

黄芪多糖对脂多糖诱导大鼠心肌细胞肥大的保护作用

周振华¹, 王洪新^{1*}, 赵素玲¹, 喻晓春², 张晶¹, 宋莹¹

1. 辽宁医学院 分子生物学与新药开发重点实验室, 辽宁 锦州 121001

2. 中国中医科学院 实验中心, 北京 100700

摘要: 目的 研究黄芪多糖对脂多糖(LPS)诱导的大鼠心肌细胞肥大的保护作用。方法 新生1~2 d的SD大鼠心肌细胞培养48 h后, 设对照组, 模型组, 黄芪多糖低、中、高质量浓度(1、10、100 mg/L)组。计算机图像分析系统测量细胞体积; RT-PCR法检测心房利钠多肽(ANP)mRNA的表达; ELISA法检测细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的量; 采用Fluo-3/Am荧光染色剂负载细胞, 在激光共聚焦显微镜下测定细胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的瞬间变化。结果 与对照组相比, LPS 1 mg/L可使心肌细胞体积显著增大, ANP mRNA的表达显著增强, 细胞分泌TNF- α 蛋白的量显著增加, 心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬间峰值增大($P < 0.01$)。与模型组相比, 黄芪多糖1、10、100 mg/L预先给药均可抑制心肌细胞体积增大; 细胞产生的TNF- α 显著减少, ANP mRNA的表达不同程度地减少($P < 0.05$), 其中10、100 mg/L组这两项指标可恢复到对照组的水平($P > 0.05$); 黄芪多糖10 mg/L可拮抗LPS对正常心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬间变化幅度增大的作用($P < 0.01$)。结论 黄芪多糖对LPS诱导的乳鼠心肌细胞肥大有良好的保护作用, 其机制可能与抑制TNF- α 的产生、降低 $[Ca^{2+}]_i$ 有关。

关键词: 黄芪多糖; 脂多糖; 心肌细胞肥大; 肿瘤坏死因子- α ; 钙离子; 心房利钠多肽

中图分类号: R282.710.5; R972.9 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0524-05

Protection of astragalus polysaccharide on lipopolysaccharide-induced cardiac myocytes hypertrophy of rats

ZHOU Zhen-hua¹, WANG Hong-xin¹, ZHAO Su-ling¹, YU Xiao-chun², ZHANG Jing¹, SONG Ying¹

1. Key Laboratory of Molecular Biology and New Drug Research, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China

2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of astragalus polysaccharide (APS) on lipopolysaccharide (LPS)-induced cardiac myocytes hypertrophy of rats and its mechanism. **Methods** Cardiac myocytes of 1—2 d neonatal SD rats were cultured 48 h *in vitro*, and divided into control, model (LPS 1 mg/L) group, APS low-, middle-, and high- (1, 10, and 100 mg/L) groups. The cardiomyocyte volume was assayed by computer photograph analysis; atrial natriuretic peptide (ANP) mRNA expression was measured by RT-PCR; and tumor necrosis factor- α (TNF- α) level was determined by ELISA. The transient peak change of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured by using Fluo-3/Am fluorescent dye load cell under laser confocal microscope. **Results** Compared with control group, LPS 1 mg/L could make the volume of myocardial cells, ANP mRNA expression, the release of TNF- α protein, and $[Ca^{2+}]_i$ transient peak increase significantly ($P < 0.01$). Compared with the LPS model group, APS pre-administrated at the concentrations of 1, 10, and 100 mg/L could inhibit myocardial cell volume increase, while cells of TNF- α were significantly reduced, ANP mRNA expression decreased in varying degrees ($P < 0.05$). APS 10 and 100 mg/L groups could be restored to normal levels of the control group ($P > 0.05$) and APS 10 mg/L could antagonize transient changes in amplitude increase of $[Ca^{2+}]_i$ in normal cardiac myocytes ($P < 0.01$). **Conclusion** APS does have a good protection on cultured cardiac myocytes hypertrophy and its mechanism may be related to the inhibition of $[Ca^{2+}]_i$.

