

一氧乙酰旋覆花内酯对血管紧张素 II 诱导的肥大心肌细胞的保护性作用

酉鹏华 何晓敏 林 静 陈海潮 崔倩卫

摘 要 **目的** 探讨 ABL 在心肌细胞肥大中的作用及其机制。**方法** 体外培养 H9C2 心肌细胞,血管紧张素 II (Ang II) 构建心肌细胞肥大模型;模型组给予 $1\mu\text{mol/L}$ Ang II 刺激 24h、ABL 处理组给予 Ang II 刺激,同时给予 $5\mu\text{mol/L}$ 和 $10\mu\text{mol/L}$ ABL 处理 24h。采用心肌细胞肌动蛋白 α -actinin 染色评价心肌细胞大小,采用 RT-PCR 检测肥厚相关基因心房利钠肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP)、肌球蛋白重链 β (β -MHC) 的表达;蛋白印迹 (Western blot) 法检测信号通路蛋白的表达。**结果** 与模型组比较, $5\mu\text{mol/L}$ 和 $10\mu\text{mol/L}$ ABL 处理组心肌细胞面积明显降低 ($P < 0.05$); ANP、BNP、 β -MHC 肥厚相关基因表达降低 ($P < 0.05$), 且其抗心肌细胞肥大呈现剂量依赖性 ($P < 0.05$)。Western blot 法检测结果显示 ABL 处理组 AMPKa 磷酸化水平增高 ($P < 0.05$), 而 Akt、mTOR、GSK3 β 的磷酸化明显抑制 ($P < 0.05$); AMPKa 拮抗剂 Compound C 可阻断 ABL 的心肌保护作用。**结论** ABL 可通过激活 AMPKa 信号通路,调节 Akt/mTOR/GSK3 β 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大发挥保护性作用。

关键词 一氧乙酰旋覆花内酯 心肌细胞 血管紧张素 II AMPKa Akt

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.04.033

Protective Effect of 1-O-acetylbritannilactone in Angiotensin II Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. You Penghua, He Xiaomin, Lin Jing, et al. Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Shaanxi 710068, China

Abstract **Objective** To explore the role of ABL in cardiomyocytes hypertrophy. **Methods** H9C2 myocardial cells were stimulated with Angiotensin II (Ang II). The cell surface area was measured by α -actinin staining. The mRNA expression of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and myosin heavy chain beta (β -MHC) was measured by RT-PCR. The protein expression of AMPKa signaling proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with model group, cell surface area in $5\mu\text{mol/L}$ and $10\mu\text{mol/L}$ ABL treatment group was decreased significantly. The expression of ANP, BNP, β -MHC was decreased in a dose dependent manner. The phosphorylation of AMPKa expression was decreased in model group. After treatment with ABL, the levels of phosphorylation of AMPKa was up-regulated, and phosphorylation of Akt, mTOR, GSK3 β was significantly decreased. AMPKa inhibitor compound C abolished the protective effect of ABL. **Conclusion** ABL can protect cardiomyocytes against Ang II induced cardiomyocytes hypertrophy by regulating AMPKa/Akt/mTOR/GSK3 β signal pathway.

Key words 1-O-acetylbritannilactone; Cardiomyocytes; Ang II; AMPKa; Akt

心肌肥厚是各种心血管疾病发展成为心力衰竭的共同病理过程。心肌肥厚主要表现为心肌细胞体积增大,蛋白质合成增多,胚胎基因的激活等^[1]。研究证实左心室肥厚与心力衰竭患者病死率呈明显相关性^[2]。在受到机械牵张刺激(容量负荷过重,压力负荷增加),或体液因子刺激(血管紧张素、儿茶酚胺、醛固酮、内皮素等)下,心肌细胞膜上相关受体激活,刺激细胞内信号转导分子的活化,通过一系列信号通路网络促进细胞核内肥厚相关基因的转录。多

