

通心络对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大及 Cx43mRNA 表达的影响

杨军, 丁赛良*, 邓彪, 王光辉, 张勇, 王苏燕, 邝宇
(南华大学附属第一医院心内科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 目的: 观察通心络(Tongxinluo, TXL)超细干粉水提物对异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)诱导的 H9c2 心肌细胞肥大的作用, 并探讨其对缝隙连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)mRNA 表达的影响。方法: 将培养的 H9c2 心肌细胞随机分为对照组、TXL 组、Iso 组和 Iso + TXL 组, 通心络以通心络超细干粉水提物的形式加入, 使用异丙肾上腺素诱导 72 h 后, 采用相差显微镜测量细胞大小, BCA 法测定蛋白浓度, 运用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定 Cx43mRNA 的表达。结果: Iso 刺激 H9c2 心肌细胞 72 h 后, Iso 组细胞直径增大, 高于对照组($P < 0.05$); 通心络对正常 H9c2 心肌细胞直径无明显影响, 但能抑制 Iso 诱导的细胞直径增大($P < 0.05$)。Iso 组蛋白浓度明显升高, 高于对照组($P < 0.05$); 通心络对正常 H9c2 心肌细胞蛋白浓度无明显影响, 但能抑制 Iso 诱导的蛋白浓度的升高($P < 0.05$)。Iso 组 Cx43mRNA 表达明显减少, 低于对照组($P < 0.05$); 通心络对正常 H9c2 心肌细胞 Cx43mRNA 表达无影响, 但能够抑制 Iso 诱导的 Cx43 mRNA 表达的下调($P < 0.05$)。结论: 通心络可以抑制 Iso 诱导的 H9c2 心肌细胞肥大及 Cx43mRNA 表达的下调。

[关键词] 通心络; 心肌肥大; H9c2 心肌细胞; 连接蛋白 43; 异丙肾上腺素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0191-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0934.023.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 9:34

[收稿日期] 20120416(002)

[基金项目] 湖南省科技厅重点课题项目(2009SK2010); 湖南省自然科学基金重点项目(11JJ2046)

[第一作者] 杨军, 副教授, 博士, 从事中西医结合心血管病防治研究, E-mail: yangjunincn@163.com

[通讯作者] * 丁赛良, 硕士研究生在读, 从事中西医结合冠心病治疗研究, Tel: 18773488787, E-mail: dingsailiang@163.com

- [5] 王斌, 孙建宁, 石任冰, 等. 清脑宣窍滴丸对大鼠急性脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 151.
- [6] 刘勇, 胡明均, 何国厚. Fas/FasL 的高表达在缺血性脑损伤中的意义[J]. 中国临床康复, 2003, 7(31): 4184.
- [7] 先雄斌, 袁琼兰. Caspase-3 与脑缺血再灌注后神经元凋亡[J]. 海南医学, 2008, 19(8): 150.
- [8] 胡跃强, 胡国恒, 龙华君, 等. 清热化痰方提取物预处理对大鼠脑缺血耐受作用及 Fas/FasL 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(8): 153.
- [9] Siesj B K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. (1992) [J]. J Neurosurg, 2008, 108(3): 616.
- [10] 任俊伟, 杨琴, 陈娜, 等. 白藜芦醇对脑缺血再灌注后细胞凋亡及 Caspase-3 表达的影响[J]. 中成药, 2011, 33(4): 570.
- [11] 白文婷. 巴曲酶对大鼠脑缺血再灌注 Fas 基因和 FasL 基因表达变化的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2011, 18(3): 173.
- [12] 宋建立, 方川, 王佳良, 等. 活血法配合西医治疗重型颅脑损伤昏迷的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 131.
- [13] 赖真, 李丽珊, 程少冰. 黄芪加红花对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及半胱氨酸蛋白酶-3 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2): 45.
- [14] 毛焯, 刘丽, 王冬雪. 参芎注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠 Fas, FasL 蛋白表达的影响[J]. 黑龙江医学, 2008, 32(8): 580.
- [15] 贾士奇, 王军, 张红霞, 等. 生姜对局灶性脑缺血大鼠海马神经细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 163.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Tongxinluo on H9c2 Cardiomyocytes Hypertrophy and Expression of Connexin43 mRNA Induced by Isoproterenol

