

丹参提取物对血管紧张素 II 致培养乳鼠心肌细胞肥大的影响

毛秉豫¹, 杨雷^{1*}, 徐国昌¹, 黄显章¹, 叶松山¹, 曾小涛²

(1. 南阳理工学院医学实验中心, 河南 南阳 473004;

2. 中国医学科学院实验动物研究所比较医学国家重点实验室, 北京 100021)

[摘要] **目的:** 研究丹参提取物对血管紧张素 II (Ang II) 致心肌肥大及相关基因表达的影响, 并探讨其抑制心肌肥大的作用机制。**方法:** 乳鼠心肌细胞原代培养, 复制 Ang II 致心肌细胞肥大模型, 随机分为模型组 ($10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II), 缬沙坦 (10^{-4} , 10^{-3} , $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Val) 对照组, 丹参提取物 10^{-4} , 10^{-3} , $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的丹参提取物。BI-2000 医学图像分析系统进行心肌细胞计数和直径测定, Bradford 法测定心肌细胞蛋白质含量, 反转录 PCR (RT-PCR) 法测定蛋白激酶 D1 (PKD1) mRNA 的表达。**结果:** 与正常对照组相比, 模型组心肌细胞数量上变化不大, 心肌细胞直径、总蛋白质含量及 PKD1 mRNA 的表达明显增加 ($P < 0.05$); 和模型组相比, Val 对照组心肌细胞直径、总蛋白质含量及 PKD1 mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.05$); 而丹参提取物中、高剂量组心肌细胞直径、总蛋白质含量及 PKD1 mRNA 的表达均明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 丹参提取物能显著抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大, 可能与对 PKD1 mRNA 的表达调控密切相关。

[关键词] 丹参提取物; 心肌梗死; 血管紧张素 II; 蛋白激酶 D1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0263-04

Effect of Salvia Extract on Cultured Neonatal Rat Cardiocytes Induced by Angiotensin II

MAO Bing-yu¹, YANG Lei^{1*}, XU Guo-chang¹, HUANG Xian-zhang¹, YE Song-shan¹, ZEN Xiao-tao²

(1. Medical Experimental Center, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China;

2. Chinese Academy of Medical Sciences and Experimental Animal Research Institute of State Key Laboratory of Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibition effect of salvia extract on cultured neonatal rat hypertrophic cells induced by angiotensin II (Ang II) and the related gene regulation to mRNA expression. **Method:** The Ang II-induced cardiac myocyte hypertrophy model was replicated, the neonatal rat cardiomyocytes in primary culture were randomly divided into normal control group, model group, valsartan (Val) in the control group, and salvia extract three different dose groups. There was any added drugs in the normal control group, and the final concentration was $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II in the model group, $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Val in Val control group, and 10^{-4} , 10^{-3} , $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ salvia extract in the other three groups. Myocardial cell counting and diameter were determined by the BI-2000 medical micrograph analyzing system, protein content was detected by the Bradford method, and protein kinase D1 (PKD1) mRNA expression was analysed by the reverse transcription PCR (RT-PCR) method. **Result:** Compared with the normal control group, the number of myocardial cells in model group changed little, yet cardiomyocyte diameter, total protein content and PKD1 mRNA expression were significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, cardiomyocyte diameter, the total protein content and PKD1 mRNA expression of the Val control group were significantly lower ($P < 0.05$); as well as the 10^{-3} , $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ salvia

[收稿日期] 20121105(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173372)

[第一作者] 毛秉豫, 医学博士, 教授, 从事心血管疾病的的气血并治方药研究, Tel:0377-62232916, E-mail: maobingyu2005@126.com

[通讯作者] * 杨雷, 医学博士, 讲师, 从事中药抗心血管疾病发病机制研究, Tel:0377-62071309, E-mail: yanglei200609@126.com

extract groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Salvia extract can significantly inhibit hypertrophy of cardiac myocyte induced by Ang II, which may be closely related to the mRNA expression regulation of PKD1.

