

实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠 TT 的作用。说明三者均能较好地提高凝血过程中纤维蛋白原的利用度,但丹皮炭的鞣质部位以及醋酸乙酯部位对凝血过程中纤维蛋白原利用度的提高作用没有丹皮炭整体效果好。

实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位均有缩短大鼠 PT 的作用。说明丹皮炭品以及丹皮炭的鞣质部位均能通过影响外源性凝血系统以及血浆中凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性产生凝血作用,但是丹皮炭品作为一个整体比丹皮炭的鞣质部位作用强。

实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠 APTT 的作用。说明丹皮炭品以及丹皮炭的鞣质部位、醋酸乙酯部位均能通过影响内源性凝血系统以及血浆中凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性产生凝血作用,但是丹皮炭品作为一个整体比丹皮炭的鞣质部位以及醋酸乙酯部位作用强。

3 讨论

目前国内外对牡丹皮药理作用的研究多集中于生品,牡丹皮的炮制作用及丹皮炭止血机制还没有深入研究。为探讨丹皮炭止血的机制,本实验首先对丹皮炭止血作用主要活性部位进行筛选研究。结果表明丹皮炭具有一定的止血、凝血作用,并初步确定了其止血作用主要活性部位为丹皮炭鞣质部位以及醋酸乙酯部位。通常炭药是通过以下途径发挥止血作用:首先饮片炒炭后炭素增加,加强吸附作用,使局部止血作用增强^[3];其次炒炭后炭药中的鞣质相对增多,而鞣质具有止血和收敛作用,能达到止血、凝血的目的^[4];再次饮片炒炭后钙离子增多,而钙离子是凝血系统中的重要离子,它对内源性、外源

性凝血系统和血小板有激活作用,使纤维蛋白原转化为纤维蛋白,使血小板聚集,从而起到促进止血、凝血的作用^[5]。

PRT 能反映内源性凝血系统的活性,TT 可以反映内源性凝血过程第三期中纤维蛋白原的利用度;而 APTT 反映了内源性凝血系统诸因子如凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性。本实验结果表明,丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠 PRT、TT、APTT 的作用,说明三者均能影响内源性凝血系统,加速纤维蛋白原的利用度以及对内源性凝血系统中的凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 表现出明显的激活作用,达到止血、促进凝血的作用。PT 能反映外源性凝血系统的活性,其长短与外源性凝血系统中凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性有关。丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位均有缩短大鼠 PT 的作用,说明两者可通过影响外源性凝血系统以及激活凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性发挥止血、促进凝血的作用。

实验中同时发现丹皮炭作为一个整体比其鞣质部位、醋酸乙酯部位具有更强的止血能力,说明丹皮炭炒后也许是多成分通过多途径产生了止血作用,即不仅对内源性和外源性凝血系统产生影响,是否还对凝血途径中的纤溶系统、血小板的功能产生一定影响,还有待于对丹皮炭止血机制进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 肖培根. 新编中药志 [M]. 第 3 卷. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [3] 孔祥安, 刘洪章, 刘喜梅. 中药炭药析疑 [J]. 时珍国药研究, 1995 (4): 42.
- [4] 连以国. 中药炭药作用原理的探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 1989, 9(6): 265.
- [5] 单鸣秋, 张丽, 丁安伟. 中药炭药的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 631-634.

越橘中原花青素抑制新生大鼠心肌成纤维细胞增殖及其作用机制

王艳春¹, 任 旷^{1*}, 顾饶胜¹, 杨世杰²

(1. 吉林医药学院 药理教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林大学基础医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021)

摘 要:目的 研究越橘中原花青素对血管紧张素 (angiotensin, Ang) 诱导新生大鼠心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblast, CFb) 增殖的影响及其作用机制。方法 用 Ang 诱导新生大鼠 CFb 增殖, 采用 MTT 法检测细胞增殖, ELISA 法测定 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原及转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 的量, 硝酸还原酶法、分光光度法检测

* 收稿日期: 2009-03-12

基金项目: 吉林省科技厅发展计划项目资助课题 (200705405)

