

GHRPs 对 CHF 大鼠存活时间影响及心脏活性研究

李梅秀 李 娟 邢继强 陈乃峰 田国忠 曹济民 赵 勇 杨 微

摘 要 **目的** 研究 GHRPs 对 ADR 诱导的 CHF 大鼠存活时间影响,探索 GHRPs 的 CHF 直接治疗作用及其心脏保护性作用机制,为 CHF 生物学治疗提供新方法、新途径。**方法** 采用 ADR 经 ip 制作 CHF 大鼠模型,尾静脉注射法分别给 GHRPs 和复方丹参和生理盐水,观察 4 组 CHF 大鼠存活时间。**结果** ADR 大鼠 CHF 模型基本符合临床心肌病性 CHF 的病理生理过程;GHRPs 和复方丹参都能延长 CHF 大鼠存活时间,总计 GHRPs 比复方丹参组多存活 15 ~ 17 天。**结论** 复方丹参和 GHRPs 均能改善重症 CHF 大鼠恶液质状态,延长其存活时间,GHRPs 的心脏保护作用比复方丹参更强。

关键词 生长素释放肽 慢性心力衰竭 存活时间 心脏保护活性

Study on the Effect of GHRPs on Survival Time and Cardioprotective Function in Rats with CHF. Li Meixiu, Li Juan, Xing Jiqiang, Chen Naifeng, Tian Guozhong, Cao Jimin, Zhao Yong, Yang Wei. Jiamusi University, Heilongjiang 154007, China

Abstract Objective To observe the effect of GHRPs on the survival time in CHF model of rats in a purpose to explore the cardioprotective effect mechanisms of GHRPs on heart, so as to provide new method, new pathway for CHF biological therapy. **Methods** The establishment of rat CHF model was caused by ADR and the survival time in the four group rats with serious CHF after the different therapy through injection of GHRP - 2, GHRP - 6, compound recipe Danshen or NaCl into tail vein was observed. **Results** The rat model of ADR - induced CHF basically hit the target of Bishop indexes of CHF which suggested that the CHF model of rats reduced by ADR was successfully similar with the pathological processes of cardiomyopathy style CHF. Both GHRPs and the compound recipe Danshen could prolong the survival time in rats with serious CHF reduced by ADR and the GHRPs groups were 15 to 17 days longer than the lateral one. **Conclusion** Both GHRPs and the compound recipe Danshen could ameliorate the dyscrasia condition and prolong the survival time in rats with serious CHF, and the cardioprotective activity of GHRPs was much stronger compared with the compound recipe Danshen.

Key words GHRPs; CHF; Survival time; Cardioprotective active

生长素释放肽(growth hormone - releasing peptide, GHRP)是 20 世纪 80 年代初合成的一族能强烈促进生长激素(growth hormone, GH)释放的寡肽,因之能与在人及哺乳动物中枢及外周广泛分布的特异 G 蛋白偶联受体(又称 7 跨膜受体)特异结合,发挥多种独立于生长激素轴以外的多系统生物活性而备受瞩目^[1~3]。近年来, GHRPs 心血管系统有益作用吸引了许多国内外研究者,试图从其发挥作用的方式、途径、机制多方面诠释 GHRPs 的生物活性原理^[4,5]。实验设计研究 GHRP - 2、GHRP - 6 对 ADR

诱导的慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)大鼠动物模型生存时间的影响,并以对心脏具有保护性作用的复方丹参作为对照,进一步探讨 GHRP 直接对心脏保护性的作用机制及其对 CHF 心脏生物学治疗机制,为新世纪 CHF 的生物学治疗提供新方法、新途径。

材料与方法

1. 材料:(1)实验试剂:盐酸阿霉素(adriamycin, ADR)购于深圳万乐药业公司。GHRP - 2 和 GHRP - 6 购于杭州中肽生化有限公司(美国原装),复方丹参注射液由上海制药有限公司生产。(2)实验动物为 Wistar 大鼠,2 ~ 3 月龄成年 Wistar 大鼠 50 只,体重 280 ~ 320g(雌雄不限),清洁级,购于佳木斯大学动物实验中心。

