

熊果酸抑制 Ang II 诱导大鼠心肌细胞肥大实验研究

裴菱花 夏 勇

摘 要 **目的** 探讨熊果酸(ursolic acid, UA)对血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)诱导大鼠心肌细胞肥大的抑制作用及其可能机制。**方法** 按常规方法分离并培养新生大鼠心肌细胞。CCK-8 法确定 UA (2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$) 对心肌细胞的最佳作用浓度,利用 Ang II 诱导建立新生大鼠心肌细胞肥大模型。实验分对照组(control 组)、Ang II 组、UA 干预组、LY294002 ($\text{PI}_3\text{K/Akt}$ 通路抑制剂)干预组共 4 组。UA 和 LY294002 均预处理心肌细胞 30min。以心肌细胞表面积、 β -肌球蛋白重链(β -MHC)mRNA 和脑钠肽(BNP)mRNA 表达作为心肌细胞肥大标志,同时使用蛋白免疫印迹法检测 T-Akt (total Akt) 和 p-Akt (phospho-Akt) 蛋白表达。**结果** 显微镜下观察各组心肌细胞生长良好。与 control 组相比,Ang II 组和 UA 干预组大鼠心肌细胞表面积增加($P < 0.05$),LY294002 干预组心肌细胞表面积差异无统计学意义($P > 0.05$);与 Ang II 组相比,UA 干预组和 LY294002 干预组大鼠心肌细胞表面积减小($P < 0.05$)。与 control 组相比,Ang II 组的 p-Akt 蛋白、BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达显著增加($P < 0.05$);与 Ang II 组相比,UA 干预组和 LY294002 干预组的 p-Akt 蛋白、BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达均降低($P < 0.05$);UA 干预组和 LY294002 干预组之间 p-Akt 蛋白、BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达均差异无统计学意义($P > 0.05$);4 个实验组间 T-Akt 蛋白水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** (1) Ang II 诱导的新生大鼠心肌细胞肥大模型中,心肌细胞表面积增加,BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达升高,同时伴有 p-Akt 蛋白表达增加,提示 $\text{PI}_3\text{K/Akt}$ 通路在 Ang II 致心肌细胞肥大中起重要作用。(2) UA 能减轻 Ang II 诱导的大鼠心肌细胞肥大,使心肌细胞表面积减小,p-Akt 蛋白、BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达减少,这与 LY294002 作用一致,提示 UA 可能是通过抑制 $\text{PI}_3\text{K/Akt}$ 通路而发挥抗心肌肥大作用。

关键词 熊果酸 心肌细胞肥大 Ang II LY294002

中图分类号 R541.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.11.023

Study of the Inhibiting Effect of Ursolic Acid on Cardiocytes Hypertrophy in Rats Induced by Ang II. Pei Linghua, Xia Yong. Department of Internal Medicine - Cardiovascular, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu 221002, China

Abstract **Objective** To explore the inhibitory effect of ursolic acid on the hypertrophy of cardiac myocytes induced by angiotensin II (Ang II) in rats and its possible mechanism. **Methods** Neonatal rat cardiomyocytes were isolated and cultured by conventional method. The optimal concentration of UA (2, 4, 8, 16 $\mu\text{mol/L}$) on cardiomyocytes was determined using CCK-8 colorimetric method. Hypertrophy model of rat cardiomyocytes was set up by adding Ang II. The experiment was divided into four groups: control group, Ang II group, UA intervention group, LY294002 ($\text{PI}_3\text{K/Akt}$ inhibitor) intervention group. Cardiomyocytes were pretreated with UA or LY294002 for 30 minutes. Myocardial cell area and beta myosin heavy chain (β -MHC)mRNA as well as brain natriuretic peptide (BNP)mRNA were regarded as the marker of cardiomyocytes hypertrophy. Western blot was used to detect expression of T-Akt and p-Akt protein. **Results** The cells grew well under the phase contrast microscope. Compared with the control group, Ang II intervention group and UA group increased cell surface area ($P < 0.05$), then LY294002 intervention group had no significant difference in cell surface area ($P > 0.05$). Compared with Ang II group, UA group and LY294002 intervention group reduced surface area of myocardial cells ($P < 0.05$). Compared with the control group, Ang II significantly increased the expression of p-Akt protein as well as BNP mRNA and β -MHC mRNA ($P < 0.05$). Compared with the Ang II group, LY294002 group and UA group could significantly reduce them ($P < 0.05$). There was no significant difference in the level of above indexes between LY294002 group and UA group ($P > 0.05$). There was no significant difference in the level of T-Akt protein among the four experiment groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Ang II induced cardiomyocyte hypertrophy. UA significantly reduced the augmented myocardial cell surface area induced by Ang II and reduced the BNP mRNA and β -MHC mRNA level, as well as decreased p-Akt protein expression. It suggested that UA played the role of anti myocardial hypertrophy through inhibiting of the $\text{PI}_3\text{K-Akt}$ pathway.

