

氧化苦参碱与安倍生坦联用对野百合碱致肺动脉高压大鼠右心室重构的作用

李本鹏, 徐玉平, 曾珠亮, 戴贵东*
(凯里学院, 贵州 凯里 556011)

摘要:目的 探讨氧化苦参碱联合安倍生坦调控 RhoA/ROCK 蛋白表达对野百合碱致肺动脉高压大鼠右心室心肌肥厚的抑制作用。方法 将 60 只雄性大鼠随机分为正常组、模型组、氧化苦参碱组、安倍生坦组、氧化苦参碱联合安倍生坦组 (25 mg/kg+10 mg/kg)、氧化苦参碱联合安倍生坦组 (50 mg/kg+10 mg/kg)。模型组及各用药组单次皮下注射野百合碱 (60 mg/kg), 正常组给予等量的生理盐水, 氧化苦参碱、安倍生坦及氧化苦参碱联合安倍生坦均在皮下注射野百合碱 1 h 后灌胃给药。4 周后, 分离大鼠右心室 (RV)、左心室+室间隔 (LV+S) 并称质量, 计算 RV/(LV+S) 的比值, HE 染色观察心肌病理变化, Western blot 检测右心室组织中 RhoA、ROCK1 和 ROCK2 蛋白的表达。结果 与正常组比较, 模型组大鼠终末体质量降低, 大鼠心脏肥厚指数增加; 与模型组比较, 氧化苦参碱联合安倍生坦连续给药 4 周后, RV/(LV+S) 的比值降低, 终末体质量增加, 右心室病理变化有所改善, 右心室组织中 RhoA、ROCK1 和 ROCK2 的蛋白表达降低。结论 氧化苦参碱联合安倍生坦能够抑制野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠右心室重构, 其机制可能与其抑制 RhoA/ROCK 通路有关。

关键词: 氧化苦参碱; 安倍生坦; 肺动脉高压; 野百合碱; 右心室重构; RhoA/ROCK 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)01-0223-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.01.043

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 可导致机体肺循环功能障碍, 引起肺血管阻力增加, 诱发右心室超负荷、心室肥厚, 最终发生右心衰竭^[1-2]。RhoA 是一种小分子蛋白质, 属于 Rho 蛋白家族成员。RhoA GTP 酶及其下游 ROCK 与血管平滑肌收缩、应力纤维形成、细胞迁移及血压调节等过程有关^[3-4], RhoA/ROCK 蛋白的表达与高血压引起的心肌肥厚有密切的关系^[5-6]。苦参性苦、寒, 氧化苦参碱是主要活性成分, 具有广泛的生物活性, 如抗菌、抗病毒、抗炎、免疫调节等^[7-8], 对心脏有正性肌力、减慢心率、抗心律失常作用^[9], 氧化苦参碱具有较好的抗心肌缺血、脑缺血的作用^[10-11]。安倍生坦是内皮素-1 的选择性抑制剂, 对肝脏的毒性较小, 生物安全性较高, 近年来在治疗肺动脉高压上取得了良好的疗效^[12-13]。本研究在野百合碱诱导大鼠肺动脉高压的基础上, 通过检测 RhoA/ROCK 通路关键蛋白表达来探讨氧化苦参碱联合安倍生坦对心肌保护的可能分子机制, 为该成分进一步的开发和利用提供依据。

1 材料

雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (川)

2014-028, 预养 1 周后进行实验。氧化苦参碱 (纯度 99.8%, 批号 20091028) 购自宁夏夏紫荆制药有限公司; 野百合碱 (纯度大于 98%, 货号 B101942)、安倍生坦 (货号 EB0911) 均购自上海士锋生物科技有限公司。RhoA、ROCK1、ROCK2 抗体均购自英国 Abcam 公司; 相应二抗及内参 β -actin 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。

2 方法

2.1 分组及建模 参考文献 [14-15] 报道, 60 只大鼠随机分成 6 组, 分别为正常组、模型组、氧化苦参碱组、安倍生坦组、氧化苦参碱联合安倍生坦组 (25 mg/kg+10 mg/kg)、氧化苦参碱联合安倍生坦组 (50 mg/kg+10 mg/kg)。模型组和各给药组皮下单次注射 60 mg/kg 野百合碱, 正常组皮下注射等体积生理盐水, 安倍生坦组按 10 mg/kg、氧化苦参碱组按 25 mg/kg、氧化苦参碱联合安倍生坦组分别按 25 mg/kg+10 mg/kg、50 mg/kg+10 mg/kg 灌胃给药; 正常组和模型组灌胃给予等体积生理盐水, 每天 1 次, 共 28 d。所有大鼠在实验期间自由饮水、饮食, 饲养环境温度保持在 23 ℃左右, 12 h/12 h 光暗交替。

