

结缔组织生长因子与原发性高血压模型大鼠 心肌纤维化的关系及药物干预研究*

许明, 闵新文, 杨汉东, 李莉, 李东峰

(鄖阳医学院附属东风医院心内科, 湖北十堰 442008)

[摘要] 目的 评价结缔组织生长因子(CTGF)与原发性高血压模型大鼠(SHR)心肌纤维化的关系,以及CTGF作为抗心肌纤维化靶点的敏感性。方法 将32只14周龄雄性SHR随机分为SHR对照组、卡托普利组、硝苯地平组和螺内酯组各8只,SHR对照组不给予任何药物,其他3组分别灌胃给予卡托普利 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、硝苯地平 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、螺内酯 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,共12周。同时设8只同龄雄性SD大鼠为正常对照组。免疫组化法和RT-PCR法检测各组大鼠转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)和CTGF表达情况,MASSON染色分析测量胶原容积分数(CVF),碱水解法测定羟脯氨酸(Hypro)含量。结果 SHR对照组左室重量指数(LVI)、CVF、Hypro、CTGF、TGF- β_1 表达均明显高于正常对照组(均 $P<0.01$);与SHR对照组比较,卡托普利组和螺内酯组LVI、CVF、Hypro、CTGF、TGF- β_1 表达显著降低(均 $P<0.05$);CTGF、TGF- β_1 、CVF、Hypro和LVI呈高度正相关($P<0.01$)。结论 CTGF与SHR心肌纤维化关系密切,卡托普利、螺内酯能抑制其表达,CTGF可作为新的抗心肌纤维化靶点。

[关键词] 卡托普利;硝苯地平;螺内酯;结缔组织生长因子;高血压,原发性;心肌纤维化

[中图分类号] R941.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)08-0883-04

Research of the Relationship between CTGF and Myocardial Fibrosis of SHR and the Drug Intervention

XU Ming, MIN Xin-wen, YANG Han-dong, LI Li, LI Dong-feng (Department of Cardiology, Dongfeng Hospital Affiliated with the Yunyang Medical College, Shiyan 442008, China)

ABSTRACT Objective To evaluate the correlation of CTGF and myocardial fibrosis of SHR and the possibility of CTGF as a new antifibrotic target. **Methods** 32 fourteen-week male SHR were randomly assigned to captopril($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), nifedipine($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), antisterone($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and SHR group equivalently, 8 male SD rats with the same age as a control group. Expression of CTGF, TGF- β_1 were evaluated by immunohistochemistry and RT-PCR assay. CVF was measured by MASSON staining, and the concentration of Hypro was detected by alkaline hydrolysis method. **Results** The LVI, CVF, Hypro and the expression of TGF- β_1 , CTGF in SHR group were significantly higher than those in SD control group ($P<0.01$), which were obviously decreased in the captopril and antisterone groups, compared with those in the SHR group ($P<0.05$). **Conclusion** CTGF is closely connected with myocardial fibrosis of SHR and suppressed by captopril and antisterone. It could be regarded as a new antifibrotic target.

KEY WORDS Captopril; Nifedipine; Antisterone; CTGF; SHR; Myocardial fibrosis

结缔组织生长因子(CTGF)是即刻早期反应基因中的CCN(CTGF、CYY、NOV)家族成员之一,可能是 β 转化生长因子(TGF- β)促纤维化活性的下游信号递质,可刺激细胞增殖及细胞外基质的形成,在组织纤维化中有重要作用。本实验的目的在于通过给予原发性

高血压大鼠(SHR)不同降压药物后观察左室CTGF和其他纤维化指标变化情况来评价CTGF与SHR心肌纤维化的关系,以及CTGF作为新抗纤维化靶点的敏感性,为临床选药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 14周龄雄性SHR大鼠32只[北京实验动物研究中心提供,批号:0067099,清洁度:SPF级,实验动物许可证号:SCXK(京)2002-2003],同龄雄性SD大鼠8只[湖北省实验动物研究中心提供,批号:007254,清洁度:CL级,实验动物许可证号:SCXK(鄂)2003-0005];卡托普利片(常州制药厂生产,批号:060307),硝苯地平片(湖北华中制药厂生产,批号:20050613),螺内酯片(杭州民生制药厂生产,批号:T05J525)。山羊抗大鼠CTGF多克隆抗体(Santa Cruz