Key words: astragalus polysaccharide (APS); lipopolysaccharide (LPS); cardiac myocytes hypertrophy; tumor necrosis factor- α (TNF- α); calcium ion; atrial natriuretic peptide (ANP)

黄芪多糖为黄芪的主要活性成分之一, 具有免疫调节、抗肿瘤、修复神经损伤、延缓细胞衰老、抑菌和抗病毒等作用^[1-3]。脂多糖(LPS)是诱导心肌细胞释放炎症细胞因子的一个强效刺激因素, 其

收稿日期: 2011-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973898/C190702)

作者简介: 周振华(1983—), 男, 硕士, 主要研究方向为心血管药理。

*通讯作者 王洪新 Tel: 18641637333 E-mail: jyhxwang@163.com

首先与 LPS 结合蛋白 (LBP) 相结合, 再传递给单核细胞和巨噬细胞表面的特异性受体 CD14, 形成 LPS/LBP/CD14 复合物, 该复合物与 Toll 样受体 4 (TLR4) 相互作用, 启动细胞内几种信号通路, 诱导一系列炎症因子的表达^[4], 进而促进心肌细胞肥厚, 恶化心肌收缩功能以及诱导心肌细胞凋亡。有研究显示, 黄芪多糖对 LPS 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1) 有不同程度的抑制作用, 表明其可通过抑制炎症因子的分泌, 进而减少组织细胞的损伤来发挥其对机体的保护作用^[5]。黄芪多糖能够改善糖尿病模型大鼠的物质代谢, 降低心肌钙的量, 对心肌超微结构有保护作用^[6]。本实验采用 LPS 诱导 SD 乳鼠心肌细胞肥大, 研究黄芪多糖对心肌肥大的保护作用及其可能机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

黄芪多糖, 陕西森弗生物技术有限公司, 批号 HQ090312, 质量分数 98%。LPS, Sigma 公司; DMEM 培养基, Gibco 公司; 胎牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司; Fluo-3/Am, 江苏碧云天生物工程公司; 大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 检测试剂盒, 研域(上海)化学试剂有限公司; RT-PCR 试剂盒, 大连宝生物工程有限公司。

1.2 动物

1~3 日龄的 SD 大鼠, 雌雄不限, 由辽宁医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (辽) 2003-0007。

1.3 仪器

超净工作台, 江苏吴县市净化技术研究所; CO₂ 孵箱, 美国 Sheldon Manufacturing Inc 公司; XD—101 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 79—1 磁力加热搅拌器, 江苏金坛中大仪器厂; TDL—4 型离心机, 上海安亭科学仪器厂; DNM—9602G 酶标分析仪, 北京普朗新技术有限公司; X-chart 软件分析系统, 德国公司; Leica TCS-NT 激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司; 倒置相差显微镜, 日本 Canon 公司。

2 方法

2.1 乳鼠心肌细胞培养

乳鼠用 75%乙醇消毒皮肤, 无菌取出心脏, 用 D-Hanks 液洗去血液, 除去与心脏相连的大血管及心房组织后, 用眼科剪将其剪成 1 mm³ 大小的组织

块, 加入 0.08%胰蛋白酶, 反复吹打后于 37 °C 恒温消化 10 min, 弃上清液, 再加入 0.08%胰蛋白酶消化 3~4 次, 每次 10 min。收集消化完毕的细胞置于含有 15%小牛血清和 85%低糖 DMEM 的培养瓶中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 90 min, 将未贴壁的心肌细胞悬液用吸管吸出, 根据实验需要的细胞密度接种于合适的培养皿中。

2.2 分组和给药

将实验用细胞再常规培养 48 h 后分为对照组、模型组与黄芪多糖低、中、高质量浓度组。对照组不做任何处理, 模型组用 LPS 1 mg/L 作用乳鼠心肌细胞, 黄芪多糖低、中、高质量浓度组分别用黄芪多糖 1、10、100 mg/L 孵育乳鼠心肌细胞 30 min 后, 再加入 LPS 1 mg/L。

