

苦参碱对房颤犬心房肌胶原合成及 TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF 的影响

戴友平 李七一 张曙光 吴佳佳 王惠敏 朱萱萱

【摘要】 目的 探讨苦参碱对犬心房颤动(房颤)心房肌组织中胶原合成以及肿瘤坏死因子(TNF- α)、转化生长因子(TGF- β 1)和结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。方法 健康比格犬10只采用快速右心室起搏造房颤模型,随机分成房颤组和房颤+苦参碱组各5只。采用天狼星红染色,计算胶原容积分数(CVF)以测定纤维化程度;采用免疫组织化学法检测右心房 TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF 的蛋白表达情况;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF 的 mRNA 水平表达情况。结果 与房颤组相比,房颤+苦参碱组纤维化程度降低,CVF 明显下降($P<0.05$),TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF 蛋白表达水平下降,且 TNF- α 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达水平显著下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 苦参碱可能通过抑制 TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF 的表达,抑制房颤心房肌胶原合成,改善心房组织纤维化程度。

【关键词】 心房颤动; 苦参碱; 肿瘤坏死因子 α ; 转化生长因子; 结缔组织生长因子

Effects of matrine on collagen proliferation and TNF- α , TGF- β 1 and CTGF in atrial tissues of dogs with persistent atrial fibrillation DAI You-ping, LI Qi-yi,ZHANG Shu-guang, WU Jia-jia, WANG Hui-min, ZHU Xuan-xuan.Department of Cardiology, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Corresponding author: DAI You-ping, Email: daiyp2001@126.com

【Abstract】 Objective To study the effects of matrine (mat) on collagen synthesis and expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and connective tissue growth factor (CTGF) in atrial tissues of dogs with persistent atrial fibrillation (AF). **Methods** Ten healthy beagle dogs were randomly divided into two groups: AF group ($n=5$) and AF/Mat group ($n=5$), using right ventricular pacing to establish AF model. The collagen volume fraction (CVF) in atrial tissue were detected by sirius red staining to determine the level of fabrication. The level of TNF- α , TGF- β 1 and CTGF were detected by immunohistochemistry. The mRNA expression level of TNF- α , TGF- β 1 and CTGF were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with the AF group, the fibrillation level of AF/Mat was decreased obviously ($P<0.05$), the expression levels of TNF- α , TGF- β 1 and CTGF were decreased, and the mRNA expression level were decreased significantly in atrial tissues ($P<0.05$ and $P<0.01$). **Conclusion** Matrine may inhibit fibrosis in atrial tissues through inhibition collagen proliferation and expression of TNF- α , TGF- β 1 and CTGF.

【Key words】 Atrial fibrillation; MATRINE; Tumor necrosis factor-alpha; Transforming growth factors; Connective tissue growth factor

房颤 (atrial fibrillation, AF) 是最常见的心律失常之一,人群中总发病率达 1%,且随年龄增加而升高,75 岁以上达 10%,此外,器质性心脏病患者的房颤发

生率高达 40%^[1],目前尚无一种较为满意的治疗方法。房颤的危害不仅在于其发作时的临床症状(如心悸、心功能不全等)会严重影响患者的生活质量,还在于其高于正常人 5 倍的血栓栓塞并发症如脑卒中等的发生率,显著增加致残、致死率^[2]。临床和实验研究发现,心房肌细胞在房颤期间发生了结构重构,其中,心房间质纤维化在心房结构重构中可能起到了更为关键的作用。苦参碱 (Matrine, mat) 是苦参中的活性成分,有免疫抑制、抗肝纤维化、抗心律失常的作用,苦参

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.24.086

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2010596)

作者单位:210029 南京,江苏省中医院心内科(戴友平、李七一、朱萱萱、王惠敏);淮安中医院心内科(张曙光);淮安第二人民医院康复科(吴佳佳)

通讯作者:戴友平, Email: daiyp2001@126.com

碱可以抑制血管紧张素 II (Ang II) 诱导的大鼠心成纤维细胞增殖、胶原合成及转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的表达^[3], 通过抑制 TGF- β 1 的产生抑制高血压鼠心室纤维化^[4], 通过抑制基质金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-1)、III型前胶原 (PCIII) 和 IV型胶原 (Col IV) 的合成实现抗心肌纤维化的作用^[5]。本研究考察了 Mat 对于房颤犬心房肌细胞胶原合成的影响以及对肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、TGF- β 1 和结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的影响。