Key words Ursolic acid; Cardiocyte hypertrophy; Ang II; LY294002

心肌肥厚是心脏对各种机械或神经体液刺激产生的代偿性反应,主要表现为心肌细胞表面积增大、直径增宽,心肌间质增殖以及心肌细胞外基质重建,心脏质量增加,伴或不伴心室腔增大,若刺激因素持续存在,最终导致心力衰竭、心律失常甚至猝死^[1,2]。心肌肥厚是独立的心血管危险因素,因此防止心肌肥厚发生及控制其发展能够有效保护心脏功能。大量证据表明心肌肥厚性生长涉及许多神经内分泌因子,如肾素-血管紧张素系统,同时心肌肥大病理过程中活性氧增多^[3]。心肌细胞肥大特征是一些内在分子表达改变,如心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、BNP、c-fos、c-myc 等基因表达增强,亦有肌质网 ATP 酶的 RNA 转录水平下降、 α -肌球蛋白向 β -肌球蛋白转变等^[4]。已有动物模型实验证实了一些介导心肌肥厚的分子机制,如磷脂酰-肌醇-3 激酶(Pi3K)及其介导的信号转导途径、JAK/STAT 途径等。

UA 在自然界分布广泛,存在于多种食物和传统药用植物中^[5,6]。既往的研究发现,它具有多种病理生理功能,如有免疫调节、抗病毒、抗癌、抗 HIV、镇静、抗菌、抗炎、肝损伤等多种药理作用,另外还有许多文献报道 UA 能抑制异常细胞增生、诱导凋亡,且对正常细胞如鼠胚胎细胞系和肝细胞有极轻微的毒性^[7-14]。也有研究证实 UA 能够抑制血管动脉粥样硬化、通过抗氧化、抗凋亡作用从而减轻心肌缺血再灌注损伤^[15]。但是至今尚无研究涉及 UA 对心肌细胞肥大的影响。因此本课题以 Ang II 诱导心肌细胞肥大模型,分别给予 UA 及 Pi3K 抑制剂干预,观察 UA 对肥大心肌细胞的影响及探讨其可能作用机制。

材料与方法

1. 材料:试验动物:出生后 1~3 天清洁级 SD 大鼠,由徐州医学院实验动物中心提供,主要试剂及仪器:熊果酸(北京索莱宝公司),高糖 DMEM(上海拜力公司),新生小牛血清(杭州四季青公司)、胰蛋白酶(上海拜力公司)及胶原酶(Gibco 公司),Ang II(上海阿拉丁公司)、5-溴脱氧尿苷(5-BrdU)、CCK8 试剂盒(上海 Biosharp 公司)、磷脂酰肌醇 3 激酶(Pi3K)抑制剂 LY294002(Sigma 公司)、总 RNA 提取试剂 Trizol, Akt 兔抗鼠一抗(北京博奥森公司)、山羊抗兔二抗(中杉金桥公司),p-Akt 兔抗鼠一抗(北京博奥森公司),山羊抗兔二抗(中杉金桥公司),台式低温高速离心机(Sigma 公司),RT-PCR 试剂盒(上海捷瑞公司)、RT-PCR 引物由上海捷瑞公司合