[收稿日期] 2007-09-24

[基金项目] *湖北省十堰市科技局资助项目(基金编号:No. 2005ZD050)

[作者简介] 许明(1975-),男,河南信阳人,主治医师,硕士,研究方向:高血压病。电话:(0)13636169750, E-mail: xuming-1975@163.com。

[通讯作者] 杨汉东,男,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事心血管疾病介入治疗研究。E-mail: yanghandong@163.com。

公司提供),兔抗大鼠 TGF-β₁ 多克隆抗体(博士德公司提供),SP 免疫组化试剂盒(中山试剂公司提供),TRIZOL(Invitrogen 公司提供),M-MLV 逆转录酶(Promega 公司提供),TaqDNA 聚合酶(Biostar 公司提供),DNA Marker DL-2000(TaKaRa 公司提供)。

1.2 方法 将 32 只 14 周龄雄性 SHR 随机分为 SHR 对照组、卡托普利组、硝苯地平组和螺内酯组各 8 只。SHR 对照组不灌药,其他 3 组分别灌胃给予卡托普利 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹、硝苯地平 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹、螺内酯 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹。8 只同龄雄性 SD 大鼠设为正常对照组。每 2 周用 RBP-1 型大鼠尾动脉血压测定仪(中日友好医院临床医学研究所研制)测量大鼠清醒状态下的尾动脉收缩压,测量 3 次取平均值。12 周后麻醉各组大鼠,开胸取出心脏,电子天平准确测量左室干重,并计算左室重量指数(LVI, LVI = 左室重量/体重)。采用碱水解法羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)按说明测定羟脯氨酸含量。取左室中段横截面心肌组织常规固定、包埋和制片,进行苏木精-伊红(HE)和 MASSON 染色。采用免疫组化 SP 法检测 TGF-β₁、CTGF 蛋白表达,操作步骤按试剂盒说明,TGF-β₁、CTGF 抗体稀释度均为 1 : 100。采用 HPIAS2000 型医学图像分析系统测量 MASSON 染色切片 CVF 和免疫组化切片阳性物质平均灰度值。所测标本均随机取 4 个视野测量,取平均值。采用 RT-PCR 检测 TGF-β₁、CTGF mRNA 表达,操作步骤按试剂盒说明。引物均由上海生工合成,大鼠 CTGF 的引物序列:上游 5' CCTGACCCAACATATGATGC 3',下游 5' CCCTTACTCCCTGGCTTT 3'(499 bp); TGF-β₁ 的引物序列:上游 5' GGACTACTACGCCAAAGAAG 3',下游 5' TCAAAAAGACAGCCACTCAGG 3'(294 bp); GAPDH 的引物序列:上游 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3',下游 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'(452 bp); PCR 反应体系为 50 U,PCR 反应参数:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 45 s,退火 45 s,72 °C 延伸 45 s,40 个循环;72 °C 后延伸 5 min。CTGF、TGF-β₁、GAPDH 的退火温

度分别为 58,55,59 °C。PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶上进行电泳,UVP 凝胶成像系统(Gene 公司)进行半定量分析,目的基因相对表达值 = 目的基因条带灰度值/GAPDH 基因条带灰度值。

1.3 统计学方法 所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析和直线相关分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠 SBP、LVI、CVF、Hypro 值 见表 1。由表 1 可见,SHR 对照组 LVI、CVF、Hypro 显著高于正常对照组(均 $P < 0.01$),而卡托普利组和螺内酯组明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠心肌纤维化情况 正常对照组心肌壁内冠状小动脉外膜有少量胶原沉积,但很少向周围间质延伸,肌间隙中可见少量胶原占据。SHR 对照组血管周围胶原增密,且较长距离的延伸至间质中,肌间隙中的胶原明显增多,呈栅栏状排列紧裹心肌细胞。而卡托普利组和螺内酯组胶原分布明显减少。

