

· 药理 ·

## 芍药苷对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥大的抑制作用及其机制研究

刘和兰<sup>1</sup>, 莫丹<sup>2</sup>, 梁荣寿<sup>3</sup>, 李健哲<sup>3\*</sup>

(1. 南宁市红十字会医院, 南宁 530012; 2. 广西壮族自治区妇幼保健院, 南宁 530003;  
3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

**[摘要]** 目的:探讨芍药苷(PEF)对异丙肾上腺素(ISO)诱导大鼠心肌肥大的抑制作用及其潜在的机制。方法:雄性SD大鼠40只,随机分成5组,每组8只,正常组,模型组,PEF低、中、高剂量组(20,40,80 mg·kg<sup>-1</sup>),除正常组外,大鼠每天*ih*给予ISO(5 mg·kg<sup>-1</sup>,连续10 d)以诱导心肌肥大模型,*ih* ISO的同时*ig*给予PEF。给药结束后,分离心脏,测量全心重与体重以及左心室重与体重的比值;HE染色观察心肌细胞大小的改变;RT-qPCR检测肥大标志物心钠素(ANP)和脑钠素(BNP)以及心肌营养素-1(CT-1)的mRNA表达;Western blot和DCFH-DA荧光法分别检测心肌组织中CT-1蛋白的表达和活性氧(ROS)的水平。结果:与正常组比较,模型组全心重与体重、左心室重与体重的比值以及心肌细胞横截面积和ANP,BNP mRNA表达明显增加,同时心肌组织中CT-1 mRNA和蛋白表达以及ROS的水平也明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,PEF明显降低全心重与体重、左心室重与体重的比值以及心肌细胞横截面积和ANP,BNP mRNA表达,心肌组织中CT-1 mRNA和蛋白表达以及ROS的水平也明显降低。结论:PEF可抑制ISO诱导的心肌肥大,其机制可能与减少ROS的产生进而下调CT-1的表达有关。

**[关键词]** 芍药苷; 异丙肾上腺素; 心肌肥大; 心肌营养素-1; 活性氧

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0088-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160088

### Inhibitory Effect and Mechanism of Paeoniflorin on Isoproterenol-induced Myocardial Hypertrophy in Rats

LIU He-lan<sup>1</sup>, MO Dan<sup>2</sup>, LIANG Rong-shou<sup>3</sup>, LI Jian-zhe<sup>3\*</sup> (1. Nanning Red Cross Hospital, Nanning 530012, China; 2. Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530003, China; 3. Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect of paeoniflorin on isoproterenol (ISO)-induced myocardial hypertrophy in rats and its potential mechanism. **Method:** Totally 40 SD rats were randomly divided into five groups: the normal group, the model group and paeoniflorin low, middle and high does groups (20, 40, 80 mg·kg<sup>-1</sup>), with eight rats in each group. Except for the normal group, all of the rest groups were subcutaneously injected with isoprenaline (5 mg·kg<sup>-1</sup>) for 10 days to induce the myocardial hypertrophy model and at the same time intraperitoneally injected with PEF. At the end of drugs treatment, their hearts were collected to measure the heart weight (HW), left ventricular weight (LVW) and the ratio to body weight (BW). The changes in the size of cardiac cells were observed by hematoxylin-eosin staining. The mRNA expressions of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and cardiostrophin-1 (CT-1) were measured by real-time PCR. The protein expression of CT-1 and level of reactive oxygen species (ROS) in myocardium were detected by Western blot and DCFH-DA florescent probe, respectively. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant increases in the ratio of HW/BW and LVW/BW, cardiac myocyte cross-sectional area, mRNA expressions of ANP and BNP, CT-1 mRNA and protein expressions and ROS level at myocardial tissues ( $P <$

**[收稿日期]** 20141201(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81460613);广西自然科学基金项目(2013GXNSFB019126);广西壮族自治区卫生厅科研项目(Z2013206);广西中医药管理局科研项目(GZZC14-36)

**[第一作者]** 刘和兰,主管药师,从事心血管药理学研究,Tel:0771-2326659,E-mail:helan\_liu0771@126.com

**[通讯作者]** \*李健哲,博士,副主任药师,从事心血管药理学研究,Tel:0771-2239088,E-mail:lijianzhe20035@126.com

0.01). Compared with the model group, PEF could obviously decrease the ratio of HW/BW and LVW/BW, cardiac myocyte cross-sectional area, mRNA expressions of ANP and BNP, CT-1 mRNA and protein expressions and ROS level at myocardial tissues. **Conclusion:** PEF can inhibit ISO-induced myocardial hypertrophy. Its mechanism may be correlated with the down-regulation of CT-1 expression by inhibiting ROS production.

