

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2013.04.004

·基础研究·

转化生长因子 β_1 /Smads 通路在急性心肌梗死后心肌重塑中的作用 及祛瘀生新法的干预研究

张秀静¹, 赵海滨¹, 王帅², 郭梦², 许晓英², 马迪²

[摘要] **目的** 通过研究祛瘀生新中药对转化生长因子(TGF)- β_1 /Smads 通路的影响, 探讨祛瘀生新法对急性心肌梗死后心肌重塑的效应机制。**方法** 清洁级雄性 Wistar 大鼠 50 只随机分为正常组、假手术组、模型组、中药组、西药组, 每组 10 只。中药组大鼠术前 3 d 给药, 1 次/d。7 d 后, 检测外周血骨髓间充质干细胞(BMSCs)含量, 实时荧光定量 RT-PCR 检测心肌组织 TGF- β_1 mRNA、Smad3 mRNA、Smad7 mRNA 表达, 并观察心肌组织 HE 染色结果及免疫组化检测心肌 c-kit 细胞数。**结果** 模型组较假手术组心肌组织 TGF- β_1 mRNA、Smad3 mRNA 表达均增加($P<0.05$), Smad7 mRNA 表达降低($P<0.05$)。中药组心肌组织 TGF- β_1 mRNA、Smad3 mRNA 表达降低, Smad7 mRNA 表达增加, 中药组及西药组较模型组 c-kit 细胞数明显增多, 并能减轻心肌组织的病理损伤。中药组与西药组比较, TGF- β_1 mRNA、Smad3 mRNA 和 Smad7 mRNA 表达无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 祛瘀生新法能有效抑制急性心肌梗死后心肌重塑。

[关键词] 祛瘀生新法; 急性心肌梗死; 心肌重塑; 转化生长因子- β_1 /Smads; 大鼠

Effect of Quyushengxin Method on Transforming Growth Factor- β_1 /Smads in Ventricular Remodeling of Rats after Acute Myocardial Infarction ZHANG Xiu-jing, ZHAO Hai-bin, WANG Shuai, et al. The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To explore the effect of Quyushengxin Method on transforming growth factor- β_1 /Smads in ventricular remodeling of rats after acute myocardial infarction. **Methods** 50 male Wistar rats were randomly divided into control group, sham operation group, myocardial infarction group, Chinese medicine group and western medicine group with 10 rats in each group. Chinese medicine group was administered 3 d before the operation once a day. The rats were sacrificed 7 d later. The peripheral blood bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) was detected and the mRNA level of TGF- β_1 , Smad3 and Smad7 were observed with RT-PCR. Myocardial c-kit cell number and HE staining results were also observed. **Results** The expression of TGF- β_1 mRNA and Smad3 mRNA were higher and the expression of Smad7 mRNA was lower in the model group than in the sham operation group ($P<0.05$). The expression of TGF- β_1 mRNA and Smad3 mRNA were lower and the expression of Smad7 mRNA was higher in the Chinese medicine group than in the model group ($P<0.05$). And the c-kit cell number was more in both Chinese medicine group and western medicine group than in the model group. And there was no significant difference between Chinese medicine group and western medicine group ($P>0.05$). **Conclusion** Quyushengxin Method can inhibit ventricular remodeling after myocardial infarction in rats.

Key words: Quyushengxin Method; acute myocardial infarction; myocardial remodeling; transforming growth factor β_1 -Smads; rats

[中图分类号] R542.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2013)04-0329-05

[本文著录格式] 张秀静, 赵海滨, 王帅, 等. 转化生长因子 β_1 /Smads 通路在急性心肌梗死后心肌重塑中的作用及祛瘀生新法的干预研究[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(4): 329-333.

