

何永芸,黎红,胡明霞,等. 基于 sGC-cGMP-PKG 信号通路研究桂郁金水提物对异丙肾上腺素诱导小鼠心肌肥厚的作用及机制[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(10): 1260-1269.

HE Y Y, LI H, HU M X, et al. Effects of aqueous extract of *Curcuma kwangsiensis* root tubers on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice based on the sGC-cGMP-PKG signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(10): 1260-1269.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.10.004

基于 sGC-cGMP-PKG 信号通路研究桂郁金 水提物对异丙肾上腺素诱导小鼠 心肌肥厚的作用及机制

何永芸^{1,2,3}, 黎红^{1,3}, 胡明霞^{1,2,3}, 姚玥^{1,2,3}, 莫晓丹^{1,2,3}, 杨秀芬^{1,2,3*}

(1. 广西中医药大学 药学院, 南宁 530200; 2. 广西壮瑶药重点实验室, 南宁 530200;
3. 广西高校中药神经-代谢及免疫药理重点实验室, 南宁 530200)

【摘要】 目的 基于 sGC-cGMP-PKG 信号通路研究桂郁金 (*Curcuma kwangsiensis* root tubers, GYJ) 水提物对异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导小鼠心肌肥厚的改善作用及相关机制。**方法** 将 72 只 KM 雄性小鼠随机分为正常对照组、模型组、普萘洛尔 (40 mg/kg) 组以及 GYJS 低 (1 g/kg)、中 (2 g/kg)、高 (4 g/kg) 剂量组。除正常对照组外, 其余各组小鼠在第 1 ~ 3 天皮下注射 ISO (10 mg/kg), 第 4 ~ 14 天皮下注射 ISO (5 mg/kg), 皮下注射 ISO 4 h 后, 各组小鼠灌胃相应的药物, 给药周期为 14 d。取材后, 称量小鼠全心重和左心室重量; 苏木素-伊红 (HE) 染色和马松 (Masson) 染色观察小鼠心肌组织的病理情况; 免疫组织化学 (immunohistochemical, IHC) 染色观察鸟苷酸环化酶 1β3 (guanylate cyclase 1, soluble, beta 3, GUCY1B3)、转化生长因子-β1 (transforming growth factor beta 1, TGF-β1) 心肌组织中的表达情况; 试剂盒检测小鼠血清中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶 (creatinine kinase, CK) 活性和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量, 检测心肌组织中超氧化物歧化酶活性 (superoxide dismutase, SOD) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量; ELISA 法测定小鼠血清中环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 含量; 逆转录荧光定量 PCR (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 检测心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)、GUCY1B3、环磷酸鸟苷依赖蛋白激酶 1 (cGMP-dependent protein kinase 1, PKG I)、磷酸二酯酶 5A (phosphodiesterase 5A, PDE5A) mRNA 表达水平。**结果** 与模型组比较, 普萘洛尔组和 GYJS 各剂量组可以显著降低小鼠全心重指数和左心室重量指数 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$), 明显改善小鼠心肌组织肥厚和心肌纤维化, 显著升高 GUCY1B3 在小鼠心肌组织中表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 显著降低 TGF-β1 的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 心肌损伤标志物 LDH、CK 活力显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), NO、cGMP 含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 心肌氧化应激指标 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD 活力显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 心肌肥厚标志物 ANP、BNP 和 PDE5A mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), GUCY1B3、PKG I mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。**结论** 桂郁金水提物对 ISO 诱导小鼠心肌肥厚具有明显的改善作用, 其机制可能与调节 sGC-cGMP-PKG 信号通路有关。

【关键词】 桂郁金; 小鼠; 心肌肥厚; sGC-cGMP-PKG 信号通路; 机制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 10-1260-10

【基金项目】 广西自然科学基金 (2020GXNSFAA297165), 广西壮瑶药重点实验室建设项目 (GXZYZZ2022-08), 中药学广西一流学科 (桂教科研 [2022] 1 号)。

Funded by the Guangxi Natural Science Foundation (2020GXNSFAA297165); Guangxi Zhuang and Yao Medicine Key Laboratory Construction Project (GXZYZZ2022-08); Guangxi First-class Discipline; Guangxi first-class discipline construction project of Chinese materia medica (Guangxi Educational Scientific Research [2022] No. 1).