2.3 形态学观察

各组原代培养心肌细胞经过相应处理后, 在相差倒置显微镜 (×200) 下观察形态学变化。

2.4 心肌细胞体积的测定

接种于 24 孔培养板的心肌细胞经“2.2”项方法分组和处理, 继续培养 24 h 后, 吸出培养板各孔的培养液 (15%小牛血清和 85%低糖 DMEM), 用 PBS 缓冲液快速冲洗培养孔 3 次, 每孔加入 1 g/L 的胰蛋白酶 0.3 mL, 放入 37 °C 恒温箱中培养 10 min, 随后每孔加入含 0.1%血清的培养基 0.2 mL 终止消化, 收集细胞注入一细胞室内 (该细胞室底部是一经硅化的盖玻片, 以防心肌细胞贴壁), 在倒置显微镜 (×400) 下观察其中的细胞几乎均呈球形。用计算机 CIAS 大恒细胞图像分析系统测量单个细胞的直径, 计算细胞体积。每孔随机选择 4 个视野, 每个视野测 20 个细胞。

2.5 心肌细胞心房利钠多肽 (ANP) mRNA 表达的测定

将心肌细胞 1×10⁵/mL 接种于 6 孔板中, 经“2.2”项方法分组和处理, 继续培养 24 h 后, 弃去培养液, PBS 洗涤 2 次, 加入 Trizol 试剂完全裂解细胞, 收集细胞裂解液, 取 1 mL, 氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 回收总 RNA, 贮存于 -70 °C 待用。以 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 (A_{260}/A_{280}) 鉴定 RNA 纯度和浓度。取约 1 μ g 总 RNA, 进行反转录。反转录条件为: 42 °C、60 min, 99 °C、2 min, 4 °C 保存。ANP 的引物序列 (5'-3') 为 GGCTCC TTCTCCATCACCAATGTTATCTTCGGTACCG, 内参 GAPDH 的引物序列 (5'-3') 为 CAAAGTT

GTCATGGATGACCATGGAGAAGGCTGGG。得出 ANP 的片段长度为 458 bp, 内参 GAPDH 的片段长度为 198 bp。灭菌水溶解并配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物混合液, 使用浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 。PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、4 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 终末延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止, 20 个循环。循环扩增结束后, 取 6 μL 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结束后, 置于凝胶成像系统进行观察和分析。

2.6 心肌细胞内 TNF- α 的测定

接种于 24 孔板的心肌细胞按照“2.2”项下方法分组和处理后, 继续培养 6 h, 培养结束后收集细胞上清液, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书测定细胞上清液中 TNF- α 的量, 以此反映心肌细胞的 TNF- α 蛋白表达水平。

2.7 心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化的测定

将细胞按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于激光共聚焦专用培养皿, 无血清 DMEM 培养液培养 48 h 后分两组, 对照组不做任何处理, 黄芪多糖组加入黄芪多糖 10 mg/L , 细胞孵育 30 min 后取出。将细胞用 D-Hanks 液洗 3 次, 用终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fluo-3/AM 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 30 min, 然后吸出染液, 再以 D-Hanks 液洗涤 3 次, 每孔加入 0.4 mL

的 D-Hanks 液, 用于下列的各项检测。将培养皿置于 ACAS 570 载物台上, 在激光共聚焦显微镜下动态扫描细胞内荧光强度的变化, 激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 扫描方式为时间扫描, 激光功率为 30 mW, 物镜倍数为 20, 时间间隔 2 s, 连续扫描一段时间。对同一细胞先扫描记录一段正常波动曲线, 再加入 LPS 1 mg/L , 记录细胞内荧光强度的变化并由计算机进行处理。共聚焦系统由 Leica 公司提供的软件控制, 每孔选 2~3 个视野, 以平均荧光强度变化间接反映细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的相对水平。

2.8 数据处理

数据采用 q 检验, 多组间差异检验采用单因素方差分析, 统计数据以 SPSS 13.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对乳鼠心肌细胞形态的影响

乳鼠心肌细胞培养 48 h 后, 贴壁牢固, 生长良好, 细胞形态呈梭形、不规则三角形或多边形。经 LPS 1 mg/L 处理 24 h 后, 乳鼠心肌细胞表面积和体积均显著增大。乳鼠心肌细胞预先与黄芪多糖 1、10、100 mg/L 培养 30 min 后, 再经过 LPS 处理 24 h, 心肌细胞肥大程度有不同程度的降低。结果见图 1。

