

人参皂甙 Rb1 对阿霉素心力衰竭大鼠致心脏纤维化因子表达的影响

孔宏亮*, 宋丽杰, 李占全, 袁 龙

(辽宁省人民医院心脏中心, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的:探讨人参皂甙 Rb1(Ginsenosides-Rb1, Gs-Rb1)是否通过心脏抑制心脏纤维化相关蛋白和 mRNA 介导其改善慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)大鼠的心肌重构效应。方法:在构建阿霉素 CHF 大鼠模型成功后,将其随机分为 Gs-Rb1 组($n = 17$)给予 Gs-Rb1 70 mg/(kg·d)和 CHF 组($n = 15$),另外选取同龄健康大鼠作为对照组($n = 10$)。第 4 周心脏超声评估全心质量指数(HW/BW)和左室质量指数(LW/BW),应用 Western blot 和 RT-PCR 方法检测转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、内皮素-1(endothelin 1, ET-1)等蛋白和 mRNA 的表达。结果:与对照组相比,Gs-Rb1 组全心质量指数(HW/BW, $P = 0.005$)及左室质量指数(LW/BW, $P = 0.000$)均显著改善;与 CHF 组相比,Gs-Rb1 组 TGF- $\beta 1$ 、CTGF 和 ET-1 蛋白的表达均显著下降(P 均 < 0.05),但均显著高于对照组(P 均 < 0.05);Gs-Rb1 组 TGF- $\beta 1$ 、CTGF 和 ET-1 等 mRNA 的表达均显著低于 CHF 组(P 均 < 0.05),但均显著高于对照组(P 均 < 0.05)。结论:在 Gs-Rb1 改善 CHF 大鼠心肌重构效应中,Gs-Rb1 可通过下调 TGF- $\beta 1$ 、CTGF、ET-1 等蛋白和 mRNA 等介导其保护作用。

[关键词] 人参皂甙 Rb1; 心肌重构; 转化生长因子- $\beta 1$; 结缔组织生长因子; 内皮素-1

[中图分类号] R541.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-026-04

The effects of Ginsenoside-Rb1 on myocardial fibrosis related protein and mRNA in rats with adriamycin-induced chronic heart failure

KONG Hong-liang*, SONG Li-jie, LI Zhan-quan, YUAN Long

(Cardiology Center, the People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate whether Ginsenosides-Rb1 (Gs-Rb1) improved myocardial remodeling and whether Gs-Rb1 improved myocardial fibrosis related protein/mRNA in rat heart with chronic heart failure (CHF) induced by adriamycin. **Methods:** CHF models of rats were performed by adriamycin. CHF rats were randomly divided into CHF group ($n = 15$) and Gs-Rb1 group ($n = 17$) that received 70 mg/(kg·d) Gs-Rb1. In addition, age-matched health rats were referred as control group ($n = 10$). At the 4th week, the heart to body weight (HW/BW) and the left ventricular to body weight (LW/BW) was analyzed by echocardiography. Histology was used to assess myocardial interstitial fibrosis in the heart. The expression of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), connective tissue growth factor (CTGF) and endothelin 1 (ET-1) were detected by Western blot and RT-PCR. **Results:** Compared to CHF group, Gs-Rb1 significantly improved HW/BW ($P = 0.005$) and LW/BW ($P = 0.000$); The protein expression of TGF- $\beta 1$, CTGF and ET-1 were more significantly down-regulated in Gs-Rb1 group than in CHF group, which in those both group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$); The mRNA expression of TGF- $\beta 1$, CTGF and ET-1 were more significantly down-regulated in Gs-Rb1 group than in CHF group, which in the both group were significantly higher than in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The effects of Gs-Rb1, on improving myocardial remodeling in CHF rats, were fulfilled by increasing protein and mRNA of TGF- $\beta 1$, CTGF and ET-1.

[Key words] Ginsenosides-Rb1; chronic heart failure; transforming growth factor $\beta 1$; connective tissue growth factor; endothelin 1

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 026-029]

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(201102107)

