

广枣总黄酮抑制 Ang II 诱导大鼠心脏成纤维细胞胶原合成及其机制

舒亮^{1,3}, 金明², 包俊萍³, 杨雨民^{3*}, 高晓慧³, 邢慧慧¹, 贾磊¹

1. 内蒙古医科大学研究生学院, 内蒙古 呼和浩特 010050

2. 内蒙古林业总医院 中医科, 内蒙古 牙克石 022150

3. 内蒙古自治区中医医院 心内科, 内蒙古 呼和浩特 010020

摘要: 目的 观察广枣总黄酮(TFCF)对血管紧张素 II(Ang II)诱导心脏成纤维细胞(CFs)胶原合成的影响。方法 采用差速贴壁法培养新生大鼠 CFs, 在体外建立 Ang II 诱导 CFs 增殖模型。采用 ³H-脯氨酸掺入法及羟脯氨酸比色法检测 CFs 胶原合成, 分别观察一氧化氮合酶抑制剂(L-NAME)、鸟苷酸环化酶抑制剂(ODQ)及 TFCF 对 Ang II 诱导 CFs 胶原合成的影响; 采用硝酸还原酶法测定细胞培养液中一氧化氮(NO)水平; 化学比色法测细胞上清液中一氧化氮合酶(NOS)水平; 放免法测定细胞内环鸟苷酸(cGMP)水平。结果 TFCF 25~100 mg/L 呈剂量依赖性抑制 Ang II 诱导的 CFs 胶原合成, 但这种作用可被 L-NAME 及 ODQ 部分阻断; TFCF 作用细胞后 NO、NOS、cGMP 水平升高。结论 TFCF 在一定质量浓度范围对 Ang II 诱导的 CFs 胶原合成有抑制作用, NO-cGMP 信号通路可能是其发挥作用的途径之一。

关键词: 广枣总黄酮; 心脏成纤维细胞; 血管紧张素 II; 胶原合成; 一氧化氮合酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)02-0232-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.015

Inhibitory effects of total flavones from *Chorspondiatis Fructus* on collagen synthesis of cardiac fibroblasts induced by Ang II of rats and their mechanism

SHU Liang^{1,3}, JIN Ming², BAO Jun-ping³, YANG Yu-min³, GAO Xiao-hui³, XING Hui-hui¹, JIA Lei¹

1. Graduate School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Inner Mongolia Forestry General Hospital, Yakeshi 022150, China

3. Department of Cardiovascular Disease, Traditional Chinese Medicine Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010020, China

Abstract: Objective To investigate the effects of total flavones from *Chorspondiatis Fructus* (TFCF) on collagen synthesis in cardiac fibroblasts (CFs) induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** The CFs of rats were cultured by the differential adherence method. CFs proliferation model was established by Ang II *in vitro*. The collagen synthesis was measured by ³H-proline incorporation assay and hydroxyproline chromatography in order to observe the effects of TFCF, L-NAME, and ODQ on collagen synthesis induced by Ang II. The levels of NO, NOS, and cGMP in culture media were measured by nitrate reductase method, chemical colorimetric method, and radioimmunoassay, respectively. **Results** TFCF (25—100 mg/L) inhibited collagen synthesis of CFs and these effects were blocked by pretreatment with L-NAME or ODQ. Pretreatment of CFs with TFCF resulted in the increase of NO, NOS, and cGMP levels. **Conclusion** TFCF could inhibit the collagen synthesis of CFs induced by Ang II in a dose dependent manner and the inhibitory effects might be partly correlated with NO-cGMP signaling pathways.

Key words: total flavones of *Chorspondiatis Fructus*; cardiac fibroblasts; angiotensin II; collagen synthesis; nitricoxide synthase

心肌纤维化是指在心肌细胞外基质中, 由心脏成纤维细胞(CFs)分泌的胶原纤维过量聚集, 胶原的量过度升高或胶原成分发生改变, 常伴随风湿

性心脏病、高血压、心肌梗死及心力衰竭等多种心血管疾病, 在增龄和冠状动脉粥样硬化过程中也会发生心肌纤维化^[1]。心肌纤维化可导致心肌结构紊

收稿日期: 2013-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81060362); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2009BS1204)