【作者简介】 何永芸, 女, 硕士, 研究方向: 中药心脑血管药理。Email: 528573374@qq.com

【通信作者】 杨秀芬, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药心脑血管药理。Email: xiufenyang@163.com

Effects of aqueous extract of *Curcuma kwangsiensis* root tubers on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice based on the sGC-cGMP-PKG signaling pathway

HE Yongyun^{1,2,3}, LI Hong^{1,3}, HU Mingxia^{1,2,3}, YAO Yue^{1,2,3}, MO Xiaodan^{1,2,3}, YANG Xiufen^{1,2,3*}

(1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China; 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Neuro-Metabolism and Immunopharmacology of Guangxi Education Department, Nanning 530200, China)

Corresponding author: YANG Xiufen. E-mail: xiufenyang@163.com

[Abstract] Objective To investigate the role and related mechanism of the soluble guanylate cyclase (sGC)-cGMP-protein kinase G (PKG) signaling pathway in the amelioration of isoproterenol (ISO)-induced cardiac hypertrophy in mice by aqueous extract of *Curcuma kwangsiensis* root tubers (GYJS). **Methods** 72 KM male mice were divided randomly into 6 groups: normal, model, propranolol control (40 mg/kg), and GYJS low- (1 g/kg), medium-(2 g/kg), and high-dose (4 g/kg) groups. Mice in the experimental groups were injected subcutaneously with ISO 10 mg/kg on days 1~3 and ISO 5 mg/kg on days 4~14 to establish a mouse cardiac hypertrophy model. 4h after each subcutaneous injection of ISO, the mice in each group were administered the corresponding drugs orally for a dosing cycle of 14 days. The hearts were then removed and whole heart and left ventricle weight were measured. Myocardial tissue pathology was observed using hematoxylin and eosin and Masson staining, and sGC subunit beta-1 (GUCY1B3) and transforming growth factor (TGF-β1) were detected by immunohistochemistry. Serum lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), and Nitric Oxide (NO), and myocardial superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were measured using respective kits. Serum cGMP was detected by enzyme-linked immunosorbent assay and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), and atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), GUCY1B3, PKG I, and phosphodiesterase (PDE) 5A mRNA expression levels were also determined by RT-qPCR. **Results** Compared with the model group, whole heart and left ventricle weights were significantly reduced in mice treated with propranolol or GYJS ($P < 0.001$ or $P < 0.0001$) and myocardial hypertrophy and myocardial fibrosis were significantly reversed. All the treatments significantly elevated myocardial expression of GUCY1B3 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and significantly reduced expression of TGF-β1 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The myocardial damage markers LDH and CK were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) while NO and cGMP were significantly elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the myocardial oxidative stress indicator MDA was significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and SOD activity was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). mRNA levels of the myocardial hypertrophy markers ANP, BNP, and PDE5A were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$, or $P < 0.001$) and the mRNA levels of GUCY1B3 and PKG I were significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). **Conclusions** GYJS may improve cardiac hypertrophy by modulating the sGC-cGMP-PKG signaling pathway.

[Keywords] *Curcuma kwangsiensis* root tubers; mice; cardiac hypertrophy; sGC-cGMP-PKG signaling pathway; mechanism
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心肌肥厚(cardiac hypertrophy,CH)是一种慢性代偿性疾病,其典型特征是心肌细胞肥大和排列紊乱及心肌纤维化等^[1],心脏对外在或内在应激的适应涉及一系列复杂的过程,其对应激的初步代偿性肥厚反应有助于维持心肌的收缩功能,但长时间的心肌肥厚可能会诱发其他心血管疾病的发生。因此,心肌肥厚作为心血管疾病的一个预测因子,在

预防和治疗心血管疾病方面有重要意义。异丙肾上腺素(isoproterenol,ISO)是一种β-肾上腺素能受体激动剂,是交感神经系统的重要组成部分。目前有研究表明,ISO可加快心率,增加心肌耗氧量,增加环磷酸腺苷生成和糖原合成增加,促进心肌细胞总蛋白合成,使心肌收缩力增强,心肌胶原沉积,进而诱发心肌肥厚^[2]。同时ISO已被发现在高剂量

和持续剂量使用时可诱导心肌肥厚,并被广泛用于心肌肥厚实验模型的建立^[3]。当前有关皮下注射 ISO 药物诱导建立心肌肥大动物模型的相关研究较多,但使用时的注射剂量差别很大,1 ~ 10 mg/kg 范围均有报道^[4]。

