

丹皮酚联合三七总皂苷对 Ang II 诱导的心脏成纤维细胞增殖及 TGF-β/Smads 信号通路的影响

孙红丹, 聂 丹, 周晓慧*, 时召平
(承德医学院, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 探讨丹皮酚联合三七总皂苷应用对血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导新生大鼠的心脏成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 增殖及 TGF-β/Smads 信号通路的影响。**方法** 采用胰酶消化法分离培养的 CFs 随机分为 6 组: 正常对照组, 模型组, 三七总皂苷组, 丹皮酚组, 丹皮酚与三七总皂苷联合用药大、小剂量组。采用 MTT 比色法测定各组培养液中 CFs 增殖情况, 免疫细胞化学法检测 α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 的蛋白表达水平, RT-PCR 法检测转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, *Tgfb1*) 的 mRNA 表达水平, Western blot 法检测 TGF-β1、磷酸化的 Smad2/3 (p-Smad2/3) 的蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠 CFs 增殖明显增高, *Tgfb1* 的 mRNA 表达显著增加, α-SMA 及 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达显著增加; 与模型组比较, 丹皮酚组、三七总皂苷组、联合用药的大剂量和小剂量组均可抑制由 Ang II 诱导的 CFs 的增殖, *Tgfb1* 的 mRNA 表达显著减少, α-SMA 及 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达显著减少; 与丹皮酚组、三七总皂苷组比较, 联合用药大、小剂量组在抑制 CFs 增殖的作用上显著增强, 抑制 *Tgfb1* 的 mRNA 表达效果显著增强, 抑制 α-SMA 及 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达效果显著增强; 与联合用药小剂量组比较, 联合用药大剂量组对以上指标的抑制效果更佳, 显示一定的剂量依赖性。**结论** 丹皮酚与三七总皂苷联合应用对抑制 CFs 增殖, 呈现明显的协同作用。其作用机制与抑制 TGF-β/Smads 信号通路的传导有关。

关键词: 丹皮酚; 三七总皂苷; 联合用药; 心脏成纤维细胞; α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA); TGF-β1; p-Smad2/3

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)04-0729-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.003

Effects of paeonol combined with *Panax notoginseng* saponins on the proliferation of angiotensin-induced cardiac fibroblasts and TGF-β/Smads signal pathway

SUN Hong-dan, NIE Dan, ZHOU Xiao-hui*, SHI Zhao-ping
(Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the effects of combining paeonol (Pae) with *Panax notoginseng* saponins (PNS) on the proliferation of cardiac fibroblasts (CFs) induced by angiotensin II (Ang II) and TGF-β/Smads signal pathway. **METHODS** The CFs of neonate rat were isolated and cultured by trypsin digestion and randomly divided into six groups: normal control group, model group, PNS group, Pae group, the combination of Pae and PNS high-dose and low-dose groups. The cell proliferations were measured with MTT. The expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) protein was detected by immunocytochemistry method. The mRNA expression of transforming growth factor-β1 (*Tgfb1*) was detected by RT-PCR. The protein levels of TGF-β1 and p-Smad2/3 were determined by Western blot. **RESULTS** Compared with the control group, the rat CFs proliferation, *Tgfb1* mRNA, α-SMA protein, TGF-β1 and p-Smad2/3 protein expression increased obviously in the model group. Compared with the model group, the CFs proliferation, *Tgfb1* mRNA, α-SMA protein, TGF-β1 and p-Smad2/3 pro-

收稿日期: 2015-06-26

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2011406009); 河北省教育厅重点项目 (ZD20131068)

作者简介: 孙红丹 (1988—), 女, 硕士, 从事心血管药物药理学研究。Tel: 18518176625, E-mail: sunhongdan@outlook.com

* 通信作者: 周晓慧 (1957—), 女, 教授, 从事心血管药理学研究。Tel: (0314) 2290632, E-mail: zxh5055@sina.com

tein expression decreased significantly in PNS group, Pae group, the combination of Pae and PNS high-dose and small-dose groups. Compared with PNS group and Pae group, the CFs proliferation, *Tgfb1* mRNA, α -SMA protein, TGF- β 1 and p-Smad2/3 protein expression decreased significantly in combination of Pae and PNS high-dose and low-dose groups. With regard to the inhibition of abovementioned indicators, the effect of Pae combined with PNS high-dose group were better than that of Pae combined with PNS low-dose group in a dose-dependent manner.

CONCLUSION The combination of Pae and PNS can inhibit CFs proliferation and show significant synergistic effects related with the suppression of TGF- β /Smads signal transduction pathway.

