·实验研究·

瓜蒌薤白半夏汤对心肌纤维化中整合素 β1 的抑制作用

沈　雁，韦　红

（上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院，上海　200437）

摘　要：目的　研究整合素 β1 和纤维连接蛋白在血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）诱导心肌纤维化中的作用，探讨瓜蒌薤白半夏汤（GXB）抗心肌纤维化的作用机制。**方法**　采用胰酶消化法培养乳鼠心肌成纤维细胞，建立 AngⅡ诱导心肌纤维化模型。实验分为空白对照组，AngⅡ组，5%、10%、15% GXB 含药血清组和缬沙坦含药血清组。空白对照组心肌成纤维细胞以空白对照组大鼠血清温育，其余各组均以 AngⅡ 1×10^{-6} mmol/L 刺激 24 h 后，再分别以空白对照组大鼠血清、5% GXB 含药血清、10% GXB 含药血清、15% GXB 含药血清、缬沙坦含药血清温育 24 h。RT-PCR 法检测 GXB 对整合素 β1 mRNA 表达水平的影响；ELISA 检测培养上清液中纤维连接蛋白的量；MTT 法检测心肌成纤维细胞增殖。**结果**　与空白对照组比较，AngⅡ 1×10^{-6} mmol/L 作用心肌成纤维细胞 24 h，整合素 β1 mRNA 表达水平及纤维连接蛋白的量明显上调（$P<0.01$），心肌成纤维细胞增殖指数明显升高（$P<0.01$）；经 GXB 含药血清干预后，与 AngⅡ组比较，整合素 β1 mRNA 的表达水平明显下降（$P<0.01$），纤维连接蛋白的量减少（$P<0.05$），心肌成纤维细胞增殖指数明显降低（$P<0.01$）。**结论**　瓜蒌薤白半夏汤能够抑制 AngⅡ诱导心肌纤维化，其作用机制可能与下调纤维连接蛋白/整合素 β1 表达有关。

关键词：瓜蒌薤白半夏汤；心肌纤维化；血管紧张素Ⅱ；整合素 β1；纤维连接蛋白

中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1674－5515(2010)04－0277－05

Mechanism of Gualou Xiebai Banxia Decoction reversal myocardial fibrosis through integrin β1

SHEN Yan，WEI Hong

（Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine，
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine，Shanghai 200437，China）

Abstract: Objective　To investigate the effects of integrin β1 and fibronectin on cardiac fibroblasts induced by Angiotensin Ⅱ（AngⅡ），and to expore the mechanism of Gualou Xiebai Banxia Decoction（GXB），a compound traditional Chinese herbal medicine，in reversing myocardial fibrosis．**Methods**　Fibroblasts derived from neonatal rats were cultured with enzymatic dissociation，and myocardial fibrosis was induced by AngⅡ．The fibroblasts were divided into normal control group，AngⅡ group，5% GXB-containing serum group，10% GXB-containing serum group，15% GXB-containing serum group，and Valsartan-containing group．Fibroblasts in normal control group were incubated by normal serum．In other experimental groups，fibroblasts were induced for 24 hours by AngⅡ（1×10^{-6} mmol/L），then incubated by 5% GXB-containing serum，10% GXB-containing serum，15% GXB- containing serum，and Valsartan-containing serum for 24 hours respectively．Integrin β1 mRNA expression was detected by RT-PCR，fibronectin content in the extracellular matrix were measured by ELISA，and proliferation of cardiac fibroblasts was measured by MTT．**Results**　After 24-hour stimulation of Ang Ⅱ in

基金项目　国家自然科学基金资助项目（30600826）；上海市教育委员会基金（08cz030）

作者简介　沈　雁（1971—），女，博士，副研究员，硕士研究生导师，主要研究方向为中医药防治心血管疾病。

韦　红（1983—），女，上海中医药大学 2006 级中医内科学硕士研究生。

fibroblasts，compared with those in normal control group，the expression of integrin β1 mRNA raised significantly（$P<0.01$），fibronectin increased significantly（$P<0.05$）. The model of myocardial fibrosis was intervented by different dosages of Gualou Xiebai Decoction. Compared with AngⅡ group，the integrin β1 mRNA expression showed a significant downward trend（$P<0.01$）and fibronectin decreased（$P<0.05$）. **Conclusion** Gualou Xiebai Decoction can inhibit cardiac fibroblast induced by AngiotensinⅡ，and the mechanism may be related to fibronectin/integrin β1.