*通讯作者, E-mail: khl339@sina.com

心肌重构是心肌对异常压力或容量负荷等的适应性反应,主要包括心肌细胞肥大、间质纤维化和心肌细胞凋亡,是许多心血管疾病的最终共同通路^[1],并最终导致慢性心力衰竭(chronic heart fail-

ure, CHF)由“代偿”转折向“失代偿”^[1],因此,如何抑制心肌重构从而延缓 CHF 进程成为当今研究的热点。我国广泛应用于临床的中药材人参具有多元化生物学活性,目前的一些研究显示人参的有效成分人参皂甙 Rbl (Ginsenosides-Rbl, Gs-Rbl)可有效改善扩张型心肌病大鼠的心功能^[2]及其它原因所致的心肌损伤^[3,4],不过, Gs-Rbl 遏制 CHF 进程是否通过调整转化生长因子- β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、内皮素-1(endothelin1, ET-1)等来实现尚不清楚,故而,本研究拟通过 Gs-Rbl 干预阿霉素致 CHF 大鼠模型探讨上述蛋白和 mRNA 的表达,从而明确 Gs-Rbl 抑制 CHF 的部分生物学效应。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

Wistar 大鼠[SCXK(辽)2003-0009],体重 150~200 g,购自中国医科大学动物试验中心。

1.1.2 试剂

阿霉素(adriamycin,美国 Sigma 公司),Gs-Rbl(纯度 96%,中科院昆明植物研究所),即用型兔抗大鼠 TGF- β 1、CTGF 多克隆抗体(武汉博士德生物技术公司)、ET-1 试剂(上海森雄科技实业有限公司)、总 RT-PCR 提取试剂盒(深圳华氏)、RT-PCR 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。仪器:二维心脏超声(CFM-725,7.5MHz broadband transducer,美国

Vingmed 公司)、高速离心机(2K15C 美国 Sigma 公司)和倒置显微镜(日本 Olympus 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 CHF 模型构建

根据我们以前的方法构建 32 只大鼠阿霉素(adriamycin)CHF 模型^[4],将其随机分为 Gs-Rbl 组($n = 17$)和 CHF 组($n = 15$),其中 Gs-Rbl 组于饮食中添加 Gs-Rbl 70 mg/(kg·d),一天 3 次,另外随机选取同龄健康大鼠为对照组($n = 10$),所有大鼠均常规喂养。

1.2.2 心脏超声检查

分别在阿霉素停用 2 周后和干预后第 4 周进行心脏超声检查。方法如下^[7]:10%水合氯醛麻醉 15~20 min 后,称其体重并于仰卧位固定,根据美国心脏超声协会制定的标准采用二维心脏超声评价心功能,左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)均值 < 45%被作为左心衰竭标准,该指标均被重复间断测定 3 次后取其均值。然后迅速分离、提取左心室,-80℃保存准备后续检测。

1.2.3 RT-PCR 检测

用 TRIzol 法提取心脏总 RNA,逆转录合成 cDNA (30℃ 10 min,45℃ 30 min,99℃ 5 min,5℃ 10 min),以 cDNA 为模板,用 TGF- β 1、CTGF、ET-1 和 β -actin 引物进行 PCR 扩增(表 1)。PCR 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭显色,自动凝胶图像分析系统分析,以各个 mRNA 平均积分光密度分别与 β -actin mRNA 平均积分光密度比值作为各个 mRNA 半定量指标。

表 1 ET-1,CTGF,TGF-1 和 GAPDH mRNA 引物

Table 1 The primers of mRNA of ET-1,CTGF,TGF-1 and GAPDH

基因	引物(5'→3')	退火温度(℃)	扩增长度(bp)
TGF- β 1	上游-CCCACTGATACGCCTGAG	56	154
	下游-CTGATCCCATTTGATTCCAC		
CTGF	上游-CTAAGACCTGTGGGATGGGC	57	383
	下游-CTCAAAGATGTCATTGTCCCC		
ET-1	上游-TGCTGTTTGTGGCTTTCCAA	56	257
	下游-CAAGGATCGCTTAGACCTAGAAGG		
GAPDH	上游-ACCACAGTCCATGCCATCAC	56	452
	下游-TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

1.2.4 Western blot 检测

提取心肌总蛋白并调至同一浓度水平后聚丙烯酰胺凝胶电泳(每孔加样 20 μ l)、转膜、封闭,分别加入 TGF- β 1、CTGF 一抗(兔抗鼠多克隆抗体,均 1:200 稀释),4℃孵育过夜、洗膜,加入二抗(抗兔 IgG 1:400)孵育 1 h,自动凝胶成像分析系统测

定条带平均积分光密度值,将各个蛋白平均积分光密度分别与内参 β -actin 平均积分光密度比值作为各个蛋白的半定量指标。

1.2.5 血清 ET-1 的检测

取大鼠动脉血 2 ml 于含 10% EDTA 30 μ l 塑料试管中分离血清,按试剂盒说明采用酶联免疫吸

附法检测 ET-1。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 15.0 软件包进行统计学处理, 计量资料进行 One-way 方差 (One-way ANOVA) 分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 Gs-Rb1 改善阿霉素所致的心肌重构