KEY WORDS: paeonol (Pae); *Panax notoginseng* saponins (PNS); combination; cardiac fibroblasts (CFs); α -smooth muscle actin (α -SMA); TGF- β 1; p-Smad2/3

心肌梗死后的心室重构主要表现为心肌细胞的代偿性肥大、心肌间质成纤维细胞增生、纤维化,细胞外基质胶原网的量和组成的变化等。TGF- β 1 是一种多功能的细胞间信号蛋白,在心脏中的表达较多,在心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)中起重要作用,是重要的促纤维化因子。有研究表明, TGF- β /Smads 信号通路的激活可促进成纤维细胞增殖和胶原合成,从而引起 MF^[1]。肌成纤维细胞是含有肌动蛋白、肌球蛋白和其他肌肉蛋白的成纤维细胞, TGF- β 1 的增加有利于诱导成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,使细胞 α -SMA 的表达量增加^[2]。血管紧张素 II 可促进 CFs 的增殖并引起心肌细胞肥大,是目前较公认的引起 MF 的因素之一^[3]。丹皮酚是从中药萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* (Bge.) Kitag. 和毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 中分离得到的一类小分子酚类化合物,具有抗菌消炎、抗肿瘤、保护心血管、抗心律失常、增强免疫力等多种生物活性^[4]。三七总皂苷是五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的主要有效成分,具有补血、止血,调血脂,抗血栓等作用,广泛应用于外伤出血、跌打肿痛及心脑血管疾病的治疗^[5]。研究还发现丹皮酚与三七总皂苷均具有改善心肌纤维化,抑制 CFs 增殖的作用^[6-7],但二者联合应用是否存在协同作用却未见报道,本研究采用 Ang II 诱导大鼠 CFs 增殖,观察丹皮酚与三七总皂苷联合应用对 CFs 增殖的影响,以期探讨丹皮酚与三七总皂联合应用有无协同增效作用及分子机制。

1 材料

1.1 实验动物 SD 大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号: SCXK [京] 2012-0001)。

1.2 药物与主要试剂 丹皮酚(5 mg/mL, 宁波

天真制药有限公司,批号 20110603);三七总皂苷(50 mg/mL, 血塞通注射液 [络泰], 昆明制药集团股份有限公司,批号 13CJ27); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);胰蛋白酶(北京奥博星生物技术责任有限公司);血管紧张素 II (美国 Sigma 公司);第一链 cDNA 合成试剂盒(美国 Invitrogen 公司); RT-PCR 扩增试剂盒(宝生物工程 [大连] 有限公司); TGF- β 1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司); p-Smad2/3 抗体(美国 CST 公司); β -Actin 抗体(美国 Santa Cruze 公司);兔超敏二步法免疫组化检测试剂盒及辣根过氧化酶标记的二抗(北京中衫金桥生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器 OLYMPUS 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); HERAcell150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); SWCJ-2FD 型净化工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); iCycle⁷ Thermal Cycler 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); DNM-9602 型酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司); DYY-BC 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 乳鼠心脏成纤维细胞原代及传代培养 取新生 1~3 d 的 SD 大鼠置于体积分数为 75% 酒精中浸泡处死,取出心脏迅速置于含有 10% 血清的 DMEM 培养液中并转移至超净台。用平衡盐溶液(D-Hanks)清洗心脏 3 次。加入 20~30 倍体积的胰蛋白酶消化液, 37℃ 水浴消化 8 min。用吸管取出消化液到离心管内并滴加 4 滴胎牛血清使胰酶灭活。重复消化 3 次后将收集的所有细胞悬液过 200 目筛网, 1 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清, 反复 2 次并用 D-Hanks 冲洗细胞。将细胞接种在含 10% 胎牛血清的培养基内,置于 37℃ 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。然后采用差速贴壁法分离培养心脏成纤维细胞,待细胞生长至 80% 融合时

用 0.125% 胰蛋白酶消化进行传代培养。实验用第 3 代细胞。

2.2 实验分组及给药 将培养的心脏成纤维细胞分为以下 6 组。正常对照组，不加干预因素；模型组，Ang II (10^{-7} mol/L)；丹皮酚组，丹皮酚 (45 mg/L) + Ang II (10^{-7} mol/L)；三七总皂苷组，三七总皂苷 (50 mg/L) + Ang II (10^{-7} mol/L)；联合大剂量组，丹皮酚 (45 mg/L) + 三七总皂苷 (50 mg/L) + Ang II (10^{-7} mol/L)；联合小剂量组，丹皮酚 (30 mg/L) + 三七总皂苷 (30 mg/L) + Ang II (10^{-7} mol/L)。

