

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01305

葛根素对异丙肾上腺素诱导的心肌细胞肥大及凋亡的影响

张玲^{1*}, 孙媛², 许薇²

1. 辽宁医学院畜牧兽医学院, 锦州 121001

2. 辽宁医学院附属第一医院, 锦州 121001

[摘要] **目的** 利用体外培养的大鼠乳鼠心肌细胞, 探讨葛根素(puerarin, Pue)对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)所致心肌细胞肥大和心肌细胞凋亡的影响。**方法** 新生大鼠心肌细胞培养, 除对照组外, 分别给予 ISO(10^{-5} mol/L)、Pue(10^{-6} mol/L)、ISO(10^{-5} mol/L)+Pue(10^{-6} mol/L)、ISO(10^{-5} mol/L)+普萘洛尔(propranolol, Pro, 2×10^{-6} mol/L), 检测培养心肌细胞蛋白质含量、细胞体积、蛋白质的合成及细胞凋亡率。**结果** 和对照组相比, ISO可使心肌细胞总蛋白含量、体积和凋亡率明显增加($P < 0.01$); Pue可以抑制由于ISO诱导所出现的上述情况, 结果与Pro相近。**结论** Pue能对抗ISO引起的心肌肥大及细胞凋亡, 此效应可能是葛根素抑制心肌肥厚发生的保护机制之一。

[关键词] 葛根素; 异丙肾上腺素; 心肌细胞; 肥大; 细胞凋亡

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1305-04

Effects of puerarin on isoproterenol-induced hypertrophy and apoptosis of cardiomyocytes

ZHANG Ling^{1*}, SUN Yuan², XU Wei²

1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning, China

2. First Affiliated Hospital, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of puerarin (Pue) on hypertrophy and apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes induced by isoproterenol (ISO). **Methods** Cardiomyocytes of neonatal rats were cultured *in vitro* and were treated with ISO (10^{-5} mol/L), Pue (10^{-6} mol/L), ISO (10^{-5} mol/L) + Pue (10^{-6} mol/L), or ISO (10^{-5} mol/L) + propranolol (Pro, 2×10^{-6} mol/L); untreated cells were taken as control. The total protein content, cardiomyocyte volume, protein synthesis and apoptosis rate of the cardiomyocytes were investigated. **Results** Compared with the control group, ISO significantly increased the total protein content, cardiomyocyte volume and apoptosis rate of cardiomyocytes ($P < 0.01$). Similar to Pro, Pue inhibited the above changes induced by ISO. **Conclusion** Pue can inhibit the hypertrophy and apoptosis of cardiomyocytes induced by ISO, which might be one of the reasons for the protective effect of Pue against myocardial hypertrophy.

[Key words] puerarin; isoproterenol; cardiomyocyte; hypertrophy; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12):1305-1308]

葛根素(puerarin, Pue)为豆科植物野葛干燥根中的提取物, 已有动物实验研究表明Pue对肾^[1]、肠^[2]等多种组织、器官的疾病具有一定的防治作用, 而且在心血管方面有调节肾素-血管紧张素系统(RAS)、血浆内皮素(ET)和一氧化氮(NO)含量^[3], 拮抗 β -肾上腺受体^[4]等多方面作用。近来研究显示多种心脏疾病发生、发展的基本机制是心室重塑, 心肌细胞的凋亡、肥大均为心室重塑的特征性改变^[5-6]。笔者曾实验证实Pue能明显抑制心肌肥厚动物模型中心肌细胞肥大及相关因子变化^[7], 本实验用培养的新生大鼠心肌细胞研究Pue对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的心肌细胞肥大及凋亡的影响, 进一步探讨其抑制心肌肥厚的可能机制。

腺素(isoproterenol, ISO)诱导的心肌细胞肥大及凋亡的影响, 进一步探讨其抑制心肌肥厚的可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物、药品与试剂 出生23 d的SD大鼠乳鼠, 雌雄不限, 由辽宁医学院实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(辽)2007-2011。ISO、十二烷基硫酸钠(SDS)、低糖培养基DMEM、双苯并咪唑染料(Hoechst33258)和碘化丙啶(PI)均购自美国Sigma公司; Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自晶

[收稿日期] 2010-06-18

[接受日期] 2010-11-06

[作者简介] 张玲, 硕士, 讲师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0416-4672062, E-mail: fengling84@163.com

美生物工程有限公司;Pue 购自广东燕塘生物化学药业有限公司;普萘洛尔(propranolol,Pro)购自中国利生药物公司;小牛血清为杭州四季青生物材料研究所产品;其他试剂均为分析纯;CIAS-1000 计算机细胞图像分析系统(北京大恒图像图形研究所)。

