

# 氧化苦参碱对慢性心力衰竭大鼠心肌胞浆型磷脂酶 A2、环氧合酶 1、环氧合酶 2、前列腺素 I<sub>2</sub> 合酶表达的影响

徐烨华<sup>1</sup>, 马萍<sup>2</sup>, 王洋<sup>3</sup>, 熊爱琴<sup>1</sup>, 戴贵东<sup>4</sup>, 徐清斌<sup>2</sup>

(1. 宁夏医科大学, 宁夏银川市 750004; 2. 宁夏医科大学总医院心内科, 宁夏银川市 750004;

3. 银川市口腔医院药剂科, 宁夏银川市 750004; 4. 凯里学院化学与材料工程学院制药工程系, 贵州省凯利市 556011)

[关键词] 氧化苦参碱; 异丙肾上腺素; 心力衰竭; 胞浆型磷脂酶 A2; 环氧合酶 1; 环氧合酶 2; 前列腺素 I<sub>2</sub> 合酶; 大鼠

[摘要] **目的** 探讨氧化苦参碱对异丙肾上腺素(ISO)诱导心力衰竭大鼠模型中心肌组织胞浆型磷脂酶 A2(cPLA<sub>2</sub>)、环氧合酶 1(COX-1)、环氧合酶 2(COX-2)及前列腺素 I<sub>2</sub> 合酶(PGIS)的影响。**方法** 采用 Sprague-Dawley 大鼠皮下注射 ISO(5 mg/kg)7 天建立慢性心力衰竭大鼠模型。实验分为 5 组: 正常对照组、ISO 组、氧化苦参碱 100 mg/kg 组、ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组、ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。各组大鼠预先灌胃给药(不同剂量氧化苦参碱或等体积生理盐水)7 天后, ISO 组、ISO + 氧化苦参碱(100 mg/kg、50 mg/kg)组大鼠灌胃给药同时皮下注射 ISO(5 mg/kg), 正常对照组、氧化苦参碱 100 mg/kg 组皮下注射等体积生理盐水 7 天, 共 14 天。随后检测各组大鼠心功能血流动力学参数、血清脑钠肽含量, 观察心肌病理学表现, 用 Western blot 法对大鼠心肌 cPLA<sub>2</sub>、COX-1、COX-2、PGIS 进行半定量分析。**结果** 氧化苦参碱(100 mg/kg、50 mg/kg)能改善心力衰竭心脏收缩和舒张功能, 显著降低 ISO 诱导的心力衰竭大鼠升高的血清脑钠肽水平; 氧化苦参碱可显著减轻心力衰竭大鼠的心肌纤维化, 并且显著升高 ISO 诱导的心力衰竭大鼠心肌组织中 COX-2、PGIS 的表达( $P < 0.01$ ), 降低 COX-1 的表达( $P < 0.01$ ); 氧化苦参碱对 ISO 诱导的慢性心力衰竭大鼠心肌组织中 cPLA<sub>2</sub> 的表达无明显影响。**结论** 氧化苦参碱可改善 ISO 诱导的心力衰竭大鼠的心脏功能及心肌纤维化, 其机制可能与调节环氧合酶通路中 COX-1、COX-2 及 PGIS 的表达相关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

## Effect of Oxymatrine on Myocardial Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>, Cyclooxygenase-1, Cyclooxygenase-2 and Prostacyclin Synthase Expression in Rat with Chronic Heart Failure

XU Ye-Hua<sup>1</sup>, MA Ping<sup>2</sup>, WANG Yang<sup>3</sup>, XIONG Ai-Qin<sup>1</sup>, DAI Gui-Dong<sup>4</sup>, and XU Qing-Bin<sup>2</sup>

(1. Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Cardiology, General Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 3. Department of Pharmacy, Yinchuan Stomatology Hospital, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 4. School of Chemical and Material Engineering, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011, China)

[KEY WORDS] Oxymatrine; Isoproterenol; Heart Failure; Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>; Cyclooxygenase-1; Cyclooxygenase-2; Prostacyclin Synthase; Rat

[ABSTRACT] **Aim** The present study was to investigate the protective effects of oxymatrine (OMT) on regulation of the expression of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>), cyclooxygenase-1 (COX-1), COX-2 and prostacyclin synthase (PGIS) in isoproterenol-induced rat heart failure. **Methods** Heart failure was induced in Sprague-Dawley rats by 5 mg/kg isoproterenol (ISO) subcutaneous injection for 7 days. The rats, maintained on a normal diet, were randomly di-

[收稿日期] 2013-11-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81060024)

[作者简介] 徐烨华, 在读硕士研究生, 医师, 从事心脏病的基础及临床研究, E-mail 为 xyhlily24@163.com。马萍, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 从事心脏病的基础及临床研究, E-mail 为 xu-qb@163.com。通讯作者徐清斌, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 从事心脏病的基础及临床研究, E-mail 为 xu-qb@163.com。

vided into five groups given control, oxymatrine (100 mg/kg) alone, ISO and ISO with oxymatrine (100 mg/kg or 50 mg/kg). In groups of ISO and ISO with oxymatrine (100 mg/kg or 50mg/kg), saline or oxymatrine was administered orally for 7 days prior to the ISO administration. ISO (5 mg/kg) was administered subcutaneously for 7 days with saline or oxymatrine. In groups of control and oxymatrine (100 mg/kg) alone, saline was administered subcutaneously for 7 days. Serum brain natriuretic peptide (BNP) level, haemodynamic parameters, histopathological variables and expression of protein levels were analysed. **Results** Oral administration of OMT significantly inhibited ISO-induced heart failure, as evaluated by serum BNP and haemodynamic parameters, and histological examinations. Coadministration of oxymatrine increased myocardial level of COX-2 and PGIS, and inhibited COX-1 expression in ISO-induced heart failure rat. Whereas the protein level for cPLA2 was markedly increased by ISO, OMT exerted no effects on ISO-induced elevated protein cPLA2 expression. Compared with control group, any indexes in sham rats treated with OMT (100 mg/kg) alone were unaltered (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Our results suggest that the favourable effects of oxymatrine for management of heart failure are probably achieved by regulation of the COX-1, COX-2 and PGIS expression.

