

- 2004, 20(7): 1218-1221.
- [7] Chen H, Hu C J, He Y Y, et al. Reduction and restoration of mitochondrial DNA content after focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Stroke*, 2001, 32(10): 2382-2387.
- [8] Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, et al. Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 1998, 37(11): 777-787.
- [9] Red J C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family [J]. *Nature*, 1997, 387(6635): 772-776.

玄参水提物对心室重构大鼠心肌纤维化的影响

顾伟梁, 陈长勋*, 王 樱, 沈云辉

(上海中医药大学 药理教研室, 上海 201203)

摘要: 目的 探讨玄参对心室重构大鼠心肌纤维化的影响及其作用机制。方法 腹主动脉缩窄法制备大鼠心室重构模型。8周药物干预后, 测定大鼠左室及全心肥厚指数(LVWI、HWI); 紫外分光光度法测心肌羟脯氨酸的量(hydroxyproline, Hyp); 病理切片HE染色观察心肌细胞横断面面积; RT-PCR 测定心肌组织转化生成因子 $\beta 1$ 基因(TGF- $\beta 1$ mRNA)表达水平。结果 玄参水提液能降低心肌肥厚指数、羟脯氨酸量, 减小左心室心肌细胞的横断面面积, 显著降低TGF- $\beta 1$ mRNA表达水平。结论 玄参水提液对心肌细胞和间质胶原重构两方面都有显著的抑制作用, 抗心室重构的作用机制与抑制TGF- $\beta 1$ mRNA表达有关。

关键词: 玄参; 心室重构; 羟脯氨酸; TGF- $\beta 1$ 基因表达

中图分类号: R286.2; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)09-1371-04

心室重构是由一系列复杂的分子和细胞机制导致的心肌结构、功能和表型的变化, 包括心室肌细胞数量、质量及细胞排列方式上发生改变和心肌间质细胞(主要为成纤维细胞)及细胞外基质(主要为各型胶原纤维)数量、质量及构型方式上发生改变。心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是指在心肌的组织结构中胶原纤维过量积聚、胶原浓度显著升高或胶原容积分数(CVF)显著增加^[1]。心肌纤维化是心室重构的主要表现之一, 可导致心肌僵硬度增加、心室舒张功能减退、冠状动脉储备下降, 甚至引起猝死, 是导致心力衰竭发生、发展的决定性因素^[2]。因此如何逆转心肌纤维化和减轻心室重构成为国内外共同的研究热点。

玄参为玄参科多年生草本植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的根, 是著名的传统中药, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 性寒, 味苦、甘、咸, 可入肺经、胃经、肾经, 具有滋阴, 降火, 生津, 凉血, 解毒等功效。现代药理研究发现玄参对心血管系统具有广泛而重要的药理作用, 而玄参抗心室重构的实验研究尚未见报道。本研究旨在观察玄参有无抗心室重构的作用并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂: SD大鼠, 雄性, 体质量220~250 g, 购于中国科学院上海实验动物中心, 合格证号: SCXK(沪)2003-0003, 饲养于上海中医药大学实验动物中心SPF级动物实验室。

DL-50RC-L离心机(上海中科生物医学高科技开发有限公司), FJ-200高速分散均质机(上海标本模型厂), IX 70倒置显微镜(日本Olympus公司), 图像分析系统(Image-Pro plus 4.0 media cybernetics), PCR SYSTERM 9700(ABI美国应用生物有限公司), FR-250电泳仪(复旦科技有限公司), Tanon 2500凝胶成像(上海天能科技有限公司), Biohit 移液枪、Eppendorf 移液枪、基尔森移液枪(法国Gilson公司)。

玄参产地浙江(上海养和堂中药饮片有限公司, 批号060913); 卡托普利(上海衡山药业有限公司, 批号060804); 羟脯氨酸测试盒(消化法)(南京建成试剂公司); 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成试剂公司); 2×PCR Master Mix(上海欣百诺生物科技有限公司); Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, K1622(Fermentas公司上海中晶代理)。

