

• 药理 •

黄芪组分配伍对乳鼠肥大心肌细胞肌酸 激酶同工酶 mRNA 表达的影响

苏敬泽, 农一兵, 温志浩, 林 谦*

(北京中医药大学东方医院, 北京 100078)

[摘要] 目的: 探讨黄芪组分(黄芪皂苷和黄芪多糖)对心肌细胞能量代谢的干预作用及其分子机制, 为中药防治心衰提供实验依据。方法: 体外培养的乳鼠心肌细胞, 加血管紧张素 II (Ang II) 造成肥大心肌细胞模型, 黄芪组分配伍干预后, 采用 RT-PCR 法测定肌酸激酶(CK)同工酶的 mRNA 表达。结果: 1. Ang II 作用 24 h 后, CK-B 亚基的表达增加而 CK-M 亚基的表达减少, 48 h 该作用持续存在; 2. 黄芪不同组分及配伍干预 48 h, 心肌细胞的 CK-B 亚基及 CK-M 亚基表达趋于正常。结论: 黄芪组分及组分配伍可在分子水平上抑制 Ang II 对心肌细胞 CK 同工酶 mRNA 表达的影响, 提示黄芪可能是通过对肥大心肌细胞能量代谢的干预作用预防心衰的发生发展。

[关键词] 黄芪; 血管紧张素 II; 心肌肥大; 细胞培养

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)05-0040-04

Radix Astragali Affect mRNA Expression of Isoenzyme Creatine Kinase of Cultured Neonatal Myocyte Hypertrophy Induced by Ang II in Rats

SU Jing-ze, NONG Yi-bing, WEN Zhi-hao, LIN Qian*

(Dong Fang Hospital, Affiliated Hospital of Beijing TCM University, Beijing 100078, China)

[Abstract] **Objective:** To observe whether Radix Astragali saponins and Astragali polysaccharides can effectively interfere with the cellular energy metabolism and its mechanism and to provide scientific evidence for the application of the Chinese herbs preventing and treating congestive heart failure. **Methods:** mRNA expression of isoenzyme creatine kinase (iso-CK) was investigated by means of RT-PCR, based on the study of the effect of Radix Astragali saponins and Astragali polysaccharides, through the cultured neonatal myocyte hypertrophy induced by Ang II. **Results:** 1. The expression of CK-B subunits was increased significantly while the expression of CK-M subunits was decreased by Ang II since the 24th hours, at 48th hours, the expression still stay the same level. 2. The expression of iso-CK: Subunits in Radix Astragali saponins and Astragali polysaccharides influenced kept it at the normal level at 48th hours. **Conclusion:** The influence of Ang II on the mRNA expression of isoenzyme creatine kinase can be effectively inhibited by Radix Astragali saponins and Astragali polysaccharides. Radix Astragali can prevent the development of heart failure, the possible mechanism is Radix Astragali interferes the myocyte hypertrophy in terms of the cellular energy metabolism.

[Key words] Radix Astragali; angiotensin II; cardiac hypertrophy; cell culture

[收稿日期] 2008-01-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No: 30772693); 教育部博士点专项基金资助项目(20050026004)

