

益心泰含药血浆对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞增殖、凋亡的影响及机制研究

杨金伟, 郭志华, 李雅, 张彤瑜, 邓奕辉(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 探讨益心泰含药血浆对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的心肌成纤维细胞(CFs)增殖、凋亡的影响及相关机制。**方法** 将分化完全的 CFs 随机分为空白血浆组、模型组、益心泰含药血浆组, 每组 6 个复孔。除空白血浆组外, 其余各组以 Ang II (10^{-7} mol·L⁻¹) 诱导构建细胞增殖及纤维化模型。空白血浆组及模型组以 15% 空白血浆培养, 益心泰含药血浆组以 15% 益心泰含药血浆培养, 干预 24 h。采用 CCK-8 法检测 CFs 细胞增殖情况; ELISA 法测定细胞中 I 型胶原(Collagen I)、III 型胶原(Collagen III)及转化生长因子(TGF- β 1)含量; 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期; Western Blot 法检测细胞中 TGF- β 1、B 细胞白血病/淋巴瘤-2(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的蛋白表达水平; RT-qPCR 法检测 CFs 的增殖细胞核抗原(PCNA)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、Collagen I/III mRNA 表达水平。**结果** 15% 益心泰含药血浆对 CFs 无明显的促细胞增殖或抑制作用。与空白血浆组比较, 模型组细胞 G0/G1 期的细胞百分率明显降低($P < 0.01$), S 期和 G2/M 期的细胞百分率明显升高($P < 0.01$); 细胞凋亡率有所下降, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); I/III 型胶原含量及 TGF- β 1 水平均显著升高($P < 0.01$); TGF- β 1、Bcl-2 蛋白表达明显上调($P < 0.01$), Bax 蛋白表达明显下调($P < 0.01$); PCNA、 α -SMA、Collagen I/III mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 益心泰含药血浆组细胞的 G0/G1 期细胞百分率明显升高($P < 0.01$), S 期和 G2/M 期的细胞百分率明显降低($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$); I、III 型胶原含量及 TGF- β 1 水平明显降低($P < 0.01$); TGF- β 1、Bcl-2 蛋白表达明显下调($P < 0.01$), Bax 蛋白表达明显上调($P < 0.01$); PCNA、 α -SMA、Collagen I/III mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.01$)。**结论** 益心泰含药血浆能够抑制 CFs 细胞增殖分化及纤维化, 可能与其调控 Bax/Bcl-2 平衡及下调纤维化相关因子表达有关。

关键词: 益心泰含药血浆; 心肌成纤维细胞; 血管紧张素 II; 细胞增殖; 细胞凋亡; TGF- β 1; Bax/Bcl-2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1245-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.003

Mechanism of *Yixintai* Medicated Plasma on Proliferation and Apoptosis of Cardiac Fibroblasts Induced by Angiotension II

YANG Jinwei, GUO Zhihua, LI Ya, ZHANG Tongyu, DENG Yihui (Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208 Hunan, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *Yixintai* medicated plasma on Angiotension II (Ang II)-induced proliferation and apoptosis of Cardiac fibroblasts (CFs). **Methods** CF cells were pretreatment with Ang II (10^{-7} mol·L⁻¹) to establish an experimental model for proliferation, which were randomly divided into 3 groups: blank plasma group, model group and *Yixintai* medicated plasma group, 6 replicates in each group. The blank

收稿日期: 2021-04-29

作者简介: 杨金伟, 男, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合防治内分泌疾病。Email: ykingjay@126.com。通信作者: 邓奕辉, 女, 博士, 教授, 研究方向: 中西医结合防治内分泌疾病。Email: 644138330@qq.com。李雅, 女, 副教授, 博士, 研究方向: 中药复方作用机理及中药超微粉体研究。Email: 350085259@qq.com。

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目(2020002, 201516); 湖南省“国内一流建设学科”中医学开放基金项目(2018ZYX44); 湖南省研究生科研创新项目(CX2018B471)。

plasma group and model group were cultured with 15% blank plasma, and the *Yixintai* medicated plasma groups was cultured with 15% drug containing plasma, for 24 h respectively. The proliferation of CFs were detected by CCK-8 assay. ELISA was used to detect levels of Collagen type I (Collagen I), Collagen type III (Collagen III) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). The cell cycle and apoptosis were determined using flow cytometry. The expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax) and TGF- β 1 were detected by Western Blot. RT-qPCR was used to examine the gene transcript levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), α -smooth muscle actin (α -SMA), Collagen I and Collagen III. **Results** 15% *Yixintai* medicated plasma showed no inhibition of cells. Compared with the blank plasma group, the results of flow cytometry demonstrated that Ang II induced G0/G1 phase block and increased S and G2/M phase, which delayed cell cycle progression in model group ($P < 0.01$); the apoptosis rate decreased with no statistically significance ($P > 0.05$); the contents of Collagen I, Collagen III and TGF- β 1 were significantly increased ($P < 0.01$); the expression of Bcl-2 and TGF- β 1 increased obviously, while the expression of Bax decreased ($P < 0.01$); the mRNA expression levels of PCNA, α -SMA, Collagen I and Collagen III were significantly up regulated in model group ($P < 0.01$). Compared with model group, *Yixintai* medicated plasma could apparently arrested cells in G0/G1 and decreased those in S and G2/M phase ($P < 0.01$); the apoptosis rate and Collagen I, Collagen III, TGF- β 1 level reduced ($P < 0.01$). *Yixintai* medicated plasma can significantly restrain the expression of Bcl-2 and TGF- β 1 ($P < 0.01$); meanwhile, Bax expression and apoptosis rate were obviously increased ($P < 0.01$); the mRNA expression of PCNA, α -SMA, Collagen I and Collagen III significantly decreased after *Yixintai* medicated plasma interference ($P < 0.01$). **Conclusion** *Yixintai* medicated plasma can suppress the proliferation and fibrosis process of CFs, and its mechanism may be associated with regulating the balance of Bax/Bcl-2 and down-regulating fibrogenic cytokine expression.

