

姜黄素对心力衰竭大鼠心脏 AT₁ 受体表达的影响

徐建辉, 杨波

武汉大学人民医院心血管内科(湖北 武汉 430061)

摘要:目的 研究姜黄素对大鼠慢性心力衰竭心脏血管紧张素 I 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT₁R)的表达作用。**方法** 结扎大鼠左冠状动脉前降支制备心肌梗死后心衰模型, 32 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组, 假手术姜黄素处理组, 心衰对照组及心衰姜黄素处理组。超声心动图检测各组大鼠心功能, 放射免疫法测定血浆肾素(plasma renin activity, PRA)及血管紧张素 II(angiotension II, Ang II)水平, qRT-PCR 检测各组大鼠心脏 AT₁ 受体的 mRNA 表达, Western 印迹法测定各组大鼠心脏 AT₁ 受体的蛋白表达。**结果** 与假手术组相比, 心衰对照组左心室射血分数显著降低($P<0.05$), 而血浆 PRA 及 Ang II 水平升高($P<0.05$), 同时心脏 AT₁ 受体 mRNA 及蛋白的表达水平也显著上调($P<0.05$)。给予姜黄素处理 4 周后, 可明显改善心衰大鼠上述指标的异常($P<0.05$)。而姜黄素对假手术组无相应作用。**结论** 姜黄素通过降低心衰大鼠心脏 AT₁ 受体的表达, 改善慢性心衰大鼠心功能。

关键词: 血管紧张素 I 型受体; 心力衰竭; 姜黄素; 心脏

Effect of curcumin on the AT₁ receptor expression in rat hearts with heart failure

XU Jian-hui, YANG Bo

Department of Cardiology, Peoples Hospital of Wuhan University, Wuhan 430061, Hubei, China

Abstract: objective To investigate the effect of curcumin on the angiotensin receptor type-1 in rat heart with heart failure.

Methods Models of chronic heart failure (CHF) established by left anterior descending coronary artery ligation. Thirty-two Wistar rats were randomly divided into four groups: sham operation group, sham operation with curcumin (2.0 mmol/L in drinking water) treatment group, CHF model group, CHF model with curcumin (2.0 mmol/L in drinking water) treatment group. Cardiac function was examined by echocardiography after 4 weeks therapy. PRA and Ang II levels were tested by radioimmunity. The mRNA levels of AT₁ receptor were measured by qRT-PCR. In addition, the level of cardiac AT₁ receptor expression was detected by Western blotting. **Results** Compared with sham operation group, left ventricular ejection fraction (LVEF) was significantly decreased. The plasma levels of PRA and Ang II were markedly increased. Moreover, the AT₁ receptor mRNA and protein expressions were also higher in rat heart with heart failure. All of the above-mentioned abnormalities were reversed to some degree by curcumin treatment in rats with heart failure, but not sham operation group rats. **Conclusions** curcumin reduces expression of AT₁ receptor in heart and improves heart function in rats with heart failure.

Key words: Angiotensin II type 1 receptor; Heart failure; Curcumin; Heart

慢性心力衰竭是大多数心血管疾病到终末阶段的一种临床综合症, 也是其心脏病患者死亡的最主要原因之一。有研究显示, 65 岁以上人群心衰的患病率达 6% 以上, 因此, 针对心衰的防治就显得尤为重要^[1]。

在心衰的发生发展过程中, 肾素-血管紧张素-醛固酮(RAS)系统的过度激活是心室重构的重要因素之一, 其中, 血管紧张素 II(Ang II), 一个 RAS 系统中重要的效应因子, 通过作用于血管紧张素 I 型受体(AT₁R), 促进水钠潴留及炎症反应, 引起内环境的紊乱, 加剧了心衰的发生发展过程^[2, 3]。已有研究证实, 抑制 RAS 系统的过度激活, 如给予血管紧张素受体拮抗剂, 可以显著的减缓心衰的进展^[4]。姜黄素是从姜科植物根茎中提取的一种化学成分, 研究表明其具有较强的抗氧化, 抗炎等作用^[5]。研究显示, 姜黄素能有效抑制糖尿病大鼠肾脏 AT₁R 的过度激活^[6]。是否姜黄素能减缓心衰心室重构, 改善心脏 AT₁ 受体表达, 尚不清楚。本研究通过观察姜黄素处理心衰大鼠 4 周后, 心衰大鼠心功能情况, 同时进一步观察心脏 AT₁ 受体 mRNA 及蛋白的表达水平变化情况, 从而为通过姜黄素在心衰中的可能作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