YANG Jun, DING Sai-liang*, DENG Biao, WANG Guang-hui, ZHANG Yong, WANG Su-yan, KUANG Bei
(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Tongxinluo (TXL) on hypertrophy of H9c2 cardiomyocytes and connexin 43 mRNA expression induced by isoproterenol (Iso). **Method:** Cultured H9c2 cardiomyocytes were randomly divided into four groups: control group, TXL group, Iso group, and Iso + TXL group. After 72 hours of culture, cell size was determined by phase contrast microscope, the protein concentrations were measured by BCA method and the expression of Cx43 mRNA were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Cell size of H9c2 cardiomyocytes of the Iso group ($P < 0.05$) was increased more prominently than the control group. Compared with Iso group, Tongxinluo attenuated the increase of cardiomyocytes size ($P < 0.05$). H9c2 cardiomyocytes protein concentrations in the Iso group ($P < 0.05$) was increased more significantly than the control group. Although Tongxinluo didn't affect the normal H9c2 cardiomyocytes protein concentration, it inhibited the increase of protein concentrations induced by Iso ($P < 0.05$). Iso decreased Cx43 mRNA expression of H9c2 cardiomyocytes more evidently than that of the control group ($P < 0.05$), which was inhibited by Tongxinluo ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tongxinluo can prevent the hypertrophy of H9c2 cardiomyocytes and down-regulate of Cx43 mRNA expression induced by Iso.

[Key words] Tongxinluo; cardiac hypertrophy; H9c2 cardiomyocytes; connexin 43; isoproterenol

心肌肥大是对各种心血管刺激因子的适应性反应,但持续的心肌肥厚会导致失代偿而发生心律失常,泵衰竭和心源性猝死危险性增加,其机制与心肌肥大时所导致的电生理重构有关^[1]。缝隙连接是相邻心肌细胞间电、化学偶联的通道,亦是心肌成为功能合胞体的重要结构。缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 是哺乳动物心肌细胞中的主要连接蛋白。研究发现,心肌肥大、心肌缺血-再灌注、心力衰竭、高胆固醇、糖尿病等条件下, Cx43 表达降低合并非均匀化、侧面化、去磷酸化等心肌病理条件下 Cx43 的重塑,构成了心律失常的基础^[2]。因此,以 Cx43 为靶点的研究将成为探索新型抗心律失常药物的热点^[3]。通心络是运用中医络病理论研制而成的中药复方制剂,具有改善血管内皮、调脂、抗血小板、抑制炎症、抗氧化、稳定粥样斑块、防止细胞凋亡和促进血管新生等。通心络多途径的心血管保护作用已经在临床广泛使用,但通心络能否对心肌肥大及缝隙连接重构有改善作用尚未见报道^[4]。因此,本研究通过使用有效致肥大剂量 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 Iso 为诱导剂诱导 H9c2 心肌细胞肥大,构建体外心肌肥大实验模型,以观察通心络对 H9c2 心肌细胞肥大及 Cx43mRNA 表达的影响。

1 材料

1.1 药品和试剂 通心络超细干粉由人参、全蝎、水蛭、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍等组成的中药复方制剂,由河北省石家庄以岭药业提供(原药)。根据参考文献^[5]确定质量浓度为 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的通心络干粉水提物为适合心肌细胞生长浓度。高糖 DMEM (Hyclone), FBS (四季青), 异丙肾上腺素 (Iso, Sigma), 胰蛋白酶 (四季青), Trizol 试剂 (Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (Fermentas), PCR 相关试剂 (TIANGEN), PCR 引物 (北京赛百特公司合成), RIPA 裂解液 (碧云天), PMSF (碧云天), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天), 其他常用生化试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 CO_2 培养箱 (Heraeus 公司), YJ-875 医用净化工作台 (苏州净化设备公司), 倒置显微镜 (Olympus 公司), PCR 仪 (Eppendorf 公司)。

1.3 细胞株 大鼠心肌细胞株 H9c2 (南华大学心血管病研究所提供)。

2 方法

2.1 H9c2 心肌细胞培养及分组 H9c2 心肌细胞培养于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,置于 37°C 5% CO_2 培养箱,传代培养,取对数生长期、

生长良好的细胞进行试验。实验分组如下:对照组:加含 5% 胎牛血清培养基;TXL 组:在对照组的基础上加入终质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的通心络超细干粉水提物;Iso 组:在对照组的基础上加入终质量浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Iso;Iso + TXL 组:在 Iso 组基础上加入终浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的通心络超细干粉水提物。每隔 24 h 更换 1 次培养基,培养 72 h 后,用相差显微镜测定 H9c2 心肌细胞大小,BCA 法测定 H9c2 心肌细胞蛋白质浓度,RT-PCR 检测 Cx43mRNA 的表达。

2.2 H9c2 心肌细胞大小的测定 调整细胞密度为 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$,将细胞接种于 6 孔平底细胞培养板上,按不同组别进行相应处理 72 h 后,用胰蛋白酶消化使之脱落,在相差显微镜下用测微器测定细胞直径,观察 10 个视野,每个视野测 10 个细胞,取其平均值(每组取 6 次样本进行分析)。

