

• 药理与临床 •

苦参碱对压力超负荷大鼠心室重构的影响

韩向东, 彭秀文, 徐珊璐, 郭 娟, 顾伟梁, 陈长勋*

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘 要:目的 探讨苦参碱抗压力超负荷大鼠心室重构的作用及其作用机制。方法 用腹主动脉缩窄方法复制大鼠压力超负荷心室重构模型。设假手术组, 模型组, 苦参碱大、中、小剂量 (63、31.5、15.75 mg/kg) 组及阳性药 (美托洛尔 36 mg/kg、卡托普利 13.5 mg/kg) 组。给药 3.5 个月后测量心率 (HR)、动脉收缩压 (SBP)、动脉舒张压 (DBP)、平均动脉压 (MAP)、左室内压 (LVSP)、左室舒张末期压 (LVEDP)、左室内压上升下降最大速率 ($\pm dp/dt_{\max}$); 计算左心室质量/体重 (LVW/BW)、右心室质量/体重 (RVW/BW)、全心室质量/体重 (HW/BW); 用放射免疫方法测定左心室心肌肾素活性 (RA) 及血管紧张素 I (Ang I) 的量; 用免疫组织化学方法测定左心室心肌 I 和 III 型胶原蛋白的量; 用逆转录-聚合酶链反应法 (RT-PCR) 测定左心室心肌房利钠肽 (ANP) mRNA、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) mRNA 的表达。结果 苦参碱能显著降低压力超负荷致心室重构大鼠的 LVW/BW、HW/BW, 改善血流动力学参数, 降低左心室心肌 RA 及 Ang I 的量, 降低左心室心肌 I 和 III 型胶原蛋白的表达, 降低左心室心肌 ANP mRNA、TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达。结论 苦参碱具有抑制实验性心室重构的作用, 其机制与抑制心肌肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 激活, 降低左心室心肌 ANP mRNA 及 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达有关。**关键词:**苦参碱; 心室重构; 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS); 胶原蛋白; 基因表达
中图分类号:R286.2 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)04-0552-07

Effect of matrine on ventricular remodeling in press-overload rats

HAN Xiang-dong, PENG Xiu-wen, XU Shan-jun, GUO Juan, GU Wei-liang, CHEN Chang-xun
(College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanisms of matrine on ventricular remodeling in press-overload rats *in vivo*. **Methods** The press-overload ventricular remodeling was induced by abdominal aortic banding in rats. Ventricular remodeling model rats were randomly divided into the following groups: Sham group, press-overload model group, Metoprolol group (36 mg/kg), Captopril group (13.5 mg/kg) and matrine groups with various dosages 63, 31.5, and 15.75 mg/kg. After administration of the tested drugs for 3.5 months, HR, SBP, DBP, MAP, LVSP, LVEDP, and $\pm dp/dt_{\max}$ were recorded. The left ventricular renin activity (RA) and the content of Ang I were measured using radioimmunity assay. The content of type I and III collagen in left ventricle were determined using immunohistochemical analysis. The ratios of LVW/BW, RVW/BW, and HW/BW were calculated. The mRNA expression levels of ANP and TGF- $\beta 1$ in left ventricle were determined by RT-PCR. **Results** The experimental data demonstrated that matrine could significantly decrease the ratios of LVW/BW and HW/BW, reduce RA and the Ang I content in left ventricular muscle, decrease the protein expression of type I and III collagen, lessen the mRNA expression levels of ANP and TGF- $\beta 1$ in left ventricle. **Conclusion** Matrine could significantly attenuate the experimental ventricular remodeling. The mechanism is related with its ability to inhibit the activation of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and also associated with the reduction of the mRNA expression levels of ANP and TGF- $\beta 1$ in the left ventricle.

Key words: matrine; ventricular remodeling; renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS); collagen; gene expression

苦参碱 (matrine, MT) 是苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的重要成分, 苦参碱具有较为广泛的心血管药理作用, 其中对抗心律失常、调血脂及正性肌力作用的研究较为深入。体外研究发现苦参碱

收稿日期: 2006-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572379); 国家中医药管理局基金资助项目 (04DSZP30)

作者简介: 韩向东 (1970—), 男, 中药药理博士, 上海中医药大学方剂室讲师, 研究方向为中药心血管药理及方剂配伍规律研究。

Tel: (021) 51322186 E-mail: hanxd555@163.com

* 通讯作者 陈长勋 Tel: (021) 51322200 E-mail: cxchen6@126.com

能抑制醛固酮、血管紧张素Ⅰ(AngⅠ)诱导的离体心肌成纤维细胞的增殖^[1,2]。为进一步了解苦参碱的作用,本实验对苦参碱进行了抗压力超负荷诱导的心室重构的研究,发现苦参碱具有抑制实验性心室重构的作用。

