

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.19.001

赖氨大黄酸促进大鼠心肌 Smad7 表达的研究*

赵 鹏,刘志勇[△]

(华北理工大学附属医院胸心血管外科,河北唐山 063000)

摘 要:目的 初步探讨赖氨大黄酸(RHL)对肾性压力负荷性心肌纤维化模型大鼠 Smad7 表达的影响。**方法** 将 32 只大鼠随机分为对照组、模型组、赖氨酸组及 RHL 组,每组 8 只,用“两肾一夹”法建立肾性压力负荷性心肌纤维化模型,通过测量鼠尾动脉收缩压及左心室质量指数评价造模效果,通过 Masson 染色观察大鼠心肌纤维化病变程度,采用免疫组织化学法及实时荧光定量聚合酶链反应在蛋白及 mRNA 水平检测 Smad7 表达情况。**结果** 与模型组相比,经 RHL 治疗后肾性压力负荷性心肌纤维化大鼠心肌组织中 Smad7 蛋白及 mRNA 表达均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** RHL 可有效抑制肾性压力负荷性大鼠心肌纤维化进程,其机制与上调 Smad7 表达,靶向拮抗 TGF- β /Smads 信号传导通路有关。

关键词:赖氨大黄酸; 心肌纤维化; TGF- β /Smads; Smad7

中图分类号:R965

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)19-2845-04

Research of rhein lysine on promoting expression of Smad7 in rat myocardial tissue*

ZHAO Peng, LIU Zhiyong[△]

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To preliminarily explore the effect of rhein lysine (RHL) on the expression of Smad7 in renal pressure-loaded myocardial fibrosis model rats. **Methods** Thirty-two rats were randomly assigned to the control group, model group, lysine group and RHL group, 8 cases in each group. The renal pressure-loaded myocardial fibrosis model was established by the method of two kidney one clip. The effect of constructing model was evaluated by measuring the artery systolic pressure of rat tail and left ventricular mass index. The degree of myocardial fibrosis lesion was observed by Masson staining; the expression situation of Smad7 in protein and mRNA level was detected by adopting the immunohistochemical method and real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** Compared with the model group, the myocardial tissue Smad7 protein and mRNA after RHL treatment in the rats with renal pressure-loaded myocardial fibrosis were significantly increased, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** RHL can effectively inhibit the progression of myocardial fibrosis in renal pressure-loaded rats, its mechanism is related with up-regulating Smad7 expression and targeted antagonism on the TGF- β /Smads signal transduction pathway.

Key words: rhein lysine; myocardial fibrosis; TGF- β /Smads; Smad7

心肌纤维化(MF)指心肌间质成纤维细胞增殖,致细胞外基质(I、III型胶原纤维为主)过度沉积的病理改变,是多种心脏疾病向终末期发展的一个必然过程。众多研究提示 TGF- β /Smads 信号通路在 MF 进展中发挥重要作用,而 Smad7 是该信号通路中的抑制因子^[1-2]。大黄酸(RH)为大黄、何首乌等传统中药的主要有效成分之一,通过赖氨酸(LY)对 RH 进行结构改造获得了赖氨大黄酸(RHL),其水溶性显著提高,拓展了其临床应用^[3]。已有研究初步证实 RHL 具有抗肝纤维化的作用^[4-5]。在此基础上,建立肾性

压力负荷性 MF 模型,给予 RHL 治疗,通过观察 Smad7 表达来探讨其对 MF 的作用及可能机制,为临床 MF 的防治提供新的实验数据及可行方法。

1 材料与方法

1.1 材料来源 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量(200 $\pm$ 20)g,购于华北理工大学动物实验中心;RHL(纯度 98%,相对分子质量约为 430.4 $^{\circ}$ C 避光保存,批号 20120812);Trizol 总 RNA 提取试剂, M-MLV 酶 cDNA 第一链合成试剂盒,聚合酶链反应(PCR)试剂盒(美国 Invitrogen 公司),引物由上海生物工程有限

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201281);河北省自然科学基金资助项目(H2013209180、C2012401037、H2013209040)。

作者简介:赵鹏,男,在读硕士,主要从事心肌纤维化发病机制及治疗的研究。 [△] 通信作者, E-mail: macromicro@126.com。

公司设计并合成; Smad7 抗体(中衫公司), 抗兔二抗(中衫公司); PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司), Gemini EM 荧光读板机(美国 Molecular Devices 公司), 全自动免疫组织化学仪(澳大利亚郝思琳公司), softron BP-98A 智能无创血压计, Olympus 光学显微镜及照相系统。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 将 32 只大鼠随机分为 4 组($n=8$): 对照组、模型组、LY 组、RHL 组, 用染色法逐一标记。采用“两肾一夹”造模法^[6], 游离模型组、LY 组及 RHL 组左肾动脉, 卡入 0.20 μm U 形银夹, 以肾脏红色变浅为宜; 对照组重复同样操作, 不置银夹。

