

实验研究

川芎嗪对 PGF_2 诱导心肌肥大的抑制作用*蒋青松^{1,2}, 黄燮南¹, 戴支凯¹, 杨贵忠¹, 周岐新², 吴 芹¹, 石京山¹⁽¹⁾遵义医学院药理教研室, 遵义 563003; ⁽²⁾重庆医科大学药理教研室, 重庆 400016)

摘要 目的:研究川芎嗪(Tetraethylpyrazine, TMP)对前列腺素 F_2 (PGF_2) 所致心肌肥大的影响。方法:利用培养的新生大鼠心肌细胞,以细胞直径大小、蛋白质含量为心肌肥大反应指标,观察药物的抗心肌肥大效应;用 Fura 2/AM 负载的培养心肌细胞检测细胞内游离钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)。结果: PGF_2 10^{-7} mol/L 使心肌细胞明显增大,蛋白质含量明显增加,并使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著升高。与 PGF_2 组比较, TMP 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L 可分别使心肌细胞直径缩小 36%、44% 和 55% ($P < 0.05$); 蛋白质含量分别减少 13%、21% 和 24% ($P < 0.01$); $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别降低 17%、37% 和 48% ($P < 0.05$)。结论:TMP 可抑制 PGF_2 诱导的心肌细胞肥大,该作用可能与其抑制心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高有关。

关键词 川芎嗪;前列腺素 F_2 ;心肌肥大;钙

川芎嗪(ligustrazine)具有广泛的药理作用,钙通道阻滞可能是 TMP 药理作用的重要基础。研究表明,细胞内钙的增加是致心肌肥厚的最基本信号^[1], Ca^{2+} 及其激活的下游信号通路在心肌肥厚的发生发展中起重要作用^[2]。外源性前列腺素 F_2 (prostaglandin F_2 , PGF_2) 可促使心肌肥厚的发生发展^[3,4]。我们的实验还发现,野百合碱诱导的大鼠右心室肥厚可能与心肌局部 PGF_2 升高有关,并至少部分由细胞内钙增加激活钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)信号通路中介(待发表)。那么, TMP 对 PGF_2 所致心肌肥大有无影响,尚未见相关报道。本研究拟利用体外细胞培养技术,观察 TMP 对 PGF_2 诱导心肌细胞肥大的作用,并初步探讨其作用机理。

1 材料与方法

1.1 试验药物 TMP,无锡第七制药厂产品。

1.2 动物 1~4d SD 乳鼠,重庆第三军医大学野战外科研究所动物室提供,许可证号:SCXK(渝)20020003。

1.3 试剂 PGF_2 (Cayman Chemical); DMEM (GIBCO), 胰蛋白酶(上海佰奥生物科技有限公司), 小牛血清(上海第二医科大学实验中心), Fura 2/AM、EGTA、 5 3 溴脱氧尿苷(5 3 BrdU) (Sigma), Triton X-100(华美生物工程公司), RIPA 裂解液(美国 Upstate), Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天), 抗 α -actin 抗体(北京中山生物技术公司)。

D-Hank's 液的成分为 (mmol/L): NaCl 137.0,

KCl 5.0, Na_2HPO_4 0.6, KH_2PO_4 0.4, NaHCO_3 3.0, Glucose 5.6。pH 7.30~7.40。在 D-Hank's 液中加入 CaCl_2 1.30 mmol/L 和 MgCl_2 0.5 mmol/L 即为 Hank's 液。

1.4 心肌细胞培养与鉴定 参照文献^[5],用胰蛋白酶消化法将乳鼠心室肌消化成单细胞悬液,经差速贴壁分离后,将未贴壁心肌细胞用含 20% 小牛血清的 DMEM 悬浮,调细胞密度至 $1.5 \sim 3 \times 10^6$ 个/ml,分别接种于 25 ml 培养瓶内(用于检测细胞内钙含量)或调细胞密度至 $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 个/ml 于 6 孔板(用于 HE 染色检测细胞直径)及 24 孔板(用于测定细胞蛋白质含量),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。18~30h 后见细胞培养贴壁生长,48 h 可见细胞出现自发搏动。培养前 2d 加入 0.1 mmol/L 5 3 BrdU 抑制成纤维细胞生长。于细胞培养 48 h 后更换培养液,72 h 换无血清培养液并加入 PGF_2 10^{-7} mol/L 或同时加入 TMP (10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L),继续孵育 48 h 后用于检测。