姜黄素(Sigma 公司, 美国), RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 (TaKaRa 公司), 血管紧张素 II 放射免疫试剂盒(建成, 中国南京), 肾素检测试剂盒(建成, 中国南京), AT₁ 受体单克隆抗体及内参 GAPDH 抗体(Santa Cruz 公司, 美国)。

1.2 实验动物

作者简介: 徐建辉(1980-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心力衰竭防治方面的工作。通讯作者: 杨波, Email: yybb112@yahoo.com.cn

32 只 10 周龄，体质量 220~250 g，雄性 Wistar 大鼠，由武汉大学人民医院实验动物中心提供，动物生产许可证：SCXK(鄂) 2003-0003，使用许可证：SYXK(鄂) 2003-0003。大鼠置于清洁级条件下，给予标准饲料、自由进食及饮水，控制环境温度 22℃~24℃,湿度 52%~58%，在 12 h 明暗交替的环境下饲养。所有实验均符合实验动物伦理法案。

1.3 心肌梗死后心衰模型制作

将 30 只 Wistar 大鼠随机分为造模组和假手术组。以 2.5%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉，仰卧固定，行气管插管，连接小动物呼吸机，进行人工辅助呼吸，监测心电图。在胸骨左侧第 4 肋间开一横切口，打开胸腔，暴露心脏，在左心耳下方 2~3mm 结扎左冠状动脉前降支。结扎即刻心电图监护显示肢体导联 R 波振幅明显升高，随后 I、II 导联 ST 段弓背向上抬高，1 周后复查心电图示病理性 Q 波，证实心肌梗死模型制备成功，心肌梗死 4 周后超声心动图检测显示，左侧射血分数（left ventricular ejection fraction, LVEF） $\leq 45\%$ 为心力衰竭模型成功的标志。假手术组手术方法同上，仅在冠状动脉前降支只栓线，不结扎。

1.4 分组及给药

将心衰造模组与假手术组分为 4 组，分别为心衰对照组和假手术对照组，心衰（姜黄素）处理组及假手术（姜黄素）处理组。对照组给予正常饮水，处理组通过姜黄素溶在饮用水的方式，保持姜黄素浓度在 2.0 mmol/L，给大鼠自由饮用，喂养 4 周。

1.5 指标测定

1.5.1 超声心动图检测心功能

Wistar 大鼠给药前与给药 4 周后分别进行超声心动图检测。测量参数包括左心室舒张末内径（left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD），左心室收缩末内径（left ventricular end-systolic dimension, LVESD）和 LVEF，每项指标均测量三次，结果取平均值。

1.5.2 血浆 PRA 和 Ang II 的检测

采用 PRA 检测试剂盒和 Ang II 检测试剂盒分别测量各组大鼠血浆 PRA 和 Ang II 水平。

1.5.3 QRT-PCR 检测 AT₁ 受体 mRNA 水平

应用 Trizol 法提取非梗死区左心室组织总 RNA，测定 RNA 浓度，然后进行逆转录，RT-PCR 扩增。PCR 反应 AT₁ 受体引物序列，正义链：5'-CAAAAGGAGATGGGAGGTCA-3'；反义链：5'-TGACAAGCAGTTTGGCTTTG-3'。GAPDH 引物序列，正义链：5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3，反义链：5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。RT-PCR 检测反应系统依据 TaKaRa 公司 RNA PCR Kit（AMV）Ver3.0 说明步骤进行。反应体系 25 μ l，反应条件为：95℃ 变性 2 min；继之扩增 95℃ 20 s，58℃ 25 s，72℃ 30 s，40 个循环，最后 72℃ 延伸 7 min，GAPDH 作为内参，计算 AT₁ 受体相对表达量。