2.3 心肌组织中 CTGF、TGF-β₁ 蛋白表达 CTGF 和 TGF-β₁ 主要在心肌细胞的胞质及间质内表达,其半定量分析见表 2。SHR 对照组 CTGF 和 TGF-β₁ 表达显著高于正常对照组(均 $P < 0.01$),而卡托普利组和螺内酯组 CTGF、TGF-β₁ 表达明显低于 SHR 对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相关分析表明,CTGF 与 TGF-β₁ ($r = 0.927, P < 0.01$)、CVF ($r = 0.830, P < 0.01$)、Hypro ($r = 0.844, P < 0.01$) 和 LVI ($r = 0.807, P < 0.01$) 呈高度正相关。

2.4 心肌组织中 CTGF 与 TGF-β₁ mRNA 表达 见图 1。SHR 对照组 CTGF 和 TGF-β₁ mRNA 表达显著高于正常对照组($P < 0.01$),而卡托普利组和螺内酯组明显降低($P < 0.05$)。

3 讨论

CTGF 最初由 BRADHAM 等^[1]于 1991 年用 PDGF 筛选人脐静脉内皮细胞 cDNA 文库时发现。CTGF mRNA 在心脏、脑、胎盘、肺、肝、肌肉、肾脏、胰脏中均

表 1 5 组大鼠 SBP、LVI、CVF、Hypro 测定结果

$\bar{x} \pm s$

组别	大鼠数/ 只	SBP/ mmHg	LVI/ (mg · g ⁻¹)	CVF/ %	Hypro/ (μg · g ⁻¹)
卡托普利组	8	120 ± 5.3 ^{*1}	2.29 ± 0.20 ^{*1}	5.58 ± 0.23 ^{*1}	387 ± 27.8 ^{*1}
硝苯地平组	8	125 ± 4.9 ^{*1}	2.53 ± 0.13	6.55 ± 0.35	469 ± 47.2
螺内酯组	8	178 ± 11.6 ^{*1}	2.46 ± 0.18 ^{*2}	6.17 ± 0.26 ^{*1}	461 ± 40.4 ^{*2}
SHR 对照组	8	193 ± 9.9	2.67 ± 0.17	6.98 ± 0.38	501 ± 10.2
正常对照组	8	117 ± 6.5 ^{*1}	2.11 ± 0.15 ^{*1}	4.94 ± 0.22 ^{*1}	340 ± 43.2 ^{*1}

与 SHR 对照组比较, ^{*1} $P < 0.01$, ^{*2} $P < 0.05$; 1 mmHg = 0.133 kPa

有表达,其生物效应包括促纤维化、肥大、黏附、增生、分化、迁移、血管形成和凋亡。研究发现,在培养的人心脏成纤维细胞中 AngII 通过激活 AT1 诱导 CTGFmRNA 迅速表达^[2]。CTGF 反义寡核苷酸能减少 Ang II 诱导的 CTGF 和纤连蛋白的上调^[3]。AngII 在心肌细胞通过 PKC 激活介导途径上调 CTGF 的表达并引起心肌纤维化^[4]。上述结果都提示 AngII 确能引起 CTGF 表达增高,CTGF 在高血压引起的心肌纤维化中起重要作用。TGF-β₁ 是 ECM 最重要的调节因子,在心脏的生长和修复中起重要作用,它也是 CTGF 的强诱导药,在成纤维细胞和心肌细胞中诱导 CTGF 的表达^[5]。应用抗 CTGF 抗体或 CTGF 寡核苷酸探针可以显著抑制 TGF-β₁ 诱导的胶原合成,证实了 CTGF 作为 TGF-β₁ 的下游因子起作用^[6]。而 TGF-β₁ 在心肌细胞和成纤维细胞主要由 Ang II 刺激表达^[7],Ang II 在心肌成纤维细胞诱导胶原合成的能力是通过增加 TGF-β₁ 的合成而介导^[8]。故 AngII、TGF-β₁ 是 CTGF 强烈的刺激因子,可能心脏中这 3 种因子通过 AngII→TGF-β₁→CTGF 途径使心肌纤维化。

