

穿心莲内酯对异丙肾上腺素诱导的 心肌肥厚大鼠血管活性物质的影响

黄志华^{1,2}, 曾雪亮², 裘莉莉², 熊冬莲², 曾靖², 韩立民^{1,3*}
(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007; 2. 赣南医学院, 江西赣州 341000;
3. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**观察穿心莲内酯(andrographolide, AP)对异丙肾上腺素(isopropylarterenol, Iso)所致大鼠心肌肥厚的保护作用及其对血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)、心钠素(atrial natriuretic peptide, ANP)、内皮素(endothelin, ET)和一氧化氮(nitric oxide, NO)的影响。**方法:**以 Iso 1 mg·kg⁻¹背部皮下注射(sc)连续 10 d 建立大鼠心肌肥厚模型。选模第 2 天给药组 sc 给予低、中、高剂量(0.1, 0.3, 1.0 μmol·kg⁻¹)的 AP, 溶剂组 sc 二甲亚砜, 正常组和模型组 sc 给予生理盐水, 连续 14 d, 末次给药后禁食 12 h, 取血, 分离血清及血浆, 取心肌组织并制成 10% 匀浆。酶活性分析法检测血清及心肌组织乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性; 硝酸还原酶法检测血清 NO 含量; 放射免疫法测定血浆 Ang Ⅱ, ANP 和 ET 的含量。**结果:**与正常对照组相比, 模型组大鼠血清 LDH 活性升高(1 425.4 ± 304.7) U·mL⁻¹, (*P* < 0.01), 心肌组织 LDH 活性降低(662.5 ± 172.6) U·g⁻¹, (*P* < 0.05), 血浆 ET(62.45 ± 12.27) ng·L⁻¹ (*P* < 0.05), 含量升高, ANP(241.82 ± 127.71) ng·g⁻¹, (*P* < 0.05) 和 NO(37.21 ± 2.62) μmol·L⁻¹ (*P* < 0.01) 含量降低。与模型组相比, AP 处理后血清 LDH 活性降低(*P* < 0.001), 组织 LDH 活性升高(*P* < 0.05), 血浆 Ang Ⅱ 及 ET 含量下降(*P* < 0.05), 而血浆 ANP 含量及血清 NO 含量升高(*P* < 0.05)。**结论:**穿心莲内酯可能通过影响大鼠血管活性物质的平衡, 抑制 RAS 系统及 ET 的合成, 增加 ANP 及 NO 的合成, 从而抑制心肌肥大及心力衰竭的进程, 对心脏起保护作用。

[关键词] 穿心莲内酯; 异丙肾上腺素; 心肌肥厚; 血管活性物质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0166-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120411.0913.001 **[网络出版时间]** 2012-04-11 9:13

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120411.0913.001.html>

Effect of Andrographolide on Vasoactive Substances in Myocardial Hypertrophy Rats

HUANG Zhi-hua^{1,2}, ZENG Xue-liang², QIU Li-li², XIONG Dong-lian², ZENG Jing², HAN Li-min^{1,3,*}
(1. Hunan Chinese Traditional Medicine University, Changsha 410007, China; 2. Gannan Medical College,
Ganzhou 341000, China; 3. Jiangxi Chinese Traditional Medicine College, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protection of andrographolide (AP) on rat's myocardial hypertrophy induced by isopropylarterenol (Iso), explore balance of vasoactive substance. **Method:** The rat's myocardial hypertrophy model is formed through hypodermic injection which extended 10 days at back skin with Iso, 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹. Once the model is formed, it will be administrated with various doses of AP, dimethyl sulfoxide (DMSO) or normal saline through hypodermic injection from the second day, and the process will extend 14 days. After the last administration, the rat will be in absolute diet status for 12 h and its blood and heart are taken under anesthesia. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in serum and myocardium tissue, the level of

[收稿日期] 20111123(002)

[基金项目] 江西省卫生厅科技项目(20091208)

[第一作者] 黄志华, 教授, 在读博士, 从事心脑血管药理研究

[通讯作者] * 韩立民, 教授, 博士生导师, 从事消化系统病证研究, E-mail: jxhlm@163.com.

NO in serum, and the content of angiotensin II (Ang II), endothelin (ET) and atrial natriuretic peptide (ANP) in plasma were investigated. **Result:** Compared with control group, Iso group showed a change about activity of LDH which was increased in serum but decreased in myocardium tissue, a descended level of NO in serum, improved content of Ang II and ET while reduced content of ANP in plasma. However, the activity of LDH is depressed in serum and elevated in myocardium tissue in AP groups, furthermore, the level of NO and ANP were enhanced while the content of Ang II and ET were reduced in AP groups. **Conclusion:** AP has a protection on rat's myocardial hypertrophy caused by Iso, and its mechanism probably result of modulating the homeostasis of Ang II, ANP, ET and NO.