1 材料

1.1 药品和试剂:苦参碱,质量分数98.89%,购自西安飞达生物技术有限公司。美托洛尔片,批号H32025391,阿斯利康制药有限公司。卡托普利片,批号H31021353,上海衡山药业有限公司。血管紧张素Ⅰ(AngⅠ)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)放射免疫分析药盒,北京北方生物技术有限公司。考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白免疫组化试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司。随机引物、溴化乙锭(EB),博采生物技术有限公司。Trizol, Gibco公司。Taq DNA聚合酶, Gibco公司。M-MLV反转录酶、RNasin核酸酶抑制剂, PROMEGA公司。焦碳酸二乙酯(DEPC),博采生物技术有限公司。4种三磷酸脱氧核苷酸(dNTP),北京天根生物科技有限公司。二硫苏糖醇(DDT), Amersco公司。DNA分子量标准参照物(Marker),北京天根生物科技有限公司。心房利钠肽(ANP)兔抗大鼠多克隆抗体、转化生长因子-β1(TGF-β1)兔抗大鼠多克隆抗体, Santa Cruz公司。β-肌动蛋白(β-actin)小鼠抗大鼠单克隆抗体,武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 溶液配制:0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),氯化钠8.5 g、NaH₂PO₄ 2.8 g、NaH₂PO₄ 0.4 g,加双蒸水至1 000 mL,调pH值为7.2~7.6。0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液:枸橼酸钠(C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) 3 g、枸橼酸(C₆H₈O₇·H₂O) 0.4 g加双蒸水至1 000 mL。上样缓冲液:溴酚蓝0.25%、二甲苯青0.25%、甘油50%、EDTA·Na₂ 1 mmol/L, pH 8.0。5×Tris-硼酸(TBE)缓冲液:Tris 54 g,硼酸27.5 g,并加入0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 20 mL,稀释至1 000 mL,高温高压消毒。1.6%凝胶:琼脂糖1.6 g、5×TBE 20 mL加双蒸水至80 mL,煮沸溶解,冷却至60℃左右,加入饱和溴化乙锭10 μL。DEPC处理水:0.5 mL DEPC加于500 mL双蒸水中,室温下摇匀过夜,加热消毒后密封保存。2×SDS凝胶加样缓冲液:100 mmol/L Tris·Cl (pH 6.9)、200 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)、4% SDS电泳级、0.2% 溴酚蓝、20% 甘油。

1.3 动物:清洁级雄性SD大鼠,200~220 g,上海

斯莱克试验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。

1.4 仪器:RM26000型八道生理记录仪,成都仪器厂;Olympus BX51正置显微镜,日本Olympus公司;同位素液闪仪,Perkin Elmer公司。752紫外可见分光光度计,上海第三分析仪器厂。FR-200紫外与可见光分析装置,上海复日科技。莱卡Jung RM2050轮转切片机、莱卡HI-1210D摊片机、莱卡HI-1210D烘片机,上海莱卡仪器有限公司。Sigma 2-16K冷冻离心机, Sigma公司。Centrifuge 5417R低温高速离心机,德国Eppendorf公司。

2 方法

2.1 大鼠压力超负荷心室重构模型制备:按Doering等^[3]方法行腹主动脉部分结扎术,造成持续性血流阻力增加,心脏负荷加重,导致心室重构。取200~220 g的雄性SD大鼠,手术前12 h禁食不禁水,戊巴比妥钠按40 mg/kg ip麻醉,待角膜反射消失后固定在手术台上,开腹,于右肾动脉上方用银铗(银铗内径为0.6 mm)不完全结扎腹主动脉,使腹主动脉外径缩小为0.6 mm,缝合腹壁,注射抗生素防止感染。设假手术组,动物开腹后仅分离右肾动脉上方腹主动脉,但不用银铗结扎,其余步骤与造模动物相同。将造模动物随机分为6组,即模型组,苦参碱大、中、小剂量组及阳性药(美托洛尔、卡托普利)组。造模后第7天开始,苦参碱大、中、小剂量组分别ig给予63、31.5、15.75 mg/kg苦参碱水溶液,美托洛尔组ig给予36 mg/kg美托洛尔水溶液,卡托普利组ig给予13.5 mg/kg卡托普利水溶液,给药体积均为5 mL/kg,模型对照组ig给予同体积的蒸馏水;连续给药3.5个月。