1.2 玄参药液制备: 玄参1012 g用8倍量水煎煮3

收稿日期: 2007-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30572379)

作者简介: 顾伟梁(1981—), 女, 上海人, 在读博士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (021) 51322398 E-mail: gwli22@163.com

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

次,每次微沸30 min,合并滤液浓缩至750 mL,每毫升含生药量1.35 g,冷藏备用,给药容积为20 mL/kg。每隔4 d煎煮1次。给药剂量按每千克给予的生药量计算。

1.3 模型制备及分组给药:大鼠用戊巴比妥钠30 mg/kg ip麻醉,仰位固定,打开腹腔,钝性分离腹主动脉,用内径为0.5 mm的银夹不完全结扎左右肾动脉之间的腹主动脉,使之外径狭窄至0.5 mm,制备压力超负荷性心室重构模型。术后im青霉素1×10⁴U/(kg·d),共3 d,预防感染。手术动物66只,术后死亡22只,均于一周内死于急性左心衰,解剖发现双肺明显瘀血,部分还伴有胸腔积液,其死亡与急性压力超负荷有关。

随机分为5组,即假手术组(仅分离腹主动脉后不做结扎),模型组,玄参大、小剂量(27、13.5 g/kg)组和阳性对照(卡托普利40 mg/kg)组。假手术组和模型组大鼠ig等量蒸馏水。每组11只,每天给药1次,连续给药8周。

1.4 心脏指数测定:各组大鼠称质量取血处死后,快速打开胸腔取心脏,去除心房组织,分离左、右心室,冰冷的生理盐水中漂洗去血,用滤纸吸干表面水分,准确称取左心室和全心质量。计算左心室肥厚指数(左心室质量/体质量,LVWI)和全心肥厚指数(全心质量/体质量,HWI)。

1.5 心肌组织羟脯氨酸(Hyp)的测定:取大鼠的左室心肌组织约200 mg,加入2 mL生理盐水在冰浴环境中快速匀浆,3 500 r/min离心10 min,取上清200 μL加生理盐水800 μL,制成2%的组织匀浆,按羟脯氨酸试剂盒说明书操作测定Hyp,同时进行蛋白测定。结果以每毫克蛋白中羟脯氨酸的量表示。

1.6 心肌细胞横断面面积:取左心室中段,将10%福尔马林液固定的心肌组织经乙醇梯度脱水、透明、浸蜡包埋后,按心肌走向横断切成5 μm的切片,将左心室心肌进行HE染色,选择横断心肌的切片(细胞核清晰,细胞膜完整)放大200倍。用Image-Pro plus 4.0图像分析软件分析HE病理图片,测量左心室心肌细胞横断面面积。每一标本随机测量20个心肌细胞,计算其细胞平均横断面面积。

1.7 转化生成因子β1基因(TGF-β1 mRNA)表达水平的测定

1.7.1 提取总RNA及逆转录反应:每组取5个心肌标本,每个约100 mg,Trizol试剂盒提取总RNA,取2 μg总RNA逆转录合成cDNA,-20℃保存。所有引物均由上海生物工程技术有限公司合

成。β-actin基因的正义引物序列为:AGGCCCTCTCTGAACCCTAAG,反义引物序列为:TGCCACAGGATTCCATACCC,扩增片段长度为500 bp; TGF-β1基因的正义引物序列为:ATTCCCTGGCGTTACCTTGG,反义引物序列为:CCTGTATTCCGTCTCCTTGG,扩增片段长度为117 bp。