种信号分子参与其中,包括磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI₃K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、Ca²⁺/钙调蛋白磷酸酶信号通路和 AMP 依赖的蛋白激酶通路等^[3]。尽管近年来对心肌肥厚的发生、发展机制的认识逐渐深入,然而心肌肥厚发展成为心力衰竭的病患数逐年增加,如何更有效的抑制心肌肥厚的发展至关重要。

一氧乙酰旋覆花内酯 (ABL) 是提取自欧亚旋覆花的一种倍半萜类化合物。现代研究表明,ABL 具有抗肿瘤、抗炎、护肝、抗粥样硬化等多种生物学活性^[4-6]。ABL 可通过多条信号通路发挥其生物活性作用。ABL 可通过抑制蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路抑制黑色素活性^[5]。ABL 可抑制

作者单位:710068 西安,陕西省人民医院心血管内科(酉鹏华、林静、陈海潮、崔倩卫);西安理工大学医院(何晓敏)

通讯作者:崔倩卫,电子信箱:qwcui0502@163.com

NF- κ B 活性抑制新生内膜形成从而降低血管成形术后再次狭窄的风险^[7]。Zhao 等^[8]发现, ABL 可以促进血管内皮生长因子诱导的 Akt 等的磷酸化而促进人内皮细胞的增殖、迁移和血管生成。但是, 目前 ABL 在心肌细胞肥大中的作用尚无报道。本研究通过建立离体心肌细胞肥大模型, 探讨 ABL 对心肌细胞肥大的抑制作用及其潜在机制, 为心肌肥厚和心力衰竭的防治提供新靶点。

材料与方法

1. 材料: 一氧乙酰旋覆花内酯(纯度为 98%, 中国辰光生物公司), 一抗: 磷酸化(P-)和总的(T-) AMPK α 抗体, Akt 抗体, mTOR 抗体, GSK3 β 抗体, (美国 CST 公司); GAPDH 抗体(美国 Santa Cruz 公司); Ang II (美国 Sigma 公司); AMPK α 拮抗剂 compound C 美国 Sigma 公司)。

2. H9C2 心肌细胞培养: H9c2 心肌细胞株购自中国科学院细胞库, 用低糖培养基 (DMEM) 孵育, 培养基中添加 10% 的胎牛血清 (FBS)、青霉素 (100U/ml) 和链霉素 (100U/ml), 置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中生长。

3. 细胞分组与处理: 为探讨 ABL 对心肌细胞肥大的影响, 将培养的 H9C2 心肌细胞随机分为 6 组: ①对照组: 加与模型组相同体积的 PBS; ②模型组: Ang II (1 μ mol/L) 刺激心肌细胞 24h; ③5 μ mol/L ABL 的处理组: 心肌细胞同时给予 Ang II (1 μ mol/L) 和 5 μ mol/L ABL 孵育 24h; ④10 μ mol/L ABL 的处理组: 心肌细胞同时给予 Ang II (1 μ mol/L) 和 10 μ mol/L ABL 孵育 24h; ⑤AMPK α 抑制剂处理组: 心肌细胞同时给予 Ang II (1 μ mol/L) 和 CompoundC (10 μ mol/L) 孵育 24h; ⑥AMPK α 抑制剂 + ABL 处理组: 心肌细胞同时给予 Ang II (1 μ mol/L), CompoundC (10 μ mol/L) 和 ABL (10 μ mol/L) 孵育 24h。

4. α -actinin 免疫荧光染色: 细胞爬片处理后用 4% 多聚甲醛进行固定, 0.2% TritonX 通透后用 8% 羊血清封闭 1h, α -actinin 一抗孵育 4℃ 过夜, 二抗孵育 1h 后用 DAPI 染细胞核后封片, 显微镜下观察。

5. RT-PCR 检测 mRNA 表达量: trizol (美国 Invitrogen 公司, 15596-026) 提取细胞的总 RNA, 反转录试剂盒 (瑞士 Roche 公司, 04896866001) 将每组 2mg 的总 RNA 反转录为 cDNA。利用 LightCycler 480 SYBR Green 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。每个样品设 3 个复管。并用将其结果与 GAPDH 基因的表达进行对比。

