

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.010

秦皮素对苯肾上腺素诱导的大鼠心肌细胞肥大的影响

程阔菊¹, 景胜²

(1. 达州市中西医结合医院药学部, 四川达州 635000; 2. 第三军医大学新桥医院麻醉科, 重庆 400037)

摘要:目的 观察秦皮素对苯肾上腺素诱导的原代 SD 大鼠心肌细胞肥大的影响。方法 建立苯肾上腺素诱导的 SD 大鼠原代心肌细胞肥大模型, 观察秦皮素对心肌细胞肥大的影响; 图像分析法计算心肌细胞面积; [³H]-亮氨酸掺入法测试心肌细胞蛋白质合成速率; 实时定量荧光 PCR 法检测心肌细胞 Nrf2 和肥大分子标志物心房钠尿肽、心房利尿肽的 mRNA 表达水平。结果 (1) 80 μmol/L 苯肾上腺素刺激心肌细胞 48 h 能成功复制 SD 大鼠心肌细胞肥大模型并伴随 Nrf2 表达量的增加; (2) 秦皮素呈剂量依赖性地抑制苯肾上腺素刺激的 SD 大鼠心肌细胞面积的增大、蛋白质合成速率的增加和肥大分子标志物的上调。结论 秦皮素能显著抑制 PE 诱导的原代大鼠心肌细胞肥大。

关键词: 心肌细胞; 脱氧肾上腺素; 秦皮素; Nrf2

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)02-0174-03

Effect of fraxetin on cardiomyocyte hypertrophy induced by phenylephrine

Cheng Kuoju¹, Jing Sheng²

(1. Department of Pharmacy, Dazhou City Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Dazhou, Sichuan 635000, China; 2. Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital Affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of fraxetin on primary cardiomyocyte hypertrophy induced by phenylephrine. Methods Primary SD cardiomyocyte hypertrophy was induced by phenylephrine, and we observed the effects of fraxetin on cardiomyocyte hypertrophy induced by phenylephrine. Image-ProPlus 5 measured the area of cardiomyocyte; [³H]-leucine incorporation assay detected the protein synthesis rate of cardiomyocyte; Real-time PCR measured the Nrf2 and molecular markers (ANP, BNP) mRNA expression levels of cardiomyocyte hypertrophy. Results (1) Primary neonate SD Cardiomyocyte hypertrophy model was successfully established by 80 μmol/L phenylephrine for 48 h, and Nrf2 expression levels significantly increased in cardiomyocyte hypertrophy model; (2) The increase of cardiomyocyte area, protein synthesis rate and molecular markers expression of cardiomyocyte hypertrophy were significantly inhibited by fraxetin in a dose-dependent manner. Conclusion Fraxetin could significantly inhibit the cardiomyocyte hypertrophy induced by PE.

Key words: cardiomyocytes; deoxy pine phrine; fraxetin; Nrf2

心肌肥厚是心脏长期负荷过重时发生的一种心室重构, 以心肌细胞蛋白质合成增加、细胞体积增大和心肌细胞间结缔组织沉积为表现, 也是多种心血管疾病, 如冠心病、高血压、心脏瓣膜病的常见并发症和病理基础^[1-2]。尽管心肌肥厚早期是一种代偿反应, 但晚期则逐渐发展为失代偿, 常导致严重的心力衰竭、心肌梗死等, 最终导致死亡^[3]。预防与逆转这种改变是治疗的重要目标。研究表明, NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 对心肌肥厚及纤维化具有抑制作用, 而秦皮素 (fraxetin) 为 Nrf2 的天然激动剂^[4-7]。目前, 关于秦皮素对心肌肥厚及纤维化是否具有抑制作用的问题尚无相关研究报道。鉴于此, 本研究拟在苯肾上腺素 (phenylephrine, PE) 诱导的 SD 大鼠心肌细胞肥大模型基础上, 观察秦皮素对 PE 诱导的大鼠心肌细胞肥大作用的影响, 以期对心肌肥厚、纤维化及其诱导的心血管疾病提供有效的药物防治。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生 SD 大鼠 (0~2 d), SPF 级, 由第三军医大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(渝)2007-0003。

