

葛根素对舒张性心力衰竭大鼠心肌僵硬度和心肌组织 I 型、III 型胶原表达的影响

张晓丹¹, 柏胜男^{1*}, 张彩霞², 张天一¹

1. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨红十字中心医院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 研究葛根素对舒张性心力衰竭 (distolic heart failure, DHF) 大鼠心肌僵硬度和心肌组织 I 型、III 型胶原表达的影响。方法 Wistar 大鼠腹主动脉缩窄法建立 DHF 模型, 术后 4 周, 随机分为 4 组 ($n=10$), 模型组, 葛根素高、中、低剂量组 (180、120、80 mg/kg), 另有假手术组 10 只。连续给予相应处理 4 周后, 通过十六导生理记录仪测量所得的血流动力学指标计算大鼠心肌僵硬常数 (K), 并应用免疫组化法测定心肌组织 I、III 型胶原的表达。结果 与模型组比较, 葛根素高剂量组 K 值无变化 ($P>0.05$), 中剂量组 K 值显著低于模型组 ($P<0.01$), 低剂量组 K 值明显低于模型组 ($P<0.05$)。与模型组比较, 葛根素高剂量组心肌 I 型胶原蛋白表达明显减弱 ($P<0.05$), 心肌 III 型胶原表达明显增强 ($P<0.05$); 中剂量组心肌 I 型胶原蛋白表达显著减弱 ($P<0.01$), 心肌 III 型胶原蛋白表达显著增强 ($P<0.01$); 低剂量组心肌 I 型胶原蛋白表达明显减弱 ($P<0.05$), 心肌 III 型胶原表达明显增强 ($P<0.05$)。结论 葛根素中、低剂量能够降低 DHF 大鼠心肌僵硬程度, 其作用机制与心肌 I 型胶原、III 型胶原的表达有关。

关键词: 葛根素; 舒张性心力衰竭; 心肌僵硬; I 型胶原; III 型胶原

中图分类号: R285.5; R286.2 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2012)03 - 0204 - 05

Effects of puerarin on stiffness in myocardium and expression of collagen type I and III in diastole heart failure rat models

ZHANG Xiao-dan¹, BAI Sheng-nan¹, ZHANG Cai-xia², ZHANG Tian-yi¹

1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Harbin Red Cross Central Hospital, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To study the effects of different doses of puerarin on stiffness in myocardium and expression of collagen type I and III in diastole heart failure (DHF) rat models. **Method** DHF models were established by narrowing abdominal aorta in wistar rats. Four weeks after operation, DHF rats were divided into four groups randomly as follows, model group, puerarin high-, mid-, and low-dose groups (180, 120, 80 mg/kg), and sham operation group ($n=10$). After four-week administration, the stiffness of rat cardiac (K) was calculated by hemodynamics which measured by 16 physiologic recorder. The expression of collagen type I and III was examined by immunohistochemical method. **Results** Compared with model group, K of the puerarin high-dose group did not change ($P>0.05$), K of the mid-dose group was significantly lower ($P<0.01$), K of the low-dose group was significantly lower ($P<0.05$). Compared with model group, the expression of collagen type I was significantly decreased ($P<0.05$), type III was significantly enhanced ($P<0.05$) in puerarin high-dose group. The expression of collagen type I was significantly decreased ($P<0.01$), type III was significantly enhanced ($P<0.01$) in puerarin mid-dose group. The expression of collagen type I was decreased significantly ($P<0.05$), type III was significantly enhanced ($P<0.05$) in puerarin low-dose group. **Conclusion** Puerarin of middle and low doses could improve myocardial stiffness of DHF rats, and its mechanism is related with the expression of collagen type I and III.

