

川芎嗪对血管紧张素 II 诱导心肌细胞肥大的影响及其机制

余良主,李敏才,余同辉*,韩璐
(湖北科技学院基础医学院,湖北 咸宁 437100)

[摘要] **目的:**探讨川芎嗪(TMP)对血管紧张素 II(Ang II)所诱导心肌细胞肥大的抑制作用及其机制。**方法:**利用 Ang II($0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)刺激新生大鼠心肌细胞建立肥大细胞模型。培养心肌细胞随机分为 6 组:对照组,Ang II($0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,低剂量 TMP($0.01\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,中剂量 TMP($0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,高剂量 TMP($1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,吡咯烷二硫化氨基甲酸酯(PDTC, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。在给药处理 24 h 后,收集各组心肌细胞,检测心肌细胞总蛋白含量、 β -肌球蛋白重链(β -MHC) mRNA 表达量和核因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达量。**结果:**Ang II 刺激导致培养心肌细胞的总蛋白含量[Ang II 组(296.7 ± 27.6) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对照组(184.3 ± 11.6) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $P<0.05$]、 β -MHC mRNA 表达量(Ang II 组 0.936 ± 0.059 ,对照组 0.496 ± 0.030 ; $P<0.05$)明显增加,这证实心肌肥大的发生;TMP 以剂量依赖的方式抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。同时 TMP $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 降低 Ang II 诱导的肥大心肌细胞中磷酸化 NF- κ B(Ang II 组 0.861 ± 0.065 ,TMP 组 0.655 ± 0.052 , $P<0.05$)和 I- κ B 蛋白的表达量(Ang II 组 0.785 ± 0.042 ,TMP 组 0.525 ± 0.045 , $P<0.05$)。在应用 Ang II 刺激心肌细胞同时,给予 NF- κ B 抑制剂 PDTC 也能抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。**结论:**川芎嗪通过抑制心肌细胞内 NF- κ B 途径,而抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。川芎嗪的这些作用构成了它对心脏疾病具有保护作用的机制之一。

[关键词] 川芎嗪;肥大;心肌细胞;核因子- κ B
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0154-04
[doi] 10.11653/syfy2013200154
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130808.1519.001.html>
[网络出版时间] 2013-08-08 15:19

Effects of Tetramethylpyrazine on Ang II-induced Cardiomyocyte Hypertrophy and the Underlying Mechanisms

YU Liang-zhu, LI Min-cai, SHE Tong-hui*, HAN Lu
(School of Basic medicine, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of tetramethylpyrazine (TMP) on angiotensin II (Ang II)-induced cardiomyocyte hypertrophy and the underlying mechanisms. **Method:** Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy model was established in isolated neonatal rat ventricular myocytes. The cells were then randomly divided into 6 groups: control group, Ang II ($0.1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, low-dose TMP ($0.01\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, middle-dose TMP ($0.1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, high-dose TMP ($1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, a NF- κ B inhibitor, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. After 24 h treatment, cardiomyocytes were harvested to measure total protein content by Lowry's method, β -myosin heavy chain (β -MHC) mRNA expression by Real-time PCR, and NF- κ B content by Western blotting. **Result:** Ang II induced cardiomyocyte hypertrophy characterized by increased total protein content [Ang II group (296.7 ± 27.6) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; control group (184.3 ± 11.6) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $P<0.05$] and enhanced β -MHC mRNA expression (Ang II group 0.936 ± 0.059 ; control group

[收稿日期] 20130401(012)
[基金项目] 湖北省教育厅科学技术研究项目(B20122804);湖北科技学院科学研究项目(BK1104,ZX1201)
[第一作者] 余良主,博士,副教授,从事心肌肥厚的发生机制及防治研究,E-mail:yuliangyu73@sina.com
[通讯作者] *余同辉,博士,讲师,从事干细胞移植防治心脏疾病的研究,E-mail:xnsth@163.com

0.496 ± 0.030 , $P < 0.05$), while TMP significantly inhibited Ang II-induced hypertrophic growth in a dose-dependent manner. Meanwhile, TMP ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) also attenuated Ang II-induced increase in phosphorylated NF- κ B (Ang II group 0.861 ± 0.065 ; TMP group 0.655 ± 0.052 , $P < 0.05$) and I- κ B protein content (Ang II group 0.785 ± 0.042 ; TMP group 0.525 ± 0.045 , $P < 0.05$) in cardiomyocytes. Furthermore, inhibition of NF- κ B by the specific inhibitor PDTC markedly suppressed Ang II-induced hypertrophic responses. **Conclusion:** Our findings suggested that TMP inhibits Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophy through suppression of NF- κ B pathway, which might contribute to the protective role of TMP in cardiac diseases.