本实验用 SHR 模拟原发性高血压导致的左室重构和心肌纤维化。实验发现 CTGF 在 SHR 心室肌中表达明显增加,并与纤维化指标(CVF、Hypro、LVI)及 TGF-β₁ 的表达密切相关。给药 12 周后卡托普利组和螺内酯组心肌 TGF-β₁、CTGF 表达明显减少,LVI 和纤维化的程度明显减轻。卡托普利可能通过减少 Ang II 依赖性 CTGF 形成,从而延缓心肌纤维化的发生发展,而螺内酯可能是通过阻断盐皮质激素受体抑制 CTGF 表达。有研究表明,高血压大鼠心脏能产生内源性醛甾酮并诱导 CTGF 表达和心肌纤维化^[9],故螺内酯能明显减轻 SHR 心肌间质的纤维化^[10]。本实验硝苯地平对心肌纤维化和 CTGF、TGF-β₁ 的表达都没有显著影响。提示单纯降压虽能部分减轻心肌纤维化,但是达不到预防高血压靶器官损害的效果。TOMASSONI 等^[11]发现不同二氢吡啶类钙拮抗药显示不同抗纤维化效果:马尼地平、氨氯地平和乐卡地平逆转 SHR 左室纤维化有明显效果,而硝苯地平和依拉地平效果不显著。这与本实验结果相符。

表 2 5 组大鼠心肌 CTGF 与 TGF-β₁ 相对含量 $\bar{x} \pm s$

组别	CTGF	TGF-β ₁
卡托普利组	134 ± 3.12 ^{*1}	158 ± 2.96 ^{*1}
硝苯地平组	149 ± 4.07	177 ± 9.07
螺内酯组	142 ± 7.04 ^{*2}	169 ± 11.4 ^{*1}
SHR 对照组	153 ± 4.11	187 ± 6.52
正常对照组	123 ± 8.11 ^{*1}	143 ± 5.59 ^{*1}

与 SHR 对照组比较, ^{*1}P < 0.01, ^{*2}P < 0.05

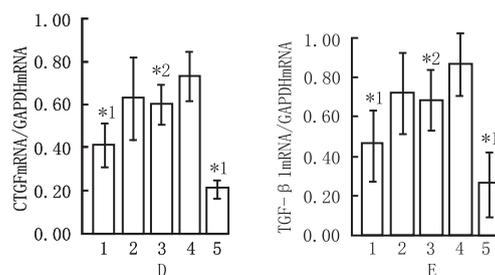


图 1 5 组大鼠心肌组织 CTGF (A)、TGF-β₁ (B)、GAPDH mRNA (C) 表达结果及 CTGF (D)、TGF-β₁ (E) 基因相对表达值

1~5 分别为卡托普利组、硝苯地平组、螺内酯组、SHR 对照组和正常对照组;与 SHR 对照组比较, ^{*1}P < 0.01, ^{*2}P < 0.05

心肌纤维化是一个复杂的过程,目前认为 TGF-β 是最重要的促纤维性细胞因子之一。但因 TGF-β 除了促纤维化效应,还有抗增生和抗炎症的效应,长期完全阻断 TGF-β 系统势必产生严重后果,而 CTGF 似乎是 Ang II 和 TGF-β 致纤维化共同的、最后的中介物之一。故对于高血压心肌纤维化,CTGF 可能是更好的药理学靶目标,可以研究用中和抗体、反义寡核苷酸或 siRNA 技术来预防和治疗心脏及其他纤维化疾病。

[参考文献]

[1] BRADHAM D M, IGARASHI A, POTTER R L, et al. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10 [J]. *J Cell Biol*, 1991, 114(6): 1285 - 1294.

[2] IWANCIW D, REHM M, PORST M, *et al.* Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003,23(10):1782-1787.

[3] RUPEREZ M, LORENZO O, BLANCO-COLIO L M, *et al.* Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis [J]. *Circulation*, 2003, 108(12):1499-1505.

