

· 基础研究 ·

通心络干预心肌微血管内皮细胞条件培养液
对心肌细胞的保护作用位 庚^{1,2} 常丽萍^{1,3} 尹玉洁⁴ 张月霞² 梁小华² 梁俊清³

摘要 **目的** 观察心肌微血管内皮细胞条件培养液对心肌细胞的影响及通心络的干预作用。**方法** 制备 3 种心肌微血管内皮细胞条件培养液:正常内皮细胞条件培养液(N-CM),同型半胱氨酸诱导损伤的心肌微血管内皮细胞条件培养液(H-CM)和通心络干预的心肌微血管内皮细胞条件培养液(T-CM)。将心肌细胞随机分为 4 组:正常对照组、N-CM 组、T-CM 组及 H-CM 组,采用相应培养液培养。倒置显微镜观察心肌细胞形态,酶联免疫吸附法检测细胞上清液心肌肌钙蛋白 T(cTnT)含量,JC-1 试剂盒测定细胞中线粒体膜电位(MMP),Western blot 法检测细胞色素 C(Cyt C)和钙网蛋白(CRT)蛋白表达。**结果** 与正常对照组比较,N-CM 组细胞形态无明显变化,细胞上清液 cTnT 含量、MMP 水平、CRT 及 Cyt C 蛋白表达无明显变化($P > 0.05$);与 N-CM 组比较,H-CM 组细胞皱缩,细胞边缘模糊,有大量坏死细胞漂浮,细胞上清液 cTnT 含量、CRT 及 Cyt C 蛋白表达升高,MMP 水平降低($P < 0.01$);与 H-CM 组比较,T-CM 组细胞无明显皱缩,细胞边缘较清楚,坏死漂浮细胞减少,细胞上清液 cTnT 含量、CRT 及 Cyt C 蛋白表达降低,MMP 水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 受损心肌微血管内皮细胞的条件培养液可损伤心肌细胞,其损伤机制可能与 CRT 介导的线粒体功能受损有关,通心络可抑制该损伤过程。

关键词 通心络;心肌微血管内皮细胞;心肌细胞;共培养;线粒体;钙网蛋白

Protective Effects on Cardiomyocytes by the Conditioned Medium of Cardiac Microvascular Endothelial Cells Treated with Tongxinluo WEI Geng^{1,2}, CHANG Li-ping³, YIN Yu-jie⁴, ZHANG Yue-xia², LIANG Xiao-hua², and LIANG Jun-qing³ 1 National Key Laboratory of Collateral Disease Research and Innovative Chinese Medicine, Shijiazhuang (050035); 2 Department of Endocrinology, The Second Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang (050051); 3 Hebei Yiling Institute of Pharmaceuticals, Shijiazhuang (050035); 4 Department of Graduate School, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang (050090)

ABSTRACT **Objective** To investigate the influence of conditioned medium of cardiac microvascular endothelial cells on cardiomyocytes and the protective effect of Tongxinluo. **Methods** Three kinds of conditioned cardiac microvascular endothelial cell conditioned medium were prepared: the normal cardiac microvascular endothelial cell-conditioned medium (normal-conditioned medium, N-CM), the homocysteine-induced microvascular endothelial cell-conditioned medium (homocysteine-conditioned medium, H-CM) and the cardiac microvascular endothelial cell-conditioned medium with Tongxinluo (Tongxinluo-conditioned medium, T-CM). The cardiomyocytes were randomly divided into four groups: the normal group, the N-CM group, the T-CM group and the H-CM group, corresponding conditioned medium were used to culture cardiomyocytes. The morphology of cardiomyocytes were observed with an inverted microscope, the contents of cardiac troponin T (cTnT) in cell supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, the mitochondrial membrane potential (MMP) of the cells were detected by JC-1

基金项目:国家重点基础研究发展计划(No. 2012CB518600);石家庄市科学技术研究与发展计划项目(No. 161462343)

作者单位:1. 络病研究与创新中药国家重点实验室(石家庄 050035);2. 石家庄市第二医院内分泌科(石家庄 050051);3. 河北以岭医药研究院(石家庄 050035);4. 河北中医学院研究生学院(石家庄 050090)