1.2.2 动物给药方案 造模后 4 周给药, 连续 8 周。LY 组及 RHL 组分别灌胃 LY 及 RHL 溶液, 剂量为 70 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 对照组和模型组灌胃生理盐水, 每次给药前称质量, 严格计算给药量。整个实验期间大鼠自由采食、饮水。

1.2.3 血压测定 应用 softron BP-98A 智能无创血压计检测鼠尾动脉收缩压(SBP), 于日间大鼠安静清醒状态下进行, 1 次/周, 严格按照血压计使用说明进行操作, 连续测量 3 次取平均值。

1.2.4 左心室质量指数(简称左心指数)测定和标本处理 沿房室交界处仔细分离心房及主动脉弓, 分离右心室游离壁, 保留室间隔, 得到左心室, 称取左心室和全心质量, 左心指数 = 左心室质量/全心质量。剪取心尖部厚约 5 mm 心肌组织, 经液氮速冻后转 -80°C 保存, 留待分子学检测, 其余经 4% 多聚甲醛液固定及石蜡包埋后, 制成 3~4 μm 切片。取材过程力求迅速, 全程冰面操作, 手术器械高压蒸汽灭菌并预冷, 最大限度地减少组织降解。

1.2.5 心肌 Masson 染色 每组随机选取 3 张石蜡切片, 经 Masson 染色后观察 MF 程度及病理改变, 随机选取 5 个不重叠视野($\times 400$)采集图像, 利用 Image J 图像分析软件进行分析, 采用半定量方法测定左心室胶原平均积分光密度值(IOD), 取其平均值进行统计学处理。

1.2.6 免疫组织化学法检测心肌组织 Smad7 相对表达量 每组随机选取 3 张石蜡切片, 应用全自动免疫组织化学仪, 以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗阴性对照, Smad7 一抗稀释水平为 1:200。随机选取 5 个不重叠视野($\times 100$), 采用半定量方法测定 IOD 并进行统计分析。

1.2.7 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 Smad7 mRNA 相对水平 取 -80°C 冰箱中冻存的大鼠心肌组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 样品在 260~280 nm 处检测吸光度值(A), 按 $1 \text{ A}=40 \mu\text{g}/\text{mL}$ RNA 计

算 RNA 的产量。 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 即可使用。采用双蒸水为空白对照, 按公式 $A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数}/1000 = \text{RNA}(\mu\text{g}/\mu\text{L})$ 计算总 RNA 水平, 用时调整 RNA 水平 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。以 RNA 为模板, 使用 M-MLV 反转录酶合成第一链 cDNA, 构建 20 μL 的反应体系可反转录 1~5 μg 总 RNA。反转录反应体系 20 μL 包括组织总 RNA 2 μL , Oligo(dT)1 μL , dNTP 混合物(10 mmol)1 μL , $4 \times$ 第一链合成缓冲液 4 μL , 0.1 mmol/L DTT 2 μL , 重组核糖核酸酶抑制剂(40/ μL)1 μL 和 M-MLV 反转录酶(200/ μL)1 μL , 其余用无 RNA 酶的 DEPC 水补齐至 20 μL 。反应条件为 37°C 孵育 50 min, 70°C 加热 15 min 灭活反转录酶, 终止反应, 保存备用(-20°C)。取 cDNA 进行 PCR 检测。反应体系 20 μL : cDNA 产物 2 μL , 10 nmol 上下游引物各 1 μL , dNTP 1 μL , Taq 2 μL , 其余用无 RNA 酶的 DEPC 水补齐至 20 μL 。加样完成后经震荡混匀及瞬间离心, 置入 PCR 仪扩增。设置反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 15 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 循环 30 次, 72°C 延伸 5 min。反应结果以 Comparative ΔCt 相对定量方法分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 实验过程中无大鼠死亡, 造模后大鼠血压逐渐升高, 直至术后 4 周血压升高值均在 50 mm Hg 以上, 且趋于稳定。模型组大鼠毛发干枯晦暗, 易激惹。