[4] HE Z, WAY K J, ARIKAWA E, *et al.* Differential regulation of angiotensin II-induced expression of connective tissue growth factor by protein kinase C isoforms in the myocardium [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(16):15719-15726.

[5] DEAN R G, BALDING L C, CANDIDO R, *et al.* Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction [J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, 53(10):1245-1256.

[6] DUNCAN M R, FRAZIER K S, JUHANI A, *et al.* Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: Down-regulation by CAMP [J]. *FASEB J*, 1999, 13:1774.

[7] CAMPBELL S E, KATWA L C. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997,29(7):1947-1958.

[8] LIJNEN P J, PETROV V, FAGARD R H, *et al.* Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2000,22(10):709-723.

[9] LEE Y S, KIM J A, KIM K L, *et al.* Aldosterone up-regulates connective tissue growth factor gene expression via p38 MAPK pathway and mineralocorticoid receptor in ventricular myocytes [J]. *J Korean Med Sci*, 2004,19(6):805-811.

[10] NEVES M F, AMIRI F, VIRDIS A, *et al.* Role of aldosterone in angiotensinII-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005,83(11):999-1006.

[11] TOMASSONI D, SABBATINI M, AMENTA F. Effect of different dihydropyridine-type Ca²⁺ antagonists on left ventricle hypertrophy and coronary changes in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003,41(4):544-552.

壳聚糖对甲硝唑凝胶体外促透作用研究

刘新云¹, 余红梅², 何秀丽¹, 叶立红¹, 肖森生¹

(鄖阳医学院附属太和医院 1. 药学部; 2. 内分泌科, 湖北十堰 442000)

[摘要] 目的 考察壳聚糖(CS)对甲硝唑凝胶体外透皮速率的影响。方法 将1.0% CS作为吸收促进剂用于甲硝唑凝胶中,以泊洛沙姆p407为凝胶基质,以含2%氮酮的甲硝唑凝胶作为阳性对照,不含任何促渗剂的甲硝唑凝胶作为阴性对照,采用改良Franz扩散池进行大鼠体外皮肤渗透实验,反相高效液相色谱法(RP-HPLC)法测定接受液中甲硝唑含量,计算累积透过量 Q ,得出 $Q-t$ 回归方程及稳态渗透速率 J 。结果 1.0% CS组和氮酮组 J 分别为2.841, 2.874 $\mu\text{g} \cdot (\text{cm}^2)^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,两者差异无显著性($P > 0.05$),而与阴性组相比均差异有显著性(均 $P < 0.05$),其透皮吸收行为符合一级方程。结论 CS对甲硝唑凝胶的体外透皮吸收有较好的促进作用,值得进一步研究。

[关键词] 壳聚糖;甲硝唑;透皮吸收促进剂;凝胶;体外

[中图分类号] R944;R978 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)08-0886-03

Study of Chitosan on the Transdermal Permeation Enhancing Effect by Metronidazole Gels *in vitro*

LIU Xin-yun¹, YU Hong-mei², HE Xiu-li¹, YE Li-hong¹, XIAO Miao-sheng¹ (1. Department of Pharmacy; 2. Department of Endocrine, Taihe Hospital Affiliated with the Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China)

ABSTRACT Objective To study the effect of chitosan (CS) on cutaneous absorption of metronidazole gel *in vitro*.

Methods 1.0% CS was used as penetration enhancer in metronidazole gels, which contained 2% of azone as positive control, and that with no penetration enhancer as the negative control. The rats skin was treated as cutaneous barrier, the cumulative penetration amount (Q) of Azone group and CS groups, respectively was determined by RP-HPLC assay to calculate the stable penetration rate J . **Results** J of metronidazole gels including 2% Azone and 1.0% CS was 2.841 and 2.874 $\mu\text{g} \cdot (\text{cm}^2)^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively, which showed no significant difference ($P > 0.05$) between each other. However, both displayed significant difference with that in metronidazole gels without any enhancer ($P < 0.05$). **Conclusion** 1.0% CS could enhance cutaneous absorption of metronidazole, which deserves further research.