通讯作者:梁俊清, Tel: 0311-66703020, E-mail: liangjunqing@yiling.cn

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20171010. 235

reagent, and the protein expression levels of Cytochrome C (Cyt C) and calreticulin (CRT) were detected by Western blot. Results Compared with the normal group, the cells morphology, the contents of cTnT in cell supernatant, the MMP, and the protein expression levels of Cyt C and CRT did not significantly changed in the N-CM group ($P > 0.05$). Compared with N-CM group, the cells were shrinkaged, the cell edge was fuzzy, and there were a large number of dead cells floated in conditioned medium, the contents of cTnT in cell supernatant was increased, and the protein expression levels of Cyt C as well as CRT were up-regulated, while the MMP was decreased in the H-CM group ($P < 0.01$). Compared with H-CM group, there was no obvious change in morphology, the cell edge was clear, and the dead cells floated in culture medium were decreased, the contents of cTnT in cell supernatant was decreased, and the protein expression levels of Cyt C as well as CRT were down-regulated, while MMP was increased in the H-CM group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion The cardiac microvascular endothelial cells injury can damage cardiomyocytes, and the underlying mechanism may be related to the damage of mitochondria by CRT, which can be inhibited by Tongxinlou.

KEYWORDS Tongxinluo; cardiac microvascular endothelial cells; cardiomyocytes; co-culture; mitochondrial membrane potential; calreticulin

心肌微血管内皮细胞不仅可以控制微循环血流,为心肌细胞供血供氧,而且还是重要的代谢和内分泌器官,心脏微血管内皮细胞通过旁分泌和自分泌功能,在心肌生长发育,组织代谢,收缩功能以及节律控制方面起着重要作用^[1]。已有研究表明,心肌微血管内皮细胞结构和功能破坏成为急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)无再流和再灌注损伤、AMI后心律失常及心力衰竭病理过程的重要机制,而且AMI后大部分患者出现心肌电重构、组织重构、神经重构,而导致心律失常的发生,同时AMI患者由于心肌细胞凋亡、炎性损伤、神经内分泌激活进而发生心室重构最终出现心力衰竭^[2,3]。因此深入探讨受损心肌微血管内皮细胞对心肌细胞的影响,对阐明上述疾病的病理过程中微血管发病机制,寻找有效干预措施和药物具有重要意义。

材料与方法

1 动物 2 周龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 10 只,体重(30 ± 5)g,由北京富豪实验动物养殖中心提供,许可证号:SCXK(京)2011-0012。动物实验通过河北省中西医结合医药研究院伦理委员会审核,审批号:N2013089。

2 细胞 大鼠胚胎心肌细胞 H9C2(货号:GNR 5)购自中国科学院细胞库。

3 药物 通心络(简称 TXL,由人参、水蛭、全蝎、麝虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、酸枣仁、檀香、降香、乳香及冰片组成,每克药粉含生药 1.47 g),由石家庄以岭药业股份有限公司提供,批号:S-130901。

4 试剂及仪器 同型半胱氨酸(美国 Sigma 公

司);内皮细胞培养套装(美国 Sciencell 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);大鼠心肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)试剂盒(南京建成生物工程研究所);JC-1 线粒体膜电位分析试剂盒(美国 Cayman 公司);calreticulin 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Abcam 公司);细胞色素 C 兔抗鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。PrimoVert 倒置显微镜(德国 Zeiss 公司);多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司);UVP 凝胶扫描系统(美国 UVP 公司);电转膜仪、半干转膜仪、垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

5 方法

5.1 原代大鼠心肌微血管内皮细胞分离、培养和鉴定 参照文献[4]并加以改进提取大鼠心肌微血管内皮细胞(rat cardiac microvascular endothelial cells, RCMECs),并用参考文献[5]的方法进行鉴定。提取的原代 RCMECs 经 CD31 免疫荧光鉴定显示纯度 >95%。

5.2 大鼠心肌微血管内皮细胞损伤模型的建立 取对数生长期 RCMECs,胰酶消化后,调整细胞密度为 1.0×10^5 个/mL,种于 6 cm 细胞培养皿中,待细胞生长至 80% 融合时,弃去旧培养基,更换含 10 mmol/L 同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的内皮细胞基础培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中继续培养 24 h^[4]。

