益心解毒方对大鼠心肌细胞内活性氧水平及信号转导通路的影响

解　华　麻春杰　郭淑贞　刘　甲　王　伟

摘　要　目的　研究益心解毒方含药血清抑制血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的大鼠心肌细胞内活性氧(ROS)水平及信号转导通路相关分子的变化。**方法**　取对数生长期的大鼠 H9c2 心肌细胞,同步化后进行实验,实验分为正常组:无造模刺激,无干预;模型组:10^{-6}mol/L 的 AngⅡ刺激 24h,1% 正常大鼠血清干预;益心解毒方组:10^{-6}mol/L 的 AngⅡ刺激 24h,1% 益心解毒方含药血清干预;二亚苯基碘(DPI)对照组:10^{-6}mol/L 的 AngⅡ刺激,10μmol/L 的 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 干预 24h,采用乙酰乙酸双氯荧光素(DCFH－DA)法测定 H9c2 心肌细胞 ROS 水平; Western blot 法测定各组 H9c2 心肌细胞信号转导通路相关分子的变化。**结果**　研究发现 AngⅡ诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平显著提高,而益心解毒方含药血清对增高的 ROS 水平都有明显的抑制作用,与模型组相比,低剂量组作用最为显著($P<0.05$);在给予 AngⅡ培养 24h 后,低剂量组信号转导通路上的血管紧张素受体(AT1 受体)、信号转导子和转录激活子 3(STAT3)蛋白、基质金属蛋白酶(MMP9)蛋白表达水平低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论**　益心解毒方通过降低心肌 ROS 水平;抑制 AngⅡ引起的交感神经系统、肾素－血管紧张素系统(RAAS)过度激活、降低 AT1 受体的表达水平,抑制 STAT3 的作用而延缓心肌肥厚的过程,发挥其在心肌肥厚过程中的心肌保护作用;同时抑制 MMPs 的活性,减缓心肌重构。

关键词　心肌细胞　益心解毒方　ROS　信号转导通路

中图分类号　R9　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.009

Research on the Effects of Yixin Jiedu Formula on ROS Level and Signal Transduction Pathways in Myocardial Cells. *Xie Hua, Ma Chunjie, Guo Shuzhen, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*

Abstract　Objective　Rat myocardial cells had been used to research inhibiting effect of Yixin Jiedu formula medicated serum on reactive oxygen species (ROS) level and the change of signal transduction pathways related molecules in myocardial cells induced by Angiotensin Ⅱ (AngⅡ). **Methods**　Rat H9c2 cardiac muscle cells in logarithmic phase were detected after the synchronization. Experiment were divided into normal group: none modeling stimulation(no intervention), model group (10^{-6}mol/L AngⅡ stimulated 24h, cultured with 1% serum of normal rats), Yixin Jiedu Formula group(10^{-6}mol/L AngII stimulated 24h, cultured with 1% Yixin Jiedu Formula contained serum), Diphenylene iodide (DPI) in the control group(10^{-6}mol/L AngII stimulation, 10umol/L DPI intervention 24h). H9c2 cardiac muscle cells ROS level was detected by DCFH－DA method. Change of signal transduction pathways related molecules in myocardial cells were detected by Westernblot method. **Results**　We found that ROS level in myocardial cells induced by AngⅡ improved significantly, and Yixin Jiedu formula medicated serum had great inhibiting effect on the improved ROS level. Compared with model group, the lower dosage treatment group showed the most significant change ($P<0.05$). After 24h cultivation with AngII, the angiotensin receptor (AT1 receptor), signal transduction element and expression levels of activation about transcription 3 (STAT3) protein, matrix metalloproteinases (MMP9) protein at signal transduction pathway of low dose group was lower than the model group, with statistically significant difference ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion**　The experiment had been showed that Yixin Jiedu formula could reduce the ROS level to inhibit the excessive activation of the sympathetic nervous system and the renin－angiotensin system (RAAS) caused by AngⅡ, reduce the AT1 receptor expression level, and inhibit the role of STAT3, and finally delay the process of myocardial hypertrophy, playing its role in myocardial protection during the process of myocardial hypertrophy; at the same time, inhibit the activity of MMPs to reduce myocardial remodeling.