作者简介: 王艳春 (1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为心血管分子药理学。

Tel: (0432) 4560023 E-mail: wangyanchun1972@163.com

* 通讯作者 任 旷 Tel: (0432) 4560301 E-mail: renkuang@sina.com

NO、一氧化氮合酶(iNOS)活性,流式细胞仪检测细胞周期,免疫细胞化学法测定 p27 蛋白的量。结果 原花青素(25、50、100 mg/L)可抑制 Ang 诱导的 CFb 增殖,胶原合成增加及 TGF- β_1 蛋白量增多,并明显提高 CFb NO 的量,iNOS 的活性,同模型组比较差异有显著性($P < 0.05, 0.01$),且呈现剂量依赖性。流式细胞仪检测表明 G₀/G₁ 期细胞比例随原花青素质量浓度增加而增加,S 期细胞比例随原花青素质量浓度增加而减少,与模型组相比差异有显著性($P < 0.05, 0.01$),免疫细胞化学染色结果也表明原花青素可增加 p27 的蛋白表达,与模型组相比具有统计学意义($P < 0.01$)。结论 原花青素通过促进 p27 的表达,使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,从而抑制 CFb 增殖和胶原分泌量的增加。

关键词:原花青素;心肌成纤维细胞;血管紧张素(Ang);p27

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)08-1280-05

Inhibition of procyanidin from *Vaccinium vitisidaea* on proliferation of cardiac fibroblast in neonatal rats and its mechanism

WANG Yan-chun¹, REN Kuang¹, GU Rao-sheng¹, YANG Shi-jie²

(1. Department of Pharmacology, College of Jilin Medicine, Jilin 132013, China; 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract : Objective To investigate the effect of procyanidin from *Vaccinium vitisidaea* on the proliferation of cardiac fibroblast (CFb) induced by angiotensin (Ang), and to explore its mechanism.

Methods The CFb proliferation of cultured neonatal rat was induced by Ang and detected by MTT assay. The levels of collagen, collagen, and TGF- β_1 were measured by ELISA. The change of NO content and iNOS activity were measured by nitric acid reductase method and spectrophotometry. Cell cycle was assessed via flow cytometry (FCM). The expression of cell cycle regulatory protein p27 was determined by the combination of immunocytochemical staining and image analysis software. **Results** CFb Proliferation, collagen content, and TGF- β_1 levels in culture medium were markedly inhibited when CFb were treated with procyanidin at concentration of 25, 50, and 100 mg/L ($P < 0.05$ and 0.01). And iNOS-NO system activities in CFb were increased ($P < 0.05$ and 0.01). In the FCM analysis, it was found that procyanidin could block CFb in the G₀/G₁ phase from entering the S phase, resulting in more cells in the G₀/G₁ phase and fewer in the S phase. The percentage of the cells in the G₀/G₁ phase and the S phase at the dosage of 25, 50, and 100 mg/L were significantly different in comparison to the model group ($P < 0.05$ and 0.01). Procyanidin induced p27 expression with statistic significance compared to model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The inhibition of procyanidin on CFb proliferation might be due to the stimulation of p27 expression and arresting of cells in G₀/G₁ phase.

Key words: procyanidin; cardiac fibroblast (CFb); angiotensin (Ang)

越橘 *Vaccinium vitisidaea* L. 又称蓝莓(blueberry),原花青素(procyanidin)是越橘中重要的生物活性成分,是表儿茶素和表没食子儿茶素的低聚体或多聚体。目前国内对越橘原花青素药理活性的相关研究较少,主要发现原花青素具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老及抗炎症等作用^[1,2]。本实验室以血管紧张素(Ang)诱导心肌成纤维细胞(cardiac fibroblast, CFb)增殖,观察越橘原花青素对 CFb 增殖、细胞周期分布、细胞周期调控蛋白 p27 及 CFb 分泌 I、II 型胶原的影响,以探讨原花青素抑制 CFb 增殖的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物:Wistar 大鼠,清洁级,1~3 日龄,雌雄兼用,由吉林大学基础医学院实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂:越橘原花青素(质量分数 >

25%,南京苏朗医药科技开发有限公司),Ang (Sigma),IMDM、血清(Gibco),MTT (Sigma),胰蛋白酶(宝泰克生物科技公司),I 型胶原、II 型胶原、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)试剂盒(南京建成生物工程研究所),NO 试剂盒(碧云天生物技术研究所),p27 单克隆抗体(Santa cruz),碘化丙啶(Biotium),RnaseA (Sigma),S-P 试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)。

1.3 仪器:超净工作台(AIR TECH),倒置显微镜(OLYMPUS CK40),CO₂ 培养箱(HERAEUS),酶标仪(SUNRISE),流式细胞仪(BDFACSAria),低温离心机(SORVALL)。