5.3 大鼠心肌微血管内皮细胞条件培养液的制备 取对数生长期 RCMECs,0.25% 胰蛋白酶消化后,调整细胞浓度为 1.0×10^5 个/mL,接种于 6 cm 细胞培养皿中,待细胞生长至 80% 融合时用于实验。制备 3 种 RCMECs 条件培养液:(1)正常 RCMECs 条

件培养液(N-CM):弃去原培养基,换为内皮细胞基础培养基;(2)Hcy 诱导损伤的 RCMECs 条件培养液(H-CM):弃去原培养基,换为含 10 mmol/L Hcy 的内皮细胞基础培养基;(3)TXL 干预的 RCMECs 条件培养液(TXL-conditioned medium,T-CM):弃去原培养基,换为含 400 μg/mL TXL 的内皮细胞基础培养基预孵育 4 h 后,最后换为含 10 mmol/L Hcy 和 400 μg/mL TXL 的内皮细胞基础培养基。各组细胞处理完毕置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,弃去上清液,加入 DMEM 无血清培养基,置于培养箱中继续培养 6 h,收集各组细胞上清液,离心取上清,获得各组微血管内皮细胞条件培养液。

5.4 H9C2 心肌细胞分组及处理 取对数生长期 H9C2 心肌细胞,胰酶消化后,调整细胞密度为 1.0 × 10⁵ 个/mL,接种于 6 cm 细胞培养皿/96 孔细胞培养板中,待细胞生长至 80% 融合时用于实验。将 H9C2 心肌细胞分为 4 组(每组设 3 ~ 4 个平行复孔):(1)正常对照组:弃去原培养基,换为 DMEM 无血清培养基;(2)N-CM 组:弃去原培养基,换为正常 RCMECs 条件培养液;(3)H-CM 组:弃去原培养基,换为 Hcy 诱导损伤的 RCMECs 条件培养液;(4)T-CM 组:弃去原培养基,换为 TXL 干预的 RCMECs 条件培养液。4 组细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后,进行指标检测。

5.5 倒置显微镜观察 H9C2 心肌细胞形态 H9C2 心肌细胞按“5.4”处理后,倒置显微镜下观察各组 H9C2 心肌细胞形态,并拍摄照片。

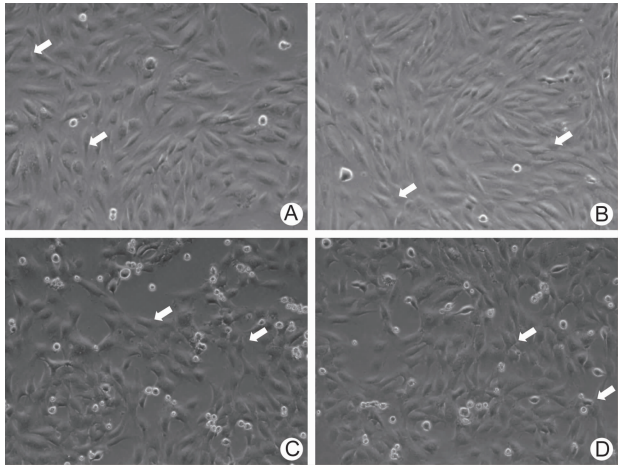
5.6 H9C2 心肌细胞上清液 cTnT 含量、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)测定 接种于 96 孔细胞培养板培养的 H9C2 心肌细胞按“5.4”处理结束后,酶联免疫吸附法检测细胞上清液 cTnT 含量,JC-1 试剂盒测定细胞中线粒体膜电位,实验操作步骤严格按说明书进行。

5.7 钙网蛋白(calreticulin, CRT)及细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)蛋白表达 采用 Western blot 法检测。接种于 6 cm 细胞培养皿培养的 H9C2 心肌细胞按“5.4”处理结束后,吸净上清,加入 40 μL 细胞裂解液于冰上充分裂解 20 min,超声破碎后 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,收集上清取 2 μL 进行蛋白定量后,取等量蛋白样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转膜后封闭,与一抗结合,4 ℃ 过夜后洗膜,与二抗结合,洗膜后用化学发光法检测,以 GAPDH 作为内参,以各目的蛋白吸光度值与 GAPDH 吸光度值的比值进行统计分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著差法(LSD),若方差不齐采用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞形态学观察(图 1) 正常对照组细胞呈短梭形或不规则三角形,边缘清楚;与正常对照组比较,N-CM 组细胞形态无明显变化;与 N-CM 组比较,H-CM 组细胞皱缩,细胞边缘模糊,有大量坏死细胞漂浮;与 H-CM 组比较,T-CM 组细胞无明显皱缩,细胞边缘较清楚,坏死漂浮细胞减少。



