

通络药物对心梗后心衰大鼠非梗死区心肌纤维化的影响 *

李佳彧¹ 李佳睿² 马丕勇¹ 杨 萍¹ 倪维华^{3△}

(1 吉林大学中日联谊医院 吉林 长春 130033 ;

2 吉林省肿瘤医院 吉林 长春 130012 3 吉林大学白求恩医学院 吉林 长春 130021)

摘要 目的 探讨不同剂量芪苈强心胶囊对心衰模型大鼠非梗死区胶原蛋白分子表达的影响。方法 将通过结扎冠状动脉左前降支并饲养 4 周的 56 只心衰模型鼠随机分成 4 组:心衰对照组(MI-C)、转换酶抑制剂雷米普利治疗组(MI-R, 10 mg/kg.d)、芪苈强心小剂量组(MI-S, 0.25 g/kg.d) 以及芪苈强心大剂量组(MI-L, 1.0 g/kg.d)。同步药物干预 4 周后,ELISA 法检测 Ang II 水平、RT-PCR 检测非梗死区胶原-I mRNA。结果 血清中 Ang II 的浓度与心力衰竭对照组比较,假手术组、雷米普利组、大剂量芪苈强心组和小剂量芪苈强心组均明显降低 ($P<0.05$)。其中,大剂量芪苈强心组比雷米普利组明显减低,差异具显著性 ($P<0.05$) ;而小剂量芪苈强心组与雷米普利组水平接近,差异无显著性 ($P<0.05$)。非梗死区胶原-I mRNA 的表达与心衰对照组比较,假手术组、雷米普利组、大剂量芪苈强心组,小剂量芪苈强心组表达均下调,差别具显著性 ($P<0.05$) 大剂量芪苈强心组与雷米普利组接近,差别无显著性 ($P>0.05$) ;小剂量芪苈强心组高于大剂量芪苈强心和雷米普利组,差别具有显著性 ($P<0.05$)。结论 芪苈强心胶囊能够明显地减少心梗后心衰非梗死区胶原分子的合成,并具有明显的剂量依赖性。

关键词 心衰 芪苈强心 胶原-I 非梗死区

中图分类号 R541.61 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2011) 18-3431-03

Effect of Qiliqiangxin Capsule on Myocardial Fibrosis in Non-infarct Zone of Rats with Heart Failure After Myocardial Infarction*

LI Jia-yu¹, LI Jia-rui², MA Pi-yong¹, YANG Ping¹, NI Wei-hua^{3△}

(1 Clinical-japan Union Hospital, Changchun 130033, China;

2 Jilin Cancer Hospital and Institute; 3 Norman Bethune College of Medicine Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of different dosages qiliqiangxin capsule on the production of collagen in non-infarct zone (NIZ). **Method:** A total of 56 rats surviving left anterior descending coronary artery were randomly divided into placebo (MI-control), Ramipril (MI-ramipril, 10 mg/kg.d) therapy, qiliqiangxin large dosage (MI-large, 1.0 g/kg.d) therapy and qiliqiangxin small dosage (MI-small, 0.25 g/kg.d) therapy with additional eight other rats being sham. Four weeks later, the plasma angiotensin II (Ang II) was detected by using ELISA, and the expressions of collagen types I (collagen I) were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** Plasma Ang II concentration evidently dropped in the MI-ramipril rats, MI- large and MI-small rats, compared with that in the control rats. Compared with that in MI- ramipril rats, plasma Ang II concentration decreased significantly in MI-large rats ($P<0.01$) . There was no difference between ramipril rats and MI-small rats. The expressions of collagen I and total collagen concentration in NIZ were as follow: Compared with that in sham rats, the expressions of collagen I and total collagen concentration in MI-control rats and the other three admission groups increased evidently ($P<0.05$). Compared with that in MI-control rats, the proteins were down-regulated in MI-ramipril rats and MI-large rats. There were no significant differences between MI-ramipril rats and MI-large rats ($P>0.05$). And there were no differences between MI-control rats and MI-small rats($P>0.05$). **Conclusions:** Qiliqiangxin Capsule can significantly inhibit the production of collage in NIZ, which is in a dose-dependent manner.

