



基于 TGF- β -Smads 信号的氧化苦参碱干预急性心肌梗死诱发实验性大鼠心肌纤维化的研究

沈祥春^{1*}, 杨钰萍¹, 徐旖旎¹, 许立², 方泰惠²

(1. 贵阳医学院 药理研究室, 贵州 贵阳 550004;

2. 南京中医药大学 江苏省中药药效学与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究氧化苦参碱(OMT)对大鼠急性心肌梗死诱发实验性心肌纤维化的保护作用及对 TGF- β -Smads 信号通路的影响。方法:采用冠状动脉结扎术复制大鼠急性心肌梗死模型,随机分为模型组、OMT 高、中、低剂量组(50, 25, 12.5 mg·kg⁻¹)、卡托普利组(50 mg·kg⁻¹);假手术组(Sham)只做冠状动脉穿线而不结扎。模型复制 8 周后采用 HE 与 Masson 染色分析心肌纤维化病变程度,半定量 RT-PCR 分析 TGF- β -Smads 信号系统 mRNA 的表达。结果:模型组急性心肌梗死 8 周后,病理组织学检查提示心肌细胞减少,细胞外基质沉积,胶原含量增加;RT-PCR 结果提示 TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA 表达明显增加,而 Smad7 mRNA 的表达显著降低,与 Sham 组比较,差异显著。OMT 显著抑制急性心肌梗死 8 周后诱发的实验性心肌纤维化,抑制 TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA 表达的上调和增加 Smad7 mRNA 的表达。结论:OMT 对急性心肌梗死诱发实验性心肌纤维化具有一定的抑制作用,其作用机制与 TGF- β -Smads 信号系统密切相关。

[关键词] 氧化苦参碱;心肌纤维化;TGF- β -Smads

急性心肌梗死(acute myocardial fibrosis, AMI)后病程演变形成的心肌重塑可导致心室扩张,心功能进行性障碍,甚至诱发猝死^[1]。目前,预防和逆转心肌重塑已成为防治心血管系统疾病的焦点之一。因此,寻找合理有效的防治与逆转心肌重塑的药物成为世界各国医药研究工作的重大课题。我国独特的中医药理论指导下的防病治病体系是前人对疾病防治的系统总结和精心归纳的结果,从传统中药中寻找防治心肌重塑的药物对促进中医药现代化和产业化以及中医药在世界范围内被广泛认可具有重要的社会意义和经济价值。

中药苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根,具有清热燥湿,杀虫,利尿等作用。氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)是豆科植物苦参的主要有效成分,具有广泛的药理作用^[2],本实验室前期研究结果证实,OMT 对大鼠冠脉结扎诱发实验性心肌纤维化具有显著的保护作用^[3]。本研究采

用结扎冠状动脉法复制 AMI 诱发大鼠实验性心肌纤维化模型,进一步探索 OMT 防治心肌纤维化的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,清洁级,9 周龄,60 只,体重(275 ± 25) g,由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黔)2000-0001。

1.2 药物及试剂 氧化苦参碱(南京泽郎医药科技有限公司,批号 20080210);卡托普利片(山东华信制药有限公司,批号 H37021491);Trizol Reagent(invitrogen, Cat 15596-026);RT kit(TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit, code DRR037S, LotBK1301);PCR kit [TaKaRa Taq™, 宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 仪器 HX-300 动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);BS223S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);移液器(1 mL, 200, 20, 2.5 μ L: EppendorfAG, North America Inc., USA);Gene quant pro 80-2114-98 紫外分光光度计(Amersham Biosciences);TC-512 基因扩增仪(Techn);MiniRun GE-100 电泳仪(杭州博日科技有限公司);Image quant 400 凝胶成像仪(GE Healthcare)。

2 方法

2.1 AMI 大鼠模型的制备 大鼠称重后用 3% 水

[稿件编号] 20110312002

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701024;81173586);贵州省科技攻关项目(黔科合[2007]1035号);贵州省国际科技合作基金(黔科合外 G 字[2009]700115号)