注:A 为正常对照组;B 为 N-CM 组;C 为 H-CM 组;D 为 T-CM 组;箭头所指为典型变化处

图 1 倒置显微镜观察各组细胞形态 (×200)

2 各组细胞上清液 cTnT 含量及 MMP 水平比较(表 1) 与正常对照组比较,N-CM 组细胞上清液 cTnT 含量及 MMP 水平无明显变化($P > 0.05$);与 N-CM 组比较,H-CM 组细胞上清液 cTnT 含量升高,MMP 水平降低($P < 0.01$);与 H-CM 组比较,T-CM 组细胞上清液 cTnT 含量降低,MMP 水平升高($P < 0.01$)。

表 1 各组细胞上清液 cTnT 含量及细胞 MMP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cTnT (ng/mL)	MMP
正常对照	4	35.13 ± 1.66	4.36 ± 0.34
N-CM	4	34.99 ± 1.16	4.52 ± 0.30
H-CM	4	40.58 ± 1.78*	2.50 ± 0.28*
T-CM	4	37.03 ± 0.99 ^Δ	4.04 ± 0.40 ^Δ

注:与 N-CM 组比较,* $P < 0.01$;与 H-CM 组比较,^Δ $P < 0.01$

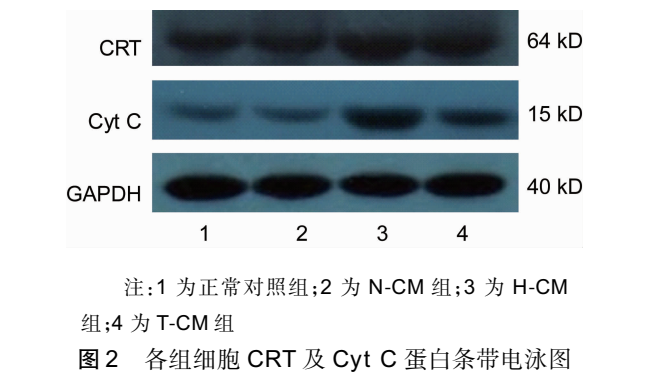
3 各组细胞 CRT 及 Cyt C 蛋白表达比较(表 2,

图 2) 与正常对照组比较, N-CM 组细胞 CRT 及 Cyt C 蛋白表达无明显变化($P > 0.05$); 与 N-CM 组比较, H-CM 组细胞 CRT 及 Cyt C 蛋白表达升高($P < 0.01$); 与 H-CM 组比较, T-CM 组细胞 CRT 及 Cyt C 蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组细胞 CRT 及 Cyt C 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CRT	Cyt C
正常对照	3	0.58 ± 0.03	0.13 ± 0.01
N-CM	3	0.58 ± 0.02	0.13 ± 0.01
H-CM	3	0.71 ± 0.07 *	0.27 ± 0.02 *
T-CM	3	0.60 ± 0.04 $\Delta\Delta$	0.21 ± 0.01 Δ

注: 与 N-CM 组比较, * $P < 0.01$; 与 H-CM 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



讨 论

心肌微血管位于循环系统的末梢,管壁主要由一层内皮细胞和基膜组成,是心脏微循环的重要组成部分。心肌微血管不仅为心肌细胞运输血氧和营养物质,还通过旁分泌的作用调节心肌细胞的发育和收缩。这与中医学络学说关于“孙络—微血管”末端营卫“由络以通、交会生化”而发生形气转换的气、血、津液、精等物质代谢与能量转换的认识是相一致的。“络以通为用”为络病病变的总体治疗原则,通心络为其代表方药,由人参、赤芍、降香、全蝎、水蛭、麝虫、蝉蜕、蜈蚣、檀香、酸枣仁、乳香及冰片组成,具化瘀通络、益气活血等功效,已广泛应用于心脑血管疾病的防治,尤其对微血管具有明显的保护作用^[4,6,7]。因此本研究选用通心络为干预药物,从络学说“孙络—微血管”保护切入,研究其对心肌细胞的间接保护作用。

