

基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨川芎提取物对慢性心力衰竭大鼠的干预作用[△]

高嘉*,黄冀娜,李珍(保定市第二医院心血管内科,河北保定 073000)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2023)02-0199-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2023.02.015



摘要 目的:探讨川芎提取物对慢性心力衰竭大鼠的干预作用,并通过 Wnt/ β -catenin 信号通路探究其作用机制。方法:采用腹主动脉缩窄法结合耐力式游泳建立慢性心力衰竭大鼠动物模型,通过心电图检测大鼠造模前后心电图变化,建模成功后将大鼠分为模型组($n=10$)和实验组($n=10$),取 10 只未造模大鼠作为对照组。实验组大鼠给予川芎提取物(100 mg/kg),1 日 1 次,连续干预 4 周;对照组和模型组大鼠分别给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。实验终点检测各组大鼠心率及呼吸频率,检测大鼠左心室舒张末期径(LVIDd)、左心室收缩末期径(LVIDs)、左心室射血分数(LVEF)和左心室缩短分数(LVFS)。采用苏木精-伊红(HE)染色检测大鼠心脏组织病理状态,采用电子显微镜检测大鼠心脏组织超微结构变化,采用蛋白质印迹法检测大鼠心脏组织 Wnt/ β -catenin 信号通路关键分子去水平段极性蛋白 3(Dvl3)、糖原合成酶激酶-3(GSK β)和 β -连环蛋白(β -catenin)表达情况。结果:超声检查结果表明,模型组大鼠的 LVIDd、LVIDs 显著高于对照组,LVEF、LVFS 显著低于对照组;实验组大鼠的 LVIDd、LVIDs 显著低于模型组,LVEF、LVFS 显著高于模型组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。HE 染色结果和电镜结果表明,模型组大鼠心脏组织出现损伤,而实验组大鼠损伤小于模型组。蛋白质印迹法结果表明,模型组大鼠 Dvl3、GSK β 和 β -catenin 表达水平显著高于实验组,而实验组相比于模型组有显著下降趋势,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结论:川芎提取物对慢性心力衰竭大鼠心脏有保护作用,其作用机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制有关。

关键词 川芎提取物;慢性心力衰竭;损伤;Wnt/ β -catenin 信号通路

Intervention Effects of Ligusticum Chuanxiong Extract on Rats with Chronic Heart Failure Based on Wnt β -catenin Signaling Pathway[△]

GAO Jia, HUANG Jina, LI Zhen (Dept. of Cardiology, the Second Hospital of Baoding, Hebei Baoding 073000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the intervention effects of Ligusticum Chuanxiong extract on rats with chronic heart failure and explore its mechanism through Wnt/ β -catenin signaling pathway. **METHODS:** The rat model of chronic heart failure was established by abdominal aortic constriction combined with strenuous swimming. Electrocardiogram was used to detect the changes of electrocardiogram before and after modeling. After successful modeling, the rats were divided into the model group ($n=10$) and experimental group ($n=10$), and 10 rats without model were set as the control group. The experimental group was given Ligusticum Chuanxiong extract (100 mg/kg) once a day for 4 weeks, and the control group and model group received the same amount of 0.9% sodium chloride solution gavage. At the end of the experiment, the heart rate and respiratory rate of rats in each group were detected, and LVIDd, LVIDs, LVEF and LVFS were detected. The pathological state of rat heart tissue was detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. Ultrastructural changes of heart tissues were detected by electron microscope, and the expression of key molecules Dvl3, GSK β , β -catenin in heart tissues was detected by Western blotting. **RESULTS:** Ultrasound results showed that LVIDd and LVIDs of the model group were significantly higher than those of control group, LVEF and LVFS were significantly lower than those of control group, LVIDd and LVIDs of experimental group were significantly lower than those of model group, LVEF and LVFS were significantly higher than those of model group, the differences were statistically significant ($P<0.01$). HE staining and electron microscopy results showed that heart tissues of the model group were damaged, while the experimental group was less than the model group. Western blotting results showed that expression levels of Dvl3, GSK β and β -catenin in the model group were

