

# 川芎嗪对血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 诱导心肌细胞肥大的影响

杨爽<sup>1</sup>, 杨凯<sup>2</sup>, 陆莹<sup>3</sup>, 于波<sup>1</sup>

(哈尔滨医科大学附属第二医院 1 心内科, 3 急诊科, 2 哈尔滨理工大学医院, 黑龙江省哈尔滨市 150086)

[关键词] 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ ; 川芎嗪; 心肌细胞;  $\beta$ -肌球蛋白重链;  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入率

[摘要] 目的 研究川芎嗪对血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 诱导心肌细胞肥大的影响。方法 利用血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 刺激心肌细胞造成细胞肥大, 给予不同浓度的川芎嗪进行干预。检测心肌细胞大小、 $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入率和 $\beta$ -肌球蛋白重链 mRNA 的表达。结果 经血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 刺激后在相差显微镜下可见心肌细胞面积变大,  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入率和 $\beta$ -肌球蛋白重链 mRNA 水平增高。给予不同浓度的川芎嗪后, 上述指标随着川芎嗪浓度增加而逐渐下降。结论 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 能够诱导心肌细胞肥大; 川芎嗪能够部分抑制血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 所诱导的心肌细胞肥大。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

## Effects of Ligustrazine on Hypertrophy of Cardiomyocytes Induced by Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$

YANG Shuang YANG Kai LU Ying and YU Bo

(Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086 China)

[KEY WORDS] Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ ; Ligustrazine; Cardiomyocyte;  $\beta$ -myosin Heavy Chain;  $^3\text{H}$ -Leucine Incorporation

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of ligustrazine on hypertrophy of cardiomyocytes induced by angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ . **Methods** The cultured cardiomyocytes were treated with  $\text{Ang}(\text{I})$  to induce hypertrophy and given with ligustrazine of different densities. The cell size,  $^3\text{H}$ -Leucine incorporation and the mRNA levels of  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) were examined. **Results** Stimulated by  $\text{Ang}(\text{I})$ , the cardiomyocytes were enlarged under the contrast phase microscope. After stimulated by  $\text{Ang}(\text{I})$ ,  $^3\text{H}$ -Leucine incorporation and the mRNA levels of  $\beta$ -MHC increased in the hypertrophic cardiocytes. Given by ligustrazine, these data decreased accordingly as the ligustrazine densities increased.

**Conclusion**  $\text{Ang}(\text{I})$  may induce the cardiomyocytes hypertrophy. Ligustrazine P could partly inhibit the cardiomyocytes hypertrophy induced by  $\text{Ang}(\text{I})$ .

心肌肥大被认为是心血管病独立危险因素和预后信号。血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 是重要的刺激因子, 可直接致心肌细胞肥大<sup>[1, 2]</sup>。川芎是我国的传统中药, 川芎嗪被公认为是其活血祛瘀的有效成分, 化学结构为四甲基吡嗪(TMP)。临床上主要用于缺血性血管疾病如冠心病、脉管炎等的治疗, 川芎嗪可抑制内皮素、 $\text{Ang}(\text{I})$ 等介导的心肌肥大反应<sup>[3]</sup>, 但其药理作用机制目前尚不十分清楚。本研究利用培养的新生大鼠心肌细胞, 研究川芎嗪对 $\text{Ang}(\text{I})$ 诱导的心肌细胞肥大及相关基因表达的影响, 探讨川芎嗪作用的可能机制, 为其用在临床治疗与心肌肥大相关的疾病提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

TaKaRa TaqIM /RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司),  $\text{Ang}(\text{I})$ (Sigma公司), 盐酸川芎嗪(哈尔滨三联药业有限公司),  $^3\text{H}$ -亮氨酸(中国原子能科学研究院同位素研究所), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。

### 1.2 心肌细胞培养及分组

取出生 48 h 的 Wister 乳鼠, 剪碎心室肌, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 37℃ 反复消化。收集各次消化的上清移入含 20% 小牛血清的培养液中, 离心后制备细胞悬液( $1 \times 10^8/\text{L}$ ), 按不同实验要求接种于培养瓶或培养板中。96 h 后换无血清培养液, 继续培养 24 h 后随机分组加入不同的干预因素: 对照组、 $\text{Ang}(\text{I})$ 组( $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L Ang}(\text{I})$ )、川芎嗪高剂量组( $10^{-3} \text{ mol/L}$  川芎嗪)、川芎嗪中剂量组( $10^{-4} \text{ mol/L}$  川芎嗪)和川芎嗪低剂量组( $10^{-5} \text{ mol/L}$  川芎嗪)。