作者简介: 舒亮, 硕士, 研究方向为中医药防治心肌纤维化研究。E-mail: 653337157@qq.com

*通信作者 杨雨民 E-mail: yangyumin331@126.com

乱、僵硬度增加、心脏顺应性降低、组织异质性增高及心室舒张功能下降,是引起心律失常、猝死和慢性心功能不全的重要原因,其重要性日益引起关注,防治心肌纤维化的发生与进展已是目前治疗某些心血管疾病过程中,改善心脏功能并促进疾病愈复的重要环节^[2]。

广枣总黄酮(total flavones of *Choerospondiatis Fructus*, TFCF)为漆树科植物南酸枣 *Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill 的果实经乙醇回流提取得到的黄酮类成分, TFCF 具有抗心律失常、抗缺氧和心肌缺血、增强小鼠免疫功能、抑制血小板聚集及改善血液流变学等作用^[3-7]。本研究拟通过体外实验构建心肌纤维化细胞模型,通过³H-脯氨酸掺入法及羟脯氨酸比色法探索 TFCF 对 CFs 胶原合成功能的影响,并进一步就其与 NO-环鸟苷酸(cGMP)信号通路的关系进行探讨,旨在为其临床抗心肌纤维化应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠, 出生 1~3 d, 体质量(16.0±1.1) g, 许可证号 SCXK(浙) 2008-0115, 由浙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂

胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、噻唑蓝(MTT)、血管紧张素 II(Ang II)、一氧化氮合酶抑制剂(L-NAME)和鸟苷酸环化酶抑制剂(ODQ)均购自 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司; ³H-脯氨酸购自中国原子能研究院同位素研究所; 羟脯氨酸、一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOS)测试盒购自南京建成生物工程研究所; cGMP 放免试剂盒购自上海中医药大学同位素室; 胎牛血清(FCS)购自杭州四季青生物研究所; 小鼠纤维粘连蛋白(Fn)单克隆抗体及小鼠平滑肌肌动蛋白(α -actin)单克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司; HPD100 大孔吸附树脂购自河北沧州宝恩化工有限公司; 广枣药材由内蒙古国际蒙医医院提供, TFCF 的制备参照舒亮等^[8]研究工艺提取制备(以芦丁计, TFCF 质量分数为 53.65%); 测定用芦丁对照品(批号 100080-200707)购于中国食品药品检定研究院。

1.3 仪器

2500E 型 CO₂ 培养箱(Nu Aire 公司); LS6500 型液态闪烁计数仪(Beckman 公司); Mode 1680 型酶标仪(BIO-RAD 公司); JY92-II 超声波细胞粉

碎机(上海新芝生物技术研究所); TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司); 倒置显微镜(重庆奥特公司); CA-1080-II 洁净工作台(上海汇龙仪表电子公司); 高速低温离心机(Sigma 公司); 培养皿、96 孔培养板(Greiner 公司)。

2 方法

2.1 CFs 培养及鉴定

在无菌条件下取出生后 2~3 d 的 SD 大鼠心室, 剪碎, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 用 0.125% 胰蛋白酶在 37 °C 分散细胞, 每 5 min 收集 1 次细胞。离心 2 次, 将所得全部细胞置于 100 mL 培养瓶中, 加入含 10% FCS 的 DMEM 培养液 8 mL, 在 5% CO₂、37 °C 孵箱中培养 60 min, 采用差速贴壁法分离 CFs^[9]。待 CFs 生长接近融合时以 1:2 传代。在倒置显微镜下, 细胞呈梭形、多角形, 细胞质透明, 胞核椭圆形, 颜色淡, 常含有 2~3 个核。培养至第 4 天时, CFs 出现集落样迅速生长, 呈放射状、螺旋状、瀑布状、编织状排列。经免疫组化检查: 几乎所有细胞 Fn 染色阳性(胞浆中可见棕黄色颗粒)和 α -actin 染色阴性(未见棕黄色颗粒), 证实为所需的 CFs, 且纯度较高。实验采用 2~3 代细胞。

2.2 CFs 胶原蛋白合成测定

采用³H-脯氨酸掺入法^[10]进行。取第 2~3 代 CFs, 0.25% 胰酶消化制备细胞悬液, 用含 10% FCS 的 DMEM 调细胞密度 2.5×10⁴ 个/mL, 每孔 200 μ L, 接种在 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养, 24 h 后换无血清 DMEM, 继续孵育 24 h, 使细胞生长同步化, 分别进行如下处理: 对照组, 未加药物; Ang II 组, 加入 Ang II (100 nmol/L); TFCF+Ang II 组, 加入 Ang II (100 nmol/L) 和不同质量浓度(25、50、100 mg/L)的 TFCF。药物作用 72 h 后, 每孔加入³H-脯氨酸 74 kBq/mL 和维生素 C 50 mg/L, 12 h 后吸弃上清液, PBS 轻洗, 再用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞呈细胞悬液, 多头细胞收集器收集细胞至玻璃纤维滤纸上, 烤干。将玻璃纤维滤纸置于闪烁计数管中, 每管加入闪烁液 0.5 mL, 液态闪烁计数仪测定放射性。

