

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.01.002

化療方抗大鼠心肌纤维化疗效及其与氧化应激的关系^{*}

刘 馨¹, 陈 凯¹, 隋育坤², 张宇彬², 管怡晴¹, 张国华^{1△}

(南方医科大学:1. 中医药学院;2. 药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的 探讨化療方对自发性高血压大鼠(SHR)心肌纤维化的疗效及其与氧化应激的关系。

方法 结合中医理论和网络药理学,预测化療方为血府逐瘀汤抗心肌纤维化有效药物组合。SHR 分为模型组,化療方低、中、高剂量组,血府逐瘀汤组和卡托普利组,Wistar-Kyoto(WKY)大鼠作为正常对照组。超声心动图、无创尾压仪、组织病理学检测心肌纤维化程度,反转录 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 检测抗氧化酶的表达。**结果** 与模型组比较,化療方低、中、高剂量组射血分数和短轴缩短率增加($P<0.05$),血压、肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)的表达降低($P<0.05$),心肌纤维化减轻,且化療方高剂量疗效与血府逐瘀汤组相当。同时,与模型组比较,高剂量化療方能增加过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的表达($P<0.05$)。**结论** 化療方抗大鼠心肌纤维化的疗效可能与减轻氧化应激有关。

[关键词] 血府逐瘀汤;化療;自发性高血压;心肌纤维化;氧化应激

[中图法分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)01-0006-05

Effects of Hua-Yu decoction on anti-hypertensive myocardial fibrosis and its relationship with oxidative stress^{*}

LIU Xin¹, CHEN Kai¹, SUI Yukun², ZHANG Yubin², GUAN Yiqing¹, ZHANG Guohua^{1△}

(1. School of Traditional Chinese Medicine; 2. School of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[Abstract] **Objective** To observe the efficacy of Hua-Yu decoction for myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats (SHR) and its relationship with oxidative stress. **Methods** Based on the traditional Chinese medicine theory and network pharmacology, we predicted that Hua-Yu decoction was the main effective component of Xue-Fu-Zhu-Yu decoction on anti-hypertensive myocardial fibrosis. 12-week-old male spontaneous hypertension rats (SHR) were randomized into six groups: the model group, the Hua-Yu decoction group at low-, medium-, and high-dose, the Xue-Fu-Zhu-Yu decoction group and the captopril group, Wistar-Kyoto (WKY) rats as the model group. The cardiac fibrosis was observed using echocardiography, non-invasive tail pressure gauge and histological examination. The mRNA and protein expression of cellular defense enzymes were determined through quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot. **Results** Compared with the model group, ejection fraction and fraction shortening increased in the Hua-Yu decoction group at low-, medium- or high-dose ($P<0.05$), while blood pressure and the expression of creatine kinase-MB (CK-MB) decreased, myocardial fibrosis was inhibited. There was no significant difference between Hua-Yu decoction and Xue-Fu-Zhu-Yu decoction. Moreover, Hua-Yu decoction could increase the expression of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX, $P<0.05$). **Conclusion** Hua-Yu decoction had the effect of anti-hypertensive myocardial fibrosis, which may be related to alleviating oxidative stress.

[Key words] Xue-Fu-Zhu-Yu decoction; Hua-Yu decoction; spontaneous hypertension; myocardial fibrosis; oxidative stress

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是指心肌间质胶原纤维过度沉积,导致心力衰竭和心室肥厚^[1-2]。氧化应激是由于体内抗氧化酶和氧自由基失衡,其在 MF 的发生过程中起着重要作用^[3]。本课题组前期已证实血府逐瘀汤抗 MF 疗效显著^[4],但血府逐瘀汤成分复杂,具体作用机制尚不清楚。拆方研究

是中医复方研究的传统手段,其通过精简复方,观察疗效变化,从而寻找最有效的配伍组合^[5]。因此,本研究以精简组方但不降低疗效为目的,对血府逐瘀汤进行拆方研究,预测化療方可能是血府逐瘀汤抗 MF 的有效药物组合,对其进行实验验证,并研究其与氧化应激的关系,现报道如下。