[**Key words**] salvia extract; myocardial infarction; angiotensin II; protein kinase D1

心肌梗死后心室重塑是由于一系列复杂的分子和细胞机制而导致心肌结构、功能和表型的改变,这些变化包括心肌肥大、凋亡以及心肌细胞外基质和组分的变化等^[1]。其中心肌细胞肥大是最为重要的病理变化之一,在心肌重塑中的作用愈来愈受到重视,被认为是心衰从“代偿”到“失代偿”转折的关键因素,对心肌梗死后心功能的改善起关键性作用^[2]。本实验采用原代培养的乳鼠心肌细胞,复制血管紧张素 II 导致的心肌细胞肥大模型,观察丹参提取物对大鼠心肌细胞肥大的影响,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 动物 新出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠乳鼠,雌雄不拘,由河南省实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(豫)2005-0001,动物质量合格证号 0003857,用于体外心肌细胞培养。

1.2 药物与试剂 丹参由河南中医学院药学院陈随清教授鉴定,为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)的干燥根及根茎。丹参提取物为南阳理工学院方药研究所提供,系经水提、大孔吸附树脂纯化所得,纯化后总酚酸的含量为 63.7%。血管紧张素 II(Ang II),批号 064K51201;缬沙坦(Val),批号 S0004,以上均购自美国 Sigma 公司。Dulbecco's Modified Eagle's Medium,批号 1019564;HEPES,批号 010111625;胰蛋白酶,批号 1118374;胶原酶,批号 1202775;以上均来自 Gibco 公司,美国。胎牛血清(特级),杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 110909;小鼠 α -横纹肌动蛋白单克隆抗体(α -SCA),武汉博士德生物工程有限公司,批号 20101109;MasterPure™ RNA Purification Kit, Epicentre 美国公司,批号 MCR85102;Access Quick RT-PCR System, Promega 美国公司,批号 A1250137。其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 IX71 型制冷摄像头倒置显微镜,日本 Olympus 公司;8000 型 CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;ZHJH-C1112B 型超净工作台,河南智诚科技有限公司;Allegra 64R 型低温冷冻离心机,美国贝克曼公司;BI-2000 型医学图像分析系统,成都泰盟科技有限公司;Gel Doc XR+ 型凝胶成像分析系统,美国伯乐公司。

2 方法

2.1 心肌细胞的培养与鉴定 参照文献[3],将出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠,雌雄不拘,无菌条件下取出心脏,将心脏剪成 1 mm³ 大小的组织块,加入胰蛋白酶和胶原酶混合消化液,于 37 °C 水浴下振荡分次消化,直至组织块完全消化,收集除第 1 次消化后以外的细胞悬液,加入胎牛血清终止消化。4 °C 下离心,弃上清,制成单细胞悬液,差速贴壁分离法孵育(1~1.5) h。经差速贴壁分离后,将未贴壁心肌细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 悬浮,按不同的实验目的用含 10% 胎牛血清的 DMEM 调节细胞密度至 10⁸/L,按不同实验目的接种好的心肌细胞,在培养前 48 h 内加 0.1 mmol·L⁻¹ 的 5-BrdU 抑制非心肌细胞增殖,48 h 更换培养液,72 h 换无血清培养液并加入 10⁻⁶ g·L⁻¹ Ang II 和终浓度为(10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² g·L⁻¹) 的丹参提取物,继续作用 48 h 后用于检测。

经以上方法分离制备的心肌细胞,免疫组织化学方法鉴定心肌细胞,一抗为小鼠 α 横纹肌肌动蛋白(α -SCA),3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色,如纯度达 95% 以上,可用于实验。实验分正常对照组,不加任何药物;模型组,加入 Ang II,终浓度为 1 × 10⁻⁶ g·L⁻¹;Val 组,在模型组基础上加入 Val,终浓度为 10⁻⁶ g·L⁻¹;丹参提取物组,在模型组基础上加入不同剂量的丹参提取物,其终浓度分别为 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² g·L⁻¹。

