

雷公藤甲素对大鼠心肌H9c2细胞肥大的抑制作用^Δ

童洋飞*,郭奉洁,潘夕春,陈波,陈晓红,张海港*(第三军医大学药理学教研室,重庆 400038)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0878-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.05

摘要 目的:研究雷公藤甲素对大鼠心肌H9c2细胞肥大的抑制作用。方法:以0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μg/L雷公藤甲素作用细胞24 h,采用MTT法检测细胞活力以筛选最适质量浓度。采用血管紧张素Ⅱ(1.0 μmol/L)培养细胞24 h以复制细胞肥大模型。实验分为正常对照(常规培养液)组、模型(常规培养液)组与雷公藤甲素①、②、③、④(0.3、1.0、3.0、10.0 μg/L)组,复制模型的同时给予相应药物培养24 h。染色后荧光镜下观察细胞,以Image J软件检测细胞面积;二辛可酸(BCA)法检测细胞蛋白质量浓度;采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测β-肌球蛋白重链(β-MHC)、心房利钠肽(ANP)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1a(CDKN1a) mRNA的表达水平。结果:0.1~10 μg/L雷公藤甲素对H9c2细胞生长无明显影响。与正常对照组比较,模型组细胞面积、蛋白质量浓度增加,β-MHC、ANP、CDKN1a mRNA表达增强,差异有统计学意义(P<0.01);与模型组比较,雷公藤甲素②、③、④组细胞面积、蛋白质量浓度减少,β-MHC、ANP、CDKN1a mRNA表达减弱,差异有统计学意义(P<0.01)。结论:雷公藤甲素能抑制大鼠H9c2细胞的肥大反应,其机制可能与下调CDKN1a mRNA表达有关。

关键词 心肌细胞;肥大;雷公藤甲素;细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1a;细胞培养

Inhibitory Effect of Triptolide on Rat Myocardial H9c2 Cell Hypertrophy

TONG Yang-fei, GUO Feng-jie, PAN Xi-chun, CHEN Bo, CHEN Xiao-hong, ZHANG Hai-gang (Dept. of Pharmacology, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of triptolide on rat myocardial H9c2 cell hypertrophy. METHODS: Cells were treated with triptolide (0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0 μg/L) for 24 h, the cell vitality was detected by MTT to choose the optimal mass concentration. Cells were treated with angiotensin II (1.0 μmol/L) for 24 h to generate the cell hypertrophy model. Experiments were divided into normal control group (conventional culture), model group (conventional culture) and triptolide ①, ②, ③, ④(0.3, 1.0, 3.0, 10.0 μg/L) groups. The cell hypertrophy model were generated and treated with the corresponding drug for 24 h. The cells were observed by using fluorescence microscope after staining; cell areas were determined by Image J; cell protein mass contents were detected by BCA; the mRNA expression levels of β-myosin heavy chain (β-MHC), atrial natriuretic peptide (ANP) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1a (CDKN1a) were determined by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). RESULTS: 0.1-10 μg/L TP had no obvious effect on H9c2 cell growth. Compared with normal control group, the cell areas and protein mass contents were increased in model group, the mRNA expression of β-MHC, ANP, CDKN1a were enhanced, there was statistical significant difference (P<0.01). Compared with model group, the cell areas and protein mass contents were decrease in triptolide ②, ③, ④ groups, the mRNA expression of β-MHC, ANP, CDKN1a were decreased, there was statistical significant difference (P<0.01). CONCLUSIONS: Triptolide can inhibit the hypertrophy reaction of rat H9c2, and its mechanism may be related to down-regulation of CDKN1a mRNA expression.

KEYWORDS Cardiomyocyte; Hypertrophy; Triptolide; Cyclin-dependent kinase inhibitor 1a; Cell culture

作,采取有效措施确保这两类药品的安全使用。

参考文献

[1] 卫生部.关于印发《麻醉药品临床应用指导原则》的通知[S].2007-01-25.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30973524);重庆市基础与前沿研究计划项目(No.cstc2013jcyjA10094)

* 硕士研究生。研究方向:心血管药理学。E-mail:125308094@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:心血管药理学。电话:023-68752365。E-mail:hg001zhang@163.com

[2] 姜开杰,邢军,赵艳艳.我市麻醉药品、精神药品管理和使用中存在的问题及分析[J].中国执业药师,2013,10(12):10.

[3] 张万智,文加勇,汤松,等.4家医疗机构麻醉药品管理调查分析[J].医药导报,2011,30(5):683.