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373811、81072937)。 作者简介:刘馨(1991—),在读硕士,主要从事中西医结合基础研究。

[△] 通信作者, E-mail: zghgz@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只 12 周龄的自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 和 5 只同龄雄性 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司, 编号: SCXK2016-0011)。

1.2 药品及仪器 血府逐瘀汤组方免煎颗粒、化瘀方组方免煎颗粒及卡托普利均购自南方医科大学附属南方医院。彩色多普勒超声诊断仪 (S40, 深圳开立科技有限公司); 无创尾压仪 (ALC-NIBP, 上海奥尔科特生物科技有限公司); 倒置光学显微镜 (BS-51, 日本奥林巴斯公司)。

1.3 方法

1.3.1 网络药理学分析 网络药理学是新起的中药复方的研究方法^[6], 它基于系统生物学理论, 对生物系统进行网络分析的新学科^[7]。BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org/BATMAN-TCM>) 是首个用于网络药理学分析的中医分子机制研究工具。根据中医病理机制, 血府逐瘀汤分为 4 个独立方, (1) 化瘀方: 桃仁、红花、川芎、赤芍、牛膝; (2) 行气方: 枳壳、桔梗、柴胡; (3) 养血方: 当归、生地; (4) 调和方: 甘草。BATMAN-TCM 中拼音输入 4 个独立方的草药名。设置参数: 预测候选靶点数不低于 20; 调整 $P < 0.05$ 。分别构建其“活性成分-靶点-疾病”网络图。发现与行气方、养血方和调和方比较, 化瘀方网络图的节点和连接最多, 数据分析显示化瘀方可用于治疗高血压、心力衰竭、心血管疾病等。结合中医理论和网络药理学, 预测化瘀方可能为血府逐瘀汤抗心肌纤维化的有效药物组合。

1.3.2 分组 SHR 分为 6 组: 模型组、化瘀方低剂量组 (2 g/kg)、化瘀方中剂量组 (4 g/kg)、化瘀方高剂量组 (8 g/kg)、血府逐瘀汤组 (16 g/kg) 和卡托普利组 (13.5 mg/kg), 每组 5 只。5 只 WKY 作为正常对照组。除正常对照组和模型组分别给予等量蒸馏水外, 各组大鼠均灌胃给药, 连续给药 12 周。

1.3.3 超声心动图检测 多普勒超声仪检查大鼠心脏功能。2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后胸部备皮, M 型模式下获得左心室长轴视图的稳定图像, 观察并计算射血分数和短轴缩短率, 其为评价心功能的敏感指标, 下降则提示心力衰竭^[8]。

1.3.4 无创尾压仪检测 尾套法对大鼠进行尾动脉测量。老鼠置于装有保温垫 (温度为 37~38 °C) 的大鼠固定器中, 将鼠尾置于加压套内, 大鼠安静稳定 2~3 min 后仪器显示出稳定的脉搏波, 按下开始键开始自动测量。

1.3.5 生化指标检测 末次给药后, 大鼠腹主动脉取血, 静置离心后取上清液。按生化试剂盒说明书检测血清中心肌标志物: 肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB) 和乳酸脱氢酶 (LDH), 其为心肌坏死的特异标记物^[9]。准确称取心肌组织, 加生理盐水

机械匀浆, 离心取上清液。先 BCA 比色法测量蛋白浓度, 然后按生化试剂盒说明书检测氧化指标: 过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 和超氧化物歧化酶 (SOD)。

1.3.6 苏木精-伊红 (HE) 染色和 Masson 染色 心肌组织 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋切片后, 进行 HE 染色和 Masson 染色, 于显微镜下随机视野拍照观察。

1.3.7 反转录 PCR (qRT-PCR) 提取心肌组织中总 RNA, 检测样品浓度及纯度。根据反转录反应体系反转录为 cDNA, 配制 qRT-PCR 反应液, 设定 qRT-PCR 反应条件, 定量分析反应模板, 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 CAT、GPx 和 SOD 的 mRNA 水平。