成、倒置相差显微镜(Olympus 公司)。

2. 方法

(1)新生大鼠心肌细胞培养:无菌取出新生大鼠心脏后,剪碎成约 1mm³,0.25% 胰酶及 0.08% 胶原酶反复消化,吸取上清,1000r/min 离心 5min,重悬后接种入培养皿,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,差速贴壁 40min,分离出未贴壁的心肌细胞,再向未贴壁心肌细胞中加入 0.1mol/L Brdu 以抑制非心肌细胞的增殖,然后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 天。

(2)通过 CCK-8 法检测心肌细胞活性确定 UA 最佳作用浓度:分离出心肌细胞后,在 96 孔板中接种细胞悬液,每孔 100 μ l,培养 48h 后每孔加入 10 μ l UA,UA 设置 2、4、8、16 μ mol/L 4 个药物浓度,每一浓度设置 4 个复孔,设置调零孔(DMSO、CCK8),处理 24、72h 后每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,培养箱内继续孵育 4h,用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度值。

(3)实验分组:①对照组(control 组);②Ang II 组(1 μ mol/L);③UA 干预组:UA(8 μ mol/L) + Ang II(1 μ mol/L)组;④LY294002 干预组:LY294002(10 μ mol/L) + Ang II(1 μ mol/L)组。分离出心肌细胞并贴壁 48h 后,换无血清培养液同步化 24h,UA 干预组和 LY294002 干预组分别先加入 UA 和 LY294002,UA 终浓度为 8 μ mol/L,LY294002 终浓度为 10 μ mol/L,继续培养 30min 后,Ang II 组、UA 干预组和 LY294002 干预组分别加入 Ang II,使 Ang II 终浓度为 1 μ mol/L。继续放置 37℃、5% CO₂ 培养箱中。

(4)观察指标:倒置相差显微镜下观察细胞形态,细胞处理完毕后,应用 Image-Pro Plus6.0 分析显微镜 400 倍下心肌细胞表面积,每组分析 50 个细胞面积后取平均值。

(5)反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 β -MHC mRNA、BNP mRNA 表达:用 Trizol 等试剂提取心肌细胞总 RNA,经浓度测定后反转录合成 cDNA。按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作, β -MHC 基因引物序列上游:5'-GCTTGAGGGAGGACTTCTGG-3',下游:5'-ATGCTGGCACCCTGGACTA-3',扩增产物长度 102bp;BNP 基因引物序列:上游:5'-TGATTCTGCTCCTGCTTT TCC-3',下游:5'-TTCTTTTGTAGGGCCTTGGTC-3',扩增产物长度 179bp, β -actin 基因引物序列:上游:5'-CAC-

CCGCGAGTACAACCTTC - 3', 下游: 5' - CCCATAC-CCACCATCACACC - 3'。以 β -actin 为内参照, 结果以 β -MHC/ β -actin、BNP/ β -actin 比值表示。每个样本抽取 2 μ l RNA 使用反转录试剂盒反转录为 cDNA, 并采用 SYBR Green 法进行扩增后同自身 β -actin 比较, 得出标准化数值。

(6) 细胞总蛋白提取和 Western blot 法检测: 细胞经干预后, 加入胰酶在 37℃ 培养箱内消化细胞, 并用细胞刮收集, 4℃、3000r/min 离心 15min 用 100 μ l 蛋白裂解液 RIPA 和 10 μ l 苯甲基酰氟 PMSF 冰上裂解 30min, 12000r/min、4℃ 离心 15min 获得总蛋白, 检测蛋白浓度。配好聚丙烯酰胺凝胶后, 每孔加入 20 μ l 蛋白溶液上电泳, 350mA 恒流 45min 转膜。5% 脱脂奶粉封闭 37℃ 3h。TBS - T (Tris - Base 2.42g, NaCl 8g, Tween 20 1ml, pH 7.6) 洗膜 5min, 共 5 次; 1:1000 Akt、p - Akt、 β -actin 兔抗鼠多克隆抗体 4℃ 过夜; TBS - T 洗膜 5min, 共 5 次; 辣根过氧化物酶标记的 1:5000 山羊抗兔二抗 37℃ 孵育 1h, TBS - T 液洗膜 5min, 共 5 次。ECL 发光试剂盒显色、显影。

