

- 年学杂志, 2009, 29(16): 2057-2059.
- [12] 陈树清, 周厚明, 孙保国, 等. 补肾方对去卵巢大鼠血清中 PICP、PINP 的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(3): 13-14.
- [13] Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, et al. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation[J]. J Bone Mine Res, 2003, 18: 859-867.
- [14] 马进峰, 王一农, 金锐. 枸杞多糖对骨质疏松大鼠血清 PICP、ICTP 及钙、磷、镁和碱性磷酸酶水平的影响[J]. 郑州大学学报, 2012, 47(2): 247-249.
- [15] Sigrist IM, Gerhardt C, Alini M, et al. The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep[J]. J Bone Miner Metab, 2007, 25(1): 28-35.

(编辑: 宋威)

齐墩果酸对血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌成纤维细胞增殖的影响及其作用机制

冯健¹, 左玉梅², 徐亮³, 钟毅¹, 查克岚¹, 李家富¹, 范忠才¹ (1. 泸州医学院附属医院心内科, 四川泸州 646000; 2. 解放军 77156 部队医院内科, 四川乐山 614000; 3. 河南科技大学第四附属医院, 河南安阳 455000)

摘要: **目的** 研究齐墩果酸(OA)对血管紧张素 II(Ang II)诱导的大鼠心肌成纤维细胞(CFs)增殖的影响, 并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用胰酶消化法及差速贴壁法培养大鼠 CFs, 实验分为空白对照组、Ang II(10^{-6} mol·L⁻¹)组、Ang II(10^{-6} mol·L⁻¹)+OA(60, 80, 100 μ mol·L⁻¹)组。细胞长至融合状态时, 先加入 OA(60, 80, 100 μ mol·L⁻¹)预处理 1 h, 然后加入 Ang II(10^{-6} mol·L⁻¹)作用 24 h。应用二甲基四唑氮蓝(MTT)法测定细胞增殖活性, 酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞上清中 I 型胶原含量, 蛋白质印迹法(Western blotting)和激光扫描共聚焦显微镜分别检测各组 CFs 中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)蛋白表达和活性氧(ROS)变化。**结果** Ang II 能诱导 CFs 增殖, 并能增加细胞上清中 I 型胶原的含量, 同时 CTGF 的蛋白表达及 CFs 中 ROS 水平也显著增加。OA 在 60~100 μ mol·L⁻¹ 浓度范围内呈浓度依赖性抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖, 并且 OA 能减弱 Ang II 诱导的 CTGF 和 ROS 表达。**结论** OA 可通过 ROS-CTGF 途径抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原生成。

关键词: 齐墩果酸; 血管紧张素 II; 心肌成纤维细胞; 活性氧; 结缔组织生长因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0564-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.011

Study of Oleanolic Acid in Inhibiting Rat Cardiac Fibroblasts Proliferation Induced by Angiotensin II Through ROS-CTGF Pathway

FENG Jian¹, ZUO Yumei², XU Liang³, ZHONG Yi¹, ZHA Kelan¹, LI Jiafu¹, FAN Zhongcai¹ (1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000 Sichuan, China; 2. Department of Internal Medicine, No.77156 Military Hospital, Leshan 614000 Sichuan, China; 3. The Fourth Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Anyang 455000 Henan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitive effect of oleanolic acid (OA) on cardiac fibroblasts (CFs) proliferation induced by angiotensin II (Ang II) and to explore the related mechanism. **Methods** Rat CFs were isolated by the methods of digestive enzyme and differential adhesion. When the rat CFs became cell fusion, OA ($60, 80, 100 \mu$ mol·L⁻¹) was added into the medium. One hour later, Ang II (10^{-6} mol·L⁻¹) was added into the medium for co-culture for 24 hours. Cell proliferation was measured by MTT assay. The content of type I collagen in the culture medium was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting method was used to detect the protein level of connective tissue growth factor(CTGF), and cellular reactive oxygen species(ROS) levels were detected by confocal laser scanning microscope. **Results** Ang II significantly induced CFs proliferation, increased