Key words　Myocardial cells; Yixin Jiedu formula; ROS; Signal transduction pathway

---

基金项目:国家科技部重大新药创制基金资助项目(2012ZX09103－201－011);国家自然科学基金资助项目(81102839);北京中医药大学自主选题(2014－JYBZZ－JS－002)

作者单位:100029　北京中医药大学(解华、郭淑贞、刘甲、王伟);010020　呼和浩特,内蒙古医科大学(麻春杰)

通讯作者:王伟,电子信箱:wangwei@bucm.edu.cn

活性氧(ROS)通过妨碍线粒体转运、干扰胞内钙调控等途径降低心肌收缩率,并且通过肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活,信号转导子和转录激活子3蛋白(STAT3)、基质金属蛋白酶蛋白(MMP9)表达上调等信号转导途径促进心肌细胞肥大、凋亡以及心肌纤维化,从而推动心力衰竭发生和发展的进程。本实验采用大鼠心肌细胞系H9c2细胞,经血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导后,通过对核心网络调控机制的研究,探讨益心解毒方治疗心力衰竭的作用机制。

材料与方法

1. 细胞株和实验动物:大鼠心肌细胞株H9c2,购于协和细胞资源中心。正常SD大鼠,体重220±10g,清洁级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证编号:SCXK(京)2012-0001。

2. 主要试剂和仪器:AngiotensinⅡ(美国Sigma公司,批号:A9525);DMEM高糖培养基(DMEM-H)(美国Gibco公司,批号101054);南美胎牛血清(FBS)(美国Hyclone公司,批号:NuF0352);二亚苯基碘(美国Sigma公司,批号:D2926);乙酰乙酸双氯荧光素(DCFH-DA)(美国SIGMA公司,批号:D6883);AT1、STAT3、MMP9、GAPDH抗体(英国Abcam公司,批号:ab9391、ab76315、ab38898、ab8245);激光共聚焦显微镜(日本Olympas公司,FV1000-IX81)。

3. 含药血清及空白血清的制备:将SD大鼠随机分为益心解毒方高、中、低剂量组,灌胃浓度分别为2倍临床等效剂量18.67g/(kg·d)、临床等效剂量2.20g/(kg·d)和1/2临床等效剂量1.10g/(kg·d);给药体积为10ml/kg大鼠体重,水溶经口灌胃给药,正常组大鼠灌等量生理盐水,连续灌胃7天,于末次给药30min后腹主动脉取血,室温静置4h后3000×g离心10min,收集血清,56℃灭活30min,同时将所收集的大鼠血清混合以减少动物的个体差异,0.22μm微孔滤膜过滤除菌,分装,-80℃保存备用。

4. H9c2心肌细胞的培养及分组:取对数生长期的H9c2心肌细胞,以1×10^5个/毫升的细胞密度接种于平皿中,用含10% FBS的DMEM-H培养基于37℃、5% CO_2培养箱中培养,待细胞长至85%~90%,选择生长状态良好的细胞,转入无血清的培养基中同步化24h后进行实验。正常组:无造模刺激,无干预;模型组:10^{-6}mol/L的AngⅡ刺激24h,1%正常大鼠血清干预;益心解毒方组:10^{-6}mol/L的AngⅡ刺激24h,1%益心解毒方含药血清干预;二亚苯基碘(DPI)对照组:10^{-6}mol/L的AngⅡ刺激,10μmol/L的NADPH氧化酶抑制剂DPI干预。

5. DCFH-DA法测定H9c2心肌细胞内ROS水平:将心肌细胞接种于直径15mm的激光共聚焦小皿中,加药处理24h后加入DCFH-DA 10μmol/L,37℃孵育30min,在激光共聚焦显微镜下随机选取5个不重复区域进行摄片,用Image J 1.48软件分析5个视野绿色荧光强度的平均值,再对每组的样本进行统计学分析。培养的H9c2心肌细胞内ROS的产生量由DCFH-DA被ROS氧化成DCF的程度决定。

6. Western blot法检测各组H9c2心肌细胞信号转导通路相关分子的变化:将H9c2心肌细胞接种于直径35mm平皿中培养,分组处理24h后,加入预冷的RIPA裂解液提取细胞总蛋白,用BCA方法进行蛋白定量。每个样品取相同总蛋白含量40μg,根据所要分离的蛋白质分子量AT1(41kDa)、STAT3(80kDa)、MMP9(92kDa)、和GAPDH(36kDa)选择12%分离胶和5%浓缩胶电泳分离,4℃条件下将凝胶上的蛋白电转至PVDF膜,电转后的PVDF膜在室温下封闭1~2h或4℃过夜,以降低背景。分别加入一抗,4℃轻摇孵育过夜,TBST洗膜3次/分钟,加入相应的二抗室温孵育2h,在TBST洗涤1h内用ECL发光法进行鉴定,在不同时间点用暗盒曝光,成像于医用X线胶片上,每组试验重复3次。将胶片扫描后分析目标条带的光密度值。

