

• 基础研究 •

黄芪皂甙Ⅳ对大鼠心肌胶原的影响及其机制

宁险峰, 林毅, 陈羽, 吕宏宇, 李自普

【摘要】 目的 研究黄芪皂甙Ⅳ(XGA)对大鼠心肌胶原代谢的影响及机制。方法 采用胶原酶-胰蛋白酶消化法分离大鼠心肌成纤维细胞(FBC),建立FBC培养系统,加入不同浓度和不同作用时间的XGA后,检测Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原,基质金属蛋白酶(MMP-1、MMP-2、MMP-9)及其组织抑制物(TIMP-1、TIMP-2)mRNA的表达水平。结扎左冠状动脉前降支制备大鼠心肌梗死模型,存活者随机分为缺血组和XGA组,另设正常组和假手术组;给予XGA组不同剂量(0.5~10.0 mg/kg)和不同作用时间(7~28 d)的XGA,观察血清Ⅲ型胶原氨基端肽(P-Ⅲ-NP)、Ⅰ型前胶原羧基端肽(I-CTP)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)和内皮素(ET)的变化,Masson染色观察心肌组织胶原情况,免疫组化法观察心肌组织MMP-2、MMP-9及TIMP-1的表达。结果 给予不同浓度和不同时间的XGA后,心肌成纤维细胞Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原,TIMP-1、TIMP-2 mRNA的表达水平有所下降,而MMP-1、MMP-2、MMP-9 mRNA的表达水平有所上升,且随XGA剂量的增加或作用时间的延长而逐渐下降或上升。给予缺血大鼠不同剂量XGA后,血清P-Ⅲ-NP、I-CTP、AngⅡ、ET含量均较缺血组明显下降(0.5 mg/kg剂量组除外);同时5、10 mg/kg剂量组心肌MMPs/TIMP比值较缺血组明显增加;且随XGA剂量的增加,上述变化逐渐增加。给予缺血大鼠XGA 10 mg/kg,除血清ET水平和心肌MMPs/TIMP比值在治疗7 d后与缺血组变化不大外,余各组血清指标较缺血组明显下降,心肌MMPs/TIMP比值较缺血组明显增加,且随用药时间的延长,上述变化逐渐增大。结论 XGA可减少心肌胶原的形成,其机制可能为抑制胶原的合成、增加胶原的降解。

【关键词】 胶原;成纤维细胞;心肌梗死;大鼠;黄芪皂甙Ⅳ

【中图分类号】 R962

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)02-08

Effects of astragaloside Ⅳ on metabolism of cardiac collagen in rats and its mechanisms

NING Xianfeng, LIN Yi, CHEN Yu, et al

Department of Cardiology, Affiliated Hospital, Medical College of Qingdao University,
Qingdao 266003, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of astragaloside Ⅳ (XGA) on metabolism of cardiac collagen in rats and its possible mechanisms. Methods The myocardial fibroblast cells (FBC) were isolated from rats by collagenase and trypsinase digestion method, and cultured stably. After incubation with different concentrations of XGA for various durations, the mRNA expression levels of type I, II, III collagens, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2, MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-2 in the cells were measured. The rat models of acute myocardial infarction were induced by ligation of left anterior descending coronary artery and the survivors were randomly divided into ischemic group and XGA group; meanwhile, normal group and sham-operated group were also established. After administration of different doses of XGA (0.5-10.0 mg/kg) for various durations (7-28 d), the serum concentrations of angiotensin II (Ang II), endothelin (ET), carboxyterminal procollagen type I propeptide (I-CTP) and aminoterminal procollagen type III propeptide (P-III-NP) were measured. The alteration of myocardial collagen was observed with Masson's staining, and the expression levels of MMP-2, MMP-9, and TIMP-1 in myocardial tissue were detected immunohistochemically. Results XGA reduced the mRNA expression levels of type I, III and IV collagens, TIMP-1, and TIMP-2, and elevated the mRNA expression levels of MMP-1, MMP-2, and MMP-9 in FBC in a concentration- and time-dependent manner. After XGA administration, the serum levels of P-III-NP, I-CTP, Ang II, and ET decreased significantly in all dose groups except 0.5mg/kg group, and the ratio of MMPs/TIMP increased markedly in 5 and 10mg/kg groups compared with ischemic group, and the effects were in a dose-dependent manner. Except ET at all predetermined time points and the ratio of MMPs/TIMP on day 7, all the

基金项目:山东省教育厅科技发展基金(J05L02)和青岛市自然科学基金(04-2-JZ-97)

作者单位:266003 青岛市,青岛大学医学院附属医院心内科(宁险峰、林毅、陈羽、李自普),266000 青岛市,青岛市中心医院心内科(吕宏宇)

通讯作者:李自普, Tel:0532-82911869, E-mail:lizp@qdmh. qd. sd. cn

serum indices decreased markedly after XGA administration at a dose of 10 mg/kg, and the ratio of MMPs/TIMP increased significantly; the effects were in a time-dependent manner. Conclusion XGA can markedly reduce the myocardial collagen formation, and the mechanisms are possibly related with its roles in inhibiting collagen synthesis and promoting collagen degradation.