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 冯健, 男, 主治医师, 研究方向: 冠心病及相关疾病的发病机制与防治。Email: 415623fj@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(31300946); 泸州医学院附属医院人才基金(12290); 泸州市科技计划项目(12330)。

the content of type I collagen, elevated CTGF protein expression and ROS levels in CFs. OA at the dose of 60~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ showed inhibitory effect on CFs proliferation induced by Ang II in dose-dependent manner. OA also inhibited the expression levels of CTGF and ROS induced by Ang II. **Conclusion** OA can inhibit the proliferation of CFs induced by Ang II and the formation of collagen through ROS-CTGF pathway.

Keywords: Oleanolic acid; Angiotension II; Cardiac fibroblasts; Reactive oxygen species; Connective tissue growth factor

心肌重构是众多心血管疾病的最终病理过程, 而心肌间质纤维化参与了心肌重构的过程, 心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)的异常增殖是心肌间质纤维化的主要特征, 因此, 有效地抑制 CFs 增殖有助于防治心肌间质纤维化。齐墩果酸(oleanolic acid, OA)是一种从天然植物中提取的五环三萜类化合物, 具有降压、降糖及降血脂等广泛的心血管保护作用。血管紧张素 II(Ang II)是导致心肌纤维化和心肌肥厚的重要活性物质。本研究以体外原代培养的 SD 乳大鼠 CFs 为研究对象, 观察 OA 对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 增殖的影响, 并进一步探讨其抗心肌纤维化的具体机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠, 1~3 d 龄, 雌雄不拘, 清洁级, 由第三军医大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK-(军)-2002007。

1.2 药品与试剂 齐墩果酸, 美国 Sigma 公司, 批号: O5504; 结缔组织生长因子抗体(CTGF 抗体)为小鼠来源的单克隆抗体, 美国 Santa Cruz 公司, 批号: sc-365970; MTT 细胞增殖检测试剂盒(批号: C0009)、ROS 检测试剂盒(批号: S0033), 碧云天生物有限公司, ELISA 试剂盒, 重庆海韵生物技术公司, 批号: BMA-20248。

1.3 大鼠心肌成纤维细胞的原代培养 无菌条件下, 将出生 1~3 d 的 SD 大鼠, 开胸取出心脏, 剪成 1 mm^3 小块后采用差速贴壁法分离培养出 CFs, 并经倒置相差显微镜形态学观察, 免疫组化波形蛋白染色鉴定证实为 CFs, 待细胞生长融合时按 1:3 传代, 3~4 代细胞用于实验。

1.4 药物干预 实验分为空白对照组、Ang II (10^{-6} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、Ang II (10^{-6} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+OA(60, 80, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。细胞长至融合状态时, 先加入 OA (60, 80, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)预处理 1 h, 然后加入 Ang II (10^{-6} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用 24 h。

1.5 MTT 法检测细胞增殖情况 将干预后的细胞置于 96 孔板内, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 在细胞培

养箱内继续孵育 4 h 后, 小心吸掉各孔上清液, 并加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO), 避光振荡 10 min, 使结晶物质充分溶解。在酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度 OD 值, 每组均重复 6 次。

1.6 ELISA 法检测上清液中 I 型胶原的含量 干预 24 h 后收集细胞上清液, 严格参照试剂盒操作说明进行检测。不同浓度的 I 型胶原标准品及各组细胞上清液分别加入包被了抗大鼠 I 型胶原单抗的 96 孔板, 温育 2 h, 洗涤, 加入第 1 抗体工作液及酶标抗体工作液后, 加底物显色, 用酶标仪在 492 nm 处测定 OD 值, 根据绘出的标准曲线, 得到各组中 I 型胶原的含量。每组均重复 6 次。

1.7 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 CTGF 蛋白水平 细胞干预 24 h 后提取各组 CFs 中总蛋白, 蛋白定量绘制标准曲线, 测定样品浓度, 灌制 10% 分离胶, 上样量为 50 μg , 电泳槽电泳, 转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 加入一抗、二抗后用凝胶扫描成像, 并用图像分析软件进行分析。

