

## 积雪草酸抑制小鼠主动脉缩窄术后心肌肥厚形成

司林杰<sup>1</sup>, 许晶<sup>1</sup>, 易晨龙<sup>1</sup>, 徐晓晗<sup>1</sup>, 张杨杨<sup>1</sup>, 张郁青<sup>2</sup>, 王晓伟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院胸心外科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学附属江宁医院心血管内科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:观察积雪草酸(asiatic acid, AA)对小鼠主动脉弓缩窄术后心肌肥厚的保护作用并探讨其可能的机制。方法:采用主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction, TAC)法建立小鼠心肌肥厚模型。实验分为 5 组:假手术组(Sham 组)、手术组(TAC 组)、TAC+AA1[25 mg/(kg·d)]组、TAC+AA2[50 mg/(kg·d)]组、TAC+AA3[100 mg/(kg·d)]组。TAC 术后 2 周,心脏超声检测心功能,Western blot 法检测心肌组织中转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta$ 1、p-p38、p38、p-ERK1/2 以及 ERK1/2 蛋白的表达,real-time PCR 法检测心肌组织中 ANP 和 TGF- $\beta$ 1 基因的表达。结果:AA 可显著抑制 TAC 诱导的心肌肥厚,改善心功能,降低 TGF- $\beta$ 1 基因和蛋白表达,并抑制 p38 和 ERK1/2 磷酸化。结论:AA 治疗可抑制心肌肥厚,其机制可能与 AA 抑制 TGF- $\beta$ 1-p38/ERK1/2 信号通路有关。

**[关键词]** 积雪草酸;心肌肥厚;转化生长因子  $\beta$ 1;丝裂原激活蛋白激酶

**[中图分类号]** R541

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)09-1168-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140904

## Protective effects of asiatic acid against postoperative cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction in mice

Si Linjie<sup>1</sup>, Xu Jing<sup>1</sup>, Yi Chenlong<sup>1</sup>, Xu Xiaohan<sup>1</sup>, Zhang Yangyang<sup>1</sup>, Zhang Yuqing<sup>2</sup>, Wang Xiaowei<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Cardiology, the Affiliated Jiangning Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the protective effects and molecular mechanisms of asiatic acid (AA) on postoperative cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction in mice. **Methods:** Transverse aortic constriction (TAC) was performed to establish the mice model of myocardial hypertrophy. C57BL/6 mice were divided into five groups: the Sham group, the TAC group, the TAC+AA1 [25 mg/(kg·day)] group; the TAC+AA2 [50 mg/(kg·day)] group and the TAC+AA3 [100 mg/(kg·day)] group. After 2 weeks of TAC, echocardiography was performed to measure the hypertrophic criteria of the hearts. The protein expressions of TGF- $\beta$ 1, p-p38, p38, p-ERK1/2 and ERK1/2 were detected by Western blot. The mRNA expressions of ANP and TGF- $\beta$ 1 were detected by real-time PCR. **Results:** AA significantly inhibited cardiac hypertrophy induced by TAC, improved cardiac function, reduced the mRNA and protein expression of TGF- $\beta$ 1, as well as the phosphorylation of p38 and ERK1/2. **Conclusion:** AA attenuates TAC-induced cardiac hypertrophy. The protective mechanisms of AA may through inhibiting TGF- $\beta$ 1-p38/ERK1/2 signaling pathway.

**[Key words]** asiatic acid; cardiac hypertrophy; transforming growth factor- $\beta$ 1; mitogen activated protein kinase

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1168-1172]

**[基金项目]** 江苏省教育厅自然科学基金(12KJB320003);江苏省中医药局科技基(lz13217);南京市科技局科技发展基金(201303036)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wangxiaowei@njmu.edu.cn

高血压是威胁人类健康的重要疾病,其发病率和致死率逐年增加。当高血压引起压力负荷增大时,心脏会代偿性增大以适应增大的血流动力学的需求,这个过程被称为心肌肥厚。但是,持续性的压力超负荷会引起心肌肥厚失代偿,进而导致心血管意外如猝死、心肌梗死、心律失常、心力衰竭等的发生

率显著增加。越来越多的研究表明,心肌肥厚是心血管疾病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。因此,探寻有效的抑制心肌肥厚的药物具有重要的临床意义。