[**Key words**] tetramethylpyrazine; hypertrophy; cardiomyocyte; NF- κ B

川芎嗪(TMP)是中草药川芎中的主要活性成分。在心脏疾病治疗中,川芎嗪被证实具有抗缺血-再灌注损伤、抗氧化等多方面的保护作用^[1-3]。而近年在体研究显示,川芎嗪具有一定抑制心肌肥厚的作用^[4]。但是,其抑制心肌肥厚的细胞学机制并不清楚。转录因子 NF- κ B 所介导的信号途径近年来被证实在心肌肥厚中起着重要作用^[5]。川芎嗪对血管平滑肌细胞的核因子- κ B(NF- κ B)途径具有明显的抑制作用^[6]。这促使作者推测,川芎嗪对心肌细胞 NF- κ B 信号途径的抑制可能是其抗心肌肥厚的细胞学基础。为此,本研究从培养细胞水平,探讨川芎嗪对 Ang II 所诱导心肌肥厚以及心肌细胞内 NF- κ B 表达的影响。

1 材料

1.1 动物 出生 1~3 d 龄的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,雌雄不拘,购自湖北省实验动物研究中心,许可证号 SCXK(鄂)2008-0005。

1.2 试剂 血管紧张素 II (Ang II, 批号 064K51201),胶原酶 B,吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC,批号 L07399, Sigma 产品);胰蛋白酶(批号 BE2189),DMEM 培养基(批号 1313804),美国 Gibco 产品;盐酸川芎嗪(批号 06032411,购自无锡市第七制药有限公司);其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 电热鼓风干燥箱(重庆四达试验设备有限公司),二氧化碳培养箱(德国 Eppendorf 公司),超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司),荧光定量 PCR 仪(美国 BioRAD 公司),恒压恒流电泳仪(美国 BioRAD 公司),凝胶成像系统(美国 Bio Rad 公司)。

2 方法

2.1 新生大鼠心肌细胞的分离培养及实验分组 SD 大鼠原代心肌细胞分离培养过程参照以往报道^[7]。简要过程如下:在无菌条件下,将 1~3 d 龄新生鼠心脏取出,仔细分离心室,用冷的 D-Hanks 液洗净血液后,将心室剪成约 1 mm^3 大小的碎块,再

用含 0.1% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶 B 的混合消化液中 37°C 反复消化 5 次,每次 7 min。收集分离下的心肌细胞至含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,经梯度贴附法去除非肌细胞,再以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板中,置于二氧化碳培养箱中培养。培养 48 h 后,即换为无血清 DMEM 培养液适应性培养 10 h。再改为含药物的 DMEM 培养液培养 24 h。

实验分组及给药如下:①对照组;②Ang II 组,用含 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 的 DMEM 培养液培养心肌细胞;③低剂量 TMP 组,用含 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 和 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 川芎嗪的 DMEM 培养液培养心肌细胞;④中剂量 TMP 组,用含 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 和 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 川芎嗪的 DMEM 培养液培养心肌细胞;⑤高剂量 TMP 组,用含 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 川芎嗪的 DMEM 培养液培养心肌细胞;⑥PDTC 组,用含 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ang II 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PDTC 的 DMEM 培养液培养心肌细胞。给药培养 24 h 后进行各项指标的测定。

2.2 肥大心肌细胞总蛋白含量检测 药物作用完成后,移除 6 孔板中的培养液,PBS 液冲洗 3 次。再加入 1% SDS 裂解细胞,根据细胞计数,采用 Lowry 法检测各孔心肌细胞总蛋白含量。

