

2007,45:319-327

- 9 Aboyans V, Lacroix P, Tran MH, *et al.* The prognosis of diabetic patients with high ankle-brachial index depends on the coexistence of occlusive peripheral artery disease[J]. *Vasc Surg*,2011,53(4):984-991
- 10 Resnick HE, Lindsay RS, McDermott MM, *et al.* Relationship of high and low ankle brachial index to all-cause mortality. The Strong Heart Study[J]. *Circulation*,2004,109:733-739
- 11 Suominen V, Uurto I, Saarinen J, *et al.* PAD as a risk factor for mortality among patients with elevated ABI—a clinical study[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*,2010,39(3):316-322
- 12 Allison MA, Cushman M, Solomon C, *et al.* Ethnicity and risk factors for change in the ankle-brachial index: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis[J]. *J Vasc Surg*,2009,50(5):1049-1056
- 13 Suzuki E, Yoshimura T, Omura Y, *et al.* Higher arterial stiffness, greater peripheral vascular resistance and lower blood flow in lower-leg arteries are associated with long-term hyperglycaemia in type 2 diabetic patients with normal ankle-brachial index[J]. *Diabetes Metab Res Rev*,2009,25(4):363-369
- 14 Shen L, Zhang YG, Liu M, *et al.* Increased arterial stiffness in sub-

jects with pre-diabetes among middle aged population[J]. *Biomed Environ Sci*,2013,26(9):717-725

- 15 Paik JK, Kim M, Kwak JH. Increased arterial stiffness in subjects with impaired fasting glucose[J]. *J Diabetes Complications*,2013,27(3):224-228
- 16 Doobay AV, Anand SS. Sensitivity and specificity of the ankle-brachial index to predict future cardiovascular outcomes: a systematic review[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2005,25(7):1463-1469
- 17 Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzer NR, *et al.* ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Associations for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease)—summary of recommendations[J]. *J Vasc Interv Radiol*,2006,17(9):1383-1397

(收稿日期:2014-03-29)

(修回日期:2014-04-30)

橙皮素对血管紧张素Ⅱ诱导 H9C2 心肌细胞肥大的影响

邓 伟 刘 源 魏 丽 陈昌贵 吴青青 唐其柱

摘 要 目的 探讨橙皮素对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导 H9C2 心肌细胞肥大的影响。方法 使用不同浓度橙皮素(0.125、0.25、0.5、1 μmol/L)和 AngⅡ(1 μmol/L)共同孵育 H9C2 心肌细胞 12h,心肌细胞骨架骨骼 α-肌动蛋白(α-actinin)荧光染色评估 H9C2 细胞面积改变以及 real-time PCR 方法检测心肌肥厚标志物 BNP、β-MHC 的 mRNA 表达变化,以观察不同浓度橙皮素对 AngⅡ诱导 H9C2 心肌细胞肥大的影响,选择 0.25 μmol/L 橙皮素和 AngⅡ(1 μmol/L)共同孵育 H9C2 心肌细胞 6、12、24h,观察橙皮素对 AngⅡ诱导 H9C2 心肌细胞肥大抑制作用的时间相关性。结果 橙皮素干预可以缓解 AngⅡ诱导 H9C2 心肌细胞的细胞面积增大;橙皮素抑制了 AngⅡ诱导的 H9C2 心肌细胞 BNP、β-MHC 的 mRNA 表达水平升高。结论 橙皮素能够抑制 AngⅡ诱导 H9C2 心肌细胞肥大,其有可能成为治疗心肌重构新的潜在药物。

关键词 橙皮素 血管紧张素Ⅱ H9C2 心肌细胞

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

Effect of Hesperetin on H9C2 Cardiomyocytes Hypertrophy Induced by AngⅡ. Deng Wei, Liu Yuan, Wei Li, *et al.* Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To investigate the effect of hesperetin on H9C2 cardiomyocytes hypertrophy induced by AngⅡ. **Methods** The embryonic rat heart-derived H9C2 cells were cocubated with different concentrations of hesperetin(0.125, 0.25, 0.5 and 1 μmol/