2.2 心肌细胞计数和直径检测 取有心肌细胞生长的盖玻片,用预冷的 D-Hank' 液漂洗血清及杂质,再用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后晾干,用 BI-2000 医学图像分析系统对心肌细胞进行计数并测量单个细胞直径,每孔测 5 个视野,每个视野测 10~15 个细胞,取其平均值。每组重复 3 次。

2.3 心肌细胞蛋白含量检测 将接种于 24 孔板内培养好的心肌细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化并作细胞计数。先用 0.01 mmol·L⁻¹ 的 PBS 离心 3 次,弃上清,加入 RIPA 裂解缓冲液,超声破碎细胞,每管 30 s × 2 次,冰浴上操作。再以 12 000 r·min⁻¹, 4 °C 下离心 20 min,取上清液按照 Bradford 法测定心肌细胞蛋白质含量,并根据每孔细胞数计算单个心肌细胞的蛋白含量。

2.4 对乳鼠肥大心肌细胞 PKD1 的 mRNA 表达影响 用 MasterPure™ RNA Purification Kit 提取心肌细胞总 RNA,参照试剂盒说明书进行。提取完毕,加入 100 μL 75% 乙醇, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。采用 ArrayDesigner4.0 设计 PKD1 特异引物,长度 20 bp,预期产物大小为 198 bp。上游引物 5'-GCATGAGCTAGCCTACAGCC-3',下游引物 5'-CTAATCAGCAGCTGGGACT-3'; β -actin 引物,长度 20 bp,预期产物大小为 138 bp。上游引物 5'-GCAGTTGGTTGGAGCAA-3',下游引物 5'-ATGCCGTGGATACTTGA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,以 β 肌动蛋白(β -actin)作为内对照,按照反转录 PCR (RT-PCR) 试剂盒说明,进行一步法 RT-PCR 扩增。对于扩增的产物,采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,100 V 电压下电泳 40 min 后用凝胶图像分析仪采集图像并分析条带灰度值,以目的基因与 β -actin 基因灰度比值作为各目的基因 mRNA 的相对表达量。

2.5 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件系统,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌细胞形态及鉴别结果 心肌细胞在培养 24 h 后开始伸展,高度折光,细胞形态不规则,呈梭形、三角形、星形等,部分细胞聚集成团生长,开始出现收缩运动,72 h 后细胞有节律的收缩运动,细胞成团生长尤为显著。细胞免疫化学证实阳性染色细胞达 99% 以上,见图 1。

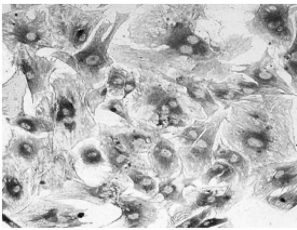


图 1 正常心肌细胞 α -SCA (免疫组化, $\times 200$)

3.2 对乳鼠肥大心肌细胞总蛋白含量、细胞数和细胞直径的影响 倒置相差显微镜 400 倍下观察,心肌细胞贴壁牢固,生长良好,正常对照组心肌细胞呈三角形、梭形、或者不规则形,中央有卵圆形核,胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起,呈放射状排列;模型组细胞多饱满呈三角形或者圆形,且细胞明显肥大,并可见细胞碎片;和模型组相比,Val 组和丹参提取物各剂量组心肌细胞直径明显减小,肥大程度明显减轻,细胞碎片减少,细胞数量增多。和正常

对照组相比,模型组心肌细胞总蛋白含量明显增加 ($P < 0.05$);和模型组相比,Val 组和丹参提取物各剂量组心肌细胞总蛋白含量明显减少 ($P < 0.05$)。各组间心肌细胞数量无明显差异,而心肌细胞直径,模型组较正常对照对照组增加明显 ($P < 0.05$),而 Val 组和丹参提取物各剂量组较模型组明显减少 ($P < 0.05$)。见表 1,图 2。