心力衰竭是一种复杂的临床症候群,为各种心脏病的终末阶段,预后极差,临床研究显示<sup>[1]</sup>自出院之日起有 71.26% 的患者 30 天内因心力衰竭加重而再次入院。心力衰竭的发病及发展的机制复杂。研究认为,炎症在慢性心力衰竭的发生发展中起着重要的作用。早期研究显示慢性心力衰竭患者血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平升高,并且随心力衰竭的严重程度增加而增加<sup>[2]</sup>,其它炎症因子如白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 和 IL-6 可降低心肌收缩力<sup>[3-5]</sup>,提示炎症可能参与心力衰竭发生及进展。近期大量研究发现应用非甾体类抗炎药物选择性环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 抑制剂损害了心脏功能,而非选择性环氧合酶抑制剂对心脏有保护性作用<sup>[6, 7]</sup>,其中研究认为环氧合酶 2 抑制剂减少了具有心脏保护作用的前列腺素 I<sub>2</sub> (prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) 的合成,增加了血栓形成、高血压及动脉硬化的风险,但并没有减少具有促血栓形成作用的血栓素 A<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>) 的产生<sup>[8]</sup>,提示环氧合酶通路在心力衰竭发生及发展中发挥了重要作用。细胞膜中的磷脂在磷脂酶 A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>) 催化下释放花生四烯酸,后者在 COX-1、COX-2 催化下产生前列腺素 H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), PGH<sub>2</sub> 分别在相应的前列腺素合酶作用下合成 PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub>, 而 PGI<sub>2</sub> 合酶 (prostacyclin synthase, PGIS) 是合成 PGI<sub>2</sub> 的关键酶。

氧化苦参碱 (oxymatrine, OMT) 是一种喹诺里西啶类 (quinolizidine) 生物碱,从豆科植物苦参 (*Sophora flavescens* Ait.)、苦豆子 (*Sophora alopecuroides* L.) 和山豆根 (*Sophora subprostrata* chunet T.) 等中草药植物中提取。以往研究发现其具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、抗纤维化等广泛药理作用<sup>[9-12]</sup>。近年来,OMT 在心血管系统方面的作用引起了人们极大

的重视和兴趣。研究表明,氧化苦参碱可能通过 TGF- $\beta$ -Smads 信号通路抑制急性心肌梗死大鼠心肌纤维化<sup>[13]</sup>。已有动物实验研究表明,氧化苦参碱可通过 ATP 酶及 L 型 Ca<sup>2+</sup> 通道改善慢性心力衰竭大鼠心脏功能<sup>[14, 15]</sup>。但是氧化苦参碱对慢性心力衰竭大鼠心肌组织环氧合酶通路的影响尚未见文献报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、药品和试剂

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠:体重 210 ~ 250 g,由宁夏医科大学实验动物中心提供,动物合格证号为 SCXK(宁)2012-0012;氧化苦参碱:纯度大于 99.8%,宁夏紫荆花药业股份有限公司出品;异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO):TCI 化工有限公司(上海)产品;大鼠脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒: CUSABIO 公司产品;COX-1、COX-2 及 PGIS 一抗:美国 Abcam 有限公司产品;胞浆型磷脂酶 A<sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>) 一抗:美国 Cell Signaling Technology 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验仪器

BL-420E 四道生物机能实验系统:成都盟泰科技有限公司产品;TY96-II N 型超生细胞粉碎机:宁波新芝生物科技股份有限公司产品;H1850R 型台式高速冷冻离心机:长沙湘仪离心机仪器有限公司产品;Mutiskan Go 酶标仪:美国 Thermo Fisher 公司产品;PowerPac Basic 电泳仪:美国 BIO-RAD 公司产品;培清 JS-860B 凝胶成像分析仪:上海培清科技有限公司产品。

### 1.3 动物模型制备、实验分组及给药方法

Sprague-Dawley 大鼠随机分为 5 组,每组 12 只:正常对照组、ISO 组、氧化苦参碱 100 mg/kg 组、ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组和 ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。氧化苦参碱用生理盐水溶解。各组大鼠预先灌胃给药,根据体重,给予不同剂量氧化苦参碱或等体积生理盐水 7 天后,ISO 组、ISO + 氧化苦参碱(100 mg/kg、50 mg/kg)组大鼠灌胃给药同时皮下注射异丙肾上腺素(5 mg/kg)7 天,而正常对照组和氧化苦参碱 100 mg/kg 组皮下注射等体积生理盐水 7 天,共 14 天。

### 1.4 心脏血流动力学参数测定

各组动物于末次给药后禁食不禁水 24 h,称体重,20%乌拉坦按 6 mL/kg 麻醉。于颈部偏右侧行纵向切口,分离出右颈总动脉,插入含有肝素生理盐水(肝素含量 500 kU/L)的心导管(PE50)至右颈总动脉,经压力换能器连接 BL-420E 四道生物机能实验系统记录仪,稳定 15 min,然后沿颈动脉向心方向将导管轻轻插入 3~4.5 cm,当动脉压力波形突然有大幅度的变化、舒张压明显下降时,说明导管已进入左心室,稳定 10 min 后记录心率、左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室压力最大上升速率(+LVdp/dt<sub>max</sub>)及左心室压力最大下降速率(-LVdp/dt<sub>min</sub>)等心脏血流动力学参数。

