

· 基础研究 ·

复方钩藤降压片对大鼠心肌 CT-1/JAK-STAT 通路蛋白表达的影响

曾 勇 谭元生 任卫琼 陈偶英 段武磊 文爱珍

摘要 目的 观察复方钩藤降压片对自发性高血压大鼠(SHR)心肌营养素-1(CT-1)/JAK-STAT 通路蛋白表达影响,探讨其干预逆转高血压左室肥厚的机制。**方法** 将 50 只 SHR 按随机数字表法分为 5 组,复方钩藤降压片高剂量组(H 组,129.6 mg/mL)、复方钩藤降压片中剂量组(M 组,86.4 mg/mL)、复方钩藤降压片低剂量组(L 组,43.2 mg/mL)、贝那普利组(B 组,0.9 mg/mL)、SHR 模型对照组(S 组),每组 10 只,另选取 10 只 Wistar 大鼠为正常对照组(W 组),每天灌胃 1 次,持续干预 24 周后取材,采用免疫组化法检测心肌局部 CT-1 的含量,Western blot 法检测心肌 JAK1/STAT3 蛋白表达水平。**结果** 与 W 组比较,S 组心肌组织中 CT-1 表达量和 JAK1、STAT3 蛋白表达水平均升高($P < 0.05$)。与 S 组比较,B 组、H 组、M 组及 L 组心肌组织中 CT-1 表达量降低($P < 0.05$),JAK1、STAT3 蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。各药物干预组间 CT-1 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),H 组、M 组、L 组呈剂量依赖性 JAK1、STAT3 蛋白表达量递增,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 B 组比较,H 组、M 组 JAK1、STAT3 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。**结论** 复方钩藤降压片具有一定抑制 SHR 心肌 CT-1/JAK-STAT 通路蛋白表达的作用,可能通过降低心脏局部 CT-1 表达水平,抑制 JAK-STAT 通路,干预逆转左室肥厚。

关键词 复方钩藤降压片;自发性高血压大鼠;心肌营养素-1;JAK-STAT 通路;左室肥厚

Effect of Compound Uncaria Antihypertensive Tablet on Protein Expression of CT-1/JAK-STAT Pathway in Rats ZENG Yong, TAN Yuan-sheng, REN Wei-qiong, CHEN Ou-ying, DUAN Wu-lei, and WEN Ai-zhen *First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410007)*

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of reversing left ventricular hypertrophy in spontaneous hypertension rats (SHR) by the intervention of Compound Uncaria Antihypertensive Tablet from the point of view of interfering with the protein expression of cardiotrophin-1 (CT-1) /JAK-STAT pathway in rats' cardiac myocardium. **Methods** Totally 50 SHR were divided into 5 groups, the high dose group (group H, 129.6 mg/mL), the middle dose group (group M, 86.4 mg/mL), the low dose group (group L, 43.2 mg/mL), the benazepril group (group B, 0.9 mg/mL), and the SHR model control group (group S) according to the random number table, 10 in each group. 10 Wistar rats were recruited in a normal control group (group W), then performed gastric lavage once a day, and continued the intervention for 24 weeks. The contents of partial myocardial CT-1 and protein expression level of myocardial JAK1/STAT3 were detected by immunohistochemistry and Western blot respectively. **Results** Compared with group W, the expression level of CT-1 and the protein expression level of JAK1 and STAT3 in myocardial tissue were uniformly increased in group S ($P < 0.05$). Compared with group S, expression levels of CT-1 in myocardial tissue decreased ($P < 0.05$), while protein expression level of JAK1 and STAT3 decreased in group B, H, M and L ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the expres-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81473616); 湖南省中医药科研计划重点项目 (No. 201534); 湖南省教育厅重点项目资助 (No. 15A142); 中医内科学省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目 (No. ZYNK201507)

作者单位: 湖南中医药大学第一附属医院急诊科 (长沙 410007)

通讯作者: 文爱珍, Tel: 0731-85369114, E-mail: 18874154416@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180731.218

sion of CT-1 among the intervention groups ($P > 0.05$). The protein expression levels of dose-dependent JAK1 and STAT3 increased in group H, M and L, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group B, the expression level of JAK1 and STAT3 decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Conclusion Compound Uncaria Antihypertensive Tablet had a certain inhibitory effect on the protein expression of CT-1/JAK-STAT pathway protein, and its possible mechanism to reverse left ventricular hypertrophy is to reduce expression level of cardiac partial CT-1 and inhibit the JAK-STAT pathway, and then give full scope to reverse the left ventricular hypertrophy.

