

丹参红花提取物对鼠心脏成纤维细胞胶原合成的影响

徐琳¹ 邱健¹ 李志梁² 李高中³ 向定成¹ 马骏¹ 赵霞²

(1 广州军区广州总医院心血管内科, 广东省广州市流花路 111 号, 510010; 2 南方医科大学珠江医院心血管内科; 3 西安交通大学医院)

摘要 目的:探讨丹参红花提取物(DCE)对血管升压素(AVP)诱导的新生SD大鼠心脏成纤维细胞(CF)胶原合成作用的影响,为应用中成药防治高血压心肌纤维化提供理论依据。方法:运用³H-脯氨酸掺入法分别观察不同浓度和不同时间DCE对AVP诱导CF胶原合成的影响。结果:CF的³H-脯氨酸掺入率随着DCE干预浓度的增加而降低,其中100mg/L和200mg/L DCE组的³H-脯氨酸掺入率明显低于空白对照组,并具有统计学意义($P < 0.01$);随着DCE作用时间的延长,CF的³H-脯氨酸掺入率呈递减趋势,CF胶原合成功能与DCE作用时间呈明显的负相关。结论:DCE能够呈浓度和时间依赖性抑制AVP诱导的CF胶原合成功能,防治高血压心肌纤维化。

关键词 丹参红花提取物;心脏成纤维细胞

Effects of Danshen root and Carthamus tinctorius Extract on the collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts

Xu Lin¹, Qiu Jian¹, Li Zhiliang², Li Gaozhong³, Xiang Dingcheng¹, Ma Jun¹, Zhao Xia².

(Department of cardiology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Direct, Guangzhou 510010)

Abstract Objective: To investigate the effects of Danshen root and Carthamus tinctorius Extract (DCE) on the collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts (CF). **Methods:** CF of neonatal Sprague-Dawley (SD) rats were isolated by trypsin digestion method and growth-arrested CF were stimulated with 10^{-7} mol/L AVP in the presence of varying concentrations of DCE (10mg/L, 50mg/L, 100mg/L and 200mg/L). Collagen synthesis was measured by ³H-proline incorporation. **Results:** The results showed that DCE decreased ³H-thymidine incorporation in CF with a concentration dependent manner. ³H-thymidine incorporation values of 100mg/L and 200mg/L DCE groups are 502 ± 35.13 cpm/2000cells and 408 ± 24.58 cpm/2000cells, respectively, which are significantly lower than that of the control (both $P < 0.01$); With the increase of time, ³H-thymidine incorporation of CF decrease gradually, there are obviously negative relevance between ³H-thymidine incorporation and time. **Conclusion:** The results indicate that DCE decreases CF collagen synthesis.

Key Words Danshen root and Carthamus tinctorius Extract; cardiac fibroblasts

高血压心肌重构包括细胞和间质的改变,前者指心肌细胞异常增殖肥大和凋亡,后者表现为心脏成纤维细胞(CF)异常增殖,合成纤维状胶原增加,聚积于细胞外间质内,引起心肌纤维化(MF)。目前抑制或逆转MF是防治高血压心肌重构的新目标,因此探寻具有抗MF作用的药物用于防治心脑血管病具有重要的临床意义和广阔的应用前景。本实验观察了丹参红花提取物对心脏成纤维细胞胶原合成的影响,现将结果报道如下。

1 材料

1.1 实验动物:出生1~3天的SD大鼠,广州军区总医院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器:胰蛋白酶、四氮唑盐(MTT)均为Sigma公司产品;AVP购自美国Pennisular Lab;丹参红花提取物(商品名丹红注射液,由陕西步长集团提供浓缩液);DMEM培养基为GIBCO公司产品;胎牛血清(CFS)是浙江金华市靖湖犍牛利用研究所研制;³H-脯氨酸购自中国原子能研究院同位素研究所;2500E型

CO₂培养箱(NuAire公司);3550型自动酶联检测仪和LS6500型液态闪烁计数器(Beckman公司)。

2 方法

2.1 CF培养及鉴定:无菌取出生后1~3d的SD大鼠心室,剪碎,1.25g/L胰酶在37℃下分散细胞,每隔5min收集1次细胞,1000r/min×5min×2次,将所得全部细胞置于含100ml/L CF的DMEM培养液中,在50ml/LCO₂、37℃、饱和湿度条件下培养60~90min,采用差速贴壁法,倾去上清液,剩下的细胞即为CF,加入含100ml/L CF的DMEM继续培养。经倒置显微镜、透射电镜、免疫组化纤维黏连蛋白染色阳性和平滑肌肌动蛋白染色阴性鉴定为所需的CF,纯度达98%,台盼蓝染色细胞活力大于97%。生长近融合时按1:3传代,实验采用2~4代细胞。

2.2 CF的胶原合成功能测定:以³H-脯氨酸掺入率反映CF胶原合成功能。取对数生长期CF,2.5g/L胰酶消化,用含100ml/L胎牛血清的DMEM调整细胞密度为 2.5×10^7 个/ml,加入96孔培养板中,每孔加入

200 μ l, 静置培养至细胞接近融合。弃上清, 加入无血清 DMEM, 继续培养 24h, 使细胞维持生长静止状态。分别加入干预试剂。在最后的干预药物加入时, 同时加入³H-脯氨酸 2 μ Ci/ml 和维生素 C 50mg/L, 12h 后吸弃上清液, PBS 轻洗, 再用 2.5g/L 胰蛋白酶消化细胞呈细胞悬液, 多头细胞收集器收集细胞至玻璃纤维滤纸上, 烤干。将玻璃纤维滤纸置于闪烁计数管中, 每管加入闪烁液 0.5ml, 液态闪烁计数仪 (Beckman 公司) 测定放射性。