7. 统计学方法:数据采用SPSS 16.0软件包进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本均数间比较采用*One-way ANOVA*检验,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

结　　果

1. H9c2心肌细胞内ROS水平的测定结果:与模型组相比,益心解毒方含药血清各剂量组能明显抑制AngⅡ引起的细胞内ROS水平的升高,其中小剂量含药血清组抑制作用最为显著,差异有统计学意义($P<0.05$),详见表1、图1。

表1　益心解毒方含药血清对H9c2细胞内ROS水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	数量	细胞的平均光密度(像素平均值)
正常组	3	0.068±0.050
模型组	3	0.111±0.050
益心解毒方大剂量组	3	0.086±0.050
益心解毒方中剂量组	3	0.082±0.050
益心解毒方小剂量组	3	0.049±0.020*
DPI对照组	3	0.075±0.040

与模型组相比,*$P<0.05$

2. 各组H9c2心肌细胞信号转导通路相关分子的变化:通过检测各组AT1、STAT3、MMP9蛋白表达发现:益心解毒方高、中、低剂量组对AngⅡ引起的H9c2心肌细胞中AT1、STAT3、MMP9蛋白表达较模型组减少,对结果进行统计显示低剂量组AT1、MMP9蛋白表达水平低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$);高、中、低剂量组的STAT3蛋白表达水平低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$);DPI对照组AT1、STAT3、MMP9蛋白表达水平均低于模型组,差异有统计学意义($P<0.01$,$P<0.05$),详见表2,图2。

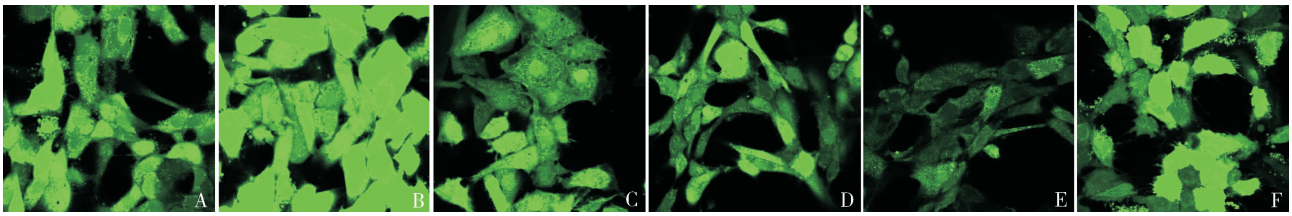

图 1　激光共聚焦显微镜下各组心肌细胞内 ROS 表达水平(DCFH－DA 法,×60)

A. 正常组;B. 模型组;C. 益心解毒方高剂量组;D. 益心解毒方中剂量组;E. 益心解毒方低剂量组;F. DPI 对照组

表 2　各组 H9c2 心肌细胞中 AT1、STAT3、MMP9 蛋白含量的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AT1	STAT3	MMP9
正常组	3	1.14 ±0.41	1.37 ±0.07	1.96 ±0.55
模型组	3	1.77 ±0.65	1.45 ±0.02	2.30 ±0.72
益心解毒方高剂量组	3	1.02 ±0.59	1.12 ±0.07 **	1.80 ±0.37
益心解毒方中剂量组	3	1.33 ±0.73	0.99 ±0.05 **	1.71 ±0.43
益心解毒方低剂量组	3	0.50 ±0.25 **	0.68 ±0.12 **	1.46 ±0.37 *
DPI 对照组	3	0.88 ±0.54 **	0.52 ±0.12 **	0.99 ±0.10 *