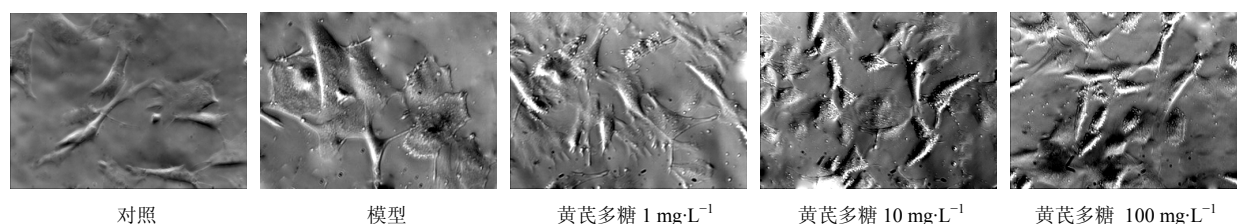


图 1 黄芪多糖对 LPS 处理 24 h 后心肌细胞形态的影响

Fig. 1 Effects of APS on morphology of cardiac myocytes after treatment for 24 h by LPS

3.2 对乳鼠心肌细胞体积的影响

与对照组比较, 模型组乳鼠心肌细胞体积明显增大 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪多糖 1 mg/L 组能有效抑制乳鼠心肌细胞体积的增大 ($P < 0.01$), 但仍与对照组有差异 ($P < 0.05$); 黄芪多糖 10、100 mg/L 组均能更有效地抑制心肌细胞体积增大 ($P < 0.01$), 并与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

3.3 对 LPS 诱导的乳鼠心肌细胞 ANP mRNA 表达的影响

在 1 mg/L 的 LPS 作用下, 乳鼠心肌细胞中

表 1 黄芪多糖对 LPS 诱导的心肌细胞体积增大的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of APS on increase of cell size in cardiac myocytes induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞体积 / μm^3
对照	—	998 ± 182
模型	—	$2\,581 \pm 165^{**}$
黄芪多糖	1	$1\,542 \pm 171^{*##}$
	10	$1\,302 \pm 138^{##}$
	100	$1\,177 \pm 156^{##}$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.01$; 下表同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs model group; same as below

ANP mRNA 的表达水平明显高于对照组, 差异显著 ($P<0.01$)。经黄芪多糖 1、10、100 mg/L 预处理后再给予 LPS 刺激的乳鼠心肌细胞 ANP mRNA 的表达水平与模型组相比均有显著的下降 ($P<0.01$), 其中黄芪多糖 1 mg/L 组仍高于对照组 ($P<0.01$), 而黄芪多糖 10、100 mg/L 与对照组相比则无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见图 2 和表 2。

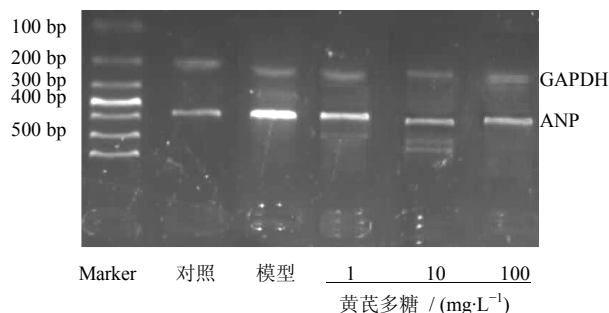


图 2 黄芪多糖对心肌细胞中 ANP mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of APS on ANP mRNA expression in cardiac myocytes

表 2 黄芪多糖对 LPS 诱导的心肌细胞 ANP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of APS on ANP mRNA expression in cardiac myocytes induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	ANP / GAPDH
对照	—	3.74 ± 0.26
模型	—	$8.05 \pm 0.45^{**}$
黄芪多糖	1	$5.29 \pm 0.21^{**\#}$
	10	$4.01 \pm 0.14^{\#}$
	100	$3.85 \pm 0.15^{\#}$