1.4 CFb 的分离与培养:取 Wistar 大鼠,无菌开胸取心肌,D-Hank's 液清洗,剪成 1 mm³ 大小的碎

片, 0.125 % 胰蛋白酶反复消化, 收集各次消化上清液, 离心 (1 000 r/min, 5 min), 弃上清, 用含 10 % 血清的 IMDM 培养基重悬沉淀, 制成细胞悬液, 接种于培养瓶中, 置 37 °C、5 % CO₂ 培养箱内培养。用差速贴壁法去除内皮细胞及心肌细胞。实验采用第 3~5 代细胞。

1.5 实验分组和给药: CFb 细胞分为对照组、模型组、原花青素组。各组细胞无血清培育 24 h 后, 除对照组外均给予终浓度为 1×10^{-7} mol/L 的 Ang, 药物治疗组同时给予原花青素, 终质量浓度分别为 25、50、100 mg/L, 对照组给予 1 % 血清的 IMDM 培养基。

1.6 细胞增殖 (MTT 法): 将处于对数生长期的 CFb 制成细胞悬液, 以 1×10^5 个/mL 浓度接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L。分别给予不同的处理因素作用 48 h。每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L, 37 °C 继续培养 4 h, 终止培养, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡 10 min 后酶标仪上于 490 nm 波长测吸光度 (A) 值, 以各给药组 A 值/对照组 A 值 $\times 100$ % 表示细胞增殖率。

1.7 ELISA 法测定 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原的量: 取第 3 代 CFb 制成细胞悬液, 以 2.5×10^5 个/mL 浓度接种于 24 孔板, 每孔 1 mL。按 1.5 项方法给予不同因素的处理, 分别在培养的 48 h 吸取细胞上清液, 按照试剂盒说明检测 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原的量。

1.8 ELISA 法测定 TGF- β_1 的量: 细胞按 1.5 项方法给予各因素处理后, 分别在培养的 24 h 吸取细胞上清液, 按照试剂盒说明书操作测定 TGF- β_1 的量。

1.9 NO 定量测定: 各处理因素与 CFb 共孵育 6 h, 检测细胞上清液中 NO 的变化。具体操作按试剂盒说明书进行。

1.10 iNOS 活性测定: 处理细胞方法同上。通过 iNOS 催化产生的 NO 量推算 iNOS 的活力, 采用分光光度计法测定 A 值。iNOS 活性以每毫升培养液每分钟生成的 1 nmol NO 为一个酶活力单位。用公式 (测定管 A 值 - 空白管 A 值) $\times 45.431$ U/mL 计算。具体操作按说明书进行。

1.11 流式细胞仪分析细胞周期: 将 CFb 以 1.0×10^5 个/mL 的密度接种于 25 mL 培养瓶, 各不同因素作用 24 h 后, 胰酶消化、收集细胞, 经 4 °C 预冷的 PBS 洗涤, 悬浮固定于预冷的 70 % 乙醇中, 4 °C 过夜。离心、收集细胞, 重悬于染色液 (PBS + 0.1 % Triton X-100 + 10 % 山羊血清), 调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL, 再加 RNA 酶 200

μ L (终质量浓度 50 μ g/mL), 37 °C 水浴 30 min 后, 冰浴中止 RNA 酶的作用。加入碘化丙啶 (PI) 800 μ L, 终质量浓度为 50 μ g/mL, 保存在冰浴中暗处 45 min。上机前用孔径 300 目的尼龙网滤过。根据 PI 所标记的 DNA 的量确定细胞所处的细胞周期。用 MCYCLE 软件进行细胞周期分析。

1.12 免疫细胞化学染色检测 p27 蛋白的表达: 将第 3 代 CFb 放入预先放置了 10 mm \times 10 mm 盖玻片的 24 孔板。各种处理因素作用 24 h 后, 将生长有成纤维细胞的盖玻片取出, 用 PBS 洗涤 3 次, 4 % 多聚甲醛固定 30 min, 晾干后用 SP 法进行免疫细胞化学染色。阳性反应呈棕黄色细密颗粒, 阴性对照用 PBS 取代一抗染色为阴性。用 Media Cybernetics 公司的 Image-Pro Plus 图像分析软件分析各组 p27 在成纤维细胞中表达的平均吸光度值。

