

当归提取物对大鼠左心室肥厚的保护作用

邓江¹, 邓雪松^{1,2}, 罗洁³, 吴芹¹, 黄燮南¹

1. 遵义医学院 药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州 遵义 563000

2. 遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563000

3. 遵义医学院 生物化学教研室, 贵州 遵义 563000

摘要: **目的** 观察当归提取物对腹主动脉缩窄所致大鼠左心室肥厚的保护作用, 并探讨其可能的作用机制。**方法** 将雄性SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 当归提取物低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组及L-精氨酸(200 mg/kg)阳性对照组。除假手术组外, 其他组大鼠采用腹主动脉缩窄法制备大鼠左心室肥厚模型, 术后次日给药, 每天给药1次, 连续给药21 d。观察各组大鼠心肌肥厚参数及血流动力学指标改变; 测定左心室心肌纤维直径(MD); 电镜观察心肌组织超微结构改变; 实时荧光定量PCR法检测心房利钠因子(ANF)及钙调神经磷酸酶(CaN)mRNA的表达; Western blotting检测左心室心肌钙调神经磷酸酶 α -亚基(CnA)蛋白的表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠左心室肥厚指数(LVHI)、左心室质量/右心室质量(LVW/RVW)及MD均显著提高, ANF、CaN mRNA及CnA蛋白表达明显上调; 当归提取物可使LVHI显著降低, LVW/RVW趋于降低或明显降低, 舒缩功能指标改善, 并使ANF、CaN mRNA及CnA蛋白表达下调。**结论** 当归提取物对腹主动脉缩窄所致大鼠左心室肥厚具有保护作用, 其机制可能与抑制CaN信号转导通路有关。

关键词: 当归提取物; 左心室肥厚; 心房利钠因子; 钙调神经磷酸酶; 钙调神经磷酸酶 α -亚基

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)06-0721-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.017

Protection of *Angelica sinensis* extract against left ventricular hypertrophy of rats

DENG Jiang¹, DENG Xue-song^{1,2}, LUO Jie³, WU Qin¹, HUANG Xie-nan¹

1. Department of Pharmacology/Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China

2. School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China

3. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China

Abstract: Objective To investigate the protection of *Angelica sinensis* extract on the left ventricular hypertrophy (LVH) of rats and explore the possible mechanisms. **Methods** Male SD rats were randomly divided into Sham, model, and low-, mid-, and high-dose *A. sinensis* extract (25, 50, and 100 mg/kg), and L-arginine (200 mg/kg) positive control groups. Except for Sham group, the rats with LVH were induced by abdominal aorta coarctation and were administered from the next day after surgery once daily for consecutive 21 d. Changes of cardiac hypertrophy parameters and hemodynamic indexes of rats were observed. Left ventricular myocardial fiber diameter (MD) was determined. Electron microscopy was used to observe the ultrastructure of myocardial tissue. RT-PCR was used to determine the mRNA expression of atrial natriuretic factor (ANF) and calcineurin phosphatase (CaN). Western blotting was used to determine the expression of α -subunit of calcineurin phosphatase (CnA). **Results** Compared with Sham group, the left ventricular hypertrophy index (LVHI), the left ventricular weight/right ventricular weight (LVW/RVW), and MD were remarkably increased, the expression of ANF, CaN mRNA, and CnA protein was obviously elevated. *A. sinensis* extract could remarkably decrease LVHI, tend to or significantly decrease LVW/RVW, improve the indicators of systolic and diastolic function, and down-regulate the expression of ANF, CaN mRNA and CnA protein. **Conclusion** *A. sinensis* extract has the protection against LVH induced by abdominal aorta coarctation in rats, and the mechanism may be related to its inhibitory effects on CaN signaling pathway.