Key words: puerarin; diastole heart failure; stiffness in myocardium; collagen type I; collagen type III

舒张性心力衰竭 (distolic heart failure, DHF) 是指在心室收缩功能正常的情况下, 心室的松弛性和顺应性减低, 心室充盈量减少和充盈压升高导致肺循环或体循环瘀血而出现的临床综合征^[1]。以往的

收稿日期: 2012-02-09

作者简介: 张晓丹, 教授, 博士, 研究方向是心血管药理。Tel: (0451)84603230

*通讯作者 柏胜男 Tel: 13644568451 E-mail: abaidada@163.com

研究普遍采用左心室舒张末压和心室内压最大下降速率两种指标来评价左心室整体舒张功能。但是近年来,越来越多的研究显示心肌僵硬度常数在评价左心室舒张功能方面优于以上两种指标^[2-3]。心肌僵硬度增加是 DHF 舒张功能障碍的重要因素之一。研究证明, DHF 时心肌间质及血管周围胶原蛋白异常表达,导致心肌代谢异常,僵硬度增加,最终引发心室舒张功能障碍^[4]。

葛根素是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根中提取的单体,有效成分为 4,7-二羟基 8-β-D-葡萄糖吡喃糖异黄酮^[5]。葛根素可降低心肌纤维化模型大鼠的左心指数和心肌组织中羟脯氨酸水平,同时还可减少心肌间质胶原沉积^[6-8],提示葛根素能够通过抑制心肌胶原蛋白的异常表达来拮抗心肌组织的纤维化从而降低心脏的后负荷,改善心室舒张功能^[9]。本实验给予 DHF 大鼠不同剂量的葛根素,观察葛根素对 DHF 模型大鼠心肌僵硬度和心肌组织胶原蛋白 I 型、III 型表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂与仪器

Wistar 大鼠,8~10 周龄,50 只,雌雄各半,吉林大学白求恩医学院动物实验中心提供;动物批号:SCXK[吉 2007-0003]。饲料为标准合成大鼠饲料。

葛根素(西安艾沃生物科技有限公司生产,质量分数≥99%);胶原蛋白 I 型一抗(批号:BA0325)、胶原蛋白 III 型一抗(批号:BA0326)和第二步法免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

BIOPAC 十六导生理记录仪(美国 Biopac 公司);SM2000R 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);显微镜照相系统(厦门麦克奥迪)。

1.2 DHF 大鼠模型的建立

采用腹主动脉缩窄法制作 DHF 大鼠模型^[10]。大鼠用 ip 3%戊巴比妥钠以 3 μL/g 麻醉,使之仰卧并固定于大鼠手术台上,腹部去毛消毒,剑突下腹正中切口,分层打开腹腔,在肾动脉分支以下钝性游离腹主动脉,将 9 号注射器针头平行置于腹主动脉上,用 4 号手术丝线将腹主动脉和 9 号针头一同结扎,然后缓慢将针头撤出,使大鼠腹主动脉直径减少 35%~40%,关腹,逐层缝合。

1.3 分组及给药

手术后 4 周,将模型大鼠随机分为 4 组,每组 10 只,分别为模型组[ip 0.9%生理盐水 5 mL/(kg·d)],葛根素高、中、低(分别 ip 180、120、80 mg/kg)

剂量组^[11-12],葛根素的溶剂为生理盐水,给药容积为 5 mL/(kg·d)。连续 4 周;造模时另取同源大鼠 10 只作为假手术组,假手术组只开腹游离腹主动脉,但不缩窄,其他操作与手术组完全相同,4 周后,ig 0.9%生理盐水 5 mL/(kg·d),连续 4 周。

1.4 血流动力学指标测定及心肌僵硬度的计算

ip 3%戊巴比妥钠 3 μL/g 麻醉大鼠,分离出右颈总动脉,用连有十六导生理记录仪的超微型心导管经右颈总动脉插至左心室内,测得左室内压最大下降速率、左心室舒张末期内压(LVEDP)、左心室收缩压(LVSP)。Chung 等^[13]从生理学和运动学建模的角度,认为心脏作为一个压力和容积输出具有确定的位相关系的振荡器而发挥功能,从而提出推导心肌僵硬度常数(myocardial stiffness constant, K)的方法,即:

$$K = [-(dp/dt)_{\max}]^2 / (P_S - P_E)$$

其中 $-(dp/dt)_{\max}$ 为心室内压最大下降速率, P_S 为左心室收缩压, P_E 为左心室舒张末压

1.5 心肌组织 I 型、III 型胶原蛋白的表达^[14-15]