[△] 基金项目:河北省医学科学研究课题计划(No. 20200262)

* 主治医师。研究方向:慢性心力衰竭。E-mail:g19860720022@163.com

significantly higher than those in the experimental group, and there was a significant downward trend compared with the model group ($P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Ligusticum Chuanxiong extract has protective effects on the heart of chronic heart failure rats, and its mechanism is related to the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEYWORDS Ligusticum Chuanxiong extract; Chronic heart failure; Damage; Wnt/ β -catenin signaling pathway

慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 是由于心肌梗死、心肌病、血流动力学负荷过重及炎症等原因引起的心肌损伤,患者临床表现主要为活动或生气时出现呼吸困难,还会出现消化不良、腹胀等症状^[1-2]。川芎提取物是伞形科植物川芎根茎的提取物,可以抑制炎症反应、调控细胞凋亡、改善血管收缩功能,治疗心力衰竭^[3-4]。Wnt 信号通路可促进核内恶性肿瘤相关基因转录调节分子,其功能最常见于胚胎发育和恶性肿瘤,决定细胞的命运。Wnt/ β -catenin 信号通路也参与心脏重要的生物学进程,心脏受损后,Wnt/ β -catenin 信号促进心脏成纤维细胞的纤维化、瘢痕形成和有害心肌扩张^[5-6]。本研究将通过诱导大鼠 CHF 模型,探讨川芎提取物对 CHF 大鼠的干预作用,并探究 Wnt/ β -catenin 信号通路的变化,为临床使用川芎提取物治疗及辅助治疗 CHF 提供分子基础和依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 8~10 周龄 SPF 级 SD 大鼠,购于北京维通利华实验动物中心。

1.2 仪器

Leica RM2015 型切片机 (德国 Leica 公司);-80℃超低温保存箱 (美国 Thermo 公司);4℃冰箱 (合肥美菱股份有限公司);SC-3610 型低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司);Western blot 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.3 药品与试剂

川芎提取物购自广州朋远化工有限公司 (批号: 20150412,-20℃避光保存,使用时用 2%吐温 80 先溶解,再用 0.9%氯化钠溶液稀释,终浓度为 5 mg/mL);戊巴比妥钠 (批号: 020919) 购自天津市申泰化学试剂有限公司;苏木精 (批号: H9627)、伊红 (批号: 861006) 购于美国 Sigma 公司;去水平段极性蛋白 3 (Dvl3) 抗体 (ab76081)、糖原合成酶激酶-3 (GSK β) 抗体 (ab185141)、 β -连环蛋白 (β -catenin) 抗体 (ab32572) 和二抗 (ab150113) 购于美国 Abcam 公司。

2 方法

2.1 大鼠分组及饲养条件

8~10 周龄雄性 SD 大鼠于 SPF 级鼠房饲养,室温调节在 (25 $\pm$ 2)℃,相对湿度 40%~65%,12 h/12 h 昼夜交替照明,自由摄取食物和饮用水,适应性饲养 1 周后造模。

2.2 大鼠 CHF 模型的建立

大鼠称重后按 10%水合氯醛 0.4 mL/100 g 行腹腔注射麻醉,将大鼠以背位固定于鼠板上,气管插管后将针形心电图导联电极刺入大鼠四肢,观察并记录心电图,暴露左侧胸腔,于左侧第 3—4 肋间开胸,逐层分离筋膜、肌肉,打开大鼠胸膜,挤压大鼠右侧胸腔,托举心脏,钝性撕开心包膜,于距离左冠

状动脉前降支起点 2 mm 处用缝线结扎前降支,并予以利多卡因注射液 0.1 mL 防止发生室性心律失常。结扎结束后缝合,观测心电图可见 ST 段明显抬高,说明结扎成功。造模后半量饲料饥饿喂养,并对大鼠进行每日力竭式游泳 1 次^[7]。