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300104);教育部博士点基金资助项目(20130141120042);湖北省自然科学基金资助项目(2013CFB303)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科(邓伟、刘源、陈昌贵、吴青青、唐其柱);430060 武汉大学心血管病研究所(邓伟、刘源、魏丽、陈昌贵、吴青青、唐其柱);430060 武汉大学人民医院儿科(魏丽)

通讯作者:唐其柱,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:qztang@whu.edu.cn

L) and Ang II ($1\mu\text{mol/L}$) for 12h. We characterized cells by immunocytochemistry for cardiac α -actinin to examine increasing cell surface area and real-time PCR was used to measure mRNA levels of hypertrophic markers BNP, and β -MHC to clear the effect of hesperetin on H9C2 cardiomyocytes hypertrophy. **Results** We found H9C2 cells treated with hesperetin could be protected from Ang II-induced hypertrophy. The increasing mRNA levels of BNP and β -MHC in Ang II-stimulated cells were also down-regulated by hesperetin treatment. **Conclusion** Hesperetin attenuates H9C2 cardiomyocytes hypertrophy which induced by AngII.

Key words Hesperetin; Angiotensin II; H9C2 cardiomyocytes

心肌重构是高血压病、心肌梗死、瓣膜病等多种心血管疾病发展为心力衰竭的共同病理、生理过程,其初始是心脏为了适应增加的血流动力学需求的一种代偿机制,以心肌细胞体积增大和细胞外基质增多为特征,主要表现为心室壁增厚和心肌收缩力增强。随着代偿作用的持续增加,心肌重构程度不断进展,心肌终不能满足机体需要而发生失代偿,导致左心室功能不全和心力衰竭^[1]。虽然现在对心肌重构和心力衰竭的治疗已取得很大进展,但仍有相当数量的患者疗效和预后不佳^[2]。因此,寻找更有效的治疗方法抑制甚至逆转心肌重构、防止心力衰竭发生尤为必要。

橙皮素(hesperetin, Hes)是一种天然黄酮类(flavonoids)化合物,其广泛存在于水果、花卉、食品等植物源物质中^[3]。以前的研究已证实其具有抗氧化、抗炎、抗衰老和降低血脂及抗肿瘤等多种生物学活性,以及能够缓解抗肿瘤化疗药物阿霉素对心脏的毒性作用^[4-6]。笔者最近的研究也证实橙皮素能够抑制机械压力负荷诱导的小鼠心肌重构^[7]。但是引起心肌重构的原因除了心脏所受机械负荷外,还有一系列神经内分泌因素的影响。H9C2 细胞来源于大鼠胚胎期心脏,能够良好模拟心肌细胞的生物学性状而且能够分裂,因此被广泛应用于心血管疾病的离体细胞实验。在本项研究中,笔者应用橙皮素干预血管紧张素 II(Ang II)刺激的 H9C2 心肌细胞,拟从离体水平进一步证实橙皮素对心肌重构的抑制作用。

对象与方法

1. 细胞来源与试剂: H9C2 细胞购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,橙皮素(HPLC > 98%)购买于上海融禾生物有限公司。DMEM 培养液、胎牛血清、胰酶、青霉素/链霉素双抗购于 Gibco 公司, α -actinin 抗体购买于 Millipore 公司, DMSO 购于 Sigma 公司,其余为国产分析纯。

2. 实验分组: 浓度相关观察实验分 6 组: 对照组(control 组), Ang II 组, Ang II + $0.125\mu\text{mol/L}$ 橙皮素组, Ang II + $0.25\mu\text{mol/L}$ 橙皮素组, Ang II + $0.5\mu\text{mol/L}$ 橙皮素组, Ang II + $1\mu\text{mol/L}$ 橙皮素组。时间相关观察实验分 7 组: 对照组, Ang II 6h 组, Ang II + $0.25\mu\text{mol/L}$ 橙皮素 6h 组, Ang II

12h 组, Ang II + $0.25\mu\text{mol/L}$ 橙皮素 12h 组, Ang II 24h 组, Ang II + $0.25\mu\text{mol/L}$ 橙皮素 24h 组。