1.1.2 主要设备与试剂 CO₂ 培养箱 (购自 SANYO 公司), 超净工作台 (购自 JOYN 公司), 倒置显微镜 (购自 Leica 公

司), LightCycler480 (购自 Roche 公司), 青霉素、链霉素 (均购自华美生物工程公司), 二甲亚砜 (DMSO)、fraxetin、phenylephrine (均购自 Sigma 公司), 羊血清、胎牛血清 (FBS)、DMEMF12 (购自 GBCO 公司), 组织固定液 (购自 Alphelys 公司), RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒及 PCR 扩增试剂盒 (均购自 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 新生 SD 大鼠原代心肌细胞的培养与鉴定 无菌取出新生 SD 大鼠心脏, 预冷 PBS 溶液洗净心脏残血, 切除两心耳、心房与右心室, 将左心室切成 1~2 mm³ 碎片, 加入消化酶液 (Gibco 胰酶 0.15%, Hyclone 胰酶 0.10%), 以 140 r/min 的转速于恒温 36.5 °C 下消化 10 min, 沉淀、吸取上清液, 加入 20% FBS 培养液中终止消化, 反复多次至所有心脏组织消化完全为止。弃第 1 次消化的上清液, 收集余下上清液, 40 μmol/L (40 μm; 过滤网规格) 过滤网过滤, 将过滤细胞接种于细胞培养瓶中贴壁培养 90 min, 除去贴壁纤维细胞。90 min 后, 吸取上清液, 经滤网再过滤后, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷, 种置于预先包被有明胶的培养皿中。5% CO₂ 培养箱中 37 °C 条件下孵育 48 h, PBS 轻柔清洗 1 次, 更换培养基, 观察细胞形态, 并对心肌细胞进行形态学及免疫学鉴定。

1.2.2 心肌细胞肥大模型的建立及实验分组 实验对秦皮素设置 5 个浓度梯度,对 PE 刺激设置 5 个时间梯度,秦皮素浓度梯度:0、1.0、2.0、4.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$;PE 时间梯度:0、6、12、24、48 h;模型的建立及药物处理:心肌细胞无血清饥饿 24 h,换成分别含 0、1.0、2.0、4.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的秦皮素培养基孵育 1 h 后,加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 PE,分别继续孵育 0、6、12、24、48 h。每组设立 3 个复孔,重复 3 次实验。

1.2.3 心肌细胞面积的测定(图像分析法) 细胞处理结束后,弃去培养基,用预冷的 PBS 快速轻柔洗涤细胞 2 遍,于倒置显微镜下观察并拍照。每培养皿取 3~5 个视野,每个视野取 5~10 个细胞,用专业图像分析软件 Image-ProPlus 5.0 测定单个心肌细胞面积(m^2)。

1.2.4 [^3H]-亮氨酸掺入法测定心肌细胞蛋白质合成速率 在离处理结束 12 h 时,每培养皿加入 11 μL Ci/mL [^3H]-亮氨酸。实验结束后,弃去培养液,4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 清洗贴壁细胞 2 次,用 0.2% 胰酶将贴壁细胞消化,收集消化心肌细胞于预备好的玻璃纤维膜上。10.0% 三氯乙酸分解破碎心肌细胞,于 PBS 中清洗 3 次,除去游离的同位素标记物,烘干滤膜。置于含相应剂量闪烁液的检测瓶内,摇匀,液体闪烁仪(Beckman)测定蛋白质合成速率,结果以 cpm 表示, [^3H]-亮氨酸的掺入量即可反映心肌细胞蛋白质的合成速率。