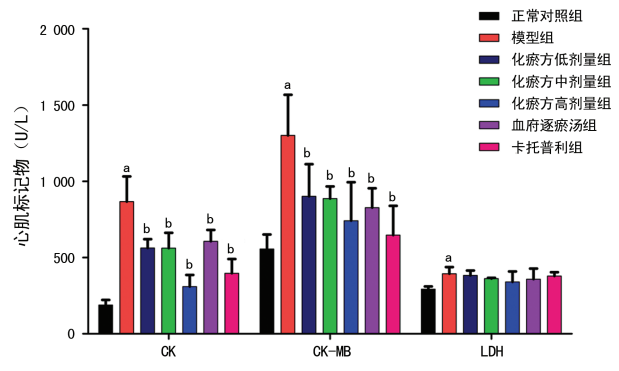
1.3.8 Western blot 法 提取心脏组织蛋白, BCA 比色法测量蛋白水平, 定量后样品煮沸 5 min, 上样后置于电泳缓冲液中电泳, 分离目的蛋白 (CAT、GPx 和 SOD), 100 V 电压转膜 90 min, 5% 牛奶室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 显色, 曝光扫描。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心血管指标和血流动力学参数检测 与正常对照组比较, 模型组的射血分数和短轴缩短率显著降低 ($P < 0.05$), 收缩压、舒张压和平均动脉压显著升高 ($P < 0.05$), 化瘀方治疗后能显著增加射血分数和短轴缩短率 ($P < 0.05$), 降低收缩压、舒张压和平均动脉压 ($P < 0.05$), 高剂量化瘀方的降压效果与血府逐瘀汤相当, 见表 1。

2.3 心肌标记物检测 与正常对照组比较, 模型组的 CK 和 CK-MB 均显著升高 ($P < 0.05$)。化瘀方治疗后 CK 和 CK-MB 较模型组显著降低 ($P < 0.05$), 化瘀方高剂量组治疗效果优于血府逐瘀汤组 ($P < 0.05$), LDH 各组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。



^a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与模型组比较
图 1 各组血清 CK、CK-MB 和 LDH 的比较

2.3 HE 染色和 Masson 染色 HE 染色结果显示: 模型组的心肌细胞排列紊乱, 出现大量炎性细胞, 并

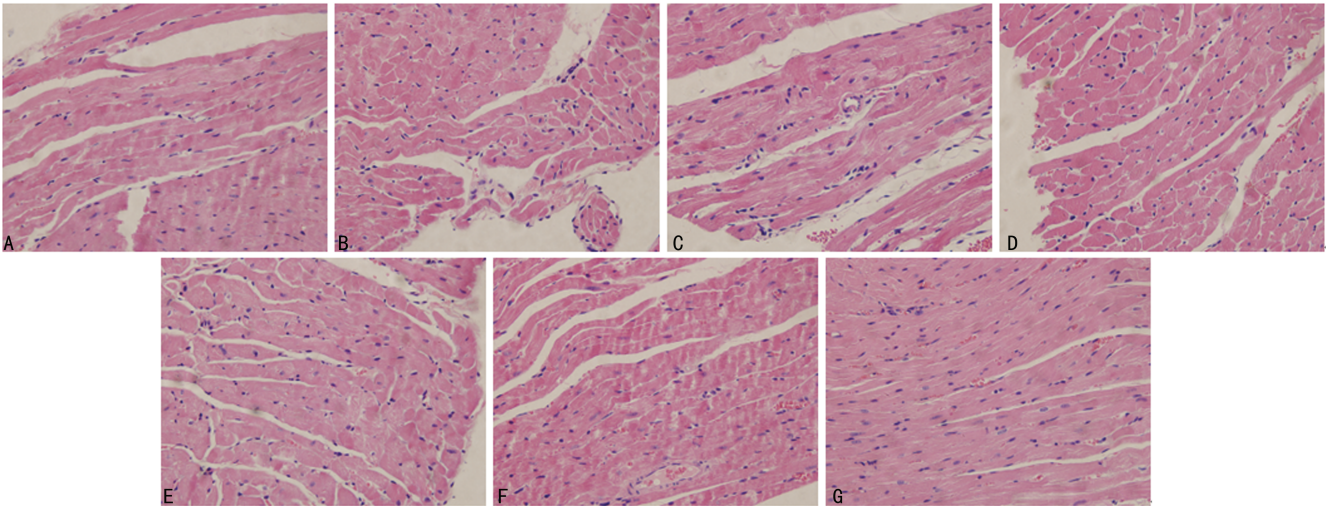
发生浸润。化癆方低、中、高剂量组炎性细胞减少,炎性细胞浸润程度减轻,化癆方能有效减轻心肌病理改变。Masson 染色结果显示:与正常对照组比较,模型组的心肌胶原纤维显著增多,排列紊乱。化癆方低、中、高剂量组的心肌纤维排列有序,心肌中胶原纤维减少,见图 2、3。