2. 方法:(1)实验分组及处置:实验大鼠随机分成 A、B、C、D 和 E 共 5 组,每组 10 只,实验分组设第 E 组为正常对照组, A、B、C、D 4 组用于制作 ADR 诱导的 CHF 模型, ADR 按 20mg/kg 经腹腔注射(intraperitoneal injection, ip)分 8 次给药制作模型,第 2、4 天给 ADR 1mg/kg, ip^[6];第 6、8 天给 ADR 2mg/kg, ip;第 10、12 天给 ADR 3mg/kg, ip;第 14、16 天给 ADR

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D2006 - 24);黑龙江省卫生厅科研项目(2009 - 346);佳木斯大学科技创新项目(CX2010 - 035 和 S2009 - 071)

作者单位:154007 佳木斯大学(李梅秀、李娟、邢继强、陈乃峰、田国忠、赵勇、杨微);100730 北京协和医学院(曹济民)(注:李梅秀、李娟为并列第一作者)

通讯作者:田国忠, 电子信箱:tgz1966@163.com;曹济民, 电子信箱:caojimin@126.com

4mg/kg,ip。分组及各组处置如下:①CHF 模型对照组(A 组),从造模开始的第 10 天每日对照 GHRP 和复方丹参治疗组给平均体积的生理盐水,用微量加样器经尾静脉注射;②CHF模型复方丹参治疗组(B 组),从造模开始的第 10 天每日 1 次用微量加样器经尾静脉注射复方丹参注射液,150μl/kg,第 17 天停止;③ CHF 模型 GHRP-2 治疗组(C 组),造模开始的第 10 天每日 1 次用微量加样器给 GHRP-2,经尾静脉注射 25μg/kg,第 17 天停止;④ CHF 模型 GHRP-6 治疗组(D 组),造模开始的第 10 天每日 1 次用微量加样器给 GHRP-6,经尾静脉注射 25μg/kg,第 17 天停止;⑤正常对照组(E 组),与造模组同期对照给等体积生理盐水 ip,实验分组及各组处置(表 1)。(2)观察方法:从造模开始每日早、中、晚对比观察各治疗组大鼠的精神状态、活动情况、皮毛变化、饮食情况及粪便颜色等指标。每天给各组大鼠称重,记录死亡大鼠的时间、组别以及各组大鼠自给 ADR 第 10 天起到停药 1 周后的总存活时间,但正常组 E 组不计数。

3. 统计学处理:实验组间统计学分析采用 *t* 检验, $P < 0.01$ 为意义显著。

表 1 实验分组及处置一览表

组数	实验组内容	<i>n</i>
A	CHF + 生理盐水	10
B	CHF + 复方丹参	10
C	CHF + GHRP-2	10
D	CHF + GHRP-6	10
E	正常对照组 + 生理盐水	10

结 果

通过复制 CHF 大鼠模型,A~D 组大鼠与 E 组大鼠相比,在开始复制模型的第 10~12 天起即出现中毒体征,至第 14~20 天表现出明显的 CHF 体征:表现活动能力下降精神状态萎靡、进食减少、眼睑分泌物增多、柏油色脓样粪便、尿液赤黄、被毛蓬乱、脱毛,呼吸加快,体温下降、喜欢聚团等,出现了生命体征发生变化的现象;其中 A 组在开始复制模型的第 16 天出现第一只大鼠死亡,B 组在开始复制模型的第 17 天出现第一只大鼠死亡,C 组和 D 组于开始复制模型的药第 19 天出现第一只大鼠死亡;A 组至 D 组大鼠从模型复制开始第 10 天至造模结束后 1 周的总存活天数不同:发现虽然 B 组、C 组和 D 组也出现大鼠死亡,但用尾静脉注射法给药治疗的 3 个组大鼠总存活天数明显多于 A 组,即 GHRP-2、GHRP-6、复方丹参注射液均可延长 CHF 大鼠存活时间,总计存活天数 GHRPs 治疗的两组比复方丹参治疗组分别长 15 天和 17 天,差异显著, $P < 0.01$,具有统计学意义,而两组 GHRP 之间未见明显的差异(表 2),正常对照组