1.13 统计学分析: 实验所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 原花青素对 CFb 增殖的影响: MTT 结果表明模型组细胞增殖率明显高于对照组 ($P < 0.01$), 经原花青素 (25、50、100 mg/L) 作用 48 h 后, 细胞增殖率依次降低, 与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 且量效关系明显。结果见表 1。

2.2 原花青素对 CFb 分泌 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原的影响: 各处理因素作用 48 h 后, 模型组细胞 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原量明显高于对照组 ($P < 0.01$)。原花青素在 25~100 mg/L 内可抑制 Ang 诱导的胶原合成增加 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 1。

2.3 原花青素对 TGF- β_1 的影响: Ang 作用 24 h 即可明显升高 TGF- β_1 的量, 与对照组比较有统计

表 1 原花青素对 Ang 诱导新生大鼠 CFb 增殖及胶原分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effect of procyanidin on CFb proliferation and collagen content of neonatal rats induced by Ang ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	/ (mg \cdot L $^{-1}$)	增殖率/ %	Ⅰ型胶原/ (pg \cdot mL $^{-1}$)	Ⅲ型胶原/ (pg \cdot mL $^{-1}$)
对照	-	100.04 \pm 8.10	43.56 \pm 4.24	7.83 \pm 0.25
模型	-	149.69 \pm 16.33 **	561.62 \pm 81.15 **	38.24 \pm 5.42 **
原花青素	100	129.05 \pm 8.21	101.42 \pm 24.53	9.72 \pm 1.01
	50	134.33 \pm 6.81	274.24 \pm 13.31	16.92 \pm 1.21
	25	140.26 \pm 16.68	442.42 \pm 105.62	28.62 \pm 8.31

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

学差异 ($P < 0.001$), 原花青素可以抑制 Ang 对于 TGF- β_1 的诱导作用, 各剂量组均可降低 TGF- β_1 的量 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 2。

2.4 原花青素对 NO 水平和 iNOS 活性的影响: 对照组 CFb 具有 iNOS 活性, 能够合成 NO, Ang 使 CFb iNOS 活性降低, NO 的量减少 ($P < 0.001$)。各剂量的原花青素均可明显提高 CFb 的 iNOS 活性和 NO 的量 ($P < 0.01, 0.001$)。结果见表 2。

2.5 原花青素对 CFb 细胞周期的影响: 在 Ang 24 h 的作用下, CFb S 期细胞比例增加, 同对照组比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。原花青素组可使 CFb S 期细胞比例降低, G₀/G₁ 期细胞数高于模型组 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 3。

2.6 原花青素对 p27 蛋白表达的影响: 免疫细胞化学染色结果显示与对照组相比, Ang 作用 24 h, 即可见到 p27 的表达量降低 ($P < 0.01$), 而 50、100 mg/L 的原花青素在同一时间点可明显提高 p27 的表达量, 同模型组比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。结果见图 1。

表 2 原花青素对 Ang 诱导新生大鼠 CFb 的 NO 水平、iNOS 活性及 TGF- β_1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of procyanidin on NO level, iNOS activity, and TGF- β_1 levels of CFb in neonatal rats induced by Ang ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	/	NO/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	iNOS/ ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TGF- β_1 / ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	-	12.44 \pm 1.18	9.04 \pm 1.14	802.51 \pm 10.42
模型	-	2.42 \pm 1.40 ***	2.63 \pm 0.83 ***	1237.95 \pm 23.48 ***
原花青素	100	7.56 \pm 0.69	5.32 \pm 1.12	895.25 \pm 15.95
	50	5.07 \pm 0.73	4.75 \pm 0.08	1016.64 \pm 3.06
	25	4.63 \pm 1.29	3.34 \pm 0.43	1153.20 \pm 9.65

与对照组比较: *** $P < 0.001$

与模型组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$ $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

$P < 0.05$ $P < 0.01$ $P < 0.001$ vs model group

表 3 原花青素对 Ang 诱导新生大鼠 CFb 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of procyanidin on cell cycle of CFb in neonatal rats induced by Ang ($\bar{x} \pm s, n=6$)