近年来研究发现,可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)-环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 信号通路是与病理性心肌肥厚的发生及进展相关的重要信号通路。目前研究证实,通过激活 sGC-cGMP-PKG 信号途径,降低氧化应激反应可以改善小鼠心肌肥厚^[5]。桂郁金(*Curcuma kwangsiensis* root tubers, GYJ)是广西道地药材,属活血化瘀类中药,是姜科植物广西莪术的块根,收载于历版《中国药典》的“郁金”项下。桂郁金辛、苦、寒,归心、肝、肺经,具有行气化瘀、清心解郁、凉血止血等功效,目前,已有研究表明,桂郁金醇提取物^[6]、桂郁金多糖^[7]、桂郁金挥发油中的主要成分吉马酮^[8]对过氧化氢(H₂O₂)诱导的人脐静脉内皮细胞损伤均具有保护作用,其机制可能与抗炎、抗氧化及抑制细胞凋亡基因的表达等有关。除此之外,研究还发现吉马酮对氧糖剥夺所致大鼠大脑微血管内皮细胞损伤也有保护作用^[9];桂郁金水提取物及醇提取物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀、冰醋酸致小鼠腹腔通透性增高、小鼠棉球肉芽肿增生等均有明显的抑制作用^[10],由此表明桂郁金提取物的抗炎、抗氧化和改善心脑血管疾病作用已有一定的研究进展,但其作用机制尚未完全阐明。因此,本研究基于 sGC-cGMP-PKG 信号通路研究桂郁金水提取物对 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚的改善作用及机制,可为桂郁金治疗心血管疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

72 只 SPF 级 KM 雄性小鼠,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 22 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2019-0004】。饲养条件为恒定室温(25 ± 2)℃、相对湿度(50 ± 10)%、昼夜各半循环照明的实验室中,饲养期间各组大鼠自由饮用纯水和获取普通维持饲料,并饲养于广西中医药大学动物实验室【SCXK(桂)2019-0001】。本实验经广西中医药大学实验动物伦理委员会批准(DW20230525-

091),所有实验操作均遵循 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器

桂郁金购于广西钦州市灵山县陆屋镇,经广西中医药大学中药鉴定教研室的滕建北教授鉴定为正品;盐酸异丙肾上腺素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司, F2215417);盐酸普萘洛尔片(天津力生制药股份有限公司, 2212008);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine Kinase, CK)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)活性测试盒(南京建成生物工程研究所, 20231220、20240117、20240122、20231223、20231223);环磷酸鸟苷酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Elabscience 公司, E-EL-0083);细胞/组织总 RNA 提取试剂盒、HieffTM qPCR SYBR[®] Green Master Mix(No Rox)、Hifair[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(gDNA digester plus)(上海翌圣生物科技有限公司, 19221ES50、11139ES60、11201ES08);GUCY1B3 抗体、TGF-β1 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 19011-1-AP、21898-1-AP)。

冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司 SCIENTZ-12N);石蜡切片仪(Thermo Fisher HM325);多功能样品均质机(Omni International Bead RuPtor 24 Elite);实时荧光定量 PCR 仪(Roche LightCycler 96);超微量紫外分光光度仪(Thermo Fisher NANO DROP ONE);连续波长检测仪(TECAN M200 PRO)。

1.2 方法

1.2.1 桂郁金水提取物的提取方法

称取桂郁金粉末 500.0 g,用 7 L 纯水浸泡 1 h,之后文火煎煮 90 min,用四层纱布过滤,收集滤液;重复煎煮 3 次,将 3 次滤液进行合并,回流浓缩至 300 mL,将药液分装并冻为固体后,于真空冷冻干燥机中冷冻干燥,最后得到干燥粉末 30.7 g,得膏率为 6.14%。

1.2.2 动物分组及给药方法

将 72 只健康的 SPF 级 KM 雄性小鼠随机分为 6 组,即正常对照组、模型组、普萘洛尔(40 mg/kg)组以及 GYJS 低、中、高剂量组,每组 12 只,给药周期为 14 d。桂郁金每天成人用量为 10 g,成人平均体重按 60 kg 计算,即成人给药剂量为 10 g/60 kg,根据陈奇教授主编《中药药理研究方法学》^[11]中动物剂量换算方法可知,小鼠与成人的剂量换算系数

