

益母草水苏碱对大鼠心肌细胞肥大的肌浆网钙摄取及 SERCA 活性的影响

孙祝美, 李华*, 吕嵘, 赵培

(上海中医药大学基础医学院生物教研室, 上海 201203)

[摘要] 目的: 探讨益母草水苏碱(stachydrine, Sta)对去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)诱导的新生大鼠心肌细胞肥大肌浆网钙摄取及 SERCA 活性的影响。方法: 采用不同浓度的益母草水苏碱(10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mol · L⁻¹)对 NE 诱导的心肌肥大模型组进行干预, 通过大鼠心肌肌浆网的蛋白水平和钙摄取能力来反映益母草水苏碱对 NE 诱导的新生大鼠心肌细胞肥大的影响。结果: 益母草水苏碱能够明显减少心肌细胞蛋白含量, 降低 Protein/DNA 比值; 益母草水苏碱可剂量依赖地提高 NE 诱导的心肌肥大细胞的肌浆网钙摄取和 SERCA 活性。结论: 益母草水苏碱对 NE 诱导的心肌肥大细胞的肌浆网钙摄取功能有一定的程度的提高, 与剂量有一定的依赖关系, 随着益母草水苏碱的浓度的提高, 肌浆网的钙摄取速率和 SERCA 活性也明显提高。

[关键词] 益母草水苏碱; 心肌细胞; 心肌肥大; 钙摄取能力; SERCA 活性

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0118-05

Effects on Calcium Uptake Capacity and Activity of SERCA in Rat Sarcoplasmic Reticulum of Myocardial Hypertrophy Cell of Stachydrine

SUN Zhu-mei, LI Hua*, LV Rong, ZHAO Pei

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Basic Medical, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To investigate the stachydrine (Sta) on norepinephrine (NE)-induced hypertrophy of neonatal rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum calcium uptake capacity and activity of SERCA. **Method:** different concentrations of stachydrine (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mol · L⁻¹) on the NE-induced cardiac hypertrophy model group intervention, by rat cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake of protein levels and the ability to Stachydrine reflect on NE-induced hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes studied. **Result:** Stachydrine can significantly reduce the protein content of myocardial cells and reduce Protein / DNA ratio; Stachydrine in a dose-dependent increase NE-induced cardiac mast cells in sarcoplasmic reticulum calcium uptake and activity of SERCA. **Conclusion:** Stachydrine on NE-induced cardiac mast cells in sarcoplasmic reticulum calcium uptake have a certain degree of increased dose-dependent relationship between certain, with the concentration of Stachydrine improvement of sarcoplasmic reticulum calcium uptake rate and activity of SERCA has improved markedly.

[Key words] stachydrine; myocardial cells; cardiac hypertrophy; calcium uptake capacity; activity of SERCA

[收稿日期] 20100227(001)

[基金项目] 上海市教育委员会科研项目(08cz04);浦东新区科技发展基金创新资金项目(PKJ2009-Y14)

[第一作者] 孙祝美,女,博士,讲师,从事高学压及心血管病的相关机理研究, Tel: (021) 51322585, E-mail: sunzhumei2000@hotmail.com

[通讯作者] * 李华, Tel: (021) 51322585, E-mail: lhuagirl@hotmail.com

益母草为唇形科植物,始载于《神农本草经》,具有活血化瘀、利尿消肿之功效。随着对益母草研究的深入^[1],发现益母草的主要成分有生物碱、黄酮类、二萜类、阿魏酸、挥发油、多糖和微量元素等。其作用主要表现^[2]在抗血栓的形成、利尿、抗诱变作用、对心血管方面的影响,如可以保护心肌^[3]、防止心肌损伤等。心肌肌质网是心肌细胞的滑面内质

网,主要功能是储存钙离子。心肌肌浆网通过调节细胞内游离 Ca^{2+} 浓度而在心肌的收缩舒张活动中起到关键的作用。本实验主要在心肌细胞培养基础上,以 NE 诱导新生大鼠心室肌细胞制作心肌细胞肥大模型,明确益母草生物碱的疗效,进一步探索益母草生物碱对心肌细胞肌浆网钙摄取功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠 36 只,1 ~2 d 龄,体重约 25 g,雌雄不限,由上海科学院实验动物中心提供(合格证号医动字第 02-22-2 号)。

1.1.2 仪器 CO_2 培养箱(德国 Heraeus 公司);5415R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);酶标仪(美国 Biotek 公司);F4500 型双波长荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司)。

