

# 水杉总黄酮对胰岛素样生长因子- I 诱导的乳鼠心肌细胞肥大的抑制作用

赵永青<sup>1\*</sup>, 田 伟<sup>2</sup>, 彭海平<sup>1</sup>, 舒希贵<sup>1</sup>, 屠志本<sup>3</sup>, 糜留西<sup>3</sup>, 杨建军<sup>4</sup>

(1. 河北廊坊市卫生学校, 河北 廊坊 065000; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091;  
3. 中国科学院武汉植物研究所, 湖北 武汉 430717; 4. 宁夏医学院公共卫生学院, 宁夏 银川 750004)

[摘要] 目的: 探讨水杉总黄酮(TFM)对胰岛素样生长因子- I (IGF- I) 诱导的体外培养的乳鼠心肌细胞 DNA 和 RNA 合成的影响。方法: 体外分离培养乳鼠心肌细胞, 分成 4 组, 即正常对照组(C 组)、IGF- I 组、IGF- I + TFM 组、IGF- I + 月见草油(OBL)阳性对照组, 采用细胞 CT 扫描定量分析心肌细胞的 DNA、RNA 含量。结果: IGF- I 组心肌细胞的 DNA 和 RNA 合成明显增加, 与正常对照组比较, 均有显著性差异( $P < 0.05$ ); IGF- I + TFM 组心肌细胞的 DNA 和 RNA 合成明显低于 IGF- I 组, 两组比较差异明显( $P < 0.05$ ), 与 C 组接近( $P > 0.05$ )。结论: 水杉总黄酮对 IGF- I 诱导的乳鼠心肌细胞的肥大具有抑制作用。

[关键词] 水杉总黄酮; 心肌细胞; 胰岛素样生长因子- I

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)09-0038-03

## Effects of Total Flavone of Metasequoia Glyptostroboides on the Proliferation of Rat Cardiac Myocardial Cell

ZHAO Yong-qing<sup>1</sup>, TIAN Wei<sup>2</sup>, PENG Hai-ping<sup>1</sup>, SHU Xi-gui<sup>1</sup>  
TU Zhi-ben<sup>3</sup>, MI Liu-xi<sup>3</sup>, YANG Jian-jun<sup>4</sup>

(1. Langfang Medical School, Hebei Langfang 065000, China; 2. Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 3. Phytological Institute, Chinese Academy of Sciences, Hubei Wuhan 430717 China; 4. Public Health Department of Ningxia Medical College, Ningxia Yinchuan 750004, China)

[收稿日期] 2005-11-18

[基金项目] 河北省科委资助项目(No: 00276155D)

[通讯作者] \* 赵永青, Tel: 13683554446; E-mail: rom6509@sina.com

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the effect of total Flavone of *Metasequoia Glyptostroboidea* on synthesizing of DNA and RNA of rat myocardial cells (MCs). **Methods:** Isolated and cultured MCs of neonatal Sprague-Dawley (SD) were divided into four groups, that is control, insulin-like growth factor- I (IGF- I), IGF- I + Total Flavone of *Metasequoia Glyptostroboidea* (TFM) and IGF- I + *Oenothera Biennis* L oil (OBL) group. The DNA and RNA of MCs of all groups were measured by cell Computer tool after incubation. **Results:** Comparing with the control groups the content of DNA and RNA of MCs in IGFs group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), but the DNA and RNA of MCs in IGF- I + TFM and IGF- I + OBL groups obviously decreased ( $P < 0.05$ ) and close to C group. **Conclusion:** TFM effectively inhibits the proliferation of cultured MCs in rat by IGF- I inducing, which may play a role in the regression of heart remodeling.

[ **Key words** ] Total Flavone of *Metasequoia Glyptostroboidea*; Myocardial cell; insulin-like growth factor- I

胰岛素样生长因子- I (Insulin-like growth factor I, IGF- I) 和生长激素(GH)及其受体、结合蛋白、结合蛋白酶共同构成 GH-IGF 轴,参与了胚胎期和出生早期机体的生长与发育过程<sup>[1]</sup>。近年来许多研究表明<sup>[2,3]</sup>, IGF- I 还是一种重要的心脏局部作用多肽,对于心脏生长、发育和舒缩功能的调节都有重要作用,并参与了心肌损伤后心脏结构的重塑。离体研究表明 IGF- I 能够使心肌细胞 DNA 和 RNA 合成增加,说明 IGF 参与了心肌肥厚的形成过程。而心肌肥厚作为心血管疾病的独立危险因素已形成共识。近年来防治心肌肥厚的药物研究进展迅速,阻止 IGF 作用的药物可能对防治心肌肥厚有一定的作用。中医药在防治心血管疾病中的作用越来越受到关注,近年来有研究表明,水杉总黄酮(total flavones of *metasequoia*, TFM)具有钙拮抗作用,可防治心律失常<sup>[4]</sup>和预防容量超负荷所致心肌肥厚<sup>[5]</sup>,对心肌细胞具有保护作用,为此本文主要探讨 TFM 对 IGF- I 诱导的乳鼠心肌细胞肥大是否具有抑制作用,旨在探讨 TFM 抑制心肌肥厚的作用机理。