收稿日期: 2020-09-08

基金项目: 国家自然科学基金 (81860659); 贵州省科技合作计划 (黔科合 LH 字 [2015] 7748, 黔科合 LH 字 [2016] 7324); 贵州省黔东南民族特色食品研发特色重点实验室 (黔科合 KY 字 [2017] 011)

作者简介: 李本鹏 (1988—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为心血管药理学。Tel: (0855) 8558300, E-mail: benpengli@126.com

* 通信作者: 戴贵东 (1968—), 男, 博士, 教授, 研究方向为心血管药理学。Tel: (0855) 8558300, E-mail: daiguidong@163.com

2.2 心脏肥厚指数检测 末次给药 24 h 后, 乌拉坦腹腔注射给药麻醉大鼠, 股动脉取血后立即处死, 开胸取心脏, 用 4 ℃ 生理盐水清洗, 剥离心脏上的其他结缔组织, 滤纸吸干残余的生理盐水后精密称定全心质量 (HW); 分离右心室 (RV)、左心室和室间隔 (LV+S), 计算全心质量/体质量 (HW/BW) 及右心室质量/左心室和室间隔质量 (RV/LV+S) 比值。将右心室靠近心间的部分分离, 放入 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 剩余部分立即放入液氮冻存后, 转入 -80 ℃ 冰箱中备用。

2.3 组织学观察 将固定好的大鼠心肌组织用流水冲洗, 经乙醇梯度脱水、石蜡包埋、4 μm 切片、烤片后进行常规 HE 染色, 显微镜下观察形态学变化。

2.4 Western blot 检测右心室心肌组织中蛋白表达 取适量冻存的大鼠心肌组织, 称定质量后剪碎, 放入研磨器中研磨, 每 100 mg 加入冷裂解缓冲液 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片。取上清液, BCA 法进行蛋白浓度测定, 加入裂解缓冲液及上样缓冲液使终质量浓度调至 5 μg/mL, 煮沸 10 min, -20 ℃ 冰箱保存。取蛋白样本 100 μg, 在 8.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶中电泳 (80 V/100 V) 分离, 湿法转膜, 将条带转印至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后分别用一抗 (RhoA, 1 : 600; ROCK1, 1 : 4 000; ROCK2, 1 :

500; β-actin, 1 : 2 000) 4 ℃ 孵育过夜, PBST 洗膜 3 次后加入二抗山羊抗兔 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h, PBST 洗膜 4 次后取出硝酸纤维素膜, 加入化学发光剂显色, 曝光胶片, 条带以目的蛋白与相关 β-actin 光密度比表示, 结果采用 Image J 软件分析。

2.5 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 氧化苦参碱联合安倍生坦对肺动脉高压大鼠体质量、心脏质量和心脏肥厚指数的影响 各实验组大鼠初始体质量均无明显变化 (P > 0.05)。与正常组比较, 模型组大鼠终末体质量降低 (P < 0.05); 与模型组比较, 氧化苦参碱组、安倍生坦组大鼠终末体质量无明显变化 (P > 0.05), 氧化苦参碱联合安倍生坦组大鼠终末体质量增加 (P < 0.05)。与正常组比较, 模型组大鼠心脏肥厚指数和右心室肥厚指数均增加 (P < 0.05); 与模型组比较, 各联合用药组大鼠心脏肥厚指数和右心室肥厚指数均降低 (P < 0.05), 呈一定的剂量依赖性关系; 与安倍生坦组比较, 各联合用药组和氧化苦参碱大鼠终末体质量、右心室肥厚指数均无明显变化 (P > 0.05), 各联合用药组大鼠心脏肥厚指数降低 (P < 0.05), 见表 1。

表 1 各组大鼠体质量、右心室肥厚指数、心脏肥厚指数比较 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	体质量/g		心肌肥厚指数	
	初始体质量	终末体质量	RV/LV+ISV/(g·g ⁻¹)	H/BW/(mg·g ⁻¹)
正常组	217.5 ± 9.6	346.1 ± 26.7	0.26 ± 0.07	3.03 ± 0.28
模型组	219.0 ± 13.8	268.0 ± 26.8**	0.58 ± 0.05**	4.62 ± 0.27**
氧化苦参碱组	218.1 ± 12.4	278.0 ± 24.0	0.52 ± 0.11	4.52 ± 0.41
安倍生坦组	220.1 ± 12.3	287.3 ± 22.8	0.42 ± 0.07##	4.28 ± 0.48
氧化苦参碱+安倍生坦组 (50 mg/kg + 10 mg/kg)	218.7 ± 11.3	303.8 ± 22.3##	0.37 ± 0.09##	3.73 ± 0.31## ^Δ
氧化苦参碱+安倍生坦组 (25 mg/kg + 10 mg/kg)	217.0 ± 10.4	297.8 ± 23.1#	0.38 ± 0.06##	3.83 ± 0.40## ^Δ