6. 蛋白免疫印迹: 收集处理结束后的细胞, 将各组细胞用裂解缓冲液裂解后, 离心后取上清, 采用 BCA 法测量蛋白浓度。将组织裂解产物使用 10% SDS-PAGE 胶进行分离, 然后转移到 PVDF 膜上, 再使用 5% 脱脂牛奶封闭 2h。4℃ 孵育一抗过夜。37℃ 孵育二抗 1h, 使用双色红外成像系统进行扫膜分析。采用 Quantity One 软件计算分析各蛋白条带和对应的内参蛋白 (GAPDH) 条带的灰度。

7. 统计学方法: 使用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用单因素方差分析检测各组间的显著性差异。两组间比较使用两独立样本的 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ABL 处理对心肌细胞面积的影响: 与对照组相比, Ang II 处理 24h 后心肌细胞面积显著增大, 而 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L ABL 处理后均能减少 Ang II 引起的心肌细胞面积增大 ($P < 0.05$), 见图 1。

2. ABL 处理对心肌细胞肥厚相关基因表达的影响: 采用 RT-PCR 检测心肌细胞肥厚相关基因的转录水平, 发现 Ang II 处理后的心肌细胞肥厚标志物 ANP、BNP、 β -MHC 的转录均明显增加 ($P < 0.05$), 而给予 ABL 预处理后, Ang II 诱导的肥厚基因的转录被明显抑制, 且该作用呈明显的浓度依赖性 ($P < 0.05$), 见图 2。

3. ABL 处理对 AMPK α 信号通路的影响: 由于 ABL 可通过影响 Akt 信号通路发挥多种生物学效应, 而 Akt 信号通路在心肌肥厚中扮演着重要的角色^[9,10]。因此笔者检测了心肌细胞中 Akt 及其上游 AMPK α , 下游 mTOR、GSK3 β 的磷酸化水平, 以探讨 ABL 保护 H9C2 心肌细胞肥大的潜在机制。模型组 AMPK α 的磷酸化水平明显下调 ($P < 0.05$), Akt、mTOR 和 GSK3 β 的磷酸化水平明显增加 ($P < 0.05$); 给予 ABL 预处理后 AMPK α 的磷酸化水平均上调 ($P < 0.05$), Akt、mTOR 和 GSK3 β 的磷酸化水平明显降低 ($P < 0.05$)。ABL 可能通过调控 AMPK α /Akt/mTOR/GSK3 β 信号通路来改善 Ang II 诱导的心肌细胞肥大反应, 见图 3。

4. AMPK α 抑制剂阻断 ABL 对心肌细胞肥大的保护作用: 为进一步确认 AMPK α 在 ABL 保护心肌细胞肥大中的重要作用, 笔者采用 AMPK α 抑制剂 compoundC 处理心肌细胞, compoundC 处理组心肌细胞面积明显大于 Ang II 刺激组, 且 compoundC + ABL 组