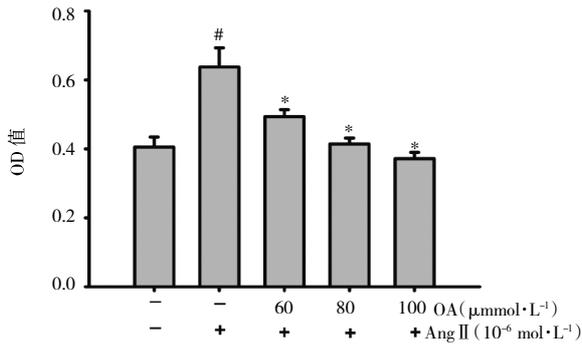
1.8 ROS 的测定 参照试剂盒操作说明进行检测。将各组细胞干预 24 h 后用 PBS 洗涤 2~3 次, 并加入 2 mL 浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 稀释液, 放入孵箱中孵育 20 min, 用不含血清 DMEM 培养基洗涤 3 次, 在激光共聚焦显微镜下, 使用 488 nm 为激发波长, 525 nm 为发射波长观察荧光。每组均重复 6 次。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 软件, 数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 OA 对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 增殖的影响 取 10^{-6} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ang II 干预 CFs 24 h 后, 细胞增殖活性 OD 值明显升高, 与空白对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 不同浓度 OA(60, 80, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预组 CFs 增殖活性被不同程度地抑制, 与 Ang II 组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1。

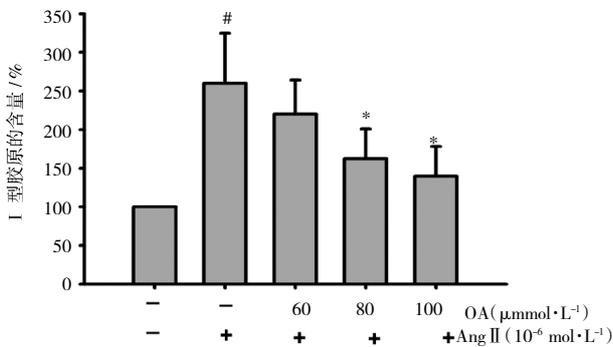
2.2 OA 对 Ang II 诱导的大鼠 CFs I 型胶原含量的影响 与空白对照组比较, Ang II 能显著增加细胞培



注：与空白对照组比较，[#]*P* < 0.05；与 Ang II 组比较，^{*}*P* < 0.05。

图 1 齐墩果酸对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 增殖的影响

Figure 1 Effects of OA on the proliferation of rat cardiac fibroblasts induced by Ang II



注：与空白对照组比较，[#]*P* < 0.05；与 Ang II 组比较，^{*}*P* < 0.05。

图 2 齐墩果酸对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 上清中 I 型胶原含量的影响

Figure 2 Effects of OA on Ang II-induced collagen I in rat cardiac fibroblasts

养上清液中 I 型胶原的蛋白含量 (*P* < 0.05)。预先予 OA 孵育能显著减少细胞上清中 I 型胶原的含量，见图 2。

2.3 OA 对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 中 CTGF 蛋白表达的影响 给予 Ang II 刺激 CFs 后，细胞中 CTGF 表达较空白对照组明显升高 (*P* < 0.05)；在 Ang II 刺激之前，给予 OA 预处理，细胞中 CTGF 蛋白表达较 Ang II 组明显降低 (*P* < 0.05)，见图 3。