3. 细胞表面积观察: 使用 α -actinin 免疫荧光染色观察单个 H9C2 细胞表面积。具体步骤如下: ①吸去细胞培养皿中的培养液, PBS 清洗细胞爬片, 于 37°C CO_2 培养箱中孵育 30min 左右; ②将 RCL2 固定液 1ml 滴于培养皿中, 室温固定 10min; ③吸去掉 RCL2 固定剂, PBS 漂洗 3 次, 每次 5min; ④将 0.2% Triton X-100(PBS 配制) 1ml 滴于培养皿中, 室温通透 5min; ⑤弃去 0.2% Triton X-100, PBS 漂洗 3 次, 每次 5min; ⑥用 8% 羊血清 1ml 滴于培养皿中, 室温密闭 60min; ⑦滴加一抗: 把 anti- α -actinin 100 μl 滴于培养皿中用封口膜盖好, 4°C 孵育隔夜; ⑧取出 4°C 孵育隔夜的细胞爬片, 去封口膜, 去掉一抗, PBS 漂洗 6 次, 每次 5min; ⑨滴加二抗: 把 100 μl Alexa Fluor 488 羊抗鼠 IgG 滴于培养皿后封口, 37°C 避光孵育 1h; ⑩去除掉封口膜, 弃去二抗, PBS 漂洗 3 次, 每次 5min; ⑪用工具将爬片取出, 蒸馏水漂洗, 最后用含 SlowFade Gold 抗淬灭剂的 DAPI 封片; ⑫正面放置在荧光显微镜下仔细观察, 拍照存档; ⑬测量细胞面积: 用数字定量成像系统测量每组单个细胞的面积。每组各测量 40 个细胞, 取细胞面积的平均值。

4. 实时定量 PCR: 使用实时定量 PCR 方法检测心肌细胞肥大标志物的 mRNA 表达情况。TRIzol (Invitrogen) 法提取细胞总 RNA, 并由分光光度计(smart spec plus spectrophotometer, Bio-Rad) A260/ A280 以及 A230/A260 比率评估 RNA 提取质量。每个样本抽取 2 μg RNA 使用 Roche 反转录试剂盒反转录为 cDNA, 并采用 SYBR Green 法(light cycler 480, Roche) 进行扩增后同自身 GAPDH 比较, 得出标准化数值。

5. 统计学方法: 采用 SPSS 14.0 统计学软件进行分析, 所有数据用均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$) 表示, 两组之间的比较用两独立样本 t 检验; 多组之间的比较用多因素方差分析以及 *post hoc* Tukey 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度橙皮素对血管紧张素 II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大的影响: 使用不同浓度橙皮素(0.125 、 0.25 、 0.5 和 $1\mu\text{mol/L}$) 和 Ang II ($1\mu\text{mol/L}$) 共同孵育 H9C2 心肌细胞 12h 后, 评估橙皮素对 Ang II 诱导的 H9C2 心肌细胞肥大的影响。运用免疫荧光技术将心肌骨架 α 肌动蛋白进行染色, 应用 Image-Pro Plus 6.0 分析计数显微镜 400 倍心肌细胞横截面积(cell surface area, CSA), 每组分析 40 个细胞面积后取平

均值。结果显示, Ang II 刺激后 H9C2 细胞面积明显增加 ($P < 0.01$), 而不同浓度组的橙皮素均能显著降低 Ang II 刺激引起的细胞面积的增加 ($P < 0.01$), 且在浓度为 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 时细胞肥大程度得到最大程度改善 (图 1)。

2. 不同浓度橙皮素对血管紧张素 II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大分子标志物的影响: 本实验运用 real-time PCR 方法检测不同浓度橙皮素对 Ang II 刺激 H9C2 心肌细胞肥厚标志物 BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达变化, 以进一步证实橙皮素对心肌细胞肥大的影响。结果显示, 干预 12h 后, 不同浓度组的橙皮素均能明显抑制 Ang II 诱导的 BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达增加 ($P < 0.01$), 特别在 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 时效果最佳。而随着剂量的增加, 其对 BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达程度增加的抑制趋势并未增强 (图 2)。

