

生长激素释放肽-2对自发性高血压大鼠心肌纤维化的抑制作用

张 鹏 朱元杰 闫 莉 谷靖丽 曹济民

摘 要 **目的** 研究生长激素释放肽-2(GHRP-2)是否可抑制心肌纤维化。**方法** 由于自发性高血压大鼠(SHR)存在自然发生的严重心肌纤维化,本研究利用 SHR 作为心肌纤维化模型。SHR 从 12 周龄开始给予 GHRP-2 皮下注射治疗(100 μ g/kg,每日 1 次,共 4 周),同龄 Wistar 大鼠皮下注射等量生理盐水作为正常对照组;利用苦味酸天狼猩红染色法显示 SHR 左心室肌 I 型胶原和 III 型胶原,用 Van Gienon 染色法显示左心室总胶原水平;用羟脯氨酸含量测定法评估心肌中胶原合成水平。**结果** 与正常对照组相比,未经处理的 SHR 左心室肌中 I 型和 III 型胶原明显增多,羟脯氨酸含量也显著增高。GHRP-2 治疗可明显降低 SHR 心肌中 I 型、III 型胶原和总胶原的水平,并降低羟脯氨酸含量。**结论** GHRP-2 可以通过抑制胶原合成而减轻 SHR 左心室纤维化。

关键词 生长激素释放肽 心肌纤维化 自发性高血压大鼠 胶原

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.006

GHRP-2 Attenuates Cardiac Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats. Zhang Peng, Zhu Yuanjie, Yan Li, et al. Department of Physiology, Institute of Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate whether growth hormone releasing peptide-2 (GHRP-2) could attenuate cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** SHR shows severe cardiac fibrosis and were used as a model of cardiac fibrosis in this study. SHR were treated with GHRP-2 (100 μ g/kg, sc, qd) for 4 weeks starting from the 12th week of birth. Picro-sirius red staining was used to visualize type I and type III collagens, Van Gienon staining was applied to visualize total collagens, and hydroxyproline assay was used to quantitatively evaluate the synthetic level of myocardial collagen. **Results** Compared with control Wistar rats, GHRP-2 treatment significantly decreased the levels of type I and type III collagens and the total collagens, and also reduced the level of hydroxyproline. **Conclusion** GHRP-2 attenuates cardiac fibrosis via suppressing cardiac synthesis of collagens.

Key words Growth hormone releasing peptides; Cardiac fibrosis; Spontaneously hypertensive rats; Collagen

心肌纤维化(cardiac fibrosis)是多种心脏病的一种共同病理变化,可降低心肌的顺应性,严重影响心肌的舒张和收缩功能,是导致心肌重构和心力衰竭的重要原因之一^[1]。同时,心肌纤维化会影响心肌的正常兴奋传导,从而导致心律失常^[2]。因而减轻心肌纤维化是防治心力衰竭和心律失常的重要措施。防治原发病固然可在一定程度上减轻心肌纤维化,但仍不能代替药物治疗。目前临床上尚缺乏有效的抑制心肌纤维化的药物,因此研发抗心肌纤维化的药物是重要的医学课题。心肌纤维化主要表现为心肌胶

原纤维含量增加,其大概原因是多种复杂造成心脏胶原合成增加和(或)胶原降解减少。抗心肌纤维化的药物应具备抑制心肌胶原合成和(或)促进胶原降解的作用。

笔者前期的工作证明,一种名为 hexarelin 的人工合成的生长激素释放肽(growth hormone releasing peptides, GHRP)具有良好的心脏保护作用,可改善心力衰竭大鼠的心功能,抑制心脏成纤维细胞增殖和胶原合成,并可减轻自发性高血压大鼠(SHR)的心肌纤维化^[3-5]。GHRP 是一类人工合成的、含有右旋(D 型)氨基酸残基的短肽(一般为六肽),是生长激素分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的配体,可促进生长激素的分泌,也有不依赖于生长激素的生物效应^[6]。GHSR 的天然配体是 ghrelin,后者也具有心脏保护作用^[7]。GHRP 依据其化学

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81670313,81300139)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学系