与对照组相比, CHF 组全心质量指数 (heart to body weight, HW/BW) ($P = 0.000$) 及左室质量指数 (left ventricular to body weight, LW/BW) ($P = 0.000$) 显著升高; 与 CHF 组相比, Gs-Rb1 组 HW/BW ($P = 0.000$) 及 LW/BW ($P = 0.000$) 均显著下降 (表 2)。

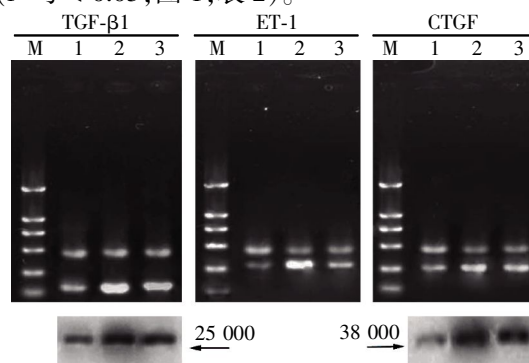
2.2 Gs-Rb1 抑制阿霉素所致心肌纤维化相关蛋白的表达

CHF 组 TGF- β 1、CTGF 和 ET-1 蛋白的表达显著高于对照组 (P 均 < 0.05); Gs-Rb1 组 TGF- β 1、CTGF 和 ET-1 蛋白的表达均显著低于 CHF 组 (P 均 < 0.05 ,

图 1, 表 2)。

2.3 Gs-Rb1 抑制阿霉素所致心肌纤维化相关因子 mRNA 的表达

与对照组相比, CHF 组 TGF- β 1、CTGF 和 ET-1 mRNA 的表达显著升高; 与 CHF 组相比, Gs-Rb1 组 TGF- β 1、CTGF 和 ET-1 等 mRNA 的表达均显著下降 (P 均 < 0.05 , 图 1, 表 2)。



M: Marker; 1: 对照组; 2: CHF 组; 3: Gs-Rb1 组。

图 1 纤维化相关蛋白和 mRNA 在各组的表达

Figure 1 The expressions of fibrosis related protein and mRNA in each group

表 2 各组心功能指标和纤维化相关蛋白/mRNA 相对含量的比较

Table 2 Cardiac function index and myocardial fibrosis related protein/mRNA in three group

组别	HW/BW(g/kg)	LW/BW(g/kg)	TGF- β 1 相对表达水平		CTGF 相对表达水平		ET-1 相对表达水平	
			蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
对照组	3.43 \pm 0.16	2.48 \pm 0.17	0.05 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
CHF 组	3.70 \pm 0.19*	2.91 \pm 0.20*	0.09 \pm 0.01*	0.27 \pm 0.03*	0.12 \pm 0.02*	0.18 \pm 0.05*	0.25 \pm 0.03*	0.32 \pm 0.05*
Gs-Rb1 组	3.57 \pm 0.24#	2.63 \pm 0.15#	0.07 \pm 0.01#	0.19 \pm 0.01#	0.08 \pm 0.02#	0.16 \pm 0.01#	0.21 \pm 0.02#	0.18 \pm 0.02#

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 CHF 组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的沉积是心肌重构的重要组成部分, 扩张型心肌病的心肌组织中, 部分正常的 ECM 被无功能的胶原基质所取代。一些研究显示 Gs-Rb1 可通过有效改善扩张型心肌病大鼠的细胞粘附蛋白 (如 E-cad、itga8 和 itgblp3)^[6] 和表皮生长因子 HB-EGF^[7] 的表达而改善心肌重构, 另外, 在促进心肌纤维化进程中, TGF- β 1、CTGF 和 ET-1 起着重要作用, 故而本研究探讨 Gs-Rb1 对这些因子的生物学效应。

TGF- β 1 是细胞外间质的重要调节因子, 与心肌纤维化的程度密切相关^[8-9], 其机制主要包括: ①通过旁分泌或自分泌方式刺激成纤维细胞增生; ②增加以胶原为主的蛋白合成, 抑制金属蛋白酶分泌并刺激蛋白酶抑制物表达, 从而抑制胶原降解; ③刺激心肌细胞肥大; ④调节下游信号蛋白如 Smad-2

的表达等。阿霉素在致 CHF 心肌重构进程中, TGF- β 1 可能起着重要作用, 而 Gs-Rb1 可能亦是通过抑制 TGF- β 1 的表达实现其改善心肌重构效应。