2.3 心肌细胞蛋白浓度测定 调整细胞密度为 $2.5 \times 10^5/\text{mL}$,将细胞接种于 75 cm 细胞培养瓶中,按不同组别进行相应处理 72 h 后,去掉培养基,用冷的 PBS 冲洗 2 次,晾干。每孔加 $150 \mu\text{L}$ (RIPA:PMSF100:1) 细胞裂解液,冰上裂解 30 min。裂解的细胞移至 0.5 mL 离心管并摇动, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12\ 000 \times g$ 离心 20 min,取上清液待用。用标准蛋白溶液制作标准蛋白曲线。按照 BCA 试剂盒说明在酶标仪波长为 570 nm 处测定吸光度(A),根据标准曲线计算出蛋白浓度(每组取 6 次样本进行分析)。

2.4 RT-PCR 检测 Cx43mRNA 的表达 按不同组别进行相应处理 72 h 后,以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,使用核酸蛋白测定仪鉴定 RNA 纯度和量,所用 RNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 1.8 ~ 2.0,琼脂糖凝胶电泳证实所提 RNA 的完整性。用逆转录试剂(Fermentas)将提取的 RNA 逆转录为 cDNA,,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。CX43 引物合成:参照 Genebank 资料设计并合成引物。Cx43, F: 5'-TTGTTTCTGTCACCAGTAAC-3', R: 5'-GATGAGG AAGGAAGAGAAGC-3' 扩增序列长度为 588 bp; β -actin(内参), F: 5'-CACGGCATTGTAACCAACTG-3', 5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3', 扩增序列长度为 400 bp。PCR 反应条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min 预变性, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 变性, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 退火, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s 延伸,循环 35 次,最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 再延伸 5 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,用 AlphaEaseFC 凝胶扫描成像系统对电泳条带进行密度扫描,并分析各组的基因及 β -actin 基因灰度值,以二者的灰度比值代表 Cx43mRNA 的相对表达量。

2.5 统计学方法 所有数据使用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组 h9c2 心肌细胞直径比较 与对照组比较, TXL 组细胞直径无差异, Iso 组细胞直径明显增大 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso + TXL 组细胞直径明显减小, 通心络能够明显抑制 Iso 诱导的 H9c2 心肌细胞直径的增大 ($P < 0.05$), 见表 1。

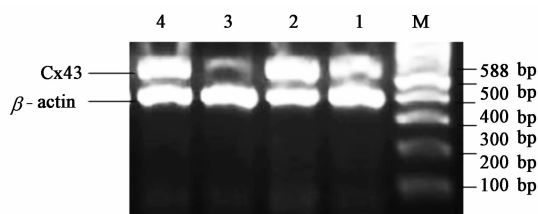
表 1 通心络对 Iso 诱导的 H9c2 心肌细胞直径、蛋白浓度及 Cx43mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	细胞直径 / μm	蛋白浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Cx43mRNA /灰度比值
对照	12.92 ± 1.13	1.45 ± 0.07	0.87 ± 0.12
TXL $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	13.29 ± 2.45	1.47 ± 0.09	0.91 ± 0.09
Iso $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$19.58 \pm 5.47^{1)}$	$2.25 \pm 0.26^{1)}$	$0.63 \pm 0.08^{1)}$
Iso $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + TXL $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$14.04 \pm 3.32^{2)}$	$1.70 \pm 0.12^{2)}$	$0.92 \pm 0.11^{2)}$

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 Iso 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 各组 H9c2 心肌细胞蛋白浓度比较 与对照组比较, TXL 组蛋白浓度无差异, Iso 组蛋白浓度明显增加 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso + TXL 组蛋白浓度明显减少, 通心络能够明显抑制 Iso 诱导的心肌细胞蛋白浓度的增加 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.3 各组 H9c2 心肌细胞 Cx43mRNA 表达的变化 各组 Cx43 及 β -actin(内参)的 mRNA 表达水平电泳分析(图 1), 各基因的 RT-PCR 产物电泳带的位置与理论值相符。与对照组比较, TXL 组 Cx43mRNA 的表达无差异, Iso 组 Cx43mRNA 的表达显著减少 ($P < 0.05$); 与 Iso 组比较, Iso + TXL 组 Cx43mRNA 的表达显著增加, 通心络能够明显抑制 Iso 诱导的 H9c2 心肌细胞 Cx43mRNA 表达的下调 ($P < 0.05$), 见表 1。