2.2 测定指标:3.5个月,禁食12 h,分别将各组大鼠称体重后,戊巴比妥钠按40 mg/kg ip麻醉,分离左右颈动脉,分别插入注有50 U/mL肝素钠溶液的PE-50聚乙烯导管,通过压力换能器与RM26000型八道生理记录仪相连,用RM6280C生物信号采集处理系统记录心电图及压力变化。测量心率(HR)、动脉收缩压(SBP)、动脉舒张压(DBP)、平均动脉压(MAP)、左室内压(LVSP)、左室舒张末期压(LVEDP)、左室内压上升下降最大速率(±dp/dt_{max})。血流动力学参数记录完毕后,剪取心脏,去除结缔组织及血管,清洁滤纸吸干水分后分别称取左心室(包括室间隔)、右心室(不包括室间隔)湿质量。在冰浴环境下将左心室于长轴中部偏下横断切成两段,将下段(含心尖的部分)放

入 10% 福尔马林溶液中固定。将上段左心室心肌分为 4 份, 每份 100 mg 左右, 冻存于液氮中, 然后移入 -70°C 冰箱内。

2.3 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠心重指数的影响: 计算左心室质量/体重 (LVW/BW)、右心室质量/体重 (RVW/BW) 和全心室质量/体重 (HW/BW)。

2.4 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠血流动力学的影响: 测量 HR、SBP、DBP、MAP、LVSP、LVEDP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 。

2.5 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌神经内分泌因子的影响: 用放射免疫方法测定左心室心肌肾素活性 (RA) 及血管紧张素 II (Ang II) 的量。用考马斯亮蓝蛋白测定方法进行蛋白定量。

通过分析心肌中血管紧张素 I (Ang I) 的产生速率, 测定心肌肾素活性 (RA)。即同一份样品取双份, 一份让其直接与抗体反应, 测其 Ang I 的浓度, 称为对照管; 另一份则在 37°C 温浴 1 h, 再让其与抗体反应, 测其 Ang I 的浓度, 称作测定管。按下式计算单位时间内 Ang I 的产生速率, 即为 RA。

$$RA = (\text{测定管浓度} - \text{对照管浓度}) / \text{样品温浴时间}$$

2.6 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌 I 和 III 型胶原蛋白的量的影响: 用免疫组织化学方法进行 I 和 III 型胶原蛋白染色。切片烘烤, 脱蜡脱水。30% H_2O_2 一份加蒸馏水 10 份混合, 室温 $5 \sim 10$ min 以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。热修复抗原: 将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 微波加热沸腾, 间隔 $5 \sim 10$ min, 反复 1~2 次, 冷却。磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2~7.6) 洗涤 1~2 次; 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min, 甩去多余液体, 滴加一抗 (I 或 III 型胶原蛋白一抗, 1:100 稀释), 37°C 孵育 2 h 左右; PBS (pH 7.2~7.6) 洗涤 2 min 共 3 次; 滴加试剂 SABC, $20 \sim 37^{\circ}\text{C}$ 放 20 min; PBS (pH 7.2~7.6) 洗涤 5 min, 共 4 次, 充分洗涤; 滴加 DAB 显色液 (1 mL 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各 1 滴), 显色 $5 \sim 30$ min。镜下控制反应时间。自来水冲洗 4 次, 蒸馏水洗 1 次, 苏木素复染 30 s, 自来水冲洗即可, 90% 盐酸 (分化胞浆中的苏木素) 冲洗, 自来水冲净。然后依次浸入 95% 乙醇、无水乙醇、二甲苯中 30 s, 自然干燥后树胶封片。

切片在 Olympus BX51 型显微镜下观察并摄片, 采用 Brilla 等^[4]描述的方法, 用 Lamage-Proplus 4.0 图像分析系统对图片进行分析, 每张标本随机测量 3 个视野, 测定 I、III 型胶原面积占总面积

积的比率, 即胶原容积分数 (CVF)。

2.7 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌 ANP mRNA、TGF- $\beta 1$ mRNA 表达的影响: 用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 测定左心室心肌 ANP mRNA、TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达。

2.7.1 左心室心肌组织 RNA 抽提: 取左心室心肌, 每组取 6 个心肌标本, 每个约 100 mg, 在冰浴环境中用剪刀剪碎, 加入 1 mL Trizol, 用玻璃匀浆器在冰水中快速匀浆, 移入 1.5 mL Eppendorf 管中, 22°C 水浴中静置 5 min; 加入氯仿 0.2 mL, 颠倒混匀后, 22°C 水浴中静置 3 min; 离心 (4°C , 15 000 r/min, 15 min), 取上清液 0.5 mL 移入另一 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 0.5 mL 异丙醇, 混匀, 22°C 水浴中静置 10 min; 离心 (4°C , 15 000 r/min, 10 min), 弃上清, 加入 1 mL 4°C 的用 DEPC 水配制的 75% 乙醇溶液, 离心 (4°C , 10 000 r/min, 5 min), 弃上清, 真空干燥 5 min, 用 40 μL DEPC 处理水溶解, 4°C 冰箱保存。