1.1.3 药品 益母草水苏碱(stachydrine, Sta)由中国药品生物制品检定所提供(批号 110712-200508),配置 1 Mm 180 μg 溶解于 1 mL 培养基中;去甲肾上腺素(norepinephrine, NE),由美国 Sigma 公司提供浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;卡维地洛(carvedilol, C):25 mg/片,德国曼海姆(roche diagnostics) GmbH 生产(批号 MH6600806),上海罗氏制药有限公司分装(SH0007),用前用生理盐水配成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.1.4 试剂 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、组织裂解液,碧云天生物技术研究所提供;5-溴脱氧尿苷(5-BrdU)、HOE 33258,由美国 Sigma 公司提供;胰蛋白酶、DMEM/F12 培养基、胎牛血清、马血清,由德国 PAA 公司生产;I 型胶原酶由美国 Worthington 公司提供;其余常用试剂均为国产分析纯。

1.2 心肌细胞培养参照 Simpson^[4]法并略加改良将 Wistar 大鼠在无菌条件下开胸取出心脏,在冰冷 D-Hanks 液中洗净后,取左心室切成 1 mm^3 大小的碎块。加入 0.08% 胰蛋白酶与 0.04% I 型胶原酶混合液,恒温振荡消化 10 min,弃上清液,重复消化 8 次,分别收集各次细胞悬液,在 CO_2 恒温培养箱中差速贴壁培养 90 min,血小球计数板计数使培养液密度为 5×10^6 个/mL。在细胞悬液中加入 5-BrdU 到细胞悬液中,以抑制非心肌细胞的增殖,将细胞悬液接种培养皿上放于显微镜下观察,细胞密度适中,折光性好,形态为圆形,可见细胞微弱搏动为好,然后将培养皿重新放于 CO_2 培养箱中,48 h 后换液。

1.3 分组与给药 心肌细胞原代培养 48 h 后,换

无血清培养液,然后将细胞如下分组:对照组,给予生理盐水;NE 组,给予 $\text{NE } 1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导心肌细胞肥大;Sta 不同剂量组,在给予 NE 基础上,再分别给予 Sta 10^{-4} , 10^{-5} , $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。药物及刺激因素处理 3 d,定时换液并保持浓度。

1.4 观察指标 心肌细胞培养第 5 d 收集细胞,进行蛋白及 DNA 含量测定以及肌浆网钙摄取能力的测定。

1.4.1 BCA 法测细胞蛋白质含量 加入 0.1% SDS 裂解细胞,用 BCA 法测定每个培养孔心肌细胞总蛋白含量,计算单个心肌细胞平均蛋白含量。

1.4.2 荧光法测定细胞 DNA 含量 加入缓冲液,匀浆 1 min。将细胞匀浆液按 1:10 与 HOE 33258 荧光染液混匀后,放置 5 min,上机测试,选择激发波长 356 nm,发射波长 492 nm,测定样品荧光强度,以小牛胸腺 DNA 作为标准品。

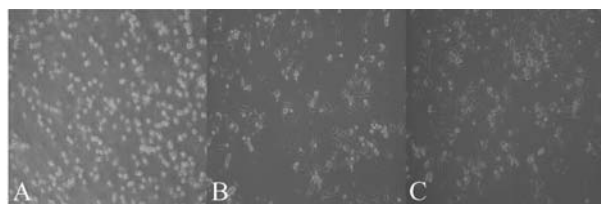
1.4.3 双荧光分光光度计法测定心肌细胞钙摄取能力 细胞悬液的制备:同上的心肌细胞培养;Fura-2/AM 负载:将收集的细胞悬液加入含有 10% 血清的 D/F12,避光加入钙离子荧光指示剂(Fura-2/AM),终浓度 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。恒温震荡 45 min,使 Fura-2/AM 负载到细胞中。加入含有 BSA 的 D-Hank's 液,混匀,离心,弃上清,重复 1 次。荧光测定心肌细胞悬液 $[\text{Ca}^{2+}]_i$: 荧光测定采用日立 F-4500 型双波长荧光分光光度计,发射光波长为 510 nm,选定激发光波长为 340 nm 和 380 nm,两狭缝均为 10 nm。在试管中加入皂苷(saponin)处理细胞,破细胞膜;30 s 后上机测定,待荧光强度稳定后加入 ATP,在 ATP 存在的条件下心肌细胞主动负载钙离子,促使肌浆网摄取 Ca^{2+} ;待荧光强度稳定后,再加入的 TritonX-100;待荧光强度稳定后,加入 EGTA 结束反应,根据荧光强度 F340 和 F380 可以反映胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度,反映肌浆网对钙的摄取情况。