为 12.33, 故小鼠使用桂郁金的临床等效剂量为 2.055 g/kg, 该剂量设为中剂量组, 低、中、高剂量按 0.5:1:2 的比例设计, 即 1、2、4 g/kg。实验中按照桂郁金水提物提取率以及小鼠灌胃量为 0.2 mL/10 g 进行计算, 依次配成 0.00307、0.00614、0.01228 g/mL 浓度进行灌胃给药。具体给药方法: 除正常对照组小鼠每天皮下注射相应体积的生理盐水外, 其他组小鼠在第 1 ~ 3 天皮下注射 10 mg/kg 的 ISO, 第 4 ~ 14 天则皮下注射 5 mg/kg 的 ISO, 构建心肌肥厚模型; 各组皮下注射 ISO 药物 4 h 后, 正常对照组和模型组灌胃相应体积的生理盐水; 普萘洛尔组、GYJS 低、中、高剂量组分别灌胃相应体积的药物, 每天 1 次。

1.2.3 动物取材

在末次给药后 12 h 禁食不禁水, 用 2% 戊巴比妥钠药物将小鼠麻醉后采血并处死, 将采集的血液室温静置 2 h 后, 4000 r/min, 离心 10 min。摘取心脏, 一部分用 4% 多聚甲醛固定, 剩下的组织快速转移至液氮中, 并于 -80 ℃ 冰箱保存, 用于后续实验指标的检测。

1.2.4 称量小鼠体重、全心重量、左心室重量

取材前称量各组小鼠的体重, 小鼠麻醉后, 取小鼠血清和心脏组织, 用预冷的生理盐水冲洗心脏, 并用滤纸吸干, 称量全心重量和左心室重量。全心重指数和左心室重量指数的计算: 全心重指数 (heart weight / body weight, HW/BW) = 全心重量 / 体重; 左心室重量指数 (left ventricular weight / body weight, LVW/BW) = 左心室重量 / 体重。

1.2.5 苏木素-伊红 (HE)、马松 (Masson) 和免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 染色

将新鲜心脏组织固定于 4% 多聚甲醛 24 h 以上, 经过脱水、包埋、切片、石蜡切片至脱水、染色、脱水封片等步骤对小鼠心肌组织进行 HE 和 Masson 染色。根据上述步骤, 再进行抗原修复、血清封闭, 加一抗、二抗封闭、复染细胞核等步骤进行 IHC 染色。最后于倒置显微镜下镜检, 进行图像采集并分析小鼠心肌细胞的肥厚与损伤情况, 用 Image J (win 64 版) 软件对胶原纤维沉积进行半量化分析, 对 IHC 染色阳性结果进行统计分析。

1.2.6 小鼠血清中 LDH、CK、NO 含量的检测

按 LDH、CK 和 NO 试剂盒说明书检测。

1.2.7 小鼠心肌组织中 SOD、MDA 含量的检测

按 SOD 和 MDA 试剂盒说明书检测。

1.2.8 ELISA 法检测血清中 cGMP 因子水平
按 cGMP 试剂盒说明书检测。

1.2.9 RT-qPCR 检测 ANP、BNP 与 GUCY1B3、PKG I、PDE5A mRNA 的表达

根据总 RNA 试剂盒说明书对小鼠心肌组织进行匀浆, 提取心肌组织中的总 RNA, 于超微量紫外分光光度仪测定每个样品的 RNA 浓度。根据逆转录试剂盒说明书先进行 gDNA 消化, 再合成 cDNA。用于 RT-qPCR 的引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成, 其序列见表 1, 在实时荧光定量 PCR 仪中以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增, 扩增程序: 预变性 (95 ℃, 5 min), 变性 (95 ℃, 10 s), 退火/延伸 (60 ℃, 30 s)。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列
Table 1 RT-qPCR primer sequence