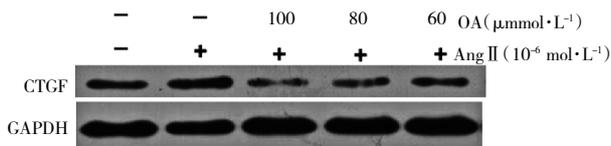
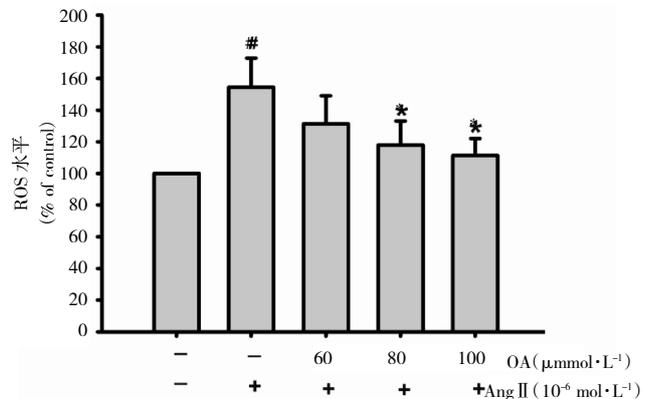


图 3 齐墩果酸对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 中 CTGF 蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of OA on Ang II-induced CTGF in rat cardiac fibroblasts

2.4 OA 对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 中 ROS 的影响

与空白对照组比较，Ang II 组细胞中 ROS 水平明显增高 (*P* < 0.05)；给予 OA 预处理后，CFs 中 ROS 水平较 Ang II 组明显降低 (*P* < 0.05)，见图 4。



注：与空白对照组比较，[#]*P* < 0.05；与 Ang II 组比较，^{*}*P* < 0.05。

图 4 齐墩果酸对 Ang II 诱导的大鼠 CFs 中 ROS 的影响

Figure 4 Effects of OA on Ang II-induced ROS in rat cardiac fibroblasts

3 讨论

近年来的研究表明，心肌间质重构在心衰的发生发展中发挥着重要的作用^[1-2]。CFs 是心肌间质的主要成分，在正常情况下，其分泌胶原维持心脏的构型，调节心肌的收缩与舒张，并参加心肌的损伤修复。心肌胶原的含量是决定心肌顺应性的重要因素，当疾病状态时，CFs 异常增殖并分泌大量胶原，引起心肌僵硬增加及顺应性下降，从而导致心肌间质重构^[3]。既往大量体外研究均显示 Ang II (10⁻⁶ mol·L⁻¹) 能刺激 CFs 增殖、DNA 及胶原蛋白合成增加^[4-5]，因此，本研究采用 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 Ang II 作为干预因素，给 CFs 予 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Ang II 刺激后，细胞增殖活性明显增加。而 CFs 数量增加，会引起细胞外基质的增生和沉积，导致心肌间质纤维化。抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖对改善心肌纤维化具有重要意义^[6-7]。本研究发现，给予 OA 预处理后，Ang II 组 CFs 增殖活性明显降低，且具有浓度依赖性，提示 OA 确实能抑制 Ang II 导致的 CFs 增殖。

CTGF 是心肌成纤维细胞中胶原合成的重要调节因子，它不仅促进心肌成纤维细胞有丝分裂和趋化，而且刺激纤维连接蛋白和胶原的合成。在病理条件下，CTGF 过度表达与多种纤维化疾病的发生有关。CTGF 在心肌纤维化过程中扮演着重要的角色，是一个致纤维化因子，可作为抗心肌纤维化治疗的靶点^[8-9]。既往实验证明^[10]，OA 能明显抑制细胞的增殖和胶原产生，从而改善肝脏纤维化。本实验中，预处理 OA 可明显抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原

产生。由于 CTGF 是刺激胶原合成的重要调节因子，因此，推测 OA 抑制 CFs 增殖及胶原合成的作用可能和 CTGF 有关。进一步实验结果表明^[10]，OA 在抑制 CFs 增殖及胶原合成的同时，CTGF 的蛋白表达水平也是显著下降的。由此可见，OA 抑制 Ang II 诱导的 CFs 增殖和胶原的合成可能是通过下调 CTGF 的表达而实现的。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是有氧过程中产生的氧代谢产物和衍生含氧物的统称。ROS 可作为体内的第二信使上调下游蛋白的表达。国内外研究表明^[11]，过氧化氢、低氧均能显著增加 CTGF 的表达，提示 CTGF 的表达可能受 ROS 的调控。研究发现^[12]，给予人晶状体上皮细胞系 B3 以过氧化氢刺激，CTGF mRNA 是显著增加的。研究表明曲美他嗪通过 NADPH oxidase-ROS-CTGF 途径抑制心肌纤维化^[13]。因此，OA 下调 CTGF 的蛋白表达可能与抑制 CFs 中 ROS 的生成有关。本实验结果显示，OA 在下调 CTGF 蛋白表达的同时，CFs 中 ROS 生成也是显著下降的。这说明，抑制 ROS 的生成是 OA 下调 CTGF 表达的主要机制之一。