2.7.2 RNA 定量: 提前 30 min 预热紫外分光光度计, 双蒸水为对照管, 调 0 和 100, 取上述抽提的样本 RNA 各 5 μL 加入 1 mL 双蒸水, 充分混匀, 加入石英比色杯中, 读 260、280 nm 吸光度 (A) 值。当 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} \geq 1.8$ 时, 方可使用。

2.7.3 引物合成: 引物由上海生工生物技术有限公司合成。ANP 引物: 上游 5'-CAGGAAACGG-AAAGATTGG-3'; 下游 3'-ATGAAGTAATG-TGGCAGGGTC-5'; PCR 产物长度 528 bp, 退火温度 55°C 。TGF- $\beta 1$ 引物: 上游 5'-GGCGGTGCT-CGCTTTGTA-3'; 下游 3'-TTCCTCTGCCTTA-TGTCCCGA-5'; PCR 产物长度 425 bp, 退火温度 55°C 。 β -actin 引物: 上游 5'-CCGTAAAGACCTC-TATGCCAACA-3'; 下游 3'-TCGTCCTCATG-CTACTCAGGC-5'; PCR 产物长度 230 bp, 退火温度 55°C 。

2.7.4 反转录 (RT): Eppendorf 管中依次加入心肌组织总 RNA 3 μg , 10 mmol/L dNTP 1 μL , $5 \times$ buffer 4 μL , DTT (100 mmol/L) 1 μL , RNAase 抑制剂 (40 U/L) 1 μL , 随机引物 (100 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 加 DEPC 水至 18 μL , 25°C 静置 10 min, 然后在冰水中加入 M-MLV 反转录酶 (200 U/mL) 1 μL ; 37°C 、50 min, 70°C 、15 min 终止反应, 合成的 cDNA 4°C 保存。

2.7.5 聚合酶链式反应: Eppendorf 管中依次加入 RT 产物 (cDNA) 2 μL , $10 \times$ PCR 缓冲液 (含

Mg²⁺) 4 μ L, 上下游引物各 2 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.4 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 双蒸馏水 29 μ L。94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, ANP 的退火温度为 55 $^{\circ}$ C, 最适循环数 30 个循环, TGF- β_1 的退火温度为 55 $^{\circ}$ C, 最适循环数 30 个循环, β -actin 的退火温度为 55 $^{\circ}$ C, 最适循环数 30 个循环。72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 得 PCR 产物, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.7.6 取上述 PCR 产物 15 μ L 上样电泳 (每上样孔同时加入目的基因和看家基因各 15 μ L), 1.6% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 扫描仪扫描, 储存于电脑中进行扫描分析, 计算目的基因 RT-PCR 产物荧光强度与 β -actin 产物荧光强度比值, 作为目的基因 mRNA 的相对量。

2.8 统计学处理: 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数间的比较采用单因素方差分析方法, 两两比较采用 SNK 法; 若不符合方差分析条件时, 采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验 (先求出精确 P 值, 与调整后的检验水准进行比较, 判断两组间有无统计差异)。

3 结果

3.1 对压力超负荷心室重构大鼠心重指数的影响: 与假手术组相比, 模型组的 LVW/BW 及 HW/BW 明显增高, 差异显著 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的 LVW/BW 及 HW/BW 有明显降低, 差异显著 ($P < 0.01$) 见表 1。与假手术组相比, 模型组的 RVW/BW 没有明显增高 ($P > 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的 RVW/BW 没有显著差异 ($P > 0.05$), 见表 1。

3.2 对压力超负荷心室重构大鼠血流动力学的影响

表 1 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠心重指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of matrine on ratios of LVW/BW, RVW/BW, and HW/BW in press-overload ventricular remodeling rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	LVW/BW/ (mg · g ⁻¹)	HW/BW/ (mg · g ⁻¹)	RVW/BW/ (mg · g ⁻¹)
假手术	—	2.01 $\pm$ 0.18**	2.60 $\pm$ 0.21**	0.58 $\pm$ 0.04
模型	—	2.53 $\pm$ 0.14**	3.16 $\pm$ 0.14**	0.62 $\pm$ 0.05
美托洛尔	36	2.27 $\pm$ 0.15**	2.83 $\pm$ 0.18**	0.56 $\pm$ 0.04
卡托普利	13.5	2.32 $\pm$ 0.15**	2.90 $\pm$ 0.15**	0.58 $\pm$ 0.04
苦参碱	63	2.34 $\pm$ 0.11**	2.94 $\pm$ 0.14**	0.60 $\pm$ 0.06
	31.5	2.31 $\pm$ 0.11**	2.93 $\pm$ 0.14**	0.61 $\pm$ 0.05
	15.75	2.35 $\pm$ 0.13**	2.95 $\pm$ 0.14**	0.60 $\pm$ 0.05

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; ** $P < 0.01$ vs model group