[4] 赵素婷,范书山,李晓丽,等.基于信息化的麻醉和精神药品监管[J].中国卫生质量管理,2010,17(6):66.

[5] 王燕,郭伟.我院门诊药房麻醉药品和第一类精神药品的规范化管理[J].中国药房,2013,24(37):3 501.

(收稿日期:2014-06-06 修回日期:2014-08-12)

(编辑:刘萍)

心肌肥大(Cardiac hypertrophy)是高血压、心瓣膜病、慢性心力衰竭等多种疾病的共同并发症,是心肌细胞的一种早期代偿性反应^[1]。心肌肥大一方面能在一定程度上提高心肌收缩力,另一方面又会导致心肌组织耗氧量增加,最终引起心力衰竭、恶性心律失常,甚至猝死等严重并发症,是导致心血管疾病发病率和病死率升高的独立危险因素之一^[2-3]。心肌细胞是一种终末期分化细胞,在受到刺激后胞内核酸和蛋白质合成均会大量增加、细胞体积增大,但不发生分裂,是造成细胞肥大的根本原因^[4]。细胞周期调控因子又称为内源性调节因子,在细胞周期的调节中起着关键作用。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子1a(Cyclin-dependent kinase inhibitor1a, CDKN1a)又称为p21,能够抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK2)/细胞周期蛋白E(Cyclin E)复合物的活性,导致细胞停滞于G₀/G₁期,从而无法进入S期完成细胞分裂^[5]。

雷公藤甲素(Triptolide)又称雷公藤内酯醇,是中药雷公藤的主要活性成分之一,具有明显的免疫调节作用,还能影响细胞周期,促进细胞进入S期^[6]。然而,雷公藤甲素能否通过影响心肌细胞的细胞周期而抑制心肌细胞的肥大反应尚不明确。为此,本研究旨在探讨雷公藤甲素对心肌细胞CDKN1a表达的影响及其与细胞肥大的关系,为心肌肥大的防治及雷公藤甲素的应用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

CFX CONNECT型实时荧光定量-聚合酶链反应(RT-PCR)仪(美国Bio-Rad公司);DMI 3000B型荧光显微镜(德国Leica公司);1500型全波长酶标仪、3111型细胞培养箱(美国Thermo公司);3K18型离心机(美国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

雷公藤甲素(北京美迪克斯生物技术有限公司,批号:TTL01017,纯度:99.69%);血管紧张素II(Ang II)、噻唑蓝、罗丹明标记的鬼笔环肽(美国Sigma公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);DAPI染液(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清(FBS)、引物合成、蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测试盒(上海生工生物工程技术有限公司);RNAiso裂解液、RNA逆转录试剂盒(大连宝生物工程技术有限公司);qPCR SYBR green超混液(美国Bio-Rad公司)。

1.3 细胞

大鼠心肌细胞(H9c2细胞)购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 最适质量浓度的筛选

收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入100 μl含有10% FBS的培养液,接种细胞3 000个/孔,同时设置调零孔、对照孔;置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育,至细胞单层铺满96孔板底,分别加入0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 μg/L雷公藤甲素;置于37℃、5% CO₂培养箱中分别孵育24 h,每孔加入20 μl 0.5% MTT,继续培养4 h;再每孔加入150 μl 二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速震荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪570 nm波长处测量各孔光密度(OD)。试验设正常对照组。

2.2 细胞分组与处理

将H9c2细胞以5×10⁵ ml⁻¹的密度接种于12孔板,置于37℃、5% CO₂的培养箱中孵育,24 h后换无血清的培养基,继续培养24 h。采用Ang II(1.0 μg/L)培养细胞24 h以复制细胞肥大模型。试验分为正常对照(常规培养液)组、模型(常规培养液)组与雷公藤甲素①、②、③、④(0.3、1.0、3.0、10.0 μmol/L)组,复制模型的同时给予相应药物培养24 h。

2.3 各组细胞面积的检测

将处理好的细胞用4℃预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,每孔加入4%的多聚甲醛固定30 min,而后再用PBS洗2次;加入新鲜制备的0.1% Triton-100孵育20 min, PBS洗涤后加入50 μg/ml 荧光标记鬼笔环肽染色细胞40 min, PBS洗3次。荧光显微镜下观察细胞,采用Image J软件测量20个细胞的面积,再取平均值。