【Key words】 collagen; fibroblasts; myocardial infarction; rats; astragaloside IV

黄芪皂甙Ⅳ(astragaloside Ⅳ, XGA)是中药黄芪的主要活性成分,也是黄芪及其制品的质控标准^[1]。黄芪皂甙对多种器官的纤维化过程都有抑制作用^[2~4],黄芪注射液可降低急性心肌梗死(myocardial infarction, MI)大鼠心肌胶原含量、改善心功能,并可对 MI 大鼠血清及病变部位局部的血管紧张素Ⅱ(angiotensin, AngⅡ)浓度产生影响^[4]。但黄芪单体 XGA 对心肌胶原的作用及机制目前尚无系统研究。本实验应用大鼠成纤维细胞培养系统和 MI 大鼠模型,系统研究 XGA 对心肌胶原的影响并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用清洁级雄性 Wistar 大鼠 195 只,体重 130~250g,由青岛市实验动物和动物实验中心提供,许可证号:SCXK(鲁)20030010,饲养于 SPF 级动物实验中心。饲养温度为 20~25℃,相对湿度 55%~65%,大鼠可自由进食、饮水,昼夜节律 12 h;其中 70 只大鼠(体重 130~150 g)用于心肌成纤维细胞的分离、培养和鉴定;其余 125 只大鼠(体重 200~250 g)随机分为正常组、假手术组和手术组。正常组 8 只。假手术组 9 只,开胸后仅在大鼠心脏左冠状动脉前降支处穿线,不结扎,术后 24 h 内死亡 1 只。手术组 108 只,结扎左冠状动脉前降支,制备 MI 大鼠模型,86 只大鼠手术成功,术后 24 h 内 14 只死亡,存活者被随机分为缺血组(MI 组)和 XGA 组。缺血组 8 只,自术后第 2 天起,每天给予腹腔注射生理盐水 1 ml,连续 28 d;XGA 组 64 只,其中 32 只均分为 4 组,自术后第 2 天起,分别给予 XGA 0.5,2.5,5.0,10.0 mg/(kg·d)腹腔注射 28 d;其余 32 只亦均分为 4 组,自术后第 2 天起,给予 XGA 10.0 mg/(kg·d)腹腔注射,用药时间分别为 7,14,21,28 d。XGA 由中国药品生物制品检定所提供(纯度为 95%,批号 110781-200512)。

1.2 心肌成纤维细胞的分离、培养和鉴定^[5] 麻醉大鼠,无菌条件下开胸取出心脏,立即置入 PBS 液中剪取心室肌,洗净残血,剪成约 1 mm³ 大小的组织块,加入 0.1%胰蛋白酶与 0.05%胶原酶于 37℃ 水浴箱中震荡消化;每 5 min 收集一次消化悬液,直至组织块消失。每次收集的消化悬液加等量含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化,离心(12 000×g)10 min 后所得的全部细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液,分种于

25 ml 培养瓶中,置 37℃,5%CO₂ 培养箱内培养。传代时采用差速贴壁 1h 的方法纯化心肌成纤维细胞,培养的第 4 代心肌成纤维细胞用于实验。倒置显微镜下观察,心肌成纤维细胞生长迅速,2~3 d 即呈融合状态。细胞排列紧密,呈梭形,胞体大,胞浆透明,胞核大,呈椭圆形,无自发性搏动;波形蛋白染色呈强阳性(胞浆内围绕细胞核呈棕褐色颗粒状改变,阳性率在 95%以上),肌动蛋白染色阴性(胞浆内围绕细胞核呈棕褐色颗粒状改变数在 5%以下)。

1.3 细胞分组 培养的第 4 代心肌成纤维细胞 20 瓶,分为 2 组。A 组:10 瓶细胞分别加入 0,0.001,0.002,0.003,0.005,0.01,0.015,0.02,0.025,0.03 ml 的 XGA 羧甲基纤维素钠溶液(1 g/L)。然后加入培养液至 10 ml,使培养瓶内 XGA 浓度分别达到 0,0.1,0.2,0.3,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mg/L,培养 24h 后提取 RNA;B 组:10 瓶细胞均给予 0.03 ml XGA 羧甲基纤维素钠溶液,然后加入 9.97 ml 培养液,使每瓶 XGA 的浓度为 3.0 mg/L,培养 0,0.5,1.0,1.5,2.0,3.0,5.0,10,12,24 h 后分别提取 RNA。

1.4 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及其组织抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)、AngⅡ、内皮素(endothelin, ET)和转化生长因子 β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)mRNA 表达水平的检测 根据细胞 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)的步骤和方法提取 RNA,用核酸蛋白分析仪测光密度值。以 GAPDH 为内参照,用 Primer Express 2.0 设计引物,引物序列如表 1。采用 One Step RT-PCR 试剂盒(QIAGEN 公司)测定 mRNA。取 10 μl 扩增产物在含 0.5 mmol/L 溴化乙锭的 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察并扫描入电脑,以 UVIpro 彩色图像分析系统计算待测样品的 mRNA 与 GAPDH mRNA 的比值,以此代表目的片段的相对表达值,重复上述步骤 5 次,取相对表达值的平均值。