响: 与假手术组相比, 模型组的 HR 明显增高, 差异显著 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 苦参碱大剂量组的 HR 明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组、卡托普利组、苦参碱中剂量组、苦参碱小剂量组的 HR 有所降低, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 2。与假手术组相比, 模型组的 SBP 明显增高, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组、卡托普利组、苦参碱大剂量组、苦参碱中剂量组的 SBP 明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 苦参碱小剂量组的 SBP 有所降低, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 2。与假手术组相比, 模型组的 DBP 有所增高, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组、卡托普利组、苦参碱大剂量组、苦参碱中剂量组、苦参碱小剂量组的 DBP 总体上有所降低, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 2。与假手术组相比, 模型组的 MAP 显著增高, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的 MAP 有所降低, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 2。与假手术组相比, 模型组的 LVSP 显著增高, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的 LVSP 有所降低, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 2。与假手术组相比, 模型组的 LVEDP 明显增高, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的 LVEDP 有所降低, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 2。与假手术组相比, 模型组的 $\pm dp/dt_{\max}$ 明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的 $\pm dp/dt_{\max}$ 均明显增高, 差异显著 ($P < 0.05$), 见表 2。与假手术组相比, 模型组的 $-dp/dt_{\max}$ 明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的 $-dp/dt_{\max}$ 均有所增高, 但差异无显著意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

3.3 对压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌神经内分泌因子的影响: 与假手术组相比, 模型组的左心室心肌 RA 及 Ang II 水平明显增高, 差异显著 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 美托洛尔组, 卡托普利组, 苦参碱大、中、小剂量组的心肌 RA 及 Ang II 明显降低, 差异显著 ($P < 0.01$), 见表 3。

3.4 对压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌 ANP mRNA 及 TGF- β_1 mRNA 表达的影响: 与假手术组相比, 模型组的左心室 ANP mRNA 表达明显增

表2 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of matrine on hemodynamics in press-overload ventricular remodeling rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	HR/ (次 · min ⁻¹)	SBP/ mmHg	DBP/ mmHg	MAP/ mmHg	LVSP/ mmHg	LVEDP/ mmHg	+dp/dt _{max} / (mmHg · s ⁻¹)	-dp/dt _{max} / (mmHg · s ⁻¹)
假手术	—	399.00±23.71*	167.47±25.28*	142.33±27.11	162.48±25.99*	191.97±23.00*	3.75±1.88*	11 561.10±2 048.31*	9 892.99±1 342.24*
模型	—	442.75±17.43#	251.56±19.87#	162.13±21.86	200.58±23.94#	239.98±29.60#	12.44±3.90#	8 040.37±1 172.31#	7 887.86±1 537.27#
美托洛尔	36	432.88±15.91	208.80±26.16*	153.66±15.40	179.33±19.87	203.21±24.96	8.69±3.19	11 300.66±1 505.58*	8 975.51±1 775.12
卡托普利	13.5	433.13±21.53	213.40±33.46*	147.09±22.66	177.48±25.75	213.55±32.39	6.81±4.82	10 186.34±1 776.86*	9 270.31±1 849.52
苦参碱	63	409.00±27.11*	218.13±33.34*	144.03±22.89	179.65±26.99	207.28±39.80	5.83±6.21	11 673.34± 904.75*	9 149.91± 928.95
	31.5	431.75±29.81	215.86±27.75*	144.85±21.23	177.30±23.98	217.49±30.80	9.87±5.92	11 352.08±1 584.24*	9 585.54±1 776.95
	15.75	423.25±37.89	222.24±41.86	166.19±34.29	193.71±36.44	222.58±43.80	7.81±5.83	10 271.54±2 865.79*	8 415.62±2 352.16

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: * $P<0.05$

$P<0.05$ vs Sham group; * $P<0.05$ vs model group

表3 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左室心肌 RA 和 Ang II 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of matrine on RA and Ang II in pressoverload ventricular remodeling rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	RA/ (pg · mg ⁻¹ · h ⁻¹)	Ang I / (pg · mg ⁻¹)
假手术	—	3.877±0.931**	258.445±30.852**
模型	—	9.812±6.841**	459.705±87.623**
美托洛尔	36	4.952±0.908**	334.994±72.573**
卡托普利	13.5	5.074±0.717**	327.873±47.637**
苦参碱	63	4.966±0.884**	333.696±65.648**
	31.5	5.038±1.226**	339.588±86.720**
	15.75	5.625±1.387**	396.964±79.110**

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group; ** $P<0.01$ vs model group

高,差异显著 ($P<0.01$);与模型组相比,美托洛尔组,卡托普利组,苦参碱大、中、小剂量组的左室 ANP mRNA 表达明显降低,差异显著 ($P<0.01$) 见表4,图1。与假手术组相比,模型组的左室 TGF- β 1 mRNA 表达明显增高,差异显著 ($P<0.01$);与模型组相比,美托洛尔组,卡托普利组,苦参碱大、中、小剂量组的左室 TGF- β 1 mRNA 表达明显降低,差异显著 ($P<0.01$) 见表4,图2。