Key words: Gualou Xiebai Banxia Decoction；myocardial fibrosis；Angiotensin Ⅱ；Integrin β1；fibronectin

心肌纤维化是指在心肌细胞外基质中，胶原纤维过量聚集，胶原的量过度升高或胶原成分发生改变[1]。中药在逆转心肌纤维化的研究中显示出良好的效果[2]。近年来在对纤维化疾病的研究中发现，肺纤维化、肝纤维化、肾纤维化等多种器官纤维化与整合素 β1 信号转导通路有密切关系。有研究显示心肌纤维化形成也与整合素 β1 信号转导通路存在密切关系。前期研究结果提示瓜蒌薤白半夏汤（GXB）具有良好的抗心肌纤维化的作用。本研究采用细胞培养和血清药理学研究方法，从整合素 β1 信号转导通路角度探讨 GXB 抗心肌纤维化的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SD 新生大鼠，1～2 日龄，雌雄不拘，第二军医大学动物实验中心提供；SD 大鼠，体质量（200±20）g，雄性，上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。动物合格证编号：SCXK（沪）2003－003。

1.2 药品与试剂

GXB 由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科制备：将瓜蒌 12 g、薤白 9 g、制半夏 12 g、黄酒 20 mL 水煎并浓缩至含生药 0.75 g/mL 的水煎剂。缬沙坦胶囊，北京诺华制药有限公司生产（批号：S0011），每粒 80 mg，以蒸馏水配制成 1.8 mg/mL 混悬液。血管紧张素Ⅱ（AngⅡ，批号 17K511O）、MTT、胰蛋白酶、分析纯 DMSO 均为 Sigma 产品；大鼠抗波形蛋白单克隆抗体、纤维连接蛋白单克隆抗体、α-肌动蛋白单克隆抗体均购自上海长岛生物技术有限公司；人纤维连接蛋白，美国 ADL 公司产品；DMEM 培养基，Gibico 产品；PCR 试剂盒，广州达晖生物公司产品。

1.3 仪器

CO_2 培养箱，德国 Heraeus 公司；CA—920—3 垂直层流洁净工作台，上海上净净化设备有限公司；550 型酶标仪，美国；LXJ—Ⅱ低温高速离心沉淀机，上海医用分析仪器厂生产；HH.W21.CU600 型电热恒温水温箱，上海医疗器械七厂生产；UV—1700 分光光度计，日本；DK—S24 电热恒温水浴箱，上海精宏实验设备有限公司；YXQ SG46 280 手提式压力蒸气灭菌器，上海医用核子仪器厂；DHG—9145A 电热恒温鼓风干燥机，上海一恒科技有限公司；TDL—50B 离心机，上海安亭科技仪器厂。

2 方法

2.1 心肌成纤维细胞的分离、培养

SD 新生大鼠以 75%酒精消毒，取出心脏，置入 4 ℃ PBS 液漂洗，剪碎，加入 0.25%胰酶，37 ℃反复消化，收集上清液，1 000 r/min 离心 5 min。弃上清，加入含新生牛血清的 DMEM 培养液，轻轻吹打混悬细胞，接种于 75 cm^2 培养瓶中，5% CO_2、37 ℃ 细胞培养箱中培养，1 h 后将未贴壁细胞移去，5%CO_2、37 ℃ 细胞培养箱中培养。实验采用 2～3 代细胞。

2.2 含药血清的制备

将 SD 大鼠分为空白对照组、AngⅡ组、GXB 组和缬沙坦组。空白对照组和 AngⅡ组分别 ig 生理盐水 10 mL/kg；GXB 组 ig GXB 水煎剂 10 mL/kg；缬沙坦胶囊组 ig 1.8 mg/mL 缬沙坦溶液 10 mL/kg。以上各组按与临床成人用药量的大鼠等效剂量的 10 倍给药[3]，每天给药 2 次，连给 3 d。末次给药后 2 h 麻醉动物，取血，3 500 r/min 离心 15 min，取血清，56 ℃ 水浴灭活 30 min，滤过，4 ℃ 保存。

2.3 细胞鉴定

观察心肌成纤维细胞形态及 EnVision；以免疫组织化学法鉴定心肌成纤维细胞。

2.4 MTT 法检测心肌成纤维细胞增殖

含药血清干预结束前 4 h，每孔加入 MTT 溶液 10 μL，继续培养 4 h，吸去培养液，终止孵育，每孔加入分析纯 DMSO 100 μL，震荡，混匀，酶标仪