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后的心肌重塑与心脏破裂、室壁瘤形成及心力衰竭等严重并发症密切相关, 在 AMI 死亡及预后中起至关重要的作用^[1]。AMI 后心肌重塑机制复杂, 后果严重, 疗效不理想, 相关研究亟待深入。张海啸等实验表明, 转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β , TGF- β_1)/

Smads 信号通路的过度激活在诱发并加重 AMI 后心肌重塑病理过程中居关键地位^[2]。但目前对其活化调控缺乏有效手段。祛瘀生新法以中医“祛瘀血、生新血”为理论基础, 对 AMI 后心肌重塑疗效肯定。本课题组通过研究祛瘀生新法在大鼠 AMI 后心肌重塑中的干预作用及对 TGF- β_1 /Smads 通路和骨髓间充质干细胞

基金项目: 北京中医药大学自主选题项目资助(No. 2011JYBZZJ-026)。

作者单位: 1. 北京中医药大学第三附属医院, 北京市 100029; 2. 北京中医药大学, 北京市 100029。作者简介: 张秀静(1983-), 女, 河北邢台人, 硕士, 医师, 主要研究方向: 中医药防治心脑血管疾病。通讯作者: 赵海滨。

(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)动员的影响,探讨祛瘀生新法对AMI后心肌重塑的效应机制,为祛瘀生新药治疗AMI后心肌重塑提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

成年清洁级雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重(250±10)g,合格证编号:0240574,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。

血塞通软胶囊:生产批号为 Z20040016,由昆明圣火制药有限责任公司提供;总 RNA 试剂提取盒:由康为世纪提供;5×SYBR Green PCR Master Mix:AB Applied Biosystems 公司;dNTP:Solarbio 公司;OligodT、Rnasin、M-MLV:PROMEGA 公司;引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,PE 标记的骨髓基质干细胞抗原 1 抗体及干细胞生长因子受体(c-kit)均由北京博奥森生物科技有限公司提供;M×3000P 荧光定量 PCR 仪:Agilent Technologies Stratagene。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 用随机数字表法将 50 只大鼠分为正常组、假手术组、模型组、中药组、西药组,每组 10 只,分笼饲养。

模型组:参照文献^[3-4]制备 AMI 大鼠模型。盐酸戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉。经气管插管行小动物呼吸机辅助呼吸,有自主呼吸,潮气量 5~6 ml,吸呼比 1:2,呼吸频率 80/min。连接标准 12 导联,记录大鼠心电图。经左前胸廓旁第 3、4 肋间逐层开胸,暴露心脏,分离心包,在肺动脉圆锥和左心耳交界处用 5-0 号丝线结扎左冠状动脉前降支(LAD)近端制成 AMI 模型,以心电图出现坏死性 Q 波判断为可能 AMI,若无病理性 Q 波,则再次结扎,以提高 AMI 模型成功率,然后逐层缝合心腔。术后常规抗感染治疗。

中药组:制备 AMI 大鼠模型,术后立即给血塞通软胶囊治疗,给药量按《药理实验方法学》所示剂量换算法计算^[5]:200 g 大鼠剂量(g/kg)=人的剂量(1 g/kg·d)×0.018。每天灌胃 1 次,共用 7 d。

西药组:制备 AMI 大鼠模型,第 6 天腹腔注射基质细胞衍生因子-1 受体阻断剂 AMD3100,5 mg/kg,余同模型组大鼠。

假手术组:大鼠经历上述手术过程,丝线从冠状动脉下穿过但不结扎。

正常组:不做造模处理。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 各组心肌组织 TGF-β₁ mRNA、Smad3 mRNA、Smad7 mRNA 表达

1.2.2.1 心肌组织总 RNA 的提取 心腔内注射 10%氯化钾使心脏停跳于舒张期,迅速取下心脏,去除心房大血管及心脏外结缔组织,冲洗干净,分别置于液氮中保存。左室用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋。在冰块上切取 50~100 mg 的心肌组织块,采用试剂盒提取组织的总 RNA,操作按说明进行。

1.2.2.2 cDNA 的合成 RNA 样品取 10 μg, M-MLV 反转录酶 1 μl,无 RNase(Ribonuclease)水补足至总体积 25 μl。反应条件:42 ℃ 1 h;95 ℃ 15 min,4 ℃ 10 min。得反转录(reverse transcription, RT)终溶液即为 cDNA 溶液。