[**Key words**] andrographolide; isopropylarterenol; myocardial hypertrophy; vasoactive substance

穿心莲内酯 (andrographolide, AP) 为爵床科植物穿心莲的有效成分之一,具有抗菌消炎,止咳平喘等作用,临床上用于治疗多种感染性疾病。最新研究表明 AP 具有免疫调节、抗肿瘤、治疗糖尿病、降低血压、抑制血小板聚集及抗血栓形成等作用^[1-5]。

心肌肥厚是心脏对慢性压力或容量超负荷产生的靶器官反应,是导致中风、心肌梗死、心律失常、猝死、心绞痛、心力衰竭和肾衰竭的主要危险因素。心肌肥厚的发病机制具有多元性和复杂性,有研究表明心肌肥厚的发生与血管活性物质密切相关,其中血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 及内皮素 (endothelin, ET) 可能是促使心脏肥厚发展加重的始动因素,而心钠素 (atrial natriuretic peptide, ANP) 则是重要的代偿因素,它能通过对 ET-1 的拮抗而缓解心脏肥厚的进展^[6]。我们的前期研究结果表明,AP 可通过提高抗氧化能力,减轻异丙肾上腺素 (isopropylarterenol, Iso) 诱导的心肌肥厚^[7],本实验拟采用背部皮下注射 Iso 的方法制作大鼠心肌肥厚模型,观察 AP 的抗心肌肥厚作用是否与改变血管活性物质水平有关。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 200 ~ 250 g,购自江西中医学院,动物许可证号 SCXK (赣) 2005-0001。

1.2 药品和试剂 穿心莲内酯,由沈阳药科大学中医药学院植化教研室提供,纯度为 99%,用 DMSO 溶解后,再用 NS 稀释成 0.05, 0.15, 0.5 mmol·L⁻¹;异丙肾上腺素 (Iso) 注射针剂,上海禾丰制药有限公司,批号 H31021344,用 NS 稀释成 0.2 g·L⁻¹;7% 的二甲基亚砷 (DMSO),用 NS 配成,浓度与 AP 中相同;Ang II, ET, ANP 放免试剂盒购自北京福瑞生物工程公司,乳酸脱氢酶 (LDH) 及一氧化氮 (NO) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 SN-695 型智能放免 γ 测量仪 (上海核

福光电仪器有限公司), ZS83-1 型内切式组织匀浆器 (浙西机械厂), 赛多利斯 BS224S 型电子天平 (北京赛多利斯仪器有限公司), MK3 型酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 造模与给药方法 按文献 [8] 制备心肌肥厚模型,雄性 SD 大鼠 40 只,200 ~ 250 g,随机分成 5 组,每组 8 只,分别为:对照组、心肌肥厚模型组、溶剂 (DMSO) 组、0.1, 0.3, 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ AP 组。除正常对照组外,其余各组大鼠背部按 5 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 给予 Iso 0.2 g·L⁻¹,连续 10 d,制备心肌肥厚模型;正常对照组给予等体积 NS。造模后第 2 天,给予 Iso 后 30 min,正常对照组及模型组于背部 sc 给予 NS 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹,溶剂对照组给予等体积 7% DMSO,AP 组分别 sc 等体积的 AP 0.1, 0.3, 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续 14 d。

2.2 血清 LDH 活性及 NO 含量检测 大鼠麻醉后,腹腔静脉取血,静置,4 $^{\circ}\text{C}$, 800 \times g,离心 10 min,分离血清,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。严格按试剂盒说明,酶活性分析法测定血清 LDH 活性,硝酸还原酶法测定 NO 含量。

2.3 心肌组织 LDH 活性检测 称取 500 mg 左心室心肌组织冰浴下制成 10% 匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$, 1 200 \times g,离心 10 min,取上清, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。严格按试剂盒说明,测定 LDH 活性。以匀浆中每克蛋白的活性表示组织 LDH 的活性,蛋白定量采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为标准。

2.4 血浆 Ang II, ET 和 ANP 含量检测 大鼠麻醉后,腹腔静脉取血 2 mL,迅速注入放在冰水浴的酶抑制剂抗凝管中,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$, 800 \times g,离心 10 min,分离血浆,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于测定 Ang II 含量。另取静脉血 2 mL,迅速注入含抑肽酶及 EDTA-Na2 的试管中,同样条件分离血浆,用于测定 ET 和 ANP 含量。严格按试剂盒说明,放射免疫学方法检测血

