

染料木素对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高血压的保护作用

金 峰, 祁 昊

河南省人民医院省直第一医院 高血压科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 研究染料木素对野百合碱引起的肺动脉高血压(PH)模型大鼠的降压作用及机制。方法 大鼠随机分组后, 模型组及染料木素组大鼠sc 50 mg/kg野百合碱制备PH模型, 对照组sc生理盐水。野百合碱注射后第3天, 染料木素低、中、高剂量组ig染料木素10、50、100 mg/kg, 对照组和模型组大鼠ig给予等体积生理盐水, 1次/d, 连续2周。末次给药后, 采用尾套法测量清醒大鼠尾部动脉血压; 小动物生理仪检测大鼠平均心室压和收缩压; 荧光实时定量PCR(RT-qPCR)检测血清白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)水平; 试剂盒测定大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)值及丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)和活性氧(ROS)水平。结果 与模型组比较, 染料木素50、100 mg/kg组动脉血压、右心室收缩压(RVSP)和右心室舒张末期压(RVEDP)均显著下降($P < 0.05$, 0.01); 染料木素10、50、100 mg/kg剂量均可显著降低大鼠血清中IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 的表达($P < 0.05$, 0.01); 染料木素10、50、100 mg/kg剂量组ROS和MDA水平显著降低, 而T-AOC和SOD水平显著增加($P < 0.05$, 0.01)。结论 染料木素对野百合碱诱导的PH大鼠具有降低血压的作用, 其机制可能与其阻断氧化应激有关。

关键词: 染料木素; 肺动脉高血压; 氧化应激; 炎症细胞因子; 野百合碱

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)04-0695-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.04.019

Protective effect of genistein on monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats by inhibiting oxidative stress

JIN Feng, QI Hao

The First Hospital directly subordinate to Province, Henan Province People's hospital, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To study the antihypertensive effect of genistein on monocrotaline-induced pulmonary hypertension (PH) in rats and its mechanism. **Methods** Rats in the model group and genistein treatment group were randomly divided into two groups. On the first day of the experiment, the rats in the model group and genistein treatment group were subcutaneously injected with monocrotaline at a concentration of 50 mg/kg. The rats in the control group were subcutaneously injected with normal saline. Fifth week after the administration, the rats in the genistein treatment group were orally given genistein of 10, 50, 100 mg/kg. Then the rats in the control group and the model group were randomly divided into two groups and given distilled water or genistein orally to record blood pressure and renal sympathetic nerve activity. The effects of genistein on blood pressure, right ventricular systolic pressure, right ventricular mean pressure and right ventricular hypertrophy index were detected; the effects of genistein on IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α and TGF- β in serum of rats were detected by PCR; the levels of ROS, MDA, T-AOC and SOD in serum were determined. **Results** Compared with the model group, the levels of arterial blood pressure, right ventricular systolic pressure (RVSP) and right ventricular end diastolic pressure (RVEDP) of Genistein 50, 100 mg/kg group decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01), and the levels of IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , TGF- β of Genistein 10, 50 and 100 mg/kg group in serum decreased significantly ($P < 0.05$, 0.01), the levels of ROS and MDA decreased of Genistein 10, 50 and 100 mg/kg group significantly, while the levels of T-AOC and SOD increased significantly ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Genistein can reduce blood pressure in hypertensive rats induced by monocrotaline, and the mechanism may be related to blocking oxidative stress.

Key words: genistein; pulmonary hypertension; oxidative stress; inflammatory cytokines

收稿日期: 2019-09-17

基金项目: 河南省卫计委科研基金项目(2018020783)