通讯作者:曹济民,电子信箱:caojimin@126.com

结构的不同有多种,包括 GHRP-1、GHRP-2、GHRP-6 和 hexarelin 等。除 hexarelin 之外,其他几种 GHRP 是否也具有抑制心肌纤维化的作用尚未见报道。本工作的目的是探讨 GHRP-2 是否具有抑制心肌纤维化的作用,并初步研究其可能的作用机制。

材料与方法

1. 实验动物、分组及处理:实验动物采用雄性自发性高血压大鼠(SHR)(2 周龄)和同龄雄性 Wistar 大鼠,购于中国医学科学院实验动物研究所。SHR 从 12 周龄起给予皮下注射 GHRP-2(100 μg/kg,每日 1 次),共计 4 周,作为药物治疗组(SHR-GHRP-2);SHR 用相同方法给予皮下注射等量生理盐水作为心肌纤维化未经药物治疗组(SHR-saline);Wistar 大鼠用相同方法给予皮下注射等量生理盐水作为正常对照组(Wistar-saline)。每组 $n=6$ 。GHRP-2 购于上海瀚香生物科技有限公司。

2. 苦味酸天狼猩红染色:动物经相应药物处理结束后,断头处死,取左心室,用多聚甲醛固定,常规方法脱水、石蜡包埋,组织切片(厚度 5 μm)。按照改良的 Junqueira 方法^[8],对心肌内胶原进行苦味酸天狼猩红染色,该方法主要显示 I 型和 III 型胶原。心肌组织切片经脱蜡和恢复水相后,用 0.1% 苦味酸天狼猩红染液(购于海德创业北京生物科技有限公司)对切片染色 30~60 min,然后用自来水冲洗,逐级乙醇脱水,二甲苯透明,封片,显微镜下照相。用此染色法,在偏振光下 I 型胶原呈黄色或红色,III 型胶原呈绿色;II 型胶原则因呈弱的双折光性并可有不同颜色。

3. Van Gieson 染色:心肌组织切片经脱蜡和复水过程后,用 Van Gieson 氏染液(购于海德创业北京生物科技有限公司)染色 3~5 min,然后依次用 95% 乙醇和 100% 乙醇脱水,二甲苯透明,封片,照相。此法心肌胶原被染成粉红色,主要反映心肌总胶原水平。

4. 组织切片胶原面积的半定量分析:使用计算机图像分析系统,测量经上述两种胶原染色组织切片的相对胶原面积。设定胶原色值,每张切片任选 10 个视野,测定并计算所有胶原面积之和,根据下列公式计算胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF): $CVF(\%) = \text{胶原面积} / \text{全视野面积} \times 100\%$ 。

5. 心肌羟脯氨酸含量测定:由于羟脯氨酸只参与胶原的合成,胶原中含有约 14% 的羟脯氨酸,因此测定心肌羟脯氨酸的含量就可估算心肌胶原蛋白的含量。羟脯氨酸测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。羟脯氨酸在氧化剂的作用下所产生的氧化产

物与二甲氨基苯甲醛作用呈现紫红色,用分光光度计测定样品和标准品的光度值,计算出样品的羟脯氨酸含量。取冷冻左心室肌组织,在匀浆介质中低温匀浆后离心(4000 r/min, 10 min);取上清,按试剂盒操作说明书进行操作,然后在 550 nm 波长处测定各管吸光度。提取左心室肌总蛋白,并用考马氏亮蓝法对每个样本进行蛋白定量。根据下面的公式计算羟脯氨酸含量:心肌组织中羟脯氨酸含量(μg/mg 蛋白) = $[(\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}) / (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度})] \times (\text{标准管浓度}(2 \mu\text{g/ml})) \times (\text{蛋白含量}(\text{mg 蛋白/毫升}))$ 。