浆 Ang II、ET 和 ANP 含量。

2.5 统计学分析 应用 Prism 4.0 统计学软件进行统计学分析。各测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间各测定指标的总比较采用单因素方差分析, 组内各指标的多重比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AP 对心肌肥厚大鼠血清及心肌组织 LDH 活性的影响 与正常对照组相比, 模型组及溶剂对照组大鼠血清 LDH 活性升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)、心肌组织 LDH 活性降低 ($P < 0.05, P < 0.001$)。与模型组相比, 溶剂对照组大鼠血清及组织 LDH 的改变无统计学差异, 提示溶剂 DMSO 对 LDH 的释放无明显影响。与模型组相比, AP 处理后血清 LDH 活性降低 ($P < 0.001$), 而组织 LDH 活性升高 ($P < 0.05, P < 0.001$), 见表 1。

3.2 AP 对心肌肥厚大鼠 Ang II、ET、ANP 和 NO 含量的影响 与正常对照组相比, 模型组及溶剂对照组大鼠血浆 Ang II 和 ET 含量均升高 ($P < 0.05$), 而 ANP ($P < 0.05$) 和 NO ($P < 0.01$) 含量降低。与模型

组相比, 溶剂对照组大鼠血浆 Ang II、ET、ANP 和 NO 含量改变无统计学差异, 提示溶剂对 4 种血管活性物质无明显影响。AP 治疗组与模型组相比, 0.1, 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组血浆 Ang II、ET 降低有统计学差异 ($P < 0.05$); 而血浆 ANP、NO 含量升高, 3 个剂量组均有统计学差异 ($P < 0.001, P < 0.05$ 或 $P < 0.001, P < 0.01$)。见表 2。

表 1 AP 对 Iso 诱导的心肌肥厚大鼠血清及心肌组织 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	血清 LDH $/\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	组织 LDH $/\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
对照	-	889.2 ± 208.2 ²⁾	1 083.6 ± 188.6 ¹⁾
模型	-	1 425.4 ± 304.7	662.5 ± 172.6
溶剂	-	1 249.7 ± 140.9 ¹⁾	512.1 ± 163.1 ³⁾
AP	0.1	822.9 ± 284.5 ³⁾	952.1 ± 123.9 ¹⁾
	0.3	562.4 ± 229.6 ³⁾	1 026.6 ± 235.0 ¹⁾
	1.0	893.4 ± 201.2 ³⁾	1 020.1 ± 237.9 ¹⁾

注: 与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

表 2 AP 对 Iso 诱导的心肌肥厚大鼠血浆 Ang II、ET、ANP、NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	Ang II $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	ET $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	ANP $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	NO $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	-	276.73 ± 47.42	45.34 ± 9.27 ¹⁾	501.84 ± 105.79 ¹⁾	53.64 ± 2.13 ²⁾
模型	-	381.70 ± 93.01	62.45 ± 12.27	241.82 ± 127.71	37.21 ± 2.62
溶剂	-	357.93 ± 39.12	60.43 ± 8.91 ¹⁾	206.41 ± 45.30 ¹⁾	42.53 ± 10.66
AP	0.1	215.33 ± 68.08 ¹⁾	25.07 ± 8.94 ¹⁾	805.59 ± 218.22 ³⁾	59.93 ± 6.99 ³⁾
	0.3	221.44 ± 50.40 ¹⁾	36.93 ± 13.77 ¹⁾	615.69 ± 271.21 ¹⁾	64.00 ± 1.56 ³⁾
	1.0	247.95 ± 30.06	31.64 ± 6.18	613.53 ± 316.54 ¹⁾	52.88 ± 4.26 ²⁾

4 讨论

Iso 是 β 肾上腺素受体激动药, 对心脏表现为兴奋作用, 可增加心肌收缩力、加快心率、加速传导。但使心肌耗氧量增加, 心排出量增加。另外, Iso 通过激动 β_2 受体使骨骼肌血管舒张, 对肾血管和肠系膜血管舒张作用较弱, 对冠状血管也有舒张作用, 使收缩压升高舒张压下降。由于心脏的代偿作用, 长期使用 Iso 可导致心肌肥厚。因此, 本实验采用异丙肾上腺素制作心肌肥厚的模型。课题组的前期研究表明^[7,9], 背部皮下注射 Iso $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 可导致全心质量指数及左心室质量指数升高, 提示心肌肥厚模型制备成功。LDH 的释放是组织细胞损伤的标志之一, 实验结果显示模型组血清 LDH 水平升