2.3 大鼠分组及给药

随机选择 CHF 大鼠 20 只,分为模型组和实验组。取 10 只未造模大鼠作为对照组。实验组大鼠使用川芎提取物 (100 mg/kg) 干预,1 日 1 次,连续干预 4 周。对照组和模型组大鼠分别给予等量 0.9%氯化钠溶液灌胃。

2.4 大鼠心脏苏木精-伊红 (HE) 染色

取出各组大鼠心脏后,对组织进行包埋后切片,进行脱蜡覆水,以苏木精染色 5 min,5%乙酸 1 min,伊红染色 1 min,脱水:70%、80%、90%和 100%酒精各 10 s,二甲苯 1 min,通风橱自然晾干再封片,于显微镜下进行检查^[8]。

2.5 大鼠心肌组织超微结构观察

取各组大鼠左室心尖心脏组织,置于 4%戊二醛固定液中,固定后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 次,1%锇酸固定,PBS 清洗 2 次,脱水,包埋后制备心肌超薄切片,厚度 50 nm,采用枸橼酸铅-醋酸铀双重染色后,经透射电镜观察大鼠心肌组织超微结构^[9]。

2.6 大鼠实验终点心率及呼吸频率检测

实验终点采用大/小鼠脉搏血氧呼吸监护仪对各组大鼠心率及呼吸频率进行检测。测量时,保持室温在 22~26℃,每次测量前,打开大鼠固定装置的电源开关,预热 15~20 min,达到设定温度时加热灯泡自动熄灭,温度下降时灯泡自动开启,维持加热板在 39~40℃;将待测大鼠放入预热箱中固定,露出尾部,安装袖带及光电容积搏动传感器,检测心率。呼吸频率采用注射麻醉,仰卧固定,记录呼吸频率。

2.7 大鼠实验终点大鼠左心室舒张末期内径 (LVIDd)、左心室收缩末期内径 (LVIDs)、左心室射血分数 (LVEF) 和左心室缩短分数 (LVFS) 检测

大鼠麻醉采用 5%戊巴比妥钠 (以 0.9%氯化钠溶液溶解过滤) 麻醉 4 min 后立即检测;检测:通过 M 型超声心功能的测定仪检测大鼠 LVIDd、LVIDs、LVEF 和 LVFS。

2.8 蛋白质印迹法检测大鼠心脏组织 Dvl3、GSK β 和 β -catenin 蛋白的表达

对各组大鼠心脏进行研磨,采用 RIPA 蛋白裂解液心脏细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,80 V、15 min,120 V、2 h,聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜转模 120 V、2.5 h,TBST 漂洗 3 次 (每次 10 min),使用 5%脱脂奶粉封闭,TBST 漂洗 3 次 (每次 10 min),加入一抗,二抗温孵育后,TBST 漂洗 3 次 (每次 10 min),超敏化学发光液显色,发光仪曝光、拍照^[10-11]。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CHF 大鼠造模前后心电图变化情况

大鼠 CHF 造模前心电图表现为 P 波及 PR 间期明显, R 波降支与 T 波相交;大鼠 CHF 大鼠造模后心电图显示 T 波低

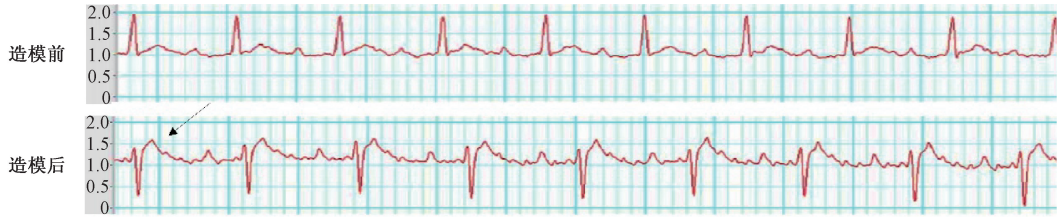


图 1 CHF 大鼠造模前后心电图比较

Fig 1 Comparison of ECG in rats with chronic heart failure before and after modeling