6. 统计学方法:实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理。多组比较用方差分析。两组比较用分组 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. GHRP-2 显著抑制 SHR 左心室纤维化:GHRP-2 可显著减轻 SHR 左心室纤维化。图 1 为 SHR 和 Wistar 大鼠左心室代表性 I 型胶原和 III 型胶原的苦味酸天狼猩红染色照片。在图 1A 中,Wistar 大鼠左心室肌的纤维化程度很低,而 SHR 左心室肌的纤维化程度很严重,密布呈黄、红、绿色的 I 型或 III 型胶原纤维。给予 GHRP-2 处理的 SHR 左心室肌的纤维化程度与未经 GHRP-2 处理的大鼠相比明显减轻。同样的现象也发生在冠脉血管及其周围组织:Wistar 大鼠左心室冠脉(特别是冠状动脉)周围的纤维化程度很低,胶原仅分布于冠脉管壁,冠脉周围很少有胶原分布;而 SHR 左心室冠状动脉管壁增厚且胶原含量高,整个冠脉管壁都呈现丰富的胶原分布,提示有冠脉中膜纤维化,并且冠脉周围也有严重的纤维化;给予 GHRP-2 处理的 SHR 左心室冠脉及其周围的胶原分布明显减少。

与图 1 类似,以总胶原阳性染色作为纤维化的判断指标,Wistar 大鼠左心室心肌间质及冠脉血管周的纤维化程度很低,胶原容积分数也较低;而 SHR 左心室的纤维化程度则很重,胶原容积分数明显增大($P < 0.01$);给予 GHRP-2 处理的 SHR 左心室的纤维化程度与未经 GHRP-2 处理的大鼠相比明显减轻,胶原容积分数明显降低($P < 0.01$, 图 2)。

2. GHRP-2 显著降低 SHR 左心室羟脯氨酸含量:本研究中心肌羟脯氨酸含量(代表胶原合成水平)以每毫克心肌总蛋白中所含的羟脯氨酸的微克数来表示,图 3 示 SHR 左心室肌羟脯氨酸含量。与

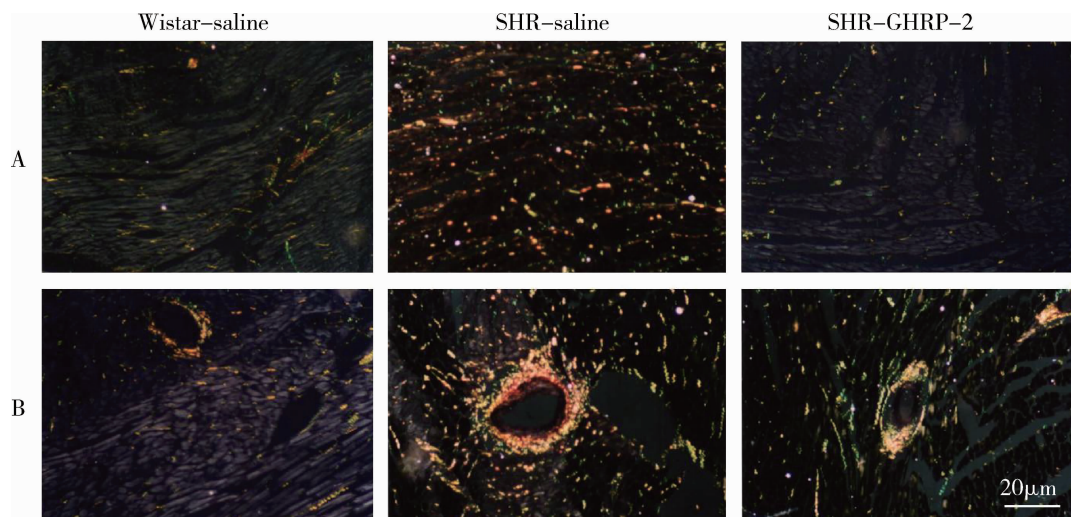


图1 苦味酸天狼星红染色代表性照片显示 GHRP-2 对自发性高血压大鼠 (SHR) 心肌纤维化的抑制作用
偏振光下 I 型胶原为黄色或红色, III 型胶原为绿色。A. 各组心肌间质纤维化情况, Wistar 大鼠心肌间质几乎没有纤维化; SHR 组心肌纤维化非常严重; 慢性给予 GHRP-2 心肌纤维化明显减轻; B. 各组冠脉血管周纤维化情况, 可见 SHR 心肌纤维化明显增强, 而 GHRP-2 可显著减少 SHR 心肌纤维化