1.5 MI 大鼠模型的制备 参照 Fishbein 等^[6]的方法。麻醉后固定大鼠,消毒皮肤,剪开大鼠左前胸皮肤,分离胸大肌,取第 4~5 肋间为入胸部位,打开胸腔,撕开心包膜,暴露心脏;以 5-0 无损伤手术缝

表 1 设计的引物序列

类别	上游引物	下游引物	扩增片段长度
内参照	5'-ATCTAACATGCCGCCTGAAGAA-3'	5'-AGTGTAGCCCAGGATGCCCT-3'	105bp
MMP-1	5'-TTTGAGGAGGAAGGCGATATTGT-3'	5'-GCTGGAAAGTGTGAGCAAGCTTA-3'	103bp
MMP-2	5'-CCGGAGATCTGCAAACAGGA-3'	5'-GGTGTCAGTGTCCGCCAAATA-3'	192bp
MMP-9	5'-GGCTTCCCTCTGAATAAAGACGA-3'	5'-GGTTCAGTTGTGGTGGTGGC-3'	198b
TIMP-1	5'-ACGAGACCACCTTATACCAGCGT-3'	5'-TGTAGGCGTACCGGATATCTGC-3'	160bp
TIMP-2	5'-GAGCCTGAACCACAGGTACCAG-3'	5'-CAGTCCATCCAGAGGCACTCA-3'	198bp
I 型胶原	5'-CCAACGAGATCGAGCTCAGG-3'	5'-GACTGTCTTGCCCCAAGTTCC-3'	232bp
Ⅲ型胶原	5'-CGTGGCTCTAATGGCATCAAA-3'	5'-TGGACTACCAACTGCACCCTG-3'	265bp
Ⅳ型胶原	5'-ATCAAGTTGGCCAGGAGCT-3'	5'-CTTTGAACCTGTGATCCCTGGA-3'	106bp
Ang Ⅱ	5'-CGGAGGCAAATCTGAACAACAT-3'	5'-TCGGCTGTTCCCTCCTCTCCT-3'	296bp
ET	5'-GAAACTACGAAGGTTGGAGGCC-3'	5'-TTGTGCGTCAACTTCTGGTCTCT-3'	280bp
TGF-β1	5'-TTCAGCGCTCACTGCTCTTGT-3'	5'-TGTCATGGATGGTGCCAG-3'	172bp

注:MMP:基质金属蛋白酶;TIMP:基质金属蛋白酶组织抑制物;Ang Ⅱ:血管紧张素Ⅱ;ET:内皮素;TGF-β1:转化生长因子β1

线于肺动脉圆锥左缘与左心耳根部交界处下方 2 mm处连同一部分肌束缝扎冠状动脉左前降支,缝扎后出现左室苍白、心室搏动减弱;心电图Ⅰ导联及Ⅱ导联出现 J 点明显上移、ST 段弓背向上抬高、与 R 波融合,肢体导联出现 QRS 波群变宽,R 波振幅加大为手术成功标志。快速关闭胸廓,逐层关闭切口后消毒皮肤,术后连续应用青霉素 3d 以防感染(每只 80 000 U/d,腹腔注射)。

1.6 血清 Ang Ⅱ、ET-1、I 型前胶原羧基端肽(carboxy-terminal propeptide of procollagen type I,I-CTP)、Ⅲ型前胶原氨基端肽(amino-terminal propeptide of typeⅢ procollagen,P-Ⅲ-NP)水平的测定 所有大鼠均于实验第 28 天上午采血,离心,血清置于-80℃条件下保存待测。采用 ELISA 方法测定血清 Ang Ⅱ、ET-1、I-CTP、P-Ⅲ-NP 的水平,试剂盒购自美国 BPB Biomedicals 公司。

1.7 MMP 及 TIMP 的测定 处死大鼠后摘取心脏,除去心房及右心室,分离正常和病变心肌组织,固定后制成组织蜡块,切片保存。采用免疫组化法检测心肌组织 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的表达。以棕黄色颗粒特异性分布于细胞浆者为阳性。染色结果采用德国 Opton 图像分析系统进行分析,每张切片随机分析 5 个高倍视野,测定出测试区域的平均光密度和面积,根据公式:平均积分光密度=Σ(平均光密度×面积)/n(n 为图像分析时计算机对一个视野进行分析的区域总数)计算每个高倍视野万方数据

的平均积分光密度值。

1.8 心肌组织 Masson 染色 心肌组织石蜡切片经脱蜡、水洗、丽春红酸性品红液染色后,以 0.2%冰醋酸溶液浸洗片刻,1%磷钼酸水溶液处理 3~5 min,然后不经水洗,直接用亮绿液复染 5 min,再以 0.2%冰醋酸溶液处理 1 min,95%乙醇及无水乙醇脱水,二甲苯透明,最后以中性树胶封片。Masson 三色法染色同时行 HE 染色对照观察。染色结果:胶原纤维呈绿色,红细胞呈橙红色,细胞浆和肌纤维呈红色,细胞核呈黑蓝色。

1.9 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析、*q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 XGA 对心肌成纤维细胞心肌胶原、MMPs 及其 TIMP、Ang Ⅱ、ET 和 TGF-β1 mRNA 表达的影响 结果见表 2、3。给予 XGA 前,心肌成纤维细胞均有 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原,MMP-1,MMP-2,MMP-9,TIMP-1,TIMP-2,Ang Ⅱ,ET 和 TGF-β1 mRNA 的表达;给予不同浓度和作用不同时间的 XGA 后,心肌成纤维细胞 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原,TIMP-1,TIMP-2,Ang Ⅱ,ET 和 TGF-β1 mRNA 的表达水平有所下降,而 MMP-1,MMP-2,MMP-9 mRNA 的表达水平有所上升,且随着 XGA 浓度的增加或时间的延长而逐渐下降或上升;且 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原,TIMP-1,TIMP-2,

表 2 不同浓度 XGA 作用 24h 后心肌成纤维细胞 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原,MMPs 等的 mRNA 相对表达值