2.3 检测心肌细胞 β -肌球蛋白重链(β -MHC) mRNA 表达量 采用 RT-PCR 法检测心肌细胞 β -MHC mRNA 表达量。利用 Trizol 试剂一步法提取心肌细胞总 RNA,随后进行逆转录合成 cDNA 和 PCR,利用相应引物扩增 β -MHC 和(GAPDH)基因的 mRNA 表达量。基因引物序列为: β -MHC 引物,上游 $5'$ -TAACCCGAGGCAAGCTCACA- $3'$,下游 $5'$ -CACAATCATGCCGTGCTGAC- $3'$,产物尺寸 120 bp;GAPDH 引物,上游 $5'$ -AGTTCAACGGCACAGTCAAG- $3'$,下游 $5'$ -GTGGTGAAGACGCCAGTAGA- $3'$,产物尺寸 148 bp。 β -MHC 引物和 GAPDH 引物序列均参照以往文献报道^[7-10]。

PCR 扩增条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 30 s,

60 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 35 个循环。扩增反应在荧光定量 PCR 仪中进行。扩增产物再进行含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳,电泳条带被扫描,并储存为 tiff 图片。应用 Image J (NIH, Bethesda, USA) 软件,对电泳条带的吸光度进行检测。同时,检测心肌细胞的内参照基因 GAPDH 表达量。以目的基因/GAPDH 基因计算相对表达量。每组实验重复 3 次。

2.4 心肌细胞 NF-κB 表达量检测 采用 Western blotting 检测心肌细胞 NF-κB 和 I-κB 含量。药物作用完成后,培养细胞用 PBS 洗 3 次, RIPA 细胞裂解液(江苏碧云天生物技术研究所)裂解细胞,按照试剂盒说明提取细胞总蛋白,蛋白浓度采用 Bradford 法定量。取 50 μg 蛋白上样,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,再转印至硝酸纤维素膜。用 5% 脱脂奶粉封闭后,经抗 NF-κB p65, I-κB 一抗抗体 (Santa Cruz, USA) 4 ℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗孵育,以及 DAB 显色。随后,蛋白条带被扫描,并储存为 tiff 图片。再应用 Image J 软件,对蛋白条带的吸光度进行检测。同时,检测心肌细胞 β-肌动蛋白 (β-actin) 的表达量。以 β-actin 为内参照,统计分析 NF-κB 的相对表达量。

2.5 统计学分析 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 软件作单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

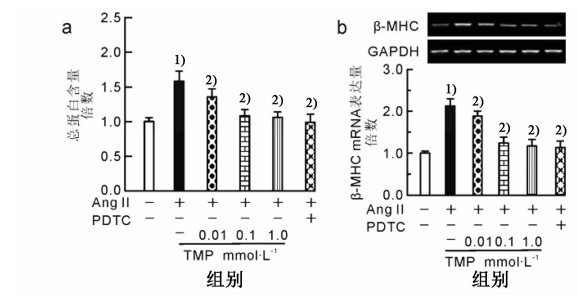
3 结果

3.1 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大的影响 如图 1 所示, 0.1 μmol·L⁻¹ Ang II 显著增加了心肌细胞的总蛋白含量和 β-MHC mRNA 的表达量,导致心肌细胞肥大。而 0.01 ~ 1 mmol·L⁻¹ 的川芎嗪则呈剂量依赖性减少 Ang II 诱导的肥大心肌细胞总蛋白含量也明显降低肥大心肌细胞中 β-MHC mRNA 的表达量。100 μmol·L⁻¹ PDTC 显著减少了 Ang II 诱导下的心肌细胞总蛋白含量(图 1a)和 β-MHC mRNA 的表达量(图 1b)。因而, NF-κB 确实在 Ang II 诱导心肌细胞肥大中起着重要作用。

3.2 对肥大心肌细胞中磷酸化 NF-κB 和 I-κB 的蛋白表达的影响 0.1 μmol·L⁻¹ Ang II 显著增加了心肌细胞中磷酸化 NF-κB 和 I-κB 蛋白的表达量,而应用川芎嗪(1 mmol·L⁻¹)则明显降低了肥大心肌细胞中磷酸化 NF-κB 和 I-κB 蛋白的表达量。见图 2。