3. 统计学方法: 使用 GraphPad Prism 5.0 软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 多组的组内比较采用 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CCK8 法检测 UA 对细胞活性影响: CCK8 分析结果显示 UA 浓度达到 16 μ mol/L 且作用时间达 24h 并未显著抑制心肌细胞生长。只有 16 μ mol/L 浓度的 UA 作用于心肌细胞 72h 后显著抑制心肌细胞生长 ($P < 0.05$), 故在实验中选用最大的 8 μ mol/L 浓度的 UA 作用于心肌细胞 (图 1)。

2. 各实验组心肌细胞表面积: 与 control 组相比, Ang II 组和 UA 干预组大鼠心肌细胞表面积增加 ($P < 0.05$), LY294002 干预组心肌细胞表面积差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Ang II 组相比, UA 干预组和 LY294002 干预组心肌细胞表面积减小 ($P < 0.05$) (图 2、图 3)。

3. 不同药物干预对心肌细胞 β -MHC mRNA、BNP mRNA 表达的影响: 与 control 组相比, Ang II 组的 BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$)。与 Ang II 组相比, UA 干预组和 LY294002 干预组的 BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.05$)。UA 干预组和 LY294002 干预组的

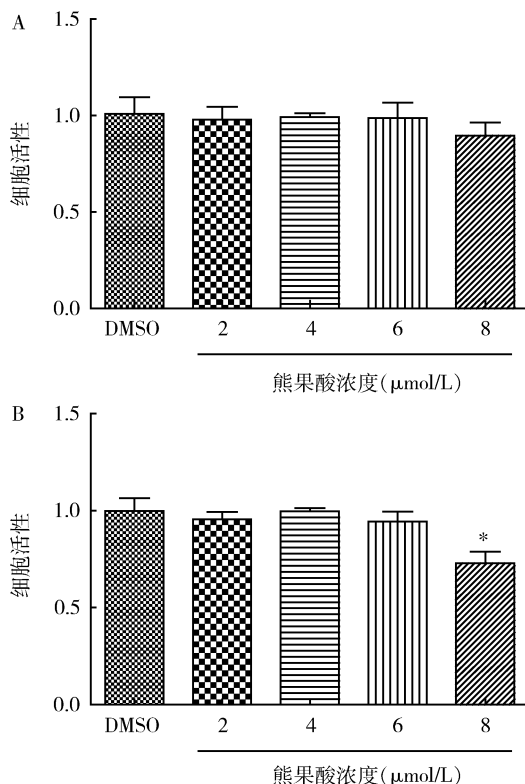


图 1 检测 UA 对心肌细胞活性影响

A. 24h; B. 72h; 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$

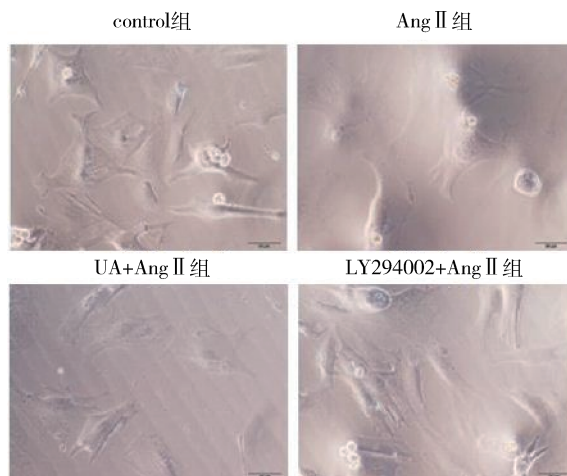


图 2 各组培养心肌细胞的典型图像 ($\times 400$ 倍)