1.7.2 PCR反应:以稀释10倍的cDNA为模板,用目的基因引物进行PCR反应,同时β-actin作为内参,并根据实测基因的mRNA丰度建立最佳循环数,优化反应条件。反应体系:取0.2 mL PCR管,分别加入2×PCR Master Mix 10 μL、TGF-β1正反引物(10 μmol/L)各1 μL、β-actin正反引物(10 μmol/L)各0.1 μL、双蒸水7.8 μL,配制完毕,放入PCR仪中进行如下反应:95℃预变性5 min;进行32个循环;95℃变性30 s;55℃退火30 s;72℃延伸40 s;72℃最后延伸10 min。

1.7.3 琼脂糖凝胶电泳检测:取PCR产物3 μL,加上样缓冲液2 μL,1.5%的琼脂糖凝胶中120 V电压电泳30 min。用凝胶分析软件Tanon 2500,根据条带强度进行积分计算,以TGF-β1/β-actin作为心肌组织TGF-β1 mRNA表达的半定量检测。

1.8 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Excel软件进行t或t'检验。

2 结果

2.1 对心脏指数的影响:与假手术组比较,模型组心脏指数显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,玄参大剂量组、阳性对照组心脏指数均显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),玄参小剂量组心脏指数虽有下降,但差异不显著。结果见表1。

表1 玄参对压力超负荷心室重构大鼠心脏指数的影响($\bar{x} \pm s$, n=11)

Table 1 Effect of Xuanshen on heart index in press-overload ventricular remodeling rats
($\bar{x} \pm s$, n=11)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	LVWI/(mg·g ⁻¹)	HWI/(mg·g ⁻¹)
假手术	—	2.13±0.23**	2.69±0.26**
模型	—	2.81±0.18	3.41±0.21
阳性对照	—	2.37±0.18**	2.95±0.18**
玄参	13.5	2.73±0.23	3.29±0.26
	27.0	2.59±0.25*	3.15±0.29*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$,下表同

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

following tables are same

2.2 对羟脯氨酸量的影响:与假手术组比较,模型组羟脯氨酸量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,

玄参大剂量组、阳性对照组羟脯氨酸量均显著降低 ($P<0.01$)，玄参小剂量组羟脯氨酸量虽有下降，但差异不显著。结果见表2。

表2 玄参对压力超负荷心室重构大鼠羟脯氨酸量的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=11)

Table 2 Effect of Xuanshen on Hyp in press-overload ventricular remodeling rats ($\bar{x}\pm s$, n=11)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Hyp/(μg·mg ⁻¹)
假手术	—	0.773±0.039**
模型	—	0.883±0.053
阳性对照	—	0.659±0.068**
玄参	13.5	0.822±0.089
	27.0	0.766±0.091**

2.3 对心肌细胞横断面面积的影响：病理切片HE染色光镜下(200倍)观察可见压力超负荷心室重构大鼠心肌较正常心肌细胞明显肥大、增宽，细胞间距增大，间质增生，组织横断面心肌纤维增多，经玄参治疗后心肌细胞接近假手术组。结果见图1和表3。

2.4 对心肌组织TGF-β1 mRNA表达的影响：TGF-β1 mRNA电泳图见图2，经分析统计后的结果见表4。与假手术组比较，模型组TGF-β1 mRNA表达显著增加。与模型组比较，玄参大、小剂量组和阳性对照组TGF-β1 mRNA表达显著降低(图2，表4)。

假手术组 模型组 阳性对照组 玄参小剂量组 玄参大剂量组

图1 玄参对压力超负荷心室重构大鼠心肌细胞的影响

Fig. 1 Effect of Xuanshen on cardiomyocyte in press-overload ventricular remodeling rats