### 1.5 标本取材

大鼠经右颈总动脉放血处死,取血液室温放置 1 h,低温离心(4℃、6000 g 离心力、15 min),分离血清,分装,-80℃保存,待测。迅速开胸,取出心脏,剪去心脏周围的组织和血管,生理盐水清洗残血,沿冠状沟将左心房剪下,沿室间沟将右心室游离去除,取左心室心尖部标本浸泡于 10% 中性甲醛缓冲液中固定,行病理学检查;剩余的心肌标本于 -80℃保存,用于 Western blot 测定。

### 1.6 血清脑钠肽测定

取血清,在无菌条件下测定血清 BNP 含量,操作步骤参照 ELISA 试剂盒说明书进行。结果判定:在波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的吸光度(absorbance, A)值;以 A 值为纵坐标,以标准品的浓度为横坐标,绘制曲线图;根据样品的 A 值查找对应的浓度范围。

### 1.7 左心室心尖心肌纤维化测定

心尖组织在 10% 中性甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋,切片 4 μm,行苦味酸-酸性品红 VG 染色,用显微镜观察心肌组织纤维化程度,光镜检查心肌细胞呈黄色,胶原呈红色。在 100 倍视野下观察,将心肌

纤维化程度分为 5 级:正常(-):0% 病变;轻度(+):病变占全部视野面积 <25%;中度(++):病变占全部视野面积为 25%~50%;重度(+++):病变占全部视野面积为 50%~75%;极重度(+++):病变占全部视野面积 >75%。

### 1.8 Western blot 测定心肌组织 cPLA2、COX-1、COX-2、PGIS 蛋白表达

选取心肌组织(约 50 mg)置于液氮中研碎后,放于无菌 EP 管中,加入 0.3 mL 预冷裂解缓冲液,其中含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)。然后用超声波破碎仪进行粉碎,冰上放置 30 min,4℃、20000 g 离心力离心 15 min,提取上清液,BCA 法进行蛋白浓度测定,加入裂解缓冲液使上样蛋白量相同,按比例计算后再加上样缓冲溴酚蓝染液,煮沸 10 min,-20℃保存。取蛋白样本 50 μg 上样,10% SDS-PAGE 凝胶电泳(80/120 V 电压),200 mA 恒定电流转膜至硝酸纤维素膜,用含 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入抗 cPLA2 抗体(1:1000)、抗 COX-1 抗体(1:500)、抗 COX-2 抗体(1:500)、抗 PGIS 抗体(1:800)及抗 β-actin 抗体(内参;1:1000),在 4℃冰箱中孵育过夜,洗膜后分别加入山羊抗兔二抗(偶联有 HRP,1:3000)和山羊抗小鼠二抗(偶联有 HRP,1:5000),常温孵育 2 h,显色采用化学发光法,暗室 X 线胶片显影及定影。采用 Quantity One 软件分析,计算目的蛋白与相对应内参 β-actin 的比值,所得比值代表该目的蛋白的相对含量。

### 1.9 统计学方法

所有资料均采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数的比较采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氧化苦参碱对 ISO 诱导的慢性心力衰竭大鼠血流动力学参数的影响

氧化苦参碱 100 mg/kg 组与正常对照组比较,心率、LVSP、+LVdp/dt<sub>max</sub>、-LVdp/dt<sub>min</sub> 均无显著性差异。ISO 组与正常对照组比较,心率、LVSP、+LVdp/dt<sub>max</sub> 均显著下降( $P < 0.01$ ),-LVdp/dt<sub>min</sub> 显著升高( $P < 0.01$ ),提示 ISO 可以降低心脏收缩及舒张功能。ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组大鼠心率、LVSP、+LVdp/dt<sub>max</sub> 均升高( $P < 0.05$ ),-LVdp/dt<sub>min</sub>

dt<sub>min</sub>降低( $P < 0.05$ );ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组大鼠心率、LVSP 均升高( $P < 0.05$ ), - LVdp/dt<sub>min</sub>降低( $P < 0.05$ );提示氧化苦参碱可以提高 ISO 诱导

的心率,提高心肌收缩力,调节心肌舒张功能,改善慢性心力衰竭心脏功能(表 1)。

表 1. 氧化苦参碱对 ISO 诱导慢性心力衰竭大鼠血流动力学参数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1. Effect of oxymatrine on left ventricular function in isoproterenol-induced heart failure rats( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

分 组	心率(次/分)	LVSP(mmHg)	+ LVdp/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	- LVdp/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)
正常对照组	401 ± 25	140.15 ± 6.99	6498.38 ± 606.01	-4519.58 ± 755.79
氧化苦参碱 100 mg/kg 组	396 ± 32	140.76 ± 5.97	6353.37 ± 484.02	-4474.14 ± 323.22
ISO 组	332 ± 23 <sup>b</sup>	119.08 ± 6.50 <sup>b</sup>	5550.61 ± 483.93 <sup>b</sup>	-3718.84 ± 463.95 <sup>a</sup>
ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组	357 ± 29 <sup>c</sup>	129.11 ± 8.00 <sup>c</sup>	6154.87 ± 494.84 <sup>c</sup>	-4373.98 ± 733.74 <sup>c</sup>
ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组	354 ± 15 <sup>c</sup>	127.80 ± 3.53 <sup>c</sup>	5927.55 ± 499.86	-4430.30 ± 735.41 <sup>c</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组相比; c 为  $P < 0.05$ , 与 ISO 组相比。