表 1 丹参提取物对乳鼠肥大心肌细胞总蛋白含量、细胞数和细胞直径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	药物终浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	蛋白质含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	细胞数 / 10^3 个	细胞直径 / μm
正常对照	-	19.3 \pm 1.3	222.2 \pm 16.7	20.8 \pm 3.2
模型	-	25.0 \pm 1.2 ¹⁾	215.3 \pm 17.4	28.7 \pm 3.8 ¹⁾
Val	1×10^{-6}	21.2 \pm 1.4 ²⁾	218.8 \pm 18.3	21.3 \pm 4.5 ²⁾
丹参提取物	1×10^{-4}	22.1 \pm 1.5 ²⁾	218.3 \pm 16.9	20.6 \pm 3.8 ²⁾
	1×10^{-3}	21.7 \pm 1.3 ²⁾	227.6 \pm 17.8	20.4 \pm 2.9 ²⁾
	1×10^{-2}	19.0 \pm 1.1 ²⁾	229.5 \pm 19.2	19.9 \pm 3.0 ²⁾

注:和正常对照组相比¹⁾ $P < 0.01$;和模型组相比²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

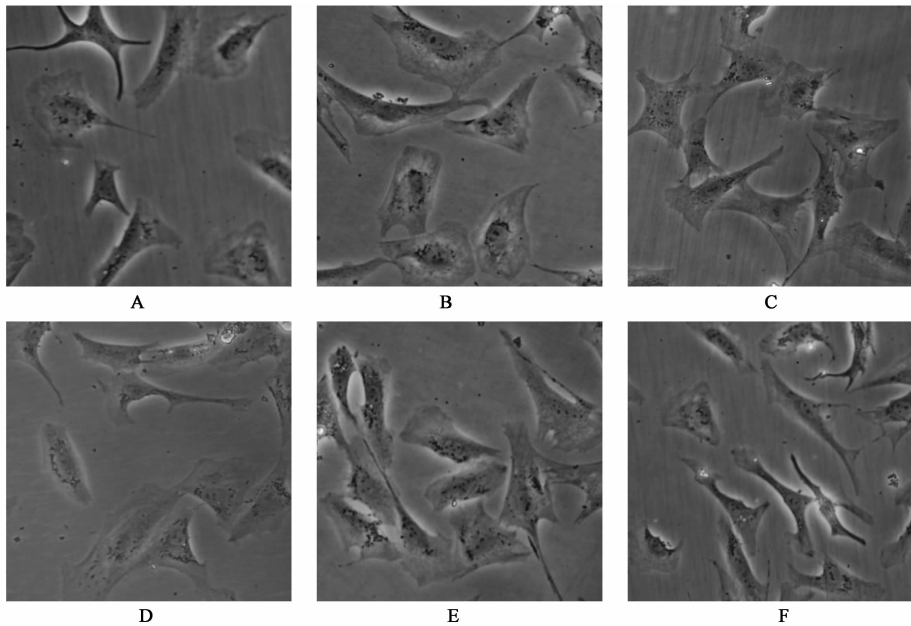
3.3 对乳鼠肥大心肌细胞 PKD1 mRNA 的表达影响 实验结果表明,心肌细胞培养 96 h 后,和正常对照组相比,模型组心肌细胞 PKD1 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。和模型组相比,Val 组心肌细胞 PKD1 mRNA 的表达显著下降 ($P < 0.05$);丹参提取物中、高剂量组心肌细胞 PKD1 mRNA 的表达均显著下降 ($P < 0.05$)。同时,丹参提取物中、高剂量组和 Val 组相比,两者对 PKD1 mRNA 的表达抑制效果基本相当。见表 2。