1.5.4 Western blot 检测 AT₁ 受体在肾脏的表达

按提取组织总蛋白的方法提取非梗死区左心室组织总蛋白，BSA 法测量蛋白浓度，20 μ L 蛋白进行 9% SDS-PAGE 电泳分离，然后电转至硝酸纤维素膜上，恒压 100V，1 h。用含 5%脱脂牛奶的 PBS 室温封闭 2 h。加入一抗稀释[AT₁ 抗体（1：500）] 4℃孵育过夜。TBST 洗涤 3 次，每次 5 min，加入 1：15000 稀释的二抗，室温孵育 1.5 h，TBST 洗涤 3 次，ECL 发光剂显影，Quantity One（1-D Analysis Software Version 4.4，Bio-Bad inc，U.S.A）软件对条带进行灰度分析，计算 AT₁/GAPDH 灰度比值。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用方差分析，组间采用 LSD 进行多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义

2 结果

2.1 各组大鼠超声心动图比较

如表 1 所示，通过超声心动图检测显示，心衰组大鼠 LVEF 较假手术对照组明显降低（ $P<0.05$ ），而 LVEDD 和 LVESD 则明显增加（ $P<0.05$ ）。给予姜黄素处理 4 周后，与心衰对照组相比，心衰姜黄素处理组 LVEF 明显升高，同时 LVEDD 和 LVESD 则显著降低（ $P<0.05$ ）。姜黄素对假手术组无明显作用（ $P>0.05$ ）。

表 1 各组大鼠超声心动图检测结果比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

| 组别 | n | LVEF（%） | LVDD（mm） | LVSD（mm） |
|----|---|---------|----------|----------|
|----|---|---------|----------|----------|

| | | | | |
|-----------|---|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 假手术对照组 | 8 | 72.4±2.5 | 6.10±0.45 | 3.43±0.43 |
| 假手术姜黄素处理组 | 8 | 73.2±4.2 | 5.93±0.32 | 3.56±0.36 |
| 心衰对照组 | 8 | 41.5±3.2* | 7.12±0.64* | 6.25±0.40* |
| 心衰姜黄素处理组 | 8 | 58.9±4.8 [#] | 6.33±0.54 [#] | 5.34±0.21 [#] |

注：与假手术对照组比较，*P<0.05，与心衰对照组比较，[#]P<0.05

2.2 各组大鼠血浆 PRA 和 Ang II 水平

与假手术对照组相比，心衰组大鼠血浆 PRA 和 Ang II 水平显著升高(P<0.05)，而给予姜黄素处理 4 周后，心衰姜黄素处理组血浆 PRA 和 Ang II 水平较心衰对照组显著降低(P<0.05)，姜黄素对假手术组无明显作用(P>0.05)，见表 2。

表 2 各组大鼠血浆 PRA 和 Ang II 水平比较（ $\bar{x} \pm s$ ）

| 组别 | n | PRA (μg/L) | Ang II (ng/L) |
|----------|---|-------------------------|-------------------------|
| 假手术对照组 | 8 | 4.23±0.85 | 110.3±12.3 |
| 假手术实验组 | 8 | 5.12±1.20 | 123.4±15.2 |
| 心衰对照组 | 8 | 16.30±2.21* | 283.4±20.1* |
| 心衰姜黄素处理组 | 8 | 10.21±1.21 [#] | 163.5±17.3 [#] |

注：与假手术对照组比较，*P<0.05，与心衰对照组比较，[#]P<0.05

2.3 各组大鼠非梗死区左心室 AT₁ 受体 mRNA 水平

与假手术对照组相比，心衰组大鼠 AT₁R mRNA 水平显著升高(P<0.05)，给予姜黄素处理 4 周后，心衰姜黄素组 AT₁R mRNA 水平较心衰对照组显著降低(P<0.05)，姜黄素对假手术组 AT₁ 受体 mRNA 表达水平无明显作用(P>0.05)，见图 1。