3.5 对压力超负荷心室重构大鼠左室心肌 I 和 III 型胶原蛋白的量的影响

3.5.1 I 型胶原蛋白:①病理形态学观察:免疫组化染色使心肌间质的 I 型胶原纤维均呈现棕红色表达,苏木素复染使细胞核为淡蓝色,细胞质不着色。假手术组极少见棕红色 I 型胶原纤维表达,模型组可见大量的棕红色的 I 型胶原纤维表达;美托洛尔组,卡托普利组,苦参碱大、中、小剂量组的心肌 I 型胶原阳性表达较模型组为轻。② I 型胶原蛋白半定量分析:与假手术组相比,模型组的心肌 I 型胶原蛋白的量明显增高,差异显著 ($P<0.01$);与模型组相比,美托洛尔组,卡托普利组,苦参碱大、中、小剂量

表4 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左室心肌 ANP mRNA 及 TGF- β 1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of matrine on mRNA expression levels of ANP and TGF- β 1 in press-overload ventricular remodeling rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	ANP mRNA	TGF- β 1 mRNA
假手术	—	0.61±0.09**	0.52±0.11**
模型	—	2.09±0.17**	2.27±0.10**
美托洛尔	36	0.81±0.08**	0.75±0.06**
卡托普利	13.5	0.81±0.08**	0.71±0.09**
苦参碱	63	0.95±0.07**	0.78±0.07**
	31.5	0.95±0.09**	0.83±0.08**
	15.75	0.99±0.11**	0.92±0.12**

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group; ** $P<0.01$ vs model group

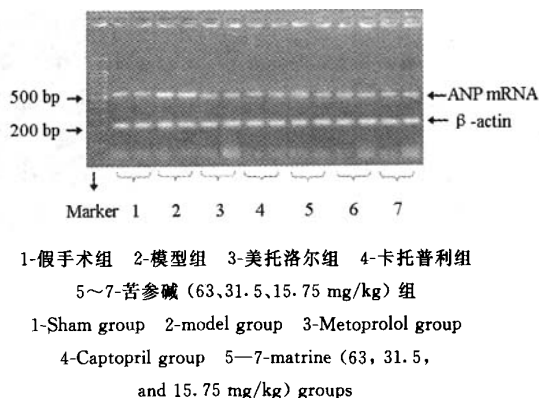
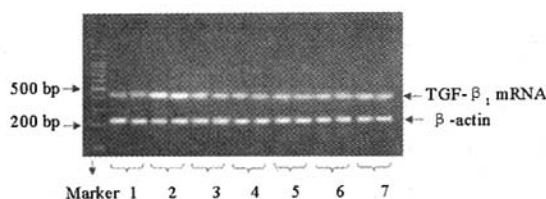


图1 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左室心肌 ANP mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of matrine on ANP mRNA expression in left ventricular muscle of press-overload remodeling rats

组的心肌 I 型胶原蛋白的量明显降低,差异显著 ($P<0.01$),见表5。

3.5.2 III 型胶原蛋白:①病理形态学观察:免疫组化染色使心肌间质的 III 型胶原纤维均呈现棕红色表达,苏木素复染使细胞核为淡蓝色,细胞质不着色。假手术组极少见 III 型胶原纤维表达,模型组可见大



1-假手术组 2-模型组 3-美托洛尔组 4-卡托普利组
5~7-苦参碱 (63,31.5,15.75 mg/kg) 组
1-Sham group 2-model group 3-Metoprolol group
4-Captopril group 5-7-matine (63, 31.5,
and 15.75 mg/kg) groups

图 2 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌 TGF-β1 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of matrine on TGF-β1 mRNA expression in left ventricular muscle of press-overload remodeling rats

量的棕红色的Ⅲ型胶原纤维表达;美托洛尔组,卡托普利组,苦参碱大、中、小剂量组的心肌Ⅲ型胶原阳性表达较模型组为轻。②Ⅲ型胶原蛋白半定量分析:与假手术组相比,模型组的心肌Ⅲ型胶原蛋白的量明显增高,差异显著 ($P<0.01$);与模型组相比,美托洛尔组,卡托普利组,苦参碱大、中、小剂量组的心肌Ⅲ型胶原蛋白的量明显降低,差异显著 ($P<0.01$),见表 5。