DHF 大鼠心肌组织经常规方法石蜡包埋、脱蜡、水化、煮沸法修复,按照第二步法免疫组化试剂盒说明操作,取出切片,蒸馏水洗后, PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加封闭液(5% BSA),室温 10 min 后弃之;滴加适当稀释的一抗(胶原蛋白 I 型一抗、胶原蛋白 III 型一抗,效价 1:50);PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加聚合 HRP 标记抗鼠 IgG,37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色,自来水冲洗后苏木素复染、盐酸酒精分化、脱水、封片,显微镜观察。应用 Image Pro Plus 6.0 软件进行图像分析^[16]。

1.6 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两均数比较用 t 检验,多组均数的比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),所有统计学处理均由 SPSS13.0 软件完成。

2 结果

2.1 葛根素对 DHF 大鼠血流动力学和心肌僵硬度的影响

与假手术组比,模型组收缩功能指标 LVSP 无显著变化,而舒张功能指标 LVEDP 显著升高($P < 0.01$), $-(dp/dt)_{\max}$ 明显降低($P < 0.05$),计算的心肌僵硬度显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,葛根素高剂量组 LVSP 无明显变化, LVEDP 明显降低($P < 0.05$), $-(dp/dt)_{\max}$ 明显升高($P < 0.05$),心肌

僵硬度无明显变化；葛根素中剂量组 LVSP 无明显变化，LVEDP 明显降低 ($P < 0.05$)， $-(dp/dt)_{max}$ 明显升高 ($P < 0.05$)，心肌僵硬度显著降低 ($P <$

0.01)；低剂量组 LVSP 无显著变化，LVEDP 明显降低 ($P < 0.05$)， $-(dp/dt)_{max}$ 明显升高 ($P < 0.05$)，心肌僵硬度明显增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 葛根素对大鼠血流动力学和心肌僵硬度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of puerarin on hemodynamics and myocardial stiffness ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	$+(dp/dt)_{max}$ /(mmHg)	LVSP/mmHg	LVEDP/mmHg	K
假手术	—	5 140.54 ± 649.74	141.43 ± 5.46	2.56 ± 0.35	1 370.25 ± 4.36
模型	—	5 042.15 ± 565.721*	142.76 ± 2.39	10.12 ± 0.22**	1 462.30 ± 6.58**
葛根素	180	5 354.73 ± 761.243 [▲]	146.81 ± 8.26	7.16 ± 0.83 [▲]	1 465.26 ± 7.16
	120	5 233.54 ± 322.523 [▲]	145.04 ± 6.28	4.23 ± 0.25 [▲]	1 381.40 ± 5.28 ^{▲▲}
	80	5 260.32 ± 262.543 [▲]	146.58 ± 8.65	6.79 ± 0.63 [▲]	1 416.03 ± 7.35 [▲]

1mmHg=0.133 kPa 与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$, 表 2 同

1mmHg=0.133 kPa * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sham operation group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group, same as Table 2

2.2 葛根素对 DHF 大鼠心肌组织 I 型、III 型胶原表达的影响

与假手术组相比，模型组心肌 I 型表达显著增强 ($P < 0.01$)，III 型胶原明显减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较，葛根素高剂量组心肌 I 型胶原蛋白表达明显减弱 ($P < 0.05$)，心肌 III 型表达胶原明显增强 ($P < 0.05$)；中剂量组心肌 I 型胶原蛋白表达显著减弱 ($P < 0.01$)，心肌 III 型胶原蛋白表达显著增强 ($P < 0.01$)；低剂量组心肌 I 型胶原蛋白表达明显减弱 ($P < 0.05$)，心肌 III 型胶原表达明显增强 ($P < 0.05$)。见表 2 及图 1、2。

