

丹酚酸 B 对异丙肾上腺素所致乳鼠心肌细胞肥大的保护作用

吴继超¹, 王彬², 田振¹, 张伟华^{1*}

1. 哈尔滨医科大学 病理生理教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081

2. 牡丹江医学院第二附属医院 医保科, 黑龙江 牡丹江 157015

摘要: **目的** 探讨丹酚酸 B 对异丙肾上腺素诱发的原代乳鼠心肌细胞肥大的保护作用及其机制。**方法** 用异丙肾上腺素诱导制备原代乳鼠心肌细胞肥大模型。MTT 法检测丹酚酸 B 对乳鼠心肌细胞活力的影响; RT-PCR 技术检测心肌肥厚指标心钠肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP) 基因表达; 分光光度法检测心肌细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性和丙二醛 (MDA) 的量; Western blotting 法测定心肌肥厚信号转导通路 JAK、STAT 蛋白的表达。**结果** 不同浓度的丹酚酸 B 对乳鼠心肌细胞的活力无明显影响。与模型组比较, 丹酚酸 B 浓度为 10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时明显下调 ANP、BNP 基因表达 ($P < 0.05$ 、 0.01); 显著增强 SOD 活性和降低 MDA 的量 ($P < 0.05$ 、 0.01); 显著下调 JAK1 与 STAT3 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 丹酚酸 B 能有效抑制异丙肾上腺素诱发的原代乳鼠心肌细胞肥大, 其机制可能与抗氧化应激以及抑制 JAK1/STAT3 信号通路有关。**关键词:** 丹酚酸 B; 异丙肾上腺素; 心肌细胞肥大; 氧化应激; JAK1/STAT3 信号通路

中图分类号: R972.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)17-2422-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.015

Protection of salvianolic acid B on isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy of neonatal rats

WU Ji-chao¹, WANG Bin², TIAN Zhen¹, ZHANG Wei-hua¹

1. Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

2. Department of Pediatrics of the Second Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157015, China

Abstract: Objective To observe the effects of salvianolic acid B (Sal B) on isoproterenol (ISO)-induced cardiomyocyte hypertrophy of neonatal rats and clarify the underlying mechanisms. **Methods** Hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes was induced by ISO. The effect of Sal B on the myocardial viability of neonatal rats was measured by MTT. The mRNA expression levels of ANP and BNP were detected by RT-PCR. Colorimetric method was employed to measure SOD activity and MDA content. The expression levels of JAK1 and STAT3 were assessed by Western blotting. **Results** Sal B at different concentration had no effect on the myocardial viability of neonatal rats. Compared with the model group, Sal B at 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ could obviously down-regulate the gene expression levels of ANP and BNP ($P < 0.01$, 0.05), significantly increase SOD activity, and decrease MDA content. The protein expression levels of JAK1/STAT3 were down-regulated ($P < 0.01$, 0.05). **Conclusion** Sal B could effectively inhibit ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy of neonatal rats and the mechanism may be related with the anti-oxidative stress and the inhibition of JAK1/STAT3 signaling pathway.

Key words: salvianolic acid B; isoproterenol; cardiomyocyte hypertrophy; oxidative stress; JAK1/STAT3 signaling pathway

心肌肥大(厚)是心脏对多种病理性刺激,如高血压、主动脉狭窄、瓣膜缺陷等的一种代偿性反应^[1-2]。心肌肥大最初是心脏对高负荷的一种代偿机制,心肌的持续肥大最终导致心脏功能下降,间质纤维化和心室扩张。大量临床研究表明,心肌肥大

是室性心律失常、心力衰竭、猝死等心血管事件的独立危险因素^[3]。因此,停止或逆转病理性心肌肥大具有重要的临床意义。丹酚酸 B 是从唇形科植物丹参的根及根茎提取的成分,具有降低心肌缺血再灌注损伤、抗心肌细胞损伤、保护血管内皮细胞、

收稿日期: 2012-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81170289, 81101164)