第一作者: 金 峰,男,本科学历,主治医师,主要从事高血压以及相关疾病研究。E-mail: 1099372244@qq.com

肺动脉高血压(Pulmonary hypertension, PH)是人体心肺疾病和几种全身性疾病的一种病态并发症。如果不及时治疗,它会迅速发展并致命^[1]。PH是一种高发病率和病死率的疾病,其特征是静息平均肺动脉压大于3.33 kPa。这与肺血管阻力增加有关,由于肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞的血管收缩和增殖增加所致。肺动脉压力的持续增加导致右心室的工作量增加,导致右心室肥厚,并最终导致右心衰竭和死亡^[2]。目前寻找安全、高效、低毒的降血压药是高血压病的研究重点。慢性炎症、氧化应激和交感神经紧张等是高血压发展和随后并发症的关键因素^[3]。炎症和氧化应激在高血压的形成和发展过程中具有重要作用,并可影响整个心血管系统^[4],例如通过NF- κ B活化的促炎性细胞因子(PICs)表达增加而导致以PICs的产生为主要特征的炎症过程,如白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等,均可影响高血压的发生^[5]。目前,用于治疗PH的药物有磷酸二酯酶5型抑制剂,如西地那非;前列环素类似物,如环氧丙烷;内皮素受体拮抗剂,如波生坦;口服抗凝剂和钙通道阻滞剂,如硝苯地平 and 地尔硫卓等^[6-8]。不过这些药物在PH的治疗中都不太理想,寻找和发现PH新的治疗药物迫在眉睫。

染料木素存在于多种豆科植物中,是常见的异黄酮类化合物^[9],已知具有抗肿瘤、抑菌、降血脂、雌激素样作用。近年来研究发现,染料木素在包括癌症、神经退行性疾病、心血管系统疾病等在内的恶性疾病治疗中可能发挥重要的作用,受到人们的普遍关注,但对其作用机制仍缺乏全面的了解^[10-11]。本研究通过建立PH大鼠模型,评价染料木素降血压的活性,测定其对大鼠体内IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、转化生长因子- β (TGF- β)水平等的影响,为揭示染料木素的降压活性和作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

健康成年SD大鼠,雌雄各半,SPF级,体质量180~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2015-0004。所有大鼠均饲养于河南省人民医院省直第一医院实验动物中心,饲养室温度25~28℃,相对湿度50%,光照周期12 h,可自由进食和饮水。各项动物实验均遵循实验动物伦理要求和管理条例。

1.2 药物与主要试剂

染料木素,美国Sigma公司,批号G6649;野百合碱,美国Sigma公司,批号C2401;总RNA提取试剂盒,德国Macherey-nagel公司;PrimeScript™ RT试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™试剂盒,日本Takara公司;氧化应激指标检测试剂盒,艾美捷科技有限公司。

1.3 主要仪器

MP160型16通道小动物生理仪,美国BIOPAC公司;Muromachi MK2000ST尾套法血压测定仪,香港生科仪有限公司;5424R小型高速离心机,德国Eppendorf公司;光栅型微孔板读数仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;伯乐T100型梯度PCR仪,美国Bio-Rad公司;UX4200S圆盘型小动物用动物天平,日本岛津公司。

2 方法

2.1 分组与造模

大鼠适应性饲养1周后,随机分为对照组10只和造模组50只。造模组大鼠背部sc 50 mg/kg野百合碱,野百合碱50 mg/kg剂量诱导的大鼠PH模型更为接近理想数值,成熟稳定,不会出现假阳性现象^[12-14]。对照组大鼠背部sc等量0.9%NaCl溶液。

2.2 药物干预

将造模组大鼠随机分为模型组和染料木素高、中、低剂量(10、50、100 mg/kg)组,每组10只。野百合碱注射后第3天,染料木素各组大鼠分别ig给药,对照组和模型组大鼠ig给予等体积生理盐水,每天1次,连续2周。

2.3 检测指标与方法

2.3.1 血压测定 末次给药后,采用尾套法测量清醒大鼠尾部动脉血压,重复测量3次,取平均值^[15]。

2.3.2 血流动力学指标测定 将大鼠固定在手术台上,用酒精擦拭腹部皮肤,仔细切开上腹部的腹部皮肤,切勿切破隔膜,用小针头从腹部向右心室方向插入心脏,连接压力计的压力换能器,将信号传送到16通道小动物生理仪,记录右心室收缩1 min,并计算平均心室压和收缩压。

2.3.3 氧化应激水平测定 大鼠眼眶取血,各组血清样本在蛋白酶抑制剂作用下超声溶解,以4 000 r/min离心5 min,收集上清液进行分析。采用蛋白测定试剂盒测定上清液蛋白浓度。参照试剂盒说明书的操作步骤,分别检测各组血清样本中总抗氧化能力(T-AOC)和超氧化物歧化酶(SOD)水平以及丙

二醛(MDA)和活性氧(ROS)含量。

2.3.4 荧光实时定量PCR(RT-qPCR)检测基因表达 取大鼠右心室组织置于研钵中,加入Trizol提取总RNA,加入逆转录酶进行逆转录制备cDNA。以 β -actin为内参,进行荧光定量PCR扩增以检测各组大鼠右心室组织中IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β mRNA的表达水平。反应条件:95℃预变性15 min;95℃变性10 s,60℃退火20 s,72℃延伸25 s,40个循环。扩增引物由上游引物和下游引物合成,引物序列见表1所示。各组均设3个复孔。