2.2 氧化苦参碱对 ISO 诱导的慢性心力衰竭大鼠血清 BNP 的影响

ISO 组与正常对照组比较,大鼠血清 BNP 明显升高(156.90 ± 29.67 ng/L 比 120.42 ± 6.04 ng/L,  $P < 0.01$ )。氧化苦参碱干预后,大鼠血清 BNP 明显降低(ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组:118.82 ± 19.53 ng/L;ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组:121.19 ± 4.97 ng/L),与 ISO 组比较,有显著性差异( $P < 0.01$ )。氧化苦参碱 100 mg/kg 组与正常对照组比较,血清 BNP 无显著性差异。说明氧化苦参碱可改善异丙肾上腺素诱导升高的心力衰竭血清学指标,对心力衰竭大鼠的心功能有保护作用(图 1)。

2.3 氧化苦参碱对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响

异丙肾上腺素导致大鼠心肌基质胶原纤维显著增生,ISO 组心肌纤维化程度较正常对照组显著增加,ISO + 氧化苦参碱(100 mg/kg、50 mg/kg)组心肌纤维化程度较 ISO 组显著减轻(图 2)。与正常对照组比较,ISO 组心肌纤维化程度严重的大鼠数量

明显增多,而 ISO + 氧化苦参碱(100 mg/kg、50 mg/kg)组心肌纤维化程度严重的大鼠数量较 ISO 组减少(表 2)。氧化苦参碱 100 mg/kg 组与正常对照组比较,心肌纤维化程度无明显异常。说明氧化苦参碱对异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化有改善作用。

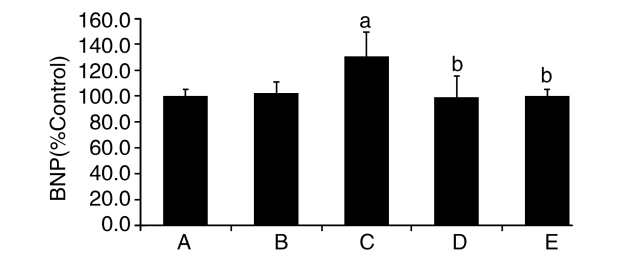


图 1. 氧化苦参碱对 ISO 诱导的慢性心力衰竭大鼠血清 BNP 的影响( $n = 8$ ) A 为正常对照组, B 为氧化苦参碱 100 mg/kg 组, C 为 ISO 组, D 为 ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组, E 为 ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组相比; b 为  $P < 0.01$ , 与 ISO 组相比。

Figure 1. Effect of oxymatrine on serum BNP of isoproterenol-induced chronic heart failure rats ( $n = 8$ )

表 2. 氧化苦参碱对异丙肾上腺素致慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化程度的影响(只)

Table 2. Effect of oxymatrine on the degree of cardiac fibrosis in ISO-induced heart failure rats (rats)

分 组	n	心肌纤维化分级				
		-	+	++	+++	++++
正常对照组	11	11	0	0	0	0
氧化苦参碱 100 mg/kg 组	11	11	0	0	0	0
ISO 组	11	0	0	4	2	5
ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组	11	0	5	5	1	0
ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组	11	0	2	5	4	0



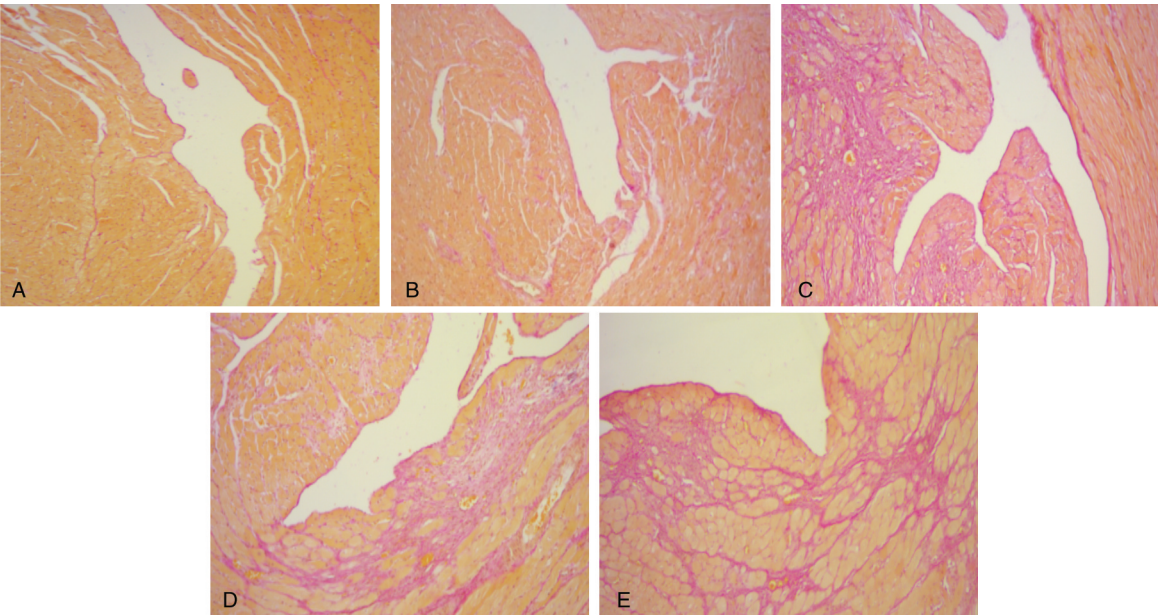


图 2. 氧化苦参碱对异丙肾上腺素致慢性心力衰竭大鼠心肌病理学变化的影响( ×100) Van Gieson 染色。A 为正常对照组,B 为氧化苦参碱 100 mg/kg 组,C 为 ISO 组,D 为 ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组,E 为 ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。