注: 与正常组比较, **P < 0.01; 与模型组比较, #P < 0.05, ##P < 0.01; 与安倍生坦组比较, ^ΔP < 0.05。

3.2 氧化苦参碱联合安倍生坦对肺动脉高压大鼠右心室组织形态的影响 如图 1 所示, 正常组大鼠右心室心肌细胞形态正常, 排列紧密; 模型组大鼠右心室心肌细胞间隔变大, 排列顺序紊乱、胞浆有肿胀, 有些区域心肌纤维化增生; 安倍生坦组及氧化苦参碱组大鼠心肌形态与模型组比较无明显变化; 各联合给药组大鼠心肌纤维排列间隔较模型组减小, 胞浆肿胀也有不同程度的改善。

3.3 氧化苦参碱联合安倍生坦对肺动脉高压大鼠右心室心肌组织 RhoA 蛋白表达的影响 如图 2 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织内 RhoA 蛋白表达升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 安倍生坦组及氧化苦参碱组大鼠心肌组织内 RhoA 蛋白表达无明显变化 (P > 0.05), 氧化苦参碱联合安倍生坦组大鼠心肌组织内 RhoA 蛋白表达降低 (P < 0.05); 与安倍生坦组比较, 氧化苦参碱组大鼠心肌内 RhoA 蛋白表达无明显变化 (P > 0.05), 各联合用药组大鼠心肌细胞 RhoA 蛋白表达降低 (P < 0.05)。

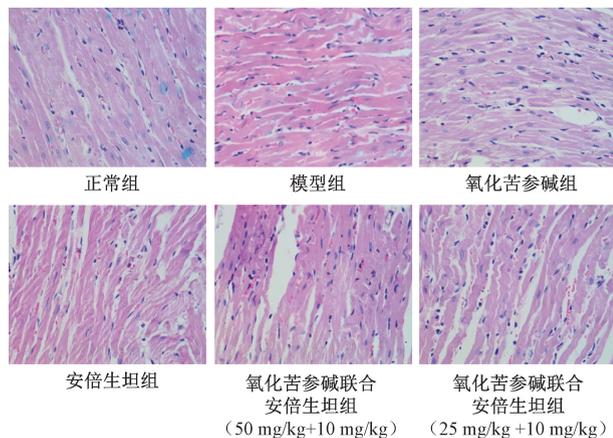
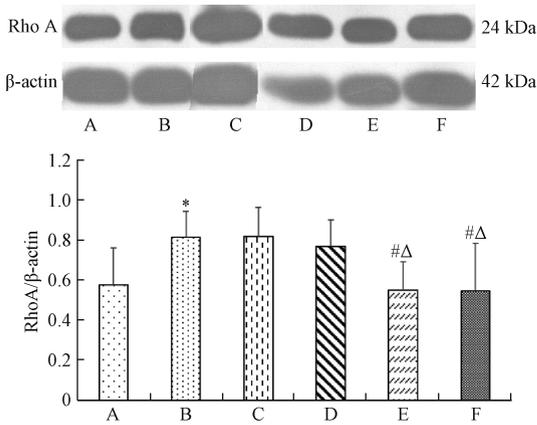


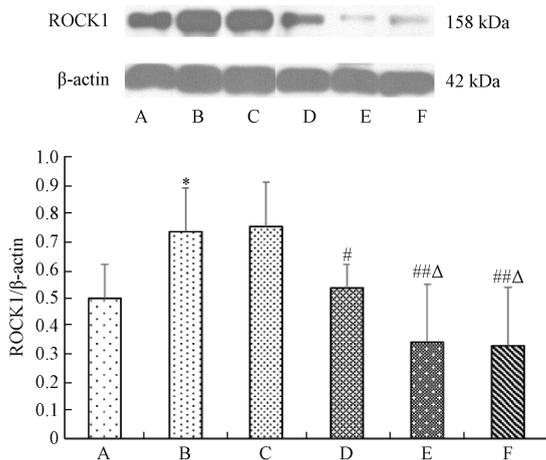
图 1 各组大鼠右心室病理变化 (HE, ×400)