1.2.2.3 实时定量 PCR 每种组织均以 TGF-β₁ mRNA 和 β-actin 基因引物进行定量 PCR 反应,每管设 3 个复孔,在 96 孔 PCR 板中进行。TGF-β₁ 引物序列:上游引物 5'-GTG TGG AGC AAC ATG TGG AAC TCT-3',下游引物 5'-TTG GTT CAG CCA CTG CCG TAC CGC-3',产物 143 bp。Smad3 上游引物 5'-GTC AAC AAG TGG TGG CGT GTG-3',下游引物 5'-GCA GCA AAG GCT TCT GGG ATA-3',产物 150 bp。Smad7 上游引物 5'-GGA GTC CTT TCC TCT CTC-3',下游引物 5'-GGC TCA ATG AGC ATG CTT-3',产物 125 bp。内参 β-actin:上游引物 5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TAG-3',下游引物 5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3',产物 150 bp。反应条件:95 ℃,10 s;95 ℃,30 s;55 ℃,30 s。共 40 个循环。每例样本反应结束后由计算机自动计算并读出定量结果 Ct 值。Ct 值采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量。

1.2.3 病理形态学检查 各组处死大鼠,取心肌组织,用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片 HE 染色,在光镜下进行病理观察。

1.2.4 流式细胞仪检测 大鼠麻醉后,腹主动脉采血,肝素抗凝。Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,稀释至 1×10⁶/ml,分别加入荧光素藻红蛋白(PE)标记的骨髓基质干细胞抗原 1(CD117)抗体,流式细胞仪检测。

1.2.5 免疫组化检测 采用 SP 法, DAB 显色,在 400 倍显微镜下计数单位面积内 c-kit 阳性细胞数,每张切片随机取 9 个视野,取其均值作为测定值,具体步骤参照试剂盒说明书。

1.2.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析。所得数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 心肌组织病理学观察

正常组及假手术组整体均呈现正常心肌膜组织。模型组: 心肌细胞数量较少且散在, 结缔组织整片广布, 炎性细胞聚集, 成纤维细胞多, 整体呈现 AMI (重症) 心肌膜组织。中药组: 心肌细胞间有大量炎性细胞聚集, 整体呈现心肌炎心肌膜组织。西药组: 结缔组织整片占据切片较大区域, 炎性细胞散在, 浅粉红色胶原成分较多, 红细胞聚集且多, 整体呈现 AMI (轻症) 心肌膜组织。见图 1。

2.2 流式细胞仪检测

模型组阳性细胞数明显高于假手术组 ($P<0.01$), 中药组与西药组均明显高于模型组 ($P<0.01$), 中药组与西药组无显著性差异 ($P>0.05$)。见表 1。

2.3 免疫组化检测

模型组单位面积内 c-kit 标记阳性细胞数高于假手术组 ($P<0.05$), 中药组与西药组均高于模型组 ($P<0.05$), 中药组与西药组间无显著性差异 ($P>0.05$)。见图 2、表 2。

表 1 各组外周血 PE 标记 CD₁₁₇ 细胞数流式细胞仪检测结果

组别	n	阳性细胞数
假手术组(A)	10	1.60±0.67
模型组(B)	10	2.18±0.29
中药组(C)	10	3.40±0.11
西药组(D)	10	4.23±0.12
<i>F</i>		79.785
<i>P</i>		0.001
<i>P</i> _{A vs. B}		0.001
<i>P</i> _{B vs. C}		0.007
<i>P</i> _{B vs. D}		0.000
<i>P</i> _{C vs. D}		0.130

表 2 各组免疫组化 c-kit 标记细胞检测结果

组别	n	c-kit 标记阳性细胞数
假手术组(A)	10	26.0±6.7
模型组(B)	10	168.0±7.5
中药组(C)	10	188.0±7.9
西药组(D)	10	195.0±6.8
<i>F</i>		59.764
<i>P</i>		0.000
<i>P</i> _{A vs. B}		0.031
<i>P</i> _{B vs. C}		0.027
<i>P</i> _{B vs. D}		0.034
<i>P</i> _{C vs. D}		0.070