1.5 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间两两比较采用单因素方差分析。采用 SPSS 12.0 以及 Prism 5.0 生物医学统计软件分析和作图。

2 结 果

2.1 心肌细胞的形态观察 见图 1。培养 90 min, A: 细胞未贴壁,呈分散状,单个细胞呈圆形或者椭圆形,有光泽,中心可见紫色的光环;培养 24 h。 B: 完全贴壁并在细胞间形成交联伸出伪足可出现自发性搏动,细胞搏动较多;培养 48 h。 C: 细胞团中的细胞密集,形态不规则,呈同步搏动,但各个细胞团搏

动的频率仍不相同。



A. 培养 90 min; B. 培养 24 h; C. 培养 48 h.

图 1 不同培养时间心肌细胞的形态(×100)

2.2 不同剂量的益母草水苏碱对细胞蛋白浓度及其蛋白/DNA 的影响。

2.2.1 对心肌细胞蛋白浓度和 DNA 浓度的影响

与对照组相比,模型组(NE)的蛋白浓度明显增加,两者具有统计学差异($P < 0.05$);低剂量 Sta 有降低肥大心肌细胞蛋白浓度的作用,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。中、高剂量 Sta 与 NE 组相比,心肌细胞蛋白浓度明显降低($P < 0.05$)。各组的细胞 DNA 含量均无明显改变。

2.2.2 对心肌细胞 Protein/DNA 比值的影响 与对照组相比,模型组(NE)的 Protein/DNA 比值明显

增加,两者具有统计学差异($P < 0.05$);小剂量 Sta 有降低肥大心肌细胞 Protein/DNA 比值的作用,但差异无统计学意义。中、高剂量 Sta 与 NE 组相比,心肌细胞 Protein/DNA 比值明显降低($P < 0.05$)。不同剂量的益母草水苏碱组都能不同程度降低 Protein/DNA 比值,存在剂量依赖关系。

2.2.3 对心肌细胞钙摄取能力的影响

以对照组作为标准化。与对照组相比,NE 的摄取速率为正常组的 67% 左右,心肌细胞对 Ca^{2+} 摄取有明显的下降,两者具有显著的统计学差异($P < 0.05$);益母草水苏碱的小、中剂量组有提高钙相对摄取速率的能力,与 NE 相比无统计学差异。益母草大剂量组的钙摄取速率明显提高,与 NE 相比两者具有显著的统计学差异($P < 0.05$)。结果说明益母草水苏碱对 NE 诱导的心肌肥大细胞的肌浆网钙摄取功能有一定的程度的提高,与剂量有一定的依赖关系,随着益母草水苏碱的浓度的提高,肌浆网的钙摄取速率也明显提高。见表 1。

表 1 益母草水苏碱的量效关系(5 d, 珣±s, n=6)

组别	蛋白浓度 /(mg·L ⁻¹)	DNA 浓度 /(mg·L ⁻¹)	蛋白 /DNA 比值	钙摄取的 相对速率
对照	465.91 ±75.53	4.56 ±0.54	102.10 ±10.63	1.00
模型(NE)	695.40 ±117.09 ¹⁾	4.46 ±0.26	155.92 ±46.96 ¹⁾	0.67 ±0.04 ¹⁾
益母草水苏碱 10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹	607.45 ±121.60 ¹⁾	3.83 ±0.26	148.86 ±45.86 ¹⁾	0.68 ±0.12
益母草水苏碱 10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹	473.82 ±84.01 ²⁾	5.35 ±0.27	114.40 ±28.71 ²⁾	0.70 ±0.11
益母草水苏碱 10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹	464.96 ±98.00 ²⁾	4.51 ±0.22	105.67 ±23.29 ²⁾	0.82 ±0.07 ²⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

2.3.4 各组心肌细胞肌浆网钙 SERCA2a 活性及含量比较

与对照组相比,模型组的 SERCA2a 活性明显下降,幅度为 51.2%,两者相比具有显著差异($P < 0.05$),但肌浆网 SERCA2a 含量各组差异不大,不具有统计学意义($P > 0.05$)。与对照组相比,益母草水苏碱的小、中、大剂量组的 SERCA2a 的活性也明显下降。与模型组相比,益母草水苏碱小、中剂量组的 SERCA2a 的活性和含量有一定的提高,但是两者并无统计学差异($P > 0.05$)。益母草大剂量组的 SERCA2a 的活性有较大的提高,基本提高在 50% 左右,与模型组相比均有统计学差异($P < 0.05$)。结果说明益母草水苏碱可以在一定程度上提高 SERCA2a 的活性,并存在剂量依赖关系。见表 2。