Key words: *Angelica sinensis* extract; left ventricular hypertrophy; atrial natriuretic factor; calcineurin phosphatase; α subunit of calcineurin phosphatase

收稿日期: 2012-05-03

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究专项(D-273)

作者简介: 邓江, 女, 副教授, 研究方向为心血管药理学。Tel: (0852)8609623 Fax: (0852)8609033 E-mail: dengjiang1225@yahoo.com.cn

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的根, 为我国传统中药, 味辛、甘, 归肝、心、脾经, 有补血活血、养血滋补及活血化瘀等功效^[1-2]。当归具有增加心脏血液供应、降低心肌耗氧量、保护心肌细胞, 降低血管阻力、增加器官血流量, 抗心律失常, 抗实验性动脉粥样硬化、心肌梗死, 抗心肌氧化损伤, 抗脂质过氧化等药理活性; 还可促进一氧化氮 (nitric oxide, NO) 合成, 抑制血管平滑肌增殖, 降低细胞内钙, 改善心肌梗死后的心室重构^[3-8]。本研究采用缩窄腹主动脉致大鼠左心室肥厚模型, 探讨当归提取物抗心肌肥厚的作用, 并初步探讨其与钙调神经磷酸酶 (calcineurin phosphatase, CaN) 信号通路的关系。

1 材料

1.1 药品与试剂

当归醇提取物 (藁苯内酯质量分数 1%), 陕西瑞康生物工程有限公司, 批号 090618, 临用前以蒸馏水配成所需浓度。HE 染液, 北京中杉生物技术有限公司; β -肌动蛋白 (β -actin)、心房利钠因子 (atrial natriuretic factor, ANF)、钙调神经磷酸酶 (calcineurin phosphatase, CaN) 引物均由大连宝生物 (TaKaRa) 工程有限公司提供; 钙调神经磷酸酶单克隆抗体 (α -subunit of calcineurin phosphatase, CnA), 美国 Sigma-Aldrich 公司; β -actin 抗体、羊抗小鼠 IgG, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; T-PERTM 蛋白提取混合液, 美国 Pierce Chemical 公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 上海捷瑞工程有限公司; Syngene 凝胶成像系统, 英国 Syngene 公司。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠, 2~3 月龄, 清洁级, 体质量 200~240 g, 由重庆第三军医大学野战外科研究所动物室提供, 合格证号: SCXK (渝) 2007-0005。

1.3 仪器

Power lab/30series 型八导生理记录仪, 澳大利亚 Adinstruments 公司; DM4000B 型 Leica 图像分析系统, 德国莱卡公司; H-600 型日立透射电镜, 日本日立公司; TU-1810 型紫外分光光度计, 北京普析通用有限公司; BeckMAN coulTER 离心机, 美国贝克曼公司; Eppend of Mastercycler Gradient PCR 仪、Centrifuge 5415D 及 5417R 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; Icyler IQ 实时荧光定量 PCR 仪、BIO-RAD 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; Syngene 凝胶成像分析仪, 英国 Syngene 公司。

2 方法

2.1 模型制备

大鼠称体质量后以戊巴比妥钠 (40 mg/kg) ip 麻醉, 按照 Anversa 等^[9]报道的方法制备高血压心肌肥厚模型, 即在双肾动脉上方分离腹主动脉, 将去尖的 7 号针头连同腹主动脉一并结扎, 然后立即抽出针头, 即造成腹主动脉的部分缩窄, 再将内脏复位后关闭腹腔, 每只大鼠给予 12 万 U 青霉素预防感染, 清醒后置笼中喂养, 术后所有动物饮用自来水。

2.2 分组与给药

大鼠 60 只随机分为 6 组 (每组 10 只): 假手术组 (大鼠分离腹主动脉, 只穿线不结扎), 模型组, 当归提取物 25、50、100 mg/kg 给药组, L-精氨酸 (200 mg/kg) 阳性对照组。各给药组均于术后次日按 5 mL/kg ig 给药, 每天给药 1 次, 连续给药 3 周, 假手术组和模型组给予同体积蒸馏水。

2.3 血流动力学指标检测

末次给药后, 大鼠 ip 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 仰卧固定, 经颈总动脉插管至左心室, 连接于八导生理记录仪, 记录左心室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张末期压 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室最大收缩/舒张速率 ($\pm dp/dt_{max}$)。