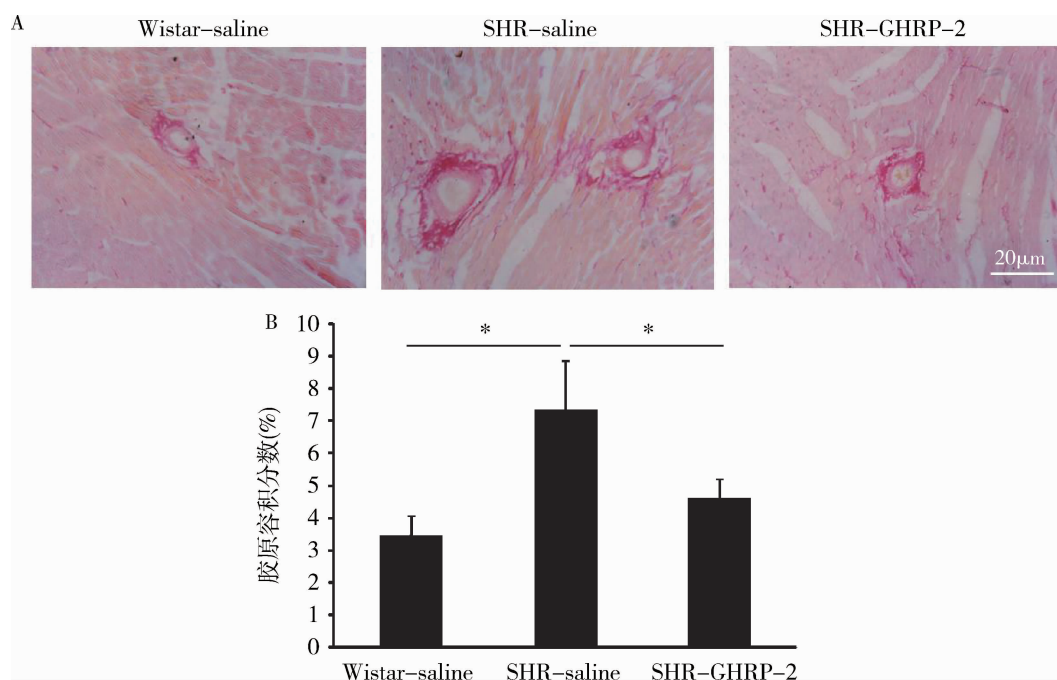


图2 Van Gieson 染色显示 GHRP-2 对 Wistar 大鼠和 SHR 心肌纤维化的影响

A. 各组大鼠心肌切片代表性 Van Gieson 染色, 光镜下总胶原为红色; B. 胶原容积分数统计图, * $P < 0.01$ (每组 $n = 6$); Wistar - saline. 正常 Wistar 大鼠生理盐水对照组; SHR - saline. SHR 盐水处理组; SHR - GHRP-2. SHR 给予 GHRP-2 治疗组

Wistar 大鼠相比明显增高 ($P < 0.01$); 慢性给予 GHRP-2 4 周后, SHR 心肌的羟脯氨酸含量显著降低 ($P < 0.05$)。

讨 论

本研究以 SHR 作为心肌纤维化的模型, 研究了从 12 周龄开始给予慢性皮下注射 GHRP-2 4 周后

对心肌纤维化是否有改善作用; 另从胶原合成角度初步探讨了 GHRP-2 抑制心肌纤维化的可能机制。结果显示 GHRP-2 可明显减轻压力负荷所致的心肌纤维化, 并且这种保护作用可能至少是通过抑制胶原合成实现的。目前针对心肌纤维化仍无有效的防治药物。本研究提示 GHRP-2 可能是防治心肌纤维化的

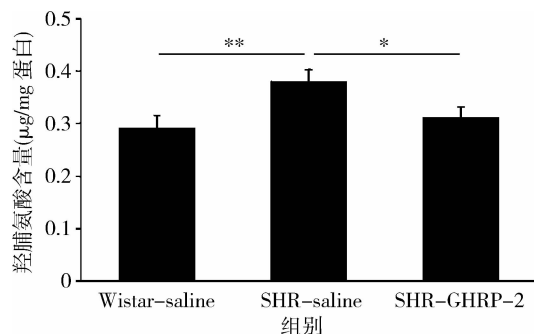


图3 GHRP-2对SHR心肌羟脯氨酸含量的影响

Wistar-saline. 正常 Wistar 大鼠生理盐水对照组。SHR-saline. SHR 盐水处理组。SHR-GHRP-2. SHR 给予 GHRP-2 治疗组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (每组 $n = 6$)