1.2 大鼠乳鼠心肌细胞原代培养 取出生1~3 d 的SD大鼠乳鼠,无菌条件下用75%乙醇消毒皮肤,开胸剪取心脏,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤3次后,剪成1 mm³大小的碎块,加入0.6 g/L胰蛋白酶消化细胞。将消化完毕的细胞置入含有体积分数分别为0.15的小牛血清、0.84的DMEM培养基及0.01的双抗液(含100 kU/L青霉素,100 mg/L链霉素)的培养基。将细胞悬液吹打均匀,以 1×10^8 /L的密度接种于24孔培养板,5%CO₂孵箱培养。

1.3 分组及给药方法 常规培养心肌细胞2~3 d后,更换含0.4%小牛血清的培养基,以减少血清成分对实验结果的影响。设不给药组为对照组,其他组分别给药:给予ISO(10^{-5} mol/L)、Pue(10^{-6} mol/L)、ISO(10^{-5} mol/L)+Pue(10^{-6} mol/L)(Pue先孵育30 min后加ISO)、ISO(10^{-5} mol/L)+Pro(2×10^{-6} mol/L),观察不同处理因素对心肌细胞肥大及凋亡的影响。继续培养2~3 d后进行各项指标的测定。

1.4 Lowry's法测定培养心肌细胞蛋白质含量 根据计数,24孔板每孔的细胞密度大致为 0.5×10^9 /L。吸去培养板各孔中的培养液,用D-Hanks液快速冲洗3次后,加入10 g/L SDS 0.5 ml溶解细胞,Lowry's法^[8]测每孔细胞蛋白质含量,具体操作如下:(1)精确量取一定体积待检样品(含蛋白质50 μg左右)于试管中,加5 ml碱性溶液(4%碳酸钠溶液、0.2 mol/L氢氧化钠溶液各25 ml,0.04 mol/L硫酸铜溶液、0.1 mol/L酒石酸钾各0.5 ml混匀配制而成),混匀,于室温放置10 min,快速加入0.5 ml酚试剂,摇匀,于室温放置30 min,用650 nm波长或红色滤光片比色(呈色后,如发现混浊,经 $800 \times g$ 离心15 min后再比色)(2)标准曲线:精确量取标准蛋白质溶液(100 μg/ml)0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 ml,分别置于试管中,加蒸馏水补至1 ml,其余操作同(1)项,可得一标准曲线。用直线回归法计算结果。

1.5 心肌细胞体积测定 用D-Hanks液快速冲洗长满细胞的培养孔3次,每孔加0.3 ml胰蛋白酶,放入37℃恒温箱中30 min后,再加入0.2 ml含有体积

分数为0.1血清的培养基中止消化,收集细胞注入细胞室内,在放大400倍的倒置显微镜下观察其中的细胞,几乎均成球形。用CIAS-1000计算机图像分析系统测量单个细胞的直径,进而计算出细胞的体积。每孔随机选择4个视野,每个视野测20个细胞。

1.6 心肌细胞蛋白质合成测定 将生长在24孔培养板上无血清静止培养了48 h的细胞培养液倒掉,代之以含有37 TBq/L [³H]leucine,与其他组一起培养72 h。吸掉每孔的培养液,用冷D-Hanks液快速冲洗3遍,加1 ml 10 g/L的SDS溶解细胞,应用49型玻璃纤维滤膜(GF/C)过滤,之后用2 ml 10%的三氯醋酸(TCA)沉淀蛋白,2 ml体积分数为95%~99%乙醇抽滤,烘干滤膜,用液闪仪(Packard,Tricard 2200 CA,美国)测量 [³H]leucine的结合,进行蛋白合成的分析。根据计数,每孔的细胞密度大致为 0.5×10^9 /L,结果以每孔的cpm值计算^[9]。

1.7 Hoechst33258/PI荧光双染 心肌细胞培养3 d,贴壁后无血清培养24 h,使细胞同步化,按分组每24 h加药1次,48 h后用0.25%的胰酶消化使之脱落,制成单细胞悬液,再收集细胞。在6孔板中铺板爬片,加入Hoechst33258(5 μg/ml)100 μl,37℃避光反应10 min。继续加入PI(50 μg/ml)100 μl,4℃避光反应20 min。4%多聚甲醛固定细胞10 min后,置于荧光显微镜下观察细胞形态结构及胞核的变化,每张玻片随机选择10个视野并计数,区分出坏死、凋亡和活细胞,并计算出凋亡率、坏死率及存活率^[10]。