材料和方法

一、材料

10 只成年健康比格犬随机分为 2 组: AF 模型组和 AF/Mat 组, 每组 5 只。起搏器埋植于右侧颈部皮下, 以 S1 400 ms 为基本周长, S2、S3、S4 -10 ms 逐级标准程序刺激和短促刺激诱发房颤, 完毕后电极导管固定并和起搏器一起埋置于右侧颈部皮下以备后用。AF 组和 AF/Mat 组以 230 次/min 频率心室起搏 7 周。从手术第 1 天开始, AF/Mat 组通过慢性测压导管静脉注射苦参碱 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; AF 组灌注等量生理盐水, 时间 7 周。7 周后处死动物前复查心电图、血常规, 超声心动图检查测定上述各项指标。麻醉处死后快速取心脏, 选取心房组织, 常规甲醛固定, 石蜡包埋保存待检。

二、方法

1. 组织学鉴定纤维化程度: 取右心房组织, 切 $4 \mu\text{m}$ 薄片, 放入 37°C 恒温箱中 $12 \sim 24 \text{ h}$, 置于 4°C 冰箱保存。切片经脱蜡、脱苯后, 浸入 0.1% 饱和苦味酸-天狼星红溶液中染色 1 h, 流水冲洗 5 min, 苏木素复染数秒, 流水充分冲洗, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。染色后的心肌切片置于中心校正好的 Olympus BH2 偏光显微镜下进行照相分析。彩色图像分析系统计算出胶原容积分数 $\text{CVF}\% = \text{胶原面积} / \text{全视野面积} \times 100\%$ 。

2. 免疫组织化学检测: 石蜡切片, 常规脱蜡、水化后, 使用枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 进行中微波修复, 正常羊血清工作液封闭, 滴加一抗 (TGF- β 1、CTGF 均来自 Santa Cruz 公司, TNF- α 来自 Abgent 公司) 4°C 冰箱孵育过夜, 转至室温 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min (用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照); 滴加二抗 (SP 羊抗兔及兔抗羊免疫组化染色试剂盒, 来自福州迈新生物技术开发有限公司), 37°C 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; DAB/ H_2O_2 反应染色, 自来水充分冲洗。苏木素复染, 干燥, 封片。

每张切片随机取 5 个高倍镜视野 ($\times 400$), 拍照。

3. mRNA 表达的检测: (1) Trizol-离心柱法提取样本总 RNA, 取 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 参照逆转录试剂盒 (Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit, 购自 Fermentas 公司) 进行操作逆转录成 cDNA; (2) 引物序列: TNF- α F: 5'-TTCTCCTTCCTCCTCGTCG-3', TNF- α R: 5'-GGC TTGTCACCTGGGGTTC-3'; TGF- β 1 F: 5'-CCAGCGA CACGCCAGAAT-3', TGF- β 1 R: 5'-TGGGCACTGAG GCGAAAG-3'; CTGF F: 5'-GCGGCGGTCTTGGACTG AT-3', CTGF R: 5'-ATGCTGCCTGGCTCCTGTG-3'; GAPDH F: 5'-AAGGCTGTGGCAAGGTC-3', GAPDH R: 5'-GAAGGTGGAAGAGTGGGTGTC-3'; (3) Real-time PCR 体系 ($25 \mu\text{l}$): 待测样品 cDNA 加水稀释至 $10.5 \mu\text{l}$, iQ SYBR GREEN SUPERMIX $12.5 \mu\text{l}$ (Bio-Rad 公司), 上游引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{l}$, 下游引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) $1 \mu\text{l}$; (4) PCR 反应条件: 95°C 预变性 3 min, 然后进入 PCR 循环, 95°C 变性 10 s, 59°C 退火 20 s, 70°C 延伸 20 s 读数, $30 \sim 40$ 个循环, 熔点曲线从 $70 \sim 95^\circ\text{C}$, 每 10 s 上升 0.5°C 并读数。实验结果由荧光定量 PCR 分析软件 BIO-RAD CFX Manager 进行统计和计算得出目的基因的 mRNA 相对表达量。

三、统计学分析

实验数据应用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计分析, 所有指标均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 心房肌纤维化改变: 对犬心房纤颤组织进行天狼星染色, 可观察到: I 型胶原纤维: 紧密排列, 显示很强的双折光性, 呈黄色红色的纤维; II 型胶原纤维: 显示弱的双折光, 呈多种色彩的疏松网状分布; III 型胶原纤维: 显示弱的双折光, 呈绿色的细纤维; IV 型胶原纤维: 显示弱的双折光的基膜, 呈淡黄色 (图 1)。AF 组主要以 I 型胶原纤维为主, 有少量 III 型胶原。而 AF/Mat 组 I 型胶原含量明显下降, III 型胶原纤维含量有所增加, 但 CVF 值 (2.7 ± 0.8) 较 AF 组 (22.5 ± 13.8) 显著降低 ($P = 0.012$)。