表3 玄参对压力超负荷心室重构大鼠心肌细胞横断面面积的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

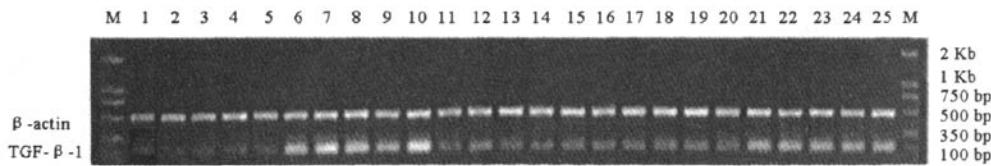
Table 3 Effect of Xuanshen on cardiomyocyte cross section area in press-overload ventricular remodeling rats ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	心肌细胞横断面面积
假手术	—	1 854.21±555.72**
模型	—	2 924.96±241.54
阳性对照	—	2 230.28±271.89**
玄参	13.5	2 243.67±720.36*
	27.0	2 164.48±352.78*

表4 玄参对压力超负荷心室重构大鼠TGF-β1 mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=5)

Table 4 Effect of Xuanshen on TGF-β1 mRNA expression in press-overload ventricular remodeling rats ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF-β1 mRNA
假手术	—	0.63±0.17**
模型	—	1.91±0.18
阳性对照	—	0.93±0.04**
玄参	13.5	1.66±0.08*
	27.0	1.14±0.05**



1~5-假手术组 6~10-模型组 11~15-阳性对照组 16~20-玄参 27.0 g/kg 21~25-玄参 13.5 g/kg
1—5-sham group 6—10-model group 11—15-Captopril group 16—20-Xuanshen 27.0 g/kg 21—25-Xuanshen 13.5 g/kg

图2 TGF-β1 电泳图

Fig. 2 TGF-β1 Electrophoretogram

3 讨论

压力超负荷心室重构模型大鼠手术后2周即可出现心肌肥厚和心室重构，左心室质量与体质量之比在造模12周时最高，之后逐渐下降^[3]。本研究在腹主动脉结扎手术后2周开始给药，心衰的进展速度与结扎的狭窄程度呈正相关，由于本次实验腹主动脉狭窄至0.5 mm，过窄造成动物死亡率偏高。采

用给药8周的方案，以便更好地了解压力超负荷引发的动物心肌肥厚和心室重构的特征以及玄参的治疗作用。

有研究显示，在压力负荷升高的最初期，就可启动大鼠心肌细胞mRNA转录，肌动蛋白和胶原蛋白合成增加^[4]。心肌间质中胶原的增加及其类型的改变可导致心肌纤维化，影响心脏的顺应性，严重的引

起心肌僵硬,使心脏舒缩功能受损,引起心力衰竭。

羟脯氨酸主要存在于胶原蛋白中,其量可反映组织纤维化的程度。本研究结果显示,造模10周后,模型组动物左心室组织羟脯氨酸量比假手术组明显增加,表明心肌间质胶原沉积是压力超负荷心肌肥厚和心室重构的特征之一。

TGF- β 1是成纤维细胞的强趋化因子,直接刺激其细胞外基质蛋白的合成,抑制胶原降解,使细胞外基质大量沉积于心肌细胞周围,从而导致心肌纤维化^[5]。在心肌纤维化过程中,许多促纤维化因子均通过TGF- β 1起作用,因此调控TGF- β 1的代谢可能影响心肌的纤维化过程,对抑制心肌肥大、心室重构有重要作用。据文献报道,大鼠左心室压力超负荷可使心肌细胞TGF- β 1 mRNA水平上调3~4倍^[6],本实验结果与报道一致。

本实验研究发现玄参水提液能降低大鼠心肌Hyp的量,抑制心肌细胞的肥大,减小左心室心肌细胞的横断面面积,对心肌细胞和间质胶原重构两方面都有显著的抑制作用。而且玄参具有显著降低TGF- β 1基因表达的作用,该作用也许与玄参降低

胶原蛋白的合成、抑制心肌肥厚有关,可能是玄参抗心室重构的作用机制之一。本实验提示玄参能通过抑制心肌间质纤维化而改善心室重构,对于改善衰竭心脏的心功能具有积极意义。

参考文献:

- [1] Jiang X C, Jiang X L, Li S Q. Current research on the pathogenesis, treatment and prevention of myocardial fibrosis [J]. *Med Recap*, 2006, 12(15): 931-933.
- [2] Hirosi H, Yayama K, Takano M, et al. Stimulation of cyclic GMP production via AT2 and B2 receptors in the pressure-overloaded aorta after banding [J]. *Hypertension*, 2004, 43(6): 1258-1263.
- [3] Schunkert H, Weinberg E O, Bruckslagel B, et al. Alteration of growth responses in established cardiac pressure overload hypertrophy in rats with aortic banding [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96: 2768-2774.
- [4] Chapman D, Weber K T, Eghbali M, et al. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type III collagen gene expression in pressure overload rat myocardium [J]. *Cir Res*, 1990, 67(4): 787-794.
- [5] Orlandi A, Francesconi A, Marellini M, et al. Role of ageing and coronary atherosclerosis in the development of cardiac fibrosis in the rabbit [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64: 544-552.
- [6] Modesti P A, Vanni S, Bertolozzi L, et al. Early sequence of cardiac adaptations and growth factor formation in pressure-and volume-overload hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(3): H976-985.

和胃饮合剂促胃动力作用实验研究

白长川¹,孙旭娟²,李卫平^{2*} 战丽彬²,韩国柱²,宫德正²,周琴²,李楠³

(1. 大连长川中医药研究中心有限公司,辽宁大连 116021; 2. 大连医科大学,辽宁大连 116044;
3. 大连理工大学 分析化学教研室,辽宁大连 116021)

摘要:目的 研究和胃饮合剂(HWYM)在不同试验模型中的促胃动力作用。方法 采用不同工具药复制小鼠胃排空功能障碍模型,观察不同剂量HWYM ig给药对胃排空作用的影响。采用激怒法复制功能性消化不良大鼠模型,观察HWYM对动物一般状况及在体胃活动频率的影响。利用离体大鼠胃平滑肌条,观察HWYM对正常及多巴胺、异丙肾上腺素作用下离体胃平滑肌活动的影响。结果 HWYM可以明显对抗阿托品及多巴胺引起的小鼠胃排空障碍。HWYM可明显改善功能性消化不良大鼠机能状态,增加功能性消化不良大鼠胃活动频率。HWYM可明显增强正常大鼠胃平滑肌活动,并对抗多巴胺及异丙肾上腺素对大鼠离体胃平滑肌活动的抑制作用。结论 HWYM具有显著的促胃动力作用。

关键词:和胃饮合剂;促胃动力;功能性消化不良;胃平滑肌

中图分类号:R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)09-1374-04

随着人们生活节奏的加快,加之精神情志、饮食结构改变等诸多因素影响,导致胃动力障碍疾病发病率日益增多,若不能得到及时有效的治疗,还可能

发展为食管溃疡、梗阻、慢性出血、营养不良和贫血等严重病症,已经成为现代社会中一个备受关注的问题。目前,临床对于此类患者的治疗以促胃动力药

收稿日期:2008-01-25

基金项目:大连市2005年科技计划项目(2005E11SF062)

作者简介:白长川(1944—),男,辽宁大连人,主任医师,硕士生导师,研究方向为中医脾胃病。

Tel: 13352256969 E-mail: bcc@bccstem.com

*通讯作者 李卫平 E-mail: liwp@yahoo.cn

玄参水提物对心室重构大鼠心肌纤维化的影响

作者: 顾伟梁, 陈长勋, 王樱, 沈云辉
作者单位: 上海中医药大学药理教研室, 上海, 201203
刊名: 中草药 [ISTIC PKU]
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2008, 39(9)
被引用次数: 3次

参考文献(6条)