经以上方法分离制备的心肌细胞,用 α -actin 抗体的免疫组化染色,其纯度可达 90% 以上,符合实验要求。

1.5 心肌细胞直径测量 取有心肌细胞生长的玻片,冷 D-Hank's 液漂洗血清及杂质,4% 多聚甲醛固定 15 min,晾干,常规 HE 染色后用 BI2000 医学图象分析系统(成都泰盟有限公司)测量单个细胞直径,每张玻片测 5 个视野,每个视野测 10~15 个细胞,取其平均值。每组重复 3 次。

* 贵州省科技厅和重庆医科大学校基金资助项目,编号分别为黔科合计(2004)3057 和(2004)4557

1.6 心肌细胞蛋白含量检测 将 24 孔板内培养好的心肌细胞用 0.125 %胰蛋白酶消化,细胞计数。然后用 0.01 mol/L PBS 离心 3 次(1000 ×g, 2 min)。弃上清,加入 RIPA 裂解缓冲液,超声破碎细胞,每管 30 s ×2 次,冰上操作。再以 12000 ×g 4 离心 20 min,取上清液根据蛋白检测试剂盒说明书操作,测定心肌细胞蛋白质含量,并根据每孔细胞数计算单个心肌细胞的含量。

1.7 心肌细胞内游离钙浓度([Ca²⁺]_i)测定^[6] 将培养瓶内培养好的心肌细胞用 0.125 %胰蛋白酶消化制成细胞悬液,加入 5 μmol/L 的 Fura 2/AM 负载,然后用 Hank's 液悬浮,调细胞密度至 10⁶ 个/mL,检测细胞内[Ca²⁺]_i。荧光分光光度计(日本岛津公司)的发射波长为 500 nm,激发发射光栅为 5 nm 和 10 nm,激发波长为 340~380 nm。根据公式[Ca²⁺]_i = Kd ×(F - F_{min})/(F_{max} - F)计算[Ca²⁺]_i浓度。式中 Kd 为 Fura 2/AM 与 Ca²⁺结合反应的解离常数(224 nmol/L);F 为细胞的荧光强度;F_{max} 是加入 0.98 g/L Tri-

ton X-100 测得的最大荧光值;F_{min} 为加入 EGTA 5 mmol/L 后测得的最小荧光值。

2 结果

2.1 TMP 对 PGF₂ 诱导心肌细胞直径增大和蛋白质含量升高的影响 HE 染色可见加入 PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 后,心肌细胞明显增大,细胞肿胀,分界不清(图 1a, b)。加入 TMP 10⁻⁴ mol/L 后,细胞明显缩小,肿胀减轻(图 1c)。用 BI2000 医学图象分析系统测量心肌细胞直径增大约 3 倍(表 1)。而 TMP 10⁻⁶、10⁻⁵和 10⁻⁴ mol/L 分别使 PGF₂ 所增大的心肌细胞直径缩小了 36%、45%和 55%。利用表 1 各项测定值计算还表明,心肌细胞蛋白质含量检测与细胞直径大小结果基本一致,加入 PGF₂ 10⁻⁷ mol/L 后心肌细胞蛋白质含量增加了 31%;而 TMP 从 10⁻⁶、10⁻⁵和 10⁻⁴ mol/L 使 PGF₂ 所升高的心肌细胞蛋白质含量分别减少了 13%、21%和 24%。



a. 正常心肌细胞 b. PGF₂ 诱导肥大心肌细胞 c. TMP + PGF₂ 10⁻⁷mol/L 处理心肌细胞

图 1 川芎嗪对 PGF₂ 诱导心肌细胞肥大的影响(HE 染色,400 ×)

表 1 川芎嗪对 PGF₂ 诱导心肌细胞直径和蛋白质含量肥大的影响($\bar{x} \pm s$)