Key words: Heart failure; Qiliqiangxin; Collagen-I; Non-infarct zone (NIZ)

Chinese Library Classification(CLC): R541.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2011) 18-3431-03

前言

心梗后非梗死区 - 远离梗死区的心肌组织的也发生了胶原组织的增殖,心梗后心肌不但出现梗死区疤痕组织中胶原网络重构,同时伴有左室非梗死区心肌 - 远离梗死区的心肌组织

胶原的增生,所以心梗后心脏重构被称为左室重构^[1]。心梗后心衰动物模型和病人的非梗死区心肌组织中均见总胶原蛋白的增加,提示非梗死区的心肌纤维化在心梗后心衰的发展过程中占有重要的地位。因而,作为细胞间基质的主要成份 - 胶原,调节其合成与成熟成为临床治疗心室重构的重要的治疗靶点^[2-4]。

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30770883)

作者简介 李佳彧 (1974) ,女,博士,主治医师,主要研究方向 心力衰竭的发病机制及治疗

△通讯作者 倪维华,电话 :13104411800,E-mail: niwh5566@jlu.edu.cn

(收稿日期 2011-06-06 接受日期 2011-06-30)

血管紧张素 II (angiotensin II) 在心梗后心力衰竭中发挥重要作用。血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotensin - converting enzyme inhibitors, ACEi) - 雷米普利被广泛用于治疗心梗后心衰,在抑制心肌纤维获得确切疗效^[5-6]。

本文通过建立实验性大鼠心梗后心力衰竭心室重构模型,对非梗死区 Ang II、collagen I 以及成熟胶原浓度的表达进行研究,进而探讨 ACEi- 雷米普利与通络药物-芪苈强心胶囊对胶原合成与成熟的抑制及其对左室重构保护作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

雷米普利由北京安万特制药有限公司生产。芪苈强心药粉由石家庄以岭药业集团赠送,每克芪苈强心胶囊粉相当于 6.325g 生药。RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。血管紧张素 II ELISA 试剂盒购自尚柏生物医学技术 (北京) 有限公司。

1.2 动物模型

随机取健康 100 只体重 200-240 克 waster 大鼠 (雌鼠 40 只,雄鼠 60 只),由吉林大学基础医学院动物室提供。采用左前降支冠状动脉结扎术制备心衰模型,参考文献^[7]方法,应用 4% 水合氯醛麻醉,快速打开胸廓,暴露心脏,在左心耳下约 2mm 处的冠状动脉左前降支用 6/0 线结扎,迅速关闭胸腔并缝合,复苏动物。同时另取 8 只大鼠 (雌鼠 4 只,雄鼠 4 只),同样的方法手术,但术中只挂线,不结扎,作为假手术组 (sham)。术后予青霉素 24 万单位 / 公斤 / 每天,共 3 天,预防感染。饲养 4 周。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及给药 术后 4 周心衰模型大鼠存活 61 只 (雌鼠 28 只,雄鼠 33 只) 存活率 61% (雌鼠 70%,雄鼠 55%)。随机选取存活鼠 56 只 (雌鼠 28 只,雄鼠 28 只),将其分为心衰模型组 (MI-control) (16 只)、雷米普利组 (MI-ramipril) (16 只)、芪苈强心大剂量组 (MI-large) (12 只)、芪苈强心小剂量组 (MI-small) (12 只),每组大鼠雌雄各半。每日给药量分别为雷米普利 10 mg/kg 体重,芪苈强心生药粉 0.25 g/kg 体重,芪苈强心生药粉 1.0 g/kg 体重。上述药物溶于 1 毫升自来水中灌胃,心衰模型组每日仅 1 毫升自来水灌胃。所有实验大鼠均自由饮食,分笼饲养,给药过程中无一大鼠死亡。

1.3.2 标本采集 给药 4 周后,处死大鼠,股动脉采血,留血清检测血管紧张素 II 并留取心脏的非梗死区心肌组织,随机选取其中一半心肌组织 (雌雄各半) 检测胶原 -I 蛋白 mRNA 的表达,另一半 (雌雄各半) 用于羟脯氨酸定量检测。

1.3.3 血清中血管紧张素 II 水平的检测 采用酶联免疫试剂盒,严格按照说明书完成。

1.3.4 非梗死区心肌组织中胶原 -I mRNA 的检测 用 Trizol 试剂处理非梗死区心肌组织提取总 RNA。使用逆转录酶将 3 μ g 总 RNA 合成双链 DNA (complementary DNA, cDNA)。胶原 -I (collagen-I), β -actin 通过 GenBank 获得 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 并设计引物。胶原 -I 的上游引物 5'-AGG GTC ATC GTG GCT TCT C-3', 下游引物 5'- ACC TTC GCT TCC ATA CTC G-3'。 β -actin 上游引物 5'-GCT CGT CGT CGA CAA

