

丹参酮 II A 对交感神经系统介导的 心肌细胞炎症反应的作用研究*

周文秀¹ 刘芳¹ 杨俊¹

[摘要] 目的:观察丹参酮 II A(STS)对交感神经系统介导的心肌细胞炎症反应的作用研究。方法:原代培养大鼠心肌细胞,使用不同浓度 STS 干预血管紧张素 II (Ang II)刺激的心肌炎症反应,Real-time PCR 及 ELISA 方法测定心肌细胞 TLR4、TNF- α mRNA 表达及细胞培养上清液 TNF- α 浓度,Western blot 检测细胞浆蛋白 I κ B- α 及细胞核蛋白 NF- κ B p65 表达。结果:不同浓度 STS 干预后,心肌细胞 TLR4、TNF- α mRNA 表达及 TNF- α 浓度下降,心肌细胞浆蛋白 I κ B- α 水平下降及核蛋白 NF- κ B p65 水平升高,随着干预浓度的升高,这种作用逐渐增强。结论:STS 对 Ang II 刺激心肌细胞引起的炎症反应有良好的保护作用,其机制与抑制细胞内 NF- κ B 激活,减少炎症因子分泌有关。

[关键词] 心肌细胞;丹参酮 II A;血管紧张素 II;肿瘤坏死因子

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2017.04.012

[中图分类号] R587.2 **[文献标志码]** A

Effect of sodium tanshinone II A sulfonate on the inflammatory reaction in cardiac muscle cells mediated by the sympathetic nervous system

ZHOU Wenxiu LIU Fang YANG Jun

(Department of Emergency, The Red Cross Hospital of Wuhan City, Wuhan 430015, China)

Abstract Objective: To observe the effect of sodium tanshinone II A sulfonate on the inflammatory reaction mediated by the sympathetic nervous system in cardiomyocytes. **Method:** The primary myocardial cells were cultured in vitro. Different concentration of tanshinone II A were performed to intervene the inflammatory response induced by angiotensin II. The expression of TLR4 and TNF- α mRNA were detected by real time PCR, and the level of TNF- α was measured by ELISA, and the expression of I κ B α and NF- κ B p65 were detected by Western blot. **Result:** The expression of TLR4 and TNF- α mRNA in cardiomyocytes, as well as the concentration of TNF- α in cell culture supernatant decreased. And the levels of myocardial plasma protein I kappa B alpha decreased and the levels of nuclear protein NF-kappa B p65 increased after application of the different concentration of tanshinone II A, and this effect was in a concentration-dependent manner. **Conclusion:** Sodium tanshinone II A sulfonate has a positive effect on the inflammatory response induced by Ang II stimulation in cardiomyocytes, and its mechanism might related to the inhibition of NF- κ B activation and the depression of secretion of inflammatory cytokines in the cells.

Key words cardiomyocytes; sodium tanshinone II A sulfonate; angiotensin II; tumor necrosis factor

丹参酮 II A(sodium tanshinone II A sulfonate, STS)是中药丹参最主要的活性成分,具有提高心肌成活率,抑制细胞凋亡,并对缺氧/复氧心肌细胞有保护作用^[1]。炎症在心血管病的发生发展中起重要作用。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)与心血管病炎症有关,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)与其受体结合后,可激活多种炎症因子,参与炎症损伤^[2]。本实验采用

Ang II 诱导 SD 大鼠心肌细胞炎症反应,研究 STS 对心肌细胞炎症反应的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

出生 2~3 d 的 SD 大鼠乳鼠,雌雄不拘,购自苏州大学实验动物中心(合格证号 SCXK(苏)2008-0005);丹参酮 II A 磺酸钠(上海第一生化药业有限公司),质量分数为 98%;Ang II (美国 Sigma 公司);PE 标记兔抗鼠 TLR 4 单克隆抗体,兔抗鼠 I κ B- α 抗体,兔抗鼠 NF- κ B p65 抗体(美国 Santa-cruz 公司);Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);

* 基金项目:湖北省武汉市临床医学科研项目(No: WX14C34)

¹湖北省武汉市红十字会医院急诊科(武汉,430015)