3 讨论

生物活性钙离子(Ca^{2+})作为一个主要的细胞

表 2 各组心肌细胞中肌浆网 SERCA2a

活性及含量比较 (珣±s, n=6)

组别	SERCA2a 活性 /nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹	SERCA2a 蛋白 相对含量
对照	112.76 ±13.07	2.58 ±0.38
模型	55.20 ±7.34 ¹⁾	2.25 ±0.12
卡维地洛	99.17 ±6.72 ²⁾	2.28 ±0.23
益母草水苏碱 10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹	60.80 ±6.06 ¹⁾	2.35 ±0.29
益母草水苏碱 10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹	74.17 ±6.66	2.40 ±0.32
益母草水苏碱 10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹	85.75 ±8.59 ²⁾	2.43 ±0.19

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

内信使,参与调控许多细胞和组织的生理活动,包括肌肉收缩、新陈代谢、分泌以及细胞分裂等。 Ca^{2+} 在心肌细胞的兴奋收缩藕联中起重要作用:当心肌细胞兴奋时, Ca^{2+} 与阿诺碱受体(RyR₂)上的 Ca^{2+} 高亲和位点相结合,可以引起一系列的变化而最终使

RyR₂ 开放,大量 Ca²⁺ 从肌质网中释放出来, Ca²⁺ 与肌钙蛋白结合,引起心肌收缩;当心肌细胞负极化的时候,细胞膜上钠钙交换蛋白(NCX)^[5]、质膜钙泵、肌浆网钙泵(SERCA2a)共同作用,降低胞浆中 Ca²⁺ 的浓度,从而完成心肌舒张。在这个过程中,心肌肌浆网通过调节细胞内游离 Ca²⁺ 浓度,而在心肌的收缩舒张活动中起到关键的作用。在生理条件下,心肌细胞产生的钙瞬变中,约有 92% 的钙来自肌浆网^[6]。肌浆网摄取 Ca²⁺ 的能力是心肌舒张的关键因素,也是收缩所必须的,钙泵可以使肌浆网腔内产生高浓度 Ca²⁺,当心肌收缩时这些 Ca²⁺ 从肌浆网大量释放,使胞浆内 Ca²⁺ 由静息水平 10⁻⁷ mol·L⁻¹,明显升高至 10⁻⁶ mol·L⁻¹。舒张期胞浆内 Ca²⁺ 再由位于肌浆网 T 管上的 SERCA^[7-8] 从胞内转移至肌浆网腔内。Ca²⁺ 的重新摄取对于心肌正常的收缩功能十分重要,因为细胞内升高的 Ca²⁺ 必须在下一次心肌收缩时降至静息水平。

SERCA 是 SR 中含量最丰富的蛋白,约占成熟动物 SR 总量的 60% ~80%,可以把胞浆中的钙泵出,SERCA 基因家族 Ca²⁺-ATPase 是一个约 110 Kd 的跨膜蛋白,其中 SERCA2a 编码的蛋白主要存在于心肌和慢速骨骼肌中^[7],心脏 SERCA 含量及活性,也直接关系到心肌正常的收缩和舒张功能^[9-10],心脏舒张时,SERCA2a 的主要作用就是降低细胞内钙离子的浓度,它将细胞浆内钙离子泵入肌浆网内。

本实验中,作者采用的是 Fura-2/AM 负载 45min, Fura-2 因有较强的亲水性难以进入细胞,在其负性基团部分结合上亲脂的乙酰羧甲基酯成为 Fura-2/AM 后,在组织孵育时易透过细胞膜,胞浆内酯酶可将 Fura-2/AM 水解为 Fura-2,后者与胞浆内游离 Ca²⁺ 结合,形成 Fura-2-Ca²⁺ 复合物。加入促吸收物质后测定钙离子浓度值的变化即可反映细胞内钙的摄取情况。本实验中加入 ATP 是能量物质,可以给予肌浆网的能量,使 SERCA2a 开放,主动摄取胞浆中的 Ca²⁺,将胞浆中的 Ca²⁺ 摄取到肌浆网中;加入 TritonX-100 (终浓度 0.2%) 后,将细胞中所有的生物膜(包括肌浆网膜)全部破坏, Ca²⁺ 全部流出,浓度达到最大,也就是说此时 F340/F380 升至最大,提示细胞膜破碎,游离的 Fura-2 均与 Ca²⁺ 结合;加 EGTA (pH > 8.5) 后,EGTA 可以与 Ca²⁺ 螯合,使 Ca²⁺ 浓度达到最低,其中 EGTA 的终浓度为细胞钙浓度的 3 ~5 倍,荧光强度下降,表明 Fura-2-Ca²⁺ 中