2.3 MTT 比色法检测细胞增殖情况 将含 10% 胎牛血清培养基的细胞悬液以 1×10^5 每孔接种于 96 孔板，培养 24 h 后换液并加入含 0.4% 胎牛血清的培养基，使细胞进入 G_0 期来调节细胞同步化^[8]。同步化处理 24 h，药物干预 48 h 后弃去培养液，每孔加入 MTT 溶液 20 μ L 以及含 10% 胎牛血清培养基 180 μ L，继续孵育 4 h，终止培养，小心吸弃孔内培养上清液，每孔加 150 μ L 二甲基亚砷 (DMSO)，震荡 10 min，使结晶物充分溶解。选择 570 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度 (D) 值，记录结果并计算细胞增殖率，公式：细胞增殖率 = (实验组 $D_{570\text{ nm}}$ - 正常对照组 $D_{570\text{ nm}}$) / 对照组 $D_{570\text{ nm}} \times 100\%$ ^[2]。

2.4 免疫细胞化学法检测 α -SMA 的表达 将含 10% 胎牛血清培养基的细胞悬液以 1×10^5 每孔接种于小玻璃培养皿中培养，取经药物干预后的细胞用冰丙酮固定 10 min，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次，制作细胞爬片，对 CFs 进行兔超敏二步法染色，显棕黄色颗粒为阳性。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析。对图片中棕黄色阳性颗粒进行光密度扫描，测定平均光密度值，以观察 α -SMA 的蛋白表达变化。

2.5 RT-PCR 法检测 *Tgfb1* 的 mRNA 的表达水平

将含 10% 胎牛血清培养基的细胞悬液以 5×10^5 每孔接种于 6 孔板中培养，药物干预 48 h 后采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA， β 肌动蛋白 (β -actin) 为内参。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成，*Tgfb1* 正向引物为 5' -GCCTC-CGCATCCCACCTTTG-3'，反向引物为 5' -GCGGGTGACTTCTTTGGCGT-3'，产物 396 bp； β -actin 正向引物为 5' -CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'，反向引物为 5' -CCCATACCCACCATCA-CACC-3'，产物 207 bp。严格按试剂盒说明书反

转录合成 cDNA，再以 cDNA 产物为模板对目的片段进行 PCR 扩增。按以下反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，61.2 $^{\circ}\text{C}$ (*Tgfb1*) 或 60.4 $^{\circ}\text{C}$ (β -actin) 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，共 30 个循环，经末次循环后 10 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。对 PCR 扩增产物结果进行灰度扫描，应用 Quantity One 软件进行定量分析，用目的条带的光密度与 β -actin 条带光密度的比值，作为各目的基因 mRNA 表达的相对水平。

2.6 Western blot 检测 TGF- β 1、p-Smad2/3 的蛋白表达 将含 10% 胎牛血清培养基的细胞悬液以 5×10^5 每孔接种于培养瓶中，药物干预 48 h 后弃去培养液，每瓶加入 500 μ L RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，蛋白提取过程均在冰上操作，用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。取 50 μ g 总蛋白加入上样缓冲液，95 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min 变性，经 SDS-PAGE 进行凝胶电泳，电泳分离的蛋白转移至 PVDF 膜上，封闭过夜，加入 1:3 000 稀释的 TGF- β 1 或 p-Smad2/3 一抗室温孵育 2 h，用 TBST 缓冲液洗 3 次，15 min/次。然后加入 1:3 000 稀释的二抗，室温孵育 1 h，滴加 ECL 化学发光剂反应 4 min 后曝光，显影并定影。对结果进行灰度扫描，应用 Quantity One 软件进行定量分析，以目的条带的光密度与 β -Actin 条带光密度的比值作为各目的蛋白表达的相对水平。

2.7 统计学处理 采用统计软件 SPSS 19.0 进行数据分析，所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 MTT 比色法检测 CFs 的增殖情况 CFs 在 Ang II 作用后，与正常对照组比较，模型组 D 值明显增加 ($P < 0.01$)，表明 Ang II 可明显促进 CFs 的增殖 (增殖率 46.8%)。各用药组作用增殖的 CFs 后 D 值有不同程度的降低，增殖率减小，与模型组比较，有显著差异 ($P < 0.01$)，表明各用药组对 CFs 的增殖有抑制作用。与丹皮酚组、三七总皂苷组比较，联合大、小剂量组的增殖率显著下降 (增殖率分别为 7.3%，16.7%； $P < 0.01$)，结果表明联合应用抑制 CFs 增殖的效果较单独用丹皮酚或三七总皂苷的效果好。与联合小剂量组比较，联合大剂量组增殖率显著下降 ($P < 0.05$)，表明联合用药时组方内各药剂量的增加有利于抑制 CFs 的增殖，显示一定的剂量依赖性。结果见表 1。