CGG CTC-3', 下游引物 5'- CAA ACA TGA TCT GGG TCATCT TCT C-3'。取 3 μ l 逆转录产物分别应用上述蛋白的上下游引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括: 10 $\times$ 反应缓冲液 2.5 μ l, 1 μ l dNTPs, 上游和下游引物各 1 μ l, 1 μ l TaqDNA 多聚酶,加 DEPC 处理 H₂O 至总体积为 25 μ l,混匀后进行 PCR 反应。反应参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟,95 $^{\circ}$ C 变性 40 秒,54 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 秒,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。取 10 μ l PCR 反应产物进行 1.5% 琼脂糖电泳,光密度扫描后图片经 Image J 软件分析,结果以检测蛋白 / β -actin 的积分光密度比值表示。

1.3.5 统计学方法 统计学处理计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有数据用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。两组数据间比较采用 t 检验,多组间的相关性比较采用单因素方差分析检验。

2 结果

2.1 血清中血管紧张素 II 水平的表达

与假手术组 (86.9 $\pm$ 29.7 pg/ml) 比较,心衰对照组 (143.1 $\pm$ 17.9 pg/ml)、雷米普利组 (111.3 $\pm$ 12.8 pg/ml) 以及小剂量芪苈强心组 (112.7 $\pm$ 19.6 pg/ml) Ang II 的水平明显增加 ($P < 0.05$);大剂量芪苈强心组 (89.0 $\pm$ 13.5 pg/ml) 与假手术组水平接近,差异无显著性 ($P > 0.05$)。与心衰对照组比较,三个治疗组 Ang II 水平均显著减低 ($P < 0.01$)。其中大剂量芪苈强心组与雷米普利组和小剂量芪苈强心组比较降低明显,差异有显著性 ($P < 0.05$)。而小剂量芪苈强心组与雷米普利组水平接近,差异无显著性 ($P > 0.05$) (见图 1)。

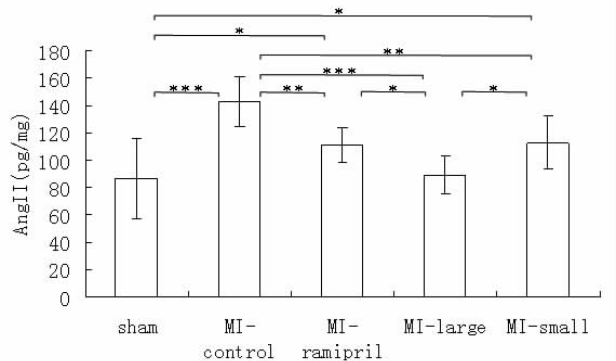


图 1 各组大鼠血清中 Ang II 的浓度

Fig.1 The level of plasma Ang II

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 心脏非梗死区心肌的胶原 -I mRNA 的表达

与假手术组比较,心梗后心衰大鼠的非梗死区心肌组织中胶原 -I mRNA 的表达上调 ($P < 0.001$)。与心梗对照组比较,雷米普利组表达下调 ($P < 0.001$),芪苈强心大剂量组 ($P < 0.001$) 和小剂量组胶原 -I mRNA ($P < 0.05$) 的表达亦下调。其中,大剂量芪苈强心组胶原 -I mRNA 的水平与雷米普利组接近,两组差异没有显著性 ($P > 0.05$)。小剂量芪苈强心胶原 -I mRNA 的水平低于心衰对照组 ($P < 0.05$),但高于大剂量芪苈强心和雷米普利组,差别有显著性 ($P < 0.05$) (见图 2)。