Keywords: *Yixintai* medicated plasma; cardiac fibroblasts; Angiotension II; proliferation; apoptosis; transforming growth factor- β 1; Bax/Bcl-2

慢性心力衰竭(CHF)是由于心脏的收缩功能和/或舒张功能障碍,导致静脉系统血液淤积,动脉系统血液灌注不足,从而引起心脏循环障碍症候群,具有较高的致残率及死亡率^[1]。心室重构是CHF发生发展的关键病理机制,存在心肌细胞肥大、心肌成纤维细胞(CFs)增生及心肌纤维化(MF)等病理特征^[2]。CFs约占心脏组织的60%~70%,可分泌各种生长因子,通过细胞间的相互作用,直接影响心脏的结构、机械力、生化及电生理特性,对维持心脏结构与正常功能具有重要作用^[3]。在各种病理因素作用下,CFs增殖活化和以I、III型胶原蛋白为主的细胞外基质过度沉积、排列紊乱为主的MF过程可诱导心功能紊乱^[4-5]。因此,抑制CFs增殖与分化,防治和逆转MF在心血管系统疾病治疗中具有重要意义。本课题组前期临床研究^[6]表明,益心泰具有“益气活血利水”的功效,可有效改善CHF患者的心功能、降低死亡率,其作用效应可能与减少细胞外基质及调节心室重塑相关,但具体机制尚不明确。故本研究

拟通过应用益心泰含药血浆干预血管紧张素II(Ang II)诱导的CFs过度增殖,从细胞学角度探讨益心泰调控CFs的增殖与凋亡从而发挥其防治MF的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物 8周龄SD雄性大鼠20只,SPF级,体质量(200±20)g,生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002,质量合格证号:43004700029165,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。雄性新西兰大耳兔5只,普通级,体质量(2.0±0.2)kg,生产许可证号:SCXK(湘)2015-0004,质量合格证号:43608300000615,购于湖南太平生物科技有限公司。

1.2 药物及试剂 益心泰颗粒,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。制备方法:将黄芪、红花、丹参、泽泻、猪苓、葶苈子按照3:1:1:2:1:1的比例配伍;加水提取2次,一煎加8倍量水提取1.5 h,二煎加6倍量水提取1 h;合并2次提取液,

过滤, 浓缩, 微波真空干燥制成干浸膏; 粉碎成粒, 加适量糊精, 制成颗粒剂后, 60 °C 下干燥整粒成品。置于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

胎牛血清(FBS, 批号: 42F0266K)、胰蛋白酶-EDTA 消化液(批号: 2120539), 均购自美国 Gibco 公司; 高糖 DMEM 培养基(批号: AF29422282)、PBS 缓冲液(批号: AD17792273), 均购自美国 Hyclone 公司; CCK-8 检测试剂盒, 北京博奥森生物技术有限公司, 批号: AI07246697; 4%多聚甲醛, 武汉博士德生物工程有限公司, 批号: 13108A79; 无血清细胞冻存液, 苏州新赛美生物科技有限公司, 批号: 18061073; Ang II, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20180613; Alexa Fluor® 488 标记山羊抗兔 IgG 二抗(批号: 60008-1-Ig)、 β -actin 抗体(批号: 66009-1-Ig), 均购自美国 Proteintech 公司; 一抗转化生长因子 β 1 (TGF- β 1, 批号: ab92486)、B 细胞白血病/淋巴瘤-2 (Bcl-2, 批号: ab182858)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax, 批号: ab32503) 抗体, 均购自英国 Abcam 公司; I 型胶原(Collagen I, 批号: ml027936)、III 型胶原(Collagen III, 批号: ml027786) 及 TGF- β 1(批号: ml028093) ELISA 试剂盒, 均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 SW-CJ-2G 型超净工作台、PIKO REAL96 型荧光定量 PCR 仪、SPL 0960 型荧光 PCR 板, 美国 Thermo Scientific 公司; CCL-170T-8 型 CO₂ 培养箱, 新加坡 ESCO 公司; TGL-18R 型台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; ELx800 型酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; DY CZ-40A 型转膜仪、DY CZ-24EN 型电泳槽, 北京六一生物科技有限公司; XB-K-25 型细胞计数板, 上海求精生化试剂仪器有限公司。

1.4 CFs 原代细胞提取 无菌剖取普通级新西兰兔心室, 剪碎; 加入适量 1 g·L⁻¹ 的 I 型胶原酶, 在 37 °C 下用磁力搅拌器搅拌, 辅助分离细胞, 每隔 5 min 收集细胞 1 次; 细胞悬液以离心半径 15 cm、800 r·min⁻¹ 离心 10 min, 将沉淀的细胞重悬于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中; 通过 200 目无菌不锈钢滤网过滤至培养皿中, 在 5% CO₂、37 °C 饱和湿度条件下培养 60 min; 采用差速贴壁法, 倾去上清液, 余下的细胞即为 CFs, 加入含 10% FBS 的 DMEM 继续培养。在倒置显微镜下观察到培养的细胞呈梭形, 无自主搏动; 波形蛋白染色阳性, 纤连蛋白染色阳性, 上述特征与 CFs 一致。待 CFs 生长近融合时按 1:3 传