积雪草酸(asiatic acid, AA)又名亚细亚酸,是从传统中药积雪草中提取的五环三萜烯酸。近年来研究表明 AA 具有治疗皮肤创伤、保护脑局灶性缺血再灌注损伤、抑制神经细胞凋亡、抑制 CCL<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化以及诱导肿瘤细胞凋亡等多种药理作用<sup>[2-5]</sup>。但是 AA 对心肌肥厚的作用未见报道。本研究拟以小鼠主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)建立心肌肥厚模型,观察 AA 对心肌肥厚的影响并探讨其可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药物配制

AA(纯度> 97%,美国 Sigma 公司),先用 DMSO 充分溶解混匀,再用生理盐水稀释,混匀,配成工作液(DMSO 浓度低于 0.1%)。

#### 1.1.2 动物模型建立和分组

雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,清洁级,体重 20~25 g,8~10 周龄,由南京医科大学动物实验中心提供[合格证号:SCXK(苏) 2002-0031]。采用 TAC 制备小鼠主动脉缩窄动物模型。4%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,仰卧位固定小鼠,胸骨正中切口,分层打开纵膈腔,拨开胸腺,在心底部钝性分离主动脉弓部,将钝性 27G 注射针头(外径 0.4 mm)平行置于主动脉外壁,在头臂干和左颈总动脉之间,用 7-0 手术丝线将针头和主动脉弓一齐扎紧后将针头移去,关胸,术毕。假手术对照组采用相同处理,将 7-0 丝线置于主动脉弓相同位置不做结扎。术后小鼠常规喂养,于术后 2 周心脏超声检测心功能后处死小鼠,取出心脏,计算心脏重量/体重比(heart weight/body weight, HW/BW),心脏标本置于液氮速冻,然后保存于-80℃冰箱待用。实验分为 5 组:假手术组(Sham 组);手术组(TAC 组);TAC+AA1 组,TAC 术后 AA 25 mg/(kg·d)灌胃,每天 1 次;TAC+AA2 组,TAC 术后 AA 50 mg/(kg·d)灌胃;TAC+AA3 组,TAC 术后 AA 100 mg/(kg·d)灌胃。每组 10 只小鼠。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 心脏超声检测

术后 2 周,小鼠经气体麻醉后连接小动物超声检测设备(Vevo 2100, VisualSonics 公司,加拿大),检测心功能,取左室短轴观、胸骨旁左室长轴观,在

二维影像指导下以 M 型超声模式测量室间隔厚度(interventricular septum diastolic diameter, IVSD)、左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness diastole, LVPWD)、左室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)和左室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD),计算左室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

#### 1.2.2 组织学检测

左室标本石蜡切片经二甲苯以及不同浓度乙醇脱蜡至水,再经苏木素-伊红(HE)染色,中性树脂封片,显微镜下观察心肌细胞横截面积。

#### 1.2.3 RNA 提取和 real-time RT-PCR

心肌组织中的总 RNA 用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国)提取。cDNA 合成采用日本 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent 试剂盒说明书步骤进行,根据 TaKaRa 公司 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书步骤建立 real-time PCR 反应体系,在美国 Eppendorf 公司 mastercycler ep realplex 荧光定量 PCR 仪上检测特异底物扩增情况。引物序列如下:心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP), forward: 5'-CCAGCATGGGCTCCTTCTCCA-3', reverse: 5'-CCGGAAGCTGTTGCAGCCTAGT-3'。转化生长因子(transforming growth factor, TGF)-β1 forward: 5'-GACTCTCCACCTGCAAGACC-3', reverse: 5'-ACTGCTTCCCGAATGTCTGA-3'。GAPDH forward: 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3', reverse: 5'-TGTTGCTGTAGCCGTATTCA-3'。相对基因表达采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算。

#### 1.2.4 蛋白质印迹检测(Western blot)

心肌组织总蛋白按照相应蛋白提取试剂盒(南京凯基生物公司)说明书进行提取,用 BCA 法对蛋白进行定量检测,经 SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜,室温 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后加抗 TGF-β1、抗 p-p38、抗 p38、抗 p-ERK1/2 以及抗 ERK1/2(1:1 000, Cell Signaling Technology 公司,美国),4℃孵育过夜。化学发光检测系统(Pierce ECL Substrate Western blot detection system, Thermo 公司,美国)显色, Molecular Imager ChemiDoc XRS 系统(Bio-Rad 公司,美国)扫描条带。ImageJ 软件进行条带的灰度检测。