**[Key words]** paeoniflorin; isoproterenol; myocardial hypertrophy; cardiostrophin-1; reactive oxygen

心肌肥大是一种适应性反应,其目的在于提高心肌功能,以应对增加的心脏负荷。心肌肥大虽然在短期内对维持心脏的正常工作具有一定的积极意义,但持续的心肌肥大会导致心功能的失代偿并最终发展成为心力衰竭。因此,探讨心肌肥大的发生发展机制,寻求有效的防治措施对于降低心力衰竭的发生具有重要的意义。心肌肥大发生的机制错综复杂,目前尚未完全阐明。但大量的研究发现,活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量产生和心肌营养素-1(cardiostrophin-1, CT-1)表达的增加在心肌肥大的发生发展过程中有着重要的作用<sup>[1-2]</sup>。

芍药苷(paeoniflorin, PEF)是从中药芍药中提取的一种有效成分,具有多种药理学活性,在多个系统中发挥着有益的效应,如改善肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导的胰岛素抵抗<sup>[3]</sup>、抑制博来霉素诱导的肺纤维化<sup>[4]</sup>、保护晚期糖基化终产物所致的肾小球膜细胞的损伤<sup>[5]</sup>以及改善脂多糖诱导的神经元损伤等<sup>[6]</sup>。笔者的前期研究也证实,PEF能够抑制阿霉素诱导的心肌细胞凋亡和异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的心肌纤维化,其机制与抑制ROS的产生有关<sup>[7-8]</sup>,但PEF对心肌肥大是否具有抑制效应,尚未见文献报道。

生理状况下,交感神经通过释放神经递质维持正常的心功能。但在病理状况下,交感神经的过度兴奋将导致心肌肥大的产生。ISO是 $\beta$ 肾上腺素能受体激动剂,大剂量应用ISO可模拟交感神经兴奋从而诱发心肌肥大的形成,其机制与诱导产生过量的ROS有关<sup>[9]</sup>。由于心肌肥大的形成与产生过量的ROS有关,以及PEF具有抗氧化效应。因此,本实验用ISO诱导大鼠心肌肥大,观察PEF对ISO诱导的心肌肥大是否具有抑制效应,并初步探讨其机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性SD大鼠,体重230~250g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(京)2007-0001。

**1.2 药物及试剂** PEF(纯度 $\geq 98\%$ ,杨凌东科麦迪森制药有限公司,批号070109),ISO(美国Sigma

公司,批号017K1402), Trizol Reagent(美国Invitrogen公司,批号1334257),逆转录试剂盒(美国MBI公司,批号00087036),CT-1和 $\beta$ -actin抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab13975和ab3280),活性氧检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究,批号0402261212);PCR引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

**1.3 仪器** XPN-100型低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司),7500型实时荧光定量PCR仪及分析软件SDS(美国Applied Biosystems公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与处理** 大鼠随机分成5组,每组8只,分别为正常组,ISO组,PEF( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + ISO组, PEF( $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + ISO组, PEF( $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + ISO组。除正常组每天皮下给予生理盐水外,其余4组每天背部*ih* ISO( $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )连续10d,以诱导心肌肥大模型。在注射ISO的同时,*ig*给予不同剂量的PEF。

**2.2 全心重与左心室质量的测定** 所有大鼠在处理前称量体重(body weight, BW),然后迅速开胸分离心脏,用PBS洗涤数次,剪去周围的大血管及结缔组织,用滤纸吸干后称取全心质量(heart weight, HW);再沿房室交界处剪去心房和右心室游离壁,保留左心室及室间隔,滤纸吸干后称取左心室质量(left ventricular weight, LVW)。计算HW/BW, LVW/BW,以此来评价心肌肥厚的程度。