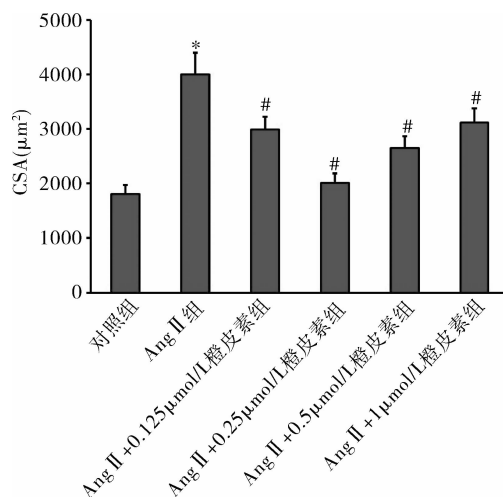


图 1 不同浓度橙皮素对血管紧张素 II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大的影响

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较, # $P < 0.01$

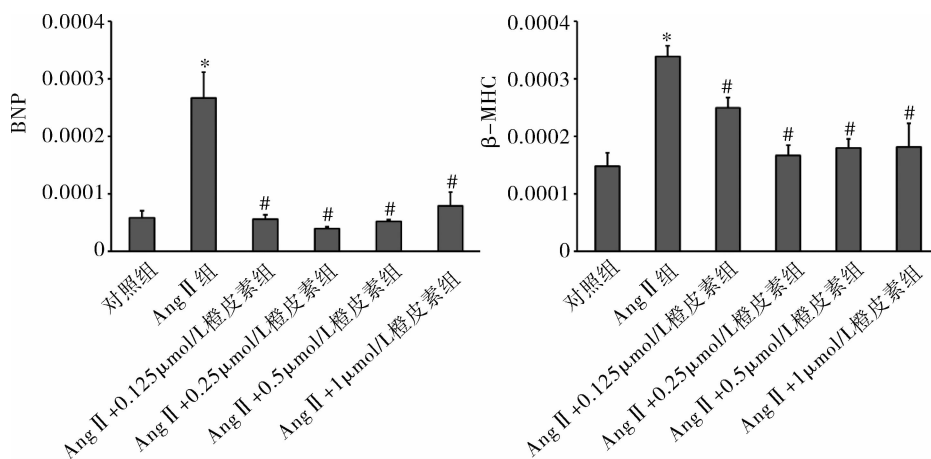


图 2 不同浓度橙皮素对血管紧张素 II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大分子标志物的影响

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较, # $P < 0.01$

3. 不同时间点橙皮素对血管紧张素 II 诱导 H9C2 心肌细胞肥大分子标志物的影响: 笔者选择 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 浓度橙皮素, 并运用 real-time PCR 方法检测不同干预时间橙皮素对 Ang II 刺激 H9C2 心肌细胞肥厚标志物 BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达变化影响, 以进一步证实橙皮素对心肌细胞肥大的抑制作用。结果显示, 在干预的第 6、12h, 橙皮素均能明显抑制 Ang II 诱导的 BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达增加 ($P < 0.01$)。而在 24h, 橙皮素对 BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达程度增加的抑制并不明显 ($P > 0.05$, 图 3)。

讨 论

在本项研究中, 笔者从细胞大小和心肌肥厚标志

物两方面首次证实橙皮素能够缓解血管紧张素 II 诱导的 H9C2 心肌细胞肥大以及抑制心肌肥厚分子标志物 BNP 和 β -MHC 的 mRNA 表达增加。

心肌重构是心脏在内外界刺激因素影响下, 产生的一系列形态学和功能学适应性变化, 随着刺激因素的持续和增强, 最终心脏功能失代偿而进展为心力衰竭。肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 激活是引起心肌重构和心力衰竭的最主要内源性因素之一。已经被证实持续输注血管紧张素 II 不仅能够升高动脉血压, 增加心脏后负荷和导致心肌重构, 而且能够直接作用于心肌细胞, 调控细胞收缩、代谢和肥厚性生长^[8]。在细胞水平, 因为心肌细胞是一种高度分化的细胞, 不能在数量上增殖, 只能是单个细胞