### 1.3 统计学方法

所有数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS18.0 统计软件,以单因素方差分析及组间 *t* 检验作统计学处理, *P* ≤ 0.05 认为差异有统计学意义。

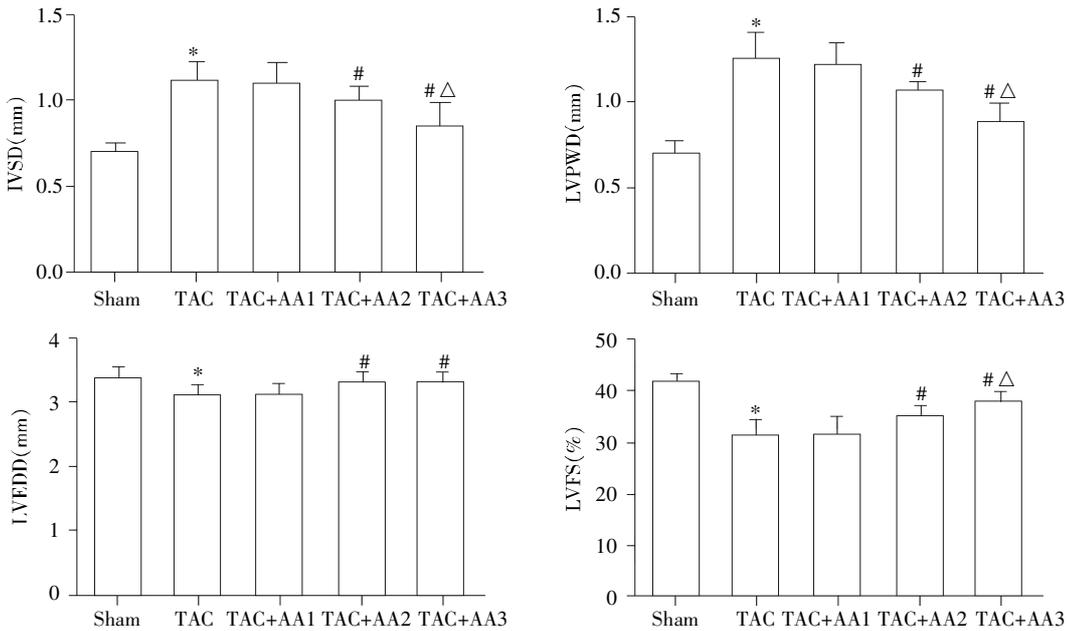
## 2 结果

### 2.1 AA 对小鼠主动脉弓缩窄术后心功能的影响

如图 1 所示, TAC 术后 2 周舒张期 IVSD 和舒张期 LVPWD 较假手术组明显增厚 ( $P < 0.05$ ), LVEDD 较假手术组下降 ( $P < 0.05$ ), 表明 TAC 术后 2 周出现明显心肌肥厚, 同时 LVFS 较假手术组明显下降 ( $P < 0.05$ )。TAC 组小鼠分别以 AA 25、50、100

mg/(kg·g) 灌胃, 心超结果显示: 25 mg/(kg·d) AA 灌胃并不能改善小鼠 TAC 术后心功能, 而 50 mg/(kg·d) AA 和 100 mg/(kg·d) AA 灌胃均能显著改善小鼠 TAC 术后心功能 ( $P < 0.05$ )。并且, 100 mg/(kg·d) AA 灌胃对 IVSD、LVPWD 以及 LVFS 的改善效果要好于 50 mg/(kg·d) AA 组 ( $P < 0.05$ ), 但是 LVEDD 的改善效果两组间无统计学差异。

### 2.2 AA 对肥厚心肌形态学的影响



与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 TAC 组比较, # $P < 0.05$ ; 与 TAC+AA2 组比较, △ $P < 0.05$  ( $n = 10$ )。

图 1 心脏超声检测心功能指标

Figure 1 Cardiac function was measured by echocardiography

各组典型心脏切片见图 2 所示。TAC 术后 2 周 HW/BW 较假手术组显著增加 ( $P < 0.05$ )。25 mg/(kg·d) AA 灌胃对小鼠 TAC 术后 HW/BW 无明显影响, 而 50 mg/(kg·d) AA 和 100 mg/(kg·d) AA 灌胃均能显著降低 TAC 小鼠 HW/BW ( $P < 0.05$ )。并且, 100 mg/(kg·d) AA 灌胃降低 TAC 小鼠 HW/BW 的效果要好于 50 mg/(kg·d) AA ( $P < 0.05$ )。另外, 左室心肌组织 HE 染色显示 TAC 小鼠心肌横截面积比假手术组显著增大。50、100 mg/(kg·d) AA 灌胃均能显著降低 TAC 小鼠心肌横截面积。