1.8 Annexin V-FITC/PI双标记法检测心肌细胞凋亡率 取经各药物处理48 h的细胞,用0.25%的胰酶消化,调节细胞密度为 1×10^6 个/L。严格按照试剂说明书操作,用PBS清洗离心2次,加入10 μl的Annexin V-FITC和5 μl的PI,4℃避光染色30 min,染色后上流式细胞仪(FACS CALIBUR,美国BD公司)检测。所得数据经Bioconsort专用软件处理,分析细胞凋亡率。

1.9 统计学处理 数据均采用SPSS 13.0统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 心肌细胞蛋白质含量 由表1可见,与对照组相比,ISO组的蛋白含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);Pue组与对照组相比,差异无统计学意

义; ISO+Pue 组和 ISO+Pro 组与 ISO 组相比均减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 心肌细胞体积 由表 1 可见, 与对照组相比, ISO 组的细胞体积增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); Pue 组与对照组相比差异无统计学意义; ISO+Pue 组和 ISO+Pro 组与 ISO 组相比均减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 心肌细胞蛋白质的合成 由表 1 可见, 与对照组相比, ISO 组蛋白质合成增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); Pue 组较对照组并未明显增加; ISO+Pue 组和 ISO+Pro 组与 ISO 组相比均减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 Pue 对 ISO 诱导心肌细胞蛋白质含量、细胞体积、细胞蛋白质合成的影响

Tab 1 Effects of Pue on protein content, cell volume and protein synthesis ($[^3\text{H}]$ leucine uptake) of cultured cardiomyocytes treated with ISO

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Protein content [$\mu\text{g} \cdot (2 \times 10^5 \text{ cells})^{-1}$]	Cell volume $V/\mu\text{m}^3$	Protein synthesis [cpm $\cdot (5 \times 10^4 \text{ cells})^{-1}$]
Control	16.19 \pm 0.13	1 057.5 \pm 40.1	1 075.5 \pm 100.5
ISO	25.66 \pm 0.14 **	2 147.7 \pm 47.7 **	1 838.0 \pm 102.9 **
Pue	15.96 \pm 0.12	1 068.8 \pm 70.2	1 154.5 \pm 106.8
ISO+Pue	17.74 \pm 0.12 $\Delta\Delta$	1 192.4 \pm 70.4 $\Delta\Delta$	1 330.1 \pm 109.4 $\Delta\Delta$
ISO+Pro	17.33 \pm 0.16 $\Delta\Delta$	1 242.7 \pm 59.5 $\Delta\Delta$	1 311.5 \pm 107.6 $\Delta\Delta$

ISO: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ isoproterenol; Pue: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ puerarin; Pro: $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ propranolol. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISO group

2.4 Hoechst33258/PI 荧光双染结果 由表 2 可见, ISO 组凋亡率和坏死率较对照组明显增加, 存活率则较对照组下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Pue 组与对照组相比, 3 个指标差异均无统计学意义; ISO+Pue 组和 ISO+Pro 组与 ISO 组相比 3 个指标均有明显改善 ($P < 0.01$)。

表 2 Pue 对 ISO 诱导心肌细胞凋亡率的影响
Tab 2 Effect of Pue on apoptosis of cardiomyocytes induced by ISO

($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	Apoptotic rate	Necrosis rate	Survival rate
Control	7.57 \pm 0.85	2.44 \pm 0.72	89.99 \pm 2.77
ISO	35.60 \pm 1.33 **	10.43 \pm 1.07 **	53.97 \pm 1.96 **
Pue	8.24 \pm 0.98	3.88 \pm 0.46	87.88 \pm 2.81
ISO+Pue	18.21 \pm 1.08 $\Delta\Delta$	5.38 \pm 0.87 $\Delta\Delta$	76.43 \pm 1.31 $\Delta\Delta$
ISO+Pro	19.22 \pm 1.33 $\Delta\Delta$	5.75 \pm 0.83 $\Delta\Delta$	75.03 \pm 1.89 $\Delta\Delta$

ISO: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ isoproterenol; Pue: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ puerarin; Pro: $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ propranolol. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISO group

2.5 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测心肌细胞早期凋亡率 由检测结果(图 1)可见, ISO 组凋亡率较对照组增加 ($P < 0.01$), 表明 ISO 能明显促进正常心肌细胞的早期凋亡; Pue 组与对照组相比凋亡率差异无统计学意义; ISO+Pue 组和 ISO+Pro 组的凋亡率均较 ISO 组明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明 Pue 和 Pro 均可在一定程度上抑制 ISO 所引起的细胞早期凋亡。