2.4 心肌肥厚指标及左室心肌纤维直径测定

血流动力学指标检测结束后, 处死大鼠, 迅速开胸取心脏, 去除心房、大血管和心包组织, 用预冷的生理盐水冲洗干净, 清洁滤纸吸干水分, 称取左心室 (含室间隔) 湿质量 (left ventricular weight, LVW) 和右心室湿质量 (right ventricular weight, RVW), 计算左心室肥厚 (left ventricular hypertrophy index, LVHI) 指数^[7] ($LVHI = LVW / \text{体质量}$)、 LVW / RVW 。在左心室壁长轴中点处垂直方向切取心肌组织, 用 10% 多聚甲醛固定, 石蜡切片, 厚度为 5 μm , HE 染色, 用 Leica 图像分析系统观察 ($\times 400$) 切片, 每张切片随机取 5 个视野, 测 30 个心肌纤维直径 (myocardial fiber diameter, MD), 取平均值, 观察心肌肥厚的程度。

2.5 电镜观察心肌组织超微结构病理改变

左心室称质量后用预冷的 PBS 漂洗, 置于干净蜡板上, 滴加预冷的电镜固定液, 快速取约 1 mm³ 组织块于电镜液中固定, 样本送第三军医大学电镜室进行标本制作, 即行常规电镜包埋, 电镜 ($\times 12\ 000$)

观察标本细胞核、闰盘、肌浆网、线粒体及内质网等超微结构的变化。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测左心室心肌 ANF 及 CaN mRNA 表达

按试剂盒说明进行样品总 RNA 的提取与纯化,以 PCR 仪逆转录后,RT-PCR 仪进行扩增。ANF 引物:正向 5'-TGACAGGATTGGAGCCCAGAG-3',反向 5'-TCGAGCAGATTTGGCTGTTATCTTC-3',扩增产物长度 75 bp;CaN 引物:正向 5'-CTGAGATGCTGGTAAACGTCCTGA-3',反向 5'-TGCTCGGATCTTGTTCTCTGATG-3',扩增产物长度 122 bp; β -actin 引物:正向 5'-TGACAGGATGCAGAAGGA-3',反向 5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3',扩增产物长度 104 bp。反应条件:95 ℃,10 min 进入循环;95 ℃、15 s,60 ℃、1 min,循环 45 次。以 β -actin 为内参,用相对定量法计算 ANF 和 CaN mRNA 的表达水平。以循环阈值(Ct 值)为统计参数,用目的基因表达/ β -actin 基因表达对 ANF 和 CaN mRNA 进行相对定量。

2.7 Western blotting 检测心肌 CnA 蛋白表达

心肌组织经 T-PERTM 蛋白提取混合液处理后,

以 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白的量。以 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电压 36 V,3 h 电转。一抗为 CnA(1:1 000)及内参 anti- β -actin(1:2 000),孵育 2 h;二抗为羊抗小鼠 IgG,孵育 1 h 后通过 BCIP/NBT 进行显色,采用 Syngene 凝胶成像系统分析。

2.8 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对左心室肥厚大鼠左心室心功能的影响

与假手术组相比,模型组大鼠收缩压(SP)、LVSP 均显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,当归提取物高、中剂量组大鼠 SP 下降($P < 0.05$ 、0.01)。模型组大鼠 LVEDP 明显高于假手术组($P < 0.01$);与模型组相比,当归提取物高、中剂量组及 L-精氨酸组大鼠 LVEDP 不同程度地降低($P < 0.05$ 、0.01)。与假手术组相比,模型组大鼠 $\pm dp/dt_{\max}$ 减低($P < 0.01$);当归提取物高、中剂量组及 L-精氨酸组大鼠 $\pm dp/dt_{\max}$ 得到明显改善($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 1。