2.4 各组蛋白质量浓度的检测

将处理好的细胞用4℃预冷PBS洗2次,刮下细胞转移至离心管中;再加入lysis buffer,磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂及PMSF,于4℃下,22 000×g离心15 min,取上清液。采用二辛可酸(BCA)法,根据说明书测定562 nm波长处的吸光度,计算蛋白质量浓度。以BSA标准蛋白溶液制作标准曲线。

2.5 各组细胞心房利钠肽(ANP)、β-肌球蛋白重链(β-MHC)和CDKN1a mRNA 表达的检测

使用Primer 5.0进行引物设计,序列如下:β-actin(NM_031144)上游5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATC-3'; ANP(NM_012612)上游5'-GAGGAGAAGATGCCGGTAG-3',下游5'-CTAGAGAGGGAGCTAAGTG-3';β-MHC(NM_017240)上游5'-GAGTG-GACGTTTATTGACTTCGG-3',下游5'-GGCTTCCTGCTTCCCTTGA-3'; CDKN1a(NM_080782)上游5'-TTGTCGCTGTCTTGCACTCT-3',下游5'-GGCACTCAGGGCTTCTC-3'。收集细胞,提取细胞的总RNA,反转录合成cDNA。PCR扩增条件:95℃预变性3 min;95℃变性10 s,58℃退火15 s,72℃延伸30 s,循环45次;终止反应。反应体系为10 μl。以内参β-actin mRNA的循环阈(Ct)值作参照,采用2^{-ΔΔCt}法进行结果分析,计算ANP、β-MHC和CDKN1a mRNA的相对表达量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0软件处理实验数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 最适质量浓度的筛选结果

经0.1~10.0 μg/L的雷公藤甲素作用24 h后,细胞生长没有明显变化,30.0 μg/L雷公藤甲素则明显抑制细胞生长($P < 0.01$)。因此,在后续试验中选择0.3、1.0、3.0、10.0 μg/L 4个质量浓度,作用时间为24 h。各组细胞活力检测结果见图1。

3.2 各组细胞面积的检测结果

与正常对照组比较,模型组细胞面积增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,雷公藤甲素②、③、④组细胞面积减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞面积的检测结果见表1;各组细胞形态学见图2。

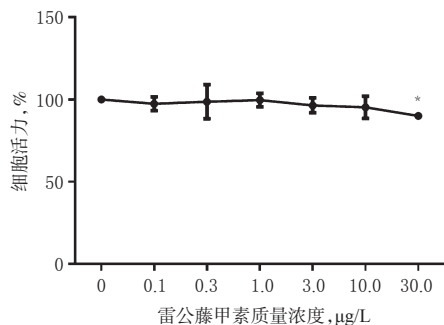


图1 各组细胞活力检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

注:与正常对照组(即0 $\mu\text{g/L}$)比较, * $P < 0.01$

Fig 1 Results of vitality of cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Note: vs. normal control group (0 $\mu\text{g/L}$), * $P < 0.01$

表1 各组细胞面积的检测结果($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab 1 Results of areas of cell in each group ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	细胞面积, μm^2
正常对照组	2 302.2 \pm 147.0
模型组	5 799.8 \pm 547.6*
雷公藤甲素①组	5 698.3 \pm 854.4
雷公藤甲素②组	3 780.7 \pm 490.4#
雷公藤甲素③组	2 949.7 \pm 380.7#
雷公藤甲素④组	2 846.0 \pm 425.3#

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.01$

0.01

3.3 各组细胞蛋白质质量浓度的检测结果

与正常对照组比较,模型组细胞蛋白质质量浓度增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,雷公藤甲素②、③、④组细胞蛋白质质量浓度减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞蛋白质质量浓度的检测结果见表2。

3.4 各组细胞 ANP、 β -MHC 和 CDKN1a mRNA 表达的检测结果

与正常对照组比较,模型组细胞中 ANP、 β -MHC 和 CDKN1a mRNA 表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,雷公藤甲素②、③、④组细胞 ANP、 β -MHC 和 CDKN1a mRNA 表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞 ANP、 β -MHC 和 CDKN1a mRNA 表达的检测结果见表3。