2.3 CFs 培养液中羟脯氨酸定量测定

采用比色法测定细胞培养液中羟脯氨酸的量, 以反映 CFs 培养上清液胶原的量。细胞接种及药物处理方法同“2.2”项, 药物作用 72 h 后, 从每孔各吸取 0.5 mL 培养基, 采用羟脯氨酸比色法测定 CFs 培养上清中羟脯氨酸的量, 具体按羟脯氨酸试剂盒

说明书方法操作。以羟脯氨酸的量计算样品中胶原的质量浓度(样品中羟脯氨酸质量浓度×7.46, 7.46是从羟脯氨酸换算为胶原时的计算常数)^[11]。

2.4 L-NAME、ODQ 对 CFs 胶原合成影响

细胞接种方法同“2.2”项。吸弃上清后,细胞分别进行如下处理:对照组,未加入药物;Ang II 组,加入 Ang II (100 nmol/L);Ang II+L-NAME 组,加入 Ang II (100 nmol/L)、L-NAME (0.1 mmol/L);TFCF+Ang II+L-NAME 组,加 Ang II(100 nmol/L)、L-NAME (0.1 mmol/L) 及不同质量浓度(25、50、100 mg/L) TFCF;Ang II+ODQ 组,加入 Ang II (100 nmol/L)、ODQ (10 μmol/L);TFCF+Ang II+ODQ 组,加入 Ang II (100 nmol/L)、ODQ (10 μmol/L) 及不同质量浓度(25、50、100 mg/L) 的 TFCF,继续培养 72 h。按“2.2”项方法测定胶原合成水平。

2.5 CFs 培养液中 NO 测定

细胞接种及药物处理方法同“2.2”项,收集药物干预 72 h 后的培养液,采用硝酸还原酶法测定上清液中 NO 的量,具体按试剂说明书操作。

2.6 CFs 培养液中 NOS 测定

细胞接种及药物处理方法同“2.2”项,收集药物干预 72 h 后的培养液,采用化学比色法检测培养液 NOS 水平,操作按试剂盒说明进行。

2.7 CFs 培养液中 cGMP 测定

细胞接种及药物处理方法同“2.2”项,药物作用细胞 72 h 后,吸掉培养板内培养液,用含 10% FCS 的 DMEM 调细胞密度 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$ 。取 1 mL 细胞悬液, $200 \times g$ 离心 5 min,使细胞沉淀,弃上清,细胞沉淀加 1 mL pH 4.75 的 50 mmol/L 的醋酸缓冲液,混悬,用超声波粉碎细胞, $400 \times g$ 离心 15 min,取上清液 100 μL,按 cGMP 放免试剂盒说明书操作,用 γ 计数器测沉淀 cpm 值,结果以 pmol/ 10^5 个细胞表示。

2.8 胶原水平与 NO、cGMP 水平相关性分析

将所测定培养液中胶原水平与培养液中 NO 水平、CFs 内 cGMP 水平进行相关性分析。

2.9 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行相关分析,两组间比较选用 Independent *t*-test 方法进行检验,多组间比较选用 One-Way ANOVA 进行检验。

3 结果

3.1 TFCF 对 Ang II 诱导 CFs 胶原合成的影响

Ang II 能明显促进 CFs 的 ³H-脯氨酸掺入率增

加,而 TFCF 以质量浓度依赖方式对其增加产生抑制作用,其中 50、100 mg/L TFCF 组的 ³H-脯氨酸掺入率明显低于 Ang II 组 ($P < 0.05, 0.01$)。见表 1。

3.2 TFCF 对 CFs 培养上清胶原量的影响

Ang II 刺激细胞后,羟脯氨酸分泌明显增加,与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。TFCF 作用细胞 72 h 后,培养液内羟脯氨酸水平有不同程度降低,其中 50、100 mg/L TFCF 组的羟脯氨酸水平明显低于 Ang II 组 ($P < 0.05, 0.01$)。见表 2。