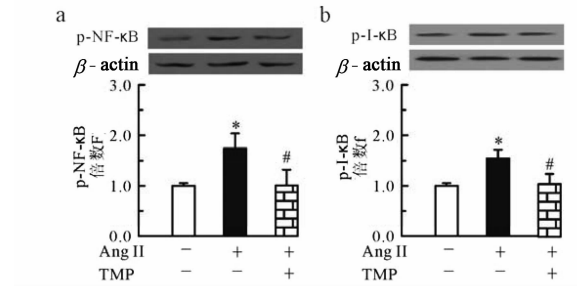
4 讨论

心肌肥大是心肌适应各种内外刺激因素而发生的一种强有力的代偿机制。其代偿作用在最初能够提高心脏泵血功能。但在病因持久作用下,肥大心



与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$; 与 Ang II 组相比²⁾ $P < 0.05$
设定对照组数值为 1, 其他组数据用对照组数值的
倍数表示(图 2 同)。各组例数为: 对照组 ($n = 8$); Ang II 组 ($n = 7$);
低剂量 TMP 组 ($n = 6$); 中剂量 TMP 组 ($n = 7$);
高剂量 TMP 组 ($n = 7$); PDTC 组 ($n = 6$)。

图 1 TMP 和 PDTC 与 Ang II 诱导的肥大心肌细胞中
总蛋白含量 (a) 和 β-MHC mRNA 相对表达量 (b) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)



对照组 ($n = 6$); Ang II 组 ($n = 6$); TMP 组 ($n = 5$)
图 2 TMP 1 mmol·L⁻¹ 对肥大心肌细胞内磷酸化
NF-κB (a) 和 I-κB (b) 的蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

肌功能将不能长期维持正常而最终转向心力衰竭^[11]。而且, 心肌肥大本身也是导致心脏猝死的独立危险因素^[11]。因此, 寻找针对心肌肥大的治疗策略一直是心血管疾病研究领域的热点之一。血管紧张素 II (Ang II) 被人们公认是促心肌肥大因子。川芎嗪这种中药被证实可抑制 Ang II 的多种效应。例如: 川芎嗪对 Ang II 诱导的主动脉平滑肌细胞增殖具有显著的抑制作用^[6]; 川芎嗪还抑制 Ang II 诱导的心脏成纤维细胞增殖以及 I 型胶原合成^[12]。而有关川芎嗪对 Ang II 诱导心肌肥大作用的影响及其细胞学机制目前并不清楚。本研究结果证实, 川芎嗪对 Ang II 诱导的新生大鼠心肌细胞肥大具有明显的抑制作用。

心肌肥大的机制较为复杂, 细胞内多种信号机制的交互对话可能促进心肌肥大的发生。其中, NF-κB 信号途径已被明确证实参与心肌肥大的发生^[5, 13]。此信号途径中的 NF-κB 是一个由 Rel 蛋白家族组成的二聚体转录因子^[14]。Rel 蛋白家族有多个成员, 包括 RelA (即 p65), RelB, cRel, p50, p52 等。这些蛋白通过其 N 端同源结构域的相互结合,

形成同型或异型二聚体。在多数细胞类型中, NF- κ B 主要是以 p65:p50 二聚体的形式存在。而细胞内 NF- κ B 的活性主要受其抑制物 I- κ B 的调节。I- κ B 家族则包含 I- κ B α , I- κ B β , I- κ B γ 等成员。目前被最为广泛研究的主要是 I- κ B α 。在未被激活时, NF- κ B 主要以与 I- κ B 结合成异三聚体的形式驻留于细胞浆中。当细胞受到脂多糖(LPS)、细胞因子等 NF- κ B 活化因素的刺激作用时,即激活细胞内的信号转导途径,导致 I- κ B 激酶(IKK)活化。这一激酶使 I- κ B 磷酸化,磷酸化的 I- κ B 随即被蛋白酶水解,从而促进 NF- κ B 的释放和活化。细胞内的信号机制在诱导 I- κ B 磷酸化的同时,也会促进 NF- κ B 的磷酸化。磷酸化的 NF- κ B 即具备较强的 DNA 结合活性,而转位入核,发挥其转录调节作用。