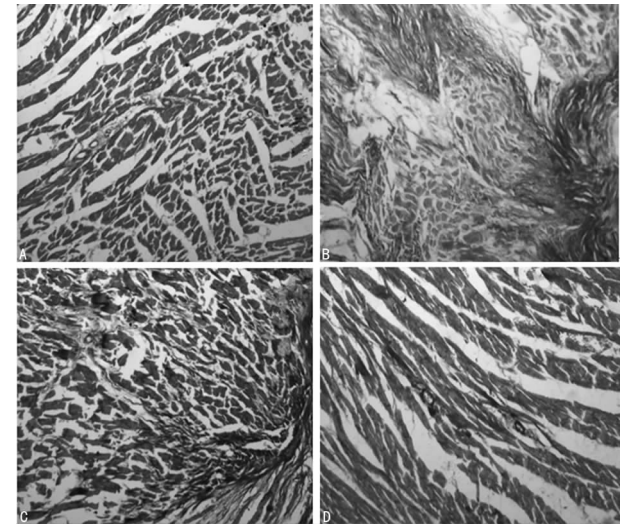
2.2 左心指数 与对照组左心指数(0.31 ± 0.02)相比, 模型组大鼠左心指数(0.47 ± 0.02)明显升高($P < 0.05$), RHL 组左心指数为 0.38 ± 0.01 , 与模型组比较明显降低($P < 0.05$)。

2.3 心肌病理学改变 Masson 染色显示, 与对照组相比, 模型组出现心肌细胞肥大、大量胶原沉积等改变, 而 RHL 组上述病理改变减轻。与对照组心肌组织胶原水平(10.05 ± 3.28)相比, 模型组大鼠心肌胶原水平(40.17 ± 10.55)明显升高($P < 0.01$)。RHL 组心肌组织胶原水平(16.32 ± 3.29)较模型组明显降低($P < 0.01$)。见图 1。

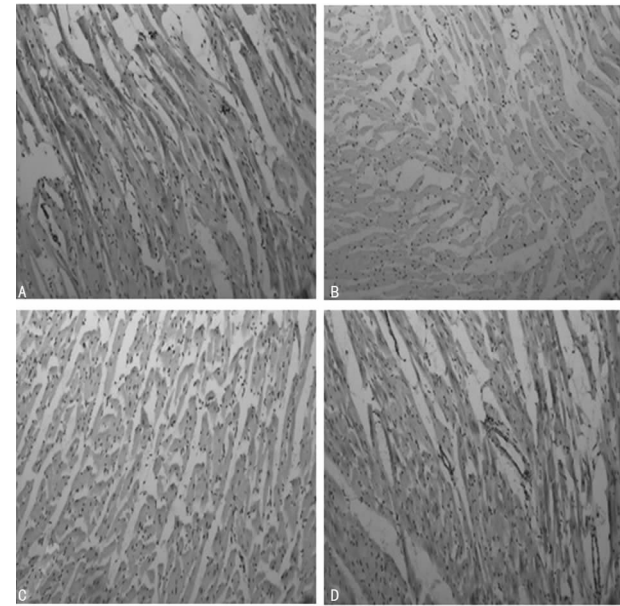
2.4 RHL 对心肌组织 Smad7 蛋白表达的影响 免疫组织化学法染色显示, Smad7 着色于细胞膜和细胞质。对照组 Smad7 蛋白在心肌间散在表达, 与对照组比较, 模型组 Smad7 蛋白相对表达量下调, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, RHL 组 Smad7 蛋白表达量上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2 及表 1。

2.5 RHL 对心肌组织 Smad7 mRNA 表达的影响

与对照组比较,模型组 Smad7 mRNA 相对表达量下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,RHL 组 Smad7 mRNA 相对表达量上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为 LY 组;D 为 RHL 组
图 1 Masson 染色检测各组大鼠心肌组织纤维分布(×100)



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为 LY 组;D 为 RHL 组
图 2 免疫组织化学法染色检测各组大鼠心肌组织中 Smad7 分布(×400)

表 1 各组 Smad7 蛋白及 mRNA 相对表达水平($n=8,\bar{x}\pm s$)		
组别	Smad7(IOD, $\times 10^4$)	Smad7 mRNA
对照组	3.82 $\pm$ 0.66	1.00 $\pm$ 0.00
模型组	1.90 $\pm$ 0.41 ^a	0.47 $\pm$ 0.04 ^a
LY 组	1.81 $\pm$ 0.63 ^a	0.49 $\pm$ 0.04 ^a
RHL 组	3.47 $\pm$ 0.51 ^b	0.75 $\pm$ 0.08 ^b