## 1 材料

**1.1 动物** 选用 SD 大鼠乳鼠(3~ 7d),由宁夏医学院实验动物中心提供,清洁级,许可证号: SCXK(宁)2005-0001。

**1.2 主要药品及试剂** 水杉总黄酮(含量为 32%)由中国科学院武汉植物所提供,用超声提取法从水杉中提取活性成分水杉总黄酮;胰岛素样生长因子- I (IGF- I); 10% 新生牛血清+ 90% DMEM; 0.1% 胶原酶-R(USA, Sigma 公司产)。月见草油为宁夏产,由宁夏志诚食品有限公司提供。

**1.3 主要仪器和设备** ACAS 575UV 激光共聚焦显微镜(USA)。

## 2 方法

**2.1 心肌细胞的收集** 取出生 3~ 7d 大鼠乳鼠若干,无菌取出心脏,剪碎至糊状,并加入 0.1% 胶原酶-R, 37℃ 消化,每 10min 收集细胞 1 次,共 3 次。将收集的全部细胞差速贴瓶 3 次,分离心肌细胞和成纤维细胞,贴壁细胞为心肌细胞,继续培养 48h 后,用 0.15% 的胰蛋白酶消化传代(1: 2.5)。第二代细胞备实验用。

**2.2 分组** 利用第 2 代心肌细胞分 4 组进行试验,即空白对照组(C):在基础培养基中加入 DMEM,量与实验组加入 IGF- I 等量; IGF- I 组:在基础培养基中加入 IGF- I 终浓度为 10ng/mL; IGF- I + TFM 组:在基础培养基中加 IGF- I 终浓度 10ng/mL 及 TFM 终浓度 60ng/mL; 阳性对照组: IGF- I + OBL:在基础培养基中加入 IGF- I 终浓度 10ng/mL 及 OBL 终浓度 0.025μg/mL<sup>[6]</sup>。取体外培养的第二代心肌细胞,于对数增生期分装至 24 孔板内,  $1 \times 10^5$  细胞/mL/孔, 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 下培养 24h 后,按分组条件分别加入 DMEM IGF- I IGF- I + TFM IGF- I + OBL, 各组于加药后 24h 后进行观察及实验。

**2.3 细胞形态的观察和细胞死亡率测定** 各组均于加药后 24h 在倒置显微镜下观察细胞形态,台盼兰 2:1 染色,计数死亡细胞。

**2.4 心肌细胞 DNA、RNA 含量及细胞面积测定** 于上述实验各组加药 24h 后分别收集细胞,进行涂片,涂片即入冷 Carnoy 固定液中固定,常规 ACAS575UV 激光共聚焦显微镜下,分别绘制细胞 DNA、RNA 含量及细胞面积,进行测定和分析。

**2.5 统计学处理** SPSS12 统计软件统计处理,采用单因素方差分析,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

**3.1 细胞形态与细胞死亡百分率** 显微镜下心肌细胞对照组呈圆形/椭圆形/多边形,核圆形/椭圆形,可见分裂相。IGF- I 组心肌细胞明显增大,IGF- I + TFM 组及 IGF- I + OBL 组两种细胞比均未见增大,似对照组。各组细胞死亡率均 < 5%,提示 IGF- I、TFM 及 OBL 对细胞均无致死性效应。

**3.2 心肌细胞 DNA 和 RNA 检测荧光值** 各组心肌细胞 DNA 和 RNA 含量测定结果见表 1。

表 1 心肌细胞 DNA 和 RNA 荧光值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞数	DNA 荧光值	细胞数	RNA 荧光值
C 组	54	463.11 ± 137.03	44	166.2 ± 41.21
IGF- I 组	54	709.39 ± 257.58 <sup>1)</sup>	63	234.24 ± 89.01 <sup>4)</sup>
IGF- I + TFM 组	52	610.65 ± 100.63 <sup>1,2)</sup>	57	185.25 ± 48.55 <sup>5)</sup>
IGF- I + OBL 组	55	582.33 ± 112.17 <sup>1,2,3)</sup>	45	181.13 ± 35.72 <sup>2)</sup>

注:与 C 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 IGF- I 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 IGF- I + TFM 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,下同。

