

苦参总黄酮抑制大鼠心肌纤维化作用研究

范红艳¹, 王艳春^{1*}, 任 旷¹, 沈 楠², 张以忠³, 王 燕¹, 杨颖杰⁴, 傅 钰⁴

1. 吉林医药学院基础医学院 药理教研室, 吉林 吉林 132013

2. 吉林医药学院基础医学院 机能实验室, 吉林 吉林 132013

3. 吉林医药学院基础医学院 病理教研室, 吉林 吉林 132013

4. 吉林医药学院 临床医学系, 吉林 吉林 132013

摘要: **目的** 探讨苦参总黄酮对异丙肾上腺素(Iso)诱导的大鼠心肌纤维化的作用及机制。**方法** 以Iso 5 mg/kg 背部sc 7 d 构建大鼠心肌纤维化模型, 同时ig 苦参总黄酮100、200、400 mg/kg, 连续用药21 d, 测定大鼠心重指数(HW/BW)和左心室重指数(LVW/BW); ELISA 法测定心肌中I型、III型胶原及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平; ELISA 法测定血清中血管紧张素II(AngII)的水平; 分光光度法检测心肌中丙二醛(MDA)水平; 比色法检测心肌中NO水平, 并观察心肌组织的病理改变。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠HW/BW、LVW/BW和心肌中I型胶原、III型胶原、TNF- α 及MDA的水平升高, 血清中AngII水平增加, 心肌中NO水平降低($P < 0.05, 0.01$), HE染色可见心肌损伤及明显的纤维化病灶形成。苦参总黄酮200、400 mg/kg均能降低HW/BW、LVW/BW及心肌中I型、III型胶原、MDA水平, 降低血清中AngII的水平, 增加心肌中NO水平, 100、200和400 mg/kg苦参总黄酮均降低心肌中TNF- α 的水平, 与模型组比较差异显著($P < 0.05, 0.01$)。HE染色显示苦参总黄酮200、400 mg/kg组未见明显纤维化病灶。**结论** 苦参总黄酮可抑制Iso所致的大鼠心肌纤维化, 其机制与提高NO水平及抗氧化作用, 进而降低循环AngII的水平、抑制心肌中TNF- α 及胶原的合成有关。

关键词: 苦参总黄酮; 心肌纤维化; 肿瘤坏死因子 α ; 血管紧张素II; NO

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)20-3055-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.20.016

Inhibition of flavonoids from *Sophora flavescens* on myocardial fibrosis in rats

FAN Hong-yan¹, WANG Yan-chun¹, REN Kuang¹, SHEN Nan², ZHANG Yi-zhong³, WANG Yan¹,
YANG Ying-jie⁴, FU Yu⁴

1. Department of Pharmacology, Basic Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013, China

2. Department of Functional Experimental Science, Basic Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013, China

3. Department of Pathology, Basic Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013, China

4. Department of Clinical Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013, China

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effect of flavonoids from *Sophora flavescens* on the myocardial fibrosis induced by isoprenaline (Iso) and its mechanism in rats. **Methods** Myocardial fibrosis model in rats was established by sc injection with Iso (5 mg/kg) for 7 d. The model rats were treated with low-, mid-, and high-dose (100, 200, and 400 mg/kg) flavonoids from *S. flavescens* and captopril (50 mg/kg) respectively by ig for 21 d. Myocardial indexes (heart weight/body weight, HW/BW and left ventricular weight/body weight, LVW/BW) were measured after the experiment was finished. The contents of collagen I, collagen III, tumor necrosis factor α (TNF- α) in myocardium and the level of angiotensin II (AngII) in blood serum were determined by ELISA. The concentration of malondialdehyde (MDA) in myocardium was assayed with spectrophotometry. The content of nitric oxide (NO) in myocardium was detected with colorimetry. The pathological changes of myocardium were observed. **Results** Compared with the control group, the myocardial indexes and the contents of collagen I, collagen III, TNF- α , MDA in myocardium, and the level of AngII in blood serum were markedly increased, the content of NO in myocardium was decreased in the model group ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the myocardial indexes, the contents of collagen I, collagen III, MDA in myocardium, and the level of

收稿日期: 2015-03-27

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科技研究项目资助课题(2012337)

作者简介: 范红艳(1975—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事心血管药理研究。E-mail: 13843245245@163.com

*通信作者 王艳春(1972—), 女, 博士, 教授。E-mail: wangyanchun1972@163.com

AngII in blood serum were markedly reduced, the content of NO in myocardium was increased in mid- and high-dose flavonoids from *S. flavescens* groups ($P < 0.05, 0.01$). The level of TNF- α in myocardium was reduced in all flavonoids from *S. flavescens* groups ($P < 0.05, 0.01$). HE staining showed that myocardial tissue had obviously myocardial damage and the formation of fibrosis lesions in the model group; The myocardial tissue had few fibrosis lesions in mid- and high-dose flavonoids from *S. flavescens* groups. **Conclusion** Flavonoids from *S. flavescens* could inhibit myocardial fibrosis and protect myocardium in rats, and its mechanism may be associated with decreasing AngII level in circulation and myocardium, lowering TNF- α content in myocardium, and inhibiting collagen synthesis by increasing the NO level and anti-oxidation.