[通信作者] * 沈祥春, 博士后, 教授, 主要从事分子与生化药理及中药民族药活性研究, E-mail: shenxiangchun@126.com



合氯醛腹腔注射麻醉($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),固定于鼠板,用针形电极插入四肢皮下,观察记录标准肢体 II 导联心电图。胸部去毛,消毒,在第4,5肋间距胸骨左缘2 mm处剪开皮肤,上下纵向延伸切口约2 cm,逐层钝性分离皮下组织、肌肉至胸壁,将皮肤作荷包缝合备用。将动物呼吸机调至频率每分钟80次、呼吸时程比2:1、潮气量 $16 \sim 20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,面罩式供呼吸。于第4,5肋间距胸骨左缘约2 mm处打开胸壁,剪断第4,5肋(或第3,4肋),挑开胸膜,小拉钩拉开胸壁,暴露心脏。挑开心包膜,轻压右侧胸壁挤出心脏,用无菌7-0号医用缝合线在肺动脉圆锥与左心耳之间距主动脉根部约5 mm处结扎左冠状动脉前降支,结扎深度约 $1 \sim 2 \text{ mm}^{[4]}$ 。将心脏迅速放回胸腔,轻柔挤压胸腔排尽气体,关闭胸腔。待大鼠恢复自主呼吸后,停止人工呼吸。观察并记录结扎后10 min大鼠标准肢体 II 导联心电图,比较结扎前后肢体 II 导联心电图,以J点的变化标志结扎手术复制AMI成功。假手术组大鼠冠脉穿线但未行结扎手术。各组大鼠均术后予青霉素预防感染,每只14万U,腹腔注射,每天1次,连续3 d。

2.2 分组及给药方案 将造模复制成功的大鼠随机分为模型组(M)、OMT高剂量组(OMT-H, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、OMT中剂量组(OMT-M, $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、OMT低剂量组(OMT-L, $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、卡托普利组(Cap, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);另设假手术组(Sham),假手术组大鼠只做冠状动脉穿线而不结扎。各组于模型复制后12 h开始灌胃给药,给药容积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日1次,其中假手术组、模型组的大鼠每日给予相同容积的蒸馏水灌胃,连续给药8周。每组保证实验结束时有8只动物存活。各组于模型复制后8周检测指标并取标本,其中4只用于病理学分析,另外4只用于PCR扩增。

2.3 病理组织学检查 HE染色分析:方法参照文献[5],每个标本取心脏横切面石蜡切片用于HE染色。石蜡切片乙醇梯度脱水后,经历苏木素染色,0.5%盐酸乙醇分化,伊红复染,中性树胶固定后观察,细胞核呈蓝色,细胞浆及其他组织呈粉红色,然后利用图像分析系统低倍镜下观察每张切片,并对HE染色切片进行拍照分析。

Masson染色分析:方法参照文献[6],每个标本取心脏横切面石蜡切片用于Masson染色。Weiger氏铁苏木素染色,1%盐酸乙醇分化,丽春红酸性品

红液复染,苯胺蓝液复染,中性树胶封片固定后观察,胶原纤维呈蓝色,胞质、肌纤维和红细胞呈红色,胞核呈蓝色,然后利用图像分析系统低倍镜下观察每张切片,并对Masson染色切片进行拍照分析。

2.4 提取总RNA 迅速剪碎新鲜组织标本(或液氮保存的组织标本),每100 mg组织加入1 mL TRIzol试剂(组织块体积不要超过TRIzol体积的10%),严格按照说明书规定操作步骤,提取左心室组织总RNA。于紫外分光光度计上,测定样品260,280 nm的A,计算 A_{260}/A_{280} 及总RNA浓度并记录。选取 A_{260}/A_{280} 在1.8~2.0的总RNA进行逆转录试验。

2.5 半定量RT-PCR分析左心室组织TGF- β -Smads mRNA的表达 取1 μg 总RNA行RT-PCR扩增,操作步骤按试剂盒要求进行。所用引物见表1,引物由宝生物工程(大连)有限公司设计并合成。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,退火温度按表1设定,退火时间30 s;循环30次;72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。取6 μL PCR产物于1.5%琼脂糖中电泳。EB染色后在紫外灯下,用Quantity-one凝胶成像分析系统分析各条带的总灰度值,并与其相对应的内参(Gapdh)的总灰度值相比较,得出灰度比值。

2.6 统计分析 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件进行数据处理(One-Way ANOVA),2组间比较采用t检验。

3 结果

3.1 病理组织学检查 冠脉结扎8周后,左心室心梗部位病理组织学检查见图1(HE染色)和图2(Masson染色)。Sham组:HE染色可见心肌细胞染色均匀,排列规则,心肌细胞间隙均匀清楚,未见任何明显病理学改变。Masson染色可见心肌纤维增生轻微(-~+)。M组:HE染色可见心肌细胞染色不均匀,多数心肌细胞排列不规则,细胞间隙变窄,并有断裂现象,在断裂心肌附近偶见点状出血,心肌广泛坏死,在坏死区炎性浸润明显、纤维结缔组织增生严重。Masson染色可见心肌纤维增生程度严重(III)。OMT组:HE染色各组均有轻微的病理改变,心肌细胞染色基本均匀,外观基本正常,排列基本整齐,心肌细胞间隙均匀,偶尔可见心肌细胞间隙变窄和较轻微的肥大,心肌坏死较少见,梗死区炎性浸润较轻微,纤维结缔组织增生不明显。Masson染色可见各组心肌纤维增生程度较轻(+~++)。