KEYWORDS Compound Uncaria Antihypertensive Tablet; spontaneously hypertensive rats; cardiotoxin-1; JAK-STAT pathway; left ventricular hypertrophy

高血压病是全球及我国第一大慢性疾病,依据《2017 美国成人高血压预防、检测、评估和管理指南》的高血压病诊断标准,我国仅 45 ~ 75 岁人群高血压病患者人数就达 2.67 亿^[1]。随着高血压患病时间延长,心脏后负荷持续增加,收缩末期室壁张力持续增强,导致左室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH)的发生。LVH 是充血性心力衰竭、缺血性心脏病、心律失常、猝死和脑卒中中独立的危险因素。有研究认为,不论用何种治疗方式或是否降压,心血管意外的发病率都会随 LVH 的消退而降低^[2]。西药治疗高血压 LVH,能有效而迅速降压,常用的 5 大类降压药物都具有不同程度的干预高血压 LVH 的作用,但总体疗效欠佳;而中医药从整体观念出发、治病求本,其作用具有多靶点性、多层次性,且作用温和、疗效确切,在高血压病及其靶器官损害的防治中,其作用受到越来越多的关注。综合前期研究基础,本实验拟以自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rats, SHR)和 Wistar 大鼠为实验对象,免疫组化法检测心肌局部心肌营养素-1(cardiot rophin-1, CT-1)的含量、Western blot 法检测心肌 JAK1/STAT3 的蛋白表达水平,试从 CT-1/JAK-STAT 通路探讨复方钩藤降压片(专利号:CN102068605A)治疗高血压 LVH 的机制。

材料与方法

1 动物 14 周龄 SHR 50 只,雄性,体重 280 ~ 320 g,尾动脉收缩压 160 ~ 190 mmHg; 14 周龄 Wistar 大鼠 10 只,雄性,体重 220 ~ 240 g,尾动脉收缩压 100 ~ 130 mmHg。所有大鼠均由北京维通利华实验技术有限公司提供(检疫合格证 No. 1100415964)。所有大鼠予相同饲料(购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司)与实验用三级用水(取自湖南中医药大学东塘校区综合楼二楼 SPF 级实验室)喂养,饲养于湖南中医药大学第一附属医院中心实验室实验动物饲养中心,各组均自由饮水和普食。

本动物实验通过湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理审查(No. ZYFY2016067)。

2 药物 复方钩藤降压片(主要药物组成:钩藤、川芎、麦冬、萝芙木等 5 味药,组成比例为钩藤:麦冬:川芎=326:252:215),0.4 g/片,每片含生药量为 1.65 g,湖南中医药大学第一附属医院制剂科生产;盐酸贝那普利片,10 mg/片,北京诺华制药有限公司生产,批次号:X2497。

3 主要试剂与仪器 多种浓度乙醇(批号:20130408)、二甲苯(批号:061204)购自武汉市鑫楚洋化工有限公司;动物解剖手术台,北京世纪圣农科技有限公司生产;赛默飞世尔(Thermo Multiskan)MK3 全自动酶标仪,北京平利洋医疗设备有限公司生产;PBS 液,长沙丽欣生物有限公司提供;820 石蜡切片机,美国 Reichert 公司生产;CT-1 免疫组化试剂盒,长沙丽欣生物有限公司提供;兔抗 JAK1,博奥森提供;兔抗 STAT3,博士德提供;兔抗 GAPDH, CST 提供,浓度:1 mg/mL;羊 Goat Anti-Rabbit IgG, Bioswamp 提供。