2. 免疫组织化学: 实验结果显示, TNF- α 主要表达在细胞质, TGF- β 1 主要表达在细胞质和细胞核表达, 间质表达不明显, CTGF 主要表达在细胞质内, 部分细胞核有表达。阳性反应呈深褐色颗粒。相对应 AF 组, AF/Mat 组表达降低 (图 2~4)。

3. TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF mRNA 表达的比较: 与 AF 组相比, AF/Mat 组的 TNF- α mRNA 表达水平下降 ($P = 0.036$), TGF- β 1 的 mRNA 表达水平显著下降

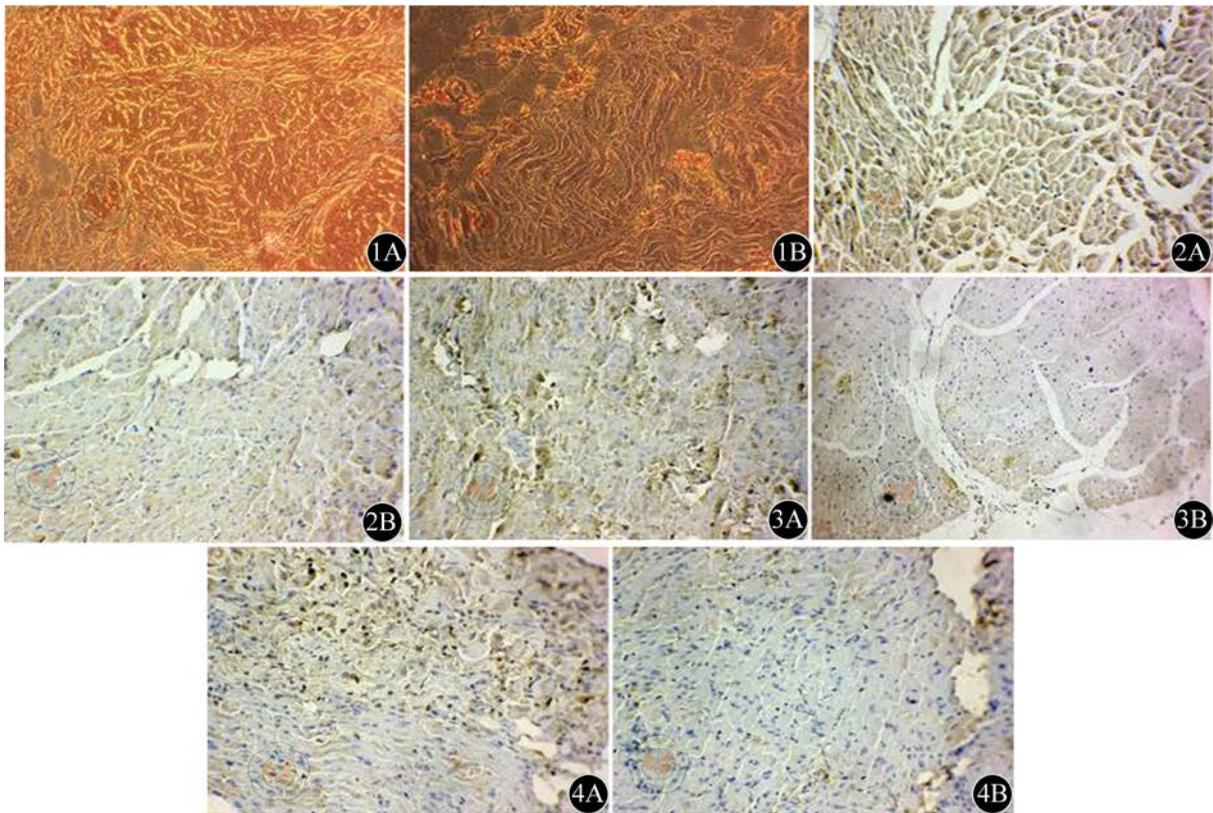


图1 AF组和AF/Mat组心房肌天狼星红染色(×400) 图2 AF组和AF/Mat组心房肌TNF-α免疫组化表达结果(×400) 图3 AF组和AF/Mat组心房肌TGF-β1免疫组化表达结果(×400) 图4 AF组和AF/Mat组心房肌CTGF免疫组化表达结果(×400)