2.3 实验分组: 1) 空白对照组; 2) 基础状态 10^{-7} mol/L AVP 组; 3) 10^{-7} mol/L AVP + 10mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L DCE 组; 4) 200mg/L DCE 作用不同时间组 (6h, 12h, 24h, 36h, 48h)。

2.4 统计学处理: 所有实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异比较采用 ANOVA 方差分析, 两组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 不同浓度 DCE 对 CF 胶原合成作用的影响: 随着 DCE 刺激浓度的增高, CF 的³H-脯氨酸掺入率呈递减趋势, 其中 50mg/L, 100mg/L, 200mg/L DCE 组明显低于对照组 (592 ± 24.58 cpm/2000 cells), 并有统计学意义; 10mg/L DCE 组虽低于对照组, 但无统计学意义 ($P > 0.05$); 50mg/L DCE 组的 CF 的³H-脯氨酸掺入率高于 10mg/L DCE 组, 但无统计学意义 ($P > 0.05$); 而 200mg/L DCE、100mg/L DCE 组则显著高于 10mg/L DCE 组 ($P < 0.01$)。

3.2 DCE 作用不同时间对 CF 胶原合成作用的影响: 随着 DCE 作用时间的延长, CF 的³H-脯氨酸掺入率逐渐减少, CF 胶原合成功能与 DCE 作用时间呈显著的负相关 ($P < 0.01$)。

4 讨论

中医药抗纤维化是一个很有研究价值和应用前景的领域。研究表明, 中成药丹红注射液具有抑制 AVP 所诱导的心肌间质成纤维细胞胶原合成的作用, 并呈一定的量效时效关系, 实验显示药物的作用亦在一定程度上和一个方面说明心肌肥厚的中医病因存在血瘀因素, 治疗亦重视活血化瘀的治疗手段^[8]。目前, 中西药治疗心肌纤维化临床效果均比较显著, 但是对其机理研究不够系统, 因此进一步研究中西医结合治疗心肌纤维化的作用及其机制将成为防治高血压心肌纤维化的研究亮点和重点。

参考文献

- [1] Karim MA. Quantification of vascular collagen in atherectomy specimens. *Am J Cardiol*, 1997, 8: 1123 - 1128.
- [2] Wayne AO, John M, Bevard M, et al. The subendothelial extracellular matrix modulates NF- κ B activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *J. Cell Biol.*, 2005, 69: 191 - 202.
- [3] 杨学东, 赵连友, 李雪, 等. 精氨酸加压素诱导大鼠心脏成纤维细胞胶原合成的作用. *心脏杂志*, 2000, 12: 169 - 171, 173.
- [4] Orlandi A, Francesconi A, Marcellini M, et al. Role of ageing and coronary atherosclerosis in the development of cardiac fibrosis in the rabbit. *Cardiovasc Res*, 2004, 64(3): 544 - 552.
- [5] Onishi, K Dohi K, Koji T, et al. Candesartan prevents myocardial fibrosis during progression of congestive heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004, 43(6): 860 - 867.
- [6] Misono K, Ogawa H, Qiu Y, et al. ANP receptor structure and signal transduction mechanism: a novel hormone-induced rotation mechanism for transmembrane signaling. *Tanpakushitsu Kakusan, Koso* 2005, 50(9): 1078 - 1087.
- [7] 徐琳, 赵连友, 郑强荪, 等. 辛伐他汀对大鼠心脏成纤维细胞增殖的抑制作用. *第一军医大学学报*, 2001, 21(12): 920 - 922.
- [8] 郭自强, 王頔仁, 朱陵群, 等. 益气活血中药对血管紧张素致培养乳鼠心脏间质成纤维细胞增殖的影响. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2005, 3(7): 605 - 607.

(2008-04-24 收稿)

世界中国际培训部举办 2008 年 中医药特色国际培训班时间表

为提高世界各国中医药人员理论与技术水平 (专业素质), 根据各国会员要求, 国际培训部选择部分培训科目作为 08 年举办的固定国际培训项目, 欢迎世界中国际成员单位及各国中医药人员踊跃报名参加。

中药的安全使用 (WT-8-15): 时间: 12 月 6-7; 地点: 北京

内容与目的: 介绍部分中药饮片及中成药的质量控制, 使用的安全方法与注意事项, 使学员了解在临床治疗时如何正确使用中药, 避免毒副作用的发生, 提高学员临床用药的安全性。

讲师: 林瑞超 (中国药品生物制品检定所教授), 叶祖光 (中国中医科学院研究员)

中医各种特色减肥疗法与针灸戒烟专题讲座 (WT-8-16): 时间: 12 月 19-23; 地点: 珠海

内容与目的: 介绍多种中医药特色减肥、戒烟方法, 如中药、针灸、锻炼、饮食等; 及中医对上述疾病的疗效评价方法, 提高学员临床技能与疗效。

讲师: 王寅 (中国中医科学院广安门医院主任医师), 刘宜群 (金陵科技学院副教授)

五腧穴的临床应用与特种治疗技术高级培训班 (WT-8-17): 时间: 12 月 25-28; 地点: 珠海

内容与目的: 详细讲解五腧穴的特点, 功能主治及在临床医疗中的灵活应用, 教师临床应用五腧穴的经验体会, 丰富学员针灸理论知识, 提高学员针灸应用技能。

讲师: 赵吉平 (北京中医药大学教授)