一些促心肌肥大因子如 Ang II, 内皮素-1 都可激活心肌细胞内的 NF- κ B 途径^[13]。NF- κ B 激活后转位至细胞核内,即触发肥大相关基因的表达,导致心肌肥大。靶向抑制 NF- κ B 可抑制心肌肥厚的发生^[5]。由于川芎嗪对 Ang II 诱导的平滑肌细胞 NF- κ B 信号途径具有抑制作用^[6],因此推测川芎嗪对心肌细胞中 Ang II 所激活的 NF- κ B 信号途径也具有抑制作用。本结果证实。应用川芎嗪可显著减少 Ang II 诱导的肥大心肌细胞中磷酸化 NF- κ B 和 I- κ B 的蛋白表达量。应用 NF- κ B 特异性抑制剂 PDTC 的研究结果则进一步证实,对 NF- κ B 信号途径的抑制可能是川芎嗪抑制 Ang II 所诱导心肌肥大的细胞内信号机制。

综上所述,川芎嗪可能通过抑制心肌细胞 NF- κ B 信号途径而抑制了 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。川芎嗪的这些作用证实其在临床上防治心脏肥厚的潜在可能意义。

[参考文献]

- [1] 张淑娟,王振涛,韩丽华,等. 川芎嗪注射液对心梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):170.
- [2] 赵润英,郝伟,孟祥军,等. 阿魏酸川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):230.
- [3] Guo L, Wang A, Sun Y, et al. Evaluation of antioxidant and immunity function of tetramethylpyrazine phosphate tablets *in vivo* [J]. Molecules, 2012,17(5):5412.
- [4] Zhao H P, Lü D, Zhang W, et al. Protective action of tetramethylpyrazine phosphate against dilated cardiomyopathy in cTnT(R141W) transgenic mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(3):281.
- [5] Gupta S, Young D, Maitra R K, et al. Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB [J]. J Mol Biol, 2008, 375(3):637.
- [6] 任新瑜,阮秋蓉,朱大和,等. 川芎嗪抑制血管紧张素 II 诱导的平滑肌细胞 NF- κ B 激活和骨形成蛋白-2 表达降低[J]. 生理学报,2007,59(3):339.
- [7] 余良主,李敏才,余同辉,等. 内皮素-1 通过一种不依赖于 p38MAPK 的信号转导机制刺激心肌细胞起搏通道的表达[J]. 南方医科大学学报,2012, 32(9):1274.
- [8] Shen E, Diao X, Wang X, et al. MicroRNAs involved in the mitogen-activated protein kinase cascades pathway during glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. Am J Pathol, 2011, 179(2):639.
- [9] Henning R J, Silva J, Reddy V, et al. Cocaine increases beta-myosin heavy-chain protein expression in cardiac myocytes [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2000, 5(4):313.
- [10] Muangmingsuk S, Ingram P, Gupta M P, et al. Dexamethasone induced cardiac hypertrophy in newborn rats is accompanied by changes in myosin heavy chain phenotype and gene transcription [J]. Mol Cell Biochem, 2000, 209(1/2):165.
- [11] Frey N, Olson E N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly [J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65(1):45.
- [12] 张冬梅,秦英,吕沛滢,等. 川芎嗪对血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌成纤维细胞增殖及 I 型胶原合成的影响[J]. 中西医结合学报,2009,7(3):232.
- [13] Rajapurohitam V, Kilic A, Javadov S, et al. Role of NF-kappaB and p38 MAPK activation in mediating angiotensin II and endothelin-1-induced stimulation in leptin production and cardiomyocyte hypertrophy [J]. Mol Cell Biochem, 2012,366(1/2):287.
- [14] Wang D, Baldwin A S Jr. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529 [J]. J Biol Chem, 1998, 273(45):29411.

[责任编辑 聂淑琴]