表 1 当归提取物对左心室肥厚大鼠左心室心功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of *A. sinensis* extract on left ventricular functions of rats with LVH ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	SP / mmHg	LVSP / mmHg	LVEDP / mmHg	+dp/dt _{max} / (mmHg·s ⁻¹)	-dp/dt _{max} / (mmHg·s ⁻¹)
假手术	—	123.0 ± 11.8	130.0 ± 11.3	8.5 ± 5.4	3 670.0 ± 426.7	-3 380.0 ± 423.0
模型	—	165.0 ± 8.2 ^{▲▲}	169.0 ± 7.1 ^{▲▲}	29.7 ± 13.9 ^{▲▲}	2 239.0 ± 639.3 ^{▲▲}	-2 095.0 ± 540.5 ^{▲▲}
当归提取物	25	162.0 ± 7.9	167.0 ± 6.9	20.7 ± 7.6	2 252.0 ± 266.3	-2 158.0 ± 264.3
	50	154.0 ± 6.3 [*]	163.0 ± 8.0	14.8 ± 3.6 [*]	3 173.0 ± 726.7 [*]	-3 111.0 ± 659.1 ^{**}
	100	154.0 ± 6.0 ^{**}	163.0 ± 7.7	7.2 ± 3.4 ^{**}	3 860.0 ± 912.6 ^{**}	-3 661.0 ± 720.9 ^{**}
L-精氨酸	200	169.0 ± 8.8	174.0 ± 9.5	8.7 ± 5.0 ^{**}	3 536.0 ± 624.9 [*]	-3 419.0 ± 433.6 ^{**}

与假手术组比较:▲▲ $P < 0.01$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$,下同

▲▲ $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

3.2 对左心室肥厚大鼠心肌肥厚指标及心肌组织形态学改变的影响

与假手术组相比,模型组大鼠 LVHI、LVW/RVW 及 MD 均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,当归提取物各剂量组及 L-精氨酸组 LVHI 显著降低($P < 0.01$);LVW/RVW 及 MD 均显著降低($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 2。光学显微镜观察可见,假手术组大鼠心肌纤维排列整齐,心肌细胞核呈圆形或卵圆形,居细胞中央,心肌间质无明显增生,微血管

结构正常,无扩张及血管壁增厚等表现;模型组出现心肌纤维增粗、紊乱、断裂,核增大,形态不规则,间质增生等改变;当归提取物高剂量组大鼠心肌细胞结构较为清晰,心肌纤维的走行较整齐,心肌间质水肿明显减轻,但心肌纤维间隙仍增宽。结果见图 1。

3.3 对左心室肥厚大鼠左心室心肌超微结构的影响

假手术组大鼠心肌肌丝排列整齐,肌节各带结构清晰,肌丝间线粒体丰富且线粒体嵴密集,基质

表2 当归提取物对左心室肥厚大鼠左心室心肌肥厚指数及心肌纤维直径的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Effect of *A. sinensis* extract on LVHI and MD in rats with LVH ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	LVHI / (mg·g ⁻¹)	LVW/RVW	MD / μ m
假手术	—	1.80±0.13	4.00±0.46	40.28±3.02
模型	—	3.10±0.41 ^{▲▲}	5.30±0.53 ^{▲▲}	55.26±3.35 ^{▲▲}
当归提取物	25	2.50±0.16 ^{**}	4.80±0.54	52.43±3.21
	50	2.30±0.16 ^{**}	4.60±0.43 [*]	46.56±3.03 ^{**}
	100	2.20±0.14 ^{**}	4.30±0.24 ^{**}	45.45±2.98 ^{**}
L-精氨酸	200	2.10±0.16 ^{**}	4.30±0.70 ^{**}	43.52±3.21 ^{**}