表 1 药物干预后的 CFs 增殖率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 Proliferative effects of drugs administration in CFs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)		D(570 nm)	增殖率/%
	三七总皂苷	丹皮酚		
正常对照组	—	—	0.379 ± 0.014	0
模型组	—	—	0.556 ± 0.011 ¹⁾	46.8
三七总皂苷组	50	—	0.498 ± 0.045 ²⁾	31.4
丹皮酚组	—	45	0.506 ± 0.045 ²⁾	33.6
联合大剂量组	50	45	0.406 ± 0.017 ^{2,3,4,5)}	7.3
联合小剂量组	30	30	0.442 ± 0.025 ^{2,3,4)}	16.7

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P < 0.01$ ；与三七总皂苷组比较，³⁾ $P < 0.01$ ；与丹皮酚组比较，⁴⁾ $P < 0.01$ ；与联合小剂量组比较，⁵⁾ $P < 0.05$

3.2 免疫细胞化学法检测 α -SMA 的表达 CFs 经 Ang II 诱导后，与正常对照组相比，模型组 α -SMA 蛋白表达阳性细胞数增加且着色较深，而经药物干

预后，阳性细胞数出现不同程度的减少且着色变淡，其中丹皮酚组与三七总皂苷组的颜色相近但略浅于模型组，联合用药组的染色颜色均浅于丹皮酚组和三七总皂苷组，而联合小剂量组的着色又略深于联合大剂量组。经统计学分析发现，与正常对照组比较，模型组 α -SMA 的表达量明显增加 ($P < 0.01$)；各组药物作用 CFs 后， α -SMA 的表达有不同程度的降低，与模型组比较，有显著性差异 ($P < 0.01$)，表明各组药物均可抑制 α -SMA 的表达。与丹皮酚组、三七总皂苷组比较，联合大、小剂量组 α -SMA 的表达水平显著下降 ($P < 0.01$)，结果表明联合用药较单独用药的效果好。与联合小剂量组比较，联合大剂量组 α -SMA 的表达水平显著下降 ($P < 0.01$)，显示一定的剂量依赖性，表明联合大剂量使用时效果更佳。结果见图 1、表 2。

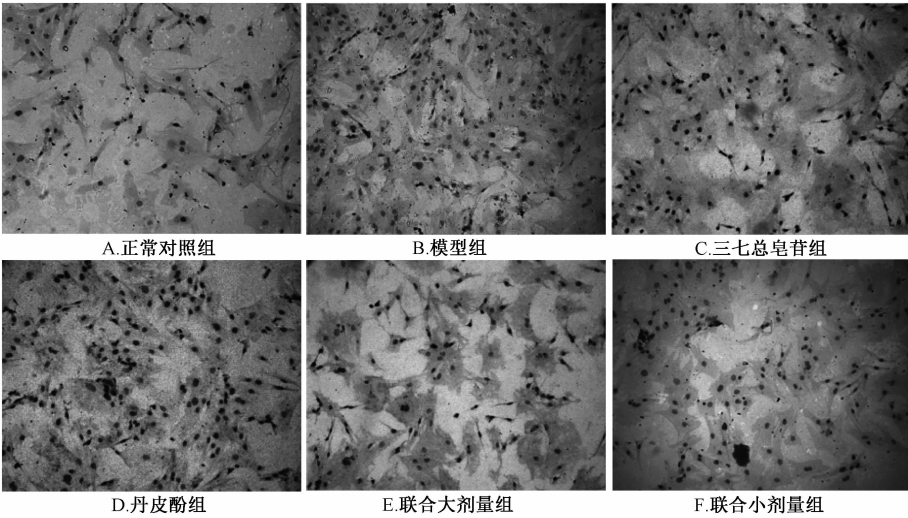


图 1 三七总皂苷、丹皮酚及联合用药对 CFs 中 α -SMA 的蛋白表达水平的影响 ($\times 100$)

Fig. 1 Effects of PNS, Pae and drug combinations on CFs of protein expression levels of α -SMA ($\times 100$)