表 5 苦参碱对压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌Ⅰ和Ⅲ型胶原蛋白量的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of matrine on collagen I and III contents in left ventricular muscle of press-overload ventricular remodeling rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ⅰ型胶原/%	Ⅲ型胶原/%
假手术	—	6.57±0.96**	3.76±2.14**
模型	—	24.96±2.46**	11.56±3.02**
美托洛尔	36	12.81±2.14**	7.26±1.40**
卡托普利	13.5	12.27±2.11**	6.85±1.67**
苦参碱	63	14.15±1.91**	7.40±1.38**
	31.5	15.10±2.52**	7.52±1.77**
	15.75	17.55±2.29**	8.57±1.84*

与假手术组比较: ** $P<0.01$

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group

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

4 讨论

苦参始载于《本经》,列为上品,味苦,性寒,无毒。归心、肺、肾、大肠经。中国古代医籍中有苦参治疗心脏疾患的一些记载,如《肘后方》卷一中的苦参汤,方中用苦酒半升煎煮三两苦参,治疗“结胸,卒心腹痛”。苦参碱是苦参的重要成分,具有较广泛的心血管药理作用,如抗心律失常、降血脂及正性肌力作用,近年来体外研究发现,苦参碱能抑制醛固酮、

Ang II 诱导的离体心肌成纤维细胞 (CFb) 的增殖。

心脏长期负荷过重及神经内分泌的过度激活是引起心室重构的主要原因,心室重构发生发展过程中,始终伴随神经激素系统的激活,其中肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 的激活对心室重构的发生发展起着重要的作用,RAAS 不但存在于循环中,也存在于心肌局部,该系统的激活可以引起 Ang II 分泌增加,Ang II 的分泌增加可引起心肌胶原增生、心肌细胞肥大,进而导致心室重构^[5-9]。

本研究发现苦参碱能降低压力超负荷心室重构大鼠左心室心肌中 RA 及 Ang II,抑制Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的合成增加,并发现,苦参碱能通过抑制 RAAS 的激活而抑制心室重构。

ANP 是心房、心室肌及血管内皮细胞分泌的一类具有强烈利尿、利钠、扩血管及降低血压等作用的多肽激素,在人体中枢和外周的水盐平衡代谢方面起重要的作用^[10]。RAAS 激活可以引起心房分泌 ANP 增加,在本研究中发现 RAAS 激活时,ANP 同步增高,说明压力超负荷刺激 RAAS 的激活,使水钠潴留、血压升高,反射性地引起 ANP 分泌增加,但 ANP 增加所产生的作用还不足以完全抵消腹主动脉缩窄致心室重构模型所产生的一系列后果。ANP 常作为心室重构时衡量血浆容量和心房压力的指标,其水平与心力衰竭程度相平行。

TGF-β1 和 Ang II 与心室重构有密切关系,体外研究证实,在培养的大鼠 CFb 及心肌细胞中加入 Ang II,能诱导 TGF-β1 基因表达,从而促进成纤维细胞有丝分裂和Ⅰ、Ⅲ型胶原合成及心肌细胞的原癌基因表达,而血管紧张素Ⅱ1型受体 (AT1-R) 拮抗剂能抑制 Ang II 的上述作用,说明 Ang II 通过 AT1-R 调控 TGF-β1 表达而诱导心肌肥厚及纤维化^[11-13]。本研究显示,苦参碱可以降低心肌 TGF-β1 mRNA 的表达,这种作用可能是直接作用于 TGF-β1,也可能是作用于 Ang II,通过 AT1-R 介导间接作用于 TGF-β1,从而达以抑制心室重构的作用。

胶原是细胞外基质 (ECM) 中量最多的成分,心肌纤维化主要表现为胶原量的显著增加。已证实循环和心肌局部的 RAAS 共同参与心肌纤维化应答^[14]。在诸多血管活性物质中,Ang II 是 CFb 的一个重要的生长调节因子,它与 CFb 上的 AT1-R 结合后,可促发多条信号转导途径,引起 ECM 合成增加^[15]。心脏中的 TGF-β1 主要由心肌细胞和 CFb 产生,可促进多种 ECM 成分合成^[16]。Ang II 可促进 TGF-β1 表达,促进Ⅰ、Ⅲ胶原蛋白合成,血管紧张

素转换酶抑制剂 (ACEI) 或 AT1-R 拮抗剂可抑制这一过程, 用 TGF- β 1 的中和抗体可消除 Ang II 刺激胶原合成增加的作用, 因此, 也可认为 Ang II 促进 ECM 的合成作用是通过 TGF- β 1 介导完成的^[17,18]。

本实验结果表明, 苦参碱可以抑制 I、III 胶原蛋白的合成, 具有抑制心室重构的作用, 其机制可能与对 RAAS、ANP 及 TGF- β 1 的调节有关, 而确切的作用机制, 还有待于进一步的研究。