BNP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4)。

4. 不同药物干预对相关信号分子蛋白表达的影响: 与 control 组相比, Ang II 组 p - Akt 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$), T - Akt 蛋白差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 Ang II 组相比, UA 干预组和 LY294002 干预组 p - Akt 蛋白的表达明显减少 ($P < 0.05$), T - Akt 蛋白表达差异无统计学意义

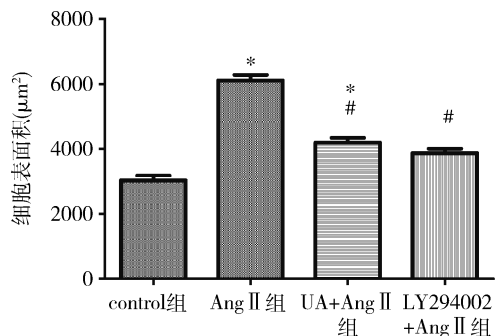


图 3 各实验组心肌细胞表面积

与 control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较, # $P < 0.05$

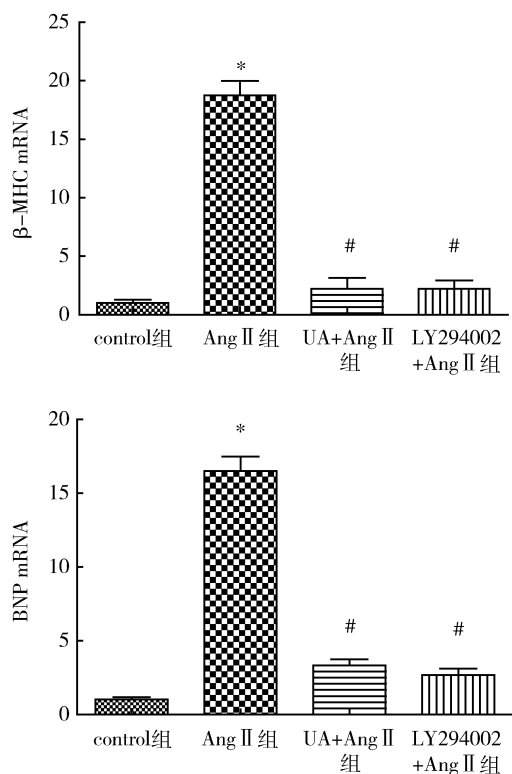


图 4 各实验组 β-MHCmRNA 和 BNPmRNA 检测结果

与 control 组比较, * $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较, # $P < 0.05$

($P > 0.05$)。UA 干预组和 LY294002 干预组之间的 p-Akt 和 T-Akt 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 5)。

讨 论

病理性心肌肥厚是高血压病、瓣膜病、急性心肌梗死及心肌病等多种心血管疾病共有的病理生理机制,它是长期负荷后心肌的失代偿改变^[16]。Ang II 刺激 NADPH(还原型辅酶 II)活化,继之活性氧如过氧化氢、超氧负离子产生增加,更多研究发现,Ang II 能导致许多下游事件,如 MAPK 家族事件,PI₃K-Akt、