读取 490 nm 吸光度（*A*），作为增殖指数。每组设 4 个复孔，重复实验 8 次。

2.5　实验分组及给药

取对数生长期心肌成纤维细胞，按每孔 2×10^5 接种于 6 孔板中，每组设 3 个复孔。每孔加入 15% 新生牛血清的 DMEM 培养液 100 μL，37 ℃、5%CO_2 及饱和湿度下培养 18～24 h。吸弃各孔培养基，空白对照组加入无血清 DMEM，其余实验组加入含 AngⅡ的 DMEM 1×10^{-6} mmol/L，培养 24 h；吸去旧培养液，空白对照组和 AngⅡ组分别加入含 15%空白对照组大鼠血清的 DMEM；3 个 GXB 组分别加入含 5%、10%和 15%GXB 组大鼠含药血清的 DMEM，每孔均 2 mL，继续培养 24 h 后收集各组细胞。

2.6　RT-PCR 检测心肌成纤维细胞整合素 β1 mRNA 的表达

2.6.1　细胞液总 RNA 的提取

采用 Trizol 一步法提取总 RNA；RNA 纯度经紫外分光光度仪测定 *A*260/*A*280 比值在 1.8 以上。

2.6.2　RNA 逆转录合成 cDNA

将总 RNA 样本进行 RT。反应体系：总计 20 μL 反应体系，取总 RNA 4 μL，oligo（d T）0.5 μL，加去焦碳酸二乙酯（DEPC）水至 10 μL，加 5×逆转录缓冲液 4 μL，脱氧核糖核苷酸（dNTPs）0.5 μL，逆转录酶（MMLV）1 μL。反应条件：37 ℃，1 h；95 ℃，5 min，灭活 MMLV。

2.6.3　cDNA PCR 扩增

样品总计 50 μL 反应体系，5×PCR 缓冲液 10 μL，上游引物 F 0.5 μL，下游引物 R 0.5 μL，dNTPs 0.5 μL，TAQMan 荧光探针 0.5 μL，*Taq* 酶 2 μL，双蒸水 31 μL，cDNA 模板 5 μL。扩增条件：50 ℃、min；95 ℃、5 min；95 ℃、15 s；60 ℃、45 s；进行 40 次循环。

2.6.4　引物及荧光探针序列

整合素 β1：上游引物 5′-CTGAAACTCTCCGAGGGAAA-3′，下游引物 5′-AATGGCTTGTGCTTGTTCAT-3′，荧光探针序列 5′-FAM-TTCCTCCGGAGGAAGAATTTATT-TAMRA-3′。内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）：上游引物 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3′，下游引物 5′-TTCTAGACGGCAGGTCAGGT-3′；荧光探针序列：5'-AAGGTCATCCCTGAGCTGAA-3′。引物设计应用 Primer Premier 5.0 软件，均由广州达安生物工程公司合成。每组设 5 个复孔。数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7500 SDS Software 1.30 分析。

2.7　ELISA 检测培养上清液中纤维连接蛋白

收集培养液上清，按纤维连接蛋白检测试剂盒说明书，于酶标板加入 50 μL 标准品于空白微孔中，再加入标记的样品 50 μL 于编号的空白微孔中，在样品孔中加入生物素 10 μL，在标准品孔和样品孔中加入 100 μL 酶标液，轻轻混匀，36 ℃ 左右孵育 60 min，洗板机清洗 5 次，每次静置 10～20 s，每孔加入底物 A 和 B 液各 50 μL，36 ℃ 左右避光孵育 15 min，每孔加入 50 μL 终止液，终止反应。在 450 nm 酶标仪读取 *A* 值，每组设 3 个复孔。

2.8　统计学分析

数据资料以 SPSS 13.0 统计学软件分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组计量资料间比较采用 One way ANOVA。

3　结果

3.1　瓜蒌薤白半夏汤对心肌成纤维细胞增殖的影响

与空白对照组比较，AngⅡ组心肌成纤维细胞增殖指数明显升高（$P<0.01$）；与 AngⅡ组比较，5%、10% GXB 含药血清组心肌成纤维细胞增殖指数明显降低（$P<0.01$），15% GXB 含药血清组此项指数虽有降低，但差异不显著（$P>0.05$）；缬沙坦含药血清组该指数明显降低（$P<0.01$）。结果见表 1。

表 1　瓜蒌薤白半夏汤对 SD 新生大鼠心肌成纤维细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组　别	*A* 值
空白对照	0.163 ± 0.015
AngⅡ	0.278 ± 0.026 ##
5% GXB 含药血清	0.206 ± 0.033 **
10% GXB 含药血清	0.178 ± 0.032 **
15% GXB 含药血清	0.246 ± 0.008
缬沙坦含药血清	0.222 ± 0.016 **