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$

3 讨 论

在临床中,MF 成因复杂,涉及肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)、交感神经系统、免疫应激等,且多个细胞因子参与,与高血压、动脉粥样硬化、心律失常、心肌梗死等多种临床心血管疾病密切相关^[7]。作为 TGF-β/Smads 信号传导途径的主要抑制性蛋白,Smad7 在 MF 中的作用受到越来越多的关注。已有实验证明,他汀类药物及黄芪、丹参等中药提取物及中药复方等通过诱导 Smad7 的表达可以有效干预 MF 进程^[8-10],且其在临床层面的研究已取得一定成果。中医药在慢性疾病的治疗上具有独特价值,其不良反应小,价格低廉,在改善预后方面优势明显^[11]。

本实验通过“两肾一夹”这一国际经典造模法激活 RAAS 系统,与人类高血压病理过程可比性强。同时,严格的无菌操作、显微器械的应用、手术技术的把控及定期血压测定均保证了造模成活率及成功率。

本研究中,与对照组相比,模型组大鼠血压及左心指数显著升高,提示造模成功。进一步 Masson 染色显示,模型组心肌细胞明显肥大,心肌间质及血管周围胶原明显沉积,而 RHL 组上述病理改变减轻,提示 RHL 有保护心肌组织、抑制 MF 进程的作用。为进一步探讨其可能的分子机制,通过免疫组织化学法及 RT-qPCR 法检测 Smad7 蛋白及 mRNA 的表达水平。研究发现,模型组 Smad7 蛋白及 mRNA 的相对表达量显著降低,分别为对照组的 49.74%、47.00%。而 RHL 可明显上调 Smad7 蛋白及 mRNA 的表达。

综上所述,RHL 有抗肾血管性高血压大鼠 MF 的作用,其机制是上调 Smad7 的表达,靶向增强 Smad7 途径对 TGF-β/Smads 信号传导通路拮抗,进而阻断细胞外基质的持续生成和过度沉积,延缓 MF 进程。本实验证实了 RHL 良好的抗 MF 作用,丰富了 RHL 的药理分子机制,为该药的进一步系统化研究奠定基础。

参考文献

[1] NAKAO A, AFRAKHTE M. Identification of Smad7, a TGF-β inducible antagonist of TGF-β signaling[J]. Nature, 1997, 389(6651): 631-635.
[2] 肖一佳, 沈祥春, 李杰平, 等. 心肌纤维化与 TGF-β-Smad 信号系统[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(2): 182-186.
[3] 林雅军, 甄永占, 魏洁, 等. 赖氨大黄酸盐的合成工艺及活性研究[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(11): 1010-1012.
[4] 王琳, 郝晓芳, 张荣花, 等. 赖氨大黄酸对胆汁淤积性肝纤维化大鼠 Smad2、Smad3 表达的影响[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(16): 2233-2235.
[5] 郝晓芳, 张荣花, 王琳, 等. 赖氨大黄酸对胆汁淤积性肝纤维化模型大鼠的治疗作用及其分子机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(3): 481-485. (下转第 2851 页)

量及血脂检测,发现 BMI 和腰臀比均是血脂异常的独立影响因素,提示周围性肥胖和中心性肥胖都是血脂异常的独立危险因素,与本研究结果类似。不同之处在于本研究将腰臀比与部分血脂指标的相关性及其性别差异进行具体分析。本研究发现腰臀比与血脂异常有相关性,因性别不同有所差异:男性人群中腰臀比与体质量呈正相关,与 HDL-C 呈负相关;女性人群中腰臀比与 TC 呈正相关,与 HDL-C 呈负相关。

本研究发现腰臀比与血糖亦具有相关性,Logistic 回归分析发现总人群中腰臀比与体质量、颈围、FPG、TC、UA 水平呈正相关。与向泽林等^[15]研究结果类似。王文绢等^[16]利用全国糖尿病流行病学调查资料,探讨 BMI、WC、腰臀比预测高血压、高血糖患病及二者聚集的价值,发现腰臀比与血压和血糖亦相关。本研究未将腰臀比与血压进行分析。