[通讯作者] * 林 谦, Tel: (010) 67689611; E-mail: linqian@mail.cintcm.ac.cn

心肌肥厚是心脏负荷增加时的主要代偿机制之一,是充血性心力衰竭(以下简称心衰)的重要病理生理过程,而心衰是多种心血管疾病的最终结局。能量代谢障碍是心肌肥厚和充血性心力衰竭重要推动因素之一,贯穿在心肌肥厚发生、发展的全过程中,是导致心肌肥厚发展为心衰的重要因素^[1]。肌酸激酶(CK)穿梭机制障碍会导致磷酸肌酸(PCr)和三磷酸腺苷(ATP)之间的能量传输发生障碍,是细胞内能量代谢障碍的原因之一。既往研究表明黄芪对心衰、缺血缺氧、再灌注损伤和病毒损伤的心肌,具有保护心肌线粒体结构、提高生物氧化相关的多种酶的活性、减少乳酸脱氢酶外漏等作用,从而改善心肌能量代谢^[2,3]。Ang II是引起心肌细胞肥大的最重要活性物质^[4,5],我们在既往研究建立的Ang II致乳鼠心肌细胞肥大模型基础上,观察体外培养的乳鼠心肌细胞肥大模型CK同功酶的mRNA表达以及黄芪注射液(主要成分为黄芪皂苷)和注射用黄芪多糖对该作用的影响,旨在探讨黄芪组分是否能有效地干预细胞能量代谢及其分子机制,为中药预防和治疗心衰提供客观实验依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II), Sigma Inc; 络沙坦(losartan), Merck Research Laboratories; 黄芪注射液,成都地奥九泓制药厂,每支 10 mL,批号:0410027; 注射用黄芪多糖,美国泛华医药公司,每支 250 mg,批号:8k01101; Trypsin, Sigma Inc; Collagenase II, Gibco Inc; Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma Inc; 胎牛血清(特级),杭州四季青生物工程材料有限公司; 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (Brd-u), Sigma Inc; 小鼠 α 横纹肌动蛋白单克隆抗体,武汉博士德生物工程有限公司; RNAgents Total RNA Isolation system, Promega; Access Quick RT-PCR System, Promega。

1.2 实验仪器 Olympus IX71+ 制冷摄像头倒置荧光显微镜; Eppendorf PCR 仪; Amersham Biosciences 电转膜系统; 英国 Syngene 凝胶成像系统; SHEL-LAB 2323 CO₂ 培养箱; 再鑫 CLASS 100 超净台。

2 方法

2.1 心肌细胞的培养与鉴定 利用乳大鼠培养心肌细胞的方法最早由 Harary 报道^[6],本实验以 Harary 的方法为基础,同时参考了其他研究者的经验。将出生(1~3) d 的 Wistar 大鼠(雌雄不拘),在无菌条

件下取出心脏,将心脏剪成 1 mm³ 大小的组织块,加入胰酶、胶原酶混合消化液,于 37 °C 水浴振荡分次消化,直至组织块完全消化,收集除第 1 次以外的细胞悬液,加入胎牛血清终止消化。4 °C、离心,弃上清,制成单细胞悬液。然后按差速贴壁分离法孵育(1~1.5) h,纯化心肌细胞,细胞计数,依需要密度接种。其中细胞培养液中含有 10% 胎牛血清、0.1 mmol·L⁻¹ 的 Brd-u 及青霉素 100 mg·L⁻¹,链霉素 100 万 U·L⁻¹。细胞于 37 °C, 5% CO₂, 95% 湿度环境培养,大约每(36~48) h 换一次液,培养(3~4) d 后使用。

细胞培养第 3 天用免疫组织化学方法鉴定心肌细胞,一抗为小鼠 α 横纹肌动蛋白单克隆抗体,DAB 显色,本抗体对 α 骨骼肌和 α 心肌的肌动蛋白具有特异性。

2.2 分组与给药 正常培养 3 d 后,换 1% 血清培养基培养,其他条件不变,实验共分 6 组。正常对照组:不加任何药物;模型组:浓度为 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 的血管紧张素 II; 络沙坦组:10⁻⁷ mol·L⁻¹ 血管紧张素 II + 10⁻⁶ g·L⁻¹ 络沙坦; 黄芪皂苷组:10⁻⁷ mol·L⁻¹ 血管紧张素 II + 10⁻² g·L⁻¹ 黄芪注射液; 黄芪多糖组:10⁻⁷ mol·L⁻¹ 血管紧张素 II + 10⁻² g·L⁻¹ 黄芪多糖注射液; 黄芪皂苷合多糖组:10⁻⁷ mol·L⁻¹ 血管紧张素 II + 10⁻² g·L⁻¹ 黄芪注射液 + 10⁻² g·L⁻¹ 黄芪多糖注射液。黄芪注射液及黄芪多糖注射液浓度选择根据既往实验结果^[7]。溶剂为 DMEM/F12,工作液浓度为终浓度的 100 倍。