与模型组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

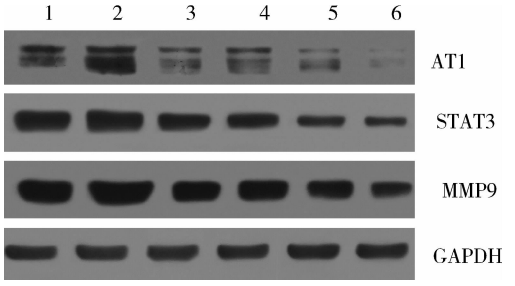

图 2　各组大鼠心肌组织中 AT1、STAT3、MMP9 的 Western blot 法检测结果

1. 正常组;2. 模型组;3. 益心解毒方高剂量组;4. 益心解毒方中剂量组;5. 益心解毒方低剂量组;6. DPI 对照组

讨　　论

由于心肌氧化应激的程度由 ROS 的产生和清除之间的平衡来协调和控制,而 ROS 生成增加在心力衰竭心脏氧化应激中占主导地位已经得到公认[1,2]。在心肌细胞中,ROS 主要来源于线粒体呼吸链,也是 ROS 作用靶点。现代研究表明,心力衰竭与神经内分泌系统的激活有关,尤其以 RAAS 系统激活为主,AngⅡ是调控心血管系统稳定性最重要的神经体液因子,而 AT1 是 AngⅡ受体之一,是发挥作用的关键靶分子,在心肌肥厚、纤维化时 AT1 受体表达增加,促进 ROS 生成,进而活化相应信号转导通路,引起心肌细胞生长、成纤维细胞增殖、细胞外蛋白表达、基质沉积等,与 STAT3 共同参与心肌细胞肥大、凋亡的过程[3,4]。STAT3 与心肌肥厚最密切相关[5]。MMPs 的正常表达是维持心肌胶原纤维及心脏结构的重要因素,其过度表达是导致心肌纤维化、心室重构的直接原因,在心室重塑中发挥主要作用[6]。

益心解毒方是采用临床治疗冠心病的常规用药加减后组方,包含黄芪、丹参、附子、玄参、银花、甘草等药物,具有温阳益气、活血解毒的功效,本课题组前期大量动物实验研究表明该复方能缓解心力衰竭大鼠心脏的扩张,改善心功能,减缓心室重构[7,8]。

笔者采用 AngⅡ造模,发现 AngⅡ诱导的 H9c2 心肌细胞中 ROS 水平显著提高,而益心解毒方含药血清高、中、低剂量可以明显抑制 ROS 水平的增高,其中益心解毒方低剂量组作用最为明显,提示益心解毒方可以恢复 ROS 的稳态。有研究表明,ROS 通过激活多种信号因子引起细胞凋亡,加重心肌损伤[9],而通过下调 ROS 的量可以减少细胞凋亡,减轻心肌再灌注损伤[10]。益心解毒方通过减少 ROS 表达水平升高,从而改善心肌细胞的肥大、凋亡以及心肌的纤维化,延缓心力衰竭的进程。

同时通过实验观察 AngⅡ刺激 24h 后的 H9c2 细胞的 AT1 受体、STAT3、MMP9 蛋白的表达均明显上调,而益心解毒方可以显著抑制这些指标的上调,对结果进行统计后显示,低剂量的益心解毒方含药血清可以下调 AT1、STAT3、MMP9 蛋白表达($P<0.01$,$P<0.05$),同时高、中剂量的益心解毒方含药血清可以明显下调 STAT3 蛋白表达($P<0.01$);DPI 对照组 AT1、STAT3、MMP9 蛋白表达均低于模型组($P<0.01$,$P<0.05$)。综合以上实验结果,笔者推论益心解毒方是通过抑制 AngⅡ引起的 RAAS 过度激活、降低 AT1 受体的表达水平,发挥其在心肌肥厚过程中的心肌保护作用;抑制 STAT3 蛋白的表达,作用于 JAK－STAT 通路来延缓心肌肥厚的过程;同时降低 MMPs 的活性,抑制心肌重塑而保护心肌细胞,降低心力衰竭的病死率。

参考文献

1　Parajuli N, Patel VB, Wang W, *et al*. Loss of NOX2 (gp91phox) pre-

vents oxidative stress and progression to advanced heart failure[J]. Clin Sci: Lond, 2014, 127(5): 331 – 340

2 Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure[J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(4): 359

3 Hingtgen SD, Tian X, Yang J, *et al*. Nox2 – containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensinⅡ – induced cardiomyocyte hypertroph[J]. Physiol Genomics, 2006, 26(3): 180 – 191