XGA(mg/L)	胶原I	胶原Ⅲ	胶原Ⅳ	TIMP-1	TIMP-2	MMP-1	MMP-2	MMP-9	Ang II	ET
0.0	0.828	0.779	0.337	0.949	0.812	0.244	0.423	0.324	0.568	0.887
0.1	0.892	0.776	0.239	0.862	0.859	0.359	0.473	0.431	0.557	0.891
0.2	0.769	0.546	0.226	0.822	0.734	0.319	0.498	0.456	0.683	0.659
0.3	0.753	0.631	0.279	0.798	0.785	0.276	0.521	0.487	0.523	0.727
0.5	0.759	0.538	0.217	0.812	0.725	0.354	0.529	0.429	0.491	0.598
1.0	0.731	0.511	0.209	0.653	0.655	0.386	0.657	0.436	0.482	0.577
1.5	0.739	0.497	0.289	0.629	0.687	0.395	0.689	0.498	0.525	0.529
2.0	0.532	0.682	0.176	0.677	0.531	0.438	0.645	0.467	0.479	0.510
2.5	0.696	0.463	0.198	0.591	0.597	0.519	0.876	0.528	0.446	0.493
3.0	0.495	0.435	0.125	0.583	0.493	0.467	0.956	0.537	0.432	0.489

注:XGA:黄芪皂IV

表 3 3.0mg/L XGA 作用不同时间后心肌成纤维细胞 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原,MMPs mRNA 的相对表达值

作用时间(h)	胶原 I	胶原Ⅲ	胶原Ⅳ	TIMP-1	TIMP-2	MMP-1	MMP-2	MMP-9	Ang II	ET
0.0	0.649	0.832	0.871	0.391	0.773	0.102	0.851	0.435	0.974	0.957
0.5	0.732	0.859	0.803	0.385	0.719	0.104	0.880	0.458	0.835	0.947
1.0	0.732	0.811	0.733	0.349	0.810	0.118	0.903	0.433	0.831	0.935
1.5	0.628	0.805	0.827	0.334	0.705	0.151	0.913	0.461	0.827	0.826
2.0	0.553	0.793	0.769	0.327	0.694	0.138	0.922	0.499	0.736	0.791
3.0	0.480	0.671	0.751	0.328	0.689	0.137	0.947	0.499	0.729	0.788
5.0	0.457	0.637	0.719	0.314	0.712	0.169	0.943	0.531	0.695	0.759
10.0	0.428	0.596	0.683	0.311	0.653	0.199	0.971	0.538	0.722	0.728
12.0	0.395	0.594	0.622	0.297	0.597	0.203	0.954	0.506	0.686	0.694
24.0	0.385	0.552	0.549	0.285	0.616	0.225	0.958	0.557	0.632	0.615

Ang II,ET 和 TGF-β₁ mRNA 的表达水平与 XGA 的浓度和作用时间呈负相关($r=-0.637 \sim -0.973$ 和 $-0.736 \sim -0.917$; $P=0 \sim 0.048$ 和 $0 \sim 0.015$),而 MMP-1,MMP-2,MMP-9 mRNA 的表达水平与 XGA 的浓度和作用时间呈正相关($r=0.746 \sim 0.899$ 和 $0.672 \sim 0.962$, $P=0 \sim 0.013$ 和 $0 \sim 0.034$)。

2.2 XGA 对大鼠血清 Ang II、ET、I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 水平的影响 结果见表 4。给予不同剂量的 XGA 后,血清 ET、I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 除 0.5mg/kg 剂量组较缺血组无明显变化外,其余各剂量组均明显下降;并随 XGA 剂量的增加,血清 AngII、ET、I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 逐渐下降。给予大鼠 XGA

10 mg/kg,用药后 7,14,21,28 d,大鼠血清 Ang II、ET、I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 较缺血组明显下降;并随 XGA 用药时间的延长,大鼠血清 Ang II、ET、I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 水平逐渐下降;但用药后 28 d 与 21 d 时比较,血清 Ang II、ET、I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 水平无明显差别($P>0.05$)。

2.3 XGA 对心肌组织 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 表达水平的影响 见表 5,6。正常组及假手术组心肌 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 呈低水平表达,而缺血组缺血区和非缺血区心肌中均呈高水平表达,且缺血区的表达水平较非缺血区明显高。给予不同剂量和不同作用时间的 XGA 后,除在剂量 0.5 mg/kg 时大鼠缺血和非缺血区心肌 MMP-2、MMP-9 表达