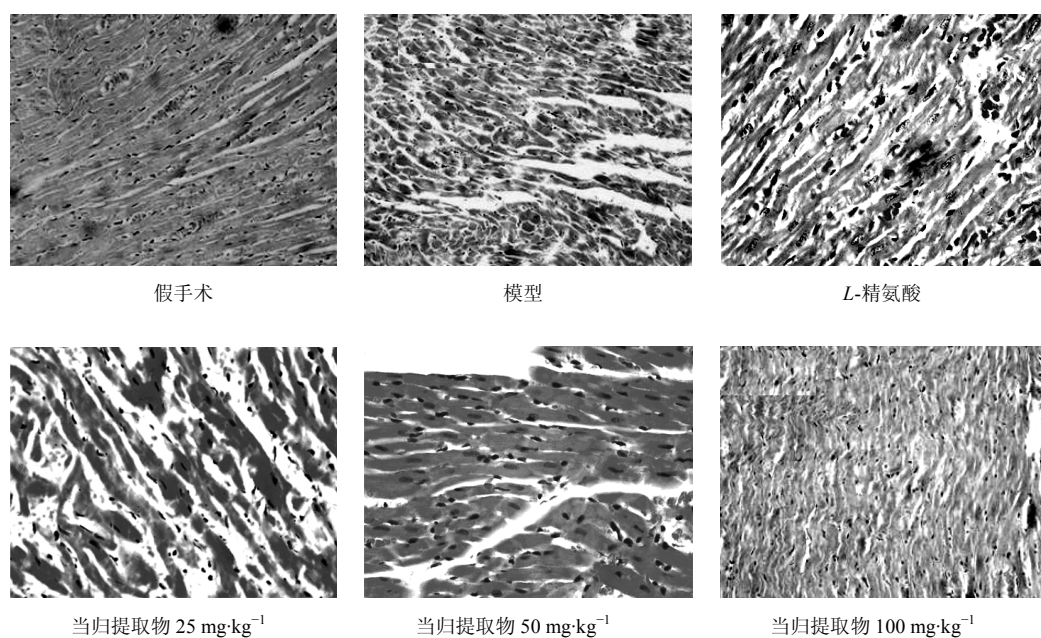


图1 当归提取物对左心室肥厚大鼠左心室心肌组织形态学的影响

Fig. 1 Effect of *A. sinensis* extract on left ventricular myocardial histopathology in rats with LVH

密度适中,肌质网发育正常;细胞核呈卵圆形,边缘光滑,核仁明显,闰盘连接结构清晰。模型组大鼠心肌间质纤维化,胶原增多变粗、迂曲、紊乱,肌节结构模糊,闰盘不连续、模糊,线粒体嵴溶解,基质密度降低,细胞核大,核形不规则,核膜凹凸明显,呈锯齿状,从某些切迹上可见分叶核,并含有多个核仁。当归提取物高剂量组大鼠心肌细胞肌丝排列整齐,细胞核呈卵圆形,边缘光滑,膜结构发育良好,线粒体增生,平行排列,血管内皮稍增厚,管腔略显狭窄。结果见图2。

3.4 对左心室肥厚大鼠左心室心肌 ANF 和 CaN mRNA 表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠心肌 ANF mRNA 表达增加约 10 倍, CaN mRNA 表达增加 5 倍多。与模型组相比,当归提取物低剂量组使增高的

ANF、CaN mRNA 表达趋于下降,但无显著差异;当归提取物中、高剂量则使 ANF、CaN mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$),呈量效关系。结果见图3。

3.5 对左心室肥厚大鼠左心室心肌 CnA 蛋白表达的影响

当归提取物对 CnA 蛋白表达与其对 CaN mRNA 表达的影响一致,即模型组 CnA 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$),而当归提取物给药 21 d 后 CnA 蛋白表达显著下降 ($P<0.01$) (图4)。

4 讨论

心肌肥厚是临床上高血压、瓣膜病、急性心肌梗死和先天性心脏病等许多心血管疾病共有的病理过程,是心肌长期负荷过度引起的一种适应性病理改变。虽然初期心肌肥厚是一种有益的代偿反应,以求平衡心肌应激的增加,但长期应激所致的持续