结果表明,IGF- I 组 DNA、RNA 检测荧光值明显增高,与对照组相比,有显著差异( $P < 0.05$ );IGF- I + TFM 组及 IGF- I + OBL 组 DNA、RNA 检测荧光值均低于 IGF- I 组( $P < 0.05$ );但均高于 C 组( $P < 0.05$ ),提示 TFM 和 OBL 均可抑制 IGF- I 致心肌细胞 DNA、RNA 含量的增高。

**3.3 细胞面积的测定** 结果见表 2。

表 2 各组细胞面积平均荧光值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	心肌细胞	
	细胞数	荧光值
C 组	54	85.67 ± 19.21
IGF- I 组	54	101.50 ± 28.36 <sup>1)</sup>
IGF- I + TFM 组	52	86.10 ± 27.43 <sup>2)</sup>
IGF- I + OBL 组	55	85.05 ± 23.38 <sup>2)</sup>

结果表明,IGF- I 组心肌细胞面积荧光值明显增高,与对照组相比,有显著差异( $P < 0.05$ )。IGF- I + TFM 组、IGF- I + OBL 组与 IGF- I 组相比较,心肌细胞面积荧光值明显下降( $P < 0.05$ )。结果提示 TFM 和 OBL 均可抑制 IGF- I 致心肌细胞面积的增大。

### 3 讨论

近年来研究证实,IGF- I 能促进心肌细胞 DNA 和蛋白质的合成,减少蛋白降解,参与了胚胎期和出生早期心肌的生长与发育过程<sup>[1]</sup>。胎儿和成年人心肌均有丰富的 IGF- I 及 IGF- I 受体表达,心肌细胞的长期培养表明,是 IGF- I 而非生长激素(growth factor, GH)促进了肌原纤维的生长。IGF- I 是一类

具有细胞分化和增殖功能并具有胰岛素样代谢作用的多肽,通过结合细胞表面 IGF- I 受体后产生作用,可直接作用于心肌细胞,通过促进蛋白质合成,使其体积增大,细胞 DNA 和 RNA 浓度提高<sup>[2,3]</sup>。成熟心肌细胞伴随着 IGF- I 和 IGF- I 受体基因表达水平的下降,其增殖能力衰退。

本实验结果进一步证明 IGF- I 促使心肌细胞增殖,肯定了实验的可靠性。IGF- I 促使心肌肥大的作用机制为 IGF- I 与相应的受体结合后,受体的酪氨酸激酶活化可引起细胞内一系列的物质发生磷酸化反应,继而发动瀑布式的信号传递。酪氨酸激酶活化及由此活化的丝裂素活化蛋白激酶、蛋白激酶 C 均参与了 IGF- I 促心肌细胞内蛋白质合成增加,从而使心肌细胞增生肥大。

研究发现<sup>[4-6]</sup>水杉总黄酮具有抗心律失常和抗心肌缺血,抑制肥厚心肌  $Ca^{2+}$  超载作用,因而对心律失常和心肌肥厚有一定的预防作用。本实验利用体外细胞培养方法,结果显示,水杉总黄酮明显抑制 IGF- I 致心肌细胞 DNA、RNA 含量增高,明显地抑制心肌细胞面积的增加,提示水杉总黄酮对心肌细胞肥大具有抑制作用,且提示这一作用可能是通过水杉总黄酮在细胞水平对心肌细胞 DNA 和 RNA 合成的抑制作用而实现的。

本研究结果将为水杉总黄酮在防治心肌肥厚中的临床应用提供基础实验理论依据。水杉总黄酮的作用机制有待于进一步的研究。

### [参考文献]

- [1] Le Roith D, Scavo L, Butler A. What is the role of circulating IGF- I [J]. Trends Endocrinol Metab, 2001, 12(2): 48-52.
- [2] Liu JL, LeRoith K. Insulin-like growth factor-1 is essential for postnatal growth in response to growth hormone [J]. Endocrinology, 1999, 140(11): 5178-5184.
- [3] Rne J, Walsh MF, Hamaty M, et al. Altered inotropic response to insulin-like growth factor-1 in diabetic rat heart: influence of intracellular  $Ca^{2+}$  and nitric oxide [J]. Am J Physiol, 1998, 275: H823-H830.
- [4] 曾加雄,刘惟莞,石明健,等.水杉总黄酮对压力超负荷大鼠左室肥厚的作用[J].中国中医杂志,2000,10: 622-624.
- [5] 杨晓茹,刘惟莞,石明健,等.水杉总黄酮抗实验性心肌肥厚作用的研究[J].中国药理学通报,2000,16(1): 87-89.
- [6] 温静,杨建军,张宁,等.月见草油对培养心肌细胞肥大的影响[J].宁夏医学院学报,2005,27(5): 361-364.