3.4 对 LPS 诱导的心肌细胞 TNF- α 蛋白水平的影响

与对照组比较, 模型组乳鼠心肌细胞中 TNF- α 蛋白的量明显升高, 差异显著 ($P<0.01$)。与模型组相比, 黄芪多糖 1、10、100 mg/L 组有效抑制 TNF- α 蛋白的表达 ($P<0.01$), 质量浓度为 10、100 mg/L 时与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$)。结果见表 3。

3.5 对 LPS 诱导的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化的影响

与 0 s 时相比, 对照组的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在加药 (100 s) 前无明显波动 ($P>0.05$); 在 100 s 时加入诱导剂 LPS 后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速并持续升高; 200 s 时差异显著 ($P<0.01$), 在 300 s 时达峰值 ($P<0.01$)。与 0 s 时相比, 黄芪多糖 10 mg/L 组的心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在加入 LPS 前波动不大, 到 100 s 加入

LPS 时也无明显差异 ($P>0.05$), 之后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 出现一定波动, 200 s 时有显著差异 ($P<0.01$), 但随后又逐渐回复至正常状态 ($P>0.05$)。与对照组相比, 黄芪多糖组在加入 LPS 前的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平无明显变化 ($P>0.05$), 而加入 LPS 后差异显著 ($P<0.01$)。结果见图 3 和表 4。

表 3 黄芪多糖对 LPS 诱导的心肌细胞 TNF- α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of APS on TNF- α protein expression in cardiac myocytes induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	TNF- $\alpha / (\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照	—	18.3 ± 4.8
模型	—	$72.9 \pm 3.5^{**}$
黄芪多糖	1	$31.6 \pm 6.9^{*\#}$
	10	$23.4 \pm 2.7^{\#}$
	100	$19.3 \pm 5.1^{\#}$

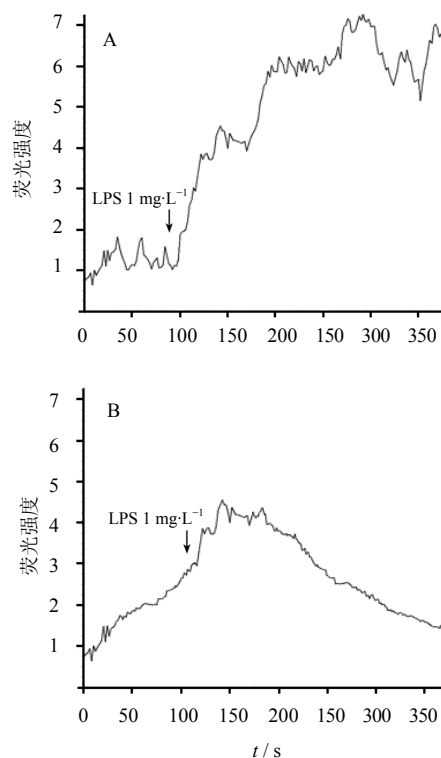


图 3 LPS(A)和黄芪多糖(B)对心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 瞬间变化的影响

Fig. 3 Effect of LPS (A) and APS (B) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient change in cardiac myocytes

4 讨论

心肌肥厚的发生是一个复杂过程, 是在多种病理作用如心肌梗死、高血压、瓣膜功能不全、传染性病原体和内分泌失调的刺激下产生的。在这些刺激作用下, 心肌细胞体积增大, 心脏质量增加以维持心

表 4 黄芪多糖对 LPS 诱导的心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 瞬间变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 4 Effect of APS on $[Ca^{2+}]_i$ transient change in cardiac myocytes induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	$\rho / (mg \cdot L^{-1})$	荧光强度			
		0 s	100 s	200 s	300 s
对照	—	1.13 $\pm$ 0.20	1.39 $\pm$ 0.34	5.72 $\pm$ 0.29**	7.09 $\pm$ 0.14**
黄芪多糖	10	1.22 $\pm$ 0.12	1.42 $\pm$ 0.35	3.67 $\pm$ 0.35***	1.44 $\pm$ 0.30##

与 0 s 时比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: ## $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs 0 s; ## $P < 0.01$ vs control group