CTGF 是一种促纤维化细胞因子, 在组织纤维化过程中, 尤其在细胞外基质蛋白沉积中起着重要作用, 不仅特异性介导 TGF- β 1 的促纤维化作用, 亦直接刺激细胞增殖和促进心肌成纤维细胞合成、分泌 ECM, 与心肌纤维化和心脏重构密切相关^[10-11]。CTGF 上调的机制比较复杂, 除 CHF 状态的直接上调作用外, 体液或心肌局部血管紧张素 II (Ang II)、MAPK 信号通路等均起着重要作用, 另外, CTGF 上游因子如 TGF- β 1 可直接诱导 CTGF 表达。本研究显示阿霉素促进心肌组织中 CTGF 的上调, 而此效应可被 Gs-Rb1 显著抑制, 但其确切机制尚不清楚。

ET-1 是迄今已知的体内最强的缩血管物质, 主要调节局部血流、维持机体内环境稳定, 目前证实^[12]: ET-1 可诱导心肌细胞肥大, 此效应可能被 ET-A 受

体介导,其中 JNK 及 TGF- β 1 信号传导通路起着介导作用;刺激大鼠心脏成纤维细胞 DNA 合成、蛋白质合成和 I 型胶原高表达等而促进心肌纤维化,蛋白激酶 c(PKC)可能是其介导途径之一;另外,其亦可促进 CTGF 表达而恶化心肌重构。在本研究中,我们证实阿霉素可促进心肌组织中 ET-1 的上调,而 Gs-Rb1 可抑制该效应,此提示 ET-1 在 Gs-Rb1 改善阿霉素致 CHF 的生物学效应中起着一定作用,不过,ET-1 被介导的确切机制需进一步研究。

总之,我们的研究提示在阿霉素 CHF 模型中,TGF- β 1、CTGF 和 ET-1 等促进 CHF 心肌重构的发生发展,Gs-Rb1 可能通过抑制 TGF- β 1、CTGF 和 ET-1 等因子的表达而延缓 CHF 心肌重构的进程,不过,Gs-Rb1 如何抑制这些因子的表达以及如何介导改善心肌重构效应亟待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Weber KT. From inflammation to fibrosis: a stiff stretch of highway[J]. Hypertension, 2004, 43(4): 716-719
- [2] Zhao H, Lv D, Zhang W, et al. Ginsenoside-Rb1 attenuates dilated cardiomyopathy in cTnT (R141W) transgenic mouse [J]. J Pharmacol Sci, 2010; 112 (2): 214-222
- [3] Kong HL, Wang JP, Li ZQ, et al. Anti-hypoxic effect of ginsenoside Rb1 on neonatal rat cardiomyocytes is mediated through the specific activation of glucose transporter-4 *ex vivo*[J]. Acta Pharmacol Sinica, 2009, 30(4): 396-403
- [4] Kong HL, Li ZQ, Zhao YJ, et al. Ginsenoside Rb1 protects cardiomyocytes against CoCl₂-induced apoptosis in neonatal rats by inhibiting mitochondria permeability transition pore opening [J]. Acta Pharmacol Sinica, 2010, 31 (6): 687-695
- [5] Kong HL, Li ZQ, Zhao SM, et al. Cardiac autonomic nerve fiber regeneration in chronic heart failure: do Akt gene-transduced mesenchymal stem cells promote repair [J]. Neural Regeneration Research, 2010, 5(1): 28-34
- [6] 赵海苹, 冯娟, 吕丹, 等. 人参皂甙 Rb1 改善转基因扩张型心肌病模型小鼠的心功能和心脏重构[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(5): 6-10
- [7] 赵海苹, 张伟, 冯娟, 等. 人参皂甙 Rb1 抑制扩张型心肌病发生中的 HB-EGF 表达和纤维化[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(5): 11-15
- [8] Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling [J]. Pharmacol Ther, 2009, 123 (2): 255-278
- [9] Dabek J, Kułach A, Monastyrska-Cup B, et al. Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the 'protective cytokine' [J]. Pharmacol Rep, 2006, 58(6): 799-805
- [10] Ahmed MS, Øie E, Vinge LE, et al. Connective tissue growth factor: a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 36(3): 393-404
- [11] 周书春, 程劲松, 赵玉兰, 等. 坎地沙坦对慢性心衰大鼠心肌结缔组织生长因子表达的影响 [J]. 山东医药, 2009, 49(20): 33-35
- [12] 孔令雷, 颜玲娣, 宫泽辉. 内皮素系统与心肌肥厚[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(9): 1127-1130

[收稿日期] 2011-09-22

欢迎投稿 欢迎订阅