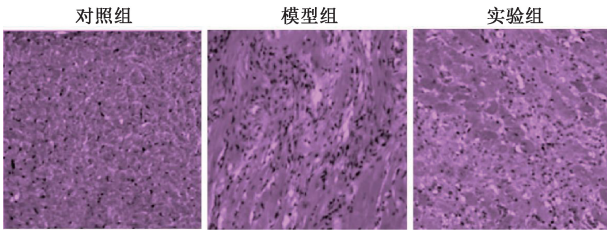


图 2 各组大鼠心脏 HE 染色情况比较 ($\times 200$)

Fig 2 Comparison of HE staining in heart of rats in each group ($\times 200$)

3.3 CHF 大鼠心脏超微结构比较

对照组大鼠心肌细胞排列整齐,胞核及胞膜清晰,明暗带界限清,线粒体膜结构清晰,数量丰富,基质排列紧密,线粒体内脊形态清晰可见,同时糖原颗粒完整,整体上细胞间质也无水肿;模型组大鼠心肌排列紊乱,纤维断裂、消失,细胞间质出现水肿,线粒体数量减少且肿胀,线粒体内脊紊乱甚至消失;实验组大鼠心肌纤维结构较模型组均有改善,水肿有所减轻,糖原数量有所增加,线粒体空泡化相比与模型组有所改善,见图 3。

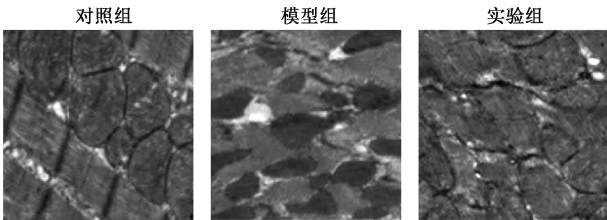


图 3 各组大鼠心脏超微结构比较 ($\times 10\ 000$)

Fig 3 Comparison of cardiac ultrastructure of rats in each group ($\times 10\ 000$)

3.4 各组大鼠实验终点心率及呼吸频率比较

模型组大鼠的心率和呼吸频率显著高于对照组,实验组大鼠的心率和呼吸频率显著低于模型组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

平或倒置明显, ST 段较术前明显抬高或下降 (绝对值 $\geq 0.1\text{ mV}$),见图 1。

3.2 CHF 大鼠心脏 HE 染色比较

对照组大鼠心脏组织切片排列有序、细胞规则,心脏结构完整,未见明显细胞损伤;模型组大鼠细胞肿胀,心脏细胞边界不清晰,模糊,心肌细胞受损伤严重;实验组大鼠心脏损伤相对于模型组有明显改善,见图 2。

表 1 各组大鼠实验终点心率及呼吸频率比较 ($\bar{x} \pm s$, 次/min)

Tab 1 Comparison of heart rate and respiratory rate of rats in each group at the end of experiment ($\bar{x} \pm s$, times/min)		
组别	心率	呼吸频率
对照组 ($n = 10$)	398.41 $\pm$ 33.36	94.0 $\pm$ 5.82
模型组 ($n = 10$)	450.58 $\pm$ 45.44 *	131.83 $\pm$ 9.13 **
实验组 ($n = 10$)	416.45 $\pm$ 39.03 * #	105.16 $\pm$ 6.32 * #

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$

Note: rs. the control group, * $P < 0.05$; rs. the model group, # $P < 0.05$

3.5 各组大鼠实验终点 LVIDd、LVIDs、LVEF 和 LVFS 水平比较

模型组大鼠的 LVIDd、LVIDs 显著高于对照组, LVEF、LVFS 显著低于对照组;实验组大鼠的 LVIDd、LVIDs 显著低于模型组, LVEF、LVFS 显著高于模型组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠实验终点 LVIDd、LVIDs、LVEF 和 LVFS 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of LVIDd、LVIDs、LVEF、LVFS in each group at the end of experiment ($\bar{x} \pm s$)				
组别	LVIDd/cm	LVIDs/cm	LVEF/%	LVFS/%
对照组 ($n = 10$)	0.41 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.02	98.21 $\pm$ 3.06	61.13 $\pm$ 5.62
模型组 ($n = 10$)	0.58 $\pm$ 0.04 *	0.38 $\pm$ 0.03 *	44.53 $\pm$ 5.19 **	35.69 $\pm$ 5.33 **
实验组 ($n = 10$)	0.45 $\pm$ 0.03 * #	0.26 $\pm$ 0.02 * #	69.33 $\pm$ 7.69 * #	48.54 $\pm$ 5.19 * #