### 1.3 心肌细胞表面积测定

相差显微镜在 1600 倍下应用 Motic Images 1.3

[收稿日期] 2010-03-23 [修回日期] 2010-04-29

[基金项目] 黑龙江省青年基金(QC06C053)、哈尔滨医科大学附属第二医院青年启动基金(QN2007-07)和黑龙江省卫生厅课题(2006-141)

[作者简介] 杨爽, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事心血管内科临床工作和心肌病发病机制研究。通讯作者于波, E-mail为 ysy4yy@yahoo.com.cn。

软件测量心肌细胞的表面积,每孔随机选取 5 个视野,每个视野测 15~25 个细胞,取其平均值。

#### 1.4 心肌细胞<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入率测定

心肌细胞分别加入各种干预因素以及<sup>3</sup>H-亮氨酸(终浓度为  $1.85 \times 10^{11}$  Bq/L),24 h 后弃掉培养基,PBS 液漂洗,胰蛋白酶消化后收集细胞于玻璃纤维滤膜上,三氯乙酸固定。滤膜烘干后置于闪烁瓶中,加入闪烁液,用  $\beta$ -液体闪烁仪测定放射强度。

#### 1.5 逆转录聚合酶链反应检测 $\beta$ -肌球蛋白重链 mRNA 表达

用 Trizol 提取心肌组织总 RNA,紫外分光光度计测总 RNA 纯度和含量,按照 Takara RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。选取  $\beta$ -actin 为内参,扩增产物的 DNA 全长 764 bp,上游引物 5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3';下游引物 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG -3'; $\beta$ -肌球蛋白重链( $\beta$ -MHC)扩增产物的 DNA 全长 596 bp 上游引物 5'-ACC AAG CAG CCA CGC CAG TA-3',下游引物 5'-TGC TTT GCC TTT GCC CTT GT-3'。逆转录条件:42℃ 逆转录 30 min,99℃ 预变性 5 min,5℃ 退火 5 min。PCR 反应条件:94℃ 变性 5 min,94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 退火 45 s,共进行 30 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,经紫外透射分析拍摄电泳条带。结果以  $\beta$ -MHC/ $\beta$ -actin 密度比值表示。

#### 1.6 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 软件包进行方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 川芎嗪对心肌细胞面积的影响

AngⅡ组和川芎嗪各浓度组心肌细胞面积高于对照组( $P < 0.05$ ),川芎嗪各浓度组心肌细胞面积低于 AngⅡ组( $P < 0.05$ ),且心肌细胞面积随着川芎嗪浓度的增高而逐渐降低(表 1)。

表 1 川芎嗪对 AngⅡ刺激后心肌细胞面积的影响

| 分 组     | 细胞面积 ( $\text{mm}^2$ )          |
|---------|---------------------------------|
| 对照组     | 44.07 $\pm$ 2.77                |
| AngⅡ组   | 145.67 $\pm$ 6.85 <sup>a</sup>  |
| 川芎嗪低剂量组 | 138.56 $\pm$ 5.11 <sup>ab</sup> |
| 川芎嗪中剂量组 | 125.31 $\pm$ 4.49 <sup>ab</sup> |
| 川芎嗪高剂量组 | 115.81 $\pm$ 4.39 <sup>ab</sup> |

a 为  $P < 0.05$  与对照组比较; b 为  $P < 0.05$  与 AngⅡ组比较。

#### 2.2 川芎嗪对心肌细胞<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入量的影响

AngⅡ作用后心肌细胞<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入量较对照组明显增加( $P < 0.05$ ),川芎嗪各浓度组心肌细胞中<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入量明显低于 AngⅡ组( $P < 0.05$ ),<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入量随着川芎嗪浓度的增加逐渐减少(表 2)。