大鼠 TNF-α ELISA 试剂盒(美国 BD Biosciences 公司)。

1.2 心肌细胞培养

无菌条件下开胸取出 SD 乳鼠心脏,仔细分离左室心肌,眼科剪将其剪成 0.5~1 mm³ 大小的组织块后用胰蛋白酶分次消化,差速贴壁法分离成纤维细胞。调整细胞浓度为 1×10⁹ cells/L,接种到培养瓶,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。

1.3 分组及给药

常规培养心肌细胞 72 h 后,将心肌细胞分为 5 组:①对照组:不做任何处理;②Ang II 刺激组:用 Ang II 10⁻⁶ mol/L 作用于乳鼠心肌细胞;③低溶度 STS 干预组:用 STS 2 μmol/L 孵育乳鼠心肌细胞 30 min 后,再加入 10⁻⁶ mol/L Ang II;④中溶度 STS 干预组:用 STS 10 μmol/L 孵育乳鼠心肌细胞 30 min 后,再加入 10⁻⁶ mol/L Ang II;⑤高溶度 STS 干预组:用 STS 50 μmol/L 孵育乳鼠心肌细胞 30 min 后,再加入 10⁻⁶ mol/L Ang II。各组细胞加药后继续培养 24 h。

1.4 Real-time PCR 检测心肌细胞 TLR4、TNF-α mRNA 表达

各组心肌细胞继续培养 24 h 后,Trizol 试剂盒抽提各组心肌细胞的总 RNA;取 4 μl RNA 模板进行逆转录合成 cDNA(37℃ 1 h,95℃ 3 min)。扩增内参 GAPDH 上游引物序列为:5'-ACAGCAA-CAGGGTGGTGGAC-3',下游引物序列为:5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3';扩增 TLR4 上游引物序列为:5'-GAATCTCAGCAAATC-CCTCA-3',下游引物序列为:5'-TCCTGGG-GAAAACTCTTGAT-3';扩增 TNF-α 上游引物序列为:5'-CATGGATCTCAAAGACAACCAA-3',下游引物序列为:5'-CTCCTGGTATGAAATG-GCAAAT-3'。采用 ABI7500 型定量 PCR 仪检测基因表达,结果按目的基因/内参基因比值换算。

1.5 各组细胞培养上清液 TNF-α 浓度的测定

各组心肌细胞继续孵育 24 h 后,收集上清液,采用 ELISA 试剂盒测定 TNF-α 浓度,实验步骤严格按照试剂盒操作说明进行。

1.6 Western blot 检测细胞浆蛋白 IκB-α 及细胞核蛋白 NF-κB p65 表达

各组心肌细胞继续培养 24 h 后,提取蛋白,BCA 法定量,调整浓度煮沸灭活待用。采用 Western blot 法^[2]检测细胞浆蛋白 IκB-α 及细胞核蛋白 NF-κB p65 表达,ECL 法曝光显影,采用 gel pro-4.0 软件进行条带灰度的分析。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因

素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心肌细胞 TLR4、TNF-α mRNA 的表达

Real-time PCR 检测结果显示,与对照组比较,Ang II 刺激组心肌细胞 TLR4 mRNA、TNF-α mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$);中、高溶度 STS 干预后心肌细胞 TLR4、TNF-α mRNA 表达较 Ang II 干预组显著下降 ($P < 0.05$)。且随着干预浓度的升高,TLR4、TNF-α mRNA 表达逐渐下降。见表 1。

表 1 各组心肌细胞 TLR4、TNF-α mRNA 的表达

组别	TLR4 mRNA	TNF-α mRNA
	表达	表达
对照组	1 ¹⁾	1 ¹⁾
Ang II 刺激组	12.24 ± 1.04	2.15 ± 0.10
低溶度 STS 干预组	10.92 ± 1.05	1.95 ± 0.11
中浓度 STS 干预组	9.04 ± 0.58 ¹⁾	1.50 ± 0.05 ¹⁾
高浓度 STS 干预组	7.22 ± 0.37 ¹⁾	1.31 ± 0.03 ¹⁾
F	51.92	56.42
P	<0.001	<0.001

与 Ang II 刺激组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 各组心肌细胞培养上清液 TNF-α 浓度