代, 实验采用 2~4 代细胞。

1.5 含药血浆的制备 将 20 只 SD 大鼠按照体质量随机分成 2 组: 空白血浆组、益心泰组, 每组 10 只。益心泰组药物浓度为 0.26 g·mL⁻¹, 灌胃给药剂量为 2.6 g·kg⁻¹ (按照临床等效剂量折算), 给药体积为 10 mL·kg⁻¹; 空白血浆组采用等容量的灭菌超纯水灌胃, 每日 1 次, 连续 5 d。末次灌胃 1 h 后, 以 10% 水合氯醛 (3 mL·kg⁻¹) 麻醉大鼠, 腹主动脉取血; 用含肝素抗凝管收集血液, 静置 3 h 后, 以离心半径 15 cm、3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min; 用移液枪取上层血浆, 0.22 μ m 滤膜过滤, 56 °C 恒温水浴锅灭活 30 min; 将灭活的血浆分装至无菌 EP 管中并标记, 置于 -80 °C 保存。

1.6 细胞培养及处理 将分化完全的 CFs 以含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基进行培养, 置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱, 2~3 d 换液 1 次, 融合至 80% 进行传代, 取对数生长期细胞进行实验。以含 10% FBS 的 DMEM 培养液将 CFs 制备成 5×10⁴·mL⁻¹ 的细胞悬液, 以每孔 1 mL 接种于 12 孔板中; 待细胞贴壁生长至 90% 左右, 用无血清的 DMEM 培养基同步化 24 h。实验分组: 空白血浆组 (15% 空白血浆)、模型组 (Ang II 10⁻⁷ mol·L⁻¹+15% 空白血浆)、益心泰含药血浆组 (Ang II 10⁻⁷ mol·L⁻¹+15% 益心泰含药血浆), 置于细胞培养箱中干预 24 h。

1.7 CCK-8 法检测细胞的增殖情况 待 CFs 生长融合至 80% 左右, 以 1~1.5 mL EDTA-胰酶消化后, 加入 10% FBS 的 DMEM 完全培养液重悬细胞; 然后以 5×10³·mL⁻¹ 细胞密度接种至 96 孔培养板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中; 用预冷的培养液将细胞同步化处理, 分别加入稀释后的胎牛血清 (正常对照组)、空白血浆及含药血浆, 每组设置 5%、10%、15%、20%、25% 的梯度浓度, 均设 6 个复孔。待分别干预处理 24 h 后, 吸弃上清, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L 及完全培养基 90 μ L; 孵育 1.5 h 后, 用酶标仪在 450 nm 波长下检测各组细胞的光密度 (OD) 值。

1.8 ELISA 法检测 Collagen I、Collagen III 及 TGF- β 1 的含量 将 CFs 以 5×10³·mL⁻¹ 细胞密度接种至 96 孔板中, 按照 “1.6” 项下实验分组干预 24 h 后, 以离心半径 15 cm、1 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 除去杂质及细胞碎片, 取上清液检测。按试剂盒说明书操作, 在酶标仪 450 nm 波长下测量吸光度值, 计算细胞上清液中 Collagen I、Collagen III 及 TGF- β 1 的含量。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期 不同组别 CFs 在药物干预处理 24 h 后, 用胰酶消化细胞, 无菌 PBS 清洗 1 次; 将细胞重悬于 300 μ L 结合缓冲液, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 10 μ L 碘化丙啶染色液(PI), 混匀, 常温避光孵育 20 min。另设未染色管、Annexin V-FITC 单染管及 PI 单染管, 用于调零及作为基准对照。于流式细胞仪上分析检测细胞凋亡率, 实验重复 3 次。

同上收集细胞, 以离心半径 15 cm、1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清; 加入 75%乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下固定 6 h, 弃上清; 以 1 mL PBS 洗涤 1 次, 加入 400 μ L PI、100 μ L RNase A, 避光孵育 30 min; 采用流式细胞仪上机检测, 并用 ModFit LT 软件分析细胞周期。

1.10 Western Blot 法检测细胞中 TGF- β 1、Bax、Bcl-2 蛋白表达 CFs 以 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞密度接种于 6 孔板中, 细胞培养 24 h 后, 不同实验组进行药物干预; 细胞培养 24 h 后, 弃去培养上清液, 用 PBS 洗涤 2 次; 加入适量 RIPA 裂解液重悬, 低温下匀浆后将样品转移至 1.5 mL 离心管中; 以离心半径 10 cm、12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后, 取上清液分装。采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。取 120 μg 蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上; 用含 1%牛血清白蛋白及 5%脱脂牛奶的封闭液室温下封闭 1 h 后, 加入兔抗人 TGF- β 1(1 : 600)、Bax(1 : 1 000)、Bcl-2(1 : 750)、 β -actin(1 : 5 000)抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(1 : 6 000), 室温下孵育 1 h; 在 ECL 显色液中 1 min 显影, 冲洗胶片、扫描。采用 Images-Pro Plus 6.0 软件读取条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 对目的蛋白进行半定量分析。

1.11 RT-qPCR 法测定 CFs 增殖细胞核抗原(PCNA)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达 细胞接种、干预处理同“1.10”项下。于 6 孔板中加入 1 mL Trizol, 吹打混匀后室温下裂解 5 min; 加入 200 μ L 三氯甲烷, 剧烈振荡 15 s, 室温下静置 3 min; 以离心半径 10 cm、12 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 取上层液相, 转移至新的 RNase-Free 离心管中; 加入等体积异丙醇, 混匀, 经过 75%乙醇洗涤沉淀后, 以紫外分光光度计测定 RNA 含量和纯度。逆转录成 cDNA 后, 进行 PCR 扩增反应, 反应体系为 30 μ L, 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 退火/延伸

60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 共 40 个循环。通过各目的基因片段的扩增曲线确定 Ct 值; 以 GAPDH 为内参基因, 采用相对定量法计算各组 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值, 比较目的基因的表达水平差异。引物合成由上海生工生物工程公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