Key words: flavonoids from *Sophora flavescens*; myocardial fibrosis; tumor necrosis factor α ; angiotensin II; nitric oxide

苦参 *Sophora flavescens* Ait., 又名白茎、水槐、地槐, 始载于《神农本草经》, 是我国常用传统中药。目前已从苦参中分离鉴定的化学成分有生物碱类、黄酮类、脂肪酸类、氨基酸类、挥发油类等, 研究表明苦参具有抗病原微生物^[1]、抗炎、抗过敏、抗肿瘤^[2]、利尿、抗心律失常、调节免疫和抗氧化^[3]等多种药理作用, 其主要活性物质是生物碱类和黄酮类^[4]。前期研究^[5]结果提示苦参总黄酮通过降低心肌局部血管紧张素 II (AngII) 的水平、抗氧化等发挥抗心肌纤维化的作用, 本研究采用异丙肾上腺素 (isoprenaline, Iso) 构建大鼠心肌纤维化模型, 进一步观察苦参总黄酮对大鼠心肌纤维化的作用, 并深入探讨其作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体质量 (220 ± 20) g, 由吉林大学基础医学部实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (吉) 2008-0005。

1.2 药品与试剂

苦参总黄酮 (西安草翠芯生物科技有限公司, 批号 20120926, 质量分数 80%); Iso (西安仁红生物科技有限公司, 批号 20120706); 卡托普利 (上海普康药业有限公司, 批号 20121011); 丙二醛 (MDA)、考马斯亮蓝试剂盒 (南京建成生物工程公司); I 型胶原、III 型胶原、AngII ELISA 试剂盒 (美国 BD 公司); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (上海浩本生物科技有限公司); NO 试剂盒 (碧云天试剂公司)。

1.3 主要仪器

722 可见分光光度计 (上海欣茂仪器有限公司产品); Model 680 型酶标仪 (美国 Bio-rad 公司); FV1000 型激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和给药方法

Wistar 大鼠随机分为 6 组 (每组 12 只): 对照组, 模型组, 苦参总黄酮低、中、高剂量 (100、200、

400 mg/kg) 组, 卡托普利 (50 mg/kg) 组。除对照组外, 各组大鼠均每天背部 sc Iso 5 mg/kg, 连续 7 d, 建立大鼠心肌纤维化模型。苦参总黄酮组及卡托普利组自造模第 2 天开始 ig 给药, 连续 21 d, 每天 1 次, 对照组和模型组 ig 给予相同体积的蒸馏水。

2.2 心脏质量参数及指标检测

大鼠末次给药 24 h, 称体质量 (BW), 10% 水合氯醛 (0.3 mL/kg) 麻醉, 腹主动脉取血, 静置 30 min 以上, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离得血清, -20°C 冻存。开胸取心脏, 去除大血管、心外膜脂肪组织, 用冰生理盐水清洗, 滤纸吸干后称全心质量 (HW) 和左心室质量 (LVW), 计算心重指数 (HW/BW, mg/g) 和左心室重指数 (LVW/BW, mg/g)。取左心室心肌组织, 在冰浴下制成 5%、1% 组织匀浆, 4°C 、4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液备用。按照 ELISA 试剂盒说明, 取 1% 心肌匀浆用酶标仪测定心肌中 I 型、III 型胶原、TNF- α 水平; 取 1% 心肌匀浆用酶标仪测定心肌中 NO 水平; 取血清用酶标仪检测血清中 AngII 水平; 取 5% 心肌匀浆严格按试剂盒说明用分光光度计测定 MDA 水平。

2.3 心肌 HE 染色

每组随机选取大鼠 2 只, 取心脏, 将心脏于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察并拍照。

2.4 统计学分析

实验所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计, 组间比较采用方差分析及 q 检验。

3 结果

3.1 对心肌纤维化大鼠心脏质量参数及心肌中 I 型、III 型胶原水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 HW/BW、LVW/BW 明显升高, 心肌中 I 型、III 型胶原水平均升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 苦参总黄酮 200、400 mg/kg 剂量组及卡托普利组大鼠 HW/BW、