表 2 葛根素对 DHF 大鼠心肌组织 I、III 型胶原表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of puerarin on expression of myocardial tissue collagen type I and III ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	胶原 I/%	胶原 III/%
假手术	—	3.34 ± 0.42	3.39 ± 0.21
模型	—	5.45 ± 0.67**	2.18 ± 0.17*
葛根素	180	4.82 ± 0.35 [▲]	2.76 ± 0.32 [▲]
	120	3.41 ± 0.38 ^{▲▲}	4.68 ± 0.31 ^{▲▲}
	80	4.65 ± 0.46 [▲]	3.27 ± 0.14 [▲]

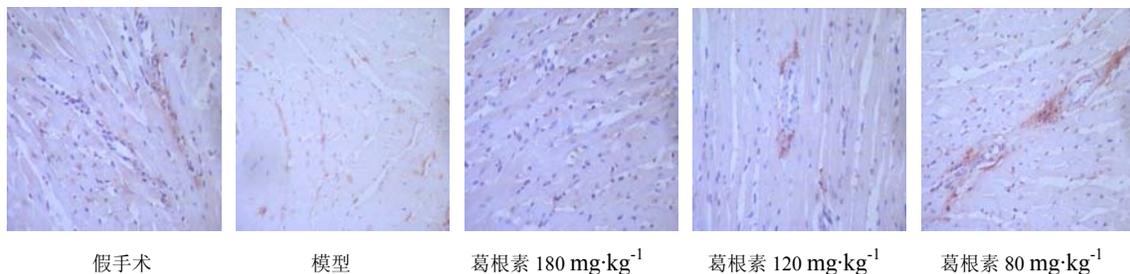


图 1 葛根素对 DHF 大鼠心肌胶原蛋白 I 型表达的影响

Fig. 1 Effect of puerarin on expression of myocardial tissue collagen type I in DHF rats

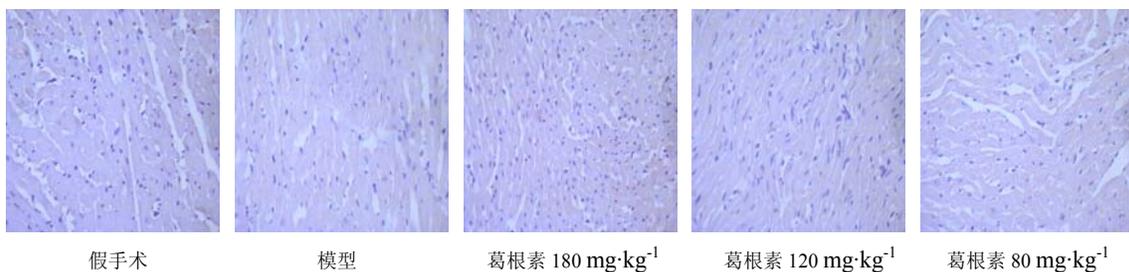


图 2 葛根素对 DHF 大鼠心肌胶原蛋白 III 型表达的影响

Fig. 2 Effect of puerarin on expression of myocardial tissue collagen type III in DHF rats

3 讨论

将腹主动脉部分缩窄可造成心脏后负荷增加, 当心脏血流动力长期超负荷时, 心肌细胞肥大, 且伴有间质胶原增生, 进而导致心肌僵硬增加、心肌纤维化, 最终引发心室舒张功能障碍^[17]。左心室舒张中晚期涉及缓慢充盈期和心房收缩期两个时期, 与舒张早期的主动充盈不同, 心室舒张中晚期的充盈完全是一个被动的过程, 期间影响心室舒张功能的主要因素是心肌的僵硬程度。心肌僵硬程度常数作为评估心肌僵硬度的重要参数, 能够衡量心室的被动舒张功能^[18]。