表 2 川芎嗪对 AngⅡ刺激后<sup>3</sup>H-亮氨酸掺入量的影响

| 分 组     | <sup>3</sup> H-亮氨酸掺入量 (cpm)       |
|---------|-----------------------------------|
| 对照组     | 1207.33 $\pm$ 13.02               |
| AngⅡ组   | 1960.33 $\pm$ 36.11 <sup>a</sup>  |
| 川芎嗪低剂量组 | 1948.83 $\pm$ 35.59 <sup>ab</sup> |
| 川芎嗪中剂量组 | 1892.17 $\pm$ 35.13 <sup>ab</sup> |
| 川芎嗪高剂量组 | 1853.33 $\pm$ 31.70 <sup>ab</sup> |

a 为  $P < 0.05$  与对照组比较; b 为  $P < 0.05$  与 AngⅡ组比较。

#### 2.3 川芎嗪对 $\beta$ -肌球蛋白重链 mRNA 表达的影响

AngⅡ刺激心肌细胞使  $\beta$ -MHC mRNA 表达较对照组明显增加( $P < 0.05$ ),川芎嗪低剂量组  $\beta$ -MHC mRNA 表达略低于 AngⅡ组( $P > 0.05$ ),川芎嗪高剂量组和川芎嗪中剂量组心肌细胞  $\beta$ -MHC mRNA 表达明显低于 AngⅡ组( $P < 0.05$ ), $\beta$ -MHC 表达随着川芎嗪浓度的增加逐渐减少,呈一定的量效趋势(表 3 和图 1)。

表 3 川芎嗪对心肌细胞  $\beta$ -MHC mRNA 表达的影响

| 分 组     | $\beta$ -MHC mRNA                 |
|---------|-----------------------------------|
| 对照组     | 0.1412 $\pm$ 0.0103               |
| AngⅡ组   | 0.2346 $\pm$ 0.0171 <sup>a</sup>  |
| 川芎嗪低剂量组 | 0.2268 $\pm$ 0.0154 <sup>a</sup>  |
| 川芎嗪中剂量组 | 0.1934 $\pm$ 0.0129 <sup>ab</sup> |
| 川芎嗪高剂量组 | 0.1749 $\pm$ 0.0093 <sup>ab</sup> |

a 为  $P < 0.05$  与对照组比较; b 为  $P < 0.05$  与 AngⅡ组比较。

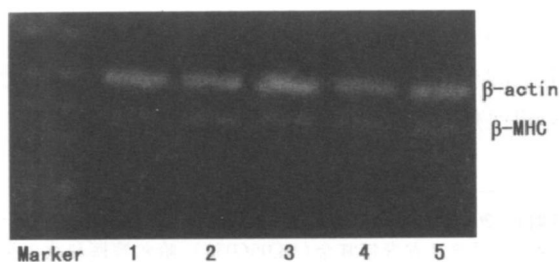


图 1  $\beta$ -MHC mRNA 表达的电泳图 1 为对照组,2 为肥大组,3 为川芎嗪低剂量组,4 为川芎嗪中剂量组,5 为川芎嗪高剂量组。

### 3 讨论

心肌受到多种刺激因素的影响后可以发生肥大性生长,进而导致心脏功能受到损害。临床上许多疾病如高血压、心肌梗死、心力衰竭等都与心肌肥大密切相关。初期的心肌肥大具有一定的代偿意义,但最终引起心力衰竭、心律失常、猝死等一系列严重后果,是一种引起心血管疾病发病率和死亡率明显升高的独立危险因素。改善心肌肥大的程度,抑制与心肌肥大有关的刺激,从而改善心脏功能,是目前治疗的重点方向。