1. Jiang X C;Jiang X L;Li S Q Current research on the pathogenesis, treatment and prevention of myocardial fibrosis 2006(15)
2. Hiyoshi H;Yayama K;Takano M Stimulation of cyclic GMP production via AT2 and B2 receptors in the pressure-overloaded aorta after banding[外文期刊] 2004(06)
3. Schunkert H;Weinberg E O;Bruckschlegel B Alternation of growth responses in established cardiac pressure overload hypertrophy in rats with aortic banding[外文期刊] 1995
4. Chapman D;Weber K T;Eghbali M Regulation of fibrillar collagen types I and I and basement membrane type I collagen gene expression in pressure overload rat myocardium 1990(04)
5. Orlandi A;Francesconi A;Mareellini M Role of ageing and coronary atherosclerosis in the development of cardiac fibrosis in the rabbit[外文期刊] 2004
6. Modesti P A;Vanni S;Bertolozzi L Early sequence of cardiac adaptations and growth factor formation in pressure-and volume-overload hypertrophy 2000(03)

本文读者也读过(10条)

1. 顾伟梁. 陈长勋. GU Wei-liang. CHEN Chang-xun 玄参对压力超负荷大鼠心室重构及心肌组织ET-1表达的影响[期刊论文]-中药材2008, 31(3)
2. GU Wei-liang. 陈长勋. WANG Ying. GU Wei-liang. CHEN Chang-xun. WANG Ying 玄参对心室重构大鼠血管紧张素II及其1型受体基因表达的影响[期刊论文]-时珍国医国药2008, 19(7)
3. 崔红燕. 彭渊. 吴琦. 孟倩超. 王晓柠 丹酚酸B盐抗腹主动脉不完全结扎大鼠心肌纤维化的实验研究[期刊论文]-中国中医药信息杂志2010, 17(7)
4. 程志清. XU Bai-hong. 窦丽萍. LIU Wang. 王娟. CHENG Zhi-qing. XU Bai-hong. DOU Li-ping. LIU Wang. WANG Juan 三七总皂苷对病毒性心肌炎慢性期小鼠心肌纤维化及细胞因子PDGF-B表达的影响[期刊论文]-中华中医药学刊2008, 26(8)
5. 李运伦 清热解毒法治疗高血压左室肥厚心肌纤维化43例临床研究[期刊论文]-山东中医药大学学报2007, 31(6)
6. 殷子杰. 窦丽萍. 崔小强 中医药抗心肌纤维化研究趋势的分析与探讨[期刊论文]-心脑血管病防治2009, 9(2)
7. 董晓蕾. 张群燕. 赵智明. 郭郡浩. 商玮. 蔡辉 补肾复方对压力负荷增加大鼠心肌I型和III型胶原mRNA表达的影响[期刊论文]-江苏中医药2010, 42(2)
8. 王保奇. 殷子杰 抗心肌纤维化药物研究进展[期刊论文]-中国中医药现代远程教育2010, 08(4)
9. 黄前. 贡沁燕. 姚明辉. 于榕. 史念慈. 田庚元. 鲁映青 玄参提取物对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[期刊论文]-中国新药与临床杂志2004, 23(6)
10. 李静. 陈长勋. 高阳. 焦亚斌. 吴喜民. 王瑞. 吴迎春. 李医明. LI Jing. CHEN Chang-xun. GAO Yang. JIAO Ya-bin. WU Xi-min. WANG Rui. WU Ying-chun. LI Yi-ming 玄参提取物抗炎与抗动脉硬化作用的探索[期刊论文]-时珍国医国药2010, 21(3)

引证文献(3条)

1. 沈雁, 韦红. 瓜蒌薤白半夏汤对心肌纤维化中整合素 β 1的抑制作用 [期刊论文] - 现代药物与临床 2010(4)
2. 张雪梅, 王瑞, 吴喜民, 王新宏, 高文运, 李医明. 优化分光光度法用于玄参中总环烯醚萜类成分的含量测定 [期刊论文] - 中成药 2011(2)
3. 张刘强, 李医明. 近10年玄参属植物化学成分和药理作用研究进展 [期刊论文] - 中草药 2011(11)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200809030.aspx