综上所述，OA 抑制 Ang II 诱导的大鼠 CFs 增殖，其机制可能与减少 CFs 中 ROS 的生成，从而导致 CTGF 表达减少有关。由于细胞内存在多条与细胞增殖相关的信号途径，且这些信号途径之间也存在复杂的相互作用，因此，OA 在此通路中的具体相关机制还需要进一步研究。

参考文献：

[1] 李健哲, 余术宜. 芍药苷对异丙肾上腺素诱导心肌成纤维细胞增殖和胶原产生的影响及其机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23 (16): 47-52.
 [2] Francis GS. Changing the remodeling process in heart failure: basic mechanisms and laboratory results[J]. Curr Opin Cardiol, 1998, 13

(3): 156-161.
 [3] Law B, Fowlkes V, Goldsmith JG, et al. Diabetes-induced alterations in the extracellular matrix and their impact on myocardial function[J]. Microsc Microanal, 2012, 18(1): 22-34.
 [4] 郑舒展, 冯健, 余琴, 等. Pravastatin 抑制心肌成纤维细胞胶原基因表达及其机制研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(3): 310-312.
 [5] Gu J, Liu X, Wang QX, et al. Angiotensin II increases CTGF expression via MAPKs/TGF-β1/TRAF6 pathway in atrial fibroblasts[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(16): 2105-2115.
 [6] Zhou H, Zhang KX, Li YJ, et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, suppresses high glucose-induced proliferation and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38 (6): 387-394.
 [7] Podgorska M, Kocbuch K, Grden M, et al. Reduced ability to release adenosine by diabetic rat cardiac fibroblasts due to altered expression of nucleoside transporters[J]. J Physiol, 2006, 576(1): 179-189.
 [8] Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, et al. Connective tissue growth factor—a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 36 (3): 393-404.
 [9] Koitabashi N, Arai M, Kogure S, et al. Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis[J]. Hypertension, 2007, 49(5): 1120-1127.
 [10] Shyu MH, Kao TC, Yen GC. Hsian-tsoo(Mesona procumbens Heml) prevents against rat liver fibrosis induced by CCl(4) via inhibition of hepatic stellate cells activation[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46 (12): 3707-3713.
 [11] Eguchi D, Ikenaga N, Ohuchida K, et al. Hypoxia enhances the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells via increased secretion of connective tissue growth factor[J]. J Surg Res, 2013, 181(2): 225-233.
 [12] Park SK, Kim J, Seomun Y, et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284 (4): 966-971.
 [13] Liu X, Gai Y, Liu F, et al. Trimetazidine inhibits pressure overload-induced cardiac fibrosis through NADPH oxidase-ROS-CTGF pathway[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(1): 150-158.

(编辑：宋威)

百合、知母总皂苷对大鼠肠易激综合征的治疗作用

陈丹¹, 高英², 李卫民¹ (1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学新药研究与开发中心, 广东 广州 510006)

摘要：目的 从脑-肠互动的角度，探讨百合总皂苷、知母总皂苷、百合知母总皂苷治疗肠易激综合征

收稿日期：2014-04-30

作者简介：陈丹，女，硕士研究生，研究方向：中药新药研究与开发。Email: chy1208@163.com。通讯作者：李卫民，教授，研究方向：中药新药研究与开发。Email: liweimin@gzucm.edu.cn。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(81273897)。