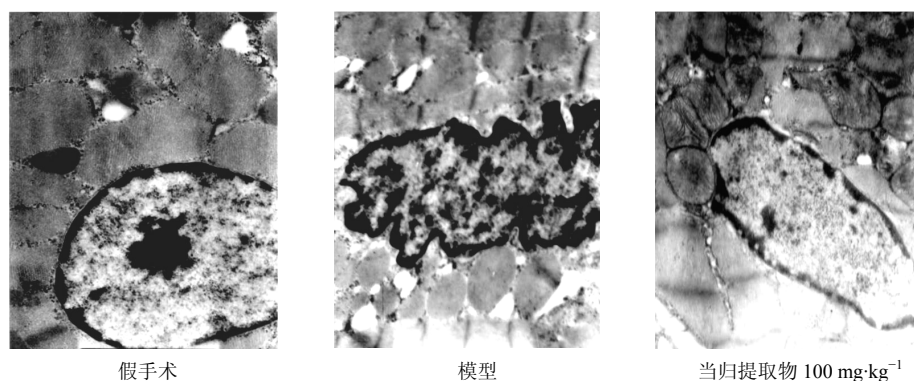


图2 当归提取物对左室肥厚大鼠心肌超微结构的影响

Fig. 2 Effect of *A. sinensis* extract on myocardial ultrastructural in rats with LVH

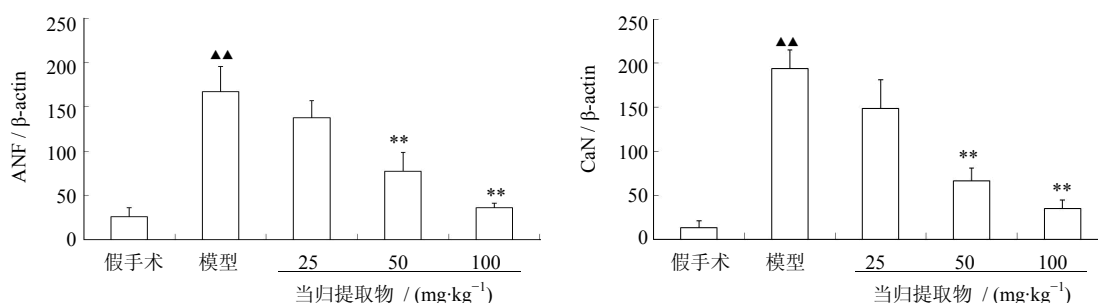


图3 当归提取物对左室肥厚大鼠左室心肌 ANF 与 CaN mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effect of *A. sinensis* extract on mRNA expression of left ventricular myocardial ANF and CaN in rats with LVH ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

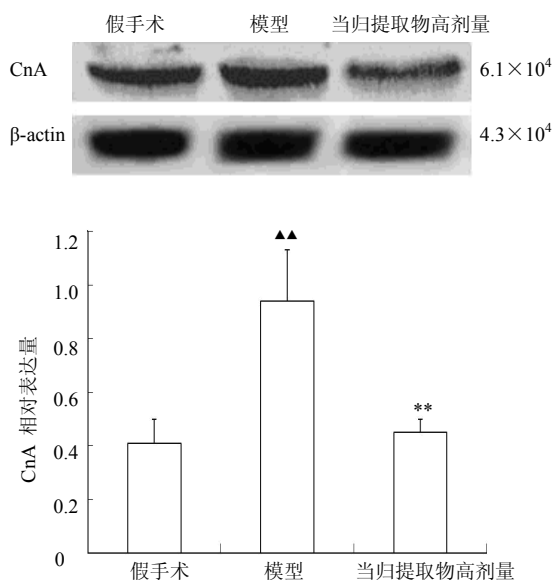


图4 当归提取物对左室肥厚大鼠心肌 CnA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of *A. sinensis* extract on expression of myocardial CnA protein in rats with LVH ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