4 动物分组及给药方法 将 50 只 14 周龄雄性 SHR 按照随机数字表法分为 5 组,即复方钩藤降压片高剂量组(H 组)、复方钩藤降压片中剂量组(M 组)、复方钩藤降压片低剂量组(L 组)、贝那普利组(B 组)、SHR 模型对照组(S 组),每组 10 只。另 10 只 Wistar 大鼠正常对照组(W 组)。上述 6 组分 12 笼饲养,每笼 5 只,给予相同标准适用性喂养 1 周后开始灌胃,大鼠用药量按照体重 60 kg 成人每日常规服用药量换算^[3]。换算公式:(动物体重/人的体重)×人用药量×8.65。复方钩藤降压片配置成浓度为 129.6、86.4、43.2 mg/mL 高、中、低 3 种浓度混悬液,按 10 mL/kg 分别灌胃 H、M、L 组大鼠,相当于临床用药量的 12.975、8.65、4.325 倍;贝那普利配置成浓度为 0.9 mg/mL,按 10 mL/kg 灌胃 B 组大鼠;S 组、W 组大鼠予蒸馏水 10 mL/kg 灌胃。每日灌胃 1 次,干预处理 24 周。期间每周称重 1 次,据体重调整药量。

5 检测指标及检测 大鼠第 24 周实验结束前最后一次体重,将禁食 12 h 的大鼠用 3% 戊巴比妥钠行腹腔注射(30 mg/kg),约 5~10 min 麻醉后称重,仰卧位固定大鼠,自剑突下打开胸腔,迅速取出心脏,用预冷的 4 ℃ 生理盐水冲洗血污,滤纸吸干水分,沿房室交界处去除心房和大血管及右心室游离壁。

5.1 免疫组化法测定心肌局部 CT-1 含量 脱蜡、水化脱蜡,时间持续 10~15 min;再置于 100%、95%、80% 水 3 种浓度的 ALC 中进行脱水,再用蒸馏水冲洗;用双氧水灭活内源性酶;将切片浸入到 0.01 mmol/L 枸橼酸缓冲液中,再置于微波炉中加热至沸腾;封闭非特异性抗原;滴加稀释的 1 抗,室温保存 3 h、或 37 ℃ 2 h;滴加生物素化抗小鼠 IgG,置湿盒中放 37 ℃ 水浴箱温育 40 min,PBS 漂洗 5 min × 3 次;临用前配制 DAB 显色剂;蒸馏水终止显色,必要时用苏木素液轻度复染;脱水、透明、封片;光学显微镜下,随机采图,每张切片采取 3 张图片,对图片进行汇总后,进行综合分析。

5.2 Western blot 法检测心肌 JAK1、STAT3 蛋白表达水平 主取心肌组织 50 mg,用滤纸吸去其表面水分,剪碎,放入玻璃匀浆器的杆状部,加入 RIPA 和 PMSF(先加 RIPA 再加 PMSF),将玻璃匀浆器插入冰中,匀浆约 30 min。将心肌组织匀浆转移到离心管中,离心 5 min,收集上清;分别以 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 将蛋白标准液加入 96 孔板的第 1~8 标准孔中,在其他样品孔中加入 10 μL 待测样品,加 PBS 定容至 20 μL。加入 200 μL BCA 工作液,室温放置 2 h,依标准曲线算出蛋白浓度;按比例配制分离胶,配制浓缩胶,然后插入梳子,静制 60 min 以上,再将聚合好的凝胶安置于电泳槽中,小心拔去梳子,加入电泳缓冲液后低电压 10~20 V 的预电泳 20~30 min;预电泳后依次加入标准品(10 μg)和待分析样品,每个泳道加 5 μL,进行电泳;再将电泳完毕的胶完整的放在盛有电转液的玻璃皿中,将目的蛋白所在区域切下来,测量其长宽,并记录;用 TBST 液洗涤印迹膜 10 min × 2 次;按相应抗体的效价加入一抗稀释液,将封闭后的膜放入杂交袋中,孵育;按相应抗体的效价加入二抗稀释液,孵育;将 ECL 工作液覆盖到膜表面,系统中观察、拍照。

6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组样本均数比较先进行方差齐性检验,组间比较采用 ANOVA,方差齐者用 LSD 检验,方差不齐时,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