表 2 三七总皂苷、丹皮酚及联合用药对 CFs 中 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 2 Effects of PNS, Pae and drug combinations on CFs of protein expression levels of α -SMA ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)		α -SMA
	三七总皂苷	丹皮酚	
正常对照组	—	—	0.20 ± 0.01
模型组	—	—	0.53 ± 0.07 ¹⁾
三七总皂苷组	50	—	0.40 ± 0.01 ²⁾
丹皮酚组	—	45	0.39 ± 0.01 ²⁾
联合大剂量组	50	45	0.22 ± 0.003 ^{2,3,4,5)}
联合小剂量组	30	30	0.31 ± 0.01 ^{2,3,4)}

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P < 0.01$ ；与三七总皂苷组比较，³⁾ $P < 0.01$ ；与丹皮酚组比较，⁴⁾ $P < 0.01$ ；与联合小剂量组比较，⁵⁾ $P < 0.01$

3.3 RT-PCR 法检测 *Tgfb1* 的 mRNA 的表达水平 给予 Ang II 诱导后，与正常对照组比较，模型组 CFs 内 *Tgfb1* 的 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.01$)。各组药物作用 CFs 后 *Tgfb1* 的 mRNA 表达量有不同程度的降低，与模型组比较，有显著性差异 ($P < 0.05$)，表明各组药物均可抑制 CFs 的增殖。与丹皮酚组、三七总皂苷组比较，联合大、小剂量组的 *Tgfb1* 的 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$)，结果表明联合应用抑制 CFs 内 *Tgfb1* 的 mRNA 表达效果较单独使用丹皮酚或三七总皂苷的效果好。与联合小剂量组比较，联合大剂量组 *Tgfb1* 的 mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$)，呈现一定的剂量依赖性。结果见图 2、表 3。

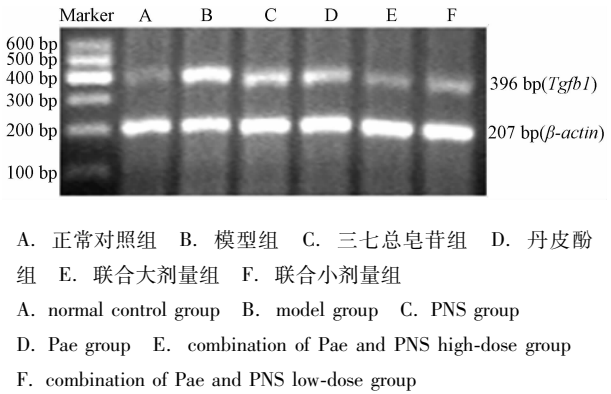


图 2 三七总皂苷、丹皮酚及联合用药对 CFs 中 *Tgfb1* 的 mRNA 表达水平的影响

Fig. 2 Effects of PNS, Pae and drug combinations on CFs of mRNA expression levels of *Tgfb1*

表 3 三七总皂苷、丹皮酚及联合用药对 CFs 中 *Tgfb1* 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 3 Effects of PNS, Pae and drug combinations on CFs of mRNA expression levels of *Tgfb1* ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)		<i>Tgfb1</i> /β-actin
	三七总皂苷	丹皮酚	
正常对照组	—	—	0.33 ± 0.08
模型组	—	—	1.26 ± 0.15 ¹⁾
三七总皂苷组	50	—	0.71 ± 0.08 ²⁾
丹皮酚组	—	45	0.82 ± 0.07 ²⁾
联合大剂量组	50	45	0.32 ± 0.06 ^{2,3,4,5)}
联合小剂量组	30	30	0.45 ± 0.05 ^{2,3,4)}

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P < 0.05$ ；与三七总皂苷组比较，³⁾ $P < 0.01$ ；与丹皮酚组比较，⁴⁾ $P < 0.01$ ；与联合小剂量组比较，⁵⁾ $P < 0.05$

3.4 Western blot 检测 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达情况 给予 Ang II 诱导后，与正常对照组比

表 4 三七总皂苷、丹皮酚及联合用药对 CFs 中 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 4 Effects of PNS, Pae and drug combinations on CFs of protein expression levels of TGF-β1 and p-Smad2/3 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·L ⁻¹)		TGF-β1/β-Actin	(p-Smad2/3)/β-Actin
	三七总皂苷	丹皮酚		
正常对照组	—	—	0.33 ± 0.01	0.20 ± 0.01
模型组	—	—	1.09 ± 0.02 ¹⁾	0.63 ± 0.02 ¹⁾
三七总皂苷组	50	—	0.64 ± 0.01 ²⁾	0.40 ± 0.02 ²⁾
丹皮酚组	—	45	0.70 ± 0.02 ²⁾	0.48 ± 0.02 ²⁾
联合大剂量组	50	45	0.46 ± 0.01 ^{2,3,4,5)}	0.27 ± 0.02 ^{2,3,4,5)}
联合小剂量组	30	30	0.58 ± 0.01 ^{2,3,4)}	0.33 ± 0.02 ^{2,3,4)}