**2.3 心肌组织HE染色** 剪取左心室心肌组织(包括室间隔),固定包埋后用组织切片机切片,厚约 $5\mu\text{m}$ ,将切片粘于预先包被多聚赖氨酸的载玻片上,用于HE染色。在普通光学显微镜下观察心肌细胞形态,使用病理图像分析系统测量并计算心肌细胞的横截面积。

**2.4 RT-PCR检测心钠素(atrial natriuretic peptide, ANP),脑钠素(brain natriuretic peptide, BNP)和CT-1 mRNA的表达** 由于ANP和BNP是心肌肥大的标志物<sup>[10]</sup>,因此检测了大鼠左心室组织ANP和BNP mRNA表达的变化。按照Trizol RNA提取试剂盒说明书,提取心肌组织的总RNA;取 $1\mu\text{g}$ 总RNA

在 20  $\mu\text{L}$  体系中逆转录合成 cDNA;取 cDNA 进行 PCR 扩增,用以检测 ANP, BNP 和 CT-1 mRNA 的表

达,引物序列见表 1。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,循环 40 个周期;最后 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

基因	上游	下游	片段长度/bp
ANP	5'-TGGGCTCCTTCTCCATCACC-3'	5'-GCCAAAAGGCCAGGAAGAGG-3'	145
BNP	5'-CTTGGGCTGTGACGGGCTGAG-3'	5'-GCTGGGAAAGAAGACGCCGA-3'	153
CT-1	5'-GGAAGTCTGGAAGACCACCA-3'	5'-TGCTGCACATATTCTCCAG-3'	137
GAPDH	5'-TGGCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3'	5'-GGCCTCTCTCTGCTCTCAGTATC-3'	138

### 2.5 Western blot 检测心肌组织 CT-1 蛋白的表达

实验结束后,剪取左心室心肌组织约 100 mg,加入 1 mL 细胞裂解液,匀浆破碎,4  $^{\circ}\text{C}$  离心取上清,用 BCA 法测定蛋白含量。取等量的蛋白行 SDS-PAGE 电泳,半干式电转膜,将蛋白电转移到硝酸纤维素膜上,用含 5% 脱脂牛奶的 TBS 室温封闭 1 h 后加入 CT-1 单克隆抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,然后加入辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育 1 h,洗膜后显影。用凝胶成像系统进行灰度扫描,以  $\beta$ -actin 作为内参。

### 2.6 DCFH-DA 荧光法检测心肌组织 ROS 的水平

大鼠心肌组织剪碎后,加入胰蛋白酶将心室肌细胞消化成单细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^7$  个/mL,然后加入二氯氢化荧光素二酯 (dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,洗涤 3 次后用酶标仪检测每组细胞的荧光强度(激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm)。

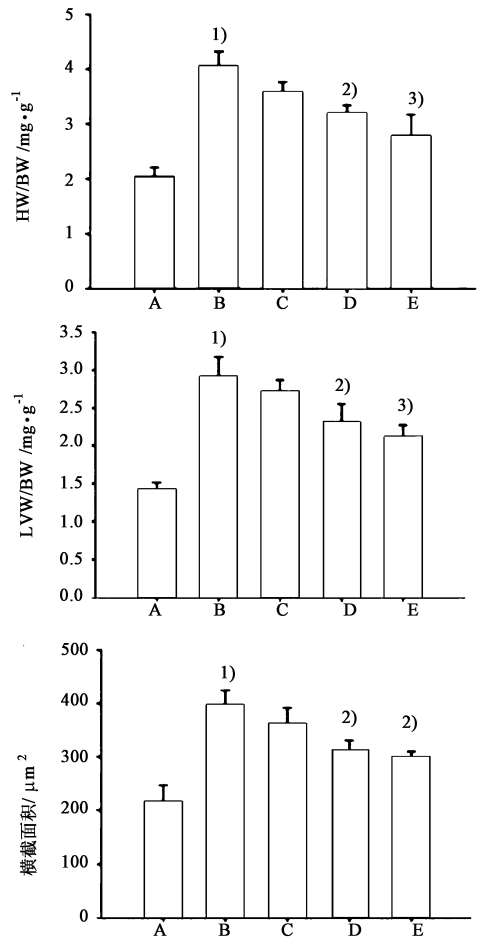
2.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件,所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间差异比较用方差分析,组间比较用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 对 ISO 诱导大鼠心肌肥大的影响 与正常组比较,ISO 模型组大鼠的心脏明显增大 ( $P < 0.01$ ), HW/BW 和 LVW/BW 均显著增加 ( $P < 0.01$ ),芍药苷各给药组均明显降低 HW/BW, LVW/BW 及横截面积 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 1。