与空白对照组比较：## $P<0.01$

与 AngⅡ组比较：** $P<0.01$

3.2　瓜蒌薤白半夏汤对整合素 β1 mRNA 表达的影响

与空白对照组比较，AngⅡ可明显诱导 SD 新生大鼠心肌成纤维细胞整合素 β1 mRNA 表达（$P<0.01$）；5%、10%、15% GXB 含药血清均能显著降低整合素 β1 mRNA 表达（$P<0.01$）；缬沙坦含药

血清组整合素 β1 mRNA 表达也明显降低（$P<0.01$）。结果见表 2。

表 2 瓜蒌薤白半夏汤对 SD 新生大鼠心肌成纤维细胞整合素 β1 mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组 别	整合素 β1 mRNA 表达
空白对照	0.036 7 ± 0.002 1
AngⅡ	0.044 7 ± 0.001 8 ##
5% GXB 含药血清	0.040 0 ± 0.003 9 **
10% GXB 含药血清	0.036 7 ± 0.003 0 **
15% GXB 含药血清	0.039 1 ± 0.001 4 **
缬沙坦含药血清	0.035 4 ± 0.002 1 **

与空白对照组比较：## $P<0.01$

与 AngⅡ组比较：** $P<0.01$

3.3 瓜蒌薤白半夏汤对纤维连接蛋白的影响

与空白对照组比较，AngⅡ组细胞培养上清液中纤维连接蛋白的量增多（$P<0.05$）；与 AngⅡ组相比，10% GXB 含药血清组纤维连接蛋白的量明显降低（$P<0.05$）；5%、15% GXB 含药血清组纤维连接蛋白的量虽有降低，但无统计学意义；缬沙坦含药血清组纤维连接蛋白的量明显降低（$P<0.01$）。结果见表 3。

表 3 瓜蒌薤白半夏汤对纤维连接蛋白的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组 别	A 值
空白对照	783.333 ± 12.423
AngⅡ	866.000 ± 36.056 #
5% GXB 含药血清	795.333 ± 52.634
10% GXB 含药血清	790.000 ± 73.912 *
15% GXB 含药血清	794.333 ± 62.043
缬沙坦含药血清	753.000 ± 10.536 **

与空白对照组比较：# $P<0.05$

与 AngⅡ组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$

4 讨论

心肌纤维化是心肌成纤维细胞的过度增殖、心肌细胞外基质中胶原纤维的过量聚集、胶原过度增多或胶原成分发生改变、胶原合成代谢和降解代谢失衡，从而导致心肌胶原网络重构的结果。在纤维化形成过程中，细胞外基质中的纤维连接蛋白、整合素 β1 的表达均明显上调，而整合素 β1 介导的信号通路与器官纤维化的发生、发展有密切关系[4]。

整合素家族是细胞膜上一类跨膜糖蛋白，是细胞外基质蛋白的受体，与组织修复和纤维化形成关系十分密切。整合素是由 α 和 β 链组成的异二聚体，每个亚基都具有一个较长的胞外域、一个跨膜域和一个较短的胞内域。α-亚单位与整合素活性的调节有关，含 β1 亚单位的整合素主要介导细胞与细胞外基质成分之间的黏附作用。α、β 亚基的胞外域是其与相应配体结合的部位，大部分整合素胞外域可以识别配体分子中的特定序列，如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列（RGD），而大多数细胞外基质蛋白都含有 RGD 顺序；整合素的跨膜域相对保守，可与许多细胞因子及其他可溶性调节因子共同作用而调节整合素的功能；整合素的胞内域可与 α-辅肌动蛋白、纽蛋白、踝蛋白、张力蛋白等细胞骨架蛋白连接，通过这些骨架蛋白最终连接到肌动蛋白上，引起细胞的形态变化，也可直接或间接与纤维连接蛋白结合而激活胞内酶链系统，介导信号转导[4-7]。因此，细胞外基质成分的改变与整合素 β1 介导信号在细胞骨架与基质之间进行传递有密切关系。

纤维连接蛋白是一种糖蛋白细胞外基质，含有 RGD 顺序，是膜受体整合素的主要配体，有两种存在形式，一种是可溶性的，主要存在于各种体液中，另一种是不溶性的，主要存在于细胞外基质和细胞中。体内许多细胞可合成、分泌纤维连接蛋白，而成纤维细胞是纤维连接蛋白的重要合成细胞。纤维连接蛋白在组织损伤的修复、细胞的增殖和分化等方面均起作用，对维持成纤维细胞的形态、排列、运动和分裂等也有重要影响，纤维连接蛋白对细胞的诸多作用均与细胞表面的纤维连接蛋白受体（整合素）结合产生的一系列生物化学反应密切相关[8]。多项研究表明纤维连接蛋白与心肌纤维化的形成有密切关系[9-12]。