作者简介: 吴继超(1985—),男,助教,研究方向为中药与心血管病。Tel: 13836133806 E-mail: w-liccoism@163.com

*通信作者 张伟华,女,教授。E-mail: doris.cameron@yahoo.cn

防治动脉粥样硬化、改善肝脏纤维化和抗肿瘤等广泛生物活性^[4-9]。但关于丹酚酸 B 对心肌肥大影响的报道还较少。本实验采用异丙肾上腺素诱导原代乳鼠心肌细胞肥大模型,探讨丹酚酸 B 对心肌肥大的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹酚酸 B (质量分数≥95%), 陕西森弗高科实业有限公司, 批号 100522; 胰酶, Gibco 公司; SOD、MDA 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; JAK1 抗体、STAT3 抗体, Santa Cruz Biotechnology 公司; Trizol、RT-PCR 试剂盒和引物, Invitrogen 公司; SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒; 美国 Applied Biosystems 公司; DMEM、胎牛血清 (FBS), 赛默飞世尔生物化学制品有限公司; 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 引物, Invitrogen 公司; 其他试剂均采用国产分析纯。

1.2 动物

1~2 日龄 Wistar 乳鼠, 哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供, 许可证号 SCXK (黑) 20020002。

1.3 仪器

低温高速离心机, 日本日立 Hitachi 公司; 红外 LI-COR 线成像系统, Biosciences 公司; 超净操作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; CO₂ 培养箱, Thermo 公司; 电泳仪 DYY—6B、DYCZ—24D 型电泳槽、D—9405B 型水平摇床, 北京市六一仪器厂; PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司。

2 方法

2.1 原代乳鼠心肌细胞培养

取 Wistar 乳鼠, 75%乙醇皮肤消毒后剪除头部, 开胸取心脏, 放置装有 DMEM 的无菌玻璃平皿中洗净血污, 每个心脏剪成大小均匀的组织块, 将所有组织块转移至无菌离心管中, 加 0.25%胰酶在 37℃恒温水浴中振摇消化、自然沉降。收集细胞悬液于离心试管中, 加入等体积预冷细胞培养液 (DMEM+10% FBS) 混匀, 经 200 目无菌不锈钢网滤过后装置另一离心管中, 2 500 r/min 离心 2 min, 弃上清液, 沉淀加入培养液吹打均匀制成细胞悬液, 接种于细胞瓶中, 按差速贴壁分离法预接种。2 h 后将未贴壁细胞吸出, 在培养液中加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BRDU, 0.1 mmol/L), 48 h 后将培养液换为无血清的培养液, 饥饿 12 h。心肌细胞随机分

为 4 组: 对照组只加入培养液, 异丙肾上腺素 10 μmol/L (模型) 组、丹酚酸 B 10、20 μmol/L 与异丙肾上腺素共同给药组, 各组细胞给予相应物质后于培养箱中孵育 48 h, 备用。

2.2 MTT 法检测丹酚酸 B 对乳鼠心肌细胞活力的影响

以 1×10^4 /孔密度将原代乳鼠心肌细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔 180 μL, 再加入不同浓度的丹酚酸 B (10、20、40、80、100 μmol/L), 每个浓度均设 3 个复孔, 对照组加入等量培养液。培养 48 h 后, 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL, 充分混匀后继续培养 4 h, 250×g 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡使沉淀充分溶解, 酶标仪测各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.3 SOD 活性和 MDA 的量检测

取“2.1”项下各组细胞, 采用黄嘌呤氧化法检测 SOD 的活性, 采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 的量, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.4 RT-PCR 法检测心钠肽和脑钠肽基因表达

取“2.1”项下各组细胞, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录获得 cDNA, 采用 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 反应。反应体系 20 μL (10 μmol/L 上游引物、10 μmol/L 下游引物各 1 μL, SYBR Green Mix 10 μL, ddH₂O 7 μL, cDNA 1 μL)。反应条件: 预变性, 95℃、2 min; 变性, 95℃、30 s; 退火, 60℃、30 s; 延伸, 70℃、45 s; 末次延伸, 72℃、6 min; 共 35 个循环。内参 GAPDH 引物序列: 正向引物 5'-TCTACATGTTCCAGTATG-ACTC-3', 反向引物 5'-ACTCCACGACATACTCA-GCACC-3', 产物长度 195 bp; 心钠肽 (ANP) 引物序列: 正向引物 5'-CTCCGATAGATCTGCCCTC-TTGAA-3', 反向引物 5'-GGTACCGGAAGCTGTT-GCAGCCTA-3', 产物长度 300 bp; 脑钠肽 (BNP) 引物序列: 正向引物 5'-TTGGGCAGAAGATAGACCAGGAT-3', 反向引物 5'-GGTCTTCCTAAAACA-ACCTCA-3', 产物长度 259 bp。