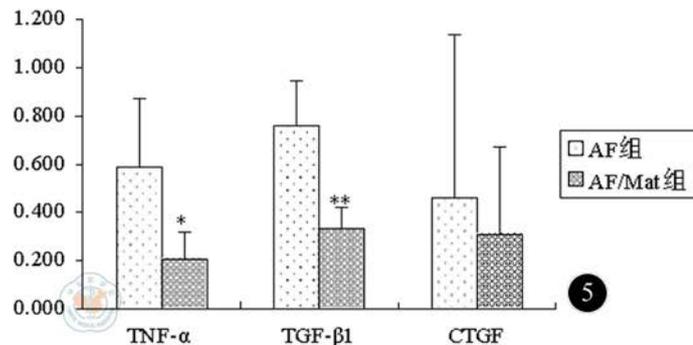


图5 AF组和AF/Mat组心房肌TNF-α、TGF-β1和CTGF mRNA表达结果。*P<0.05, **P<0.01

($P=0.005$), 而 CTGF mRNA 表达水平的降低没有显著性差异 ($P>0.05$) (图 5)。

讨 论

苦参是豆科槐属植物, 主要成分为苦参碱、氧化苦参碱等生物碱类以及苦参醇、苦参丁醇等黄酮类。苦参中的生物碱成分能够抑制和逆转早期肝纤维化病变, 并已取得了一定的临床疗效。苦参碱还可以拮抗血小板衍生生长因子和 Ang II 的作用而抑制心肌成纤维细胞、皮肤成纤维细胞、血管平滑肌增殖^[6-7], 还可以通过调节多种与增殖、细胞周期和凋亡相关基因的表达来抑制肿瘤细胞增殖或诱导分化与凋亡^[8-10]。

TNF-α 表达异常是促使急性冠状动脉综合征发生

的主要机制之一。研究发现, TNF-α 持续灌注大鼠心脏可致大鼠心腔扩大^[11], TNF-α 过度表达的转基因小鼠存在显著的心房纤维化及较高的房性心律失常发生率^[12], 而抗 TNF-α 治疗可阻止心腔扩大, 改善间质胶原重构, 减轻心肌纤维化^[13]。研究显示 TNF-α 与心肌重构密切相关。目前, 对于引起房颤患者心房组织中 TNF-α 表达发生改变详细通路尚不清楚。血管紧张素系统 (RAS) 的激活对心肌 TNF-α 的表达起着促进作用, 有研究发现 Ang II 能通过蛋白激酶 C (PKC) 途径上调哺乳动物心肌中 TNF-α 的 mRNA 转录和蛋白表达水平^[14]。

研究发现, TGF-β1 是胶原纤维和其他细胞外基质成分合成和沉积的强有力的始动因子。在病理条件下,

过量的 TGF- β 1 将导致细胞外基质的过度产生而发生纤维化。血清内过量表达的 TGF- β 1 与高血压的并发症如左心室肥厚、血管重构密切相关。Rosenkranz 等^[15]研究表明,高表达 TGF- β 1 的小鼠,心房纤维化增加,更容易发生房颤。另一项研究表明^[16],持续表达 TGF- β 1 的小鼠可选择性引起心房而不是心室纤维化,提示心房成纤维细胞可能对 TGF- β 1 的刺激更敏感。

TGF- β 1 还可以通过激活位于 CTGF 启动子的 TGF- β 1 反应元件,在不同的成纤维细胞中包括心脏成纤维细胞,促进 CTGF 的合成。有学者在鼠中发现,心肌梗死后心肌 CTGF 的升高与 TGF- β 1 和胶原表达相平行,运用 CTGF 抗体可部分减弱 TGF- β 1 诱导的成纤维细胞胶原合成。CTGF 广泛存在于人类多种组织器官中,作为 TGF- β 1 的下游介质对结缔组织细胞起作用。它促进细胞有丝分裂和成纤维细胞增殖,合成胶原^[17-19],与机体组织的创伤修复过程密切相关。成纤维细胞正常情况下处于静息状态,当受到刺激后即活化并增殖、分化和发生表型转化,转变成肌成纤维细胞,其合成胶原的能力大大增强^[20-21],目前关于心房组织 CTGF 基因表达与心房纤维化及房颤的关系尚不明确。