川芎嗪是我国的传统中药川芎的有效单体,具有活血化瘀、抗血小板凝集、改善微循环及抗心肌缺血再灌注损伤的作用<sup>[4-5]</sup>,而且具有钙通道阻滞作用<sup>[6]</sup>。近年研究发现,川芎嗪能够抑制多种因素引起的心肌肥大,包括外源性前列腺素 F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ )、Ang $\text{II}$ 内皮素 1(ET-1)诱导的心肌肥大<sup>[7]</sup>,初步推测川芎嗪的作用部位可能不在致肥大因子本身,而是作用于其下游的某些环节,如抑制细胞内钙增加。研究表明,细胞内钙的增加是致心肌肥大的最基本信号<sup>[8]</sup>,Ca<sup>2+</sup>及其激活的下游信号通路在心肌肥大的发生发展中起重要作用<sup>[9]</sup>,Ang $\text{II}$ 能够引起心肌内 Ca<sup>2+</sup>的增加并出现明显的病理性肥大<sup>[10]</sup>。本研究中,川芎嗪明显抑制心肌细胞肥大,其机制与其具有钙拮抗剂作用有关。说明 Ang $\text{II}$ 致心肌细胞肥大反应过程中,以 Ca<sup>2+</sup>信号为中心的各种信号转导通路将信息传向细胞核,并进一步作用于各种反应元件,启动基因  $\beta$ -MHC 等的表达以及蛋白合成的增加,从而最终导致心肌肥大。

正常状态下肌球蛋白重链以  $\alpha$ -MHC 为主,具有收缩功能。当心肌细胞发生肥大时,心肌细胞收缩蛋白则转变为以  $\beta$ -MHC 为主,但收缩功能差, $\beta$ -MHC 的表达上调,可反映病理性心肌肥大的程度。实验中观察到 Ang $\text{II}$ 可明显增加  $\beta$ -MHC mRNA 的

表达,也证实了上述观点。既往研究表明心肌细胞肥大机制的关键在于寻找信号传导通路的调控机制<sup>[11]</sup>。本研究证实川芎嗪可抑制 Ang $\text{II}$ 诱导的心肌细胞  $\beta$ -MHC mRNA 的高表达,说明川芎嗪可能通过抑制其实现防止心肌细胞肥大的作用。通过  $\beta$ -MHC 将川芎嗪与心肌细胞肥大联系起来,为心肌细胞肥大的机制提供了一条新的思路,同时也为心肌肥大的治疗提供了新的方向。但川芎嗪除了抑制  $\beta$ -MHC 的作用外,是否还有其它的作用机制,尚有待于进一步实验证实。

### [参考文献]

- [1] V kstrum KL, Bohneyer T, Factor SM, et al Hypertrophy pathology and molecular markers of cardiac pathogenesis [ J]. *Circ Res* 1998 **82** (7): 773-778
- [2] Kagiya S, Eguchi S, Frank GD, et al Angiotensin  $\text{II}$ -induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense [ J]. *Circulation*, 2002 **106** (8): 909-912
- [3] 姜宏,施广飞,朱珠. 川芎嗪对心血管作用研究进展 [ J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007 **12** (5): 484-487.
- [4] Chen HP, He M, Huang QR, et al Delayed protection of tetraethylpyrazine on neonatal rat cardiomyocytes subjected to anoxia-reoxygenation injury [ J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007 **100** (6): 366-371
- [5] Gao S, Chen ZW, Zheng H, et al Ligustrazine attenuates acute myocardial injury after thermal trauma [ J]. *Burns* 2007 **33** (3): 321-327.
- [6] Hintz KK, Ren J Tetraethylpyrazine elicits disparate responses in cardiac contraction and intracellular Ca<sup>2+</sup> transients in isolated adult rat ventricular myocytes [ J]. *Vascul Pharmacol* 2003 **40** (4): 213-217.
- [7] 蒋青松,黄燮南,戴支凯,等. 川芎嗪对 PGF2 $\alpha$  诱导心肌肥大的抑制作用 [ J]. *中药药理与临床*, 2005 **21** (2): 9-11.
- [8] Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function [ J]. *Nat Med*, 2000 **6** (11): 1221-227.
- [9] Kudoh S, Akazawa H, Takano H, et al Stretch modulation of second messengers effects on cardiomyocyte ion transport [ J]. *Prog Biophys Mol Biol* 2003 **82** (1~3): 57-66.
- [10] 于林君,祝善俊,周裔忠,等. PTEN 抑制钙/钙调神经磷酸酶信号通路,负性调控血管紧张素  $\text{II}$  所致心肌细胞肥大 [ J]. *中华心血管病杂志*, 2006 **34** (6): 541-544.
- [11] V kstrum KL, Bohneyer T, Factor SM, et al Hypertrophy pathology and molecular markers of cardiac pathogenesis [ J]. *Circ Res* 1998 **82** (7): 773-778

(此文编辑 文玉珊)