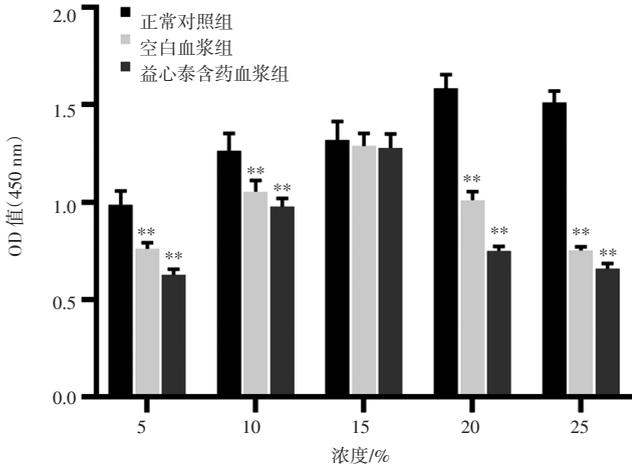
基因	引物序列	产物长度/bp
PCNA	Forward primer: 5'-GGAGGGAGGAAGTGGACTGGCTC-3'	149
	Reverse primer: 5'-CCAGCCAAGGTTGTGAGTTGCA-3'	
α -SMA	Forward primer: 5'-TGGTATTGTGCTGGACTCTG-3'	288
	Reverse primer: 5'-CCATCAGGCAGTTCGTAG-3'	
Collagen I	Forward primer: 5'-CCACAACCAGTACAAGTTCG-3'	190
	Reverse primer: 5'-CTGGATGATCAGCAAGGAGT-3'	
Collagen III	Forward primer: 5'-AACTACTGCTTCAGTCCAC-3'	250
	Reverse primer: 5'-GTAACACGATGGCGAGTGGC-3'	
GAPDH	Forward primer: 5'-GTCCTCCGAGACACGATGCTGAAGGT-3'	199
	Reverse primer: 5'-TTCTCAGCCTTGACCGTCCG-3'	

1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 SNK- q 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益心泰含药血浆对 CFs 增殖的影响 结果见图 1。与正常对照组比较, 益心泰含药血浆及空白血浆浓度为 5%、10%、20%、25% 时, CFs 的增殖受到明显抑制, 各组 OD 值均明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 益心泰含药血浆及空白血浆浓度为 15% 时, 各组 OD 值均无明显变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明, 15% 益心泰含药血浆对 CFs 无明显的促细胞增殖或抑制作用, 故作为后续实验的含药血浆干预浓度。

2.2 益心泰含药血浆对 Ang II 诱导的 CFs 中 TGF- β 1 及 I、III 型胶原含量的影响 结果见图 2。与空白血浆组比较, 模型组 CFs 经 Ang II 诱导后细胞中的 I、III 型胶原含量及 TGF- β 1 水平均显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, 益心泰含药血浆组 CFs 中的 I、III 型胶原含量及 TGF- β 1 水平明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明, 益心泰含药血浆处理后可缓解 Ang II 诱导 CFs 的心肌胶原沉积及纤维化过程。



注：与正常对照组比较，** $P < 0.01$

图 1 益心泰含药血浆对心肌成纤维细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

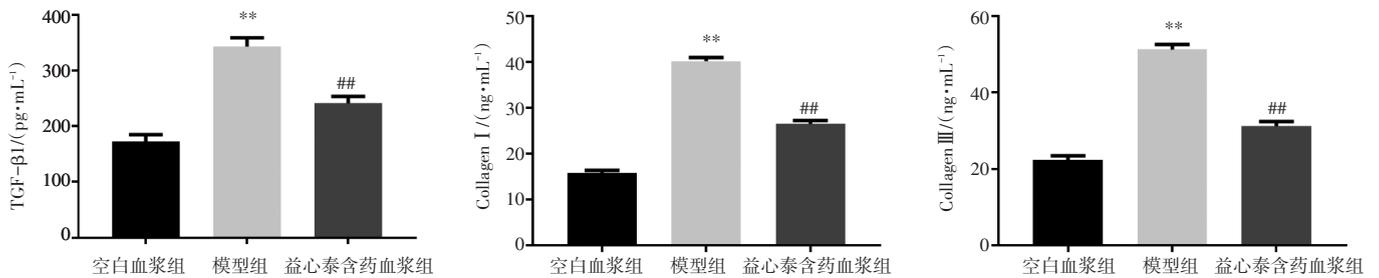
Figure 1 Effects of Yixintai medicated plasma on the proliferation of cardiac fibroblasts($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.3 益心泰含药血浆对 Ang II 诱导的 CFs 细胞凋亡的影响 结果见图 3。与空白血浆组比较，模型组 CFs 在 Ang II 诱导后细胞凋亡率有所下降，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较，益心泰含药血浆

组 CFs 的细胞凋亡率明显升高，差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明，益心泰含药血浆能明显抑制 Ang II 诱导的 CFs 细胞增殖状态。

2.4 益心泰含药血浆对 Ang II 诱导的 CFs 细胞周期的影响 结果见图 4。与空白血浆组比较，模型组细胞 G0/G1 期的细胞百分率明显降低，S 期和 G2/M 期的细胞百分率明显升高，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，益心泰含药血浆组细胞的 G0/G1 期细胞百分率明显升高，S 期和 G2/M 期的细胞百分率明显降低，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明，Ang II 能够促进 CFs 进入细胞增殖周期的过程，而益心泰含药血浆干预后能将 CFs 的细胞周期阻滞在 G0/G1 期。