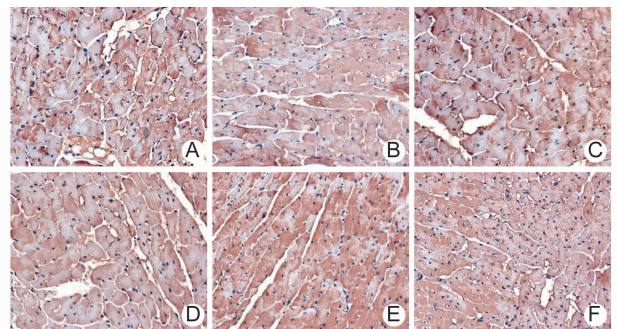
结 果

1 各组心肌 CT-1 表达量比较(表 1, 图 1) 与 W 组比较,S 组心肌组织中 CT-1 表达量升高($P < 0.05$);与 S 组比较,B 组、H 组、M 组及 L 组心肌组织中 CT-1 的表达量均降低($P < 0.05$);且 B 组与 H 组、M 组、L 组心肌组织中 CT-1 表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组心肌 CT-1 表达量比较 (吸光度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CT-1
W	10	0.52 ± 0.12
S	10	0.66 ± 0.29*
H	10	0.42 ± 0.14 [△]
M	10	0.45 ± 0.11 [△]
L	10	0.41 ± 0.05 [△]
B	10	0.45 ± 0.07 [△]

注:与 W 组比较,* $P < 0.05$;与 S 组比较,[△] $P < 0.05$



注:A 为 H 组;B 为 M 组;C 为 L 组;D 为 B 组;E 为 S 组;F 为 W 组

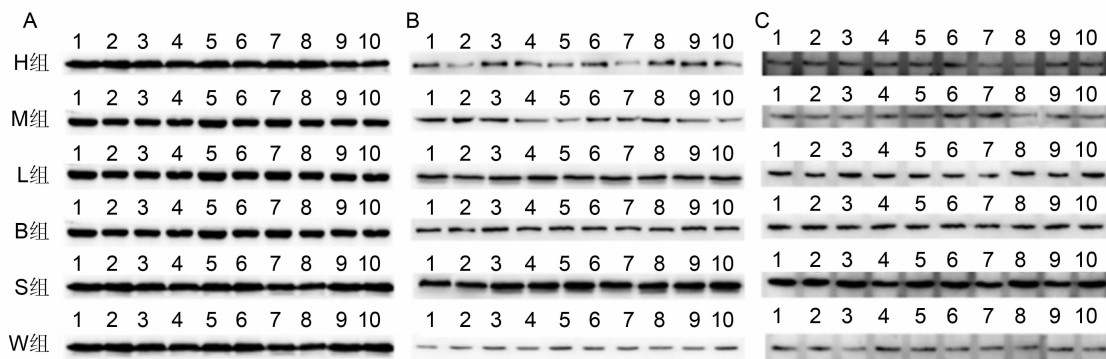
图 1 各组心肌组织 CT-1 免疫组化的结果 (PV 染色, ×400)

2 各组心肌 JAK1、STAT3 蛋白表达水平比较(表 2, 图 2) 与 W 组比较,S 组 JAK1、STAT3 蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与 S 组比较,H 组、M 组、L 组及 B 组 JAK1、STAT3 蛋白表达水平均降低($P < 0.05$),且 H 组、M 组、L 组呈剂量依赖性 JAK1、STAT3 蛋白表达量递增,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 B 组比较,

表 2 各组心肌 JAK1、STAT3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	JAK1	STAT3
W	10	3.48 ± 0.07	1.49 ± 0.14
S	10	7.91 ± 0.19*	8.18 ± 0.15*
H	10	3.13 ± 0.63 ^{△▲●}	1.38 ± 0.12 ^{△▲○}
M	10	4.29 ± 0.89 ^{△▲○}	1.49 ± 0.32 ^{△▲○}
L	10	5.18 ± 0.07 [△]	5.26 ± 0.11 [△]
B	10	5.36 ± 0.08 [△]	5.74 ± 0.14 [△]