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

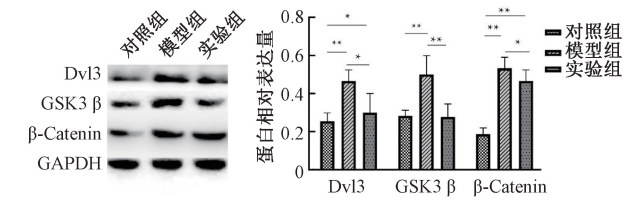
Note: rs. the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; rs. the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.6 各组大鼠心脏组织 Dvl3、GSK β 及 β -catenin 蛋白表达水平比较

与对照组相比,模型组大鼠 Dvl3、GSK β 和 β -catenin 表达水平有上升趋势;实验组大鼠 Dvl3、 β -catenin 显著高于对照组,而实验组相比于模型组有显著下降趋势,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。

4 讨论

CHF 指持续存在的心力衰竭状态,是各种病因所致心脏



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;

图4 各组大鼠心脏组织 Dvl3、GSK β 及 β -catenin 的蛋白表达水平

Fig 4 Protein expression levels of Dvl3, GSK β and β -catenin in heart tissues of rats in each group

疾病的终末阶段,其主要特点为呼吸困难、水肿和乏力,一般均有代偿性心脏扩大或肥厚及其他代偿机制参与,常伴有静脉压升高导致的器官充血性病理改变,可有心房、心室附壁血栓和静脉血栓形成,均可造成心肌结构和功能的变化,最后导致心室泵血和充盈功能低下^[12-13]。川芎常用于活血行气、祛风止痛,其提取物成分主要为川芎嗪、黑麦草碱、川芎素、藁本内酯和洋川芎酮等,具有辛散、解郁、通达及止痛等功能^[14]。本研究通过结扎左冠状动脉前降支和竭力式游泳建立大鼠 CHF 模型,并给予大鼠川芎提取物干预,探究川芎提取物对大鼠心力衰竭的干预作用。结果表明,川芎提取物可以显著降低大鼠心脏组织的损伤,提高心肌组织线粒体结构的恢复。线粒体占心肌细胞中体积的 35%~40%,心肌活动所需 95% 的腺苷三磷酸 (ATP) 均由线粒体产生。本研究结果提示,川芎提取物可以逆转线粒体受损,促进维持线粒体正常功能,进而部分恢复受损的心脏功能。本研究还发现,川芎提取物可以降低 CHF 引发的呼吸急促,缓解心率增快的病症,稳定大鼠的心肺功能。本研究通过进一步比较 LVIDd、LVIDs、LVEF 和 LVFS 水平,证实了川芎提取物能够改善大鼠心肌细胞收缩功能,起到恢复心脏功能、降低心脏损伤的作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路是经典的 Wnt 信号通路,在进化过程中高度保守。Wnt/ β -catenin 由 Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a 和 Wnt8 激活,并参与转化。Wnt 信号可通过上调 Caspase 抑制剂 Survivin 等抗凋亡蛋白来阻止细胞凋亡,并通过上调血管内皮生长因子来刺激血管生成。一些能够降解细胞外基质的蛋白酶,如供应基质裂解蛋白、基质金属蛋白酶 (MMP) 7 和 MMP26,以及细胞黏附分子,如 CD44 和 NrCAM,都是 Wnt 的靶基因,并且可以促进肿瘤的侵袭和转移。心脏受损后,Wnt/ β -catenin 信号同时参与心脏成纤维细胞的纤维化、瘢痕形成和有害心肌扩张,同时 Wnt 信号通路参与心肌梗死后心肌组织愈合过程的调控,参与心脏发育和心肌诱导分化等重要过程^[15-16]。本研究结果表明,CHF 大鼠的 Wnt/ β -catenin 信号通路关键分子 Dvl3、GSK β 和 β -catenin 表达水平显著升高,而川芎提取物干预后,Dvl3、GSK β 和 β -catenin 表达水平显著降低;同时,川芎提取物干预后 Dvl3、 β -catenin 水平仍高于对照组,而 GSK β 水平与对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示川芎提取物对 Dvl3、 β -catenin