既往, 心脏间质成分改变对 DHF 的意义未受到重视。自 1981 年, Borg^[19]等首次提出心脏胶原这个概念以后, 人们才逐渐认识到心脏细胞间质中的胶原在心力衰竭发生、发展中起着重要作用。I 型胶原和 III 型胶原是心肌细胞外基质中的主要结构蛋白, 是构成心肌间质的主要成分, 也是心肌僵硬度的决定因素^[20-21]。Weber^[22-23]发现 I 型胶原的纤维较粗、弹性小、硬度大、抗张力性强, 为心肌细胞伸长提供能量, 与心室壁和血管壁的抗张性关系较大; III 型胶原纤维纤细、富有弹性, 能维持心肌细胞适度回缩, 保证心脏舒张的协调, 与心室和血管壁的可扩张性关系较大, 是心肌间质胶原中具有弹性伸张能力的主要成分。DHF 发生时, 粗大僵硬的 I 型胶原纤维充斥组织, 以加强心肌强度, 抵抗心脏后负荷, 导致网状纤维大量减少和结构破坏, 心肌质地坚硬而丧失弹性; 同时回弹力较强的 III 型胶原表达减弱, 心室被动回弹能力下降、僵硬程度增大, 心肌顺应性下降, 从而使心脏舒张功能障碍, 最终发生心力衰竭^[24]。葛根素对心肌顺应性有逆转作用^[25]。基础和临床实验均证明, 葛根素能降低心脏后负荷, 改善心功能, 扩张冠状动脉, 有效地改善冠脉循环, 改善缺血心肌的血流动力学, 同时能修复内皮功能, 缓和地降低心率, 进而降低心肌的耗氧量, 且无明显负性肌力作用^[26-28]。

本实验研究了不同剂量的葛根素对 DHF 大鼠心肌僵硬程度及心肌胶原蛋白 I 型、III 型表达的影响。结果发现, 与假手术组相比, DHF 模型组大鼠的左心室舒张末压显著升高、心室内压最大下降速率明显降低, 心肌僵硬程度增加, 同时心肌胶原蛋白 I 型、III 型表达异常, 提示 DHF 心肌僵硬程度增加很可能与心肌胶原蛋白 I 型、III 型的表达异常有关。与模型组相比, 葛根素中剂量组左心室舒张末压显著降

低, 心室内压最大下降速率显著升高, 心肌僵硬程度显著降低, 同时心肌胶原蛋白 I 型表达显著降低, III 型表达显著增强, 以上的研究结果提示, 一方面, 葛根素有可能通过降低心肌胶原蛋白 I 型的表达, 使心肌强度降低, 减少了心肌舒张的阻力, 另一方面通过增强心肌胶原蛋白 III 型的表达, 提高心肌细胞的弹性张力, 恢复、维持心肌细胞之间的相互连接、排列, 并提供支持为心肌的主动舒张提供能量。葛根素通过对这两种胶原蛋白亚型表达的影响, 从而降低心肌僵硬程度, 改善左室的舒张功能, 缓解、甚至逆转大鼠 DHF 的进展, 葛根素低剂量组能降低心肌僵硬程度, 但作用不如中剂量组。同时本实验表明与模型组比较, 葛根素高剂量组 I 型胶原蛋白表达增强, III 型胶原蛋白表达减弱, 但新机将硬度值无明显变化, 具体机制尚不明确, 可能与高剂量的葛根素影响了心肌胶原蛋白其他亚型或心肌细胞内其他相关蛋白的表达有关。为了进一步研究葛根素对 DHF 心肌僵硬程度、心肌胶原蛋白 I 型、III 型影响的作用机制、对心肌细胞内相关蛋白表达的影响及对心肌组织其他亚型胶原蛋白表达的影响等问题今后应深入探讨, 为临床应用葛根素治疗 DHF 奠定理论基础。