大鼠不参加总存活时间计数。

表 2 GHRPs、复方丹参对 ADR 致 CHF 大鼠存活时间影响

组别	<i>n</i>	各组中第 1 例	4 次给药后至 8 次给药后
		大鼠死亡时间	1 周总存活时间(天)
A 组	10	第 16 天	94
B 组	10	第 17 天	105
C 组	10	第 19 天	120
D 组	10	第 19 天	122

讨 论

CHF 是多种心脏病理进程发展的最终结局,在经济迅猛发展、人们物质生活水平日益提高的新世纪,CHF 以其对人类寿命与对生存质量的严重制约而被视为健康最大威胁,从多种途径揭示 CHF 发病机制与病理特征,从而全方位探索 CHF 生物学治疗的最有效手段成为研究者的重要课题,有效治疗药物的遴选研究就是一项重要内容^[7,8]。GHRPs 多种心血管生物活性就是在人们的这种热望中逐步吸引了国内外学者的瞩目^[9,10]。GHRPs(GHRP-6、GHRP-1、GHRP-2 和 Hexarelin)是 20 世纪 70 年代后期首先合成的、可以强烈促进 GH 释放的寡肽,与同样作用的合成的非肽类物质(L-692、L-429、MK-0677、NN-703 等)非肽类化合物以及人和动物体天然的具有 28 肽的 Ghrelin 统称为生长激素促分泌素(growth hormone secretagogues, GHSs)。GHRPs 通过与在中枢及外周组织特别是心血管等系统广泛分布的特异受体(growth hormone secretagogues receptor, GHS-R)结合,发挥不依赖 GH-脑垂体-胰岛素样生长因子(IGF-1)系统的对多器官特别是对心脏保护等多种生物学效应,Ghrelin 正是 GHS-R 受体的内源性配基肽类化合物,是内源性的 GHRP,与合成的 GHRPs 在强烈促进 GH 释放的同时,还具有多种心血管保护活性,被研究者誉为 CHF 生物学治疗最有前途的遴选药物^[3,7,11,12]。GHRPs 对心脏的直接作用有正性肌力作用、改善心肌活动的功能,防止缺血再灌注损伤,参与细胞离子转运,参与局部神经体液因素的调控,促进心肌细胞生长代谢并有修复损伤,抗细胞凋亡以及调节冠状动脉功能等多方面作用,GHRPs 可以通过静脉、鼻腔内或口服等途径给药发挥作用,为此,我们有理由预见,GHRPs 将是未来分子医学时代从根本上治疗和改善 CHF 的最有前途药物,并预示着 GHRPs 控制 CHF 发生发展过程中的左心室重构和细胞凋亡、全面改善 CHF 患者症状、从根

本上提高病人生存质量而发挥重要主导作用时代的到来^[3,7,9-12]。GHRsP 对正常心脏以及 CHF 心脏的直接保护作用机制以及还有哪些方面的可能效应及作用方式,都需要进一步深入、系统性研究提供更多翔实的实验依据,为加快 GHRPs 早日进入临床应用签发通行证。为研究 CHF 发病机制及其生物学治疗,多种因素诱导的 CHF 动物模型,被研究者按照不同的实验目的而选择、应用。ADR 是 1970 年开始用于临床的最有效的一线广谱抗肿瘤药物,属于蒽环类,因其严重的心脏毒性等不良反应,其应用受到严重的限制,直接影响其抗癌作用的发挥。科学研究中正是利用 ADR 的心脏毒性而制作心肌病型 CHF 动物模型^[6],本研究采用 ADR 20mg/kg 分 8 次给药(ip),大鼠即出现重症剂量依赖性 CHF,用此方法诱导的心肌病(adriamycin-induced cardiomyopathy, AIC)型重症 CHF,在造模最后 1 天就有大鼠死亡,模型组大鼠从造模开始的第 10 天的行为学体征改变从畏冷、少动,渐进至颜面出现肿胀,尿色黄赤,有柏油色便,最后精神萎靡,造模结束之后 CHF 模型大鼠陆续死亡。