3.2 对 ISO 诱导大鼠心肌肥大病理组织的影响 与正常组比较,ISO 组的心肌细胞明显增大,各给药组的心肌细胞明显减小,尤其是 PEF 80  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组效果最为明显。见图 2。

3.3 对 ISO 诱导心肌组织 ANP 和 BNP mRNA 表达的影响 与正常组比较,ISO 组心肌组织中 ANP 和 BNP mRNA 水平明显上调 ( $P < 0.01$ );与 ISO 组比较,PEF 各剂量组均能降低 ANP 和 BNP mRNA 水平,尤其是 PEF 中、高剂量组较为明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3。



A. 正常组; B. ISO 组; C. PEF 20  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; D. PEF 40  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. PEF 80  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组(图 2~5 同);与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与 ISO 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 1 PEF 对大鼠心肌组织 HW/BW, LVW/BW 及横截面积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 1 Effects of PEF on HW/BW, LVW/BW and cross-sectional area in myocardium of rat ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

3.4 对 ISO 诱导心肌组织 CT-1 mRNA 和蛋白表达的影响 与正常组比较,ISO 模型组心肌组织中 CT-1 的 mRNA 及蛋白表达水平明显上调 ( $P < 0.01$ );与 ISO 组比较,PEF 各剂量组均能降低 CT-1 的 mRNA 及蛋白水平,尤其是 PEF 中、高剂量组较

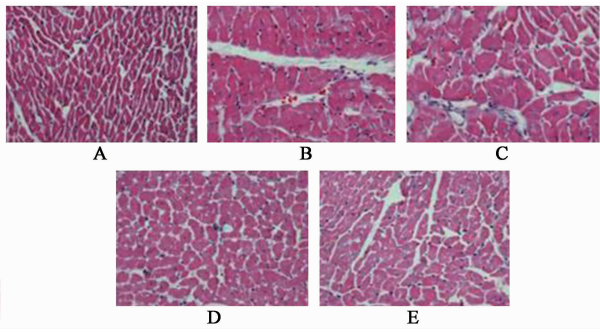
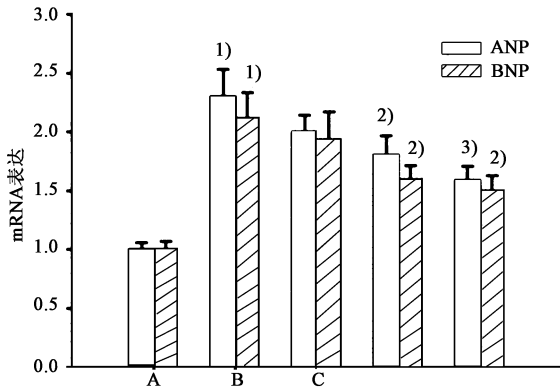


图 2 PEF 对大鼠心肌肥大病理组织形态学的影响 (HE, ×400)  
Fig. 2 Effects of PEF on Myocardial hypertrophy of pathological tissue morphology in rat (HE, ×400)



与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 ISO 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (图 4~5 同)

图 3 PEF 对大鼠心肌组织 ANP 和 BNP mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig. 3 Effects of PEF on expression of ANP and BNP mRNA in myocardium of rat ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

为明显 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 4。

**3.5 对 ISO 诱导大鼠心肌组织 ROS 水平的影响**  
与正常组比较, ISO 处理后大鼠心肌组织中 ROS 的水平明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 ISO 模型组比较, PEF 各剂量组均能降低 ROS 含量, 尤其是 PEF 中、高剂量组较为明显 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 5。