### 2.3 AA 对心肌组织中心肌肥厚标志物表达的影响

如图 3 所示, TAC 术后 2 周心肌组织中 ANP 基因以及 TGF- $\beta$ 1 基因和蛋白表达水平均比假手术组显著上升。25 mg/(kg·d) AA 灌胃能降低 TAC 小鼠心肌组织中 ANP 基因和 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 而对 TGF- $\beta$ 1 基因表达无明显影响。50 mg/(kg·d) AA 和 100 mg/(kg·d) AA 灌胃均能显著降低

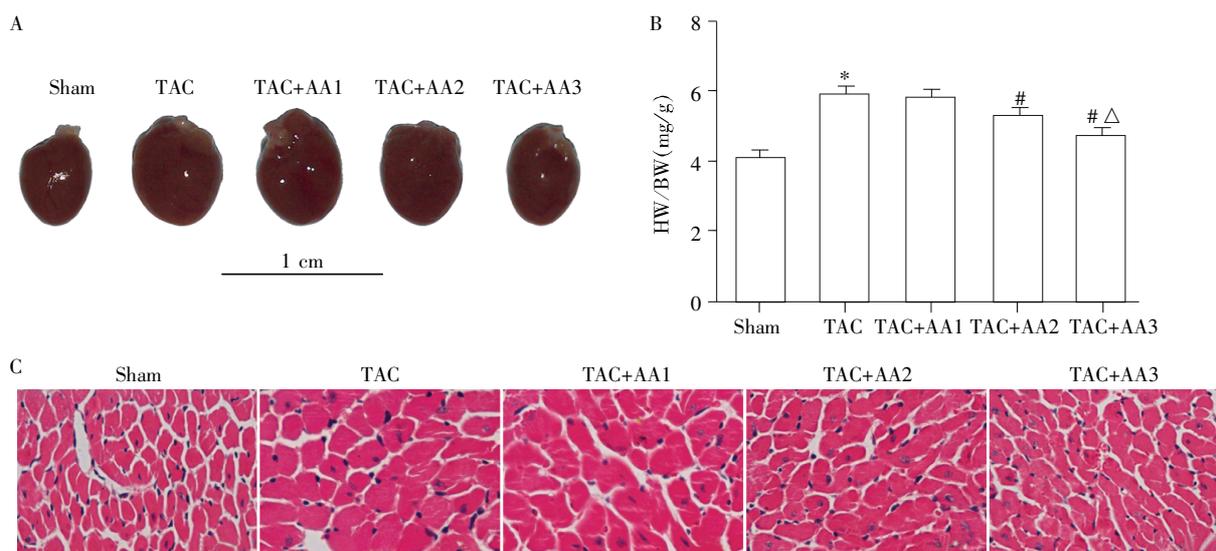
TAC 小鼠心肌组织中 ANP 基因以及 TGF- $\beta$ 1 基因和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。且 100 mg/(kg·d) AA 灌胃对这些心肌肥厚标志物的抑制效果要好于 50 mg/(kg·d) AA ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 AA 对 MAPK 信号转导通路的影响

丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路主要包括 3 条重要的 MAPK 级联反应, 分别为 p38、ERK1/2 和 JNK。Western blot 检测结果显示: 与假手术组相比, TAC 术后 2 周心肌组织中 p38 和 ERK1/2 磷酸化水平显著增高。3 种不同浓度 AA 灌胃均能显著降低 TAC 小鼠心肌组织中 p38 和 ERK1/2 磷酸化水平 (图 4)。另外, JNK 磷酸化水平不受 TAC 手术和 AA 灌胃影响 (结果未列出)。