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P < 0.01$ ；与三七总皂苷组比较，³⁾ $P < 0.01$ ；与丹皮酚组比较，⁴⁾ $P < 0.01$ ；与联合小剂量组比较，⁵⁾ $P < 0.01$

4 讨论

心脏细胞总数中，间质细胞占 2/3，其中 90% 以上是具有增殖能力的心脏成纤维细胞，正常细胞

较，模型组 CFs 内 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达量明显增加 ($P < 0.01$)。各组药物作用增殖的 CFs 后，TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达量有不同程度的降低，与模型组比较，有显著性差异 ($P < 0.01$)，表明各用药组均可抑制 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达。与丹皮酚组、三七总皂苷组比较，联合大、小剂量组 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$)，结果表明联合应用抑制 CFs 中 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达效果较单独使用丹皮酚或三七总皂苷的效果好。与联合小剂量组比较，联合大剂量组以上指标表达显著下降 ($P < 0.01$)，表明联合用药时组方内各药剂量的增加有利于抑制 CFs 中 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达，有一定的剂量依赖性。结果见图 3、表 4。

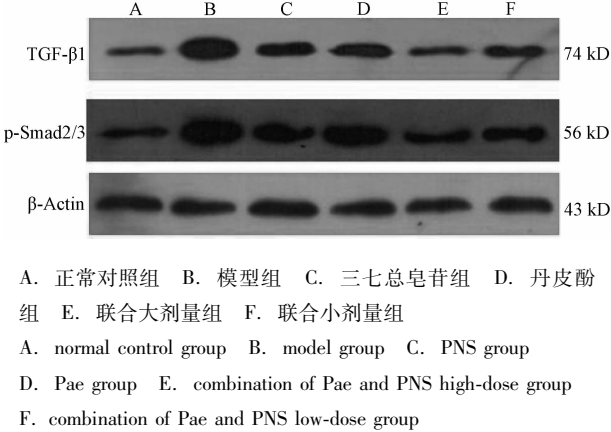


图 3 三七总皂苷、丹皮酚及联合用药对 CFs 中 TGF-β1、p-Smad2/3 的蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effects of PNS, Pae and drug combinations on CFs of protein expression levels of TGF-β1 and p-Smad2/3

中的 TGF-β1 含有量较低，TGF-β1 是 TGF-β 中具有活性的 C 端片段，再经 Ang II 诱导的 CFs 增殖后，TGF-β 被激活，此时它先与 II 型受体结合，促

使受体抑制蛋白 FKBP12 从 I 型受体解离, I 型受体与 TGF- β 形成配体再和 II 型受体结合形成配体-受体复合物, I 型受体被 II 型受体磷酸化后招募 I 型受体激酶底物 Smads 家族蛋白与受体复合物结合, 其中 Smad2 和 Smad3 能被 I 型受体磷酸化而从受体复合物上解离下来, p-Smad2/3 与 Smad4 结合后转运至细胞核内结合 DNA 并在转录激活因子的调控下进行靶基因的转录和翻译^[9]。Ang II 可促进 CFs 的增殖, 而 CFs 的过度增殖, 可导致 TGF- β 1 的表达增加, 此时 TGF- β 1 可通过 TGF- β /Smad 信号通路上调 α -SMA 的表达^[10]。CFs 转化为肌成纤维细胞是决定 MF 的关键性因素, α -SMA 是细胞骨架蛋白, 其含有量的变化可反应 MF 的程度^[11]。

丹皮酚药理作用广泛, 有结果显示丹皮酚可抑制病理状态下成纤维细胞的增殖^[12]。丹皮酚还可通过缩短动作电位持续时间, 增强内向整流钾电流的方式调节心律失常而达到保护心脏的作用^[13]。张金燕等认为丹皮酚与芍药苷配伍可在一定程度上修复缺氧/复氧对体外培养的心肌细胞的损伤, 但未见配伍后的增效作用^[14]。三七总皂苷的活性成分主要为三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁, 其中人参皂苷 Rb₁ 具有降低血管基底厚度, 扩张血管的作用, 三七皂苷 R₁ 具有抑制细胞过度增殖的作用^[15]。此前, 陈剑梅等指出三七总皂苷对改善急性心梗后左室重构大鼠的心功能确有作用^[16]。也有报道显示三七总皂苷可通过激活 PI3K/Akt 信号通路来保护由于局部缺血所造成的心肌细胞的损伤^[17]。