#### 4 讨论

CT-1 在多种组织中均有表达, 如心脏、骨骼肌、卵巢和睾丸等, 其中在心肌组织中表达最高。有文献报道, 在醛固酮诱导的大鼠心肌肥大模型或自发性高血压大鼠肥大的左心室, 心肌组织中 CT-1 的表达水平明显增加, 敲除 CT-1 或下调其表达后则可明显抑制心肌肥大的形成<sup>[2, 11]</sup>。另有研究证实, 左心室肥大病人其血浆中 CT-1 的水平明显增高, 并且与心肌肥大的严重程度密切相关<sup>[12]</sup>。以上研究结果提示, CT-1 可能是心肌肥大发生发展过程中一个潜在的生物标记物, 可作为抗心肌肥大治疗的一个靶

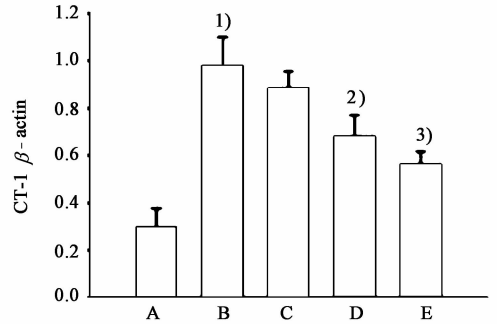
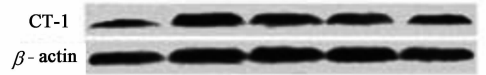
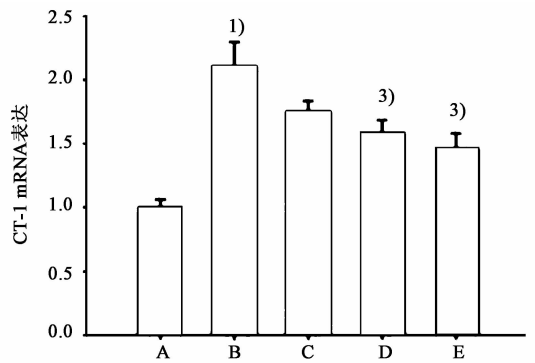


图 4 PEF 对大鼠心肌组织 CT-1 mRNA 及蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig. 4 Effects of PEF on expression of CT-1 mRNA and protein in myocardium of rat ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

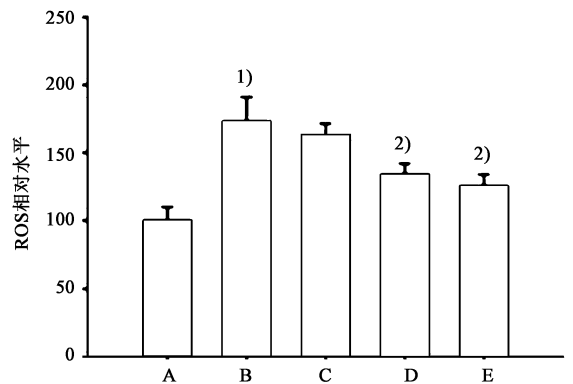


图 5 PEF 对大鼠心肌组织 ROS 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig. 5 Effects of PEF on ROS level in myocardium of rat ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

目标<sup>[13]</sup>。

最近有研究发现, PEF 在心血管系统中也发挥着有益的药理学作用, 如抑制溶血磷脂酰胆碱所致的内皮细胞炎症因子的产生和阿霉素诱导的心肌细胞凋亡<sup>[14, 7]</sup>。因此推测, PEF 可能具有抑制心肌肥大的作用。本实验中也确实观察到, PEF 能够抑制 ISO 诱导的心肌肥大, 主要表现为降低 HW/BW 与

LVW/BW、减少心肌细胞的横截面积以及下调 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达。已知 ANP 和 BNP 基因均为胚胎期表达的基因,出生后在正常心肌组织中的表达量很低,如心肌组织中 ANP 和 BNP 表达量明显增加,则属于胚胎期基因重演,在病理性心肌肥大的发生发展过程中有着重要的作用<sup>[15]</sup>。大量的研究证实,多种因素(如 ISO,压力负荷和血管紧张素 II 等)诱导的心肌肥大,心肌组织中 ANP 和 BNP 的表达水平均明显增加<sup>[16-17]</sup>。因此,ANP 和 BNP 可作为心肌肥大的可靠标志物<sup>[10]</sup>。如前所述,CT-1 在心肌肥大的形成过程中有着重要的作用,因此认为 PEF 抑制心肌肥大的效应可能与 CT-1 有关。本实验结果也显示,PEF 在抑制 ISO 诱导的心肌肥大的同时,CT-1 的 mRNA 和蛋白表达水平也明显下调。以上研究结果说明,PEF 对心肌肥大的抑制效应可能与下调 CT-1 的表达有关。