LVW/BW、心肌中 I 型、III 型胶原水平均呈下降趋势, 且差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见表 1。

3.2 对心肌纤维化大鼠血清中 AngII 及心肌 TNF- α 水平的影响

模型组血清中 AngII 水平及心肌 TNF- α 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 苦参总黄酮低、中、高剂量可降低血清中 AngII 水平、心肌中 TNF- α 水平,

与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见表 2。

3.3 苦参总黄酮对心肌纤维化大鼠心肌中 NO 和 MDA 水平的影响

模型组大鼠心肌中 NO 水平显著低于对照组, MDA 水平显著高于对照组 ($P < 0.01$); 苦参总黄酮中、高剂量升高心肌中 NO 水平, 降低 MDA 水平, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

表 1 苦参总黄酮对 Iso 诱导的心肌纤维化大鼠 HW/BW、LVW/BW 及心肌中 I 型、III 型胶原水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 1 Effect of flavonoids from *S. flavescens* on HW/BW and LVW/BW, concentration of collagens I and III in myocardium of myocardial fibrosis rats induced by Iso ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	(HW/BW)/(mg·g ⁻¹)	(LVW/BW)/(mg·g ⁻¹)	I 型胶原/(ng·L ⁻¹)	III 型胶原/(ng·L ⁻¹)
对照	—	2.88 ± 0.38	2.18 ± 0.20	510.63 ± 67.31	245.10 ± 71.74
模型	—	3.21 ± 0.20*	2.47 ± 0.24*	690.63 ± 86.69**	360.59 ± 43.13**
苦参总黄酮	100	3.05 ± 0.27	2.32 ± 0.20	629.33 ± 101.07	349.46 ± 61.61
	200	2.97 ± 0.23 [#]	2.25 ± 0.16 [#]	572.67 ± 65.99 [#]	300.21 ± 56.25 [#]
	400	2.92 ± 0.22 [#]	2.23 ± 0.13 [#]	541.93 ± 92.68 [#]	268.41 ± 21.37 [#]
卡托普利	50	2.89 ± 0.33 [#]	2.21 ± 0.18 [#]	557.11 ± 63.40 [#]	250.44 ± 25.79 ^{##}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 2 苦参总黄酮对 Iso 诱导的心肌纤维化大鼠血清中 AngII 水平及心肌 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 2 Effect of flavonoids from *S. flavescens* on concentration of AngII in serum and concent of TNF- α in myocardium of myocardial fibrosis rats induced by Iso ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AngII/(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)
对照	—	41.41 ± 2.92	41.16 ± 5.61
模型	—	61.41 ± 9.63**	65.55 ± 5.85**
苦参总黄酮	100	53.13 ± 3.18	56.71 ± 6.08 [#]
	200	50.38 ± 5.01 [#]	57.79 ± 5.54 [#]
	400	48.52 ± 7.28 [#]	47.16 ± 3.06 ^{##}
卡托普利	50	52.29 ± 1.58 [#]	49.95 ± 6.09 ^{##}

表 3 苦参总黄酮对 Iso 诱导的心肌纤维化大鼠心肌中 NO 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 3 Effects of flavonoids from *S. flavescens* on content of NO and MDA in myocardium of myocardial fibrosis rats induced by Iso ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NO/(μ mol·L ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照	—	7.05 ± 1.42	0.86 ± 0.12
模型	—	3.64 ± 1.70**	1.67 ± 0.69**
苦参总黄酮	100	5.49 ± 1.95	1.00 ± 0.13
	200	5.65 ± 1.89 [#]	0.96 ± 0.30 [#]
	400	6.04 ± 1.99 [#]	0.87 ± 0.15 [#]
卡托普利	50	6.04 ± 2.11 [#]	0.92 ± 0.19 [#]

3.4 苦参总黄酮对心肌纤维化大鼠心肌病理改变的影响

对照组心肌结构完整, 横纹清晰, 细胞核居中, 间质未见血管扩张及炎性细胞的浸润。模型组心肌结构紊乱, 可见不同程度的心肌细胞萎缩、变性、灶状坏死及炎性细胞浸润, 可见明显的纤维化病灶形成。苦参总黄酮 100 mg/kg 组与对照组比较, 有心肌细胞变性、灶状坏死, 但纤维化不明显, 与模型组比较, 心肌纤维化有改善。苦参总黄酮 200、400 mg/kg 组及卡托普利组心肌损伤程度明显减轻, 心肌结构尚规整, 虽有较明显的变性改变, 但未见明显的坏死及纤维化病灶形成。结果见图 1。