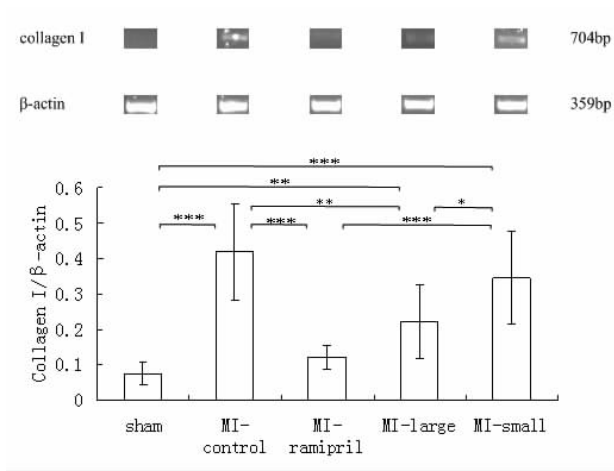


图2 各组非梗死区心肌组织 collagen I mRNA 的表达

Fig.2 The examples of RT-PCR gels and collagen I mRNA expression in NIZ

注 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

2.3 非梗死区心肌组织胶原的含量检测

与假手术组相比,心梗后心衰大鼠的非梗死区心肌组织中成熟胶原生成增加 ($P<0.05$)。雷米普利组胶原表达受到抑制,两者差别有显著性 ($P<0.05$)。经芪苈强心治疗后成熟胶原含量下降。其中,大剂量芪苈强心组胶原水平与雷米普利组接近,两组差异没有显著性 ($P>0.05$)。小剂量芪苈强心成熟胶原的水平低于心衰对照组 ($P<0.05$),但高于大剂量芪苈强心和雷米普利组,差别有显著性 ($P<0.05$) (见图 3)。

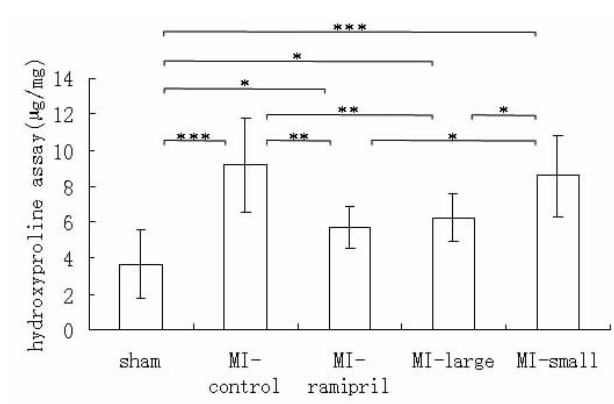


图3 各组非梗死区心肌组织成熟胶原浓度

Fig.3 The total collagen concentration in NIZ

注 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

3 讨论

心室重构是心梗后心衰的重要原因之一,抑制心梗后左心室重构是预防和治疗心衰的重要靶点。在分子水平上,其表现为心肌细胞增生,肥大,间质内的纤维细胞的增殖和成熟胶原生成增加,最终导致舒张功能障碍。急性心梗后心脏的修复过程通常人为的分为两个连续的阶段:炎症阶段和瘢痕形成阶段。心梗后修复的瘢痕阶段是心衰左室重构的重要时期^[8-9]。通过药物对瘢痕修复干预达到抑制心室重构的目的具有重要的

临床意义。其中肾素-血管紧张素系统在该修复过程中发挥重要作用。Ang II 通过刺激转移生长因子- β 1 (TGF- β 1) 导致心肌肥厚,纤维细胞增生,间质纤维化^[10-14]。心梗后的胶原重构不仅发生在梗死区,也发生在远离梗死区的左室心肌组织。胶原重构的调节对于抑制心梗后的心肌纤维化中具有重要意义,成为抑制心梗后左室重构的治疗靶点^[15-16]。

大量的实验室和临床研究表明 ACEi 能够降低心梗和心衰患者的发病率和死亡率。芪苈强心胶囊是临床治疗心力衰竭的口服通络药物。故本实验选用 ACEi- 雷米普利和中药芪苈强心胶囊作为观察药物。通过观察药物对 Ang II 的水平、collagen-I 及成熟胶原浓度的抑制作用,讨论雷米普利和中药通络药物芪苈强心胶囊抗心肌纤维化的作用。结果提示芪苈强心胶囊对 Ang II 的水平、collagen-I 及成熟胶原浓度的抑制作用与雷米普利相似,并具有明显的剂量依赖性。芪苈强心可能通过减少胶原生成和成熟,进而改善心梗后心力衰竭大鼠左心室功能并抑制心脏胶原网络的重构,具体的作用机制尚需进一步研究。芪苈强心胶囊作为临床仅有的少数治疗心力衰竭的口服通络中药,具有与雷米普利相似的抗心肌纤维化的作用,在西医学的角度对其治疗心梗后心衰提供有效的证据。

参考文献(References)

[1] Dobaczewski M, Bujak M, Zymek PG. et al. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts Cell [J]. Tissue Res, 2006, 324:475-488

[2] Bornstein P. Matricellular proteins: an overview[J]. Matrix Biol, 2000, 19:555-556