高, 心肌组织 LDH 水平降低, 提示 Iso 诱导的心肌肥厚动物模型存在心肌细胞坏死; 给予 AP 治疗后, 血清 LDH 水平降低, 心肌组织 LDH 水平升高, 说明 AP 处理可减少心肌细胞损伤。

心肌肥厚的发生是许多因素共同参与的结果, 其中血管活性物质的失平衡就起着非常重要的作用。高血压患者的肾素-血管紧张素系统 (rennin angiotensin system, RAS) 被高度激活, 儿茶酚胺大量释放, 造模大鼠心率增快, 血压升高, 引起心肌损伤、心肌缺血、心肌坏死、心肌纤维化, 心力衰竭、左室重构和体内水钠潴留等心肌结构及心脏功能一系列改变, 而 Ang II 在其中起着重要作用^[10]。ET 是目前已知的作用最强的缩血管因子, 除其强烈地缩血管

作用外,还可强烈地刺激血管平滑肌细胞、成纤维细胞的生长,并且参与介导炎症反应和心肌细胞的肥大^[11-12]。心钠素具有抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统、内皮素的分泌及交感神经活动等作用。在一些病理状况下(如心脏衰竭或心脏肥厚),可能作为自分泌和(或)旁分泌抑制性调节因子抑制过度心脏细胞生长,对 ET-1 促心肌细胞肥大有明显的抑制作用^[12]。ET-1 可能是促使心脏肥厚发展加重的始动因素,而 ANP 则是重要的代偿因素,它能通过对 ET-1 的拮抗而缓解心脏肥厚的进展。NO 作为体内重要的生理因子,可以通过舒张血管,减少心脏的前后负荷,降低心肌氧耗,直接灭活氧自由基等途径,抑制心肌和血管增殖,抑制心肌肥厚,产生心肌保护作用^[13]。本实验结果显示,模型组大鼠血管活性物质呈现失平衡状态,表现为心肌肥厚始动因素 Ang II 及 ET 显著升高、而抗心肌肥厚血管活性物质 ANP 及 NO 显著降低,经 AP 治疗后血浆 Ang II 及 ET 含量降低、ANP 及 NO 含量升高,提示 AP 可能通过影响大鼠体内血管活性物质的平衡,抑制 RAS 系统及 ET 的合成、而增加 ANP 及 NO 的合成,从而抑制心肌肥大及心力衰竭的进程,其调控机制及临床应用价值有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Lee K C, Chang H H, Chung Y H, et al. Andrographolide acts as an anti-inflammatory agent in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages by inhibiting STAT3-mediated suppression of the NF- κ B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(3): 678.

[2] Chun J Y, Tummala R, Nadiminty N, et al. Andrographolide, an herbal medicine, inhibits interleukin-6 expression and suppresses prostate cancer cell growth [J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(8):868.

[3] Gunn E J, Williams J T, Huynh D T, et al. The natural products parthenolide and andrographolide exhibit anti-

cancer stem cell activity in multiple myeloma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(6): 1085.

[4] Jin L, Shi G, Ning G, et al. Andrographolide attenuates tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 332(1/2): 134.

[5] Hsieh C Y, Hsu M J, Hsiao G, et al. Andrographolide enhances nuclear factor-kappaB subunit p65 Ser536 dephosphorylation through activation of protein phosphatase 2A in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 5942.

[6] Han B, Hasin Y. Cardiovascular effects of natriuretic peptides and their interrelation with endothelin-1 [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2003, 17: 41.

[7] 钟富有, 李良东, 黄志华, 等. 穿心莲内酯对大鼠心肌肥厚及抗氧化作用的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(1): 226.

[8] Stanton H C, Brenner G, Mayfield E D Jr. Studies oil isoproterenol-induced cardiomegaly in rats [J]. *Am Heart J*, 1969, 77(1): 72.

[9] 胡志苹, 黄志华, 吴亮亮, 等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(13): 163.

[10] Di Zhang A, Cat A N, Soukaseum C, et al. Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling [J]. *Hypertension*, 2008, 52(6): 1060.

[11] 油红文, 陈曦, 油红捷, 等. 心钠素及内皮素对心肌细胞肥大及心脏成纤维细胞增殖的影响 [J]. *高血压杂志*, 2006, 14(5): 375.

[12] 李昕, 孟令丽, 贾勇圣, 等. 内皮缩血管肽 A 受体拮抗剂 ETP-508 对内皮缩血管肽 1 诱导的心肌细胞肥厚的作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2009, 23(1): 23.

[13] Paulus W J. The role of nitric oxide in the failing heart [J]. *Heart Fail Rev*, 2001, 6(2): 105.

[责任编辑 聂淑琴]