## 3 讨论

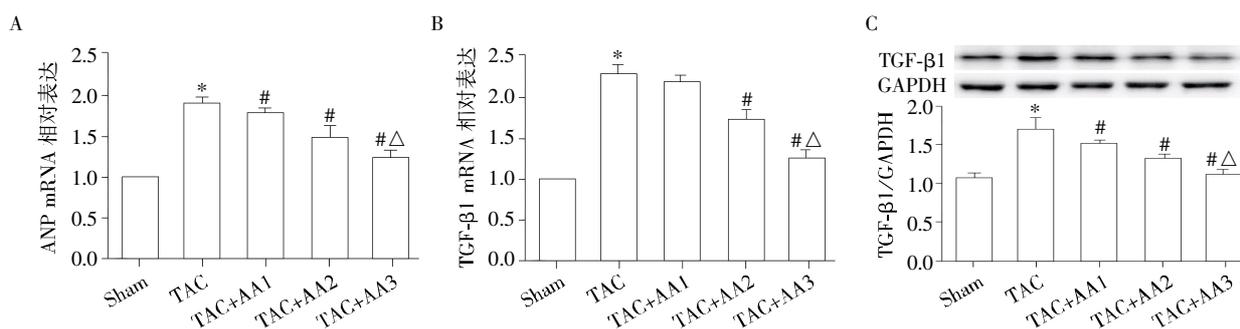
本研究发现, 小鼠 TAC 术后 2 周出现明显心肌肥



A: 各组典型心脏照片; B: 各组心脏重量与体重比, 与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 TAC 组比较, # $P < 0.05$ ; 与 TAC+AA2 组比较, △ $P < 0.05$ 。C: 心脏切片 HE 染色( $\times 400$ )。

图 2 AA 对肥厚心肌形态学的影响

Figure 2 Effect of AA on hypertrophy myocardial morphology



A: ANP 基因表达; B: TGF-β1 基因表达; C: TGF-β1 蛋白表达。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 TAC 组比较, # $P < 0.05$ ; 与 TAC+AA2 组比较, △ $P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

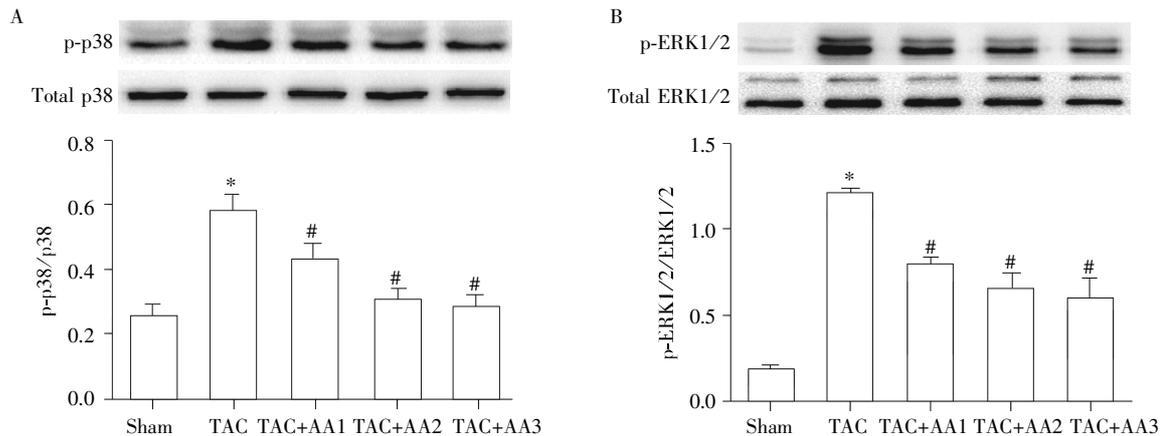
图 3 AA 对心肌组织中心肌肥厚标志物表达的影响

Figure 3 Effect of AA on the expression of hypertrophic markers in the myocardium

厚, 心肌组织中肥厚标志物表达水平以及 p38 和 ERK1/2 磷酸化水平均显著升高。50 和 100 mg/(kg·d) AA 灌胃均能显著抑制心肌肥厚, 改善心脏功能, 降低心肌组织中肥厚标志物表达水平以及 p38 和 ERK1/2 磷酸化水平。

心肌肥厚是一种以心脏重量增加为特征的病理生理改变, 可继发于多种心血管疾病, 其中以高血压最常见。高血压初期, 心脏后负荷增大导致心脏泵血阻力增大, 心脏会代偿性肥厚增大以克服增加的压力负荷。但是, 持续性的压力超负荷会引起心肌肥厚失代偿, 进而导致猝死、心律失常、心力衰竭等一系列心血管意外。因此, 心肌肥厚是目前公认的心血管疾病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。ANP 基因是一种胚胎基因, 在正常生理情况下不表达或低表达。在心