2.4 抗氧化酶检测 模型组血清及心肌组织中 CAT 和 GPx 显著低于正常对照组 ($P<0.05$),化癆

方高剂量治疗后能显著增加 CAT 和 GPx 的表达 ($P<0.05$)。各组血清及心肌组织中 SOD 比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与正常对照组比较,CAT 和 GPx mRNA 表达降低 ($P<0.05$),化癆方治疗后增加了 CAT 和 GPx mRNA 表达 ($P<0.05$)。各组 SOD mRNA 表达比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 2、图 4。

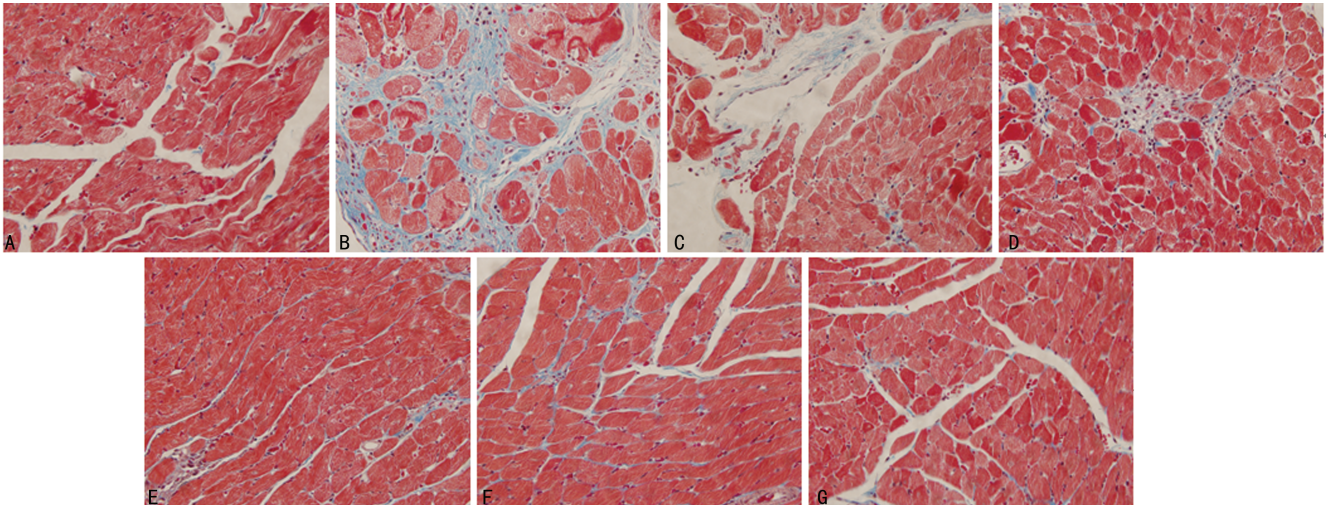
表 1 各组射血分数、短轴缩短率、收缩压、舒张压、平均动脉压和心率的比较($\bar{x}\pm s$)						
组别	射血分数(%)	短轴缩短率(%)	收缩压(mm Hg)	舒张压(mm Hg)	平均动脉压(mm Hg)	心率(次/分)
正常对照组	88.40±0.89	59.40±2.07	124.93±3.73	96.83±3.99	106.70±4.88	326.56±16.50
模型组	71.40±1.52 ^a	37.00±1.87 ^a	172.60±0.71 ^a	130.75±7.49 ^a	144.46±5.27 ^a	390.17±11.49
化癆方低剂量组	76.40±1.14 ^b	42.40±1.67 ^b	160.24±1.41 ^b	121.26±4.75 ^b	135.05±3.77	422.90±24.53
化癆方中剂量组	80.25±0.96 ^b	47.50±1.29 ^b	153.35±0.64 ^b	119.30±2.45 ^b	130.96±1.93 ^b	419.18±18.07
化癆方高剂量组	87.00±1.58 ^b	56.60±2.70 ^b	151.14±0.83 ^b	113.97±5.44 ^b	126.74±4.81 ^b	355.16±19.61
血府逐瘀汤组	86.40±1.52 ^b	56.00±2.35 ^b	157.86±6.18 ^b	117.89±7.16 ^b	130.32±6.83 ^b	383.41±24.47
卡托普利组	87.80±0.84 ^b	58.00±2.12 ^b	132.32±1.26 ^b	101.40±7.23 ^b	112.84±7.21 ^b	329.10±18.34