表1 PCR引物
Table 1 PCR primers

基因	引物序列
IL-6	上游引物 5'-TGGCTGAAAAAGATGGATGCT-3' 下游引物 5'-TCTGCACAGCTCTGGCTTGT-3'
IL-8	上游引物 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATTTC-3' 下游引物 5'-TGGTCCACTCTCAATCACTCTCA-3'
IL-1 β	上游引物 5'-CCTGTCCTGCGTGTGAAAGA-3' 下游引物 5'-GGGAAGTGGCAGACTCAAA-3'
TNF- α	上游引物 5'-TGAGCCCATGTTGTAGCAAACC-3' 下游引物 5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAGGTA-3'
TGF- β	上游引物 5'-CGCCAGAGTGGTTATCTTTTGA-3' 下游引物 5'-CGGTAGTGAACCCGTTGATGT-3'
β -actin	上游引物 5'-TGGAACGGTGAAGGTGACAG-3' 下游引物 5'-GGCTTTTAGGATGGCAAGGG-3'

2.4 统计学方法

应用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。

3 结果

3.1 染料木素显著降低PH大鼠的平均动脉压

给药2周后,各组大鼠体质量无显著差别。模型组大鼠动脉血压显著高于对照组($P < 0.05$)。染料

木素处理后,动脉血压明显下降,中、高剂量组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表2。

表2 染料木素对PH大鼠体质量及动脉压的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of genistein on body mass and mean arterial blood pressure in rats fed with high salt and low salt diet ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	动脉压/mmHg
对照	—	325±28	94±8
模型	—	329±23	137±16 [#]
染料木素	10	327±22	132±15
	50	322±25	118±11 [*]
	100	326±27	98±9 [*]

与对照组比较:[#] $P < 0.05$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ (1 mmHg=133.32 Pa)

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group(1 mmHg=133.32 Pa)

3.2 染料木素对PH大鼠的血流动力学参数的影响

与对照组比较,PH大鼠右心室收缩压(RVSP)和右心室舒张末期压(RVeDP)显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,染料木素50、100 mg/kg给药显著降低RVSP和RVeDP($P < 0.05, 0.01$),且具有明显的剂量相关性。在所有组别中,没有观察到左心室收缩压(LVSP)的显著变化,表明左心室功能没有明显变化(表3)。

3.3 染料木素降低PH大鼠血清IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 水平

与对照组比较,模型组大鼠IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 表达显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较,染料木素处理可显著降低大鼠血清中IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 的表达($P < 0.05, 0.01$)。见图1。

表3 染料木素对PH大鼠血流动力学参数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of genistein on hemodynamic parameters of PH rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LVSP/mmHg	RVSP/mmHg	RVeDP/mmHg
对照	—	71.67±4.2	22.07±0.6	3.86±0.3
模型	—	74.96±5.9	34.01±2.0 [#]	11.77±2.0 [#]
染料木素	10	72.06±4.5	30.11±2.5	9.85±1.8
	50	71.60±4.2	23.52±2.9 [*]	4.34±0.9 ^{**}
	100	73.17±3.5	18.57±2.3 [*]	3.12±0.8 ^{**}

与对照组比较:[#] $P < 0.05$;与模型组比较:^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ (1 mmHg=133.32 Pa)

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group(1 mmHg=133.32 Pa)

3.4 染料木素降低PH大鼠体内的活性氧水平

与对照组比较,模型组大鼠体内ROS水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,染料木素10、50和100 mg/kg组ROS水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。见图2。