注:与 W 组比较,* $P < 0.05$;与 S 组比较,[△] $P < 0.05$;与 B 组比较,[▲] $P < 0.05$;与 L 组比较,[○] $P < 0.05$;与 M 组比较,[●] $P < 0.05$



注:A 为 GAPDH 膜;B 为 JAK1 膜;C 为 STAT3 膜;1~10 表示每组 10 只大鼠的编号

图 2 各组 JAK1、STAT3 蛋白表达

H 组及 M 组 JAK1、STAT3 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$), L 组 JAK1、STAT3 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

CT-1 为 IL-6 细胞因子家族的新成员,因其在体外能够导致心肌细胞肥大而得名,是迄今发现的 IL-6 家族中体外诱导心肌细胞肥大的最强的细胞因子^[4]。CT-1 在心肌组织表达最高,病理状态下,如高血压病、心肌梗死、急性心肌炎、扩张性心肌病、心脏瓣膜病及垂体瘤等均可出现 CT-1 基因的过度表达^[5]。

血压升高导致压力负荷增加,牵拉心室肌细胞,刺激 CT-1 的释放^[6]。从高血压病到高血压 LVH、心力衰竭,CT-1 都扮演着一个重要的角色^[7]。CT-1 和 IL-6 一样通过 JAK-STAT3 途径引起心脏肥大^[8]。CT-1 与其特异的受体结合后,通过形成 gp130 同源二聚体或 gp130/LIFR β 异源二聚体,连续触发与 Jak、Tyk 激酶家族 (Jak1、Jak2、Tyk2) 相关的酪氨酸激酶,使酪氨酸激酶磷酸化,再激活 STAT3,活化的 STAT3 形成同源或异源二聚体,移入细胞核内,上调肾素原血管紧张素系统,激活血管紧张素原基因的启动子,并促使血管紧张素原 mRNA 产生增多诱导心肌细胞肥大^[9],并促进未成熟心肌细胞的存活和增殖,诱导心肌细胞肥大^[10,11]。CT-1 通过激活 JAK-STAT 信号传导通路,不仅促进心肌肥大,还能促进心肌间质纤维化,最终促使心室肥厚的形成^[12]。

复方钩藤降压片由钩藤、麦冬、川芎等 5 味药组成。钩藤性凉,入肝经,既能清肝热,又能平肝阳,是治疗肝阳上亢或肝火上攻之头痛、眩晕等之要药,为君药;川芎味偏辛,性温,具活血化瘀、行气止痛之功,通达气血同时,又能上行头目,乃治疗头痛要药,多种头

痛、眩晕皆可随证配伍,为臣药;麦冬味甘柔润,性偏苦寒,长于滋养阴清热,除烦安神,用治肝肾阴虚,虚阳上越所致头晕、心悸等症,为臣药;萝芙木味苦、性寒。主治:清风热,降肝火,消肿毒。方中用治阴虚阳亢所致头晕等症,为臣药。组方共凑平肝养阴、活血通脉之功,临床适应于西医诊断为高血压病及合并靶器官损害,中医辨证为阴虚阳亢、肝肾阴虚、肝阳上亢和(或)瘀血阻滞之眩晕、头痛等病症。临床及实验证实该复方具有较显著的降压效果、干预或逆转高血压 LVH 的作用^[13-16]。

本实验通过本实验通过免疫组化法检测心肌局部 CT-1 的含量、Western blot 法检测心肌 JAK1/STAT3 的蛋白表达水平发现:经中成药复方钩藤降压片及西药贝那普利治疗后 SHR 心肌局部 CT-1 表达量组间差异无统计学意义,均与 WKY 大鼠组相近,均较 SHR 模型大鼠组低,与中成药使用剂量无关,提示中成药及西药均具有一定抑制 CT-1 表达的作用,但中西药药物间差异无统计学意义;而在抑制 JAK1/STAT3 蛋白表达方面中成药具有一定优势,随着中成药剂量增加 JAK1 蛋白表达水平降低,H 组表达量甚至低于 WKY 大鼠组,B 组则表达量与 L 组表达量相近,在抑制 STAT3 表达方面,H 组、M 组表达量均与 WKY 大鼠组相近,均较 B 组及 SHR 组低,但 L 组抑制作用不强,与 B 组相近。总体而言,中成药复方钩藤降压片具有一定抑制 CT-1/JAK-STAT 通路蛋白表达的作用,相比西药,复方钩藤降压片在抑制 CT-1 表达方面未体现出明显优势,而抑制 JAK-STAT 通路的蛋白表达较明显,且与剂量相关。