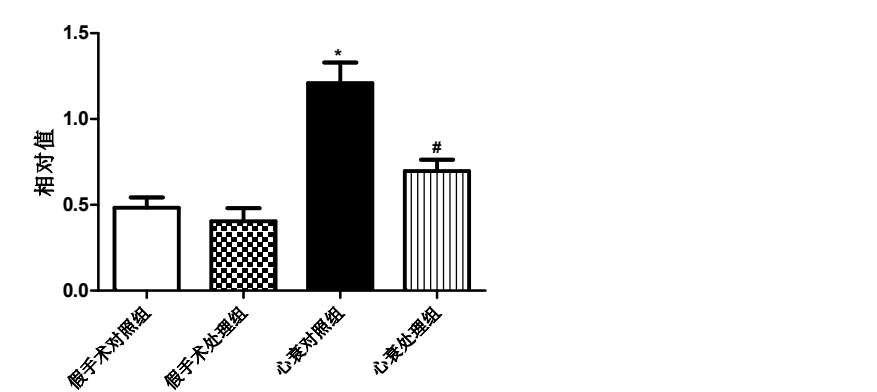
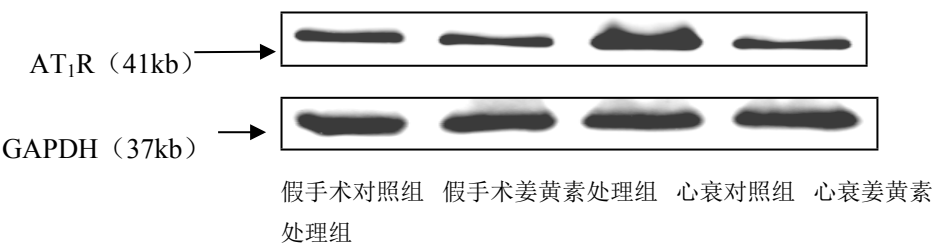


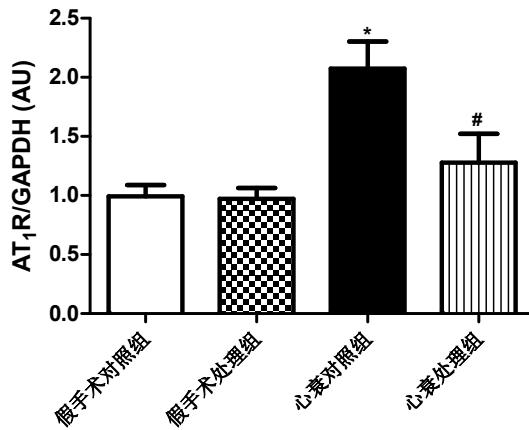
图 1 四组大鼠心脏非梗死区 AT₁ 受体 mRNA 相对表达量

注：与假手术对照组比较，*P<0.05，与心衰对照组比较，[#]P<0.05，n=8。

2.4 各组大鼠非梗死区左心室 AT₁ 受体蛋白表达水平

通过 Western blot 证实，心衰对照大鼠非梗死区组织 AT₁ 受体的表达显著较假手术对照组大鼠增强，给予姜黄素处理 4 周后，心衰大鼠非梗死区组织 AT₁ 受体蛋白表达水平较心衰对照大鼠显著降低(P<0.05)，姜黄素对假手术组大鼠无明显作用，见图 2。





注：与假手术对照组比较，* $P < 0.05$ ，与心衰对照组比较，# $P < 0.05$ ， $n = 8$ 。

图2 Western blot 法检测四组大鼠心脏非梗死区 AT₁ 受体的表达差异

3 讨论

研究证实 RAS 系统，尤其是心脏局部 RAS 系统的过度激活，在心衰的发生发展过程中，起着重要的作用^[2]。心脏局部 RAS 系统的激活可通过 Ang II 促进炎症反应，导致血管和心肌的增生肥厚，加剧其重构^[7]。因此，抑制其 RAS 系统的过度激活成为目前防治心衰的重要措施之一。