性心肌肥厚最终可导致扩张性心脏病、心衰和猝死。有学者认为,左室肥厚的消退是高血压治疗的关键目标^[10]。本实验采用缩窄腹主动脉导致左室压力超负荷进而诱发左室肥厚,与临床上高血压所致左室肥厚较为接近。当归提取物给药组大鼠心肌肥厚参数比模型组均明显降低,虽然左室肥厚指数的降低可能受体质量变化的非特异性因素干扰,但并不受体质量影响的LVW/RVW也不同程度的下降,提示当归提取物具有阻止腹主动脉缩窄术引起的心肌肥厚形成和发展的作用。作为胎心基因的ANF mRNA已被用作衡量心肌肥厚的指标^[11]。本实验结果表明,当归提取物可显著抑制腹主动脉缩窄术所致ANF mRNA表达升高,进一步说明当归提取物具有抗心肌肥厚作用。与模型组相比,当归提取物3个剂量组大鼠的LVEDP不同程度地下降,±dp/dt_{max}明显增高,这可能是当归提取物通过改善由左室压力超负荷所致的心肌重构,从而改善左室的舒张功能,增强其收缩功能的结果,这为当归提取物抗心肌肥厚作用提供了佐证。

心肌肥厚的形成是一个复杂的病理过程,血流动力学、神经-体液及内分泌等因素参与其中,这些因素通过若干信号通路将信息传至细胞核进而引起心肌肥厚。CaN 是一种受钙调素调节的多功能信号酶,广泛存在于多种组织中,是 Ca^{2+} 信号转导系统介导的多种生物学功能的重要环节。CaN 信号通路介导多种因素诱导的心肌细胞肥大^[12-13]。当归具有降低细胞内钙的作用^[6]。在本实验中,通过检测 CaN mRNA 及 CnA 蛋白的表达,探讨当归提取物抗心肌肥厚涉及的有关信号传导通路,结果显示,当归提取物剂量为 50、100 mg/kg 时表现出不同程度的抗心肌肥厚和抑制 CaN mRNA 表达的作用,剂量为 100 mg/kg 时明显抑制 CnA 蛋白表达。由此推断当归提取物抗心肌肥厚效应可能与其抑制钙调神经磷酸酶信号传导通路有关。

参考文献

- [1] 王本祥. 现代中药药理与临床 [M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 2004.
- [2] 邓永健, 郭志伟, 王 萌. 当归的化学成份及其药理作用研究进展 [J]. 新疆中医药, 2006, 24(5): 109-110.
- [3] 马燕花, 李应东, 赵健雄, 等. 当归红芪超滤物对氧化损伤乳鼠心肌细胞的保护作用及其机制 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 602-607.
- [4] 巫少荣. 当归在心血管系统的作用 [J]. 中医药研究, 2001, 17(3): 56-58.
- [5] 李 琦. 当归对高脂喂养兔内皮素和一氧化氮的影响 [J]. 武汉工业学院学报, 2003, 22(3): 123-125.
- [6] 寇俊萍. 当归芍药散对脑缺血再灌注所致记忆损伤模型小鼠的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2001, 18(5): 343-345.
- [7] 卢彦珍. 当归对大鼠心肌梗死后早期左室重构的实验研究 [J]. 长治医学院学报, 2005, 19(3): 164-168.
- [8] 韦 玮, 龚苏晓, 张铁军, 等. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130-134.
- [9] Anversa P, Hagopian M, Loud A V. Quantitative radioautographic localization of protein synthesis in experimental cardiac hypertrophy [J]. *Lab Invest*, 1973, 29(3): 282-292.
- [10] Zhang R, Crump J, Reisin E. Regression of left ventricular hypertrophy is a key goal of hypertension management [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2003, 5(4): 301-308.
- [11] Thomas C J, Head G A, Woods R L. Age-associated increase in rat ventricular ANP gene expression correlates with cardiac hypertrophy [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(3Pt 2): H1003-H1008.
- [12] Obata K, Nagata K, Iwase M, *et al.* Overexpression of calmodulin induces cardiac hypertrophy by a calcineurin dependent pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(2): 1299-1305.
- [13] 王曙霞. 心肌肥厚信号传导通路的研究进展 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2006, 6(6): 363-368.