2.3 CK 的 mRNA 表达水平(RT-PCR) 将心肌细胞接种于 25 cm 培养瓶中,每瓶细胞数约 2 × 10⁶ 个,正常培养 3 d 后,换成 1% 血清培养基培养 24 h,分组进行实验。按 24 h 48 h 两个时点加药,每组每个时点重复做 3 瓶,求其平均值。

2.3.1 总 RNA 提取与纯化 参照 Stefan Hamerschmidt^[8]的方法提取总 RNA, λ 260 λ 280 测定 RNA 浓度和纯度。-70 °C 保存。分光光度法测定核酸的浓度,1.0% 琼脂糖凝胶电泳,110 V 电压电泳(0.5~1.0) h,用凝胶图像分析仪采集图像检测 RNA 的完整性。

2.3.2 一步法 RT-PCR 反应 参照 Stefan Hamerschmidt^[8]的方法合成目的基因的引物,目的基因及 β -actin 的引物由北京赛百盛基因公司合成,引物序列、扩增片段、循环次数及退火温度见表 1。取 1.0 μ g 总 RNA 用于 RT-PCR,总反应体系体积为 50 μ L,

包括总 RNA 1.0 μg, 50 pmol·μL⁻¹ 上游引物 1.0 μL, 10 pmol·μL⁻¹ 下游引物 1.0 μL, 2 × Master Mix 25.0 μL, AMV 反转录酶 1.0 μL 及适量 DEPC-Water。45 °C 水浴 45 min, PCR 条件为 95 °C, 变性 30 s, 经退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 相应循环次数, 最后 72 °C 延伸 5 min (详见表 1)。

表 1 RT-PCR 的引物序列及反应条件

mRNA	方向	引物序列	扩增片段 长度(bp)	循环 次数	退火温度 (°C)
B-CK	上游引物	5'-GCC GCC ATG CCC TTC TC-3'	807	28	58
	下游引物	5'-CIT AGA CIT GAA GAG AGT TTC-3'			
M-CK	上游引物	5'-CCA CAA CAA GIT CAA GCT GAA-3'	773	22	60
	下游引物	5'-AAG ATC TCC TCA ATC TTC TGC-3'			
β-actin	上游引物	5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3'	263	21	60
	下游引物	5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'			

2.3.3 PCR 产物电泳分析 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 电压电泳 1.0 h。用凝胶图像分析仪采集图像, 用 ImageMaster™ TotalLab Software 软件分析条带灰度值。以目的基因与 β-actin 基因灰度值比值作为各目的基因 mRNA 的相对表达量。

2.4 统计与分析 各组实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件, 多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有显著意义。

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 开始伸展, 细胞形态不规则, 部分细胞聚集成团生长, 开始出现收缩运动, 3 d 后细胞有节律的收缩运动, 成簇细胞尤为显著。细胞免疫化学证实 99% 以上的细胞为阳性染色细胞, 只有极个别细胞不着色。证实原代培养的细胞纯度很高, 因此用该细胞进行的试验是可靠的。

3.2 黄芪组分配伍在各时点对肥大心肌细胞 CK 的 mRNA 表达影响

3.2.1 PCR 产物电泳图谱 紫外分光光度计测定 RNA, λ260 nm/λ280 nm 在 1.8~2.0 之间。RNA 变性电泳 5 S 条带隐约可见, 28 S 和 18 S 条带明亮且前者大致是后者亮度的 2 倍, 证明提取总 RNA 的完整性, 且未见基因组 DNA 污染。扩增后产物电泳显示条带长度与期望相符。

3.2.2 黄芪组分配伍对肥大心肌细胞 CK-B 亚基

mRNA 表达的影响 实验结果表明, 24 h, 肥大模型组 络沙坦组、黄芪皂苷、黄芪多糖及黄芪皂苷多糖组心肌细胞 CK-B 亚基表达显著增加, 与正常组比较有显著性差异, 48 h, 肥大模型组延续 24 h 的改变, 而络沙坦、黄芪皂苷、黄芪多糖及黄芪皂苷多糖组 CK-B 亚基表达趋于正常, 与正常组比较无显著性差异, 见表 2。