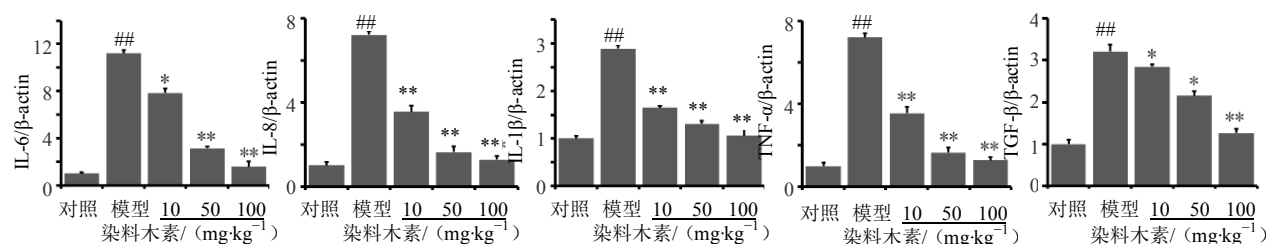
3.5 染料木素减轻PH大鼠血清氧化应激相关因子的水平

如图2所示,与对照组比较,PH大鼠血清内MDA水平显著升高,而T-AOC和SOD水平显著降

低($P<0.01$)。与模型组比较,染料木素处理后,MDA水平显著降低,而T-AOC和SOD水平显著增加($P<0.05$ 、 0.01),均呈剂量相关性。

4 讨论

虽然PH的发病机制尚不明确,最近的证据表明炎症因子在心血管疾病包括高血压的发展中发挥重要作用^[16]。野百合碱诱导的大鼠PH已成为PH的经典动物模型,在PH的研究中得到了广泛的应用。然而,野百合碱诱导PH的机制尚不完全清楚。

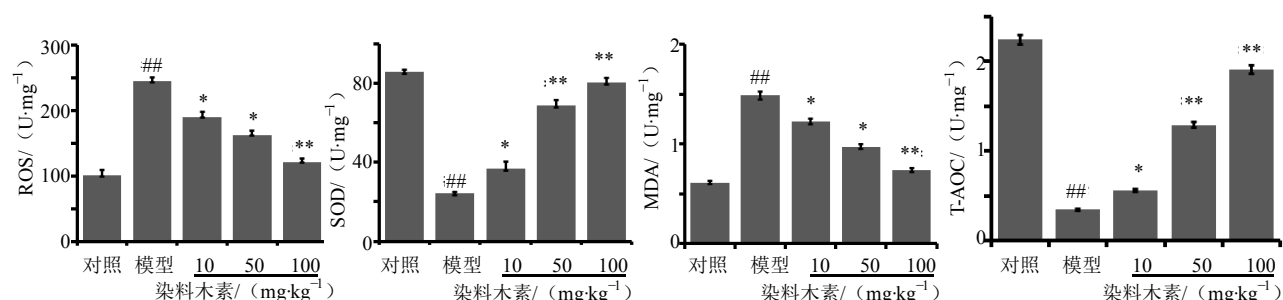


与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$

$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

图1 染料木素对PH大鼠血清中的炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effect of genistein on inflammatory factors in serum of pH rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)



与对照组比较:## $P<0.01$;与模型组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$

$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

图2 染料木素对PH大鼠血清中ROS、SOD、MDA、T-AOC产生的影响

Fig. 2 Effect of genistein on ROS, SOD, MDA and T-AOC in serum of pH rats

野百合碱本身没有生物活性。它在吸收血液后具有生物活性,并在肝脏中代谢成细胞毒性吡咯嗪。热解素通过肺部血流可损伤肺血管内皮细胞和血管内皮屏障功能,使弹性蛋白酶、凝血酶等蛋白酶渗入血液,引起炎症细胞浸润受累动脉周围。炎症反应在野百合碱所致PH的发生发展中起重要作用^[17]。

本研究发现,经过野百合碱处理后的大鼠与对照组大鼠比较,血压显著升高,血管重塑是PH的重要病理特征,导致PH的发生。肺血管阻力增加,肺动脉平滑肌细胞和/或内皮细胞明显增殖,增加肺循环阻力,又增加RVSP,作为对这种增加的阻力的补偿反应。因此,在许多动物研究中,RVSP的增加被

用作PH的替代标记^[18]。染料木素剂量相关地降低PH大鼠体内RVSP和RVeDP的升高。PH模型组炎症细胞浸润、促炎细胞因子水平升高,血清促炎细胞因子水平也显著升高。炎症前细胞因子如IL-6、IL-8和TNF等水平升高,进一步促进其他细胞因子的合成和血管内皮黏附分子的表达,触发炎症级联反应,最终促进血管平滑肌细胞增殖^[19]。一些趋化因子,如分形因子,不仅可以募集炎症细胞,而且可以直接促进血管平滑肌细胞增殖,在PH患者肺血管重构中发挥重要作用^[20]。流行病学研究表明,天然成分在预防人类疾病中起着重要作用。异黄酮类化合物在植物中普遍存在,许多已报道具有药性^[21]。其中染料木素具有很强的抗氧化活性,同