基因 Genes	序列 (5' → 3') Sequence (5' → 3')
ANP	F: AAGATAACAGCCAAGGAGGAA
	R: CGTGATAGATGAAGGCAGGAA
BNP	F: GGTGCTGTCCCAGATGATTC
	R: TTCCCAGAGGATAGGAGTGA
GUCY1B3	F: CGGATGCCTCGGTATTGTCT
	R: TGGTTCTTCTTGCCCTTCA
PKG I	F: CCTTGGAGTTGGAGGTTTCG
	R: TGCTCCTGCTGTCTCGTGTC
PDE5A	F: GGATAGCAGAACTCCTGGCA
	R: GTCTTCGGATACGTGGGTCA
β -actin	F: CAGCCTTCCTTCTTGCGTAT
	R: GGTCTTTACGGATGTCAACG

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 27.0 和 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计分析, 计量资料数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 GYJS 对全心重指数、左心室重量指数的影响

通过称量统计分析发现, 与正常对照组小鼠相比, 模型组小鼠的 HW/BW 和 LVW/BW 的比值均显著升高 ($P < 0.0001$), 初步提示小鼠心肌肥厚模型构建成功。与模型组相比, GYJS 低、中、高组和普萘洛尔组的 HW/BW 和 LVW/BW 比值均有下降, 均具有显著性差异 ($P < 0.001$), 统计结果如表 2 所示。

表 2 各组小鼠全心重指数和左心室指数($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 2 Whole heart weight index and left ventricular index of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 9$)		
组别 Groups	全心重量指数/ (mg/g) HW/BW/(mg/g)	左心室重量指数/ (mg/g) LVW/BW/(mg/g)
正常对照组 Normal group	4.70 ± 0.18	2.13 ± 0.28
模型组 Model group	5.78 ± 0.38****	3.21 ± 0.41****
普萘洛尔组 Propranolol group	5.29 ± 0.09##	2.41 ± 0.12####
GYJS 低剂量组 GYJS low dose group	5.32 ± 0.26##	2.51 ± 0.25###
GYJS 中剂量组 GYJS medium dose group	5.35 ± 0.22##	2.45 ± 0.27###
GYJS 高剂量组 GYJS high dose group	5.30 ± 0.24##	2.40 ± 0.22####

注:与正常对照组相比,**** $P < 0.0001$;与模型组相比,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$,#### $P < 0.0001$ 。(下表同)
Note. Compared with the normal group, **** $P < 0.0001$. Compared with the model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$. (The same in the following tables)

2.2 HE 染色结果

HE 染色下,通过观察分析发现,正常对照组心肌组织结构正常,心肌细胞排列紧密,大小均一,未见明显变性,心肌组织未见炎症细胞浸润;模型组可见大量炎症细胞浸润,周围心肌细胞面积明显增大,整体损伤程度较重;普萘洛尔组心肌组织结构有轻度的炎症细胞浸润和细胞面积增大;GYJS 低、中、高剂量组的炎症细胞浸润和损伤程度较模型组有所改善,但低剂量组损伤程度稍重,结果如图 1 所示。

2.3 Masson 染色结果

Masson 染色下,正常对照组未见明显蓝色胶原

纤维,模型组可见大量蓝色胶原纤维,普萘洛尔组较模型组有所改善;GYJS 低、中、高剂量组依次有所减少,整体均少于模型组;Masson 染色结果如图 2A 所示。将各组小鼠的心脏横截面胶原纤维进行量化,结果如图 2B 所示。由 Masson 染色结果和胶原纤维进行量化结果提示,GYJS 可以改善 ISO 诱导的小鼠心肌纤维化。

2.4 IHC 染色结果

IHC 染色检测 GUCY1B3、TGF-β1 在心肌组织上的表达量,通过对其阳性面积进行半定量分析结果可知,与正常对照组比较,模型组小鼠心肌组织中的 GUCY1B3 的表达显著减少($P < 0.05$),TGF-β1 表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,普萘洛尔组、GYJS 低、中、高剂量组可以显著上调 GUCY1B3 的表达,降低 TGF-β1 的表达。免疫组化染色情况如量化值如图 3A、3C 所示,阳性面积量化值如图 3B、3D 所示。

2.5 GYJS 对血清中 LDH、CK 的影响

为了评估 GYJS 对心肌肥厚小鼠心肌损伤的影响,分别测定了小鼠血清中的 LDH 和 CK 含量。根据检测结果可知,与正常对照组相比,模型组小鼠的 LDH 和 CK 活性显著上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),提示在 ISO 诱导小鼠心肌肥厚的过程中可能有心肌损伤发生;与模型组相比,普萘洛尔组、GYJS 低、中、高剂量组小鼠的 LDH 活性和 CK 活性显著降低,提示经 GYJS 药物和普萘洛尔药物干预后,可以降低小鼠在心肌肥厚过程中的心肌损伤,检测结果如表 3 所示。