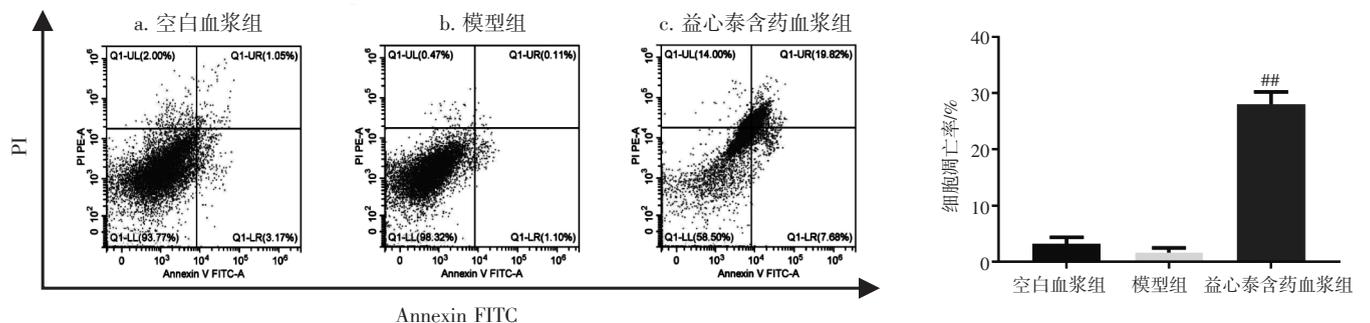
2.5 益心泰含药血浆对 Ang II 诱导的 CFs 中 TGF- β 1、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响 结果见图 5。与空白血浆组比较，模型组 CFs 中的 TGF- β 1、Bcl-2 蛋白表达明显上调，而 Bax 蛋白表达明显下调，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，益心泰含药血浆组 CFs 中的 TGF- β 1、Bcl-2 蛋白表达明显下调，同时 Bax 蛋白表达明显上调，差异均有统计学



注：与空白血浆组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图 2 益心泰含药血浆对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞中 TGF- β 1 及 I、III 型胶原含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

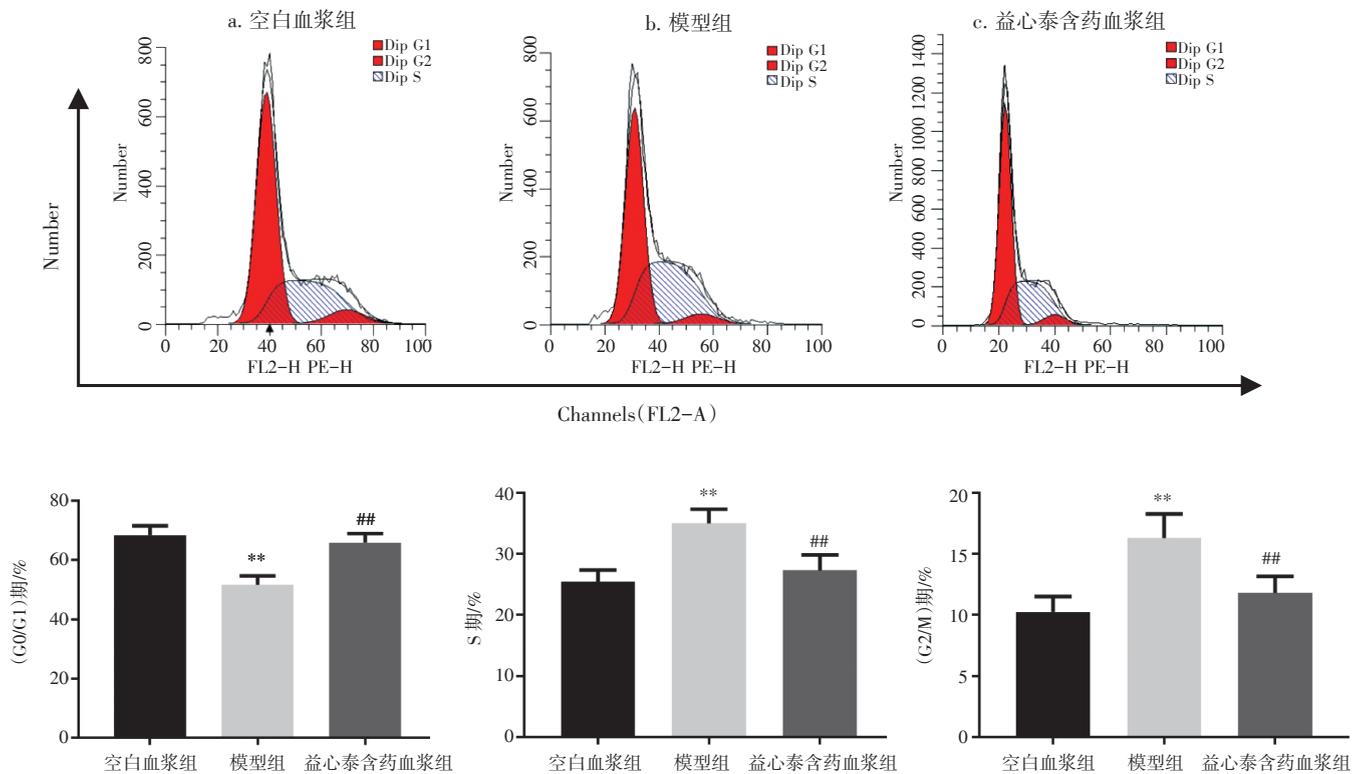
Figure 2 Effect of Yixintai medicated plasma on level of TGF- β 1, type I and III collagen in cardiac fibroblasts cells induced by Ang II ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注：与模型组比较，## $P < 0.01$