4 讨论

各种原因引起的心肌损害, 随着病变持续和病程慢性化, 将导致心肌纤维化, 心肌纤维化时局部心肌细胞凋亡, 取而代之的是心肌成纤维细胞增殖和纤维性胶原成分增多, 心脏功能逐步减退, 最终导致心功能障碍、心力衰竭和心律失常。因此预防及控制心脏间质胶原增生从而有效防治心肌纤维化的措施, 是延缓心力衰竭、减少心律失常发生的重要手段。目前研究显示多种因素可引起心肌纤维化的发生, 包括肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)、内皮素、缓激肽、儿茶酚胺、NO 及生长因子 (转化生长因

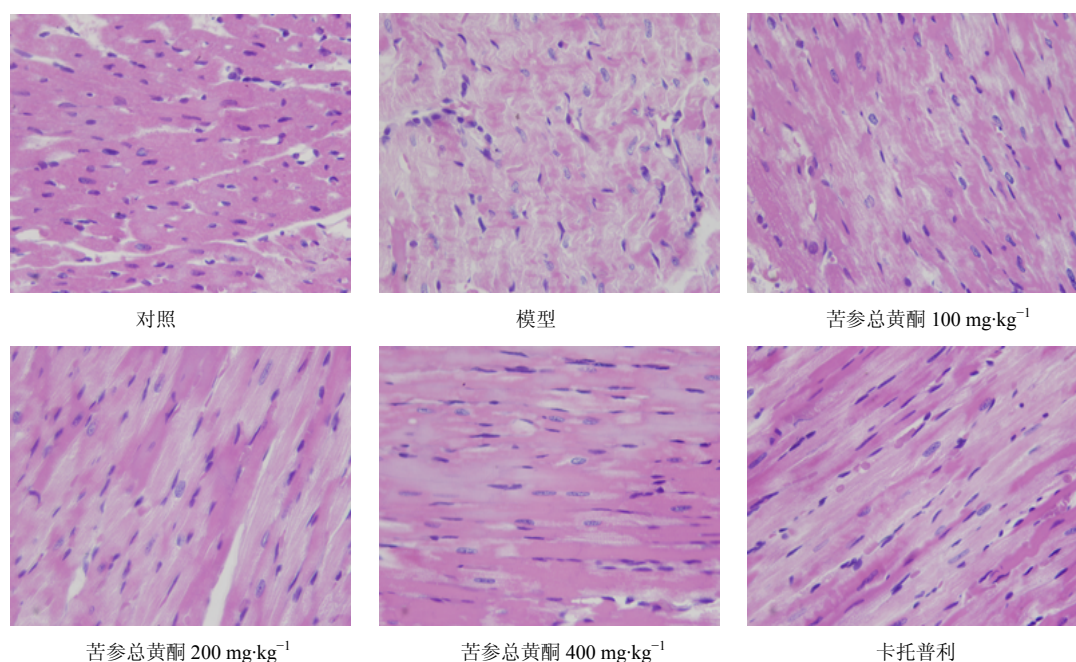


图1 各组大鼠心肌组织病理改变

Fig. 1 Pathologic changes of myocardium tissues of rats in each group

子- β 、结缔组织生长因子等)。RAAS 激活是公认的导致 MF 的神经内分泌机制,在心脏重构中起关键作用。其中,AngII 具有生长因子样作用,AngII 可通过自分泌和旁分泌的方式发挥作用,是刺激心肌肥大的重要体液因素之一,并可刺激心脏成纤维细胞增殖,引起心肌纤维化。AngII 致心肌纤维化的信号通路复杂,主要通过与其特异性受体 AngII I 型受体结合,并激活一系列信号分子通路将细胞外信号传递至细胞内产生纤维化效应^[6-8]。心肌纤维化的发生过程中,有炎症反应的参与,在心肌缺血损伤及发生炎症反应时,TNF- α 过量表达可诱发心肌细胞肥大、凋亡及心肌成纤维细胞增殖^[9],导致心肌纤维化、心力衰竭,有研究^[10]显示 AngII 可促进 TNF- α 合成,而抗 TNF- α 治疗可阻止心腔扩大,改善间质胶原重构,减轻心肌纤维化^[8]。本研究在前期结果基础上发现,Iso 颈背部 sc 建立大鼠心肌纤维化模型较成功,模型组表现为 HW/BW、LVW/BW 明显升高,循环系统和心肌局部的 AngII、I 和 III 型胶原水平明显增高,心肌 TNF- α 水平增高,心肌病理可见心肌损伤、明显的纤维化病灶形成。给予苦参总黄酮 21 d 后,可见大鼠 HW/BW、LVW/BW 降低,循环系统和心肌局部的 AngII 水平降低,心肌组织中 I、III 型胶原及 TNF- α 水平明显降低,病理改变较模型组改善,可见苦参总黄酮可通过抑制