表 1 TFCF 对 Ang II 诱导 CFs 培养液 ³H-脯氨酸掺入率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of TFCF on ³H-proline incorporation rate in medium of CFs induced by Ang II ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	³ H-脯氨酸掺入率 / min^{-1}
对照	—	1 431.67 ± 205.83**
Ang II	—	2 476.17 ± 246.70
Ang II+TFCF	25	2 241.83 ± 302.40
	50	1 863.33 ± 213.20*
	100	1 518.50 ± 322.60**

与 AngII 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Ang II group, same as below

表 2 TFCF 对 Ang II 诱导 CFs 培养液羟脯氨酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of TFCF on content of hydroxyproline in medium of CFs induced by Ang II ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	羟脯氨酸 / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照	—	10.63 ± 0.79**
Ang II	—	18.81 ± 0.82
Ang II+TFCF	25	17.69 ± 0.97
	50	15.37 ± 0.94*
	100	11.96 ± 0.94**

3.3 L-NAME 和 ODQ 对 TFCF 抑制 Ang II 诱导 CFs 胶原合成的影响

L-NAME 和 Ang II 共同作用细胞后, ³H-脯氨酸掺入率明显升高,说明 L-NAME 和 Ang II 能促进 CFs 胶原合成,与 Ang II 组比较差异显著 ($P < 0.01$)。TFCF 和 L-NAME 作用细胞后, TFCF 抑制胶原合成作用被 L-NAME 部分抵消。ODQ 和 Ang II 共同作用细胞后, ³H-脯氨酸掺入率也明显升高,与 Ang II 组比较差异显著 ($P < 0.01$)。TFCF 和 ODQ 作用细胞后, TFCF 抑制胶原合成作用被 ODQ 部分抵消。见表 3 和 4。

表 3 L-NAME 对 TFCF 抑制 CFs 胶原合成的影响
($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effects of L-NAME on TFCF inhibition on collagen synthesis of CFs ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	^3H -脯氨酸掺入率 / min^{-1}
对照	—	1 374.84 ± 176.43 ^{***}
Ang II	—	2 386.20 ± 179.70 ^{##}
Ang II+L-NAME	—	3 086.61 ± 171.94 ^{**}
Ang II+L-NAME+TFCF	25	2 984.99 ± 124.90
	50	2 794.50 ± 100.56 ^{*#}
	100	2 480.41 ± 126.23 ^{***}

与 Ang II+L-NAME 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs Ang II+L-NAME group

表 4 ODQ 对 TFCF 抑制 CFs 胶原合成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 4 Effects of ODQ on TFCF inhibition on collagen synthesis of CFs ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	^3H -脯氨酸掺入率 / min^{-1}
对照	—	1 291.37 ± 140.63 ^{***}
Ang II	—	2 268.52 ± 148.22 ^{##}
Ang II+ODQ	—	3 154.76 ± 120.11 ^{**}
Ang II+ODQ+TFCF	25	2 962.96 ± 109.07
	50	2 727.99 ± 101.00 ^{*#}
	100	2 481.87 ± 125.60 ^{***}

与 Ang II+ODQ 组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs Ang II+ODQ group

3.4 TFCF 对 CFs 培养上清 NO 浓度和 NOS 活性的影响

Ang II 作用 CFs 72 h 后, 培养液中 NO 水平明显降低, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); TFCF 作用 CFs 后, 培养液中 NO 水平升高, TFCF 25 mg/L 组与 Ang II 组比较没有统计学差异, TFCF 50、100 mg/L 组与 Ang II 组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01); Ang II 作用 CFs 72 h 后, 培养液中 NOS 活性也相应降低, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); TFCF 作用 CFs 后, 培养液中 NOS 活性升高, TFCF 25 mg/L 组与 Ang II 组比较没有统计学差异, TFCF 50、100 mg/L 组与 Ang II 组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01); 说明 TFCF 可以增加细胞 NO 的分泌, 升高培养液中 NOS 水平。见表 5。

3.5 TFCF 对 CFs 内 cGMP 水平的影响

Ang II 作用细胞后 cGMP 水平降低, 与对照组

比较差异显著 ($P < 0.01$); TFCF 作用 CFs 后, 细胞内 cGMP 水平升高, 与 Ang II 组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01), 说明 TFCF 预处理可以升高细胞内 cGMP 水平。见表 6。