M. Marker; 1. 对照组; 2. TXL $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; 3. Iso $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; 4. Iso $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + TXL $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 通心络对 Iso 诱导的 h9c2 心肌细胞 Cx43mRNA 表达影响

4 讨论

通心络是源自中医络病理论的经典中药复方制

剂,其多途径的心血管保护作用已在临床广泛应用,而其对心肌肥大及心肌细胞间的缝隙连接通讯的作用尚不清楚。有研究发现,益气活血方能显著抑制 Iso 诱导的大鼠心肌肥厚^[6],而临床观察中也发现通心络有一定改善肥厚心肌重构的作用^[7]。通络药物由于疏通经络的药理作用特点,可能对改善细胞通讯和缝隙连接重构具有一定作用,但却缺乏有关研究。

本研究通过使用有效致肥大剂量的 Iso 诱导 H9c2 心肌细胞肥大,构建体外心肌肥厚模型^[4],处理 72 h 后,Iso 组 H9c2 心肌细胞出现体积明显增大,蛋白质含量明显增加,这与国外 H9c2 心肌细胞肥大模型的表现一致^[8]。研究显示通心络可以明显拮抗 Iso 诱导的 H9c2 心肌细胞体积的增大及蛋白质浓度的增加,提示通心络可抑制 H9c2 心肌细胞肥大;同时,我们也观察到 Iso 刺激 H9c2 心肌细胞 72h 后,Iso 组 H9c2 心肌细胞 Cx43mRNA 的表达比对照组明显下调。这一结果与国内外学者观察到的结果不尽相同。Salameh^[9]等 Iso 刺激大鼠心肌细胞 24 h 后,发现 Cx43mRNA 及 Cx43 蛋白表达上调。Tang^[10]等用 Iso 诱导大鼠心力衰竭后,Cx43mRNA 及 Cx43 蛋白表达明显下调。这些差异可能与干预的时间不同有关。在压力超负荷下,交感神经系统的激活,儿茶酚胺的大量释放,引起心肌收缩力增强,心率加快。尤其是心脏局部组织中儿茶酚胺的升高,对心肌细胞有直接的毒性作用,可促使心肌细胞肥大、凋亡,参与心肌结构及电生理重构^[8]。在 Iso 的刺激下 H9c2 心肌细胞 Cx43mRNA 表达的下调,可增加心肌的缝隙连接蛋白 Cx43 表达和分布的异质性,从而使心肌兴奋性、传导性发生改变,故更易发生心律失常,这也可能是心肌肥大为何成为心血管疾病的一种独立危险因素的重要原因。因此,通心络可能通过干预 Cx43mRNA 表达改善肥大心肌细胞心电重构,而其干预的机制及具体信号通路有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Fialova M, Dlugosova K, Okruhlicova L, et al.

Adaptation of the heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin43 remodeling [J]. *Physiol Res*, 2008, 57(1):7.

- [2] YU Z B, SHENG J J. Remodeling of cardiac gap junctions and arrhythmias [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2011, 63(6):586.
- [3] Tribulova N, Knezl V, Okruhlicova L, et al. Myocardial gap junctions; targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias [J]. *Physiol Res*, 2008, 57(suppl2):S1.
- [4] 张志慧,吴相春,葛小丽,等. 信号通路糖原合成酶激酶-3 β 在 β 淀粉样蛋白损伤脑微血管内皮细胞 Tau 蛋白表达中的作用及通心络干预研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(10):116.
- [5] 刘明,石勇铨,彭玲,等. 通心络和 α -硫辛酸对高糖诱导的乳鼠心肌细胞保护作用研究及机制探讨[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(9):1528.
- [6] 顾燕频,吕嵘,黄玮,等. 4 种不同中医治法干预异丙肾上腺素致大鼠心肌肥大的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(13):136.
- [7] 韩振祥,苏晓燕,阎雅芳,等. 通心络胶囊对原发性肥厚型心肌病左室重构的疗效[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(5):309.
- [8] Watkins S J, Borthwick G M, Arthur H M, et al. The H9c2 cell line and primary neonatal cardiomyocytes cells show similar hypertrophic responses *In Vitro* [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, 47(2):125.
- [9] Salameh A, Karl S, Djilali H, et al. Opposing and synergistic effects of cyclic mechanical stretch and α -or β -adrenergic stimulation on the cardiac gap junction protein Cx43 [J]. *Pharmacological Research*, 2010, 62(6):506.
- [10] Tang Y Q, Wang M H, Le X Y, et al. Antioxidant and cardioprotective effects of Danshensu (3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-propanoic acid from *Salvia miltiorrhiza*) on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy in rats [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(12):1024.

[责任编辑 聂淑琴]