循环系统和心肌局部的 AngII 的生成,从而降低心肌中 TNF- α 的水平、减少胶原的产生,进而抑制心肌纤维化。

在调节心肌纤维化的生物活性物质中,NO 受到人们的重视。NO 是一种内源性调节因子,具有抑制血小板聚集、改善血管内皮功能、舒张血管、降低血压、延缓心室肥厚等多种心血管系统作用^[11]。有研究^[12]发现在肾小管调节血压及内环境稳定中,NO 会抑制 AngII 对心血管系统的作用。本研究发现模型组大鼠心肌中 NO 水平显著低于对照组,经苦参总黄酮治疗后大鼠心肌中 NO 的水平增加,且随剂量增加药物作用依次增强,因此推测苦参总黄酮可能通过升高心肌组织中 NO 浓度,拮抗 AngII 所致的心肌纤维化,延缓并逆转心室肥厚,改善心肌纤维化。近年研究显示心肌纤维化的发展与氧化应激密切相关。脂质过氧化产物 MDA 的水平变化可直接反映心肌细胞膜脂质过氧化的速度与程度,并间接反映细胞损伤的程度。在实验中发现,经苦参总黄酮治疗后心肌中 MDA 水平显著降低,说明苦参总黄酮的抗心肌纤维化作用的发挥也有抗氧化的参与,与前期研究结果一致^[5]。

综上所述,苦参总黄酮抑制心肌纤维化的作用可能与其通过提高 NO 水平及抗氧化作用而拮抗循环及心肌局部 AngII 的生成,从而降低心肌中

TNF- α 及胶原生成有关, 本研究对心肌纤维化疾病防治具有一定的参考价值, 但进一步的具体细胞信号转导机制还需进一步探讨。

参考文献

- [1] Chong E S, Hwang G B, Nho C W, *et al.* Antimicrobial durability of air filters coated with airborne *Sophora flavescens* nanoparticles [J]. *Sci Total Environ*, 2013, 444: 110-114.
- [2] Sun M Y, Cao H Y, Sun L, *et al.* Antitumor activities of kushen: literature review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 373219.
- [3] Xu W R, Lin H S, Zhang Y, *et al.* Compound Kushen Injection suppresses human breast cancer stem-like cells by down-regulating the canonical Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30(1): 103-112.
- [4] 顾关云, 肖年生, 蒋 昱. 苦参的化学成分、生物活性和药理作用 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(5): 265-271.
- [5] 范红艳, 王艳春, 任 旷, 等. 苦参总黄酮对异丙肾上腺素所致大鼠心肌纤维化的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(4): 76-78.
- [6] 谢永进, 盖鲁粤. 血管紧张素 II 致心肌纤维化及其信号转导机制研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(6): 630-633.
- [7] Chen J X, Zeng H, Reese J, *et al.* Overexpression of angiotensin-2 impairs myocardial angiogenesis and exacerbates cardiac fibrosis in the diabetic db/db mouse model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(4): H1003-H1012.
- [8] Li L, Zhang Z C, Lei H, *et al.* Angiotensin II reduces cardiac adipoR1 expression through AT1 receptor/ROS/ERK1/2/c-Myc pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e49915.
- [9] Venkatachalam K, Venkatesan B, Valente A J, *et al.* WISP1, a pro-mitogenic, pro-survival factor, mediates tumor necrosis factor- α (TNF- α)-stimulated cardiac fibroblast proliferation but inhibits TNF- α -induced cardiomyocyte death [J]. *Biol Chem*, 2009, 284(21): 14414-14427.
- [10] Duerrschmid C, Crawford J R, Reineke E, *et al.* TNF receptor 1 signaling is critically involved in mediating angiotensin-II-induced cardiac fibrosis [J]. *J Mol Cell Cardio*, 2013, 57: 59-67.
- [11] Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric-oxide synthase isoforms as determinants of health and disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(3): 307-316.
- [12] Horita S, Nakamura M, Shirai A, *et al.* Regulatory roles of nitric oxide and angiotensin II on renal tubular transport [J]. *World J Nephrol*, 2014, 3(4): 295-301.