基于丹皮酚与三七总皂苷在保护心脏与抑制心脏成纤维细胞增殖作用上的相似性, 本研究采用 Ang II 诱导建立大鼠 CFs 增殖的模型, 模拟临床心室重构后的心肌纤维化, 通过对 TGF- β 1、p-Smad2/3、 α -SMA 相关因子的分析来探讨丹皮酚与三七总皂苷联合应用在抑制 CFs 增殖时所呈现的协同作用。首先需要说明的是, 本实验前期采用 MTT 法对丹皮酚、三七总皂苷进行细胞毒性试验, 选择丹皮酚质量浓度范围为 5 ~ 75 mg/L, 三七总皂苷质量浓度范围为 5 ~ 85 mg/L, 且两种药物在各自的质量浓度范围内均与 CFs 的活力呈现一定的剂量依赖性。本实验综合丹皮酚质量浓度、三七总皂苷质量浓度、联合用药质量浓度及 CFs 的活力四种因素决定本课题后续实验采用的药物干预剂量, 尤其考虑到联合用药可能因剂量过大而对细胞产生毒性, 因此, 丹皮酚干预剂量选择最小致死量的

60%, 即 45 mg/L, 其大、小剂量选择采用半倍增加, 即 30、45 mg/L。三七总皂苷干预剂量选择近似最小致死量的 60%, 即 50 mg/L, 其大、小剂量选择采用近似半倍增加, 即 30、50 mg/L。

本实验研究结果显示 Ang II 可诱导大鼠 CFs 增殖, 经各组药物干预后, 与模型组比较, CFs 的增殖明显受到了抑制, *Tgfb1* 的 mRNA 表达水平显著下降, *Tgfb1* 的 mRNA 表达显著减少, p-Smad2/3 及 α -SMA 的蛋白表达也明显降低, 且联合剂量组的抑制效果更加明显。可见, 丹皮酚和三七总皂苷均具有抑制 TGF- β /Smads 信号通路的传导作用, 也进一步验证两药均具有抑制 CFs 增殖的作用。此外, 值得注意的是, 与丹皮酚组、三七总皂苷组比较, 联合用药大、小剂量组在抑制 CFs 增殖的作用上显著增强, 抑制 *Tgfb1* 的 mRNA 表达效果显著增强, 抑制 α -SMA 及 TGF- β 1、p-Smad2/3 的蛋白表达效果显著增强; 上述结果表明, 丹皮酚和三七总皂苷联合应用于经 Ang II 诱导增殖的 CFs 时, 对以上指标的抑制效果均优于单独用丹皮酚组和三七总皂苷组, 呈现明显的协同作用, 这种协同作用可能与抑制 TGF- β /Smads 信号通路的传导有关。再者, 与联合用药小剂量组比较, 联合用药大剂量组对以上指标的抑制效果更佳, 显示一定的剂量依赖性。而丹皮酚与三七总皂苷联合应用后所呈现的协同作用对指导临床用药及治疗心肌梗死后的心室重构可能具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 杨锦龙, 范忠才. 转化生长因子 β 1 与心肌纤维化的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2013, 27(8): 1007-1008.
- [2] Mun J H, Kim Y M, Kim B S, et al. Simvastatin inhibits transforming growth factor- β 1-induced expression of type I collagen, CTGF, and α -SMA in keloid fibroblasts[J]. *Wound Rep Reg*, 2014, 22(1): 125-133.
- [3] Xie Y J, Yan M S, Gai L Y. Effect of angiotensin II and aldosterone on the proliferation of cardiac fibroblasts in rats[J]. *J Cent South Univ*, 2013, 38(9): 902-908.
- [4] 胡云飞, 徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 安徽医药, 2014, 18(4): 589-592.
- [5] 武 双, 崔秀明, 郭从亮, 等. 三七“生打熟补”物质基础及药理作用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(8): 50-53.
- [6] Li H, Xie Y H, Yang Q, et al. Cardioprotective effect of paeonol and danshensu combination on isoproterenol-induced myocardial injury in rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48872.
- [7] Li C Y, Deng W, Liao X Q, et al. The effects and mecha-

nism of ginsenoside Rg1 on myocardial remodeling in an animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 16.

[8] 马文东, 张丽娟, 罗 玲, 等. 抗纤维化短肽对血清诱导的心脏成纤维细胞增殖和胶原合成与 I、III 型胶原表达抑制作用的实验研究[J]. 华北煤炭医学院学报, 2008, 10 (3): 291-293.