1.2.5 实时定量荧光 PCR 检测 Nrf2 及心肌细胞肥大分子标志物的表达 实验结束后,弃去培养液,按照 RNA 提取试剂说明书提取心肌细胞总 RNA,凝胶电泳检测 RNA 质量,分光光度仪检测 260/280 吸光度比值,计算 RNA 浓度。按照 RNA 逆转录试剂说明书将 mRAN 反转率成 cDNA,用 LightCycler 480 仪器对 Nrf2 及心肌细胞肥大分子标志物心房钠利尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)和心房利尿肽(brain natriuretic peptide, BNP)进行实时定量荧光 PCR 扩增并,内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。实时定量荧光 PCR 引物序列如下: GAPDH 上游引物序列:5'-GAC ATG CCG CCT GGA GAA AC-3',下游引物序列:5'-AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT-3',扩增产物长度为 92 bp; Nrf2 上游引物序列:5'-TCT GTC AGC TAC TCC CAG GT-3',下游引物序列:5'-GAA TAT CCA GGG CAA GCG ACT-3',扩增产物长度为 148 bp; ANP 上游引物序列:5'-ACA CAG CTT GGT CGC ATT GCC A-3',下游引物序列:5'-CGT CTG TCC GTG GTG CTG AAG TTT-3',扩增产物长度为 215 bp; BNP 上游引物序列:5'-ACA ATC CAC GAT GCA GAA GCT-3',下游引物序列:5'-GGG CCT TGG TCC TTT GAG A-3',扩增产物长度为 87 bp。

1.3 统计学处理 应用统计学软件 SAS 9.2 进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析和 t 检验对数据进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌细胞的鉴定 形态学鉴定:心肌细胞刚接种尚未贴壁时形态为椭圆形或圆形。1 d 后,细胞伸出伪足开始贴壁;2 d 后,伪足成纤维条索状,细胞完全贴壁,细胞胞体则呈现不规则形状,如多角形、菱形或梭形,并有少数细胞开始聚合(图 1);3 d 后,大部分细胞已聚合成团并成良好搏动状态,频率约 100 次/分钟。免疫荧光鉴定:心肌细胞 anti- α -actinin 染色成阳性,心肌特异性横纹肌结构明显可见,且细胞核周围有少许棕黄色颗粒,心肌细胞纯度大于 95%,结果见图 2。

2.2 秦皮素对 PE 诱导的大鼠心肌细胞面积的影响 经 PE 诱导后,心肌细胞面积显著增大($P < 0.05$),从 12 h 起作用,48

h 达最大值,表明 80 $\mu\text{mol/L}$ PE 刺激大鼠心肌细胞 48 h 能成功复制大鼠心肌细胞肥大模型;经秦皮素预处理后,PE 诱导的心肌细胞面积增大随秦皮素呈剂量依赖性的减轻,从 4 $\mu\text{mol/L}$ 起可以将其抑制在基础水平。表明,秦皮素能显著抑制 PE 诱导的大鼠心肌细胞面积增大,结果见图 3。