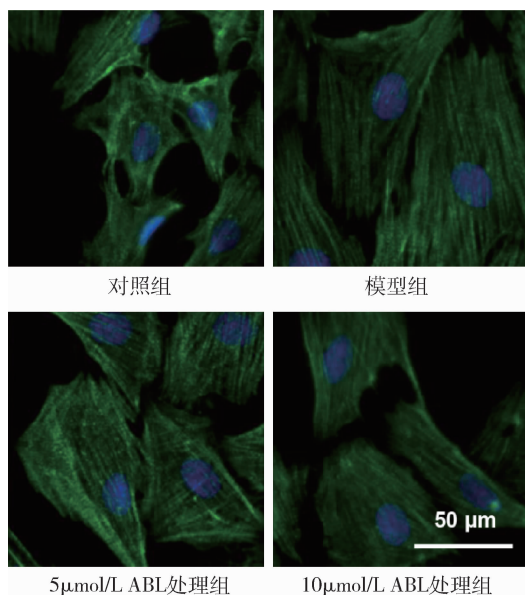


图1 ABL处理对心肌细胞面积的影响

绿色: α -actinin; 蓝色: 细胞核; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

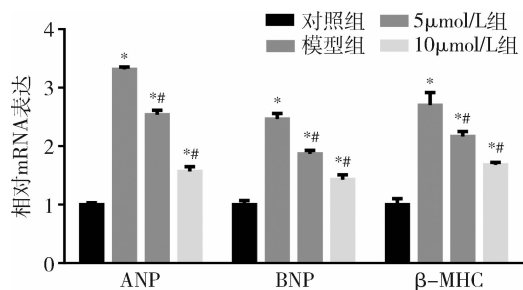
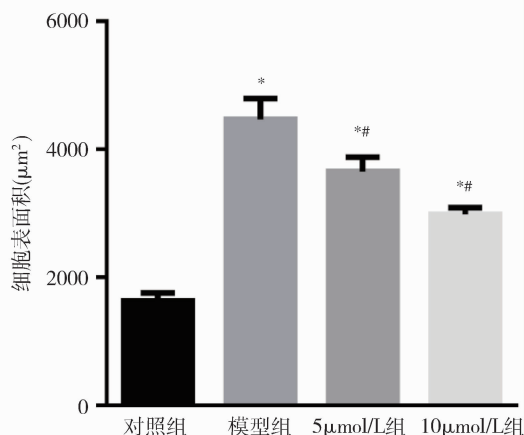


图2 ABL对肥厚基因表达的影响

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

心肌细胞面积未见减小,提示 compoundC 消除了 ABL 的心肌细胞保护作用,见图4。

5. AMPK α 抑制剂阻断 ABL 对心肌细胞肥厚相关基因表达的抑制:采用 RT-PCR 检测心肌细胞肥厚相关基因的转录水平,发现 compoundC 处理组心肌细胞肥厚基因的转录明显高于模型组,且 compoundC + ABL 组心肌细胞肥厚基因的转录未见降低,提示 compoundC 消除了 ABL 对心肌细胞的保护作用,见图5。

讨 论

本研究探讨 ABL 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大的作用。本研究结果发现 ABL 能够减轻 Ang II 诱导的心肌细胞肥大和胚胎基因的激活。ABL 通过激活 AMPK α ,抑制 Akt、mTOR 信号通路发挥抗心肌细胞肥大的药理作用。而 AMPK α 抑制剂可拮抗 ABL 的抗心肌细胞肥大作用,表明 AMPK α 是 ABL 的主要作用

靶点。

腺苷一磷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 是丝氨酸苏氨酸激酶,其作为代谢传感器,协调心脏的合成代谢和分解代谢过程^[11]。AMPK 的激活是由于细胞内 ATP 和 AMP 在细胞质中的量变引起的。AMPK 激活导致抑制能量消耗过程而激活能量的产生^[12]。因此,AMPK 激活能够恢复能量平衡,AMPK 介导的生理效应有助于心肌细胞的健康维持和存活。AMPK 不仅仅能够调节心脏能量代谢,AMPK 在多种细胞代谢中也起着关键作用例如,AMPK 调节翻译后的乙酰化,细胞自噬,线粒体自噬,内质网应激和心肌细胞凋亡。此外,AMPK 还参与心肌肥厚的发展^[13]。研究表明,AMPK α 抑制剂二甲双胍和 AICAR 能够抑制心肌细胞中蛋白质合成和心肌细胞的肥厚性生长^[14]。长期抑制 AMPK α 的活性加重缺血后心脏功能障碍和异常的凋亡。小鼠 AMPK α 基因缺失加重主动脉缩窄诱导的心肌肥厚和心功能障碍。均表明 AMPK α 在调节心肌肥厚中的重要作用^[15]。而以往的研究表明 ABL 可通过多条信号通路发挥其生物活性作用。ABL 可通过抑制 AKT 信号通路^[8]和 NF- κ B^[16]信号通路。本研究揭示 ABL 在心肌细胞中可激活 AMPK α 信号通路,抑制肥厚反应,保护心肌细胞。