Figure 2. Effect of oxymatrine on cardiac histopathological changes of ISO-induced heart failure rats( ×100)

2.4 氧化苦参碱对慢性心力衰竭大鼠心肌组织 cPLA2、COX-1、COX-2、PGIS 蛋白表达的影响

ISO 组心肌组织中 cPLA2 蛋白的表达与正常对照组相比显著升高,ISO + 氧化苦参碱( 100 mg/kg、50 mg/kg) 组心肌组织中因 ISO 诱导升高的 cPLA2 表达并没有因氧化苦参碱干预而改变( 图 3)。ISO 组、氧化苦参碱 100 mg/kg 组、ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组、ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组与正常对照组相比,ISO 组心肌组织中 COX-1 蛋白的表达显著升高( $P < 0.01$ ;图 4),而 ISO + 氧化苦参碱( 100 mg/kg、50 mg/kg) 组 COX-1 蛋白的表达水平均显著低于 ISO 组( $P < 0.01$ )。与正常对照组相比,ISO 组大鼠心肌组织中 COX-2 表达轻度减低但无显著性差异;ISO 组 PGIS 的表达与正常对照组相比无显著性差异;而 ISO + 氧化苦参碱( 100 mg/kg、50 mg/kg) 组 COX-2、PGIS 蛋白的表达水平均显著高于 ISO 组( $P < 0.01$ , $P < 0.05$ ;图 5、图 6)。氧化苦参碱 100 mg/kg 组与正常对照组比较,心肌组织 cPLA2、COX-1、COX-2、PGIS 蛋白表达无显著性差异。综合上述提示,氧化苦参碱的干预影响了 ISO 诱导的慢性心力衰竭大鼠心肌环氧化酶通路中 COX-1、COX-2 及 PGIS 的表达。

3 讨论

本研究结果显示,给予小剂量异丙肾上腺素(5

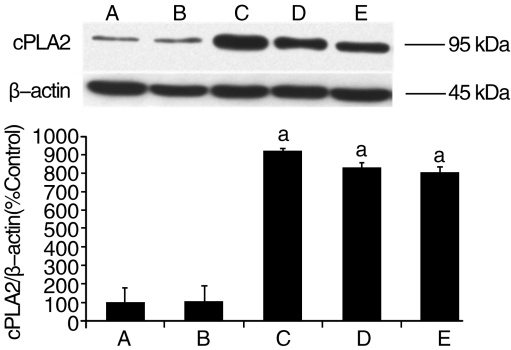


图 3. 氧化苦参碱对 ISO 诱导慢性心力衰竭大鼠心肌组织 cPLA2 蛋白表达的影响 A 为正常对照组,B 为氧化苦参碱 100 mg/kg 组,C 为 ISO 组,D 为 ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组,E 为 ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。a 为  $P < 0.01$ ,与正常对照组相比。

Figure 3. Effect of oxymatrine on expression of cPLA2 in hearts from isoproterenol-induced heart failure rats

mg/kg)皮下注射 7 天,大鼠心脏收缩及舒张功能发生显著异常,导致心力衰竭,血液 BNP 显著升高,病理学检查提示心肌呈现严重纤维化;而预先给予氧化苦参碱灌胃,可改善异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭大鼠心脏收缩及舒张功能,显著降低大鼠血清 BNP 水平,减轻大鼠心肌纤维化。皮下注射小剂量异丙肾上腺素显著升高了大鼠心肌组织中 COX-1 及 cPLA2 的表达,但对 COX-2 和 PGIS 蛋白表达无显著性影响;而氧化苦参碱显著降低了异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭大鼠心肌中 COX-1 的表达,

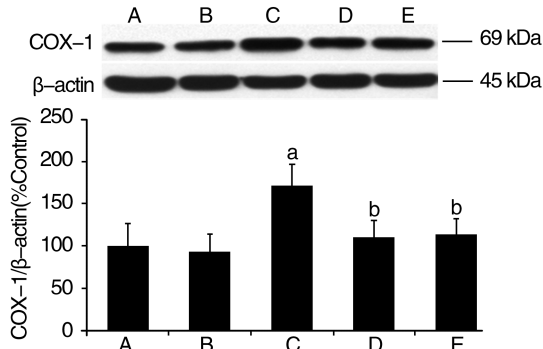


图 4. 氧化苦参碱对 ISO 诱导慢性心力衰竭大鼠心肌组织 COX-1 蛋白表达的影响 A 为正常对照组, B 为氧化苦参碱 100 mg/kg 组, C 为 ISO 组, D 为 ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组, E 为 ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组相比; b 为  $P < 0.01$ , 与 ISO 组相比。

Figure 4. Effect of oxymatrine on expression of COX-1 in hearts from isoproterenol-induced heart failure rats

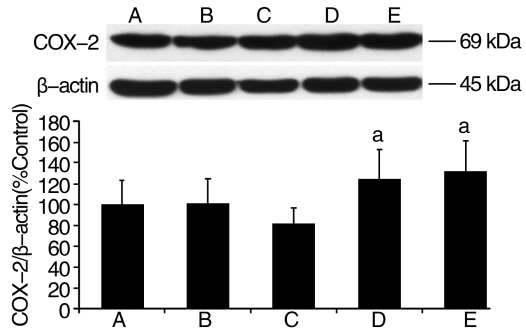


图 5. 氧化苦参碱对 ISO 诱导慢性心力衰竭大鼠心肌组织 COX-2 蛋白表达的影响 A 为正常对照组, B 为氧化苦参碱 100 mg/kg 组, C 为 ISO 组, D 为 ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组, E 为 ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。a 为  $P < 0.01$ , 与 ISO 组相比。