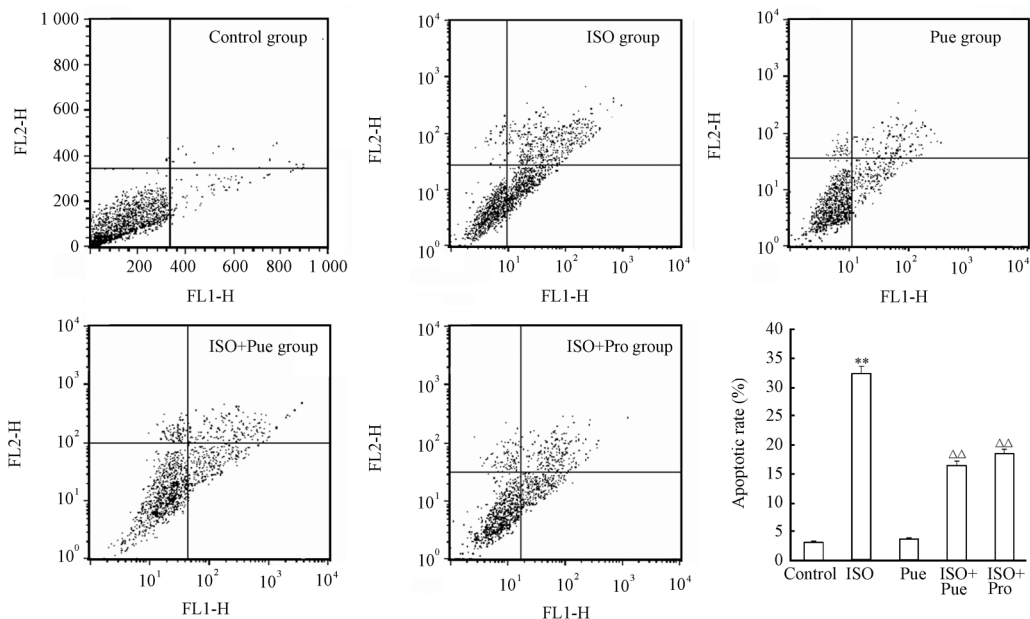


图 1 Pue 对 ISO 诱导心肌细胞早期凋亡的影响

Fig 1 Effects of Pue on early apoptosis of cardiomyocytes induced by ISO

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs ISO group. $n=6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

在多种心脏疾病中,心肌细胞凋亡可能是引发代偿性心肌肥厚转变为心力衰竭的重要诱因。在压力负荷增加、血流动力学改变、局部 Ang II 产生过多等因素作用下,某些凋亡基因活化,合成凋亡相关蛋白,使心肌细胞凋亡增加,从而导致心肌收缩和泵血功能不足。机体试图恢复心肌收缩和泵血功能,可能会通过一系列信号转导,首先刺激心肌细胞增殖。而心肌细胞一般情况下不发生增殖或增殖率极低,故不能满足心脏收缩和泵血功能的需要。生物体损伤后修复,一般通过功能修复和结构修复两种方式完成,在功能修复不能完成的情况下,有时机体也通过结构修复来实现。所以当心肌细胞凋亡增加时,由于心脏不能依靠心肌细胞增殖来完成功能修复,机体便通过一系列的调节,刺激成纤维细胞增殖,通过间质纤维化和胶原增加来维持心脏的结构。但是这种修复往往是无益的,反而启动或促进了心脏肥大的形成^[11]。因此,在心肌肥厚的发病机制中,心肌细胞凋亡被认为是减少心肌收缩单位、导致心功能损伤并进一步发展为心衰的根本原因^[12]。抑制心肌细胞凋亡可能延缓心肌肥厚和心衰的发生。

为了探讨 Pue 对心肌肥厚、心肌细胞凋亡的作用,本次实验研究了 Pue 对 ISO 诱导的大鼠乳鼠心肌细胞体积、心肌细胞蛋白质合成及心肌细胞凋亡率等的影响。实验结果显示:在低血清培养环境下,ISO 明显诱导培养心肌细胞肥大,表现为细胞蛋白质含量、细胞体积和蛋白质合成增加;而单独应用 Pue 并未对心肌细胞在上述指标方面产生明显变化;Pue 能显著性改善 ISO 所致的乳鼠心肌细胞蛋白质含量增加、细胞体积变大和蛋白质合成增加,且与经典肾上腺素受体阻断剂 Pro 无明显差异。ISO 可以诱导大鼠心肌细胞凋亡,Pue 能显著抑制 ISO 所引起的凋亡,而 Pue 自身并不会引起心肌细胞的显著性凋亡。这些结果都说明 Pue 不仅在形态学方面而且在心肌细胞凋亡方面对 ISO 导致的心肌肥厚都有一定的抑制作用。