Akt 信号参与调节新陈代谢、葡萄糖摄取、增殖和蛋白质合成和细胞生存,其在调节心肌细胞的大小、存活、血管生成和生理性和病理性心肌肥厚的反

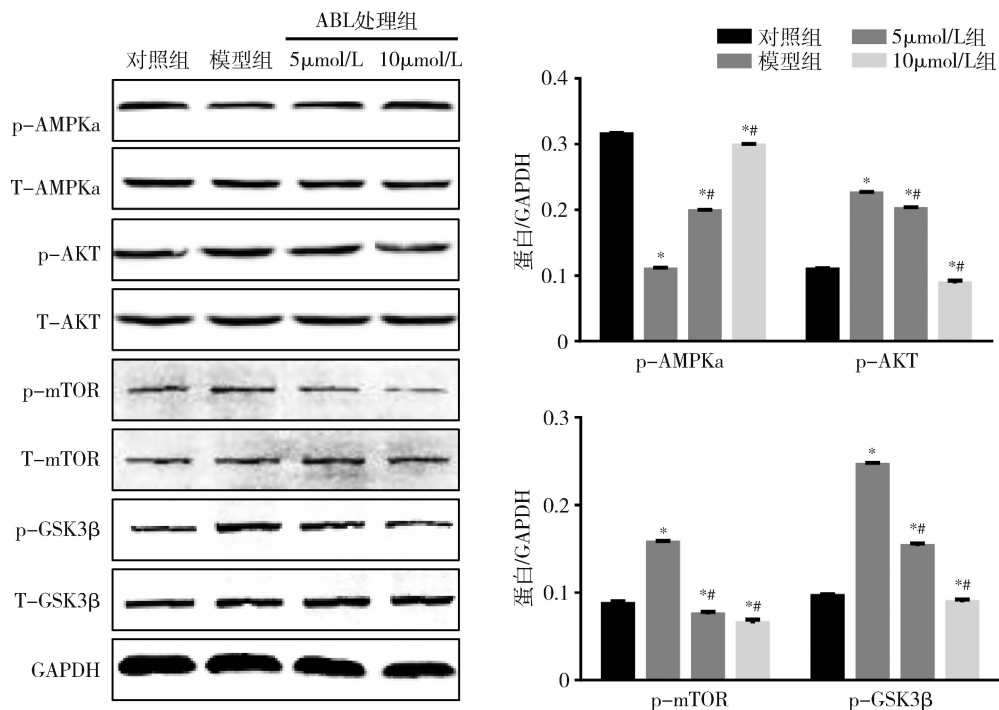


图 3 ABL 处理对 AMPKα 信号通路的影响
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

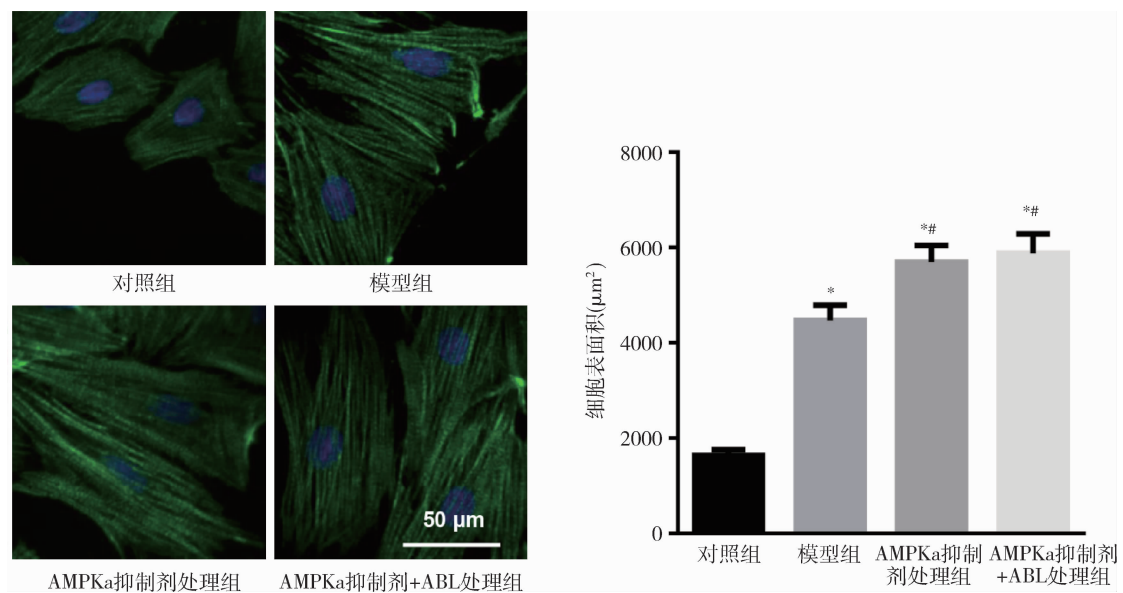


图 4 AMPK 抑制剂阻断 ABL 对心肌细胞肥大的抑制作用
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

应中发挥重要作用^[17]。心肌细胞 Akt 的长期或结构性激活导致心肌肥厚, 心功能恶化; 适度活化的 Akt 则可以保护心脏缺血再灌注损伤。Akt 促进心肌肥大的下游靶点包括 GSK - 3β、mTOR、FOXO。mTOR 通过 P70S6K 激酶诱导蛋白翻译加速, 增加细胞生长, mTOR 抑制剂雷帕霉素可以减轻压力负荷诱导

的心肌肥厚反应。GSK3β 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶。在未受刺激的细胞中, GSK3β 功能活跃, 当细胞受到外界刺激时, Akt 磷酸化 GSK3β N - 末端的第 9 位丝氨酸, 使其磷酸化降解。GSK3β 参与负性调节心肌肥厚, 心肌特异性过表达 GSK3β 能够减低压力负荷引起的肥大反应。以往的研究提示 ABL 能够抑

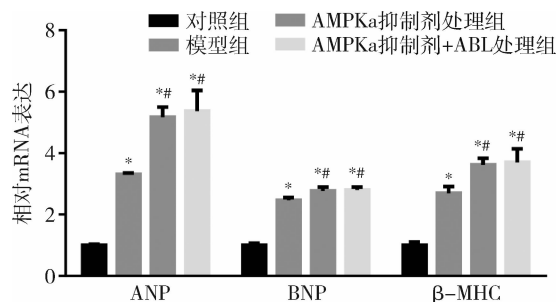


图5 AMPKa抑制剂阻断ABL对心肥厚

相关基因表达的抑制作用

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

制Akt信号通路^[9]。笔者的研究与之相应,ABL在心肌细胞中通过抑制持续激活的Akt以及其下游的mTOR、GSK3 β 的磷酸化抑制心肌细胞的肥大反应。

总之,本研究首次揭示ABL可通过激活AMPKa,抑制Akt信号通路发挥抗心肌细胞肥大的作用,其可能作为治疗心肌肥厚和心力衰竭的新药物,进一步的研究需要探讨ABL在动物体内是否能够发挥抗心肌肥厚的效用。

参考文献

- 1 Tuomainen T. The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 17: 30178 – 30177
- 2 Zhou L, Han X. The role of autophagy in angiotensin II – induced pathological cardiac hypertrophy[J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 57(4): R143 – R152
- 3 Liu R. Regulation of cardiac hypertrophy and remodeling through the dual – specificity MAPK phosphatases (DUSPs)[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 101: 44 – 49
- 4 Wang F, Li H, Qiao JO. 1Oacetylbrannilactone combined with gemcitabine elicits growth inhibition and apoptosis in A549 human nonsmall cell lung cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5568 – 5572
- 5 Choo SJ, Ryoo IJ, Kim KC, *et al.* Hypo – pigmenting effect of sesquiterpenes from *Inula britannica* in B16 melanoma cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(5): 567 – 574
- 6 Dong M, Hong T, Liu S, *et al.* Hepatoprotective effect of the flavonoid fraction isolated from the flower of *Inula britannica* against D –