本实验结果显示，与空白对照组比较，AngⅡ组构建的心肌纤维化病理模型整合素 β1 mRNA 表达水平及纤维连接蛋白的量均明显上调，提示整合素信号转导通路呈激活状态；与 AngⅡ组比较，经 GXB 5%、10%、15%含药血清干预后，均能显著降低整合素 β1 mRNA 的表达，抑制整合素 β1 的合成、聚集。跨膜分子整合素 β1 的 mRNA 的表达减少，说明 GXB 可以直接抑制 AngⅡ对整合素 β1 的促表达作用，进而抑制整合素 β1 与纤维蛋白结合而激活胞内酶链系统，抑制黏着斑的形成，阻断胞外信号通过整合素 β1 介导的信号转导，使与

心肌纤维化形成相关的心肌成纤维细胞增殖和心肌细胞外基质中胶原及其他成分的合成的信号转导被阻断，拮抗心肌纤维化的形成。研究还发现 10% GXB 含药血清可显著抑制纤维连接蛋白的合成，表明整合素 β1 信号通路在 AngⅡ诱发的化学信号的刺激下呈激活状态，推测在 AngⅡ的刺激下细胞外基质中纤维连接蛋白过度沉积等诱发的心肌纤维化，可能部分是通过激活整合素 β1 信号转导通路介导的。

总之，调节影响心肌纤维化的调控因子 AngⅡ及激活的纤维连接蛋白/整合素 β1，进一步抑制该通路活化后介导的心肌纤维化病理反应，可能是 GXB 逆转心肌纤维化的作用机制之一，但由于心肌纤维化的调控机制复杂，确切机制还有待深入研究。

参考文献

[1] 郭志坤．现代心脏组织学[M]．北京：人民卫生出版社，2007：183-200．

[2] 顾伟梁，陈长勋，王　樱，等．玄参水提取物对心室重构大鼠心肌纤维化的影响[J].中草药，2008,39（9）：1371-1374．

[3] Hao G H，Niu X L,Gao D F，*et al*． Agonists at PPAR-gamma suppress angiotensin Ⅱ-induced production of plasminogen activator inhibitor-1 and extracellular matrix in rat cardiac fibroblasts[J].Br J Pharmacol，2008，153（7）：1409-1419．

[4] 李晋辉，母得志．整合素及其信号转导通路[J].医学分子生物学杂志，2007，4（3）：279-282．

[5] 刘成海，宣红萍，陶艳艳．基于 FN/整合素信号途径探讨扶正化瘀方抑制肝星状细胞（HSC）活化的作用机制[J]．上海中医药杂志，2008，42（1）：3-7．

[6] Staunton D E，Lupher M L，Liddington R，*et al*．Targeting intehrin structure and function in disease [J]．Adv Immunol，2006，91：111-157．

[7] Humphries J D，Byron A，Humphries M J．Integrin ligands at a glance [J]．J Cell Sci，2006，119（19）：3901-3903．

[8] Blystone S D．Integrating an integrin：a direct route to actin [J]．Bionchim Biophys Acta，2004，1692（2/3）：47-54．

[9] 李　才．器官纤维化基础与临床[M]．北京：人民卫生出版社，2003：16-25．

[10] 郭　敏，郎明健，曾秋堂．RNA 干扰选择性下调心肌成纤维细胞结缔组织生长因子[J]．中华高血压杂志，2008，16（2）：154-159．

[11] 吴　辉，唐其柱，沈涤非．纤维连接蛋白及其受体在免疫性心肌炎小鼠心肌的表达[J]．心脏杂志，2007，19（6）：626-630．

[12] Garzoni L R，Adesse D，Soares M J，*et al*．Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system [J]．J Infect Dis，2008，197（6）：906-915．

（收稿日期　2010-05-17）

郑 重 声 明

天津中草药杂志社（出版《中草药》、***Chinese Herbal Medicines*（CHM）**、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊）未与任何单位或个人签署版面合作及论文代理发表协议，凡是以天津中草药杂志社及其所属期刊的名义进行的版面合作及论文代理发表等非法活动，均严重侵害了天津中草药杂志社的合法权益，天津中草药杂志社将保留对其采取法律行动的权利，特此郑重声明。

希望广大作者、读者认准天津中草药杂志社门户网站“www.中草药杂志社.中国或 www.tiprpress.com”，切勿上当受骗；若发现假冒天津中草药杂志社及所属期刊的情况，请检举揭发。**电话：**022-27474913　**E-mail:** zcy@tiprpress.com

天津中草药杂志社