本研究结果显示,AF 犬右心房组织存在 I 型胶原纤维明显增加的现象,在给予 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ Mat 后, I 型胶原表达明显下降, III 型胶原含量表达增高, I/III 型胶原比例和 CVF 值明显下降 ($P < 0.05$),说明 Mat 对于房颤组织的胶原比例有调整作用,且对于胶原合成有明确的抑制作用。通过对于 TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF 蛋白和 mRNA 表达的考察发现,给予 Mat 的房颤犬心房肌组织三者蛋白表达均有显著下降,且 TNF- α 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达也被明显抑制。但是 CTGF 的 mRNA 表达不存在显著差异,提示 CTGF 作为 TGF- β 1 的下游介质,其表达可能并非通过 mRNA 转录抑制实现。

本实验结果表明,Mat 对房颤犬右心房肌组织有明确的抗胶原合成的作用,且能够改善房颤引起的胶原比例改变,其抑制作用可能是通过抑制 TNF- α 、TGF- β 1 和 CTGF 的蛋白表达和转录水平实现的。该结果显示 Mat 能够延缓心肌纤维化的过程,为临床应用 Mat 预防和治疗心肌纤维化提供了参考依据。

参 考 文 献

- [1] Boos CJ, Anderson RA, Lip GY. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder? *Eur Heart J*, 2006, 27: 136-149.
- [2] Darbar D, Motaln AA, Ritchie MD, et al. Polymorphism modulates

symptomatic response to antiarrhythmic drug therapy in patients with lone atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 2007, 4: 743-749.

- [3] 董燕,李银霞.转化生长因子 β 在苦参碱治疗中的作用.预防医学情报杂志,2008,24:532-534.
- [4] 朱新业,高登峰,牛小麟,等.苦参碱对自发性高血压大鼠心肌间质纤维化的作用和机制.心脏杂志,2005,17:528-531.
- [5] 宋慧文.苦参素对兔实验性左房纤维化的影响.实用医学杂志,2009,25:1743-1745.
- [6] 伍严安,高春芳.苦参碱抑制血小板衍生生长因子诱导的小鼠皮肤成纤维细胞增殖.第二军医大学学报,2000,21:724-726.
- [7] 何立人.苦参碱对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌增殖及超微结构的影响.上海中医药大学学报,1999,13:47.
- [8] 黄建,陈康杰,张卧,等.苦参碱抑制人大肠癌 HT29 细胞增殖及诱导凋亡作用与机制.中草药,2007,38:1210.
- [9] 陆丽华,童锦禄,冉志华.氧化苦参碱对人结肠癌细胞株 SW1116 细胞周期通路相关调控因子的影响.胃肠病学,2008,13:398.
- [10] 陆丽华,冉志华.氧化苦参碱对人结肠癌细胞 P21、P27、Cyclin E1 及 CDK2 表达的影响.世界华人消化杂志,2007,15:1353-1357.
- [11] Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, et al. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*, 1998, 97: 1382.
- [12] Saba S, Janczewski AM, Baker LC, et al. Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289: H 1456.
- [13] Gurantz D, Yndestad A, Halvorsen B, et al. Etenarcept or in travenous immunoglobulin attenuates expression of genes involved in postmyocardial infarction remodeling. *Cardiovasc Res*, 2005, 67: 106.
- [14] Kalra D, Sivasubramannic N, Mann DL. Angiotensin II induces tumor necrosis factor biosynthesis in the adult mammalian heart through a protein kinase C-dependent pathway. *Circulation*, 2003, 105: 2198.
- [15] Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, et al. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- β (1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283: H1253-H1262.
- [16] Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, et al. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor- β (1) transgene in the heart. *Circ Res*, 2000, 86: 571-579.
- [17] Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, et al. Connective tissues growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol*, 1998, 275: L365-371.
- [18] Luce JM. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 1998, 26: 369-376.
- [19] Hickling KG, Wright T, Laubscher K, et al. Extreme hypoventilation reduces ventilator-induced lung injury during ventilation with low positive end-expiratory pressure in saline elavaged rabbits. *Crit Care Med*, 1998, 26: 1960-1967.
- [20] Zeiberg M, Strutz F, Muller GA, et al. Role of fibrobl as tactivation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol*, 2000, 13: S111-120.
- [21] Powell DW. Myofibroblast: Paracrine cells important in health and disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2000, 111: 271-292.

(收稿日期: 2013-10-16)

(本文编辑: 张岚)