表 2 黄芪组分配伍对肥大心肌细胞 CK-B 表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物终浓度 (g·L ⁻¹)	CK-B/β-actin 比值	
		24 h	48 h
正常对照组	—	0.352 ± 0.099	0.352 ± 0.099 ⁴⁾
模型组	—	0.762 ± 0.128 ³⁾	0.855 ± 0.047 ³⁾
络沙坦组	10 ⁻⁶	0.662 ± 0.052 ³⁾	0.591 ± 0.123 ⁴⁾
黄芪皂苷组	10 ⁻²	0.667 ± 0.009 ³⁾	0.446 ± 0.031 ⁴⁾
黄芪多糖组	10 ⁻²	0.783 ± 0.022 ³⁾	0.416 ± 0.072 ⁴⁾
皂苷+ 多糖组	10 ⁻²	0.788 ± 0.059 ³⁾	0.288 ± 0.033 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与模型组比较⁴⁾ $P < 0.001$ (下同)

3.2.3 黄芪组分配伍对肥大心肌细胞 CK-M 亚基 mRNA 表达的影响 实验结果表明, 24 h, 肥大模型组 络沙坦组、黄芪皂苷、黄芪多糖及黄芪皂苷多糖组心肌细胞 CK-M 亚基表达显著减少, 与正常组比较有显著性差异, 48 h, 肥大模型组延续 24 h 的改变, 而络沙坦、黄芪皂苷、黄芪多糖及黄芪皂苷多糖组 CK-B 亚基表达趋于正常, 与正常组比较无显著性差异, 见表 3。

表 3 黄芪组分配伍对肥大心肌细胞 CK-M 表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物终浓度 (g·L ⁻¹)	CK-M/β-actin 比值	
		24 h	48 h
正常对照组	—	0.674 ± 0.086	0.674 ± 0.086 ⁴⁾
模型组	—	0.493 ± 0.013 ²⁾	0.394 ± 0.04 ³⁾
络沙坦组	10 ⁻⁶	0.539 ± 0.063 ²⁾	0.719 ± 0.072 ⁴⁾
黄芪皂苷组	10 ⁻²	0.519 ± 0.040 ²⁾	0.688 ± 0.023 ⁴⁾
黄芪多糖组	10 ⁻²	0.497 ± 0.011 ²⁾	0.655 ± 0.024 ⁴⁾
皂苷+ 多糖组	10 ⁻²	0.578 ± 0.027 ¹⁾	0.656 ± 0.051 ⁴⁾

4 讨论

4.1 CK 及其同功酶的生理功能及病理变化 CK 在心肌细胞中高表达, 在心肌细胞的能量代谢和从 ATP 产生到利用的能量传递过程中起关键作用。CK 基因家族编码为 4 种同型亚单位, 包括 2 种胞质型——M-CK、B-CK 和 2 种线粒体型——ubiquitous mito-CK 和 sarcomeric mito-CK^[8]。生理情况下 ATP 可被线粒体型肌酸激酶从内膜转移并形成 PCr, PCr 在需能部位再经胞质型 CK 同工酶催化转为 ATP 以供利用。目前国内外研究认为 CK-B 亚单位在胚胎期表达水平较高, 活性较 CK-M 亚单位低。心力衰竭时 CK-B 的 mRNA 及蛋白表达增加, 使心肌细胞内 CK-MB 亚型的比例增加而 CK-MM 的比例降低, CK-MB 的活性低于 CK-MM, 因此导致总 CK 活性降低^[1], ATP 与 PCr 之间的能量转换障碍, 从而使能量产生不足、利用障碍。以上研究均来源于心肌组织, 目前尚无体外培养心肌细胞的报道。