2.5 Western blotting 法检测 JAK、STAT 蛋白表达

取“2.1”项下细胞, 提取蛋白, BCA 法测定蛋白的量, 以牛血清白蛋白作为标准。蛋白样品 60 μg 用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜上, 室温下在封闭液 [磷酸盐缓冲液 (PBS) + 5%脱脂奶粉] 中封闭 2 h, 加入 JAK1、

STAT3 一抗 (均以 GAPDH 作为内参), 4 ℃ 过夜, 用磷酸盐聚山梨酯缓冲液 (PBST) 冲洗 3 次 (每次 10 min), 加入二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h, PBST 冲洗 3 次, 红外线成像系统扫描。计算机选择扫描条带、背景校正后, 测定各条带的像素密度, 进行相对定量。

2.6 统计学处理

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 q 检验, 用 GraphPad Prism 5 分析软件分析程序。

3 结果

3.1 对异丙肾上腺素致原代乳鼠心肌细胞活力的影响

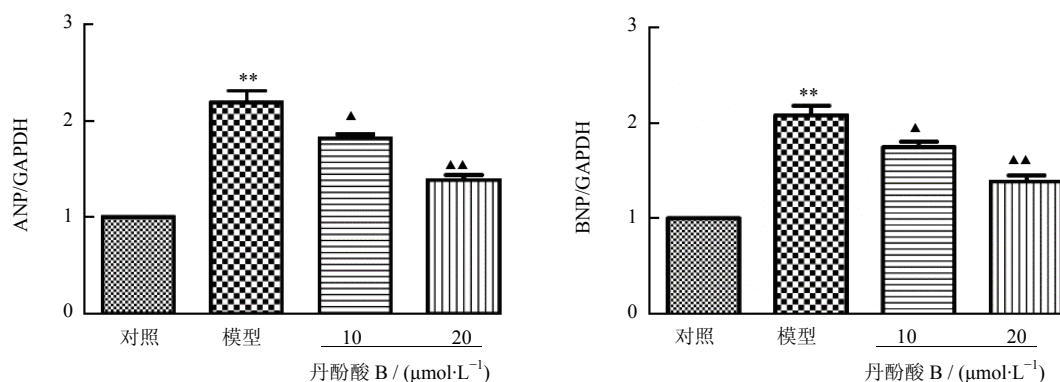
丹酚酸 B 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 以下对于原代乳鼠心肌细胞的活力无明显影响。

3.2 对异丙肾上腺素致原代乳鼠心肌细胞肥大时 SOD 活性和 MDA 量的影响

与对照组相比, 模型组乳鼠心肌 SOD 的活性显著降低 ($P < 0.01$), MDA 的量显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 丹酚酸 B 给药组乳鼠心肌 SOD 的活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), MDA 的量显著减少 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并呈浓度相关性。结果见表 1。

3.3 对异丙肾上腺素致原代乳鼠心肌细胞肥大时 ANP 和 BNP 基因表达的影响

ANP 和 BNP 是心肌肥大的重要标志物。与对照组相比, 模型组乳鼠心肌中 ANP、BNP 基因表达显著上调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 丹酚酸 B 给药组乳鼠心肌 ANP、BNP 基因表达显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并呈浓度相关性。结果见图 1。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

图 1 丹酚酸 B 对异丙肾上腺素致原代乳鼠心肌细胞肥大时 ANP、BNP 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effect of Sal B on mRNA expression levels of ANP and BNP in ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy of neonatal rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.4 对异丙肾上腺素致原代乳鼠心肌细胞肥大时 JAK 和 STAT 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组乳鼠心肌细胞用异丙肾上腺素培养 48 h 后, JAK1、STAT3 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 丹酚酸 B 给药组能抑制异丙肾上腺素引起 JAK1、STAT3 蛋白表达上调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并呈浓度相关性。结果见图 2。