与对照组比较,Ang II 刺激组上清液 TNF-α 浓度显著增加 ($P < 0.05$);中、高溶度 STS 干预后上清液 TNF-α 浓度较 Ang II 刺激组显著下降 ($P < 0.05$);且随着干预浓度的升高,TNF-α 浓度逐渐下降。见表 2。

表 2 各组心肌细胞培养上清液 TNF-α 的浓度

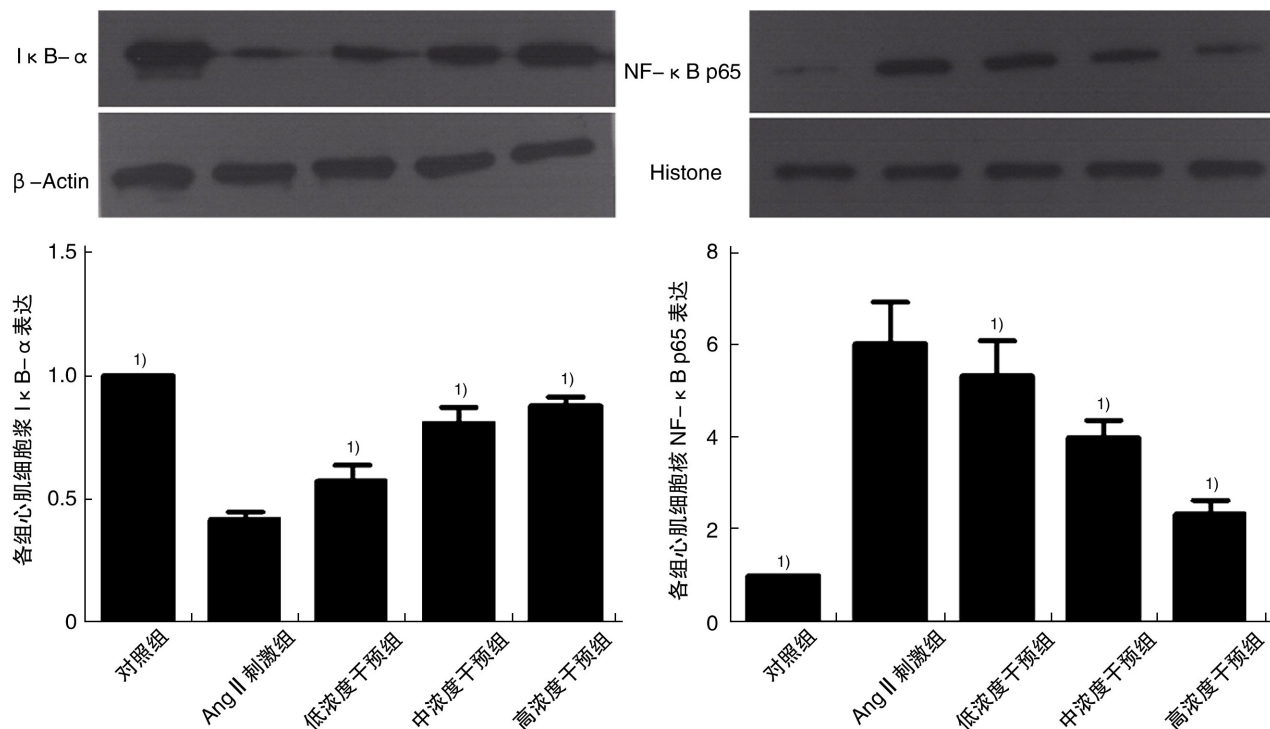
组别	TNF-α
	pg/ml, $\bar{x} \pm s$
对照组	70.48 ± 5.42 ¹⁾
Ang II 刺激组	153.88 ± 18.52
低溶度 STS 干预组	124.52 ± 13.40
中浓度 STS 干预组	101.28 ± 8.85 ¹⁾
高浓度 STS 干预组	90.41 ± 7.62 ¹⁾
F	11.37
P	0.001

与 Ang II 刺激组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 各组细胞浆蛋白 IκB-α 及核蛋白 NF-κB p65 水平