cTnT 在临床已广泛应用,成为诊断心肌损伤的具有一定特异性、敏感性的标志物^[8]。结合细胞形态学变化,本研究中 N-CM 组细胞形态及细胞上清液中 cTnT 含量与正常对照组比较无明显变化,说明正常 RCMECs 条件培养液可维持 H9C2 心肌细胞形态及

内环境的稳定。而 H-CM 组细胞核浓缩,细胞边缘模糊,有大量坏死细胞漂浮,细胞上清液中 cTnT 含量明显高于 N-CM 组,说明细胞受损严重。H-CM 组所应用的条件培养液,由于 Hcy 损伤的 RCMECs 其分泌功能受损,导致一氧化氮分泌量减少,IL-6 和细胞间黏附分子-1 分泌量增加,氧化应激产物增加^[6,9],使得条件培养液中营养物质减少,有害物质增加,导致 H9C2 心肌细胞受损。高效液相色谱和气相色谱的指纹图谱技术证实,通心络的主要成分为芍药苷、人参皂甙 Rg1、人参皂甙 Rb1、酸枣仁皂甙 A、酸枣仁皂甙 B、异冰片及冰片。有研究表明,芍药苷可减轻内皮细胞的炎症反应^[10],人参皂甙 Rg1、人参皂甙 Rb1 对内皮细胞有明显的保护作用^[11,12]。因此 T-CM 组应用的条件培养液中通心络保护了 RCMECs,减少有害物质的分泌,故 H9C2 心肌细胞损伤程度明显减轻。

线粒体存在于大多数细胞中,是细胞进行有氧呼吸的主要场所,对细胞受到的损伤较为敏感。氧化应激、再灌注损伤和 Ca^{2+} 超载等多种细胞死亡信号的刺激可使横跨线粒体内、外膜的线粒体通透性转换孔保持持续开放,通透性增加, MMP 下降,导致跨膜的氢离子浓度梯度消失,引起呼吸链脱偶联,此时线粒体发生渗透性水肿,外膜破裂,使存在于线粒体内的 Cyt C 释放入胞质^[13],导致线粒体内的 Cyt C 减少,直接造成了线粒体内呼吸链电子传递的中断,抑制氧化磷酸化,促进了氧自由基的生成,继而 ATP 含量减少,可最终导致细胞损伤乃至坏死^[14]。研究发现,线粒体功能损伤在心肌细胞中可影响到细胞的损伤、坏死及凋亡的发生^[15]。本研究 MMP、Cyt C 的结果显示, H-CM 组细胞 MMP 降低, Cyt C 蛋白表达增加; T-CM 组细胞 MMP 升高和 Cyt C 蛋白表达减少,说明通心络改善内皮细胞分泌功能后可有效减轻线粒体的损伤状态。

CRT 存在于细胞的内质网中,结合钙的能力极强,是内质网的主要钙离子结合蛋白,在心血管疾病发生发展中的作用备受重视^[16]。本研究采用 Western blot 法对 CRT 蛋白进行检测,结果显示 H-CM 组细胞 CRT 蛋白表达明显升高,与 H-CM 组比较, T-CM 组细胞 CRT 蛋白表达降低。CRT 维持了细胞内 Ca^{2+} 的稳态、调节细胞黏附、蛋白折叠、凋亡和线粒体膜电位等^[17],其在调节线粒体功能中的作用已被广泛认同^[18]。本研究发现, H-CM 组 H9C2 心肌细胞中 CRT 蛋白表达上调,同时细胞 MMP 降低和 Cyt C 蛋白表达升高,而 T-CM 组较 H-CM 组细胞 CRT 蛋白表达明显降低,同时 MMP 升高和 Cyt C 蛋白表达降低。