^a: $P<0.05$,与正常对照组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较



A:正常对照组;B:模型组;C:化癆方低剂量组;D:化癆方中剂量组;E:化癆方高剂量组;F:血府逐瘀汤组;G:卡托普利组

图 2 大鼠心脏组织的 HE 染色(×400)



A:正常对照组;B:模型组;C:化癆方低剂量组;D:化癆方中剂量组;E:化癆方高剂量组;F:血府逐瘀汤组;G:卡托普利组

图 3 大鼠心脏组织的 Masson 染色(×400)

表 2 各组血清及心肌组织中 CAT、GPx 和 SOD 水平比较(̄x±s)

组别	血清			心肌组织		
	CAT (U/mL)	GPx(μmol/L)	SOD(U/ml)	CAT (U/mgprot)	GPx(μmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)
正常对照组	0.57±0.10	26.47±1.49	167.31±2.04	9.32±0.15	27.42±2.16	165.19±21.71
模型组	0.31±0.05 ^a	16.46±4.44 ^a	165.86±3.90	5.57±0.04 ^a	11.81±2.86 ^a	147.67±31.63
化療方低剂量组	0.43±0.07	19.12±1.11	168.08±1.81	5.73±0.37	10.11±2.15	144.66±7.49
化療方中剂量组	0.46±0.09	21.59±0.82	165.50±2.38	6.54±0.49	13.07±2.02	144.79±13.32
化療方高剂量组	0.58±0.09 ^b	22.95±1.11 ^b	166.32±1.20	6.91±0.17 ^b	19.27±3.97 ^b	151.23±25.45
血府逐瘀汤组	0.60±0.06 ^b	27.47±3.79 ^b	170.29±1.17	7.50±0.76 ^b	17.59±1.65	158.84±13.89