另外, 本研究结果显示, 心室重构模型组大鼠的 HR 明显加快、SBP 明显升高, 说明腹主动脉缩窄导致心脏后负荷的增加, 为心室重构模型成功的主要原因。心室重构模型组大鼠的 LVEDP 有一定程度升高, $\pm dp/dt_{\max}$ 降低, 说明模型组大鼠已经显示有一定心力衰竭的初期特征, 但还不是特别典型。本实验发现苦参碱能明显降低腹主动脉缩窄致心室重构大鼠的 HR、SBP, 同时显著升高 $\pm dp/dt_{\max}$, 因此, 不能排除苦参碱对血流动力学的改善在一定程度上对抑制心室重构的发生发展也起到了作用。但结合本实验的数据分析, 苦参碱对神经内分泌因子的影响可能是抑制心室重构作用更主要的因素。

References:

- [1] Hu Y C, Ouyang J P, Li Y Q, *et al.* Effects of matrine on cell cycle and expression of PCNA of rat cardiac fibroblasts induced by aldosterone [J]. *Med J Wuhan Univ* (武汉大学学报: 医学版), 2004, 25(3): 224-227.
- [2] Wu K, Ouyang J P, Wang B H, *et al.* Influence of matrine on the proliferation and collagen synthesis of cultured neonatal rat cardiac fibroblast stimulated by angiotensin I [J]. *Med J Wuhan Univ* (武汉大学学报: 医学版), 2003, 24(3): 235-237.
- [3] Doering C W, Jalil J E, Janicki J S, *et al.* Collagen network remodeling and diastolic stiffness of rat left ventricle with pressure overload hypertrophy [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22: 686-695.
- [4] Brilla C G, Janicki J S, Weber K T. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension [J]. *Circ Res*, 1991, 69(7): 107-115.
- [5] Morgan H E, Baker K M. Cardiac hypertrophy: mechanical, neural, and endocrine dependence [J]. *Circulation*, 1991, 83: 13-25.
- [6] Baker K M, Aceto J F. Angiotensin I stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells [J]. *Am J Physiol*, 1990, 258: H610-H618.
- [7] Dostal D E, Baker K M. Angiotensin I stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart: mediation by the AT₁ receptor [J]. *Am J Hypertens*, 1992, 5: 276-280.
- [8] Weber K T, Brilla C G. Pathological hypertrophy and the cardiac interstitium: fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system [J]. *Circulation*, 1991, 83: 1849-1865.
- [9] Sadoshima J I, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin I-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts [J]. *Circ Res*, 1993, 73: 413-423.
- [10] Suttner S W, Boldt J. Natriuretic peptide system: physiology and clinical utility [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2004, 10(5): 338-341.
- [11] Campbell S E, Ktawa L C. Glucose kinetics and exercise performance during phases of the menstrual cycle: effect of glucose ingestion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29: 1947-1958.
- [12] Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin I induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT₁ receptor subtype [J]. *Circ Res*, 1993, 73: 413-423.
- [13] Kawano H, Do Y S, Kawano Y, *et al.* Angiotensin I has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts [J]. *Circulation*, 2000, 101: 1130-1137.
- [14] Campbell S E, Janicki J S, Weber K T. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin I and aldosterone [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27: 1545-1560.
- [15] Booz G W, Baker K M. Molecular signaling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts [J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 30: 537-543.
- [16] Brand T, Schneider M D. The TGF beta superfamily in myocardium: ligands, receptors, transduction, and function [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27: 5-18.
- [17] Watson S, Burnside T, Carer W. Angiotensin I stimulated collagen contraction by heart fibroblasts: role of the AT₁ receptor and tyrosine kinase activity [J]. *J Cell Physiol*, 1998, 177(2): 224-231.
- [18] Fukuda N, Hu W Y, Kubo A, *et al.* Abnormal regulation of transforming growth factor- β 1 receptors on vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats by Angiotensin I [J]. *Hypertension*, 1998, 31(3): 672-677.

不同剂量四君子汤对脾虚证小鼠消化和免疫功能的影响

王 璐^{1,2}, 高云芳^{1*}, 姚 洋¹

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 第四军医大学唐都医院 妇产科, 陕西 西安 710038)

摘要:目的 探讨四君子汤对脾虚证小鼠消化和免疫功能的影响及治疗用最佳药物剂量。方法 大黄酒液制备小鼠脾虚证模型后, 以 3 种剂量 (12.5、25、37.5 g/kg) 的四君子汤进行治疗, 测定小鼠体重、体温、消化道内食糜平均滞留时间、胃排空速率、胃泌素与胃动素水平、脾脏和胸腺脂数。结果 脾虚证小鼠体重增长缓慢, 体温降低、消

收稿日期: 2006-09-25

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (DH98273); 陕西省教育厅重点科研基金资助项目 (00JK009)

作者简介: 王 璐 (1980—), 女, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 从事药理学研究。

* 通讯作者 高云芳 Tel: (029) 88303935 E-mail: gaoyunf@nwwu.edu.cn