Figure 5. Effect of oxymatrine on expression of COX-2 in hearts from isoproterenol-induced heart failure rats

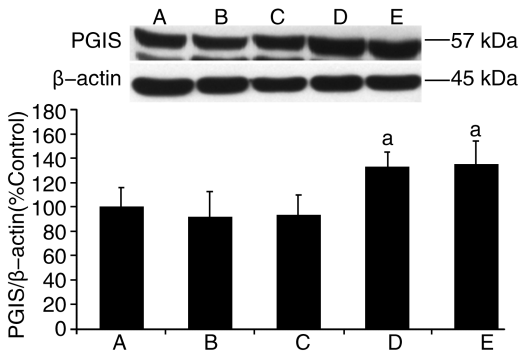


图 6. 氧化苦参碱对 ISO 诱导慢性心力衰竭大鼠心肌组织 PGIS 蛋白表达的影响 A 为正常对照组, B 为氧化苦参碱 100 mg/kg 组, C 为 ISO 组, D 为 ISO + 氧化苦参碱 100 mg/kg 组, E 为 ISO + 氧化苦参碱 50 mg/kg 组。a 为  $P < 0.05$ , 与 ISO 组相比。

Figure 6. Effect of oxymatrine on expression of PGIS in hearts from isoproterenol-induced heart failure rats

升高了 COX-2 和 PGIS 蛋白的表达,但对异丙肾上腺素诱导升高的 cPLA2 的表达无显著影响。提示氧化苦参碱可改善异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭大鼠心脏功能及心肌纤维化;氧化苦参碱对环氧合酶通路中 COX-1、COX-2 及 PGIS 的调节作用,可能参与了其改善异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭大鼠心功能的作用机制。

本研究中使用异丙肾上腺素皮下注射 7 天建立心力衰竭大鼠模型,实验结果显示 5 mg/kg 异丙肾上腺素持续给药 7 天可诱导实验大鼠心率、LVSP、+LVdp/dt<sub>max</sub> 显著下降 ( $P < 0.01$ ), -LVdp/dt<sub>min</sub> 显著升高 ( $P < 0.01$ )。本实验结果与 Krensek 等<sup>[16]</sup>以同等剂量异丙肾上腺素给药 1 周降低大鼠心率、LVSP、+LVdp/dt<sub>max</sub> 及升高 -LVdp/dt<sub>min</sub> 的实验结果相一致。从组织病理学研究提示,本实验中异丙肾上腺素 5 mg/kg 持续给药 7 天,心尖组织纤维化程度明显加重,与 Heather 等<sup>[17]</sup>人以同等剂量异丙肾上腺素建立心力衰竭大鼠模型观察到的心肌病理学变化结果相一致。BNP 是由心室分泌的多肽类激素,主要受室壁压力的调节,因此可以反应心力衰竭的程度<sup>[18]</sup>,是评估心功能的指标;本研究中异丙肾上腺素显著升高了血清中 BNP 水平,提示心功能出现异常。

COX 在心血管疾病中的作用尚有争议。COX 是合成前列腺素的关键酶,主要有两种亚型,即 COX-1 和 COX-2。COX-1 被认为是在组织细胞中持续释放,维持组织细胞生理平衡及功能完整,然而 COX-1 在一些系统中是可诱导的,如血管内皮细胞在剪切力、血管生长因子和凝血酶作用下可增加 COX-1 生成;普遍认为 COX-2 为诱导型,激活的 COX-2 可产生大量前列腺素和血栓素,在炎症过程中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。近期研究表明,在心脏缺血再灌注模型中,高表达的 COX-2 及 6-keto-PGF1α (即 PGI<sub>2</sub> 的稳定形态)对心脏缺血再灌注有保护性作用<sup>[20]</sup>。而选择性 COX-2 抑制剂 (NS-398 和 赛来西布)可消除缺血再灌注后的心肌损伤保护作用<sup>[21, 22]</sup>。基因研究显示,心脏特异性 COX-2 转基因模型可以增强心脏对缺血再灌注的保护作用<sup>[23]</sup>,而 COX-2 基因破坏小鼠表现为心肌纤维化加重<sup>[24]</sup>。此外,Run 等<sup>[25]</sup>研究显示,由花生四烯酸转换为 PGI<sub>2</sub> 时,与 COX-1 相比,COX-2 所需底物浓度低而反应速度快,且 COX-2 与 PGIS 更易结合。COX 产物 PGI<sub>2</sub> 对心脏的保护性作用已被多种实验所证实<sup>[26-28]</sup>。由此可认为 COX 通路对心脏的保护性作用主要来自于 COX-2 依赖的保护性前列腺素 PGI<sub>2</sub> 的作用。COX-1 主要产生 TXA<sub>2</sub>,而 COX-2 主要产生 PGI<sub>2</sub>;PGIS 是 PGH<sub>2</sub> 转化为 PGI<sub>2</sub>