对照组心肌细胞浆蛋白 IκB-α 水平最高,而核蛋白 NF-κB p65 水平最低,Ang II 刺激组心肌细胞浆蛋白 IκB-α 最低,而核蛋白 NF-κB p65 水平最高 ($P < 0.05$)。不同浓度 STS 干预后,STS 可抑制 Ang II 所致的 NF-κB 的激活,随浓度增加,这种抑

制作用越强,见图 1。



与 Ang II 刺激组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠心肌细胞浆 IκB-α 和核蛋白 NF-κB p65 表达水平比较

3 讨论

RAS 在心血管系统中发挥着重要作用。Ang II 是 RAS 的主要效应分子,参与了心血管系统生理和神经调节的全过程,与心脏疾病的发展密切相关^[3]。Ang II 生物学功能主要体现在调节血管张力和血流、促进细胞生长和增生。研究发现,Ang II 还具有致炎作用。Ang II 可以通过调节细胞因子、化学趋化因子和黏附因子等多种炎症递质的表达参与机体炎症反应相关疾病的发生和发展,在动脉粥样硬化、心肌肥厚等心血管疾病中 Ang II 除起到生长因子作用外还发挥着炎症因子的作用^[4-5]。

TLR4 属于跨膜信号传递受体家族,通过传递炎症信号,在免疫反应中起着重要作用。TLR4 与其配体相互作用下,通过胞内区与接头蛋白髓样细胞分化因子 (myeloid differentiation factor, MyD88) 的 TH 结构域相互作用,最终使胞浆内 NF-κB 从静息状态下激活,活化的 NF-κB 转移到细胞核内与 DNA 分子上炎症反应调节基因中启动子区域的 NF-κB 结合位点相结合,启动细胞因子 (IL-6、TNF-α 等) 以及协同刺激因子 CD86 等基因转录和翻译,导致炎症因子大量释放^[6]。TLR4 可在心肌细胞膜上表达,Ang II 可通过 TLR4 活化 NF-κB,使心肌细胞内 TNF-α 表达增加,诱导心肌细胞炎症反应^[7]。

STS 是传统中药丹参的有效成分,近来研究发

现 STS 有消炎抗菌、抗病毒、调节免疫、抗肿瘤及抗氧化等作用,可减轻巨噬细胞产生的炎症因子 NO、TNF-α 和 IL-6 的表达,阻碍 NF-κB 与 DNA 相结合,抑制 NF-κB 下游基因的转录,可从多途径多靶点发挥抗炎、抗氧化、调节免疫等作用,从而维持心血管系统的正常结构和功能^[1]。本实验采用 Ang II 刺激心肌细胞后,TLR4 表达增加,同时胞浆内 NF-κB 激活,使胞浆内 IκB-α 表达下降,细胞核内 NF-κB p65 表达增加,同时 TNF-α 分泌增多,表明 Ang II 刺激可引起心肌细胞炎症反应,这与既往研究相似^[8]。加用 STS 后,心肌细胞 TLR4 表达下降,胞浆内 NF-κB 激活受到抑制,TNF-α 分泌下降,随着剂量增加,该作用逐渐增强,表明 STS 可抑制 Ang II 刺激心肌细胞引起的炎症反应。

早期研究表明,在许多组织或器官,如肾脏、心脏和血管中存在着独立的局部 RAS,局部组织中的 Ang II 具有胞内作用,可促进心肌细胞的 DNA 合成,mRNA 转录,导致细胞肥大^[9]。正常心肌组织中 TNF-α 表达水平较低或不表达,肥厚心肌组织 TNF-α 表达明显增加^[10]。Sriramula 等^[11] 在动物实验研究发现,TNF-α 敲除大鼠相比野生型大鼠由 Ang II 诱导的心肌肥厚明显降低,提示 TNF-α 在 Ang II 诱导的心肌肥厚中起重要作用。Devorah 等^[12] 报道 TNF-α 使心肌中成纤维细胞的 Ang II AT1 受体上调,二者均可以在心肌组织局部合成成分

泌,具有自分泌和旁分泌作用,共同参与心肌病变的进展和演变过程。

综上所述,STS对Ang II刺激心肌细胞引起的炎症反应有良好的保护作用,其机制与抑制细胞内NF- κ B激活,减少炎症因子分泌有关。STS的这种作用为交感神经调节的炎症性心肌损害的防治研究提供了新的思路和理论依据,今后仍需对这一机制进行进一步的探讨。

参考文献

[1] 闫俊,冯娟,杨雪,等.丹参酮II A的药理作用及疾病治疗的最新进展[J].实用药物与临床,2015,18(8):972-977.