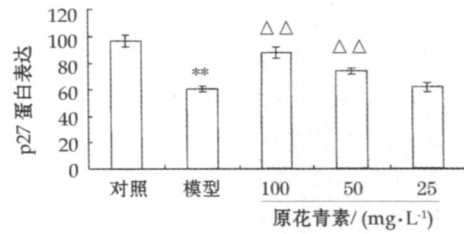
组别	/	细胞周期分布/ %		
	($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	-	89.05 \pm 1.80	4.73 \pm 1.02	6.22 \pm 0.55
模型	-	77.85 \pm 0.88 **	15.67 \pm 1.31 **	6.48 \pm 1.96
原花青素	100	87.01 \pm 1.01	8.02 \pm 0.85	4.97 \pm 0.18
	50	82.12 \pm 0.21	10.92 \pm 1.08	6.96 \pm 0.23
	25	79.06 \pm 2.14	14.21 \pm 1.23	7.71 \pm 2.04

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



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

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

图 1 免疫细胞化学染色检测原花青素对 Ang 诱导新生大鼠 CFb 的 p27 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Effect of procyanidin on p27 expression of CFb in neonatal rats induced by Ang by immunocytochemical staining ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

心肌纤维化形成的主要病理改变是大量细胞外基质 (ECM) 沉积, 因而产生 ECM 的 CFb 成为目前药物治疗纤维化的重要靶标。本实验在细胞水平观察 Ang 对 CFb 胶原代谢和分裂增殖的直接作用, 以排除血流动力学及神经内分泌的影响, 进一步探讨原花青素对于 CFb 增殖的抑制作用及其作用机制。

CFb 表面存在对 Ang 高亲和力的血管紧张素受体 (AT₁R), 而 Ang (1×10^{-7} mol/L) 是促心肌纤维化的主要因素^[3,4]。本实验结果表明: 与对照组的各项参数比较, 模型组细胞增殖活跃, 生长密度; 型、型胶原、TGF- β_1 的量增加; 流式细胞仪分析证实模型组 S 期细胞比例高于对照组, 差异具有统计学意义。即本实验中 Ang (1×10^{-7} mol/L) 可显著促进 CFb 的增殖及胶原合成, 与文献报道相一致^[3,4], 模型成立。

原花青素是越橘中的主要成分, 也是其重要的生物活性物质。目前国内的研究集中在原花青素对于缺血心肌的保护作用^[5]。本实验通过 MTT、胶原分泌量和细胞周期分析证实: 原花青素体外有直接抑制心肌纤维化作用。同模型组相比, 原花青素在 25~100 mg/L, 可剂量依赖性降低 CFb 的增殖率, 减少胶原及 TGF- β_1 的量, 阻滞 CFb 由 G₀/G₁ 期向 S 期转换, 使 G₀/G₁ 期细胞增多, S 期细胞减少。表明原花青素对 CFb 的增殖与胶原合成有显著抑制作用。

CFb 具有内源性 iNOS-NO 系统, 在多种细胞因子和生长因子的刺激下 CFb 可生成内源性 NO, 此作用系 iNOS 基因所介导^[6]。原花青素干预下的 CFb iNOS-NO 系统活性的变化, 以及与心肌纤维化的关系, 文献报道较少。本实验结果表明: 各种处

理因素与 CFb 共孵育 6 h,即可见到 NO 及 iNOS 的变化,说明在 Ang 诱导 CFb 增殖的过程中,有 NO 系统的参与,并且是作为一种早期反应的信号。与模型组比较,原花青素 (25 ~ 100 mg/L) 可剂量依赖性升高细胞培养液中 NO 的量、增加 iNOS 活性。表明原花青素对 CFb 的 iNOS-NO 系统的活性具有促进作用。

细胞周期可在正、负调控因素共同作用下协调地进行,正调控因素作用的增强和负调控因素作用的减弱是细胞增殖的机制。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI) 是细胞周期进程的负性调节因子。CKI 中的 p27 蛋白亚型目前被认为是细胞内调节增殖及细胞周期的重要影响因素^[7]。有研究表明,在高血压左心室肥厚的形成过程中,p27 蛋白水平下降,证明 p27 在心室肥厚中发挥重要作用^[8];血小板源性生长 (PDGF) 和血管升压素能通过下调 p27 蛋白表达,使静止期血管平滑肌细胞 (VSMC) 通过 G₁ 期进入 S 期开始增殖^[9]。Diep 等^[10]也发现,给动物注射一定量的 Ang 后,血管壁 DNA 合成增加,p21、p27 的表达降低。