本实验采用大鼠左冠状动脉前降支结扎术，4 周之后，成功的复制了慢性心力衰竭动物模型。从 4 周后超声心动图，可以观察到，心衰大鼠心功能各项指标较假手术组明显变差。其中 LVEF $\leq 45\%$ ，是其心衰模型成功的标志。同时进一步检测了 RAS 重要组分，血浆中 PRA 及 Ang II 水平。研究结果显示，心衰大鼠血浆中 PRA 及 Ang II 水平明显升高，表明慢性心衰时，RAS 系统被过度的激活。Ang II 可通过作用于 AT₁ 受体促进外周血管的收缩，使组织器官灌流减少，加剧心肌及间质细胞代谢变化导致心室重构^[8]。同时，Ang II 作用于 AT₁ 受体还可促进炎症反应，进一步加剧心室肥厚及重构的发生发展。本实验结果也表明，心衰大鼠心肌非梗死 AT₁ 受体的表达水平显著上调，提示 AT₁R 在 Ang II 持续作用下存在正反馈调节。有研究证实，通过运用沙坦类药物拮抗 AT₁R，阻断 Ang II 的作用，可以显著的逆转心肌肥厚，改善心功能^[9]。姜黄素是从姜科植物根茎中提取的一种化学成分，研究表明其具有较强的抗氧化，抗炎等作用^[5]。同时有研究证实，姜黄素能有效抑制糖尿病大鼠肾脏 AT₁R 的过度激活。在本实验中，通过给予心衰大鼠姜黄素处理 4 周，可以发现心衰大鼠心功能得到明显改善，同时有效的抑制了心脏局部 RAS 的过度激活，即降低血浆中 PRA，Ang II 水平和心肌 AT₁ 受体的表达，同时姜黄素对假手术大鼠无明显作用。以上研究提示，RAS 系统的过度激活是导致心衰的发生发展的重要原因之一，给予姜黄素处理 4 周，可有效的抑制 RAS 系统的激活，改善心衰大鼠心功能。有研究证实，姜黄素还可通过抑制诱导型一氧化氮合酶及 NF- κ B 活性来减少心衰时体内的炎症因子，这可能有助于促进 Ca²⁺-ATP 酶的表达，从而引起肌浆网摄取的 Ca²⁺ 增加，减少细胞内 Ca²⁺ 超载，使心肌舒张和收缩功能恢复平衡，改善心衰的症状^[10]。这也可能是姜黄素改善心衰大鼠心功能的重要机制之一，但仍需要相关研究给予进一步证实。

目前，慢性心力衰竭的发生发展机制尚不完全清楚，但相关的研究已证实，RAS 系统的过度是促进心衰发展的重要原因之一。本实验通过给予姜黄素处理心衰大鼠的相关研究证实，姜黄素可以有效的抑制 RAS 系统的激活，降低心衰大鼠心脏 AT₁ 受体的表达，从而改善心功能。

参考文献:

- [1] Coles AH, Fisher KA, Darling C, et al. Recent trends in post-discharge mortality among patients with an initial acute myocardial infarction [J]. Am J Cardiol, 2012, 110(8):1073-1077.
- [2] Ram CV. Reappraisal of role of angiotensin receptor blockers in cardiovascular protection [J]. Vasc Health Risk Manag, 2011, 7:315-319.
- [3] Lu XM, Jin YN, Ma L, et al. Olmesartan medoxomil reverses glomerulosclerosis in renal tissue induced by myocardial infarction without changes in renal function [J]. Exp Ther Med, 2014, 8(1):105-109.
- [4] Vijayaraghavan K, Deedwania P. Renin-angiotensin-aldosterone blockade for cardiovascular disease prevention [J]. Cardiol Clin, 2011, 29(1):137-156.
- [5] Tapia E, Sánchez-Lozada LG, García-Niño WR, et al. Curcumin prevents maleate-induced nephrotoxicity: relation to hemodynamic alterations, oxidative stress, mitochondrial oxygen consumption and activity of respiratory complex I [J].

Free Radic Res, 2014, 14:1-36.

- [6] Morinelli TA, Lee MH, Kendall RT, et al. Angiotensin II activates NF- κ B through AT1A receptor recruitment of β -arrestin in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304(12):C1176-C1186.
- [7] Castro-Chaves P, Cerqueira R, Pintalhao M, et al. New pathways of the renin-angiotensin system: the role of ACE2 in cardiovascular pathophysiology and therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(5):485-496.
- [8] Lorenzo O, Ramírez E, Picatoste B, et al. Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013:461967.
- [9] Li M, Zheng C, Kawada T, et al. Adding the acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, to losartan treatment markedly improves long-term survival in rats with chronic heart failure [J]. Eur J Heart Fail, 2014, 16(10):1056-1065.
- [10] Abo-Salem OM, Harisa GI, Ali TM, et al. Curcumin ameliorates streptozotocin-induced heart injury in rats [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2014, 28(6):263-270.