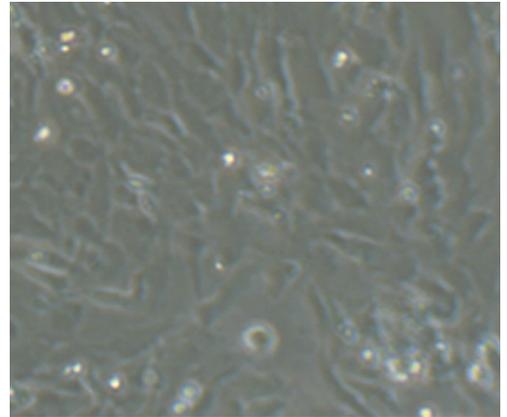


图 1 心肌细胞形态学观察

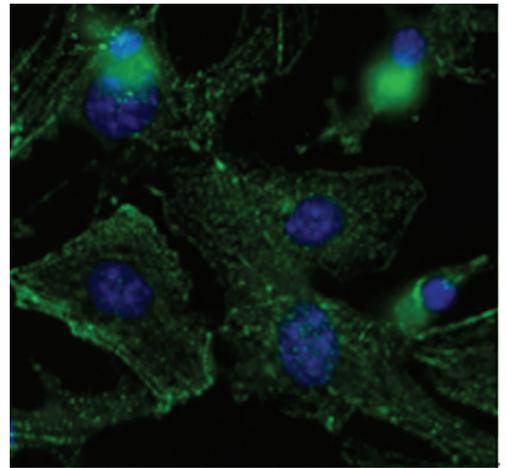
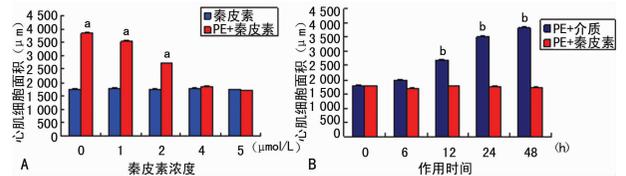


图 2 心肌细胞免疫学鉴定



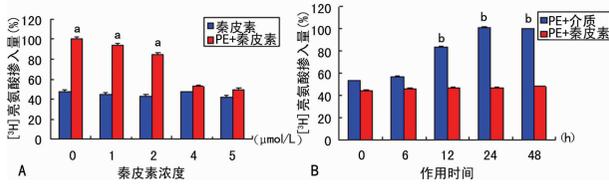
A: 不同浓度的秦皮素对心肌细胞面积的影响; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ 秦皮素对 PE 诱导不同时间的心肌细胞面积的影响; ^a: $P < 0.05$, 与秦皮素组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 PE+介质组比较。

图 3 秦皮素对 PE 诱导的大鼠心肌细胞面积的影响

2.3 秦皮素对 PE 诱导的大鼠心肌细胞 [^3H]-亮氨酸掺入量的影响 经 PE 刺激诱导后,大鼠心肌细胞的 [^3H]-亮氨酸掺入量显著增多($P < 0.05$),从 12 h 起作用,48 h 达最大值,表明 80 $\mu\text{mol/L}$ PE 刺激心肌细胞可成功的复制心肌细胞肥大模型;应用秦皮素预处理后, [^3H]-亮氨酸掺入量显著减少($P < 0.05$),从 4 $\mu\text{mol/L}$ 起可以将其抑制在基础水平,表明秦皮素可显著抑制 PE 诱导的大鼠心肌细胞蛋白质合成速率的增加,结果见图 4。

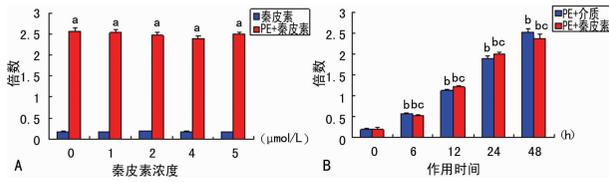
2.4 秦皮素及 PE 对大鼠心肌细胞 Nrf2 表达的影响 经 PE 诱导后,心肌细胞 Nrf2 的 mRNA 表达量显著增高($P < 0.05$),从 6 h 起作用,48 h 达最大值;经秦皮素预处理后,PE 诱导的

心肌细胞 Nrf2 表达量并不随秦皮素剂量的改变而变化。表明 PE 能显著诱导 Nrf2 表达量的增高,但秦皮素对其表达无影响,结果见图 5。



A:不同浓度的秦皮素对心肌细胞³H-亮氨酸掺入量的影响;B:5 μmol/L 秦皮素对 PE 诱导不同时间的心肌细胞³H-亮氨酸掺入量的影响; a: P<0.05,与秦皮素组比较; b: P<0.05,与 PE+介质组比较。