腰臀比与高血糖、高血脂及高 UA 具有相关性,同时腰臀比是相对较易获得的身体测量指标,更有利于及早发现异常生化指标,具有良好的公共卫生学意义。

参考文献

- [1] 杨光燃,袁申元,傅汉菁,等. 颈围、腰围、腰臀比对 2 型糖尿病患者超重、肥胖及代谢综合征评价作用的比较研究[J]. 中国全科医学,2016,19(7):781-785.
- [2] YANG G R, YUAN S Y, FU H J, et al. Neck circumference positively Chinese subjects with type 2 diabetes: Beijing Community Diabetes Study 4 [J]. Diabetes Care, 2010,33(11):2465-2467.
- [3] FORD E S, GILES W H, DIETZ W H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults-Findings from the third national health and nutrition examination survey[J]. JAMA, 2002,287(3):356-359.
- [4] 谢玲玎,陈晓平,王彦玲,等. 2 型糖尿病患者的睡眠质量对血糖控制达标的影响[J]. 中华糖尿病杂志,2013,5(4):221-225.
- [5] 许海燕,项志敏,陆宗良. 中国成人血脂异常防治指南(2007)概要及解读[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2008,10(3):238-240.

(上接第 2847 页)

- [6] 李萌,吕仕超,吴美芳,等. 不同原因诱导的心肌纤维化动物模型的建立[J]. 医学研究生学报,2014,27(3):330-334.
- [7] CHU P Y, WALDER K, HORLOCK D, et al. CXCR4 antagonism attenuates the development of diabetic cardiac fibrosis[J]. PLoS One, 2015,10(7):e0133616.
- [8] 张海嘯,史载祥,贾海忠,等. 大蒜素通过部分阻抑 TGF- β 1 介导的 Smads 信号改善压力超负荷大鼠心肌反应性纤维化[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(5):666-670.
- [9] ZHAN C Y, TANG J H, ZHOU D X, et al. Effects of tan-shinone II A on the transforming growth factor β 1/Smad

- [6] 祝之明. 肥胖与心血管病变——从流行病学到发病机制(专论)[J]. 中国糖尿病杂志,2006,14(6):402-404.
- [7] MANGGE H, ALMER G, HAJ-YAHYA S, et al. Nuchal thickness of subcutaneous adipose tissue is tightly associated with an increased LMW/total adiponectin ratio in obese juveniles[J]. Atherosclerosis, 2009, 203(1):277-283.
- [8] WANG F, WU S, SONG Y, et al. Waist circumference, body mass index and waist to hip ratio for prediction of the metabolic syndrome in Chinese[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009,19(8):542-547.
- [9] CHEONG K C, GHAZALI S M, HOCK L K, et al. The discriminative of waist circumference, body mass index and waist-to-hip ratio in identifying metabolic syndrome: variations by age, sex and race[J]. Diabetes Metab Syndr, 2015,9(2):74-78.
- [10] GODIN O, LEBOYER M, GAMAN A, et al. Metabolic syndrome, abdominal obesity and hyperuricemia in schizophrenia: Results from the FACE-SZ cohort[J]. Schizophrenia Res, 2015,168(1/2):388-394.
- [11] 苗志敏,赵世华,王颜刚,等. 山东沿海居民高尿酸血症及痛风的流行病学调查[J]. 中华内分泌代谢杂志,2006,22(5):421-425.
- [12] 李捷,黄雨晴. 高龄患者腰臀比与高尿酸血症的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2017,19(1):25-27.
- [13] 王锐,孙立军,尹福在. 2 型糖尿病患者肥胖与血脂异常及胰岛素抵抗的关系[J]. 临床荟萃,2007,22(7):494-495.
- [14] 方炎福,胡传来,阮亮,等. 合肥市某社区成年人群体质指数、腰臀比与血脂异常的关系[J]. 现代预防医学,2010,37(18):3496-3497.
- [15] 向泽林,赵景波,许加亮,等. 体质指数、腰围、腰臀比与高血压、高血糖的关系及三者对高血压、高血糖的预测价值[J]. 疾病控制杂志,2008,12(3):207-210.
- [16] 王文绢,王克安,李天麟,等. 体重指数、腰围和腰臀比预测高血压、高血糖的实用价值及其建议值探讨[J]. 中华流行病学杂志,2002,23(2):16-19.

(收稿日期:2018-01-02 修回日期:2018-05-19)

- signaling pathway in rat cardiac fibroblasts[J]. Indian J Pharmacol, 2014,46(6):633-638.
- [10] ZHAI Y S, GAO X R, WU Q M, et al. Fluvastatin decreases cardiac fibrosis possibly through regulation of TGF- β (1)/Smad 7 expression in the spontaneously hypertensive rats[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 587(1/3):196-203.
- [11] 吴美芳,吕仕超,李萌,等. 中医药干预心肌纤维化的效应与机制[J]. 中国中西医结合杂志,2014,34(7):887-891.

(收稿日期:2018-02-16 修回日期:2018-05-29)