4 讨论

在人类胚胎心肌细胞中,细胞周期调节因子 Cyclin、CDKs、 β -MHC、 α -肌动蛋白(α -actin)、ANP 均呈高表达,有利于蛋白质的合成和心肌细胞的增殖,以适应能量需求和心脏生长的需要^[7]。但在婴儿出生后,心脏中这些胚胎基因和细胞周期调节因子的表达均迅速减少,细胞停止增殖^[8]。当心脏压力负荷、容量负荷增加或受到一些神经体液因素刺激后,一些在胚胎期表达出生后停止表达的基因,如 β -MHC、ANP、 α -actin 等,会重新启动表达,称之为胚胎基因重编程,进而诱导蛋白质的合成增多来适应心肌细胞变大和能量需求增加的需要^[9]。这些胚胎基因的表达可以作为心肌细胞肥大的标志物。在本研究中,经 Ang II 刺激后, H9c2 细胞增大,蛋白含量增加, ANP mRNA 和 β -MHC mRNA 表达均明显增强。

CDKN1a 作为细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子,抑制

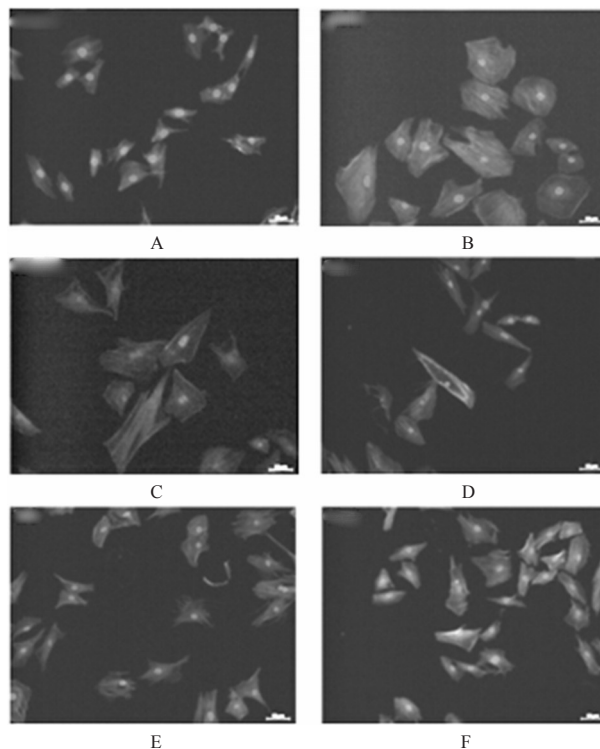


图2 各组细胞形态学(罗丹明标记鬼笔环肽染色,标尺:50 μm)

A.正常对照组;B.模型组;C.雷公藤甲素①组;D.雷公藤甲素②组;E.雷公藤甲素③组;F.雷公藤甲素④组

Fig 2 Cell morphology (staining with rhodamine labeled phalloidine, bar: 50 μm)

A.normal control group; B.model group; C. triptolide ① group; D. triptolide ② group; E. triptolide ③ group; F. triptolide ④ group

表2 各组细胞蛋白质质量浓度的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of total protein mass concentration of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	蛋白质质量浓度, mg/ml
正常对照组	2.34 \pm 0.21
模型组	3.73 \pm 0.20*
雷公藤甲素①组	3.52 \pm 0.19
雷公藤甲素②组	2.64 \pm 0.23#
雷公藤甲素③组	2.53 \pm 0.10#
雷公藤甲素④组	2.34 \pm 0.22#

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.01$

CDK2/cyclin E 复合物的活性,导致细胞停滞于 G₀/G₁ 期,从而无法进入 S 期完成细胞分裂。在心肌肥大信号通路中,蛋白激酶 C 磷酸化 Ras, 作用于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径,激活了细胞外调节蛋白激酶(ERK), 磷酸化 p53, 最终使下游靶点 CDKN1a 的表达升高,进而造成心肌细胞周期的调控失调^[10]。因此,抑制或阻断 CDKN1a, 很可能成为治疗心肌肥大的新方法。

雷公藤甲素具有抗炎、抗癌等多方面的作用^[11]。近年来,雷公藤甲素免疫抑制效应主要通过抑制免疫细胞、细胞因子,而抗炎作用主要涉及转录因子(NF)- κ B、环氧合酶(COX)-2 等