图 3 益心泰含药血浆对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

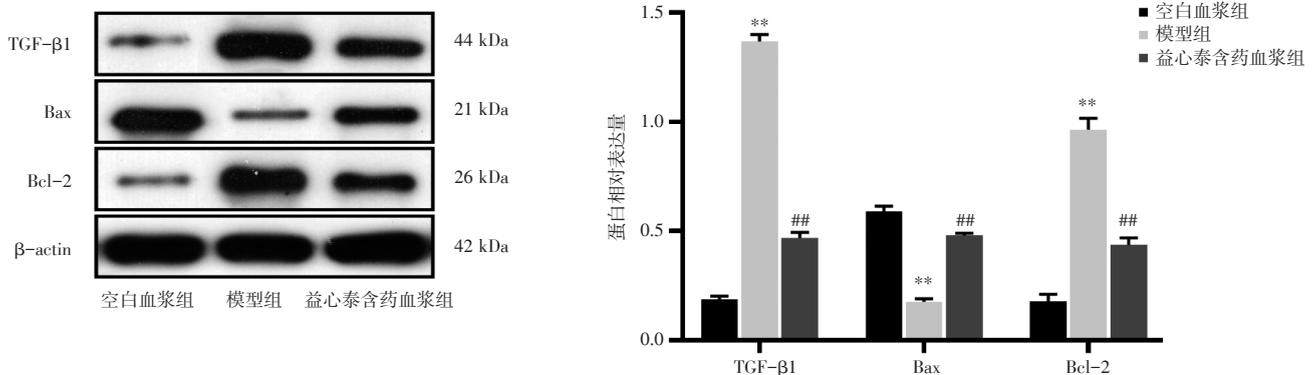
Figure 3 Effect of Yixintai medicated plasma on the apoptosis of cardiac fibroblasts induced by Ang II ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注：与空白血浆组比较，***P* < 0.01；与模型组比较，##*P* < 0.01

图4 益心泰含药血浆对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 4 Effect of Yixintai medicated plasma on cell cycle of cardiac fibroblasts induced by Ang II ($\bar{x} \pm s, n=6$)



注：与空白血浆组比较，***P* < 0.01；与模型组比较，##*P* < 0.01

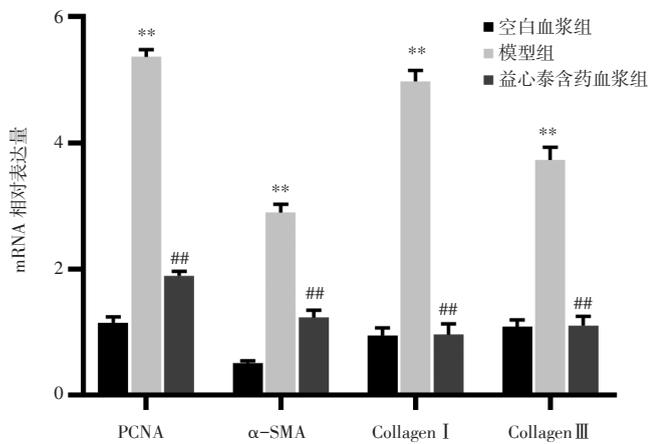
图5 益心泰含药血浆对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞中 TGF-β1、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 5 Effect of Yixintai medicated plasma on expression of TGF-β1, Bax and Bcl-2 in cardiac fibroblasts induced by Ang II ($\bar{x} \pm s, n=6$)

意义(*P* < 0.01)。结果表明，益心泰含药血浆干预可抑制 Ang II 诱导的 CFs 中 TGF-β1、Bcl-2 蛋白表达水平，增强 Bax 蛋白表达水平，从而逆转 Ang II 诱导 CFs 增殖的进程。

2.6 益心泰含药血浆对 Ang II 诱导的 CFs 中 PCNA、α-SMA、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达的影响 结果见图 6。与空白血浆组比较，模型组细胞的 PCNA、α-SMA、Collagen I、Collagen III mRNA

表达水平均明显升高，差异均有统计学意义(*P* < 0.01)。与模型组比较，益心泰含药血浆组细胞的 PCNA、α-SMA、Collagen I、Collagen III mRNA 表达水平均明显降低，差异均有统计学意义(*P* < 0.01)。结果表明，益心泰含药血浆可下调 Ang II 诱导的 CFs 中 PCNA、α-SMA、Collagen I、Collagen III mRNA 的表达水平，抑制 CFs 细胞增殖分化及纤维化。



注：与空白血浆组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图 6 益心泰含药血浆对血管紧张素 II 诱导的心肌成纤维细胞 PCNA、 α -SMA、Collagen I、Collagen III mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 6 Effect of Yixintai medicated plasma on expression of PCNA, α -SMA, Collagen I and Collagen III mRNA in cardiac fibroblasts induced by Ang II ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

慢性心力衰竭(CHF)是心血管疾病发展的终末阶段，其病理过程中心肌成纤维细胞(CFs)的异常增殖及心肌纤维化(MF)状态与心室重构密切相关。CFs 细胞增殖活化和细胞外基质(ECM)的过度沉积是 MF 最主要的 2 个特征^[7]。CFs 是心脏最主要的细胞，可促进 ECM 主要成分(尤其是 I、III 型胶原蛋白)的合成。正常状态下，I、III 型胶原蛋白常维持在合适的比例，以确保心肌组织结构的完整性和心脏功能的协调性，在维持心肌细胞排列、保持心室壁强度等方面具有重要作用。然而，CFs 细胞在氧化应激、压力负荷过度、神经体液因子异常刺激等情况时，会发生 ECM 合成与降解失衡的病理状态，介导 I、III 型胶原蛋白的分泌失代偿^[8]。另一方面，致纤因子 TGF- β 1 释放增多，可诱导 CFs 细胞增殖、胶原分泌及肌成纤维细胞的转化。通过 TGF- β 1/Samd 独立信号通路或 TGF- β 1/MAPK 等其他辅助信号通路对基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制物(MMPs/TIMPs)进行调节，下调蛋白水解酶的活性，减少胶原的降解，使 ECM 不断沉积而引起 MF^[9-10]。同时，增殖细胞核抗原(PCNA)在细胞增殖过程中呈周期性表达，是细胞增殖的常用标记物。研究表明，PCNA 在 MF 的发生发展及预后预测中具有重要作用^[11]。