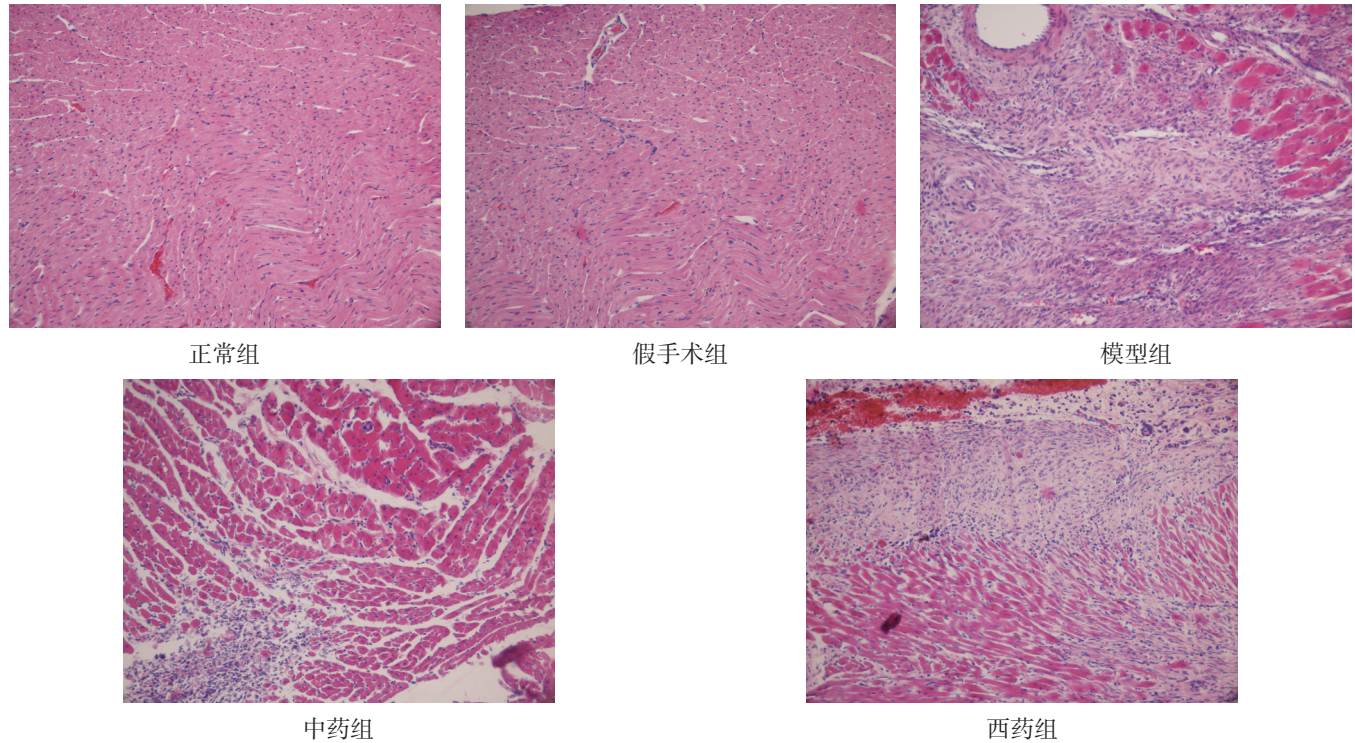


图 1 各组 HE 染色(光学显微镜, 200×)