表 5 TFCF 对细胞培养液中 NO 和 NOS 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effects of TFCF on NO and NOS levels in culture medium ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NO / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	NOS / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	24.43 ± 0.83 ^{**}	20.90 ± 0.85 ^{**}
Ang II	—	20.20 ± 0.70	17.71 ± 0.47
Ang II+TFCF	25	21.16 ± 0.93	18.36 ± 0.55
	50	21.70 ± 0.74 [*]	19.10 ± 0.67 [*]
	100	23.23 ± 0.64 ^{**}	19.77 ± 0.53 ^{**}

表 6 TFCF 对细胞 cGMP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effects of TFCF on cGMP levels ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$\rho /$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	cGMP / ($\text{pmol} \cdot 10^{-5}$ 个)
对照	—	1.19 ± 0.08 ^{**}
Ang II	—	0.69 ± 0.06
Ang II+TFCF	25	0.75 ± 0.05
	50	0.84 ± 0.05 [*]
	100	0.91 ± 0.05 ^{**}

3.6 胶原水平与 NO 和 cGMP 水平相关性分析

培养液中胶原水平与 NO 水平呈负相关 (相关系数 r 值为 -0.806, $P < 0.01$); 培养液中胶原水平与 cGMP 水平呈负相关 (r 值为 -0.693, $P < 0.01$), 说明 TFCF 抑制胶原合成与 NO、cGMP 水平密切相关。

4 讨论

心肌纤维化是指胶原蛋白在心肌间质中的过度沉积导致心肌组织的胶原浓度增加, 它被认为是心肌重塑过程中决定心功能转归的一个关键环节^[12]。CFs 是分泌胶原蛋白的主要细胞, 其合成与分泌胶原能力的增强或 CFs 的大量增殖, 都可能导致胶原总量的增加^[13], 心肌间质纤维性胶原成分的增多是心脏纤维化形成的重要原因和病理学基础。CFs 是心肌组织中合成胶原蛋白的主要细胞, 研究表明多种促纤维化因素均可促进离体培养的 CFs 合成胶原蛋白^[14]。由肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 产生的 Ang II 对 CFs 的代谢功能有重要的作用^[15]。

有实验表明, Ang II 可通过 Ang II 受体 (AT₁R), 由 G 蛋白介导, 主要通过丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 和信号转导与转录激活因子 (STATs) 等不同的信号转导途径, 增加 AP-1 等核转录因子的活性, 诱导心脏成纤维细胞 I、III 型胶原 mRNA 表达, 使 Ang II 对心脏胶原增生代谢的影响更加明显^[16]。

心血管疾病的发生发展部分是由于 NO 与 Ang II 失去平衡所致^[17]。NO 是一种重要的血管舒张因子, 主要由 NOS 催化 L-精氨酸生成, NOS 是 NO 合成的限速酶, 对 NO 的生成有重要影响。NO 作为强效的内源性血管扩张物质, 是鸟苷酸环化酶 (GC) 的重要激活物, 可通过激活 GC 促进 cGMP 产生^[18]。cGMP 是细胞内重要第二信使, 在调节细胞生长和分裂中起着极为重要的作用。心力衰竭、病毒性心肌炎、高血压、心肌梗死、糖尿病等常出现 NO 产生减少或/和 NOS 活性改变, NO-cGMP 信号传导途径发生紊乱。NO 和 cGMP 是 CFs 增殖有力的抑制剂, NO 在体内产生后, 结合并激活 GC, 产生 cGMP, 发挥抑制细胞胶原合成的作用。

细胞合成蛋白质时, 需要摄取外源性氨基酸。脯氨酸是 CFs 胶原合成的重要底物, 测定用同位素标记的 ³H-脯氨酸掺入率可直接反映 CFs 的胶原合成能力。在体外培养的细胞模型中, CFs 合成胶原蛋白并分泌至培养液中, 培养液中的胶原蛋白在碱性环境下受裂分解, 释放羟脯氨酸。羟脯氨酸经脯氨酸水解而来, 是胶原蛋白中特有的氨基酸, 量相对恒定, 占胶原中总氨基酸的 13.4%, 因此, 羟脯氨酸的定量被认为是胶原测定的一个良好指标^[19]。在本实验中, 采用 ³H-脯氨酸掺入与羟脯氨酸比色两种方法, 从 DNA 合成与胶原蛋白水解双重角度证实了 Ang II 对 CFs 胶原合成具有较强的促进作用, 而 TFCF 对 CFs 的胶原合成具有明显的抑制作用, 且随着作用浓度的增加, 其抑制作用逐渐增强, 具有浓度依赖性。