^a:*P*<0.05,与正常对照组比较;^b:*P*<0.05,与模型组比较

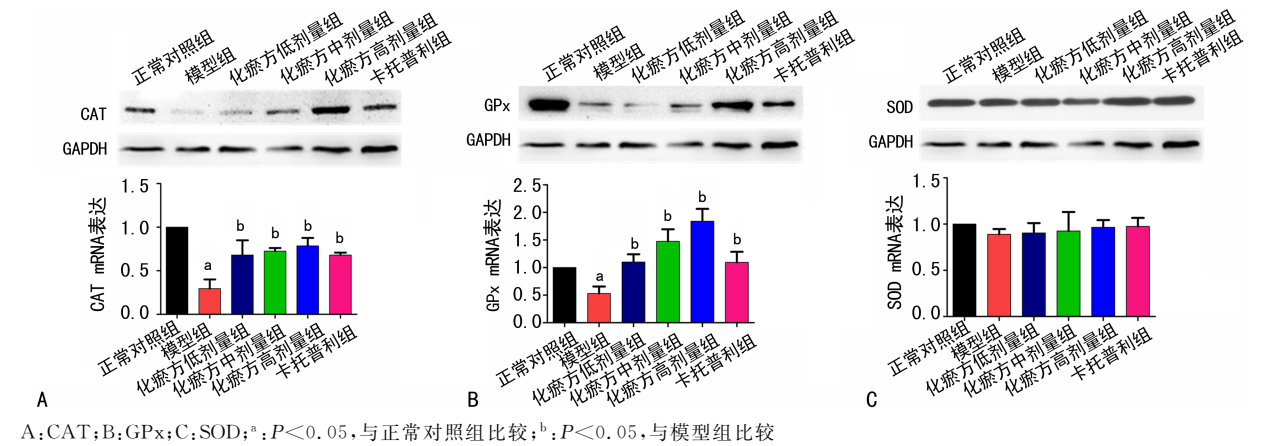


图 4 各组心肌组织中 CAT、GPx 和 SOD mRNA 表达水平比较

3 讨 论

心肌纤维化发病过程中,高血压是致心室重构的一个重要原因^[10]。氧化应激与高血压的发生、发展存在因果关系。氧化应激既引起血管壁增厚和血管腔狭窄,又损伤内皮细胞,导致内皮功能障碍,血管舒张性降低,增加血管收缩,引起外周血管阻力增加和血压升高^[11]。CAT、GPx 和 SOD 是抗氧化应激的一线防御酶^[12],高血压引起的心肌纤维化与抗氧化酶减少密切相关^[13-14]。因此,评价心肌氧化应激程度有助于研究药物的药效及探究其病理机制。

结合中医理论和临床实际,血瘀脉阻是导致心肌纤维化发生的主要原因^[15]。因此对于心肌纤维化的治疗,关键在于改善体内瘀血。大量研究表明,具有化療功效的复方可以治疗心肌纤维化,如扶正化療胶囊^[16]、益气化療汤^[17]等。本研究团队亦验证了具有活血化療作用的血府逐瘀汤具有抗心肌纤维化的作用^[4]。基于以上发现,本研究推测,在抗心肌纤维化方面,化療方是血府逐瘀汤发挥作用的有效药物组合。BATMAN-TCM 分析结果也与笔者的猜想相符。血府逐瘀汤成分复杂,不利于深入研究其具体药理作用及潜在的作用机制。因此,笔者对 11 味药物组合的血府逐瘀汤进行拆方研究,预测 5 味药物组合的化療方是血府逐瘀汤抗心肌纤维化的有效药物组合。

选材方面,SHR 是 1963 年培育成功的高血压模

型大鼠,4 周龄后,其血压逐渐增高,10 周龄后开始出现心功能下降,导致心肌纤维化^[18]。目前已广泛用于研究高血压疾病,WKY 常作为 SHR 的正常对照组^[19-20]。因此,本研究选取 12 周龄的 SHR,模拟人体高血压情况。本研究中,模型组的血压、CK 和 CK-MB 增加,射血分数和短轴缩短率降低,胶原纤维显著增多。化療方治疗后能逆转这些指标,减少纤维增生。随着化療方浓度的增高,其抗心脏损害效果越好,化療方高剂量组疗效不劣于血府逐瘀汤。化療方能显著逆转心肌纤维化,这种作用可能与降压和改善心功能有关。另外,本研究通过观察抗氧化酶的活性,评价大鼠体内氧化应激的变化。发现化療方治疗增加了 CAT 和 GPx 活性,并增加了 CAT 和 GPx 的 mRNA 和蛋白的表达。这说明化療方可能通过减轻氧化应激反应,从而调节心脏收缩功能和血压,对心肌纤维化起治疗作用。

综上,在抗心肌纤维化方面,化療方是血府逐瘀汤发挥作用的有效药物组合,其作用可能与减轻氧化应激有关。化療方由 5 味中药组成,组方更加精简,并且其药效不劣于全方,有利于以抽丝剥茧的方式深入开展药理研究及机制研究。然而,化療方的具体作用靶点及潜在机制目前尚不清楚,仍需进一步深入探索。