的关键酶;TXA<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> 产生的不平衡是选择性 COX-2 抑制剂增加心血管风险的主要原因。本实验中,异丙肾上腺素没有显著影响 COX-2 及 PGIS 的表达,但是增加了 COX-1 的表达。异丙肾上腺素对心肌组织 COX-1 及 PGIS 表达的影响少有报道;近期有研究<sup>[29]</sup>显示,左冠状动脉前降支结扎所致心力衰竭大鼠模型中 COX-1 的表达是升高的。有研究<sup>[30,31]</sup>证实,异丙肾上腺素 150 mg/kg 给药 2 天、20 mg/kg 给药 3 天建立大鼠急性心肌梗伤模型,心肌组织中 COX-2 的表达可显著升高;与本实验不同的是,这些研究是通过短期应用大剂量异丙肾上腺素以建立大鼠急性心肌梗伤模型。cPLA<sub>2</sub> 是膜磷脂代谢为花生四烯酸的关键酶,花生四烯酸是 COX 合成各种前列腺素的主要底物。Kondo 等<sup>[32]</sup>研究报道,10 mg/kg 异丙肾上腺素可以激活磷脂酶活性,导致心肌细胞损坏;磷脂是维持细胞功能的重要因素,磷脂酶活性增加可导致细胞磷脂破坏,最终导致严重的细胞损害。本实验中,异丙肾上腺素显著增加 cPLA<sub>2</sub> 的表达,提示异丙肾上腺素导致了心肌细胞的严重损坏。

氧化苦参碱是一种喹诺里西啶类生物碱,既往的研究表明氧化苦参碱具有心血管系统保护效应<sup>[13, 14]</sup>,并且可以改善心力衰竭大鼠模型的心功能及心肌纤维化。本实验中氧化苦参碱(100 mg/kg、50 mg/kg)预先灌胃给药 7 天,可显著改善异丙肾上腺素诱导的心力衰竭大鼠心脏收缩及舒张功能,并且提升心力衰竭大鼠的心率。本实验结果与既往研究<sup>[33]</sup>氧化苦参碱可以提高左冠状动脉前降支结扎所致心力衰竭大鼠 LVSP、+LVdp/dt<sub>max</sub> 及降低 -LVdp/dt<sub>min</sub>、改善心肌收缩及舒张功能相一致,提示氧化苦参碱对心力衰竭大鼠血流动力学有保护作用。病理学观察显示,氧化苦参碱可明显减轻异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化;既往研究<sup>[34, 35]</sup>已经证实,氧化苦参碱可改善不同的动物模型心肌纤维化病变。氧化苦参碱还可显著降低 ISO 诱导升高的 BNP 水平,提示氧化苦参碱可明显改善心脏功能。综合上述,氧化苦参碱可以改善 ISO 诱导的慢性心力衰竭大鼠的心脏收缩及舒张功能,减轻心肌组织纤维化,降低 ISO 诱导升高的血清 BNP 水平,证实氧化苦参碱对 ISO 诱导的慢性心力衰竭大鼠心脏有保护性作用。

本实验中氧化苦参碱显著降低了异丙肾上腺素诱导升高的 COX-1 的表达,上调了心肌组织中 COX-2 及 PGIS 的表达。研究证实,应用 COX-2 抑制剂可使血小板中 TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> 比率增高<sup>[36]</sup>。缺血再灌注动物模型研究证实,PGI<sub>2</sub> 是 COX-2 的产物,

COX-2 对缺血再灌注心脏有保护性作用;Guo 等<sup>[37]</sup>再次从基因水平上证实,COX2/PGI<sub>2</sub> 受体轴在缺血再灌注模型中对心脏有保护性作用。本研究中氧化苦参碱抑制了 COX-1 的表达,促进了 COX-2 及 PGIS 的表达,由此改变了花生四烯酸向 TXA<sub>2</sub> 及 PGI<sub>2</sub> 代谢的趋向;这可能是氧化苦参碱改善异丙肾上腺素诱导的慢性心力衰竭大鼠的心功能的因素之一。本实验中氧化苦参碱对异丙肾上腺素诱导增多的 cPLA<sub>2</sub> 没有影响,提示氧化苦参碱可能并没有改善异丙肾上腺素引起的细胞磷脂质的损害,因而产生大量花生四烯酸,但是由此为合成前列腺素提供大量底物。虽然 cPLA<sub>2</sub> 对心脏的作用尚不清楚,但是另有研究认为花生四烯酸的脂氧合酶代谢产物参与了心脏缺血预处理的调节作用<sup>[38-40]</sup>。

本研究证实,氧化苦参碱一方面能改善异丙肾上腺素诱导的心力衰竭大鼠的心功能及心肌纤维化,另一方面可以调节异丙肾上腺素诱导的心力衰竭大鼠心肌中 COX-1、COX-2 及 PGIS 的表达,上述蛋白表达的改变可能参与了氧化苦参碱改善异丙肾上腺素诱导的心力衰竭大鼠的心功能及心肌纤维化的作用。

# [参考文献]

- [1] 余娟,张玉芝,张祖峰,等.慢性充血性心力衰竭患者 30 天内再入院因素分析[J].中国医师杂志,2012,14(3):385-386.
- [2] Levine B, Kalman J, Mayer L, et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure[J]. N Engl J Med, 1990, 323(4):236-241.
- [3] Francis SE, Holden H, Holt CM, et al. Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(2):215-223.
- [4] Munger MA, Johnson B, Amber IJ, et al. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. Am J Cardiol, 1996, 77(9):723-727.
- [5] Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(17):6753-757.
- [6] Grosser T, Fries S, Fitzgerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities[J]. J Clin Invest, 2006, 116(1):4-15.
- [7] Funk CD, Fitzgerald GA. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50(5):470-479.
- [8] McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(1):272-277.
- [9] Zheng P, Niu FL, Liu WZ, et al. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(31):4912-915.