α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)作为一种参与细胞收缩和应力纤维形成的细胞迁移及收缩丝状蛋白，其表达上调反映了肌成纤维细胞(MFs)分化程度，可增强 MFs 的收缩活性^[12]。CFs 细胞增殖可转化为 MFs，而活化的 MFs 则是引起 MF 的根本原因，进而破坏心脏的正常结构，干扰心脏的机械运动和电传导^[13-14]。

细胞的凋亡与增殖共同调节细胞群体的自我更新和内环境稳态^[15]，正常凋亡代谢途径的失活可促进纤维化疾病的进展。CFs 细胞凋亡程序减弱及抗凋亡机制异常是 MF 进一步发展的主因^[16]。早期 MF 存在增殖和凋亡的状态平衡，尚可代偿性维护心功能，而随着病程进展，增殖强于凋亡进程，合成的 ECM 高于机体耐受水平，从而引起心功能严重受损^[7]。在调控细胞凋亡的基因中，Bcl-2 家族作为重要的线粒体介导的凋亡调控基因，存在抗凋亡的 Bcl-2 及促进凋亡的 Bax 两种关键蛋白，主要通过靶向定位线粒体膜上的位点来调控细胞凋亡^[18]。在炎症反应及氧化应激持续刺激下，活性氧的过度蓄积可破坏线粒体膜，并伴随细胞色素 C 的释放，进而引起细胞凋亡^[19]。促凋亡的 Bax 主要通过 Bcl-2 的解离作用和降低线粒体膜的通透性来促进细胞凋亡。Bax 在蛋白酶的作用下被激活并发生构象变化，从细胞浆移位到线粒体外膜上，与 Bcl-2 结合，使 Bcl-2 抗凋亡效应失活，促使细胞器功能丧失和各种促凋亡因子的释放，并经过信号转导途径的级联放大，最终导致细胞凋亡。所以，Bcl-2 家族蛋白表达调控可能参与了 CFs 在 MF 过程中的凋亡。

益心泰处方中重用黄芪为君药，补脏腑气之不足；配以丹参、红花活血化瘀，行血中之滞为臣药，共奏益气活血利水化瘀之功；佐以泽泻、猪苓加强利水消肿的作用。全方以补气、活血、利水为主，通过益气、活血达到扶正补虚、活血利水的目的。本课题前期研究表明，益心泰颗粒可以改善 CHF 模型兔的心肌重构，降低血清脑钠肽(BNP)，提高心功能^[20]；同时，还可以降低 CHF 模型兔血清中血管紧张素 II(Ang II)、醛固酮含量，通过抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)过度激活，降低水钠潴留，从而改善 CHF^[21]。通过网络药理学分析^[22]发现，益心泰可能通过炎症、凋亡相关通路调节细胞增殖、分化及免疫等生物学过程，发挥治疗心

力衰竭的作用。现代药理学研究表明, 黄芪甲苷通过抑制 TGF- β /Smads 通路, 可降低下游结缔组织生长因子(CTGF)、连接蛋白(FN)的表达, 从而抑制 CFs 细胞异常增殖^[23]; 丹参酮 II A 通过激活转录因子 NF-E2 相关因子 2(Nrf2), 发挥抗氧化效应, 抑制纤维化过程, 减少外周血单核/巨噬细胞趋化蛋白 1 的含量, 下调半乳糖凝集素 3 的表达, 从而干预 CFs 细胞凋亡途径^[24]; 西红花酸通过调节 MMP/TIMPs 比值, 降低 TGF- β 1 的表达, 调控细胞凋亡基因半胱天冬酶-3(Caspase-3)表达, 影响胶原合成及细胞凋亡过程^[25]。黄芪甲苷、丹参酮 II A 及西红花酸均是益心泰的主要活性成分。

本研究以 Ang II 作为 CFs 细胞增殖活化的诱导剂, 通过 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率, 以筛选实验最佳含药血浆干预浓度。结果在 15% 益心泰含药血浆的干预浓度下, 可以有效抑制 CFs 细胞增殖活化, 且对细胞不产生毒性作用。通过对 CFs 细胞周期及凋亡率的检测发现, 在益心泰含药血浆干预后, G0/G1 期细胞百分率明显增高, S 期、G2/M 期细胞百分率下降, 细胞凋亡率增高, 提示益心泰可以阻滞 AngII 诱导的 CFs 细胞增殖周期。通过 Western Blot 法检测了 CFs 中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及纤维化因子 TGF- β 1 的表达情况。与空白血浆组比较, Ang II 诱导的模型组 CFs 细胞中 Bax 表达明显下调, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 及 TGF- β 1 表达明显上调, 反映了 Ang II 抑制 CFs 细胞凋亡, 促进细胞增殖活化及纤维化过程。而益心泰含药血浆干预后, CFs 细胞的 Bcl-2、TGF- β 1 蛋白表达下调, Bax 蛋白表达明显上调, 提示益心泰含药血浆抑制 CFs 细胞过度增殖的病理状态可能与其上调 Bax 和下调 Bcl-2、TGF- β 1 表达有关。本研究结果还显示, 益心泰含药血浆可有效抑制 Ang II 诱导的 CFs 细胞中的 I、III 型胶原及 TGF- β 1 含量, 降低胶原沉积及纤维化进展。同时, RT-qPCR 分析结果进一步表明, 益心泰含药血浆可能通过在转录和翻译水平上抑制 CFs 细胞 PCNA、 α -SMA、Collagen I/III mRNA 表达, 从而发挥其抗 MF 的作用。

综上所述, 益心泰含药血浆可显著提高 Ang II 诱导的 CFs 的细胞凋亡率及 G0/G1 期细胞比例, 通过调控细胞促凋亡蛋白 Bax 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的协调

平衡, 阻断 CFs 细胞增殖活化的持续过程, 从而保护细胞正常功能状态。同时, 可能通过下调 PCNA、 α -SMA、Collagen I/III mRNA 表达, 抑制胶原蛋白的沉积, 降低纤维化因子 TGF- β 1 的释放与表达, 从而保护 CFs 正常形态, 调节心肌重构及细胞外基质降解过程, 发挥抗 CHF 的作用。