推测出现上述结果的原因:由于 β -肾上腺素受体的激动,会出现血流动力学改变、局部 Ang II 产生过多^[7]、细胞内钙离子增多^[13]等变化,进而刺激某些凋亡基因活化和凋亡相关蛋白的合成,使心肌细胞凋亡增加^[14],从而启动或促进了心肌细胞肥大的形成,出现心室重构^[15]。Mercer 等^[16]曾报道提示葛根素能延缓离体心肌细胞凋亡,对心肌有明显的保护作用,本次实验结果也再次证明了这一结论;而且 Pue 对 β -肾上腺素受体具有拮抗作用^[4],也就是

可能从抑制 ISO 作用方面减缓 ISO 所引起的一系列变化,确切机制还有待进一步探讨。

综上所述,本实验证实 Pue 能够有效地干预 ISO 所引起的心肌细胞肥大及凋亡,提示这可能是葛根素抑制心肌肥厚发生的保护机制之一。

[参考文献]

- [1] 吴合林,张荣英,李强翔,王彩云,贺金莲,钟惠菊,等. 葛根素对糖尿病肾病大鼠纤维连接蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床,2007,23:18-21.
- [2] 柳家贤,陈金和. 葛根素对肠缺血再灌注大鼠肠粘膜细胞凋亡的影响[J]. 中药药理与临床,2009,25:50-52.
- [3] 谢瑞芹,都 军,郝玉明,崔 炜,刘 凡,祖秀光,等. 葛根素注射液对冠心病患者缺血再灌注心肌保护作用及机制[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23:895-897.
- [4] 吕欣然,高 尔,许兰芝. 葛根素对含 β -肾上腺受体的离体器官和整体动物的阻断作用[J]. 中国药理学报,1986,7:537-539.
- [5] Louhelainen M, Vahtola E, Kaheinen P, Leskinen H, Merasto S, Kytö V, et al. Effects of levosimendan on cardiac remodeling and cardiomyocyte apoptosis in hypertensive Dahl/Rapp rats [J]. Br J Pharmacol,2007,150:826-828.
- [6] Diwan A, Wansapura J, Syed F M, Matkovich S J, Lorenz J N, Dorn G W 2nd. Nix-mediated apoptosis links myocardial fibrosis, cardiac remodeling, and hypertrophy decompensation [J]. Circulation,2008,117:396-404.
- [7] 张 玲,王洪新,齐志敏,孙 媛. 葛根素对大鼠心肌肥厚的相关细胞因子的影响[J]. 中成药,2007,29:960-963.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem,1951,193:265-275.
- [9] 王洪新,陶 亮,饶曼人. 血管紧张素 II 对培养乳鼠心脏的非心肌细胞 DNA 及蛋白合成的影响[J]. 中国药理学通报,1996,12:417-420.
- [10] Gao M, Zhang W C, Liu Q S, Hu J J, Liu G T, Du G H. Pino-cembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio [J]. Eur J Pharmacol,2008,591(1-3):73-79.
- [11] Diez J, Fortuño M A, Ravassa S. Apoptosis in hypertensive cardiopathy [J]. Rev Esp Cardiol,1999,52(Suppl 3):18-24.
- [12] Hamet P, Moreau P, Dan T U. The time window of apoptosis a new component in the rapentic strategy for cardiovascular remodeling [J]. J Hypertens,1996,14:65-70.
- [13] 张 玲,王洪新,高俊宏,喻晓春. 葛根素对异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚心肌胶原及细胞内钙离子的影响[J]. 中成药,2008,30:1220-1222.
- [14] Zheng M, Han Q D, Xiao R P. Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance [J]. Acta Physiologica Sin,2004,56:1-15.
- [15] Krishnamurthy P, Subramanian V, Singh M, Singh K. Beta1 integrins modulate beta-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis and myocardial remodeling [J]. Hypertension,2007,49:767-768.
- [16] Mercer L D, Kelly B L, Horne M K, Beart P M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures [J]. Biochem Pharmacol,2005,69:339-345.

[本文编辑] 孙 岩