表1 PCR引物表

Table 1 Primer of PCR

基因名称	引物序列	$T_m/^\circ\text{C}$	实际退火温度/ $^\circ\text{C}$	增幅产物/bp
Gapdh	上游 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	64.4	60	143
	下游 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	62.8		
Tgfb1	上游 5'-TGCGCCTGCAGAGATTCAAG-3'	65.0	60	82
	下游 5'-AGGTAACGCCAGGAATTGTTGCTA-3'	65.0		
Tgfb1	上游 5'-GCTGACATCTATGCAATGGGCTTA-3'	64.5	60	87
	下游 5'-AGGCAACTGGTAGTCTTCGTGGA-3'	64.4		
Smad2	上游 5'-AGTGTTTGGCCAGTGCCTAAAGTG-3'	64.9	55	146
	下游 5'-GAGCAGCAAATTCCTGTTGTTGA-3'	64.7		
Smad3	上游 5'-GATGCTTCGTGACATTGGAACCTA-3'	64.5	60	145
	下游 5'-TTCCCACGTTTAAATGCTGCTG-3'	64.3		
Smad4	上游 5'-TGACGCCTGTCTGAGCATTTGA-3'	64.1	60	190
	下游 5'-TCTCTGTATGCTGACACACTTGCTG-3'	63.7		
Smad7	上游 5'-TGCTGTGCAAAGTGTTCAGGTG-3'	64.6	60	177
	下游 5'-CCATCGGGTATCTGGAGTAAGGA-3'	63.5		

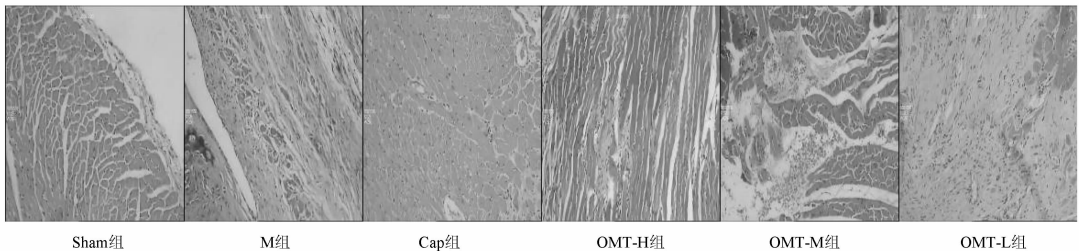


图1 冠脉结扎后8周各组大鼠心肌病理组织学检查(HE)

Fig. 1 The histopathological check of cardiac fibrosis in rats induced by coronary ligation 8 weeks(HE staining)

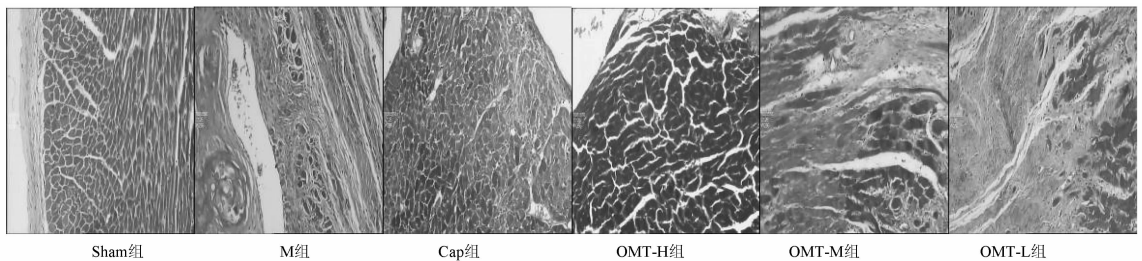


图2 冠脉结扎后8周各组大鼠心肌胶原染色病理检查(Masson染色)

Fig. 2 The collagen staining of cardiac fibrosis in rats induced by coronary artery ligation 8 weeks(Masson staining)