本实验就是进一步揭示 GHRPs 对 ADR 诱导的致死性 CHF 心脏保护性作用机制而设计。实验用 ADR 诱导重症 CHF 模型大鼠,并以被公认的复方丹参注射液为治疗对照,分别给 CHF 模型大鼠 GHRP-2、GHRP-6 治疗,观察到无论是复方丹参注射液还是两种 GHRPs 尾静脉注射给药,均能延长 ADR (20mg/kg)诱导的重症 CHF 大鼠的存活时间,而且两组 GHRPs 治疗组大鼠的存活时间与复方丹参注射液组比较,差异显著,不仅再次证实 GHRPs 对重症 CHF 大鼠的恶病质状态有显著改善作用,与曹济民课题组研究结论一致,而且直接证明其能够延长 ADR 诱导的重症 CHF 的存活时间,其作用优于复方丹参注射液,这是 GHRPs 心脏生物活性的又一方面证据^[9]。实验中 A、B、C 和 D 4 组大鼠的体重没有明显差别,甚至在模型制备成功之时反而体重明显下降,这似乎与 GHRP 促进生长发育、促进摄食增加体重的效应有所矛盾,然而,本实验在以 20mg/kg 方法制作 CHF 模型过程中在中期后开始 GHRPs 25μg/(kg·d)治疗的,这种 CHF 大鼠模型是致死性的,严重恶病质状态、CHF 模型都有胸腔积液,那么我们推测,GHRPs 和复方丹参注射液都在不同程度上减少了胸腔和腹腔积液,通过增加了心肌细胞内钙离子,增强心肌的收缩性,从而改善了重症 CHF 大鼠的恶病质状态,延长了大鼠的存活时间,这样,4 组大鼠

体重总体上虽然没有明显改变并不否定 GHRPs 促进生长发育、促进摄食增加体重的效应,或者只是从总体上抵消了各自的效果。

CHF 已经成为人类致死疾病之一,在人们更加寄望于 CHF 的全面揭示与 CHF 生物学治疗从根本上改善 CHF 病人的症状,提高生活质量,进而延长病人的存活时间的时代要求下,研究结果证明 GHRPs 延长了重症 CHF 大鼠的存活时间,其作用超过了治疗浓度的复方丹参注射液的效果,这对于 GHRPs 在不久的将来投入到临床治疗人类的重症 CHF 患者行列提供了重要的实验依据。

参考文献

- 1 Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, *et al.* Structure - activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, 1980, 106(3): 663 - 667
- 2 Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, *et al.* On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*, 1984, 114(5): 1537 - 1545
- 3 陈晨. 生长素释放肽的发现、发展及展望. *基础医学与临床*, 2002, 22(1): 1 - 5
- 4 Pang JJ, Xu RK, Xu XB, *et al.* Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II - induced apoptosis in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(3): H1063 - H1069
- 5 Cao JM, Ong H, Chen C. Effects of ghrelin and synthetic GH secretagogues on the cardiovascular system. *J Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(1): 13 - 18
- 6 李梅秀, 田国忠等, 欧叶涛, 等. 鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定. *解剖学研究*, 2005, 27(3): 176 - 178
- 7 曹济民. 心力衰竭实验研究进展. *基础医学与临床*, 2002, 22(1): 16 - 25
- 8 Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *J Circulation*, 2000, 102(20 Suppl 4): IV14 - IV23
- 9 Xu XB, Pang JJ, Cao JM, *et al.* GH - releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress - related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(4): H1643 - H1651
- 10 Marleau S, Mulumba M, Lamontagne D, *et al.* Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(1): 26 - 35
- 11 Chen C, 孙强. 生长素的发现及研究进展. *西安交通大学学报(医学版)*, 2009, 30(2): 131 - 136
- 12 Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth - hormone - releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999, 9;402(6762): 656 - 660
- 13 Xiao L, Hu Z, Zhang W, *et al.* Evaluation of doxorubicin toxicity on cardiomyocytes using a dual functional extracellular biochip. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(4): 1493 - 1499 (收稿: 2011 - 03 - 24)

(修回: 2011 - 04 - 27)