表 2 丹参提取物对乳鼠肥大心肌细胞 PKD1 的 mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	药物终浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PKD1/ β -actin
正常对照	-	0.393 \pm 0.064
模型	-	0.898 \pm 0.108 ¹⁾
Val	1×10^{-6}	0.384 \pm 0.099 ²⁾
丹参提取物	1×10^{-4}	0.786 \pm 0.117
	1×10^{-3}	0.366 \pm 0.083 ²⁾
	1×10^{-2}	0.343 \pm 0.075 ²⁾

4 讨论

心肌梗死后的心肌细胞肥大有一定的代偿作用,但易产生心肌缺血、心律失常,最终不可避免地引起心脏收缩和舒张功能的下降,导致心衰的发生。因而,心肌肥大是心血管疾病的重要危险因素之一,



A. 正常对照组; B. 模型组; C. Val 组; D. 丹参提取物 $1 \times 10^{-4} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; E. 丹参提取物 $1 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; F. 丹参提取物 $1 \times 10^{-2} \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

图 2 丹参提取物对乳鼠肥大心肌细胞直径的影响 ($\times 400$)

故研究心肌梗死后心室肥厚的发病机制以及如何预防和逆转左心室肥厚一直是心血管界所关注的问题^[2-3]。

Ang II 是 RAS 系统中的 1 种主要的生物活性物质,在心肌细胞肥大的发生和发展过程中起了重要的作用。Ang II 诱导心肌细胞肥大的模型,已经较成熟且被广大学者应用^[4-6],另外,采用乳鼠心肌细胞培养进行研究,排除了压力超负荷的影响及整体实验中的神经激素干扰,AngII 直接诱导心肌肥厚的发生而不依赖于血液动力学因素,故此选用此模型。

本研究表明在离体细胞培养水平下,和 Val 一样,丹参提取物可以明显抑制 AngII 诱发的心肌细胞肥大,这可能与下调 PKD1 mRNA 的表达密切相关。之前的研究表明^[7], Ca^{2+} 是引起心肌细胞发生肥大变化的第二信使,细胞内 Ca^{2+} 超载在刺激心肌肥大的信号转导过程起重要作用。AngII 促进心肌细胞蛋白质合成的作用可能是通过其受体介导的,并且有赖于 Ca^{2+} 升高的信息传递途径。AngII 与其受体结合后,可通过 PKC 磷酸激酶系统使胞内核酸、蛋白质合成增加,而 PKD1 也属于 PKC 家族成员之一。据此,我们推测,在本实验中,丹参提取物通过降低 AngII 诱发心肌细胞的 Ca^{2+} 超载,抑制 Ca^{2+} /钙调神经蛋白依赖性蛋白激酶的活性,并进一步抑制 PKD1 的转录表达,从而有效地逆转心肌细胞的肥大。

[参考文献]

- [1] 杨雷,毛秉豫. 芪参益气滴丸对心肌梗死大鼠心肌的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 206.
- [2] 毛秉豫,茹永新. 芪参益气滴丸对模型大鼠心肌梗死后左室结构及心功能的影响[J]. 中医杂志, 2011, 52(2): 151.
- [3] Fiedler B, Wollert K C. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca^{2+} -ealceineufin-NFAT cascade in cardiac myocytes [J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(3): 450.
- [4] 谢东霞,毛秉豫. 芪参益气滴丸对心肌梗死后气虚血瘀证患者心室重构及心功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 192.
- [5] 李磊,吴剑,龚惠,等. 奥美沙坦不依赖血管紧张素 II 改善压力超负荷诱发的小鼠心脏肥大[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2010, 10(5): 301.
- [6] 陈小文,黄燮南,吴芹. 人参皂苷 Rb_1 抑制 AngII 诱导的心肌细胞肥大[J]. 遵义医学院学报, 2008, 31(5): 457.
- [7] Kim Y I, Park J E, Brand D D, et al. Protein kinase D1 is essential for the proinflammatory response induced by hypersensitivity pneumonitis-causing thermophilic actinomycetes *Saccharopolyspora rectivirgula* [J]. J Immunol, 2010, 184(6): 3145.

[责任编辑 李玉洁]