表4 XGA不同剂量和不同作用时间对大鼠急性心肌梗死后血清指标的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	Ang II (nmol/L)	ET (ng/L)	I-CTP (ng/L)	P-III-NP (nmol/L)
正常组	3.5 ± 0.5 ^f	44 ± 7 ^f	38 ± 4 ^f	51 ± 7 ^f
假手术组	3.6 ± 0.6 ^f	44 ± 4 ^f	40 ± 4 ^f	54 ± 8 ^f
MI组	6.7 ± 0.9 ^{bd}	80 ± 5 ^{bd}	96 ± 7 ^{bd}	96 ± 8 ^{bd}
XGA组				
剂量(mg/kg;第28天)				
0.5	6.2 ± 0.5 ^{bdf}	82 ± 7 ^{bd}	98 ± 9 ^{bd}	96 ± 6 ^{bd}
2.5	5.7 ± 0.4 ^{bdfg}	74 ± 6 ^{bdeg}	87 ± 5 ^{bdeg}	89 ± 6 ^{bdeg}
5.0	5.1 ± 0.5 ^{bdfh}	65 ± 3 ^{bdfh}	73 ± 6 ^{bdfh}	78 ± 4 ^{bdfh}
10.0	4.3 ± 0.4 ^{acfh}	56 ± 6 ^{bdfh}	56 ± 6 ^{bdfh}	65 ± 5 ^{bdfh}
时间(d;10mg/kg)				
7	5.6 ± 0.8 ^{bdf}	75 ± 6 ^{bd}	80 ± 9 ^{bdf}	86 ± 7 ^{bdf}
14	5.0 ± 0.5 ^{bdf}	66 ± 5 ^{bdfi}	66 ± 5 ^{bdfj}	78 ± 6 ^{bdfi}
21	4.5 ± 0.6 ^{acfi}	58 ± 8 ^{bdfj}	59 ± 8 ^{bdfj}	66 ± 6 ^{bdfj}
28	4.3 ± 0.4 ^{acfi}	56 ± 6 ^{bdfj}	56 ± 6 ^{bdfj}	65 ± 5 ^{bdfj}

注:MI:心肌梗死;I-CTP:I型前胶原羧基端肽,P-III-NP:III型前胶原氨基端肽。与正常组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ (Ang II:q=0.52~15.10,ET:q=0.43~17.68,I-CTP:q=0.66~25.64,P-III-NP:q=1.24~20.04);与假手术组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ (Ang II:q=0.52~12.56,ET:q=5.75~18.10,I-CTP:q=6.88~24.98,P-III-NP:q=1.24~18.80);与缺血组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$ (Ang II:q=2.02~14.58,ET:q=0.73~17.38,I-CTP:q=0.90~24.74,P-III-NP:q=0.23~19.80);与0.5mg/kg剂量组比较,^g $P<0.05$,^h $P<0.01$ (Ang II:q=2.51~9.50,ET:q=3.84~12.36,I-CTP:q=4.42~18.10,P-III-NP:q=3.37~14.11);与用药7d组比较,ⁱ $P<0.05$,^j $P<0.01$ (Ang II:q=2.98~6.46,ET:q=3.75~8.99,I-CTP:q=5.96~10.44,P-III-NP:q=3.29~9.25)

表5 各组大鼠心脏非缺血区TIMP-1、MMP-2、MMP-9表达的平均积分光密度值($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	TIMP-1	MMP-2	MMP-9	MMPs/TIMP 比值
正常组	7.7 ± 1.2 ^f	12.1 ± 2.9 ^f	12.0 ± 2.4 ^f	3.21 ± 0.91 ^f
假手术组	7.9 ± 1.3 ^f	11.9 ± 2.4 ^f	11.7 ± 2.4 ^f	3.08 ± 0.81 ^f
MI组	46.9 ± 3.0 ^{bd}	18.7 ± 2.9 ^{bd}	16.6 ± 2.6 ^{bd}	0.75 ± 0.11 ^{bd}
XGA组				
剂量(mg/kg;第28天)				
0.5	44.8 ± 2.4 ^{bdf}	19.1 ± 3.0 ^{bd}	17.1 ± 2.5 ^{bd}	0.81 ± 0.09 ^{bd}
2.5	36.5 ± 3.1 ^{bdfh}	27.3 ± 2.8 ^{bdfh}	25.5 ± 3.0 ^{bdfh}	1.46 ± 0.18 ^{bd}
5.0	27.6 ± 3.2 ^{bdfh}	36.1 ± 3.5 ^{bdfh}	33.3 ± 4.5 ^{bdfh}	2.55 ± 0.39 ^{fh}
0.01	1.1 ± 2.6 ^{bdfh}	48.2 ± 3.2 ^{bdfh}	45.9 ± 3.9 ^{bdfh}	8.90 ± 2.08 ^{bdfh}
时间(d;10mg/kg)				
7	37.4 ± 2.0 ^{bdf}	28.4 ± 3.1 ^{bdf}	27.4 ± 3.4 ^{bdf}	1.50 ± 0.19 ^{bd}
14	23.7 ± 2.4 ^{bdfj}	37.1 ± 3.7 ^{bdfj}	35.2 ± 3.9 ^{bdfj}	3.07 ± 0.37 ^{fi}
21	12.4 ± 2.6 ^{bdfj}	45.3 ± 3.6 ^{bdfj}	44.8 ± 4.2 ^{bdfj}	7.58 ± 1.89 ^{bdfj}
28	11.1 ± 2.6 ^{bdfj}	48.2 ± 3.2 ^{bdfj}	45.9 ± 3.9 ^{bdfj}	8.90 ± 2.08 ^{bdfj}

注:与正常组比较,^b $P<0.01$ (TIMP-1:q=6.07~70.44,MMP-2:q=0.30~51.65,MMP-9:q=0.38~44.90);与假手术组比较,^d $P<0.01$ (TIMP-1:q=0.28~70.17,MMP-2:q=0.30~51.95,MMP-9:q=0.38~43.84);与缺血组比较,^f $P<0.01$ (TIMP-1:q=3.76~70.44,MMP-2:q=0.58~42.25,MMP-9:q=6.47~38.81);与0.5mg/kg组比较,^h $P<0.01$ (TIMP-1:q=14.95~60.62,MMP-2:q=11.79~41.67,MMP-9:q=11.13~38.11);与用药7d组比较,^j $P<0.01$ (TIMP-1:q=24.51~74.21,MMP-2:q=12.53~28.40,MMP-9:q=10.34~24.44)