表3 各组细胞 ANP、 β -MHC 和 CDKN1a mRNA 表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 Results of ANP, β -MHC and CDKN1a mRNA expressions of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ANP/ β -actin	β -MHC/ β -actin	CDKN1a/ β -actin
正常对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	2.00 ± 0.29 [*]	4.05 ± 0.51 [*]	2.04 ± 0.32 [*]
雷公藤甲素①组	1.82 ± 0.10	3.96 ± 0.34	2.00 ± 0.37
雷公藤甲素②组	1.43 ± 0.18 [#]	2.97 ± 0.35 [#]	1.24 ± 0.16 [#]
雷公藤甲素③组	1.36 ± 0.20 [#]	2.14 ± 0.22 [#]	1.20 ± 0.20 [#]
雷公藤甲素④组	1.14 ± 0.20 [#]	1.30 ± 0.11 [#]	1.14 ± 0.23 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, [#] $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.01$

信号通路,其对肿瘤、心血管疾病等的药理作用也逐步受到重视。雷公藤甲素主要是调节细胞周期,通过线粒体凋亡途径引起细胞死亡,同时也可抑制RNA聚合酶II的活性阻碍RNA的转录^[12]。本研究通过MTT实验测定H9c2细胞对雷公藤甲素的耐受性:选择不影响细胞正常生长的质量浓度给药,观察其对心肌肥大及CDKN1a mRNA表达情况的影响。结果,应用雷公藤甲素处理后,H9c2细胞蛋白质质量浓度明显减少,ANP、 β -MHC及CDKN1a mRNA表达呈剂量依赖性减弱。这表明雷公藤甲素能有效抑制H9c2细胞的肥大反应,可能部分与细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子CDKN1a有关。

限制雷公藤甲素临床应用进一步扩大的主要原因是其高剂量时会导致肝、肾、造血系统及心肌损伤^[13]。经毒理研究表明,其用于小鼠的半数死亡剂量(LD₅₀)为1.19 mg/kg,犬的LD₅₀为80 μ g/kg,连续给药会导致半数动物出现白细胞和血小板下降。但对犬在20 μ g/kg剂量下连续给药,没有任何毒性反应,此剂量相当于给予小鼠约100 μ g/kg的剂量^[14]。在体外试验中,应用550 nmol/L(200 μ g/L)雷公藤甲素培养大鼠的心肌细胞24 h,会造成细胞损伤^[15]。本研究采用0.1~10 μ g/L的雷公藤甲素培养细胞24 h,未表现出细胞毒性。综上所述,使用安全剂量的雷公藤甲素能明显降低大鼠心肌细胞H9c2的CDKN1a mRNA表达,抑制其肥大反应,为通过调节细胞周期因子的表达而改善心肌肥大奠定了实验基础。

参考文献

[1] Chen B, Zhong LY, Yang JX, et al. Alteration of mevalonate pathway related enzyme expressions in pressure overload-induced cardiac hypertrophy and associated heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(6):1 761.

[2] Aggarwal P, Turner A, Matter A, et al. RNA expression profiling of human iPSC-derived cardiomyocytes in a car-

diac hypertrophy model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e108 051.

[3] 郭奉洁,卢小岚,王妍,等.多肽药物汇利心康对慢性心衰模型大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(21):3.

[4] Naqvi N, Li M, Calvert JW, et al. A proliferative burst during preadolescence establishes the final cardiomyocyte number[J]. *Cell*, 2014, 157(4):795.

[5] Fan L, Ma Y, Liu Y, et al. Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 743(2):88.

[6] Wu J, Li QQ, Zhou H, et al. Selective tumor cell killing by triptolide in p53 wild-type and p53 mutant ovarian carcinomas[J]. *Mel Oncol*, 2014, 31(7):14.

[7] Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10):2 023.

[8] Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(2):521.

[9] Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. Micro RNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure[J]. *Circulation*, 2007, 116(3):258.

[10] Roy S, Khanna S, Rink T, et al. P21waf1/cip1/sdi1 as a central regulator of inducible smooth muscle actin expression and differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts[J]. *Mol Bio Cell*, 2007, 18(12):4 837.

[11] Liu Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3):377.

[12] Pan J. RNA polymerase-an important molecular target of triptolide in cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2010, 292(2):149.

[13] Li XJ, Jiang ZZ, Zhang LY. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1):67.

[14] 郑幼兰,叶聚荣,林大杰,等.雷公藤内酯对小鼠和犬的一些毒性[J]. *中国药理学通报*, 1981, 2(1):70.

[15] Wen HL, Liang ZS, Zhang R, et al. Anti-inflammatory effects of triptolide improve left ventricular function in a rat model of diabetic cardiomyopathy[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12(1):50.

(收稿日期:2014-11-04 修回日期:2014-12-18)

(编辑:张 静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