4 讨论

心肌肥大是一个逐步发展的过程, 主要特征为心肌细胞体积增大、蛋白量增加、细胞间质增生和胚胎基因表达上调。胚胎基因 (如 ANP、BNP) 的表达通常发生在心脏的发育期, 在出生后则低表达

表 1 丹酚酸 B 对异丙肾上腺素致原代乳鼠心肌细胞肥大时 SOD 活性以及 MDA 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Sal B on SOD activity and MDA content in ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy of neonatal rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SOD / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA / ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	18.51 $\pm$ 1.03	3.21 $\pm$ 0.37
模型	—	13.71 $\pm$ 1.37**	5.72 $\pm$ 0.62**
丹酚酸 B	10	15.88 $\pm$ 1.28▲	4.71 $\pm$ 0.56▲
	20	16.72 $\pm$ 1.21▲▲	4.56 $\pm$ 0.49▲▲

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

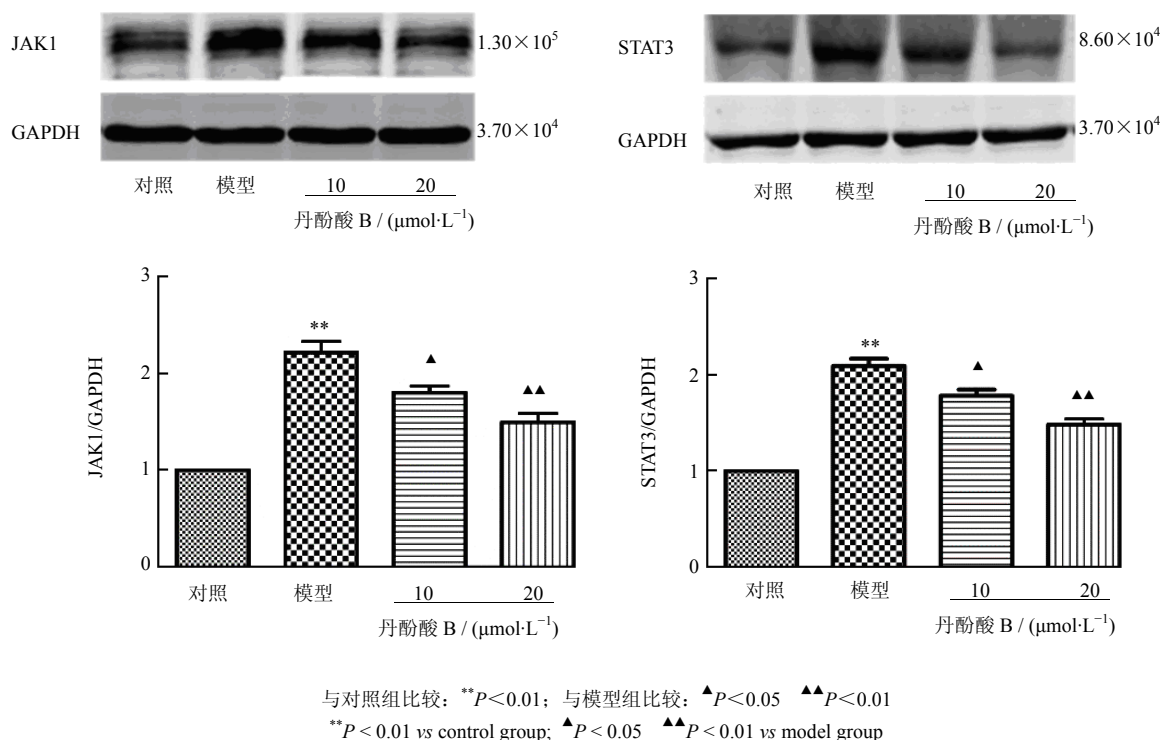


图 2 丹酚酸 B 对异丙肾上腺素致原代乳鼠心肌细胞肥大时 JAK1、STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 2 Effect of Sal B on protein expression of JAK1 and STAT3 in ISO-induced cardiomyocyte hypertrophy of neonatal rats ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