表 6 各组大鼠心脏缺血区 TIMP-1、MMP-2、MMP-9 表达的平均积分光密度值($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	TIMP-1	MMP-2	MMP-9	MMPs/TIMP 比值
MI 组	65.3 $\pm$ 2.2	34.3 $\pm$ 2.7	32.5 $\pm$ 3.6	0.97 $\pm$ 0.08
XGA 组				
剂量(mg/kg;第 28 天)				
0.5	64.2 $\pm$ 2.3	35.7 $\pm$ 3.1	34.1 $\pm$ 3.0	1.09 $\pm$ 0.08
2.5	57.4 $\pm$ 2.0 ^{bd}	43.7 $\pm$ 2.6 ^{bd}	41.9 $\pm$ 3.0 ^{bd}	1.49 $\pm$ 0.10 ^{bd}
5.0	46.8 $\pm$ 2.0 ^{bd}	54.8 $\pm$ 3.3 ^{bd}	53.8 $\pm$ 3.9 ^{bd}	2.32 $\pm$ 0.19 ^{bd}
10.0	30.9 $\pm$ 2.5 ^{bd}	68.0 $\pm$ 3.2 ^{bd}	66.6 $\pm$ 4.4 ^{bd}	4.39 $\pm$ 0.42 ^{bd}
时间(d;10mg/kg)				
7	51.4 $\pm$ 3.3 ^b	47.7 $\pm$ 2.7 ^b	45.6 $\pm$ 3.1 ^b	1.82 $\pm$ 0.12 ^b
14	42.6 $\pm$ 2.3 ^{bf}	56.9 $\pm$ 2.5 ^{bf}	53.9 $\pm$ 2.7 ^{bf}	2.61 $\pm$ 0.18 ^{bf}
21	35.7 $\pm$ 2.8 ^{bf}	64.8 $\pm$ 3.4 ^{bf}	63.5 $\pm$ 3.8 ^{bf}	3.61 $\pm$ 0.35 ^{bf}
28	30.9 $\pm$ 2.5 ^{bf}	68.0 $\pm$ 3.2 ^{bf}	66.6 $\pm$ 4.4 ^{bf}	4.39 $\pm$ 0.42 ^{bf}

注:与缺血组比较,^b $P<0.01$ (TIMP-1: $q=8.81\sim69.00$,MMP-2: $q=2.11\sim51.17$,MMP-9: $q=2.02\sim43.72$);与 0.5 mg/kg 组比较,^d $P<0.01$ (TIMP-1: $q=12.25\sim60.19$,MMP-2: $q=12.13\sim49.06$,MMP-9: $q=9.99\sim41.70$);与用药 7 d 组比较,^f $P<0.01$ (TIMP-1: $q=15.95\sim37.00$,MMP-2: $q=13.95\sim30.79$,MMP-9: $q=10.61\sim26.91$)

水平与缺血组无明显差异外,其余各组缺血区和非缺血区心肌 MMP-2 和 MMP-9 表达水平均明显高于缺血组,且随用药剂量的增加和用药时间的延长其表达水平渐增加;而 TIMP-1 表达水平较缺血大鼠明显降低,且随用药剂量的增加和用药时间的延长其表达水平逐渐减少;且缺血区的表达水平较非缺血区明显高。

2.4 心肌组织染色 见图 1。心肌组织 Masson 染色显示缺血组大鼠缺血区正常心肌组织消失,代之以增生的纤维结缔组织,非缺血区心肌组织胶原及血管周围胶原含量较正常组及假手术组明显增加;给予不同剂量和不同作用时间的 XGA 后,心肌组织胶原含量除在剂量 0.5 mg/kg 时与正常组差异不明显外,其余各组随用药剂量的增加和用药时间的延长,心肌组织胶原含量逐渐减少。

3 讨论

黄芪为常用中药之一,含有皂甙、多糖、黄酮等多种成分,对心血管系统发挥作用的主要是黄芪皂甙,其中 XGA 为其主要成分,其含量为每克生药黄芪中含 0.095~1.40 mg,约占黄芪总皂甙的 2.4%^[7]。研究证实,黄芪单药可抑制心肌胶原合成、纠正心肌 I 型、Ⅲ型胶原比例^[4]。但 XGA 能否影响心肌胶原代谢,目前尚不清楚。本实验发现,给予不同剂量和不同作用时间的 XGA 后,Masson 染色显示心肌梗死