分组 (mol/L)	心肌细胞直径 (μm, n=3)	心肌细胞蛋白质含量 (pg/个细胞, n=6)
对照组	36 ±11 **	419.2 ±41.6 **
PGF ₂ 10 ⁻⁷	115 ±23	548.5 ±59.2
PGF ₂ 10 ⁻⁷ + TMP 10 ⁻⁴	52 ±18 **	417.9 ±39.2 **
PGF ₂ 10 ⁻⁷ + TMP 10 ⁻⁵	63 ±19 **	435.2 ±51.3 **
PGF ₂ 10 ⁻⁷ + TMP 10 ⁻⁶	74 ±21 **	476.9 ±49.4 **

与 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 组比较 * P<0.05, ** P<0.01

2.2 TMP 对 PGF₂ 诱导肥大心肌细胞[Ca²⁺]_i的影响 在本实验条件下,测得心肌细胞静息[Ca²⁺]_i为 149.9 ±29.3 nmol/L,加入 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 孵育 48 h 后[Ca²⁺]_i明显升高,为 274.3 ±42.3 nmol/L (P<0.001, n=6)。TMP 10⁻⁶、10⁻⁵及 10⁻⁴mol/L 均明显抑制 PGF₂ 引起的[Ca²⁺]_i升高,其抑制率分别为 17%、37%和 48% (P<0.05, n=6),见图 2。

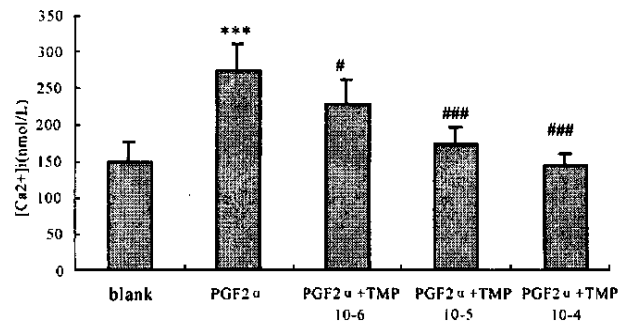


图 2 不同浓度川芎嗪(10⁻⁶~10⁻⁴mol/L)对 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 诱导心肌细胞内钙([Ca²⁺]_i)升高的作用

(*** P<0.001 与对照组比较;# P<0.05,### P<0.001 与 PGF₂ 10⁻⁷mol/L 组比较)

3 讨论

心肌肥厚是指心肌细胞增大而无细胞分裂,以细胞内蛋白合成增加、细胞体积增大和某些特殊胎儿基

因的再表达为特征,是心肌细胞对高血压、瓣膜病、急性心肌梗塞及先天性心脏病等常见临床疾病的一种基本应答。虽然初期心肌肥厚是一种有益的适应性反应,但长期应激所致持续性心肌肥厚可导致扩张性心肌病、心衰和猝死,是心血管疾病常见死亡原因之一。因此,研究阐明心肌肥厚发生的机制和中介物质是非常重要的。目前已经有许多研究集中到促进心肌肥厚发生的信号转导通路方面,但对于逆转心肌肥厚发生发展的调节方面研究较少。

现有资料表明^[3,7],缺血等应激性反应可使心肌 PGF₂ 形成增加,导致心肌肥厚;前列腺素类似物可使大鼠心脏重量和心室/体重量明显增加,提示 PGF₂ 参与了心肌适应性代偿肥大过程。本研究显示,PGF₂ 可诱导乳鼠心肌细胞体积和蛋白质合成增加,引起心肌细胞肥大,结果与文献报道一致^[3,4,8]。近年研究证明^[9,10],心肌肥厚的细胞内信号转导机制,除丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)途径、蛋白激酶 C (protein kinase C,PKC) 途径外, Ca²⁺ 激活的 CaN 途径亦是一条重要的信号通路。本研究发现,PGF₂ 引起细胞内钙明显增加,提示在其诱导的心肌肥厚过程中钙的参与有着重要作用。本文结果发现,TMP 呈剂量依赖地抑制 PGF₂ 诱导的心肌细胞直径增大和蛋白质含量增加,同时抑制了 PGF₂ 引起的细胞内钙增加,提示 TMP 具有抑制 PGF₂ 致心肌肥大作用,且该作用至少部分与其抑制细胞内钙增加有关。有研究表明^[11],TMP 还可抑制另一个血管活性物质血管紧张素 II 诱导的心肌肥大,可初步推测 TMP 的作用部位可能不在于致肥大因子本身,而是作用于其下游的某些环节,如抑制细胞内钙增加。由于心肌肥厚信号通路的复杂性,TMP 抗心肌肥大作用的