4.2 Ang II 对心肌细胞 CK 同功酶表达的影响 肾素-血管紧张素系统(RAS)在心衰发生发展中具有重要作用, RAS 中主要的生物活性物质为 Ang II。既往研究表明 Ang II 可影响心肌细胞活力和增殖力, 引起心肌细胞内能量代谢的障碍, 并通过引起心肌细胞肥大与间质成纤维细胞增生引起心肌重构, 最终导致心力衰竭^[9]。本实验发现 Ang II 作用于体外培养的乳鼠心肌细胞 24 h 后, 出现 CK-B 亚基的表达增加而 CK-M 亚基的表达减少, 表明 Ang II 可干预乳鼠能量代谢相关酶的 mRNA 表达, 从而影响酶的活性及相关能量代谢化学反应的进行, 最终引起细胞内能量代谢障碍而发生心力衰竭。

4.3 黄芪组分配伍对肥大心肌细胞 CK 同功酶表达的影响 黄芪是一味传统的补气药, 现代药理研究证明, 黄芪含有皂苷、多糖、黄酮和微量元素等多种成分, 具有多方面的药理作用^[10], 特别是具有明显的心血管作用^[11], 临床常用于治疗心力衰竭。本实验发现黄芪皂苷、黄芪多糖、黄芪皂苷加黄芪多糖作用于 Ang II 致乳鼠肥大心肌细胞 24 h, 仅表现为 Ang II 的影响作用——CK-B 亚基的表达增加、CK-M 亚基的表达减少, 黄芪组分及组分配伍的干预作用没有明显体现; 黄芪皂苷、黄芪多糖、黄芪皂苷加黄芪

多糖作用 48 h, 能显著对抗 Ang II 引起 CK-B 表达增加和 CK-M 表达减少, 心肌细胞的 CK-B 和 CK-M 亚基的表达趋于正常, 这是黄芪干预作用的结果, 说明黄芪组分及组分配伍可在分子水平上抑制 Ang II 对心肌细胞能量代谢的影响, 提示黄芪组分可能是通过对肥大心肌细胞能量代谢的干预作用预防心衰的发生发展, 这就为黄芪防治心力衰竭提供了分子水平上的实验依据。

[参考文献]

- [1] 殷仁富, 陈金明. 心脏能量学-代谢与治疗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002. 6, 168-181.
- [2] 洪 纓, 许少珍, 曾德源, 等. 黄芪注射液对慢性心衰大鼠心肌肥厚的逆转作用[J]. 中成药, 2002, 24(7): 525-529.
- [3] 于忠学, 关丽梅, 王炎焱, 等. 复方黄芪无糖颗粒对心肌缺血能量代谢的影响[J]. 中医药信息, 2003, 20(1): 55.
- [4] Clauser E. Moleculerstructure and fuctio of and function of angiotensin II receptor[J]. Nephrologie, 1998, 82: 403-410.
- [5] Tsutomu Yamazaki, Issei Komuro, Yoshio Yazaki. Role of the rennir angiotensinsystem in cardiac hypertrophy [J]. The American J of Cardiology, 1999, 83(12A): 53H-57H.
- [6] Harary I, Barbava F. In vitro studies of single isolated beating heart cell[J]. Science, 1960, 131: 1674-1683.
- [7] 苏敬泽, 林 谦, 农一兵. 黄芪组分配伍对血管紧张素 II 致肥大心肌细胞模型线粒体活力的影响[J]. 北京中医, 2007, 26(11): 742-744.
- [8] Stefan Hammerschmidt, Michael Bell, Nicole Buchler, et al. Acute changes of myocardial creatine kinase gene expression under β -adrenergic stimulation[J]. Biochimica et Biophys, Acta, 1502 (2000) 471-480.
- [9] Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat[J]. CircRes, 1994, 74: 727-739.
- [10] 韩 玲, 陈可冀. 黄芪对心血管系统作用的实验药理学研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20: 234-237.
- [11] 张建军, 韩秀珍, 姚秀俊. 干扰素和黄芪对心肌炎小鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2006, 44(5): 528-530.