参考文献

- [1] 马志敏, 李继敏. 舒张功能障碍和舒张性心力衰竭的新观点 [J]. 中国医药导刊, 2003, 5(5): 332-334.
- [2] Gill R M, Jones B D, Corbly A K, et al. Cardiac diastolic dysfunction in conscious dogs with heart failure induced by chronic coronary microembolization [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(6): H3154-H3158.
- [3] Zile M R, Baicu C F, Gaasch W H. Diastolic heart failure—abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(19): 1953-1959.
- [4] 焦东东, 李 箐, 郭 寒, 等. 川芎嗪对腹主动脉缩窄大鼠左室心肌 I 型、III 型胶原及其 mRNA 表达的影响 [J]. 微循环学杂志, 2010, 20(1): 7-9.
- [5] 段惠军, 刘淑霞. 葛根素对糖尿病大鼠肾功能及肾组织 MMP22 与 TIMP22 表达的影响 [J]. 药学学报, 2004, 39(7): 481.
- [6] 吴正红, 朱延勤, 严汉英, 等. 葛根素的溶解性及高分子聚合物助溶作用的研究 [J]. 江苏药学与临床研究, 1999, 17(1): 9-11.
- [7] 范小芳, 李继武. 葛根素对慢性低氧性肺动脉高压大鼠肺血管重构的影响 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(3): 348.

- [8] Zhang S, Ji G, Liu J. Reversal of chemical induced liver fibrosis in Wistar rats by puerarin [J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(7): 486.
- [9] 刘诗英, 王梦洪, 郑泽淇, 等. 葛根素对异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化和心肌结缔组织生长因子表达的影响 [J]. 临床心血管病杂志, 2008, 11(9): 129-132.
- [10] 蔡毅. 压力负荷诱导的舒张性心力衰竭动物模型建立与倍他乐克干预治疗 [D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2007.
- [11] 张晓丹, 张琪, 渠永清, 等. 中药葛根素对 Adr 所致不同时段心肌线粒体损伤的保护 [J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 35-38.
- [12] 陈秀芬, 雷康福, 董敏, 等. 葛根素对糖尿病大鼠心肌损伤的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(4): 650-655
- [13] Chung C S, Strunc A, Oliver R, et al. Diastolic ventricular-vascular stiffness and relaxation relation: elucidation of coupling via pressure phase plane-derived indexes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(5): H2415-H2423.
- [14] 丁美萍, 封菲, 胡海涛. 葛根素对脑缺血再灌注后核因子 kappaB 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2515-2518.
- [15] 孙旻弋, 桂双英, 吴丽. 芍药苷对肝纤维化大鼠肝脏星状细胞基质金属蛋白酶 13 及组织金属蛋白酶抑制因子 1 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1448-1452.
- [16] 满娜, 关海霞, 单忠艳, 等. 慢性碘过量对大鼠甲状腺功能及甲状腺过氧化物酶活性和钠碘同向转运体表达的影响 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86(48): 3420-3424.
- [17] Villarreal F J, Dilimann W H. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta1, Fibronectin, and collagen [J]. *Am J Physiol*, 1992, 262(6/2): 1861-1866.
- [18] Brutsaert D L, Sys S U. Relaxation and diastole of the heart [J]. *Physiol Rev*, 1989, 69(4): 1228-1315.
- [19] Borg T K, Caulfield J B. The collagen matrix of the heart [J]. *Fed Proc*, 1981, 40(7): 2037-2041.
- [20] Poole-Wilson P A, Colucci W S, Massie B M, et al. *Heart Failure* [M]. New York: Churchill Livingstone, 1992, 14-15.
- [21] Labeit D, Watanabe K, Witt C, et al. Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein thin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13718.
- [22] Weber K T, Brilla C G, Janicki J S. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors [J]. *Cardiovas Res*, 1993, 27: 341-348.
- [23] Weber K T. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1989, 13: 1637-1652.
- [24] 王文丽, 李孝生, 李文生. 川芎嗪对肝星状细胞基质金属蛋白酶 13 和金属蛋白酶组织抑制剂表达的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(11): 2075-2080.
- [25] Marijianowski M M, Teeling P, Becker A E. Remodeling after myocardial infarction in humans is not associated with interstitial fibrosis of noninfarcted myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 30(1): 76-82.
- [26] 狄灵, 于燕, 杨海侠. 葛根素对心血管病作用机制的研究进展 [J]. 中西医结合脑血管病杂志, 2009, 7(3): 213.
- [27] Hunt S A, Baker D W, Chin M H, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adults: executive summary [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38(7): 2101-2113.
- [28] 何孟国. 葛根素注射液的临床应用研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(5): 286-288.