参考文献:

- [1] TAYLOR C J, MOORE J, O'FLYNN N. Diagnosis and management of chronic heart failure: NICE guideline update 2018[J]. *British Journal of General Practice*, 2019, 69(682): 265-266.
- [2] AAZT M, WOEHRLE H, OLENBURG O, et al. Prevalence and predictors of sleep-disordered breathing in patients with stable chronic heart failure: the schlaf registry[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2016, 4(2): 116-125.
- [3] HODGES M M, ZGHEIB C, XU J, et al. Interleukin-10 (IL-10) induces differential myofibroblast activation in adult and fetal cardiac fibroblasts mediated by upregulation of transforming growth factor beta-1 (TGF β 1)[J]. *Journal of the American College of Surgeons*, 2017, 225(4): 31-39.
- [4] VALBLASCO A, PRIETO P, GONZALEZ-RAMOS S, et al. NOD1 activation in cardiac fibroblasts induces myocardial fibrosis in a murine model of type 2 diabetes[J]. *Biochemical Journal*, 2017, 474(3): 399-410.
- [5] YUAN J, LIU H, GAO W, et al. MicroRNA-378 suppresses myocardial fibrosis through a paracrine mechanism at the early stage of cardiac hypertrophy following mechanical stress[J]. *Theranostics*, 2018, 8(9): 2565-2582.
- [6] 郭志华, 毛以林, 郑爱华. 益心泰治疗慢性心力衰竭40例临床观察[J]. *中医药导报*, 2010, 16(5): 30-32.
- [7] FRANGOIANNIS N G. The extracellular matrix in ischemic and nonischemic heart failure[J]. *Circulation Research*, 2019, 125(1): 117-146.
- [8] 方欢乐, 刘峰, 韩宁娟, 等. 冠心舒通胶囊抑制TGF- β /Smad信号通路改善异丙肾上腺素诱导的大鼠心脏重塑机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(5): 516-522.
- [9] YEH H W, HSU E C, LEE S S, et al. PSPC1 mediates TGF- β 1 autocrine signalling and Smad2/3 target switching to promote EMT, stemness and metastasis[J]. *Nature Cell Biology*, 2018, 20(4): 479-491.
- [10] MABEL C, PABLO A, PÍA B, et al. TGF- β 1 induced up-regulation of B1 kinin receptor promotes antifibrotic activity in rat cardiac myofibroblasts[J]. *Molecular Biology Reports*, 2019, 46(5): 5197-5207.
- [11] ZHANG L L, DU J B, TANG C S, et al. Inhibitory effects of

- sulfur dioxide on rat myocardial fibroblast proliferation and migration [J]. Chinese Medical Journal, 2018, 131(14): 1715-1723.
- [12] NAOYUKI M, SHIZUKU M, YOSHIKUNI N, et al. Coordinated regulation of palladin and α -smooth muscle actin by transforming growth factor- β in human corneal fibroblasts[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Ence, 2016, 57(7): 3360-3368.
- [13] WEI Y, WANG N, JIN Q, et al. Renal sympathetic denervation improves myocardial apoptosis in rats with isoproterenol-induced heart failure by downregulation of tumor necrosis factor- α and nuclear factor- κ B[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 14(5): 4104-4110.
- [14] CHEN Y, ZHENG Z, WANG J, et al. Berberine suppresses apoptosis and extracellular matrix (ECM) degradation in nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in a rodent model [J]. International Journal of Biological Sciences, 2018, 14(6): 682-690.
- [15] 江章瑜, 杨柳, 余柱立, 等. 香丹注射液对SD大鼠慢性心脏毒性作用的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(4): 403-407.
- [16] PARK N R, CHA J H, JANG J W, et al. Synergistic effects of CD44 and TGF- β 1 through AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2016, 477(4): 568-574.
- [17] LIU W, ZHENG J, DONG J, et al. Association of miR-197-5p, a circulating biomarker for heart failure, with myocardial fibrosis and adverse cardiovascular events among patients with stage C or D heart failure[J]. Cardiology, 2018, 141(4): 212-225.
- [18] WANG Y, LI M, XU L, et al. Expression of Bcl-2 and microRNAs in cardiac tissues of patients with dilated cardiomyopathy [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 15(1): 359-365.
- [19] CHE X, WANG X, ZHANG J, et al. Vitexin exerts cardioprotective effect on chronic myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting myocardial apoptosis and lipid peroxidation[J]. American Journal of Translational Research, 2016, 8(8): 3319-3327.
- [20] 郭志华, 李雅, 吴刚强, 等. 益心泰颗粒对慢性心力衰竭兔心肌重构的影响[J]. 中国医师杂志, 2015, 17(3): 340-342.
- [21] 唐云, 郭志华, 李雅, 等. 益心泰颗粒对慢性心衰兔超声心动图指标及血清脑钠肽的影响[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1565-1567.
- [22] 魏佳明, 朱俊平, 王健章, 等. 益心泰治疗心力衰竭的网络药理学研究[J]. 中医药导报, 2020, 26(7): 92-97.
- [23] JIA G, LENG B, WANG H, et al. Inhibition of cardiotrophin1 overexpression is involved in the antifibrotic effect of AstrogalsideIV [J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(6): 8365-8370.
- [24] TSAI Y T, LOH S H, LEE C Y, et al. Tanshinone IIA inhibits high glucose-induced collagen synthesis via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in cardiac fibroblasts[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 51(5): 2250-2261.
- [25] SONG Y H, ZHU L B, LI M, et al. Antifibrotic effects of crocetin in scleroderma fibroblasts and in bleomycin-induced sclerotic mice[J]. Clinics, 2013, 68(10): 1350-1357.

(编辑: 邹元平)