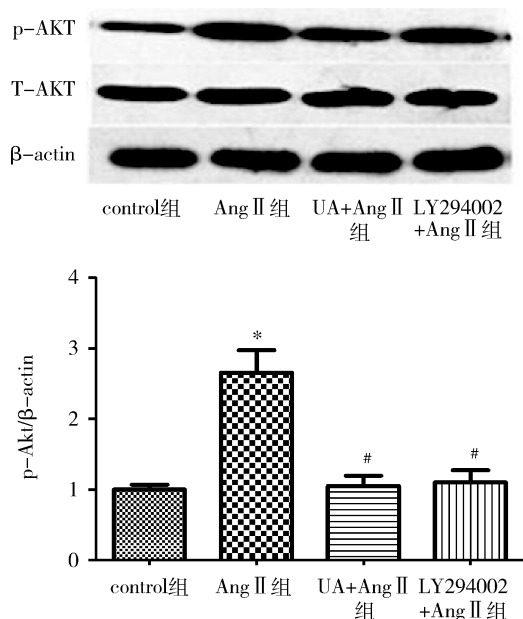


图 5 各实验组 p-Akt 蛋白的检测结果

与 control 组比较, * $P = 0.000$; 与 Ang II 组比较, # $P = 0.000$

JAK-STATs、AMP 蛋白激活酶, DNA 结合转录因子包括 NF-κB、AP-1^[1]。Ang II 通过激活 PI₃K 及下游靶蛋白,如 mTOR/P70, 也通过 MEK/ERK 通路促进心肌细胞有丝分裂^[15]。许多研究证实 Ang II 是通过刺激 PI₃K/Akt 通路从而诱导心肌肥大的,磷酸化 PI₃K 能调节多种细胞通路下游分子的表达,如 ANP、BNP、β-MHC 和 Akt 等^[17];而 Akt 蛋白在参与心肌肥大的 PI₃K 通路中发挥了重要作用。

PI₃K/Akt 信号转导通路在机体内发挥重要的生理作用,它参与细胞的生存、增殖、代谢和分化、迁移等多个生理过程。有研究表明多种药物通过 PI₃K/Akt 通路来影响细胞增殖和凋亡的^[18]。目前认为 PI₃K/Akt 信号转导通路是介导心肌细胞肥大发生的重要通路,在病理性心肌肥大过程中 PI₃Kγ 上调, PI₃Kγ 异构体激活下游 Akt^[19]。

UA 是一种自然的五环三萜化合物,并存在于多种植物和水果中,文献报道 UA 具有多种营养和药理学作用,多篇文献报道 UA 通过 PI₃K/Akt/mTOR 通路促进癌症细胞凋亡、抑制肝纤维化、增加葡萄糖糖利用^[20]。本实验中应用 Ang II 诱导心肌细胞肥大,设置对照组、Ang II 组、UA 干预组,测定心肌细胞表面积及 BNP mRNA、β-MHC mRNA 表达以及 p-Akt、T-Akt 蛋白表达,实验中另设置阳性对照组,即 PI₃K/Akt 通路抑制剂 LY294002 干预组,与 UA 干预组和 Ang II 组相比较,进而探讨 UA 抑制心肌细胞肥

大的作用机制。Ang II 诱导的心肌细胞肥大模型中可以观察到细胞表面积增大、p - Akt 蛋白及 β - MHC mRNA、BNP mRNA 表达增加,而 UA 能有效缓解 Ang II 引起的变化,表明 UA 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大具有明显的保护作用。而 UA 干预组与 PI₃K 抑制剂干预组相比,两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$),并检测 T - Akt、p - Akt 蛋白表达量,表明 UA 保护心肌细胞肥大与抑制 PI₃K/Akt 通路有关。

综上所述,笔者认为熊果酸具有防治心肌细胞肥大作用,对其特征性生化指标和 β - MHC、BNP 的改变亦具有明显的调控作用,且可能是通过抑制 PI₃K/Akt 信号转导通路而发挥作用的。UA 作用具有多效性,探讨其是否能抑制心肌细胞肥大及其影响机制具有重要意义,可为临床治疗心肌肥厚提供一种新理论。