- [10] Ma ZJ, Li Q, Wang JB, et al. Combining oxymatrine or matrine with lamivudine increased its antireplication effect against the hepatitis B virus in vitro[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 186-573.
- [11] Chen H, Zhang J, Luo J, et al. Antiangiogenic effects of oxymatrine on pancreatic cancer by inhibition of the NF-kappa B-mediated VEGF signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2): 589-595.
- [12] Liu L, Lu W, Ma Z, et al. Oxymatrine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via the inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and the TGF-beta/Smad signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(5): 815-822.
- [13] Shen X, Yang Y, Xu Y, et al. Protective effect of TGF-beta-Smads signal-based oxymatrine on myocardial fibrosis induced by acute myocardial infarction in rats[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2012, 37(5): 632-636.
- [14] Hu ST, Tang Y, Shen YF, et al. Protective effect of oxymatrine on chronic rat heart failure[J]. *J Physiol Sci*, 2011, 61(5): 363-372.
- [15] Rezkalla S, Kloner RA, Khatib G, et al. Effect of metoprolol in acute coxsackievirus B3 murine myocarditis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1988, 12(2): 412-414.
- [16] Krenke P, Kmecova J, Kucerova D, et al. Isoproterenol-induced heart failure in the rat is associated with nitric oxide-dependent functional alterations of cardiac function[J]. *Eur J Heart Fail*, 2009, 11(2): 140-146.
- [17] Heather LC, Catchpole AF, Stuckey DJ, et al. Isoproterenol induces in vivo functional and metabolic abnormalities: similar to those found in the infarcted rat heart[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(3): 31-39.
- [18] 唐特, 杨侃. 联合检测心钠肽与脑钠肽对心源性呼吸困难的诊断意义[J]. *中国医师杂志*, 2011, 13(9): 1266-268.
- [19] Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002, 68-69: 165-175.
- [20] Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, et al. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning[J]. *Circ Res*, 2002, 90(5): 602-608.
- [21] Shinmura K, Tang XL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(18): 10197-202.
- [22] Guo Y, Bao W, Wu WJ, et al. Evidence for an essential role of cyclooxygenase-2 as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning in mice[J]. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95(6): 479-484.
- [23] Inseste J, Molla B, Aguilar R, et al. Constitutive COX-2 activity in cardiomyocytes confers permanent cardioprotection constitutive COX-2 expression and cardioprotection[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(2): 160-168.
- [24] Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse[J]. *Cell*, 1995, 83(3): 473-482.
- [25] Ruan CH, So SP, Ruan KH. Inducible COX-2 dominates over COX-1 in prostacyclin biosynthesis: mechanisms of COX-2 inhibitor risk to heart disease[J]. *Life Sci*, 2011, 88(1-2): 24-30.
- [26] Xiao CY, Hara A, Yuhki K, et al. Roles of prostaglandin I2 and thromboxane A2 in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors[J]. *Circulation*, 2001, 104(18): 2210-215.
- [27] Hara A, Yuhki K, Fujino T, et al. Augmented cardiac hypertrophy in response to pressure overload in mice lacking the prostaglandin I2 receptor[J]. *Circulation*, 2005, 112(1): 84-92.
- [28] Kaneshige T, Saida Y, Tanaka R, et al. Effect of long-term administration of a prostacyclin analogue (beraprost sodium) on myocardial fibrosis in Dahl rats[J]. *J Vet Med Sci*, 2007, 69(12): 1271-276.
- [29] Wang Y, Li C, Liu Z, et al. DanQi Pill protects against heart failure through the arachidonic acid metabolism pathway by attenuating different cyclooxygenases and leukotrienes B4[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 67.
- [30] Sampath PD, Vijayaragavan K. Ameliorative prospective of alpha-mangostin, a xanthone derivative from *Garcinia mangostana* against beta-adrenergic catecholamine-induced myocardial toxicity and anomalous cardiac TNF-alpha and COX-2 expressions in rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 60(4-5): 357-364.
- [31] Li Z, Tran TT, Ma JY, et al. p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibition improves cardiac function and reduces myocardial damage in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 44(4): 486-492.
- [32] Kondo T, Ogawa Y, Sugiyama S, et al. Mechanism of isoproterenol induced myocardial damage[J]. *Cardiovasc Res*, 1987, 21(4): 248-254.
- [33] 喻斌, 李少康, 徐立, 等. 氧化苦参碱对心力衰竭大鼠血流动力学影响的研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2010, 24(2): 39-40.
- [34] 方泰惠, 沈祥春, 杨钰萍. 基于 TGF-beta-Smads 信号的氧化苦参碱干预急性心肌梗死诱发实验性大鼠心肌纤维化的研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 17(5): 632-636.
- [35] 卢均坤, 刘洋, 杨益鹏. 氧化苦参碱对阿霉素所致大鼠心肌损伤的保护作用研究[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(27): 5267-270.
- [36] Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(22): 2215-227.
- [37] Guo Y, Tukaye DN, Wu WJ, et al. The COX-2/PGI2 receptor axis plays an obligatory role in mediating the cardioprotection conferred by the late phase of ischemic preconditioning[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41178.
- [38] Starkopf J, Andreassen TV, Bugge E, et al. Lipid peroxidation, arachidonic acid and products of the lipoxygenase pathway in ischaemic preconditioning of rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 37(1): 66-75.
- [39] Murphy E, Glasgow W, Fralix T, et al. Role of lipoxygenase metabolites in ischemic preconditioning[J]. *Circ Res*, 1995, 76(3): 457-467.
- [40] Chen W, Glasgow W, Murphy E, et al. Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid in ischemic preconditioning and PKC-induced protection in heart[J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(6 Pt 2): H2094-101.