以往的研究表明,牛磺酸、苦参碱等抗氧化剂在发挥抑制 CFb 增殖作用时,主要是影响 p27 的表达,对于细胞周期正性调节因子未发现作用^[7]。本实验通过免疫细胞化学染色证明,CFb 中存在 p27 的表达,在 Ang 的作用下,p27 的表达降低,

细胞增生活跃;给予原花青素后,CFb 的 p27 蛋白的表达明显增加,细胞增殖受阻。表明原花青素可通过促进 p27 蛋白表达而发挥对 CFb 细胞周期的调控,使 CFb 停滞于 G₀/G₁ 期,从而抑制 CFb 的增殖及胶原的合成,降低 ECM 的沉积,抑制心肌纤维化。

参考文献:

- [1] Subarnas A, Waqner H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelleaguein A from *Polypodium feei* METT [J]. *Phytomedicine*, 2000, 7(5): 401-405.
- [2] 梅寒芳,谢朝阳,杨红,等. 原花青素对-淀粉样肽 25-35 诱导 PC-12 细胞 Par-4 和 bcl 基因表达的影响 [J]. *中草药*, 2006, 37(3): 405-408.
- [3] Chen K, Mehta J L, Li D, et al. Transforming growth factor [beta] receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin [J]. *Circul Res*, 2004, 95(12): 1167-1173.
- [4] 张伟,杨涛,苏彦欣,等. 双苯氟嗪对血管紧张素诱导新生大鼠心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响及其机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(2): 207-212.
- [5] 汪晨净,高明堂,时小燕,等. 原花青素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2003, 8(2): 173-175.
- [6] Farivar R S, Brecher P. Salicylate is a transcriptional inhibitor of the inducible nitric oxide synthase in cultured cardiac fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(49): 31585-31592.
- [7] 王艳春,李红,杨世杰. 牛磺酸对心肌成纤维细胞细胞周期的影响及其机制的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23(11): 1471-1475.
- [8] Li J M, Brooks G. Downregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in pressorload hypertrophy [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(2): 1358-1367.
- [9] Rao G N. Differential regulation of p27kip1 levels and CDK activities by hypertrophic and hyperplastic agents in vascular smooth muscle cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1448(3): 525-532.
- [10] Diep Q N, Mabrouk E I M, Touyz R M, et al. Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin-infused rats: role of AT (1) receptors [J]. *Hypertension*, 2001, 37(2): 604-608.

神经网络分析香丹注射液抗心肌缺血有效成分的谱效相关性研究

尹永芹,朱俊访,沈志滨^{*},唐春萍,杨超燕,孙悦

(广东药学院中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 寻找香丹注射液中抗垂体后叶素致大鼠心肌缺血的主要有效成分。方法 采取大鼠舌下 iv 垂体后叶素 (0.5 U/kg) 复制大鼠急性心肌缺血模型,观察香丹注射液的不同萃取部位及萃取部位的组合对大鼠注射垂体后叶素后不同时间点 导联心电图 T 波变化情况,结合香丹注射液不同极性萃取部位及萃取部位组合的指纹图谱,运用神经网络分析抗垂体后叶素致心肌缺血的香丹注射液中主要有效成分。结果 香丹注射液中主要成分对垂体后叶素引起的心肌缺血模型 T 波抬高存在影响,丹酚酸 D 和丹酚酸 A 在 0.5、10 s 对 T 波抬高的抑制作用随质量分数的提高而增强,其余成分在 5 s、10 s、3 min 对 T 波抬高主要为促进作用。结论 香丹注射液抗垂体后叶素致心肌缺血的主要有效成分为丹酚酸 A 和丹酚酸 D。

关键词:香丹注射液;抗心肌缺血;谱效相关性;神经网络

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)08-1284-04

* 收稿日期:2008-12-18

基金项目:国家科技支撑计划资助项目 (2006BA1B03-06);广东省科技计划资助项目 (2008B030301035);广东省自然科学基金资助项目 (8451022401001607);广东药学院科研启动项目 (2007ZYX07)

作者简介:尹永芹 (1977—),女,黑龙江七台河人,博士,讲师,主要从事中药及天然药物有效成分及谱效相关性研究。

Tel: (020) 39352612 E-mail: yongqinyin @126.com

*通讯作者 沈志滨 Tel: (020) 39352179 E-mail: szb8113 @yahoo.com.cn