的调控作用弱于对 GSK β 的调控作用。GSK β 是进化上非常保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,可以使磷酸基团加到 β -catenin 氨基端的丝氨酸/苏氨酸残基上,磷酸化的 β -catenin 被蛋白酶体降解,从而导致 β -catenin 表达水平降低。总体上,本研究推测,川芎提取物可以逆转 CHF 引发的 Wnt/ β -catenin 激活,从而起到心脏保护作用。

综上所述,川芎提取物对 CHF 大鼠的心脏有保护作用,其作用机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制有关。

参考文献

- [1] DOIMO S, PAVAN D. Novelities in therapy of chronic heart failure [J]. Heart Fail Clin, 2021, 17(2): 255-262.
- [2] NGUYEN E, WEEDA E R, WHITE C M. A review of new pharmacologic treatments for patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction [J]. J Clin Pharmacol, 2016, 56(8): 936-947.
- [3] 贾彩霞, 陈建新, 高阔, 等. 川芎治疗心力衰竭的网络药理学研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(8): 1093-1097.
- [4] 张文海. 川芎的药理作用及临床应用 [J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(26): 117-118.
- [5] ZHAO Y, WANG C, HONG X, et al. Wnt/ β -catenin signaling mediates both heart and kidney injury in type 2 cardiorenal syndrome [J]. Kidney Int, 2019, 95(4): 815-829.
- [6] 贾汉旗, 韩向东. Wnt 信号通路在心血管疾病中的调控作用研究进展 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(4): 51-54.
- [7] 陈明, 魏易洪, 侯玉鸣, 等. 心力衰竭动物模型研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34(7): 1103-1105.
- [8] 庄华梅, 陈秀娇, 王俊芳, 等. 补骨脂对慢性心力衰竭大鼠心肌损伤的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(6): 930-934.
- [9] 张彤瑜, 孙涛, 刘承鑫, 等. 益心泰有效组分对心肌梗死后心力衰竭兔心功能及心肌超微结构的影响 [J]. 中南药学, 2020, 18(3): 379-383.
- [10] 陈磊, 吴小燕. 上调 VEGF-B 基因对慢性心力衰竭大鼠的作用及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(8): 1695-1699.
- [11] 雷雨, 付蓉, 李馨钰, 等. 实脾饮对心力衰竭大鼠 NT-proBNP 及 Caspase-3 的影响研究 [J]. 贵州中医药大学学报, 2021, 43(2): 45-49.
- [12] HOFFMAN T M. Chronic heart failure [J]. Pediatr Crit Care Med, 2016, 17(8 Suppl 1): S119-S123.
- [13] 尚葛础, 刘科卫, 曹剑, 等. 三种衰弱评估工具对老年射血分数保留的心力衰竭患者全因死亡的预测水平比较 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24(12): 1258-1261.
- [14] 胡杨, 丁晓倩, 辉辉, 等. 川芎质量标准的研究 [J]. 中成药, 2021, 43(3): 692-699.
- [15] 李娇, 赵信科, 魏惠平, 等. Wnt 信号通路与心肌纤维化的研究进展和应用前景 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(18): 1828-1831.
- [16] 张冉冉, 桂永浩, 王旭. 经典 Wnt 信号通路在心脏瓣膜发育中的作用 [J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(7): 757-762.

(收稿日期:2022-07-13 修回日期:2022-09-26)