因此,SHR 心肌 CT-1/JAK-STAT 通路过表达,复方钩藤降压片具有一定抑制 CT-1/JAK-STAT 通路蛋白表达的作用。结合前期研究基础,该复方干预逆转 LVH 可能机制为:通过降低心脏局部 CT-1 表达水

平,抑制 JAK-STAT 通路,进而发挥干预逆转左室肥厚的作用。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Khera R, Lu Y, Lu J, et al. Impact of 2017 ACC/AHA guidelines on prevalence of hypertension and eligibility for antihypertensive treatment in United States and China: nationally representative cross sectional study[J]. *BMJ*, 2018, 362: k2357.
- [2] Braz Nogueira. Regression of left ventricular hypertrophy in hypertension—does it reduce cardiovascular risk? [J]. *Rev Port Cardiol*, 2005, 24(9): 1007–1013.
- [3] 吴婷婷, 屈会化, 胡丽娜, 等. 基于树鼯体表面积与人类及其它实验动物等效剂量换算系数的测算[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(1): 203–205.
- [4] Liu J, Shen O, Wu Y. Simvastatin prevents cardiac hypertrophy in vitro and in vivo via JAK/STAT pathway[J]. *Life Sci*, 2008, 82(19): 991–996.
- [5] Kanazawa H, Ieda M, Kimura K, et al. Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gpl30-signaling cytokines in rodents [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(17): 408–421.
- [6] Pemberton CJ, Raudsepp SD, Yandle TG, et al. Plasma cardiotrophin-1 is elevated in human hypertension and stimulated by ventricular stretch [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 68(1): 109–117.
- [7] Schillaci G, Pucci G, Perlini S. From hypertension to hypertrophy to heart failure: the role of cardiotrophin-1[J]. *J Hypertens*, 2013, 31(3): 474–476.
- [8] Fukuzana J, Booz GW, Hunt RA, et al. Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3 an autocrine loop for hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2000, 35(6): 1191–1196.
- [9] Calabró P, Limongelli G, Riegler L, et al. Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(2): 142–148.
- [10] Robador PA, Moreno MU, Beloqui O, et al. Protective effect of the 1742 (C/G) polymorphism of human cardiotrophin-1 against left ventricular hypertrophy in essential hypertension [J]. *J Hypertens*, 2010, 28(11): 2219–2226.
- [11] Lopez N, Dtez J, Fortufllo MA. Differential hypertrophic effects of cardiotrophin-1 on adult cardiomyocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(5): 902–913.
- [12] González A, López B, Ravassa S, et al. Cardiotrophin-1 in hypertensive heart disease [J]. *Endocrine*, 2012, 42(1): 9–17.
- [13] 曾勇, 谭超, 叶舒婷, 等. 复方钩藤降压片对自发性高血压大鼠血压及炎症水平的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(12): 2983–85.
- [14] 曾勇, 张稳, 王顺民, 等. 复方钩藤降压片对自发性高血压大鼠血压与左室肥厚的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(5): 1106–1108.
- [15] 曾勇, 谭超, 文爱珍, 等. 复方钩藤降压片对 SHR 腹主动脉壁白细胞黏附浸润及 E-选择素表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(5): 1105–1107.
- [16] 叶舒婷, 谭超, 黄娟娟, 等. 复方钩藤降压片治疗高血压病左室肥厚(阴虚阳亢、瘀血阻络证)31 例临床观察 [J]. *中医药导报*, 2013, 19(5): 8–10.

(收稿: 2017-05-23 在线: 2018-08-30)

责任编辑: 白霞