参考文献

- Gang C, Qiang C, Xiangli C, *et al.* Puerarin suppresses angiotensin II - induced cardiac Hypertrophy by inhibiting NADPH oxidase activation and oxidative stress - triggered AP - 1 signaling pathways[J]. J Pharm Pharmaceut Sci, 2015, 18(2): 235 - 248
- Jiang H, Zhang L, Liu M, *et al.* Extracellular high - mobility group box 1 mediates pressure overload - induced cardiac hypertrophy and heart failure[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(3): 459 - 470
- Keckés M, Jacobs G, Kerselaers S, *et al.* The Ca²⁺ - activated cation channel TRPM4 is a negative regulator of angiotensin II - induced cardiac hypertrophy[J]. Basic Res Cardiol, 2015, 110(4): 1 - 14
- 陆莹,肖刚,任鹏,等. SK - 7041 对血管紧张素 II 致大鼠心肌细胞肥大的干预作用[J]. 中国老年学杂志, 2015, (7): 1951 - 1952
- Bang HS, Seo DY, Y M, *et al.* Corrigendum to: ursolic acid - induced elevation of serum Irisin augments muscle strength during resistance training in men[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(6): 531 - 532
- Chen J, Wong HS, Ko KM. Mitochondrial reactive oxygen species production mediates ursolic acid - induced mitochondrial uncoupling and glutathione redox cycling, with protection against oxidant injury in H9c2 cells[J]. Food Funct, 2015, 6(2): 549 - 557
- Wang RQ, Tu PF, Hattori M, *et al.* The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives[J]. Eur J Med Chem, 2005, 40(6): 582 - 589
- BaiKK, Chen FL, Yu Z, *et al.* Synthesis of [3 β - acetoxy - urs - 12 - en - 28 - oyl] - 1 - monoglyceride and investigation on its anti tumor effects against BGC - 823[J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19(13): 4043 - 4050
- Shao JW, Dai YC, Xue JP, *et al.* In vitro and in vivo anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives[J]. Eu J Med Chem, 2011, 46(7): 2652 - 2661
- Chadalapaka G, Jutooru I, Mcalees A, *et al.* Structure - dependent inhibition of bladder and pancreatic cancer cell growth by 2 - substituted glycyrrhetic and ursolic acid derivatives[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(8): 2633 - 2639
- Zhu YM, Shen JK, Wang HK, *et al.* Synthesis and anti - HIV activity of oleanolic acid derivatives[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2001, 11(24): 3115 - 3118
- Miyazawa M, Okuno YK. Suppression of the SOS - inducing activity of mutagenic heterocyclic amine, Trp - P - 1, by triterpenoid from *Uncaria sinensis* in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 Umu test[J]. J Agr Food Chem, 2005, 53(6): 2312 - 2315
- Ouyang C, Zhou ZW, Zhang XH, *et al.* A bioinformatic and mechanistic study elicits the antifibrotic effect of ursolic acid through the attenuation of oxidative stress with the involvement of ERK, PI3K/Akt, and p38 MAPK signaling pathways in human hepatic stellate cells and rat liver[J]. Drug Design Dev The, 2015, 9(4): 25 - 46
- Deng L, Zhang R, Tang F, *et al.* Ursolic acid induces U937 cells differentiation by PI3K/Akt pathway activation[J]. Chinese J of Nat Med, 2014, 12(1): 15 - 19
- Meng DU, Huang K, Gao L, *et al.* Nardosinone Protects H9c2 Cardiac Cells from Angiotensin II - induced Hypertrophy[J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2013, 33(6): 822 - 826
- Zhang L, Yu P, Tong R, *et al.* Extracellular high - mobility group box 1 mediates pressure overload - induced cardiac hypertrophy and heart failure[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(3): 459 - 470
- Alvin Z, Zhao A, Laurence Q, *et al.* Regulation of IK by captopril and ANG II via PI3K pathway in hypertrophied cardiac myocytes[J]. FASEB J, 2010, 24(6): 214 - 216
- Yan M, Lin ZM, Nan G, *et al.* Ursolic acid induces apoptosis of prostate cancer cells via the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Am J Chinese Med, 2015, 43(7): 1 - 16
- Lijun L, Xiaochen Z, Pierre SV, *et al.* Association of PI3K - Akt signaling pathway with digitalis - induced hypertrophy of cardiac myocytes[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(5): C1489 - C1497
- HE Y, Li W, Li Y, *et al.* Ursolic acid increases glucose uptake through the PI3K signaling pathway in adipocytes [J]. PLoS One, 2014, 9(10): 13 - 16

(收稿日期:2016 - 04 - 13)

(修回日期:2016 - 04 - 22)

欢迎订阅

欢迎赐稿