3.4 氧化苦参碱联合安倍生坦对肺动脉高压大鼠心肌组织 ROCK1、ROCK2 蛋白表达的影响 如图 3 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠心肌组织内 ROCK1、ROCK2 蛋白表达升高



注: A为正常组, B为模型组, C为氧化苦参碱组, D为安倍生坦组, E为氧化苦参碱联合安倍生坦组(50 mg/kg+10 mg/kg), F为氧化苦参碱联合安倍生坦组(25 mg/kg+10 mg/kg)。与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与安倍生坦组比较,Δ $P<0.05$ 。

图2 各组大鼠右心室心肌组织中 RhoA 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)



注: A为正常组, B为模型组, C为氧化苦参碱组, D为安倍生坦组, E为氧化苦参碱联合安倍生坦组(50 mg/kg+10 mg/kg), F为氧化苦参碱联合安倍生坦组(25 mg/kg+10 mg/kg)。与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$,### $P<0.01$;与安倍生坦组比较,Δ $P<0.05$ 。

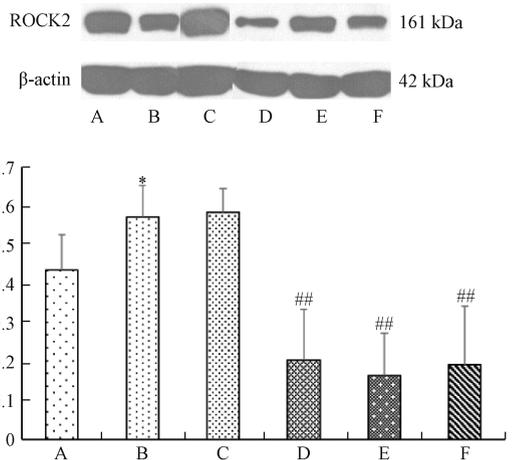
图3 各组大鼠右心室心肌组织中 ROCK1 和 ROCK2 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

($P<0.05$);与模型组比较,氧化苦参碱组大鼠心肌组织内 ROCK1、ROCK2 蛋白表达无明显变化($P>0.05$),安倍生坦组及氧化苦参碱联合安倍生坦组大鼠心肌组织内 ROCK1、ROCK2 蛋白表达降低($P<0.05$);与安倍生坦组比较,各联合用药组心肌细胞内 ROCK1 蛋白表达降低($P<0.05$)。

4 讨论

实验结果显示,皮下注射野百合碱可引起右心室肥厚,间质可见炎性细胞浸润,心肌细胞间隙增大;氧化苦参碱联合安倍生坦用药可减轻由野百合碱致肺动脉高压大鼠右心室病理损伤,尤其是高剂量的氧化苦参碱与安倍生坦联合用药组最为明显。病理检查显示,氧化苦参碱联合安倍生坦用药对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠右心室心肌损伤具有协同保护作用。

RhoA 是一类具有 GTP 酶活性的小分子,分子量为 24 kDa,在调节细胞的运动、增殖和凋亡上发挥着重要作用。作为 RhoA 的下游靶点,RhoA 的主要效应底物 Rho 激酶(Rho-associated coiled-coil-forming kinases, ROCKs)介导 RhoA 诱导的张力纤维和细胞黏附的形成^[14],在心血管疾



病中扮演重要角色,例如肺动脉高压、动脉粥样硬化和脑血管疾病也是肌动蛋白细胞骨架的重要调节因子,可以调节血管张力和重构、细胞增殖、炎症和氧化应激^[16-17]。

ROCK1 和 ROCK2 是最早发现的 RhoA 下游蛋白,具有高度同源性,其氨基酸排列顺序具有 65% 的同源性,激酶结构域同源性可达 92%^[18],两者组织表达存在差异,ROCK1 主要在免疫细胞、神经细胞、肺脏、肝脏上表达,ROCK2 在心肌、血管、脑组织中高度表达^[19]。ROCK1 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,常通过 caspase-3 介导途径调控细胞凋亡,下调 ROCK1 可降低心肌细胞凋亡^[20],并可上调 TGF-β1 表达,调控心肌纤维化^[21]。研究表明,高血压、急性心肌梗死时,ROCK2 表达会上调^[22],并通过氧化应激诱导调控心肌细胞凋亡^[21]。因此,RhoA/ROCK