或者不表达。在各种心肌肥大因素的刺激下，胚胎基因被激活，表达上调，因此可将其作为心肌肥大重要的标志物^[10]。本实验结果表明，与对照组相比，模型组乳鼠心肌细胞 ANP、BNP 基因表达水平明显上调，表明模型制备成功。丹酚酸 B 可浓度相关地下调 ANP、BNP 基因表达水平，提示其对心肌肥大有一定的保护作用。心肌肥大的发生、发展过程与氧化应激密切相关，氧自由基的堆积可促进心肌肥大及纤维化^[11]。本实验发现，模型组乳鼠心肌细胞中的脂质过氧化物 MDA 的量明显增加，而氧自由基清除酶 SOD 得活性显著降低，进一步证实心肌肥大与氧化应激相关。丹酚酸 B 给药组乳鼠心肌细胞的氧化应激状态得到明显改善（即 SOD 活性下降和 MDA 量的降低），并呈浓度相关性，表明丹酚酸 B 可能通过清除氧自由基、提高心肌的抗氧化能力，预防和治疗心肌肥大。

JAK-STAT 是非受体性酪氨酸激酶，在心肌肥大的发生和发展中具有极为重要的作用。心肌细胞发生肥大、增生时，活化的 JAK 能够使 STAT 发生酪氨酸磷酸化而被激活，并从细胞质进入细胞核中，上调肥厚相关基因，诱发肥大应答^[12]。本实验结果

表明，丹酚酸 B 明显抑制异丙肾上腺素所诱发的 JAK1、STAT3 蛋白表达上调，并呈浓度相关性，提示丹酚酸 B 的抗心肌肥大作用可能与其抑制 JAK-STAT 信号转导通路有关。

综上所述，丹酚酸 B 能够通过改善氧化应激状态、抑制 JAK-STAT 信号转导通路，抑制异丙肾上腺素诱发的乳鼠心肌细胞肥大，且丹酚酸 B 在 100 μmol/L 以下对原代乳鼠心肌细胞的活力没有影响，这为其临床上用于治疗 and 预防心肌肥大提供了实验依据。对于丹酚酸 B 对大鼠心肌肥大保护作用及其确切机制，有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Reiter R J, Manchester L C, Fuentes-Broto L, et al. Cardiac hypertrophy and remodeling: pathophysiological consequences and protective effects of melatonin [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(Suppl 1): S7-S12.
- [2] Oka T, Komuro I. Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart failure [J]. *Circ J*, 2008, 72(Suppl A): A13-A16.
- [3] Creemers E E, Pinto Y M. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded

- heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(2): 265-272.
- [4] 杨宇杰, 程晓亮, 吕英超, 等. 双氢丹酚酸B对大鼠急性心肌缺血的治疗作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 447-449.
- [5] 刘杰, 高秀梅, 王怡, 等. 丹酚酸B对急性心肌缺血大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(3): 409-412.
- [6] 李津明, 王树瑶, 李敏, 等. 不同提取工艺的丹参提取物在大鼠体内的药动学研究 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(3): 332-336.
- [7] Wu Y T, Chen Y F, Hsieh Y J, *et al.* Bioavailability of salvianolic acid B in conscious and freely moving rats [J]. *Int J Pharm*, 2006, 326(1/2): 25-31.
- [8] Liu P, Hu Y Y, Liu C, *et al.* Clinical observation of salvianolic acid B in treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis B [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(4): 679-685.
- [9] Hao Y, Xie T, Korotcov A, *et al.* Salvianolic acid B inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo* via cyclooxygenase-2 and apoptotic pathways [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(9): 2200-2209.
- [10] Xiang W, Kong J, Chen S, *et al.* Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(1): E125-E132.
- [11] Takimoto E, Kass D A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling [J]. *Hypertension*, 2007, 49(2): 241-248.
- [12] Kodama H, Fukuda K, Pan J, *et al.* Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(4): 1635-1644.