染料木素对 Iso 致心肌肥厚大鼠的抗氧化及抑制炎症反应作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):175-178.

[14] 章燕,戴小华.益气活血中药改善急性心肌梗死后左心室重构实验研究进展 [J][J].安徽中医学院学报,2012,31(2):74-76.

[15] Dai D F, Johnson S C, Villarin J J, et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and G α q overexpression-induced heart failure[J]. Cardiovasc Res, 2011, 108(7): 837-846.

[16] Freundlich M, Li Y C, Quiroz Y, et al. Paricalcitol downregulates myocardial renin-angiotensin and fibroblast growth factor expression and attenuates cardiac hypertrophy in uremic rats[J]. Am J Hypertens, 2014, 27(5): 720-726.

[17] Boyle A J, Shih H, Hwang J, et al. Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy[J]. Exp Gerontol, 2011, 46(7): 549-559.

[责任编辑 周冰冰]