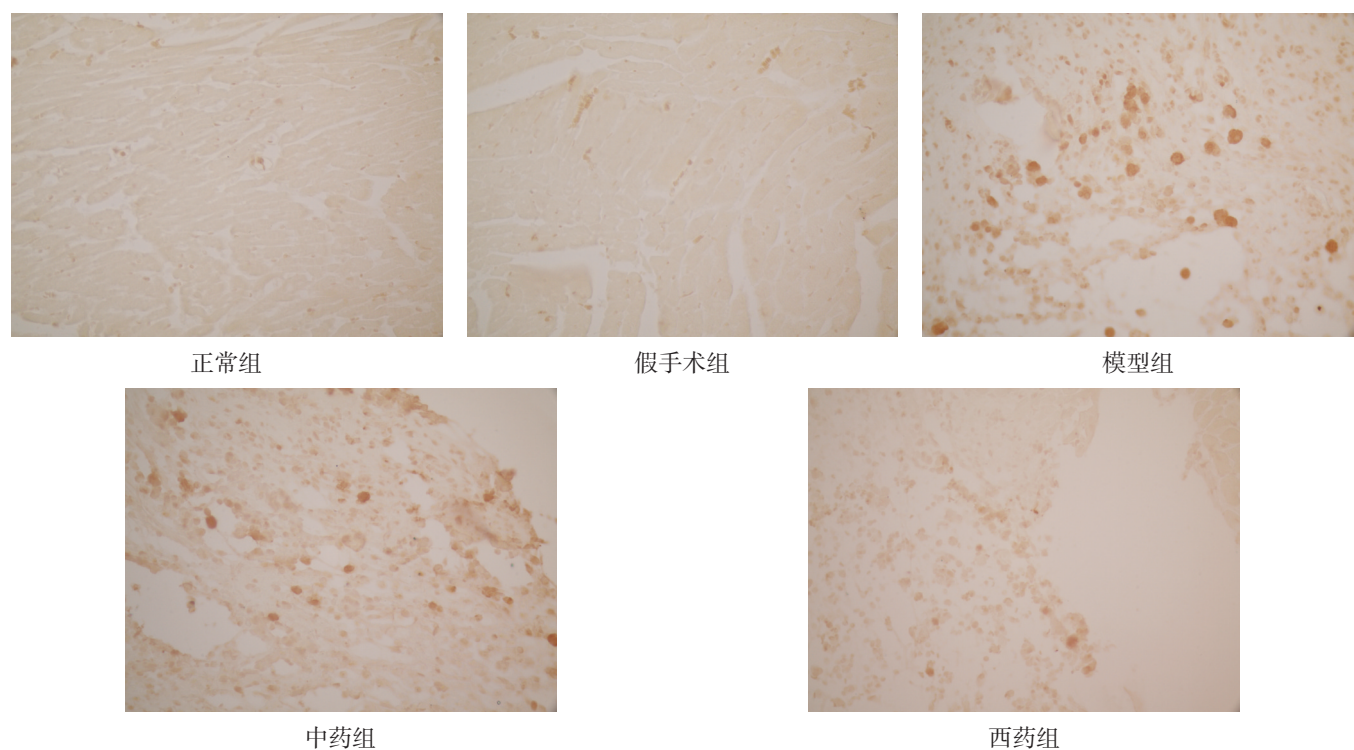


图2 各组 c-kit 免疫组化染色(光学显微镜, 400×)

2.4 实时荧光定量PCR 检测

模型组与假手术组相比, TGF-β₁ mRNA、Smad3 mRNA 表达均明显增加($P<0.01$), Smad7 mRNA 表达降低($P<0.05$)。中药组和西药组较模型组 TGF-β₁ mRNA、Smad3 mRNA 表达降低($P<0.05$), 而 Smad7 mRNA 表达增加($P<0.05$)。中药组与西药组比较, 均无显著性差异($P>0.05$), 见表3。

表3 各组心肌组织 TGF-β₁ mRNA、Smad3 mRNA、Smad7 mRNA 实时荧光定量结果

组别	n	TGF-β ₁	Smad7	Smad3
假手术组(A)	10	0.86±0.03	0.75±0.06	0.43±0.07
模型组(B)	10	1.12±0.12	0.45±0.07	1.07±0.13
中药组(C)	10	0.97±0.06	0.56±0.03	0.86±0.11
西药组(D)	10	0.95±0.01	0.65±0.09	0.82±0.02
<i>F</i>		89.778	79.886	76.996
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000
<i>P_{A vs. B}</i>		0.000	0.023	0.001
<i>P_{B vs. C}</i>		0.010	0.000	0.020
<i>P_{B vs. D}</i>		0.023	0.001	0.025
<i>P_{C vs. D}</i>		0.122	0.320	0.216

3 讨论

AMI后心肌重塑是指由于心肌严重缺血、坏死所导致的一系列心肌结构、功能和表型的变化, 主要包括^[6]: ①病理性心肌细胞肥大伴胚胎性基因再表达;

②心肌细胞的凋亡与坏死; ③细胞外基质过度沉积或降解增加。其分子和细胞机制复杂, 目前尚未完全阐明。多数研究认为信号传导途径参与的神经内分泌-细胞因子系统是引起心肌重塑的关键因素^[7]。