有效药物之一。已知 GHRP-2 的毒性不良反应很小,这也为将其开发为抗心肌纤维化药物提供了可能性。

心肌纤维化虽然是心脏器质性损伤的修复性过程和表现,但也是造成心肌顺应性降低和心功能降低重要因素之一。心肌内所含胶原是心肌细胞外基质的组成部分^[9]。当心脏暴露于压力超负荷及各种或器质性损伤时,均可导致心脏成纤维细胞增殖和细胞外基质增多。高血压性左心室重构主要表现为心肌细胞肥大和心肌纤维化。本研究显示,GHRP-2可明显减轻SHR的左心室纤维化,提示GHRP-2能够明显减轻高血压性左心室重构。

天狼猩红是目前较为理想的胶原染色染料。在偏振光下,天狼猩红主要显示I型和Ⅲ型胶原^[10]。本研究显示GHRP-2能够明显降低SHR心肌I型和Ⅲ型胶原的含量;进一步利用Van Gieson染色法对SHR左心室肌的总胶原进行了染色和分析,显示GHRP-2能够明显降低SHR心肌总胶原含量,使胶原容积分数(CVF)明显减小。SHR的冠脉中膜、外膜和冠脉周围也呈现明显纤维化,是高血压的重要血管病理改变^[11, 12]。GHRP-2可明显降低冠脉中膜、外膜和冠脉周围的纤维化以及心肌间质纤维化,证明GHRP-2抑制心肌纤维化没有明显的心脏部位选择性,这一特点对于防止心脏的广泛纤维化有重要意义。

笔者进一步利用羟脯氨酸含量来相对定量地评估了GHRP-2对胶原合成的影响,结果显示GHRP-2可明显降低SHR左心室的羟脯氨酸含量,提示在GHRP-2的作用下,心肌胶原合成减少。由于羟脯氨酸在胶原中所占比例稳定(约占胶原总量的14%),因此该方法可较准确地判断GHRP-2对

心肌中胶原合成的影响,同时也提示抑制胶原合成是GHRP-2抑制心肌纤维化的重要机制之一^[13]。

总之,本工作证明GHRP-2可抑制高血压所致的心肌纤维化,这对进一步开发GHRP-2为抗心肌纤维化药物有重要的意义。笔者推断GHRP-2也可能抑制其他病理原因所致的心肌纤维化,但尚需进一步研究。

参考文献

- Travers JG, Kamal FA, Robbins J, *et al.* Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens [J]. *Circ Res*, 2016, 118(6):1021-1040
- Pellman J, Zhang J, Sheikh F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 94:22-31
- 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 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(4): H1643-H1651
- Xu X, Pang J, Yin H, *et al.* Hexarelin suppresses cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis in rat [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(5): H2952-H2958
- Xu X, Ding F, Pang J, *et al.* Chronic administration of hexarelin attenuates cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(6): H703-H711
- Cao JM, Ong H, Chen C. Functions of ghrelin and synthetic GH secretagogues in cardiovascular system [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(1): 13-18
- Lilleness BM, Frishman WH. Ghrelin and the cardiovascular system [J]. *Cardiol Rev*, 2016, 24(6):288-297
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section [J]. *Histochem J*, 1979, 11(4):447-455
- Rienks M, Papageorgiou AP, Frangogiannis NG, *et al.* Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity [J]. *Circ Res*, 2014, 114(5):872-888
- Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, *et al.* Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone [J]. *Hypertension*, 1995, 26(1):101-111
- Bruno RM, Duranti E, Ippolito C, *et al.* Different Impact of essential hypertension on structural and functional age-related vascular changes [J]. *Hypertension*, 2017, 69(1):71-78
- Takayanagi T, Forrester SJ, Kawai T, *et al.* Vascular ADAM17 as a novel therapeutic target in mediating cardiovascular hypertrophy and perivascular fibrosis induced by angiotensin II [J]. *Hypertension*, 2016, 68(4):949-955
- Susic D, Fares H, Frohlich ED. Nebivolol prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in salt-loaded spontaneously hypertensive rats [J]. *J Am Soc Hypertens*, 2012, 6(5):316-323

(收稿日期:2017-02-01)

(修回日期:2017-02-09)