脏正常的泵血功能。尽管心肌肥厚代表了一种适应性反应,但长期持续性心肌肥厚会诱发心脏发生失代偿反应,继而容易发展成心力衰竭甚至猝死^[7-8]。

LPS 是革兰氏阴性菌的主要致病成分,能够对机体造成广泛的损害和影响,心脏是最容易受累的器官之一,大约有 40%~50%的内毒素血症患者会出现心功能不全等症状,进而引起心脏肥大^[9]。LPS 可显著诱导病理性心肌肥厚,表现为心肌细胞体积增大,肌动蛋白丝重组,肥大指标如 ANP 和 BNP 上调^[10]。ANP 是由心肌细胞合成和分泌的一种循环激素,在心肌肥厚时,ANP 表达升高,被公认为是心肌肥大过程伴随的特征性变化指标^[11]。

TNF- α 是一种具有多种生物效应的炎症细胞因子,可增加肌动蛋白和肌球蛋白重链的合成,造成心肌细胞肥大。TNF- α 还可与 IL-1、IL-6 等共同作用,引起心肌细胞肥大,诱导心肌细胞发生凋亡^[12]。细胞内 Ca^{2+} 是心肌肥大的信号,在心脏肥厚和基因表达中发挥中心作用。 Ca^{2+} 信号的增加激活众多诱导心肌肥厚反应的下游信号因子,进而通过基因表达的方式将心肌细胞对肥厚刺激的反应表达出来^[13]。

本实验发现,黄芪多糖对 LPS 诱导的心肌肥大具有保护作用:(1)可不同程度地缩小肥大的心肌细胞体积,抑制 ANP mRNA 的表达;(2)通过降低 TNF- α 的量,抑制 LPS 致心肌细胞肥大的作用;(3)降低心肌细胞的含钙量,抑制钙超载。黄芪多糖能够有效地抑制心肌细胞的肥大,保护心肌细胞的活性,但与其相关的信号转导通路及能量代谢等方面的研究目前尚无相关报道,有待于深入研究。

参考文献

- [1] 梁丽娟,屠鹏飞,赵奎君. 黄芪多糖的药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2010, 21(43): 113-116.
- [2] 苏旭春,梁傍顺,郭晓东,等. 黄芪多糖对化疗后气虚证患者青紫舌的改善作用 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 106-107.

- [3] Yang Y F, Feng J O, Xu H Y, *et al.* Influence of different extraction and purification methods on astragalus polysaccharides and pharmacological evaluation [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 54-61.
- [4] Li T, Hu J, Thomas J A, *et al.* Differential induction of apoptosis by LPS and taxol in monocytic cells [J]. *Mol Immunol*, 2005, 42(9): 1049-1055.
- [5] 路景涛,杨 雁,陈敏珠. 黄芪多糖对细菌脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞释放 TNF α 、NO 及 IL-1 的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(2): 139-141.
- [6] 张朝云,叶红英,俞茂华,等. 黄芪多糖对糖尿病大鼠心肌超微结构的影响 [J]. 复旦学报: 医学版, 2001, 28(6): 476-478.
- [7] Towbin J A, Bowles N E. The failing heart [J]. *Nature*, 2002, 415: 227-233.
- [8] Hunter J J, Chien K R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure [J]. *N Engl J Med* 1999, 341: 1276-1283.
- [9] Parrillo J E, Parker M M, Natanson C, *et al.* Septic shock in humans: Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy [J]. *Ann Intern Med*, 1990, 113: 227-242.
- [10] Liu C J, Cheng Y C, Lee K W, *et al.* Lipopolysaccharide induces cellular hypertrophy through calcineurin/NFAT-3 signaling pathway in H9c2 myocardial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 313(1/2): 167-178.
- [11] Leite M F, Page E, Ambler S K. Regulation of ANP secretion by endothelin-1 in cultured atrial myocytes: desensitization and receptor subtype [J]. *Am J Physiol*, 1994, 267(6): 193-203.
- [12] 吴 杏,叶任高,汪 涛,等. TNF- α 、IL-1 β 、LPS 对心肌细胞影响的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(6): 929-934.
- [13] Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2003, 92(10): 1079-1088.