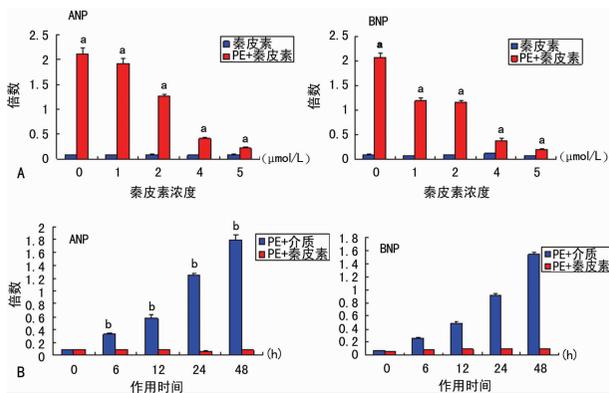
图 4 秦皮素对 PE 诱导的心肌细胞³H-亮氨酸掺入量的影响



A:不同浓度的秦皮素对心肌细胞 Nrf2 表达的影响;B:5 μmol/L 秦皮素对 PE 诱导不同时间的心肌细胞 Nrf2 表达的影响; a: P<0.05,与秦皮素组比较; b: P<0.05,与 PE+介质组比较; c: P<0.05,与 PE+秦皮素组比较。

图 5 秦皮素对 PE 诱导的大鼠心肌 Nrf2 mRNA 表达的影响

2.5 秦皮素对 PE 诱导的大鼠心肌细胞肥大标志物的影响
经 PE 诱导后,心肌细胞肥大分子标志物 ANP、BNP 的 mRNA 表达量明显上调(P<0.05),从 6 h 开始起作用,48 h 达最大值;经 5 μmol/L 秦皮素预处理后,已上调的心肌细胞肥大分子标志物 ANP、BNP 的 mRNA 表达可回落到基础水平(P<0.05)(图 6)。表明秦皮素能显著抑制 PE 刺激诱导的大鼠心肌细胞肥大分子标志物的表达。



A:不同浓度的秦皮素对心肌细胞肥大标志物的影响;B:5 μmol/L 秦皮素对 PE 诱导不同时间的心肌细胞肥大标志物的影响; a: P<0.05,与秦皮素组比较; b: P<0.05,与 PE+介质组比较。

图 6 秦皮素对 PE 诱导的心肌细胞肥大标志物的影响

3 讨 论

在临床上,心肌肥厚是多种心血管系统疾病的共同病理基础,如冠心病、高血压病、心肌炎症和先天性心脏病等多种心血管病。一般情况下,心肌肥厚是多种因素共同诱导的结果。从广义上讲,诱导心肌肥厚的因素包括两大类,即机械刺激和神经体液分子刺激。机械刺激包括各种压力负荷和容积负荷的直接刺激。

诱导心肌肥厚的各种神经体液分子,目前已报道的有受体酪氨酸激酶激动剂^[8],包括胰岛素样生长因子-1、成纤维细胞生长因子、转化生长因子 β 以及血小板源性生长因子等;G 蛋白偶联受体激动剂^[9],如内皮素-1、血管紧张素 II 以及 α1-β-肾上腺素受体激动剂,包括肾上腺素、去甲肾上腺素、PE 等;促炎因子如肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 6、白血病抑制因子及心肌营养因子-1 等^[10];花生四烯酸代谢产物前列腺素 F2α^[11]、蛋白激酶 C 激动剂^[12]等。根据以上心肌肥厚的神经体液诱发分子建立起来的体外心肌细胞肥大模型有 PE^[13]、异丙肾上腺素^[14]、内皮素-1^[15]、血管紧张素 II^[16]、醛甾酮^[17]等诱导法。本研究参照文献^[13]报道,并结合预实验采用 80 μmol/L PE 刺激心肌细胞成功的复制了大鼠心肌细胞肥大模型。

Nrf2 对心肌肥厚及纤维化具有抑制作用^[4-5],而秦皮素为 Nrf2 的天然激动剂^[6-7]。因此,本研究推测秦皮素对心肌肥厚及纤维化很可能具有抑制作用。本研究通过在 PE 诱导的大鼠心肌细胞肥大模型基础上,观察秦皮素对大鼠心肌细胞肥大的影响。结果表明,秦皮素能显著抑制 PE 刺激诱导的大鼠心肌细胞面积增大、蛋白质合成的增多以及肥大分子标志物 ANP、BNP 表达的上调,证实秦皮素可以抑制 PE 诱导的大鼠心肌细胞肥大;在心肌细胞肥大模型中,Nrf2 的表达量显著上调,而秦皮素对其表达却无影响,说明秦皮素的作用靶点可能位于 Nrf2 蛋白转录之后而非转录之前,这一结论也正好与秦皮素为 Nrf2 的天然激动剂相吻合^[6-7]。至于秦皮素抑制心肌肥厚的作用机制是否通过 Nrf2,以及秦皮素是否对整体动物心肌肥厚模型具有抑制作用,有待进一步研究。观察秦皮素对心肌肥厚的作用,并探讨其分子机制,以期对临床心肌肥厚、纤维化及其诱导的心血管病提供有效的药物防治。