因此可以推测受损的心肌微血管内皮细胞上清液可通过升高心肌细胞 CRT 蛋白表达,进而损伤细胞线粒体功能,最终导致心肌细胞受损;TXL 可通过改善受损心肌微血管内皮细胞的分泌功能,抑制心肌细胞 CRT 蛋白表达升高,进而保护细胞线粒体功能,减轻心肌细胞损伤。

综上所述,受损心肌微血管内皮细胞的条件培养液可损伤心肌细胞,其损伤机制可能与 CRT 介导的线粒体功能受损有关,TXL 可抑制该损伤过程,但在此过程中 CRT 过表达导致线粒体损伤的机制还需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 位庚,郭勇英,贾振华.发育成熟心脏中血管内皮细胞和心肌细胞的关系[J].中国老年学杂志,2015,35(19):5647-5649.
- [2] Li XD, Yang YJ, Geng YJ, et al. Tongxinluo reduces myocardial no-reflow and ischemia-reperfusion injury by stimulating the phosphorylation of eNOS via the PKA pathway [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299(4): H1255-H1261.
- [3] Cheng YT, Yang YJ, Zhang HT, et al. Pretreatment with Tongxinluo protects porcine myocardium from ischaemia/reperfusion injury through a nitric oxide related mechanism [J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(13): 1529-1538.
- [4] 位庚,李红蓉,刘红利,等.通心络对大鼠心肌微血管内皮细胞凋亡的影响[J].中国中西医结合杂志,2016,36(6):709-717.
- [5] 朱凌倜,王时俊,丁雪峰.两种大鼠心肌微血管内皮细胞缺氧模型建立方法的比较[J].临床心血管病杂志,2014,30(9):815-818.
- [6] 位庚,刘红利,李红蓉,等.通心络对同型半胱氨酸诱导大鼠心肌微血管内皮细胞损伤干预作用及氧化应激机制研究[J].中国循环杂志,2016,31(9):908-912.
- [7] Cui H, Li N, Li X, et al. Tongxinluo modulates cytokine secretion by cardiac microvascular endothelial cells in ischemia/reperfusion injury. [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(10): 4370-4381.
- [8] 王效刚,马英,王秀丽,等.柔红霉素诱导性亚急性心肌损伤大鼠模型的建立和评价[J].中国医院药学杂志,2014,34(23):1990-1993.
- [9] 王东娟,谢晓波,栗妍晖,等.Ghrelin 对同型半胱氨酸诱导大鼠心肌微血管内皮细胞损伤和炎症反应的保护作用[J].中华老年心脑血管病杂志,2010,12(3):252-255.
- [10] 马淑慧,王海芳,刘金连,等.芍药苷对 TNF- α 诱导的内皮细胞 TNFR1/NF- κ B 信号通路的抑制作用[J].中国中西医结合杂志,2016,36(3):339-344.
- [11] 李红蓉,孙颖,位庚,等.通络药物对血管内皮细胞与单核细胞黏附作用的影响[J].中国循环杂志,2016,31(5):480-483.
- [12] 张庆勇,朱武飞,罗春华,等.人参皂苷 Rg1 促血管再生作用的研究进展[J].广东医学,2015,36(8):1299-1300.
- [13] Lang F, Hoffmann EK. Role of ion transport in control of apoptotic cell death [J]. Compr Physiol, 2012, 2(3): 2037-2061.
- [14] Haraguchi M, Torii S, Matsuzawa Si, et al. Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1)-independent cell death suppression by Bcl-2 [J]. J Exp Med, 2000, 191(10): 1709-1720.
- [15] 任思嘉,徐焕华,李明,等.麦冬皂苷 D' 对大鼠心肌细胞 H9C2 的细胞毒性[J].中国药理学与毒理学杂志,2017,31(4):325-331.
- [16] Hattori K, Nakamura K, Hisatomi Y, et al. Arrhythmia induced by spatiotemporal overexpression of calreticulin in the heart [J]. Mol Genet Metab, 2007, 91(3): 285-293.
- [17] Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease [J]. FASEB J, 2010, 24(3): 665-683.
- [18] 闫蕊,单虎,林琳,等.钙网蛋白介导线粒体损伤在高糖诱导心肌细胞凋亡中的作用[J].中国病理生理杂志,2015,31(6):967-972.

(收稿:2016-04-18 修回:2017-08-25)

责任编辑:汤 静