的 Ca²⁺ 全部被 EGTA 螯合, Fura-2 处于未结合状态。

本实验中采用不同浓度的益母草生物碱对 NE 诱导的心肌肥大模型组进行干预,观察肌浆网的钙摄取功能的改变及 SERCA 的含量和活性变化。结果发现:模型组的钙摄取能力明显下降, SERCA 的活性明显下降,而 SERCA 的含量变化不大。这些变化说明心肌细胞肥大中肌浆网对钙的摄取功能下降,肌浆网受到一定程度的破坏;不同浓度的益母草水苏碱的钙摄取能力与模型组相比都有不同程度的提高,显示在益母草水苏碱对肌浆网具有一定的保护作用。通过后期的研究发现,不同浓度的益母草水苏碱的钙摄取能力主要是通过调整 SERCA 的活性来完成的。与模型组相比,益母草水苏碱小、中剂量组的 SERCA2a 的活性有一定的提高。这可能的机制:是当细胞的钙摄取能力发生变化时,细胞内的钙浓度也发生相应的变化,肌浆网 Ca²⁺ 摄取的关键因素是 SERCA 的含量和活性。本课题研究表明 SERCA 的含量基本不变而活性发生显著变化, SERCA 的活性主要通过磷酸化的 PLN(受磷蛋白)来调节。所以可能的机制:益母草水苏碱通过调节 PLN 的某个磷酸化位点(丝 10、苏 17、丝 16),改变了磷酸化的 PLN 的含量或者提高了磷酸化的程度,磷酸化的 PLN 可以与 SERCA 解离,减轻对 SERCA 摄取钙的抑制,提高了 SERCA 的活性,增强对钙的摄取能力,从而影响心肌细胞的钙浓度,引起一系列的信号转导途径的改变,最终调节心肌细胞肥大的程度。益母草水苏碱对磷酸化的 PLN 的影响在以后的实验中需要进一步明确。益母草水苏碱也可能是通过 Ca²⁺ 信号的其他途径的相互作用的,具体机制需要进一步的实验研究。

[参考文献]

- [1] 范美华,王健鑫,李鹏. 益母草的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2006, 6(7): 528.
- [2] 张娴,彭国平. 益母草化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(2): 104.
- [3] Sun J, Huang S H, Zhu Y C, et al. Antioxidative stress effects of Herba Leonuri on ischemi rat hearts [J]. Life Sci, 2005, 76: 3043.
- [4] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating non-myocardial cells [J]. Circ Res, 1982, 50(1): 101.
- [5] 李东,陈志武,岑得意,等. 甘附冲剂抗大鼠心动过缓

- 以及作用机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1) : 68.
- [6] 沈建新, 王世强, 程和平, 等. Thapsigargin 对心肌细胞钙释放和肌浆网钙容量的时间效应[J]. 中山大学学报. 医学科学版, 2004, 25(1) : 19.
- [7] 惠海鹏, 李小鹰. 心肌细胞肌浆网 Ca^{2+} -ATPase 及其相关 Ca^{2+} 调节蛋白[J]. 中国老年杂志, 2004, 24(9) : 867.
- [8] Fisher S A, Buttrick P M, Sukovich D, et al. Characterization of promoter elements of the rabbit cardiac sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene required for expression in cardiac muscle cells[J]. Circ Res, 1993, 73(4) : 622.
- [9] Ribadeau Dumas A, Wisnewsky C, Boheler K R, et al. The sarco(endo) plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene is regulated at the transcriptional level during compensated left ventricular hypertrophy in the rat[J]. Acad Sci, 1997, 320(12) : 963.
- [10] Takizawa T, Arai M, Yoguchi A, et al. Transcription of the SERCA2 gene is decreased in pressure-overloaded hearts: A study using *in vivo* direct gene transfer into living myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(12) : 2167.

[责任编辑 邹晓翠]