有文献报道,ISO 诱导的心肌肥大与产生过量的 ROS 有关以及 CT-1 的表达受 ROS 的调节<sup>[9,18]</sup>。本实验结果显示,PEF 在降低 CT-1 表达的同时,心肌组织中 ROS 的水平也显著下降。

综上所述,PEF 能够抑制 ISO 诱导的心肌肥大,其机制可能与抑制 ROS 的产生进而下调 CT-1 的表达有关。

#### [参考文献]

[1] Li Y, Wang X Y, Zhang Z L, et al. Excess EOS induced by AAPH causes myocardial hypertrophy in the developing chick embryo [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176 (1):62-73.

[2] Al-Mazroua H A, Al-Rasheed N M, Korashy H M. Downregulation of the cardiostrophin-1 gene expression by valsartan and spironolactone in hypertrophied heart rats in vivo and rat cardiomyocyte H9c2 cell line *in vitro*: a novel mechanism of cardioprotection [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 61(4):337-344.

[3] Kong P, Chi R, Zhang L, et al. Effects of paeoniflorin on tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance and changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Fitoterapia*, 2013, 91C:44-50.

[4] Ji Y, Wang T, Wei Z F, et al. Paeoniflorin, the main active constituent of *Paeonia lactiflora* roots, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by suppressing the synthesis of type I collagen [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(3):825-832.

[5] Zhang M H, Feng L, Zhu M M, et al. Antioxidative and anti-inflammatory activities of paeoniflorin and oxypaeoniflora on AGEs-induced mesangial cell damage [J]. *Planta Med*, 2013, 79(14):1319-1323.

[6] 胡增峣,徐岚,闫蓉,等.芍药苷作用于神经系统的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2013,38(3):297-301.

[7] Li J Z, Yu S Y, Wu J H, et al. Paeoniflorin protects myocardial cell from doxorubicin-induced apoptosis through inhibition of NADPH oxidase [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(12):1569-1575.

[8] 李健哲,余术宜.芍药苷对异丙肾上腺素诱导心肌成纤维细胞增殖和胶原产生的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2013,23(16):47-52.

[9] 刘艳丽,刘奔,屈扬扬,等.氧化应激和钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 参与  $\beta$  肾上腺素受体持久激动引起的大鼠心肌肥厚[J]. *生理学报*, 2013,65(1):1-7.

[10] Li J Z, Peng J, Xiao L, et al. Reversal of isoprenaline-induced cardiac remodeling by rutaecarpine through stimulating calcitonin gene-related peptide production [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(10):949-959.

[11] Lo'pez N, Di'ez J, Fortunõo MA. Differential hypertrophic effects of cardiostrophin-1 on adult cardiomyocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41:902-913.

[12] Monserrat L, Lõpez B, Gonzõlez A, et al. Cardiostrophin-1 plasma levels are associated with the severity of hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(2):177-183.

[13] Gonzõlez A, Lõpez B, Ravassa S, et al. Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(3):509-518.

[14] Li J Z, Wu J H, Yu S Y, et al. Inhibitory effects of paeoniflorin on lysophosphatidylcholine-induced inflammatory factor production in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(2):493-497.

[15] 胡玉龙,徐慧,王永梅,等. AMPK 在小鼠运动性和病理性心肌肥大能量代谢中的作用 [J]. *体育科学*, 2014,34(9):39-43.

[16] Ying H, Xu M C, Tan J H, et al. Pressure overload-induced cardiac hypertrophy response requires janus kinase 2-histone deacetylase 2 signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11):20240-20253.

[17] Xie Y Y, Sun M M, Lou X F, et al. Overexpression of PEP-19 suppresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 125(3):274-282.

[18] Ateghang B, Wartenberg M, Gassmann M, et al. Regulation of cardiostrophin-1 expression in mouse embryonic stem cells by HIF-1 $\alpha$  and intracellular reactive oxygen species [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119 (6):1043-1052.

[责任编辑 周冰冰]