大鼠心肌组织胶原含量随用药剂量的增加和用药时间的延长而逐渐减少,提示 XGA 可减少心肌梗死大鼠心肌组织的胶原含量。

XGA 减少心肌组织胶原含量的机制目前尚不清楚,笔者认为,可能与以下因素有关:(1)抑制心肌组织胶原合成。笔者发现,给予 XGA 后,心肌成纤维细胞表达 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原 mRNA 的水平下降,且随 XGA 剂量的增加和作用时间的延长而下降,提示 XGA 可抑制心肌成纤维细胞胶原的合成。MI 动物模型的结果证实,心肌梗死大鼠血清 I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 明显高于正常组和假手术组大鼠;给予 XGA 后,心肌梗死大鼠血清 I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 随用药剂量的增加和用药时间的延长逐渐减少。由于 I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 是心肌主要胶原成分 I、Ⅲ型胶原合成过程中产生的中间产物,为体内 I、Ⅲ型胶原合成的标志;血清 I-CTP 和 P-Ⅲ-NP 水平的高低可准确反映心肌组织胶原合成的活跃程度^[8]。因此,上述结果提示,XGA 抑制了心肌梗死大鼠心肌组织的胶原合成。(2)促进心肌胶原降解。MMPs 及 TIMPs 家族在心肌胶原降解中起着非常重要的作用,MMPs/TIMPs 比例失调是导致心室重构、心肌纤维化的直接原因。MMPs/TIMPs 比值的增高有利于胶原降解,防止心肌胶原的堆积^[4]。贺学林等^[2]发现黄芪有效成分可增加糖尿病大鼠模型肾组织中 MMP-2 的含量、减少 TIMP-1 的含量,从而减少肾脏Ⅳ型胶原

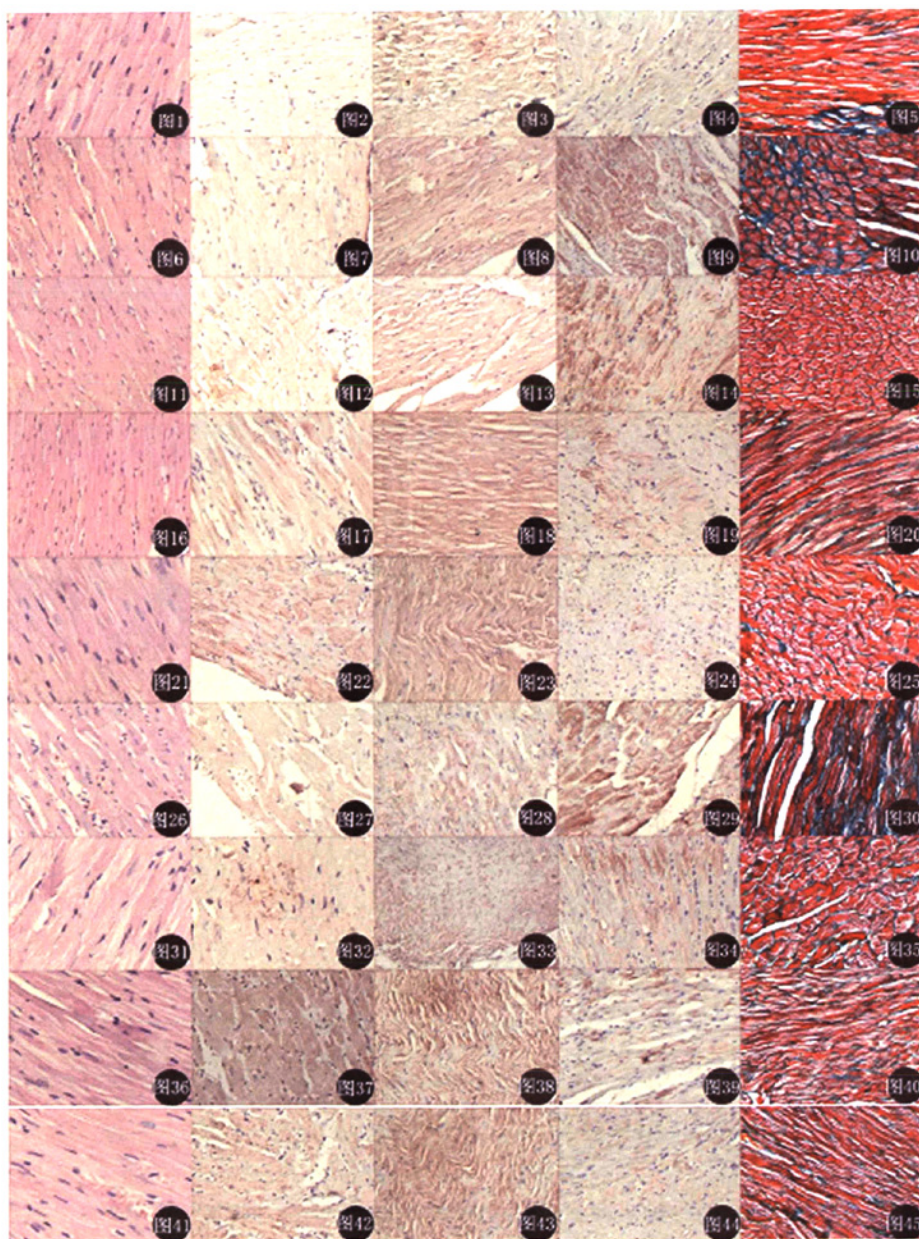


图1 心肌组织染色和 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 的表达

1~5:正常组大鼠心肌组织;6~10:缺血组大鼠心肌组织;11~15:XGA 2.5 mg/(kg·d)×28 d;16~20:XGA 5.0 mg/(kg·d)×28 d;21~25:XGA 10.0 mg/(kg·d)×28 d;26~30:XGA 10.0 mg/(kg·d)×7 d;31~35:XGA 10.0 mg/(kg·d)×14 d;36~40:XGA 10.0 mg/(kg·d)×21 d;41~45:XGA 10.0 mg/(kg·d)×28 d;每行自左至右:HE 染色;MMP-2 表达(IHC 染色);MMP-9 表达(IHC 染色);TIMP-1 表达(IHC 染色);Masson 染色