3.2 RT-PCR 结果 冠脉结扎8周后,与Sham组比较,M组大鼠非梗死区心肌中TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3, Smad4 ($P < 0.01$)的表达明显增加, Smad7表达明显减少。连续给予OMT 8周,与M组比较,OMT中、高剂量组显著抑制大鼠非梗死区心肌中TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3, Smad4的表达,提高Smad7的表达增加;OMT低剂量组显著抑制大鼠非梗死区心肌中T β R1的表达,提高Smad7的表

达增加,见表2和图3。

4 讨论

心肌重塑(cardiac remodeling)是指在各种因素(心肌缺血、梗塞、血流动力负荷、炎症等)直接或间接作用下所造成的心肌结构、功能的变化,心肌细胞适应性肥大、坏死、凋亡,心肌细胞外基质胶原沉积和纤维化,心肌僵硬增加等病理变化^[7]。

大鼠冠脉结扎8周后,模型组大鼠左心室标本



表2 OMT对AMI后8周大鼠心肌重塑相关基因 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of OMT on TGF- β -Smads mRNA expression of cardiac remodeling in rats induced by coronary artery ligation 8 weeks ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	TGF- β 1	T β R1	Smad2	Smad3	Smad4	Smad7
Sham	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01	0.43 \pm 0.11	0.28 \pm 0.01
M	0.23 \pm 0.09 ²⁾	0.40 \pm 0.08 ²⁾	0.22 \pm 0.03 ²⁾	0.10 \pm 0.01 ²⁾	1.14 \pm 0.37 ²⁾	0.11 \pm 0.05 ²⁾
Cap	0.03 \pm 0.01 ⁴⁾	0.06 \pm 0.03 ³⁾	0.09 \pm 0.02 ³⁾	0.05 \pm 0.01 ³⁾	0.54 \pm 0.11 ³⁾	0.72 \pm 0.08 ⁴⁾
OMT-H	0.04 \pm 0.01 ⁴⁾	0.11 \pm 0.02 ³⁾	0.10 \pm 0.01 ³⁾	0.04 \pm 0.01 ³⁾	0.51 \pm 0.19	0.37 \pm 0.03 ³⁾
OMT-M	0.06 \pm 0.01 ⁴⁾	0.11 \pm 0.01 ³⁾	0.13 \pm 0.05 ³⁾	0.06 \pm 0.01 ³⁾	0.70 \pm 0.14	0.29 \pm 0.07 ³⁾
OMT-L	0.15 \pm 0.05	0.14 \pm 0.04 ³⁾	0.23 \pm 0.02	0.07 \pm 0.03	0.82 \pm 0.33	0.23 \pm 0.06 ³⁾

注:与 Sham 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 M 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

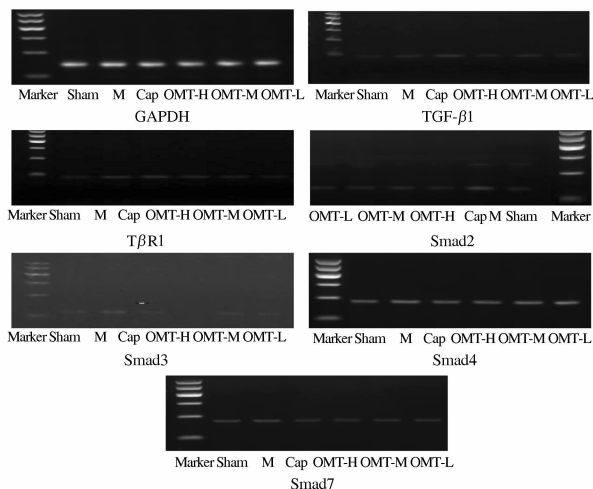


图3 OMT对TGF- β -Smads信号系统 mRNA 表达的影响
Fig. 3 The gel electrophoresis figure of OMT on TGF- β -Smads mRNA expression of cardiac remodeling in rats induced by coronary artery ligation 8 weeks

可见心肌细胞染色不均匀,多数心肌细胞排列不规则,细胞间隙变宽,并有断裂现象,心肌广泛坏死,在坏死区炎性浸润明显、纤维结缔组织增生严重,提示冠脉结扎8周已发生严重心肌梗死并出现典型的心肌重塑的病理表现。与模型组比较,OMT各组均有轻微的病理改变。显微镜下可见心肌细胞染色基本均匀,外观基本正常,排列基本整齐,心肌细胞间隙均匀,心肌坏死较少见,梗死区炎性浸润轻微,纤维结缔组织增生程度较轻。结果提示连续给予 OMT8周,具有抑制心肌纤维化作用。

活化的转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)是与细胞外基质积聚关系最为密切的细胞因子,是公认的器官纤维化的治疗靶标^[8],在调节 CFs 的表型和基因表达,促进胶原蛋白和纤维连接蛋白的合成,诱导蛋白酶抑制物从而导致细胞