具体环节,如 CaN 是否就是 TMP 作用的下游因子,TMP 是否同时作用于其它信号通路,尚需进一步研究明确。

参考文献

- 1 Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med*,2000;6(11) 1221 ~ 1227
- 2 Kudoh S, Akazawa H, Takano H, et al. Stretch modulation of second messengers: effects on cardiomyocyte ion transport. *Prog Biophys Mol Biol*,2003;82(1~3) 57 ~ 66
- 3 Lai J, Jin K, Yang R, et al. Prostaglandin F₂ induces cardiac myocyte hypertrophy in vitro and cardiac growth in vivo. *Am J Physiol*,1996;271 (Heart Circ. Physiol. 40) H2179 ~ H208
- 4 Adams JW, Migita DS, Yu MK, et al. Prostaglandin F₂ alpha stimulates hypertrophic growth of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem*,1996;271(2) 1179 ~ 1186
- 5 Harary I, Farley B. In vitro studies of single isolated beating heart cell. *Science*,1960;131 1674 ~ 1675
- 6 黄燮南, 吴芹, 雷开键, 等. 异紫堇啡碱对培养乳鼠心肌内游离钙的影响. *遵义医学院学报*,2002;25(2) 97 ~ 99
- 7 Karmazyn M. Synthesis and relevance of cardiac eicosanoids with particular emphasis on ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*,1989; 67(8) 912 ~ 921
- 8 Adams JW, Sah VP, Henderson SA, Brown HJ. Tyrosine kinase and c-jun NH₂-terminal kinase mediate hypertrophic response to prostaglandin F₂ in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res*,1998; 83(2) 167 ~ 178
- 9 Ruwhof C, van der Laarse A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res*, 2000;47(1) 23 ~ 37
- 10 Takano H, Zou Y, Akazawa H, et al. Inhibitory molecules in signal transduction pathways of cardiac hypertrophy. *Hypertens Res*,2002; 25(4) 491 ~ 498
- 11 郭自强, 牛福玲, 朱陵群, 王伟. 川芎嗪对血管紧张素 II 致心肌肥大的影响. *北京中医药大学学报*,2001;24(3) 32 ~ 34

Tetraethylpyrazine inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F₂

Jiang Qingsong^{1,2}, Huang Xianan¹, Dai Zhikai¹, Yang Guizhong¹, Zhou Qixin², Shi Jingshan¹, Wu Qin¹

⁽¹⁾ Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003;

⁽²⁾ Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

Objective: To observe the effects of tetraethylpyrazine (TMP) on cardiac myocyte hypertrophy induced by prostaglandin F₂ (PGF₂), and to probe primarily its mechanisms. **Methods:** Neonatal rat cardiomyocyte hypertrophic response and the antihypertrophic effects of TMP were assayed by measuring cell diameter and protein content. The intracellular free calcium concentration ([Ca²⁺]_i) in cultured cardiomyocytes were measured by using Fura 2/AM as a fluorescent indicator. **Results:** PGF₂ at 10⁻⁷ mol/L significantly increased the cell diameter, protein content and [Ca²⁺]_i in cultured cardiomyocyte. TMP at 10⁻⁶, 10⁻⁵ and 10⁻⁴ mol/L could significantly inhibit the cardiomyocyte hypertrophy induced by PGF₂, decreasing by 36, 44 and 55 % in cell diameter (P < 0.05), and decreasing by 13, 21 and 24 % in protein content (P < 0.01), respectively, compared with only with PGF₂. Similarly, [Ca²⁺]_i was reduced by 17, 37 and 48 % by TMP at different concentration (P < 0.05). **Conclusion:** Cardiomyocyte hypertrophic response could be abolished by TMP partly, which may be related to its inhibitory effects on the increase of [Ca²⁺]_i induced by PGF₂.

Key words tetraethylpyrazine; prostaglandin F₂; cardiomyocyte hypertrophy; calcium