近年来, 大量研究表明, 在心肌损伤修复过程中, 血管紧张素 II (angiotnin II, Ang II)、β肾上腺素、内皮素等引起心肌纤维化、心肌重塑均可导致 TGF-β₁ 增加、TGF-β₁/Smads 信号通路过度激活, 这成了诸多因素所致心肌重塑的共同通路^[8]。因而, TGF-β₁/ Smads 通路激活在 AMI 后的心肌重塑过程中起重要作用。最近研究表明^[9-10], BMSCs “归巢” 在 AMI 后心肌重塑保护效应中疗效确切, 因而也应是较佳的治疗靶点, 然而正常情况下外周血中干细胞含量很低, 达不到修复坏死心肌所需的浓度。因此, 西医学治疗 AMI 后心肌重塑, 主要使用粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)、AMD3100、粒巨细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophag colony-stimulating factor, GM-CSF) 等作为 AMI 后干细胞 “归巢” 的有效动员剂, 相关研究表明治疗 AMI 后心肌受损的有效性确切^[11-12]。本实验证实心肌梗死后, 外周血及梗死心肌区 BMSCs 明显增多, ADM3100 对干细胞循环有动员效应。

AMI 属中医 “胸痹、真心痛” 的范畴, 是血道闭塞、血脉不通、瘀血滞塞脉络所致, 以 “血气不

至”、“血凝而不流”、“血瘀滞不行”等为主要病理机制,以胸闷胸痛、心悸气短等为主要症状。“祛瘀生新”亦称化旧生新、除旧生新,方而通过祛瘀、化旧或去腐等方法来祛除体内沉积的瘀血及其他陈旧性的病理产物,另一方面而强调应用生新方法来自它血、生新血、生新络、生新物,“祛瘀”与“生新”相辅相成,不可偏废^[13]。

本实验通过祛瘀生新法对大鼠AMI后心肌重塑的作用及对TGF- β_1 /Smads通路的干预后,经流式细胞仪及免疫组化检测发现,中药组较模型组BMSCs均明显增多,说明祛瘀生新法对其有动员效应,也是“生新血”的具体体现;TGF- β_1 mRNA、Smad3 mRNA表达有所降低($P<0.05$)。分子生物学检测发现中药组较模型组Smad7 mRNA表达增加($P<0.05$),心肌组织损伤也有所减轻,TGF- β_1 /Smads通路作为关键调控因子参与AMI后的心肌重塑过程,祛瘀生新中药对TGF- β_1 mRNA、Smad3 mRNA表达的负性调节作用,同时增加Smad7 mRNA的表达,从而有效改善AMI后的心肌重塑,这可能是祛瘀生新法能抑制心肌梗死后心肌重塑的重要机制之一。至于祛瘀生新法是否还有其他的活化调控机制,还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Weir RA, Clements S, Steedman T, et al. Plasma TIMP-4 predicts left ventricular remodeling after acute myocardial infarction [J]. Card Fail, 2011, 17(6): 465-471.
- [2] 张海啸,史载祥. 转化生长因子- β 信号传导通路与心肌纤维化[J]. 中日友好医院学报, 2007, 21(2): 110-112.
- [3] Ueda S, Yamagishi S, Matsui T, et al. Administration of pigment epithelium-derived factor inhibits left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction [J]. Am J Pathol, 2011, 178(2): 591-598.
- [4] 侯春丽,张冬梅,侯学红,等. 大鼠急性心肌梗死模型制备及对心功能影响的实验研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(9): 967-970.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2001: 202-204.
- [6] 赵成军,贾如意,杨婷. 预防重塑——心血管疾病治疗的新靶点[J]. 山东医药, 2007, 47(7): 77-78.
- [7] Krasnosel'skiĭ MIa, Vorob'ev PA, Tsurko VV. Interaction of the neurohumoral and immune mechanisms of progression of myocardial damage [J]. Ter Arkh, 2010, 82(9): 77-80.
- [8] Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling [J]. Cardiovas Res, 2007, 74(2): 184-195.
- [9] Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, et al. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review [J]. Eur Heart J, 2008, 29(15): 1807-1818.
- [10] Brunskill SJ, Hyde CJ, Doree CJ, et al. Route of delivery and baseline left ventricular ejection fraction, key factors of bone-marrow-derived cell therapy for ischaemic heart disease [J]. Eur J Heart Fail, 2009, 11(9): 887-896.
- [11] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18): 10344-10349.
- [12] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis reduces remodeling and improves cardiac function [J]. Nat Med, 2001, 7(4): 430-436.
- [13] 赵海滨,张秀静. 祛瘀生新——心肌梗死中医药干预的新思考[C]. 北京中医药协会心血管病专业委员会年会论文集, 2011: 63.

(收稿日期:2012-10-30 修回日期:2012-11-22)