可能是预防或改善心肌肥厚和纤维化的潜在靶点。

本实验结果显示,模型组大鼠心肌组织中 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达升高,说明野百合碱所致肺动脉高压大鼠的心肌 RhoA/ROCK 通路被激活;氧化苦参碱联合安倍生坦(25 mg/kg+10 mg/kg、50 mg/kg+10 mg/kg)可抑制野百合碱致肺动脉高压大鼠心肌细胞中 RhoA 的表达,同时下调 ROCK1 和 ROCK2 的表达,而且对 ROCK2 的影响要大于 ROCK1,说明氧化苦参碱联合安倍生坦用药后可调控 RhoA/ROCK 通路上关键蛋白的表达,从而对肺动脉高压引起的心肌肥厚有抑制作用。

综上所述,氧化苦参碱联合安倍生坦通过下调 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达,减轻心肌组织形态学结构的病理学异常改变,维护心肌结构的完整性,对野百合碱所致

肺动脉高压大鼠右心室肥厚具有抑制作用。

参考文献:

- [1] Lachant D J, Meoli D F, Haight D, *et al.* Combination therapy improves vascular volume in female rats with pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317(4): L445-L455.
- [2] Hoepfer M M, Bogaard H J, Condliffe R, *et al.* Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(25 Suppl): D42-D50.
- [3] Schaefer A, Reinhard N R, Hordijk P L. Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation [J]. *Small GTPases*, 2014, 5(2): e968004.
- [4] Kim J G, Islam R, Cho J Y, *et al.* Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6381-6392.
- [5] Ikeda S, Satoh K, Kikuchi N, *et al.* Crucial role of Rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(6): 1260-1271.
- [6] Tsai S H, Lu G R, Xu X, *et al.* Enhanced endothelin-1/Rho-kinase signalling and coronary microvascular dysfunction in hypertensive myocardial hypertrophy[J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(11): 1329-1337.
- [7] 赵 青, 黄镇林, 卫梦娟, 等. 氧化苦参碱协同增加环磷酸胺诱导小鼠肝毒性的研究[J]. *药学学报*, 2020, 55(6): 1193-1200.
- [8] 肖雅文, 彭 灿, 肖 瑛, 等. 氧化苦参碱在 db/db 小鼠非酒精性脂肪性肝病中的抗炎机制 [J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(6): 497-503.
- [9] Gan R T, Dong G, Yu J B, *et al.* Oxymatrine, the main alkaloid component of sophora roots, protects heart against arrhythmias in rats[J]. *Planta Med*, 2011, 77(3): 226-230.
- [10] 付 岩, 杨文成, 魏世杰, 等. 苦参碱调控 p-Akt/Akt 蛋白表达抑制大鼠心肌肥厚的作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(7): 505-509.
- [11] Liu Y, Wang H, Liu N, *et al.* Oxymatrine protects neonatal rat against hypoxic-ischemic brain damage via PI3K/Akt/GSK3 β pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 254: 116444.
- [12] Preston I R, Burger C D, Bartolome S, *et al.* Ambrisentan in portopulmonary hypertension: a multicenter, open-label trial [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2020, 39(5): 464-472.
- [13] Liang F Q, Yang S Y, Yao L N, *et al.* Ambrisentan and tadalafil synergistically relax endothelin-induced contraction of rat pulmonary arteries [J]. *Hypertension*, 2012, 59(3): 705-711.
- [14] Angus J A, Wright C E. Role of endothelin-1 clearance in the haemodynamic responses to endothelin-1 in the pulmonary and hindquarter vasculature of anaesthetised rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 855: 124-136.
- [15] Dai G D, Li B P, Xu Y P, *et al.* Oxymatrine prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of the N^G, NG-dimethyl-L-arginine metabolism pathways in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 842: 338-344.
- [16] Zhou Q, Gensch C, Liao J K, *et al.* Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(3): 167-173.
- [17] Zeng P, Pi R B, Li P, *et al.* Fasudil hydrochloride, a potent ROCK inhibitor, inhibits corneal neovascularization after alkali burns in mice[J]. *Mol Vis*, 2015, 21: 688-698.
- [18] Riento K, Ridley A J. ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6): 446-456.
- [19] Mishra R K, Alokam R, Sriram D, *et al.* Potential role of Rho kinase inhibitors in combating diabetes-related complications including diabetic neuropathy—a review[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2013, 9(3): 249-266.
- [20] Chang J, Xie M, Shah V R, *et al.* Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(39): 14495-14500.
- [21] Yang X S, Li Q, Lin X, *et al.* Mechanism of fibrotic cardiomyopathy in mice expressing truncated Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 [J]. *FASEB J*, 2012, 26(5): 2105-2116.
- [22] Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, *et al.* Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice[J]. *Circulation*, 2004, 109(18): 2234-2239.