原的合成。笔者发现,给予 XGA 后,心肌成纤维细胞 TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 的表达水平有所下降,而 MMP-1, MMP-2, MMP-9 mRNA 的表达水平有所上升,且随着 XGA 浓度的增加和时间的延长而变化。提示,XGA 可使 MMPs/TIMPs 比例升高。MI 动物模型的结果证实,给予 XGA 后,心肌万方数据

梗死大鼠心脏各区域的 TIMP-1 水平随用药剂量的增加和用药时间的延长逐渐下降,而 MMP-2 及 MMP-9 水平则随用药剂量的增加和用药时间的延长逐渐升高,因此 MMPs/TIMP 比值亦渐增加。上述结果进一步提示,XGA 可促进心肌胶原的降解。

(下转第 174 页)

本研究结果可能存在一定局限性,还需今后更多临床工作进行验证。

【参考文献】

- [1] Potts SG, Bass CM. Psychological morbidity in patients with chest pain and normal or near-normal coronary arteries: a long-term follow-up study[J]. Psychol Med, 1995, 25(2): 339-347.

- [2] Birket-Smith M, Rasmussen A. Screening for mental disorders in cardiology outpatients[J]. Nord J Psychiatry, 2008, 62(2): 147-150.
- [3] 刘梅颜,胡大一,姜荣环,等.心血管内科患者合并心理问题的现状分析[J].中华内科杂志,2008,47(4):277-279.

(收稿日期:2009-01-14;修回日期:2009-04-27)

(上接第172页)

(3)抑制 Ang II 和 ET 的分泌。心脏胶原代谢受体液及心肌局部多种因素的调控,其中 Ang II 和 ET 被认为是最重要的两种因子^[9,10]。研究证实,Ang II 与 ET 可相互促进而引起心肌纤维化的发生。本组结果发现,给予不同浓度和不同时间的 XGA 后,心肌成纤维细胞 Ang II 和 ET mRNA 的表达水平有所下降,且随 XGA 浓度的增加或时间的延长而逐渐下降;同时发现,给予不同剂量和不同作用时间的 XGA 后,MI 大鼠血清 Ang II 与 ET 明显下降,且随 XGA 剂量的增加和用药时间的延长而下降更为显著;上述结果提示,XGA 可能通过抑制 Ang II 与 ET 的分泌来减轻心肌胶原的形成。

(4)抑制 TGF- β 1 mRNA 的分泌。研究证实,XGA 可减少慢性肝炎患者血清 TGF- β 1 的水平^[3]从而改善纤维化;对肾纤维化大鼠的研究发现,对照组大鼠病变组织中 TGF- β 1 水平明显升高,但 XGA 治疗组的 TGF- β 1 表达水平则接近于正常。另外,还发现黄芪皂甙还可促进肝细胞生长因子 mRNA 的表达,进而抑制 TGF- β 1 mRNA 的表达。本组结果发现,给予不同浓度和不同时间的 XGA 后,心肌成纤维细胞 TGF- β 1 mRNA 的表达水平下降,且随 XGA 浓度的增加或时间的延长而渐下降。提示,XGA 可能通过抑制 TGF- β 1 的分泌来减轻心肌胶原的形成。

(5)抑制羟脯氨酸和缓激肽的代谢。羟脯氨酸是心肌胶原增生所必需的氨基酸,缓激肽可刺激心肌胶原的增生。有研究显示黄芪皂甙可抑制心肌组织羟脯氨酸和缓激肽的代谢;笔者既往的研究显示,XGA 可减少心肌梗死大鼠心肌组织羟脯氨酸的含量^[11],提示,XGA 可抑制心肌组织内羟脯氨酸和缓激肽的代谢,从而减少心肌胶原的增生。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社, 2005. 212-213.

- [2] 贺学林,陈以平,邓跃毅,等.复方黄芪合剂对早期 DN 模型鼠 Col-IV 及 MMP-2/TIMP-2 的影响[J].上海中医药杂志, 2003, 37(6): 51-54.
- [3] 程鹏,刘素侠,孙晋浩,等.黄芪抗肝纤维化的作用与转化生长因子 β 1 及干扰素 γ 的关系[J].临床军医杂志, 2000, 10(3): 22-23.
- [4] 罗心平,施海明,曾治宇,等.黄芪对大鼠心肌梗塞后左室功能及胶原改建的影响[J].中国病理生理杂志, 1999, 15(7): 64-68.
- [5] 陈勇兵,陈如坤,陈力,等.乳鼠心肌成纤维细胞培养方法的改进[J].江苏医药, 2005, 31(3): 189-190.
- [6] Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution[J]. Am J Pathol, 1978, 90(1): 57-70.
- [7] Li ZP, Cao Q. Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(10): 898-904.
- [8] Lopes JD, Gomes RA, Hial V, et al. Correlations between the collagen content of the human left ventricular myocardium, measured by biochemical and morphometric methods[J]. Arq Bras Cardiol, 2002, 79(1): 10-19.
- [9] Kawano H, Do YS, Kawano Y, et al. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts[J]. Circulation, 2000, 101(10): 1130-1137.
- [10] Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 1993, 92(1): 398-403.
- [11] 李自普,曹倩,庞秀英.缺血大鼠心肌胶原和心功能改变与黄芪皂甙 IV 的量效和时效关系[J].中国组织工程研究与临床康复, 2005, 9(23): 207-209.

(收稿日期:2008-09-24;修回日期:2009-05-04)