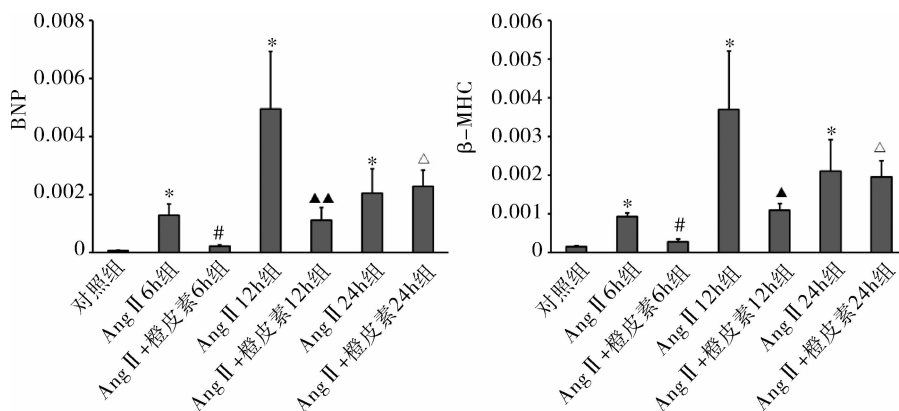


图3 不同时间点橙皮素对血管紧张素Ⅱ诱导H9C2心肌细胞肥大分子标志物的影响

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 Ang II 6h 组比较, # $P < 0.01$; 与 Ang II 12h 组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与 Ang II 24h 组比较, Δ $P > 0.05$

的体积增大。在分子水平,心肌重构时心肌细胞核内基因表达模式改变,BNP产生增多,胚胎型基因 β -MHC被激活,成熟基因表达下降以及心肌蛋白合成增加,单个细胞蛋白含量增高、心肌细胞肥大,收缩力减弱^[9]。

笔者在以前的研究中已经证实,橙皮素通过抑制PKC α / β Ⅱ-AKT/JNK和TGF- β 1-Smad信号通路缓解了胸主动脉结扎诱导的心肌肥厚、纤维化以及减少了心肌氧化应激和凋亡^[7]。在本项研究中,笔者进一步观察到橙皮素能够抑制血管紧张素Ⅱ诱导的H9C2心肌细胞肥大,其具体机制还有待于深入研究。本研究中所选4个浓度的橙皮素对H9C2细胞肥大的抑制作用并未呈现浓度依赖性,0.25 μ mol/L橙皮素抑制作用最强,而且时间上干预24h后橙皮素对细胞肥大的抑制作用减弱,这提示橙皮素对心肌重构的抑制效应存在最大有效浓度和有效时间,这些问题都需要继续探索。但已得到的数据明确显示,橙皮素既能够抵抗外源性,也能够抑制内源性促心肌重构因素,其有可能成为临床防治心力衰竭的潜在药物。

参考文献

- Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science [J]. Lancet, 2011, 378(9792):704-712

- Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association [J]. Circ Res, 2012, 111(1):131-150
- Yang HL, Chen SC, Senthil KKJ, et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(1):522-532
- Ye L, Chan FL, Chen S, et al. The citrus flavonone hesperetin inhibits growth of aromatase-expressing MCF-7 tumor in ovariectomized athymic mice [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(10):1230-1237
- Yoshida H, Takamura N, Shuto T, et al. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- α in mouse adipocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3):728-732
- Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, et al. Cardioprotective effects of hesperetin against doxorubicin-induced oxidative stress and DNA damage in rat [J]. Cardiovasc Toxicol, 2011, 11(3):215-225
- Deng W, Jiang D, Fang Y, et al. Hesperetin protects against cardiac remodelling induced by pressure overload in mice [J]. J Mol Histol, 2013, 44(5):575-585
- Yan L, Wei X, Tang QZ, et al. Cardiac-specific mindin overexpression attenuates cardiac hypertrophy via blocking AKT/GSK3 β and TGF- β 1-Smad signalling [J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(1):85-94
- Barry SP, Townsend PA. What causes a broken heart -- molecular insights into heart failure [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2010, 284:113-179

(收稿日期:2014-04-21)

(修回日期:2014-05-13)