L-NAME 是非选择性 NOS 抑制剂, ODQ 是可溶性 GC 强有力的选择性抑制剂, 是可溶性 GC 通路的特异性药物之一, 它不影响 NO 的产生及活性。研究中发现: TFCF 与 L-NAME 及 ODQ 共同作用细胞后, 其抑制 CFs 胶原合成效应被 L-NAME 及 ODQ 不同程度抵消, 说明 TFCF 是依赖 NO 和 cGMP 发挥作用的; Ang II 刺激 CFs 后细胞培养液中 NO 水平明显降低, 细胞内 cGMP 水平也降低。TFCF

预处理能升高培养液中 NO 水平, 升高细胞内 cGMP 水平, 伴随 NO、cGMP 水平增高, 抑制 CFs 胶原合成的作用增强, 进一步说明 TFCF 抑制 CFs 胶原合成作用与 NO 及 cGMP 密切相关。对培养液中胶原水平与 NO、cGMP 水平进行相关分析结果发现, 培养液中胶原水平与 NO 及 cGMP 水平均呈负相关, 更进一步说明 TFCF 抑制胶原合成与 NO、cGMP 水平密切相关。

综上所述, TFCF 可剂量依赖性抑制 Ang II 诱导的新生大鼠 CFs 的胶原合成, 其作用机制可能是通过激活 NO-cGMP 信号途径促使 CFs 中 NOS 表达来促进 NO 的生成, 进而抑制 CFs 的胶原合成。

参考文献

- [1] Orlandi A, Francesconi A, Marcellini M, *et al.* Role of aging and coronary atherosclerosis in the development of cardiac fibrosis in the rabbit [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64(3): 544-552.
- [2] Burlew B S, Weber K T. Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction [J]. *Herz*, 2002, 27(2): 92-98.
- [3] 李增曦, 冯国庆, 宋一民, 等. 广枣总黄酮抗实验性心律失常作用 [J]. *中国药理学报*, 1984, 6(4): 21-25.
- [4] 王玉玲, 王凤华, 张长在, 等. 广枣总黄酮对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中国药理学通报*, 1991, 21(7): 21-24.
- [5] 张昕原, 王志民, 包保全, 等. 广枣总黄酮抗氧化作用的研究 [J]. *中国民族医药*, 1999, 5(增刊): 112-113.
- [6] 石山, 胡元亮, 吴秀英, 等. 广枣总黄酮对血小板凝聚功能及血液流变学的影响 [J]. *内蒙古药学*, 1985, 8(2): 11-13.
- [7] 乌日娜, 张昕原, 张维兰, 等. 广枣总黄酮对阿霉素引起大鼠心肌过氧化损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2001, 32(6): 527-529.
- [8] 舒亮, 王二云, 高晓慧, 等. 蒙药广枣总黄酮的提取及 HPLC 和 LC-MS 定性分析 [J]. *中国民族医药杂志*, 2012, 18(3): 12-13.
- [9] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells [J]. *Circ Res*, 1982, 50: 101-116.
- [10] Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, *et al.* Elevation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis [J]. *Neurochem*, 1984, 43(5): 1369-1374.
- [11] 朱鹭冰, 李明. 活血化瘀中药对系统性硬皮病患者皮肤成纤维细胞胶原合成的影响 [J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2004, 3(4): 205-207.
- [12] Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in

- fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2002, 91(12): 1103-1113.
- [13] 林 军, 冯一中, 顾振纶, 等. 丹参总酚酸对博莱霉素致肺纤维化小鼠的治疗作用 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2403-2410.
- [14] Booz G W, Baker K M. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts [J]. *Cardiovasc Res*, 1995, 30(4): 537-543.
- [15] Varo N, Iraburu M J, Varela M, *et al.* Chronic AT(1)blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2000, 35(6): 1197-1202.
- [16] Thai H M, Van H T, Gaballa M A, *et al.* Effects of AT₁ receptor blockade after myocardial infarct on myocardial fibrosis, stiffness, and contractility [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(3/2): 873-880.
- [17] Yan C, Kim D, Aizawa T, *et al.* Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 26-36.
- [18] 马秉亮, 吴玉林. 心血管疾病中血管平滑肌细胞增殖与药物开发 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(8): 845-850.
- [19] Hernnas J, Nettelblatt O, Bjermer L, *et al.* Alveolar accumulation of fibronectin and hyaluronan precedes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat [J]. *Eur Respir J*, 1992, 5: 404-410.