参考文献

[1] MARON M S,CHAN R H,KAPUR N,et al. Effect of

- spironolactone on myocardial fibrosis and other clinical variables in patients with hypertrophic cardiomyopathy; a prospective, randomized trial[J]. *Am J Med*, 2018, 131(7):837-841.
- [2] DONG Y, YANG D, HAN Y, et al. Age and gender impact the measurement of myocardial interstitial fibrosis in a healthy adult chinese population; a cardiac magnetic resonance study[J]. *Front Physiol*, 2018, 9:140.
- [3] RODRIGO R, LIBUY M, FELIU F, et al. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage [J]. *Dis Markers*, 2013, 35(6):773-790.
- [4] ZHANG G, YANG G, DENG Y, et al. Ameliorative effects of Xue-Fu-Zhu-Yu decoction, Tian-Ma-Gou-Teng-Yin and Wen-Dan decoction on myocardial fibrosis in a hypertensive rat mode[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16:56.
- [5] 李雨庭, 李诗畅, 牛雯颖, 等. 方剂药理研究的方法与思路[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21):229-234.
- [6] PANG X C, KANG, FANG J S, et al. Network pharmacology-based analysis of Chinese herbal Naodesheng formula for application to Alzheimer's disease[J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(1):53-62.
- [7] MUHAMMAD J, KHAN A, ALI A, et al. Network pharmacology: exploring the resources and methodologies[J]. *Curr Top Med Chem*, 2018, 18(12):949-964.
- [8] TAO L, SHEN S, FU S, et al. Traditional chinese medication qiliqiangxin attenuates cardiac remodeling after acute myocardial infarction in mice[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8374.
- [9] ROSALKI S B, ROBERTS R, KATUS H A, et al. Cardiac biomarkers for detection of myocardial infarction: perspectives from past to present[J]. *Clin Chem*, 2004, 50(11):2205-2213.
- [10] HOEY E T, PAKALA V, TEOH J K, et al. The role of imaging in hypertensive heart disease[J]. *Int J Angiol*, 2014, 23(2):85-92.
- [11] PUDDU P, PUDDU G M, CRAVERO E, et al. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension [J]. *Blood Press*, 2008, 17(2):70-77.
- [12] SENTHIL S, VEERAPPAN R M, RAMAKRISHNA R M, et al. Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction[J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 348(1):131-137.
- [13] WU J, HECKER J G, CHIAMVIMONVAT N. Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic diseases[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(4):351-363.
- [14] CARILLON J, RUGALE C, ROUANET J M, et al. Endogenous antioxidant defense induction by melon superoxide dismutase reduces cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2014, 65(5):602-609.
- [15] 吕仕超, 杨锡燕, 张军平. 中医药治疗高血压心肌纤维化的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2015, 17(6):1295-1299.
- [16] 祁轶斐, 任学娇, 娄利霞, 等. 扶正化瘀胶囊对心肌梗死后心肌纤维化大鼠细胞外基质代谢的影响[J]. *中医杂志*, 2018, 59(7):607-611.
- [17] 崔爽, 吴军, 鲁阳侠. 益气化瘀汤对慢性心力衰竭心肌纤维化机制的影响研究[J]. *重庆医学*, 2017, 46(18):2548-2551.
- [18] 马新欣, 张跃力, 王曼, 等. 自发性高血压大鼠左心室心肌应变与心肌纤维化程度的相关性[J]. *中国医学影像技术*, 2017, 33(2):161-166.
- [19] POTJE S R, TROIANO J A, GRANDO M D, et al. Endothelial modulation of a nitric oxide donor complex-induced relaxation in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. *Life Sci*, 2018, 201:130-140.
- [20] BAKER J, KIMPINSKI K. Role of melatonin in blood pressure regulation; an adjunct anti-hypertensive agent [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45(8):755-766.

(收稿日期:2018-05-22 修回日期:2018-08-05)