外基质沉积中发挥重要的作用^[9]。TGF- β 是心肌细胞或者心脏非心肌细胞自分泌或旁分泌的生长因子,在梗死心肌组织中显著增加,而且被快速激活,在肥厚心肌稳定状态向 CHF 状态转化时也显著增加。TGF- β 通过细胞内信号转导通路发挥作用,而 Smads 蛋白家族是 TGF- β 信号系统中 TGF- β 的重要作用底物,故 TGF- β -Smads 信号通路对 CFs 激活/细胞外基质 (ECM) 病变作用引起研究人员极大关注^[10]。本研究实验结果证实,M组大鼠非梗死区心肌中 TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3, Smad4 ($P < 0.01$)的表达明显增加,Smad7 表达明显减少,提示冠脉结扎8周后,TGF- β -Smads 系统中促纤维形成信号系统因子表达增强、抑制纤维形成因子减少。连续给予 OMT 8周,与 M 组比较,OMT 中、高剂量组显著抑制大鼠非梗死区心肌中 TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3, Smad4 的表达,提高 Smad7 的表达增加;OMT 低剂量组显著抑制大鼠非梗死区心肌中 T β R1 的表达,提高 Smad7 的表达增加。证实 OMT 抑制心肌纤维化作用与其降低 TGF- β -Smads 促纤维形成作用及增强抑制纤维化形成作用密切相关。

[参考文献]

[1] Pfeffer M A, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications [J]. Circulation, 1990, 81: 1161.
 [2] 杨钰萍, 沈祥春. 氧化苦参碱药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(5): 405.
 [3] 杨钰萍, 沈祥春, 刘兴德, 等. 氧化苦参碱对急性心肌梗死诱发实验性大鼠心肌重塑的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 125.
 [4] 沈祥春, 陶玲, 彭俊, 等. 太子参对心肌梗死后慢性心衰大鼠心肌组织 NOS 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(4): 806.
 [5] 熊兰英. 浅谈石蜡制片-HE 染色点滴体会[J]. 检验医学与



- 临床,2006,4:169.
- [6] 张雪静,张国红,李清. Masson 染色在中医专业病理实验教学改革中的应用初探[J]. 河北中医药学报,2004,2(19):48.
- [7] Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts [J]. Nature, 2008,456(7224):980.
- [8] Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- β [J]. J Clin Invest, 2010,120(10):3520.
- [9] Wang J, Xu N, Feng X H, et al. Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Circ Res, 2005,97(8):821.
- [10] Yuan S M, Jing H. Cardiac pathologies in relation to Smad-dependent pathways[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg,2010,11(4):455.

Protective effect of TGF- β -Smads signal-based oxymatrine on myocardial fibrosis induced by acute myocardial infarction in rats

SHEN Xiangchun^{1*}, YANG Yuping¹, XU Yini¹, XU Li², FANG Taihui²

(1. Research Division of Pharmacology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;
2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of oxymatrine (OMT) on myocardial fibrosis induced by acute myocardial infarction in rats and its effect on TGF- β -Smads signal pathway. **Method:** Arteria coronaria ligation-induced acute myocardial infarction model was established in rats. The survived rats were randomly allotted into the model group, 50, 25, 12.5 mg \cdot kg⁻¹ OMT groups, the 50 mg \cdot kg⁻¹ captopril group, and the Sham-operated group which was treated as the model group without the arteria coronaria ligation. After 8 weeks of ligation, myocardial fibrosis was detected by HE and Masson staining, and the RT-PCR method were used to detect the expression of mRNA of TGF- β -Smads signal system. **Result:** The histopathological examination showed decrease in cardiocytes, deposition of extra-cellular matrix, and increase of collagen contents after 8 weeks of ligation. RT-PCR results showed that mRNA expressions of TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3 and Smad4 significantly increased, but mRNA expression of Smad7 is remarkable lower than the sham-operated group. Treatment with OMT for 8 weeks could remarkably inhibit myocardial fibrosis, decrease mRNA expressions of TGF- β 1, T β R1, Smad2, Smad3, and Smad4, and increase mRNA expressions of Smad7. **Conclusion:** OMT has the inhibitory effect on the experimental myocardial fibrosis induced by AMI in rats. Its mechanism may be closely related to TGF- β -Smads signal system.

[Key words] oxymatrine; myocardial fibrosis; TGF- β -Smads

doi:10.4268/cjmm20120519

[责任编辑 张宁宁]