[3] Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases[J]. J Pathol, 2003, 200:448-464

[4] Tayebjee MH, MacFadyen RJ, Lip GY. Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension[J]. J Hypertens, 2003,21: 2211-2218

[5] Dixon IMC, Ju H, Jassal DS,et al. Effect of ramipril and losartan on collagen expression in right and left heart after myocardial infarction [J]. Mol Cell Biochem, 1996,165: 31-45

[6] Tao ZW, Huang YW, Xia Q, et al. Combined effects of ramipril and angiotensin II receptor blocker TCV116 on rat congestive heart failure after myocardial infarction [J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118 (2): 146-154

[7] Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat[J]. Circ Res, 1985, 57: 84-95

[8] Gallagher GL, Jackson CJ, Hunyor SN. Myocardial extracellular matrix remodeling in ischemic heart failure [J]. Front Biosci, 2007, 12: 1410-1419

[9] Paige S, Robert BH, Ricardo AMR, et al. Periostin Is Required for Maturation and Extracellular Matrix Stabilization of Noncardiomyocyte Lineages of the Heart [J]. Circulation Research, 2008, 102: 752-760

[10] Schieffer B, Wirger A, Meybrunn M, et al. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat [J]. Circulation, 1994, 89: 2273-2282

(下转第 3464 页)

- [5] 张力, 刘兴会. 产程图的临床应用 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21 (5):262-264
Zhang li,Liu xinghui. The clinical application of partogram [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2005, 21 (5) 262-264
- [6] Sizer A.R,Evans J,Bailey S.M,et al. A second-stage partogram [J]. Obstetrics & Gynecology,2000,96(5):678-683
- [7] 张友秀. 192 例初产妇头位难产产程图分析 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006 Mar, 15(6):757-758
Zhang youxiu. 192 primiparas head dystocia partogram analysis[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine 2006 Mar, 15(6)757-758
- [8] 魏姗姗,高湘. 巨大胎儿产前诊断若干问题的探讨[J]. 实用妇产科杂志, 1994,10(2):78
Wei shanshan, Gao xiang. The approach of some problems in prenatal diagnosis of fetal macrosomia[J]. Practical Gynecology and Obstetrics, 1994,10(2):78
- [9] 单家治. 提高阴道分娩质量[J]. 中华妇产科杂志, 1997, 32(6) :323-325
Shan jia zhi. Improve the quality of vaginal delivery [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 1997, 32(6) :323-325
- [10] Neilson JP, Lavender T, Quenby S, et al. Obstructed labour [J]. BrMed Bull, 2003, 67 :191-204
- [11] Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, et al. Williams Obstetrics [M]. 21st New York: McGraw-Hill, 2001:425-481, 743-809.
- [12] 刘铭译. ACOG 实践公告: 难产和催产 [J]. 国际妇产科杂志(中文版), 2005, 1(3): 134-137
Liu mingyi. ACOG practice bulletin: Dystocia and Accelerated delivery [J]. International Journal of Gynecology and obstetrics (China), 2005, 1(3): 134-137
- [13] 姚天一. 梗阻性难产的产程图特点[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2006, 22 (2) :96-97
Yao tianyi. The characteristics of the partogram of obstructive dystocia [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2006, 22 (2) :96-97
- [14] 董云虹, 陈惠池. 单胎头位初产妇 734 例产程图分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2008, 24(2):134-136
Dong yunhong, Chen huizhi. 734 Partogram Analysis of Single Fetal Head Position Primipara [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2008, 24(2):134-136
- [15] 周红, 吴自平. 产程图在头位分娩中的应用 [J]. 中国医学创新, 2010, 7(4):31
Zhou hong, Wu ziping. The application of partogram in head position delivery [J]. Medical innovation of china, 2010, 7(4):31

(上接第 3433 页)

- [11] Wang D, Oparil S, Feng JA, et al. Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse [J]. Hypertension, 2003, 42:88-95
- [12] Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction [J]. J Exp Med, 2008, 18; 205(2): 295-303
- [13] Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, et al. Transforming growth factor beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats [J]. Circulation, 2002, 106:130-135
- [14] Deten A, Holzl A, Leicht M, et al. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33:1191-1207
- [15] Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, et al. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14: 1239-1249
- [16] Matsusaka T, Katori H, Inagami IT, et al. Communication between myocytes and fibroblasts in cardiac remodeling in an angiotensin chimeric mice [J]. J Clin Invest, 1999, 103:1451