4 Cheng TH, Shih NL, Chen CH, *et al*. Role of mitogen – activated protein kinase pathway in reactive oxygen species – medi – ated endothelin – 1 – induced beta – myosin heavy chain gene expression and cardiomyocyte hypertrophy[J]. J Biomed Sci, 2005, 12(1): 123 – 133

5 严丽,李永胜,梁黔生,等. 丹参酮ⅡA 磺酸钠对大鼠肥厚心肌血管紧张素受体及 STAT3 的影响[J]. 中草药, 2010, 41(4): 588 – 592

6 曾武涛,陈伟燕,冷秀玉,等. AVE0991 改善大鼠心肌梗死后心室重塑和心功能[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 2: 89 – 94

7 李春,王勇,欧阳雨林,等. 益心解毒方对心力衰竭气虚血瘀证大鼠血流动力学影响的实验研究[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(5): 577 – 583

8 王勇,李春,啜文静,等. 血管紧张素Ⅱ – NADPH 氧化酶 – 活性氧通路在慢性心肌缺血血瘀证中作用的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2265 – 2268

9 Wang X, Cui L, Joseph J, *et al*. Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38MAPK – mediated increase in oxidant stress[J]. J Mol Cell Cardiol, 2012, 52(3): 753

10 Zhang L, Jiang H, Gao X, *et al*. Heat shock transcription factor – 1 inhibits H_2O_2 – induced apoptosis via down – regulation of reactive oxygen species in cardiac myocytes[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 347(1/2): 21

(收稿日期:2014 – 10 – 31)
(修回日期:2014 – 11 – 19)

新疆哈萨克族、汉族心房颤动血栓栓塞与 PS 基因多态性及可溶性 P – 选择素相关性研究

古丽米拉·米尔扎　刘志强　马尔加恩·巴克依　木胡牙提·乌拉斯汉

摘　要　目的　研究新疆维吾尔自治区哈萨克族、汉族心房颤动(以下简称房颤)合并血栓栓塞 P – 选择素(P – selectin, PS)基因在 2123C/G、Thr715Pro 位点多态性与可溶性 P – 选择素(souble P – selectin, sPs)血浆水平的相关性。**方法**　收集新疆维吾尔自治区哈萨克族 248 例(其中病例组 98 例,对照组 150 例)、汉族 340 例(其中病例组 121 例,对照组 219 例),采用聚合酶链反应 – 限制性片段长度多态性法(PCR – RFLP)进行 PS 基因 2123C/G、Thr715Pro 位点多态性直接 DNA 序列分析,ELISA 法测定血浆 sPs 水平。**结果**　哈萨克族、汉族人群 PS 基因 2123C/G 位点基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义($P = 0.064$, $P = 0.453$),汉族、哈萨克族房颤合并血栓栓塞患者 sPs 血浆水平与房颤患者差异有统计学意义($P = 0.000$)。汉族、哈萨克族人群未检测出 Thr715Pro 基因多态性。sPs 血浆水平与 2123C/G 基因多态性有明显相关性,GG 基因型的 sPs 水平显著高于 CG + CC 基因型($P < 0.05$)。**结论**　PS 基因多态性与血浆 sPs 水平或血栓栓塞事件相关,房颤患者并发血栓栓塞事件可能存在遗传易感性。

关键词　心房颤动　可溶性 P – 选择素　基因多态性

中图分类号　R394　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.010

Association of PS Gene Polymorphism with Soluble P – selectin Levels and Atrial Fibrillation Thromboembolism in Kazaks and Hans of Xinjiang.

Mierza Gulimila, Liu Zhiqiang, Bakeyi Maerjiang, et al. Cardiac Center, The First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830054, China

Abstract　Objective　To investigate the association of the 2123C/G and Thr715Pro polymorphisms of P selectin (PS) with plasma levels of soluble P – selectin in Han and Kazak patients with atrial fibrillation (AF) coupled with thrombosis in Xinjiang. **Methods**　Totally 248 age – and sex – matched Kazak subjects (150 control subjects and 98 AF patients) and 340 Han subjects (219 control subjects and 121 AF patients) were enrolled. Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR – RFLP) and direct DNA sequence analysis were used to investigate 2123C/G and Thr715Pro polymorphisms. ELISA method was used to determine plasma

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260036)
作者单位:830054　乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院心脏中心
通讯作者:木胡牙提·乌拉斯汉,电子信箱:muhuyati@163.com;刘志强,电子信箱:2556295331@qq.com