Galactosamine – induced hepatic injury[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(6): 1919 – 1923

- 7 Wang BZ. The combination use of 1 – O – acetylbrannilactone (ABL) and gemcitabine inhibits cell growth and induces cell apoptosis in lung adenocarcinoma cells[J]. *Pharmazie*, 2016, 71(4): 213 – 217
- 8 Zhao J, Niu H, Li A, *et al.* Acetylbrannilactone modulates Vascular endothelial growth factor signaling and regulates angiogenesis in endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148968
- 9 Sun N, Wang H, Wang L. Protective effects of ghrelin against oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammation in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the HMGB1 and TLR4/NF – kappaB pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2764 – 2770
- 10 Diaz A, Humeres C, Gonzalez V, *et al.* Insulin/NFkappaB protects against ischemia – induced necrotic cardiomyocyte death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(2): 451 – 457
- 11 Li T, Yang Z, Ma Z, *et al.* Targeting the energy guardian AMPK: another avenue for treating cardiomyopathy? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(8): 1413 – 1429
- 12 Daskalopoulos EP, Beauoye C, Bertrand L, *et al.* AMPK in cardiovascular diseases[J]. *EXS*, 2016, 107: 179 – 201
- 13 Kundu BK, Sen S, Davogusto G, *et al.* Remodeling of glucose metabolism precedes pressure overload – induced left ventricular hypertrophy: review of a hypothesis[J]. *Cardiology*, 2015, 130(4): 211 – 220
- 14 Ma ZG, Yuan Y, Zhang X, *et al.* Piperine attenuates pathological cardiac fibrosis via PPAR – γ /AKT pathways [J]. *EBioMedicine*, 2017, 18: 179 – 187
- 15 Ma ZG, Dai J, Zhang WB, *et al.* Protection against cardiac hypertrophy by geniposide involves the GLP – 1 receptor / AMPK α signalling pathway[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(9): 1502 – 1516
- 16 Liu B, Han M, Wen JK. Acetylbrannilactone Inhibits Neointimal Hyperplasia after Balloon Injury of Rat Artery by Suppressing Nuclear Factor – κ B Activation[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324(1): 292 – 298
- 17 Wang KC, Zhang S, McMillen IC, *et al.* Akt signaling as a mediator of cardiac adaptation to low birth weight. [J]. *J Endocrinol*, 2017, 233(2): R81 – R94 (收稿日期:2017 – 07 – 26)
(修回日期:2017 – 09 – 12)

(接第142页)

- 6 冯晓冰. 剖宫产后盆腔粘连患者血清粘连相关指标与血流变指标的变化研究[J]. *中国医药科学*, 2016, 6(22): 80 – 82
- 7 Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, *et al.* Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688 – 694
- 8 孙王伟, 韩玉刚, 孟令国. 富氢水预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护研究[J]. *泰山医学院学报*, 2014, 35(10): 984 – 988
- 9 Tan YC, Xie F, Zhang HL, *et al.* Hydrogen – rich saline attenuates postoperative liver failure after major hepatectomy in rats[J]. *Clin*

Res Hepatol Gastroenterol, 2014, 38(3): 337 – 345

- 10 刘镇, 姬瑞娟, 孙爱军, 等. 饱和氢气减轻大鼠盲肠擦伤致术后粘连[J]. *解剖学杂志*, 2012, 35(5): 649 – 652
- 11 张聪聪, 巩霞, 王滨, 等. 吸入氢气对脓毒症大鼠心肌损伤的影响[J]. *中国医学创新*, 2015, 12(32): 15 – 18
- 12 张泉三, 巩霞, 王滨, 等. 吸入氢气对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *中国当代医药*, 2015, 22(27): 7 – 9, 21
- 13 石海梅, 周华成, 刘金锋, 等. 吸入氢气对休克复苏大鼠急性肺损伤的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(5): 490 – 493
(收稿日期:2017 – 07 – 05)
(修回日期:2017 – 08 – 18)