时可以调节炎症因子,本研究发现,染料木素降低了大鼠体内促炎性细胞因子IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β 的表达。

染料木素可显著降低由野百合碱诱导的大鼠血压升高,且该作用与抑制了体内氧化应激水平的激活有正相关性。这一新发现为临床应用染料木素提供了一定的参考,也为更合理使用染料木素及其制剂提供了新的依据。

参考文献

- [1] Bazan I S, Fares W H. Hypercoagulability in pulmonary hypertension [J]. Clin Chest Med, 2018, 39(3): 595-603.
- [2] Barberato S H. Right ventricular dysfunction in Lupus patients with pulmonary hypertension [J]. Arq Bras Cardiol, 2018, 111(1): 82-83.
- [3] Stenmark K R, Graham B B. Urocortin 2: will a drug targeting both the vasculature and the right ventricle be the future of pulmonary hypertension therapy [J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(8): 1057-1059.
- [4] Chen CM, Lin W, Huang LT, et al. Human mesenchymal stem cells ameliorate experimental pulmonary hypertension induced by maternal inflammation and neonatal hyperoxia in rats [J]. Oncotarget, 2017, 8(47): 82366-82375.
- [5] S  leby J, Bouzina H, Lundgren J, et al. Angiogenic and inflammatory biomarkers in the differentiation of pulmonary hypertension [J]. Scand Cardiovasc J, 2017, 1(5): 261-270.
- [6] Wu N, Yang G. Effect of sildenafil on pulmonary hypertension associated with left heart failure [J]. Biol Regul Homeost Agents, 2018, 2(3): 577-581.
- [7] Karpuz D, Hallioglu O, Buyukakilli B, et al. Clinical and histopathological relationship of sildenafil and bosentan treatments in rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension [J]. Bratisl Lek Listy, 2017, 118(9): 544-551.
- [8] Yang Y, Gao M, Guo Y, et al. Calcium antagonists, diltiazem and nifedipine, protect broilers against low temperature-induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling [J]. Anim Sci J, 2010, 81(4): 494-500.
- [9] Spagnuolo C, Russo G L, Orhan I E, et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions [J]. Adv Nutr, 2015, 6(4): 408-419.
- [10] Zhang L, Ma X, Dong Y. Effect of genistein on apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells and expression of apoptosis factors [J]. J BUON, 2018, 23(3): 641-646.
- [11] Colareda G A, Consolini A E. Low-flow ischaemia and reperfusion in rat hearts: energetic of stunning and cardioprotection of genistein [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70(9): 1174-1187.
- [12] 董丽君, 陈 鹏, 程江涛. 不同剂量野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的实验研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(10): 1172-1175.
- [13] Enache I, Favret F, Doutreleau S, et al. Downhill exercise training in monocrotaline-injected rats: Effects on echocardiographic and haemodynamic variables and survival [J]. Arch Cardiovasc Dis, 2017, 110(2): 106-115.
- [14] 马秀涛, 黄初生, 冯 旭, 等. 川牛膝醇提物对野百合碱诱导大鼠肺动脉高压的影响及机制研究 [J]. 微创医学, 2019, 14(3): 264-268.
- [15] Lee Y, Choi W, Lee D, et al. Correlation between caudal pulmonary artery diameter to body surface area ratio and echocardiography-estimated systolic pulmonary arterial pressure in dogs [J]. J Vet Sci, 2016, 17(2): 243-251.
- [16] Liu X, Tan H, Liu X, et al. Correlation between the expression of Drp1 in vascular endothelial cells and inflammatory factors in hypertension rats [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4): 3892-3898.
- [17] Yu W, Song X, Lin C, et al. Interventions and mechanisms of N-acetylcysteine on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(6): 5503-5509.
- [18] Mecoli C A, Shah A A, Boin F, et al. Vascular complications in systemic sclerosis: a prospective cohort study [J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(9): 2429-2437.
- [19] Boucherat O, Peterlini T, Bourgeois A, et al. Mitochondrial HSP90 accumulation promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(1): 90-103.
- [20] Collum S D, Chen N Y, Hernandez A M, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis attenuates pulmonary hypertension associated with lung fibrosis [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(19): 3284-3301.
- [21] Setchell K D R. The history and basic science development of soy isoflavones [J]. Menopause, 2017, 24(12): 1338-1350.