肌受到压力刺激后, ANP 基因会大量表达, 使心肌组织以及循环中 ANP 水平显著上升, 促进心肌肥厚的发生发展。因此, ANP 基因目前被认为是心肌肥厚的标志物<sup>[6]</sup>。当心肌受到压力刺激时, 心肌细胞还会释放多种细胞因子和激素, 包括 TGF-β1、血管紧张素 II (Ang II) 以及内皮素等, 这些物质可以作为信号分子活化多种信号通路最终导致心肌肥厚。TGF-β1 是一种多功能细胞因子, 目前研究表明 TGF-β1 是心肌肥厚发生发展的起始信号分子, TGF-β1 介导的肥厚性信号通路在心肌肥厚发生发展过程中起着至关重要的作用<sup>[7-8]</sup>。转基因研究表明, 小鼠心肌组织过表达 TGF-β1 会导致显著的心肌肥厚并伴有不同程度的心肌纤维化<sup>[9]</sup>。相反, 敲除 TGF-β1 基因的小鼠在受到多种肥厚性刺激时并不



A: p38 磷酸化水平; B: ERK1/2 磷酸化水平。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 TAC 组比较, # $P < 0.05$ ; 与 TAC+AA2 组比较, ^ $P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

图 4 AA 对 MAPK 信号转导通路的影响

Figure 4 Effect of AA on the MAPK signal transduction pathway

会出现显著的心肌肥厚<sup>[7]</sup>。本研究发现, TAC 术后 2 周小鼠心肌组织中 ANP 基因、TGF- $\beta$ 1 基因和蛋白表达水平均显著升高。100 mg/(kg·d) AA 治疗后可显著降低 TAC 小鼠心肌组织中 ANP 基因、TGF- $\beta$ 1 基因和蛋白表达水平。这些研究结果表明 AA 对心肌肥厚的抑制作用可能是通过抑制 TGF- $\beta$ 1 信号及其介导肥厚信号通路来实现的。

最近研究表明, MAPK 作为 TGF- $\beta$ 1 的下游信号靶点通过一系列的信号级联反应最终导致心肌肥厚<sup>[10]</sup>。在体外实验中, TGF- $\beta$ 1 可刺激心肌细胞发生明显的肥厚反应并激活 MAPK 信号<sup>[7]</sup>。在体内心肌肥厚动物模型实验中, 心肌组织中 TGF- $\beta$ 1 表达水平显著升高, 并且与 MAPK 信号活化密切相关<sup>[10]</sup>。本研究发现 TAC 术后 2 周小鼠心肌组织中 p38 和 ERK1/2 磷酸化水平显著增高。100 mg/(kg·d) AA 治疗后可显著降低 TAC 小鼠心肌组织中 p38 和 ERK1/2 磷酸化水平。

综上所述, AA 对小鼠主动脉缩窄术后心肌肥厚具有显著的抑制作用, 其机制可能与抑制 TGF- $\beta$ 1-MAPK 信号通路有关。其对心肌肥厚确切保护机制需要进一步研究来证实。

#### [参考文献]

- [1] Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(8): 589-600
- [2] Krishnamurthy RG, Senut MC, Zemke D, et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from *Centella asiatica*, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(11): 2541-2550
- [3] Zhang X, Wu J, Dou Y, et al. Asiatic acid protects primary neurons against C2-ceramide-induced apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 679(1-3): 51-59
- [4] Tang LX, He RH, Yang G, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31350
- [5] Hsu YL, Kuo PL, Lin LT, et al. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313(1): 333-344
- [6] Zhu Y, Li T, Song J, et al. The TIR/BB-loop mimetic AS-1 prevents cardiac hypertrophy by inhibiting IL-1R-mediated MyD88-dependent signaling [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(5): 787-799
- [7] Lim JY, Park SJ, Hwang HY, et al. TGF-beta1 induces cardiac hypertrophic responses via PKC-dependent ATF-2 activation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39(4): 627-636
- [8] Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(4): 600-606
- [9] Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, et al. Alterations of  $\beta$ -adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- $\beta$ 1 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(3): H1253-H1262
- [10] Huang H, Tang QZ, Wang AB, et al. Tumor suppressor A20 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis by blocking transforming growth factor-beta-activated kinase 1-dependent signaling [J]. *Hypertension*, 2010, 56(2): 232-239

[收稿日期] 2014-03-21