[2] Holownia A,Braszko J J. The effect of angiotensin II and IV on ERK1/2 and CREB signalling in cultured rat astroglial cells[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2007,376(3):157-163.

[3] Rodriguez I B,Vaziri N D,Johnson R J. Inflammation, angiotensin II, and hypertension [J]. Hypertension, 2008, 52(5):135-136.

[4] De Giusti V C,Garciarena C D,Aiello E A. Role of reactive oxygen species (ROS) in angiotensin II-induced stimulation of the cardiac $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport[J]. J Mol Cell Cardiol,2009,47(5):716-722.

[5] Kaczorowski D J,Nakao A,Vallabhaneni R, et al. Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart[J]. Transplantation,2009,87(10):1455-1463.

[6] Bernard N J,O'Neill L A. Mal, more than a bridge to MyD88[J]. IUBMB Life,2013,65(9):777-786.

[7] Wang J,Zhang Y,Guo L L,et al. Salvianolic acid B inhibits the TLR4-NF- κ B-TNF α pathway and attenuates neonatal rat cardiomyocyte injury induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(10):775-779.

[8] Yu L,She T,Li M,et al. Tetramethylpyrazine inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy and tumor necrosis factor- α secretion through an NF- κ B-dependent mechanism[J]. Int J Mol Med,2013,32(3):717-722.

[9] Griendling K K,Murphy T J,Alexander R W. Molecular biology of the renin-angiotensin system[J]. Circulation,1993,87(6):1816-1828.

[10] Wu Q Q,Xu M,Yuan Y,et al. Cathepsin B deficiency attenuates cardiac remodeling in response to pressure overload via TNF- α /ASK1/JNK pathway[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2015,308(9):H1143-H1154.

[11] Sriramula S,Haque M,Maild D S,et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in angiotensin II-mediated effects on appetite,hypertension and cardiac hypertrophy[J]. Hypertension,2008,51(5):1345-1351.

[12] Devorah G,Randy T,Francisco J,et al. Tumor necrosis factor- α upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts[J]. Circ Res,1999,85(3):272-279.

(收稿日期:2017-03-08)

第六届老年急重症暨容量管理论坛通知

随着人口老龄化的提前到来,带病生存的老年人也越来越多,已成为重要的公共卫生问题。由于老年人机体组织与器官结构及其生理功能均有一定程度的老化,免疫功能、抗病能力及应急反应减弱,一旦出现疾病,易累及多器官系统,致使临床诊治的困难增加,死亡率增高。我们在从事急危重症临床和研究的专家、同道的热情支持以及积极参与下,成功举办了五届有关老年急危重症和容量管理的国家级继续医学教育项目,参会者普遍反映论坛内容新颖,居学术前沿,理论与实践和临床病例讨论相结合,受益匪浅。

今年6月10日~11日,北京医院急诊科与中国医疗保健国际交流促进会急诊急救分会在北京共同主办国家级继续医学教育项目"第六届老年急重症暨容量管理论坛"。此次论坛将在以往聚焦容量管理的基础上,结合国内外最新的相关指南和临床研究,更加广泛地讨论老年急危重症临床问题,更加贴近临床实际,针对热点问题进行学术研讨。

您的支持与参与,将助力论坛充分地交流、开拓思路!由此,诚挚地邀请并期待您的光临!

会议时间:2017年6月10-11日(周六全天至周日上午)

报到时间:2017年6月9日(周五)

会议地点:北京医院诊疗楼7层·学术报告厅

会议地址:北京市东城区东单大华路1号

联系人:冯光宇 18601184000

温伟 13811830971

北京医院急诊科

中国医疗保健国际交流促进会急诊急救分会

2017年3月2日