[9] 朱 翠, 丁丽华, 曾宪垠, 等. TGF- β /Smads 信号转导通路的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2008, 19 (4): 604-607.

[10] Shen N N, Li X G, Zhou T, *et al.* Shensong Yangxin Capsule prevents diabetic myocardial fibrosis by inhibiting TGF- β 1/Smad signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157 (18): 161-170.

[11] Fan Y H, Dong H, Pan Q, *et al.* Effects of arginine vasopressin on differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 55 (5): 489-495.

[12] 张保刚, 王晓晔, 董 亮, 等. 丹皮酚体外抑制 TGF- β 诱导的成纤维细胞增殖的研究[J]. 天津医药, 2008, 36(9) 704-705.

[13] Ma Y L, Bates S, Gurney A M. The effects of paeonol on the electrophysiological properties of cardiac ventricular myocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 545(3): 87-92.

[14] Zhang J Y, Li P, Li Y K. Protective effects of paeonol, paeoniflorin and their compatibility on *in vitro* cultured cardiomyocytes suffering from hypoxia-reoxygenation injury [J]. *Chin J Integr Tradit Western Med*, 2012, 32(4): 510-514.

[15] Wang X M, Wang S X, Hu L M. Neuroprotective effect of *Panax notoginseng* saponins and its main components [J]. *World J Neurosci*, 2014, 4(1): 12-17.

[16] 陈剑梅, 郭洁文, 李丽明. 三七总皂苷对急性心梗后左室重构大鼠心功能的改善作用[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5) 514-517.

[17] Chen S X, Liu J L, Liu X Y, *et al.* *Panax notoginseng* saponins inhibit ischemia-induced apoptosis by activating PI3K/Akt pathway in cardiomyocytes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137 (1): 263-270.

补阳还五汤对急性脑缺血大鼠血清 CD63 和 CD62P 因子表达的影响

黄志恩^{1,2}, 李茹冰^{1*}, 姚 晖^{2*}, 朱永坤³, 陈 艳⁴

(1. 南方医科大学附属广州军区广州总医院药学部, 广东 广州 510010; 2. 南方医科大学附属佛山医院药学部, 广东 佛山 528000; 3. 东莞市第三人民医院药学部, 广东 东莞 523326; 4. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: **目的** 探讨补阳还五汤(黄芪, 当归尾, 赤芍, 地龙、桃仁、红花、川芎)对急性脑缺血大鼠血清溶酶体颗粒糖蛋白 63 (CD63) 和血小板 α 颗粒膜糖蛋白 140 (CD62P) 细胞因子的影响。**方法** 采用大脑中动脉线栓法建立大鼠急性局灶性脑缺血模型。将 SPF 级 SD 雄性大鼠 100 只随机均分为假手术组和模型组(生理盐水), 氯吡格雷组 [6.75 mg/(kg·d)], 补阳还五汤高 [26 g/(kg·d)]、低剂量组 [6.5 g/(kg·d)]。连续给药 14 d 后观察和比较各组大鼠神经功能评分、脑梗死面积和血清 CD63 和 CD62P 水平变化情况。**结果** 与模型组相比, 氯吡格雷组、补阳还五汤高剂量组均能显著降低动物的神经功能评分 ($P<0.01$)、增加体质量 ($P<0.05$, $P<0.01$) 和减少脑梗死面积 ($P<0.01$ 和 $P<0.05$)。酶联免疫法结果显示, 模型组大鼠血清 CD63、CD62P 均较假手术组升高, 补阳还五汤高、低剂量组与模型组比较, 均能降低 CD63 和 CD62P 水平, 差异有显著性 ($P<0.01$ 和 $P<0.05$), 尤以高剂量组较为明显。**结论** 补阳还五汤可能下调 CD63、CD62P 因子表达, 减轻急性脑缺血模型大鼠的神经功能损伤和减少脑梗死面积。

关键词: 补阳还五汤; 大鼠; 急性脑缺血; CD63; CD62P

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)04-0735-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.004

收稿日期: 2015-08-24

基金项目: 广东省中医药管理局中医药强省课题 (20121088)

作者简介: 黄志恩 (1981—), 女, 硕士生, 主管药师, 从事神经内科临床药学工作。Tel: (0757) 88032029, E-mail: mabel5789@163.com

* 通信作者: 李茹冰 (1971—), 女, 博士, 副主任技师, 从事药理学研究工作。Tel: (020) 88654185, E-mail: lrb90927@126.com

姚 晖 (1973—), 男, 博士, 主任药师, 从事临床药学研究工作。Tel: (0757) 88032029, E-mail: fsysaohui@126.com