参考文献:

- [1] Yamamoto S,Kita S,Iyoda T,et al. New molecular mechanisms for cardiovascular disease:cardiac hypertrophy and cell-volume regulation[J]. J Pharmacol Sci,2011,116(4):343-349.
- [2] Andrea A,Scarafille R,Ferrara,et al. An unusual case of apical hypertrophic cardiomyopathy in a transplanted heart[J]. Monaldi Arch Chest Dis,2010,74(4):192-194.
- [3] Rodilla E,Pascual JM,Costa JA,et al. Regression of left ventricular hypertrophy and microalbuminuria changes during antihypertensive treatment[J]. J Hypertens,2013,31(8):1683-1691.
- [4] Li J,Ichikawa T,Villacorta L,et al. Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2009,29(11):1843-1850.
- [5] Li J,Zhang C,Xing Y,et al. Up-regulation of p27(kip1) contributes to Nrf2-mediated protection against angiotensin II-induced cardiac hypertrophy[J]. Cardiovasc Res,2011,90(2):315-324.
- [6] Thuong PT,Pokharel YR,Lee MY,et al. Dual anti-oxidative effects of fraxetin isolated from Fraxinus rhynchophylla[J]. Biol Pharm Bull,2009,32(9):1527-1532.
- [7] Jiang JH,Jin CM,Kim HS,et al. Anti-toxoplasmosis effects of oleuropein isolated from Fraxinus rhychophylla[J]. Biol Pharm Bull,2008,31(12):2273-2276.
- [8] Oka T,Komuro I. Molecular mechanisms underlying the transition of cardiac hypertrophy to heart(下转第 179 页)

存在气体滞留,有限制性通气功能障碍。

本研究进一步分析 NSP 发生影响因素发现,年龄大、BMI 高、既往吸烟史、存在阻塞性疾病及限制性疾病是 NSP 发生的独立危险因素。分析认为随着年龄增加,肺组织的弹性回缩力下降,进而引起气流受限发生阻塞^[8-9]。对肥胖患者而言,其胸腹部大量的脂肪可使胸廓及膈肌的活动度下降,进而导致 TLC、RV 下降^[10]。吸烟已被证实是肺纤维化发生的高危因素,吸烟可以引起支气管炎症,长期吸烟或吸烟量较大可以引起管腔狭窄,甚至发生阻塞,进而使进入肺泡的空气不能有效排除,滞留肺泡中引起压力增加,最终引起肺泡扩张、破裂^[11-12]。对于存在阻塞性疾病、限制性疾病而言,其本身已存在多种肺功能指标的异常,因此更容易发生 NSP^[13-15]。

综上所述,本研究显示,高龄、吸烟、肥胖可增加 NSP 发生的风险,临床上 NSP 可表现为阻塞性及限制性通气功能障碍的特点,在临床实际中需要积极鉴别。

参考文献:

- [1] Zinzani PL, Venturini F, Stefoni V, et al. Gemcitabine as single agent in pretreated T-cell lymphoma patients: evaluation of the long-term outcome[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(4):860-863.
- [2] Wagner JY, Schwarz K, Schreiber S, et al. Myeloablative anti-CD20 radioimmunotherapy +/- high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell support for relapsed/refractory B-cell lymphoma results in excellent long-term survival[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(4):899-910.
- [3] 蒋雷服. 常规肺功能测定的常见问题和处理对策[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(9):716-717.
- [4] 吴倩, 孔灵菲, 李振华, 等. 特发性肺纤维化患者的血液高凝状态与肺功能的相关性[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(11):854-855.
- [5] Zinzani PL, Venturini F, Stefoni V, et al. Gemcitabine as single agent in pretreated T-cell lymphoma patients: evaluation of the long-term outcome[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(3):860-863.
- [6] 周德训, 魏敬安, 陈清, 等. 肺功能非特异性表现的特点与临床意义[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2013, 36(11):821-824.
- [7] Gopal AK, Press OW, Shustov AR, et al. Efficacy and safety of gemcitabine, carboplatin, dexamethasone, and rituximab in patients with relapsed/refractory lymphoma: a prospective multicenter phase II study by the Puget Sound Oncology Consortium[J]. *Leuk Lymphoma*, 2010, 51(8):1523-1529.
- [8] 王伊, 吕富荣, 盛波, 等. CT 肺功能成像技术在早期尘肺诊断中的应用[J]. *重庆医学*, 2012, 41(12):1157-1159.
- [9] 王福庆. 穴位贴敷煤工尘肺 32 例患者对其 COPD 肺功能影响的观察[J]. *世界中医药*, 2010, 5(4):280.
- [10] 肖义萍. 补中益气汤对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者肺功能的影响[J]. *世界中医药*, 2013, 8(9):1071-1073.
- [11] 刘洋, 陈丽萍, 高瑛, 等. 吸烟对中老年人肺功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(17):4247-4248.
- [12] Ribrag V, Caballero D, Fermé C, et al. Multicenter phase II study of plitidepsin in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Haematologica*, 2013, 98(5):357-363.
- [13] 谭志敏, 刘建华, 袁清华, 等. 不同剂量地佐辛静脉注射对下肢手术患者呼吸功能和镇静深度的影响[J]. *广东医学*, 2013, 34(15):2355-2358.
- [14] 胡彦艳, 秦丹丹, 叶凤青, 等. 低流量单肺通气对肺癌手术患者呼吸功能的影响[J]. *山东医药*, 2013, 53(15):38-40.
- [15] 王斐, 赵丛, 田映红, 等. 高胆汁酸血症影响兔呼吸功能的实验研究[J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(8):1181-1184.

(收稿日期:2014-09-28 修回日期:2014-10-27)

(上接第 176 页)

- failure[J]. *Circ J*, 2008, 72 Suppl A:13-16.
- [9] Mishra S, Ling H, Grimm M, et al. Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(6):598-603.
- [10] Hohensinner PJ, Kaun C, Rychli K, et al. The inflammatory mediator oncostatin M induces stromal derived factor-1 in human adult cardiac cells[J]. *FASEB J*, 2009, 23(3):774-782.
- [11] Jiang QS, Huang XN, Yang GZ, et al. Cardiac hypertrophy induced by prostaglandin F2 α may be mediated by calcineurin signal transduction pathway in rats[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2005, 57(6):742-748.
- [12] Vega RB, Harrison BC, Meadows E, et al. Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(19):8374-8385.
- [13] Ruchi P, Rebecca HR, Lgor R, et al. Phenylephrine induced hypertrophy in neonatal cardiac myocytes is modulated by testosterone[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6):138
- [14] Yeh JL, Hsu JH, Wu PJ, et al. KMUP-1 attenuates isoprenaline-induced cardiac hypertrophy in rats through NO/cGMP/PKG and ERK1/2/calcineurin A pathways[J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 159(5):1151-1160.
- [15] Yu L, Li M, She T, et al. Endothelin-1 stimulates the expression of L-type Ca²⁺ channels in neonatal rat cardiomyocytes via the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway[J]. *J Membr Biol*, 2013, 246(4):343-353.
- [16] Matsumoto E, Sasaki S, Kinoshita H, et al. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis are promoted in mice lacking Fgf16[J]. *Genes Cells*, 2013, 18(7):544-553.
- [17] Patel BM, Mehta AA. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 697(1/3):1-12.

(收稿日期:2014-07-12 修回日期:2014-10-22)