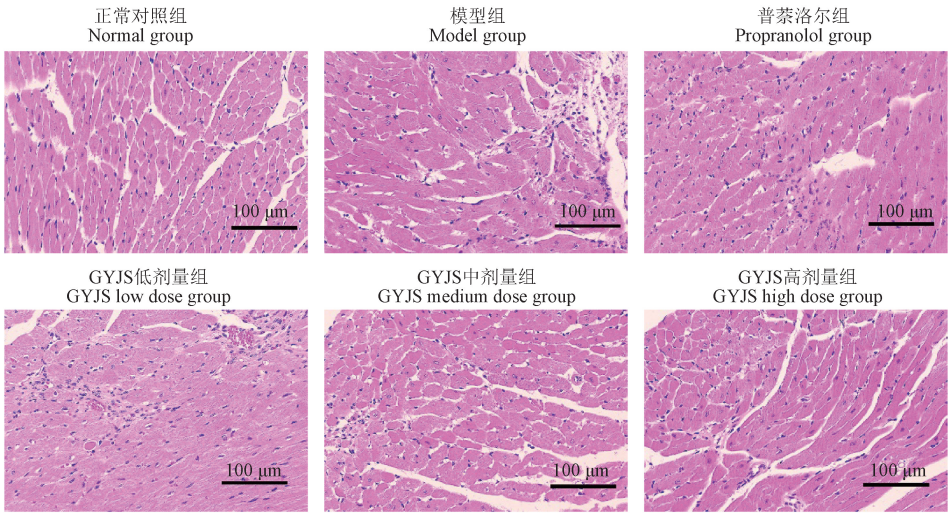


图 1 各组小鼠心肌组织 HE 染色结果

Figure 1 HE staining results of myocardial tissue of mice in each group

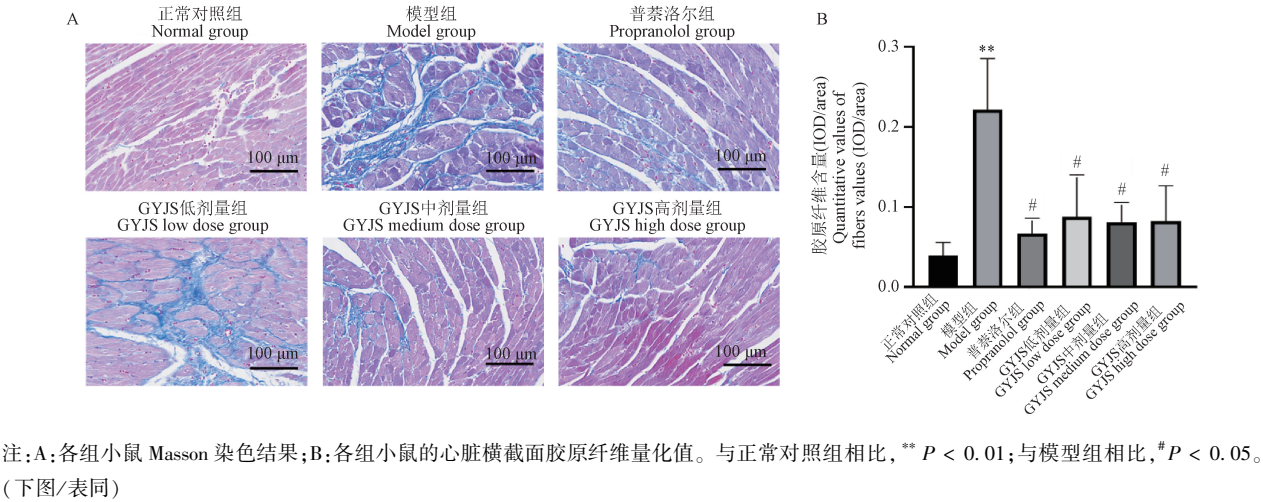


图 2 小鼠心肌组织 Masson 染色结果及胶原纤维量化值

Note. A. Masson staining results of mice in each group. B. Quantitative values of collagen fibers in cardiac cross-sections of mice in each group. Compared with normal group, ** $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

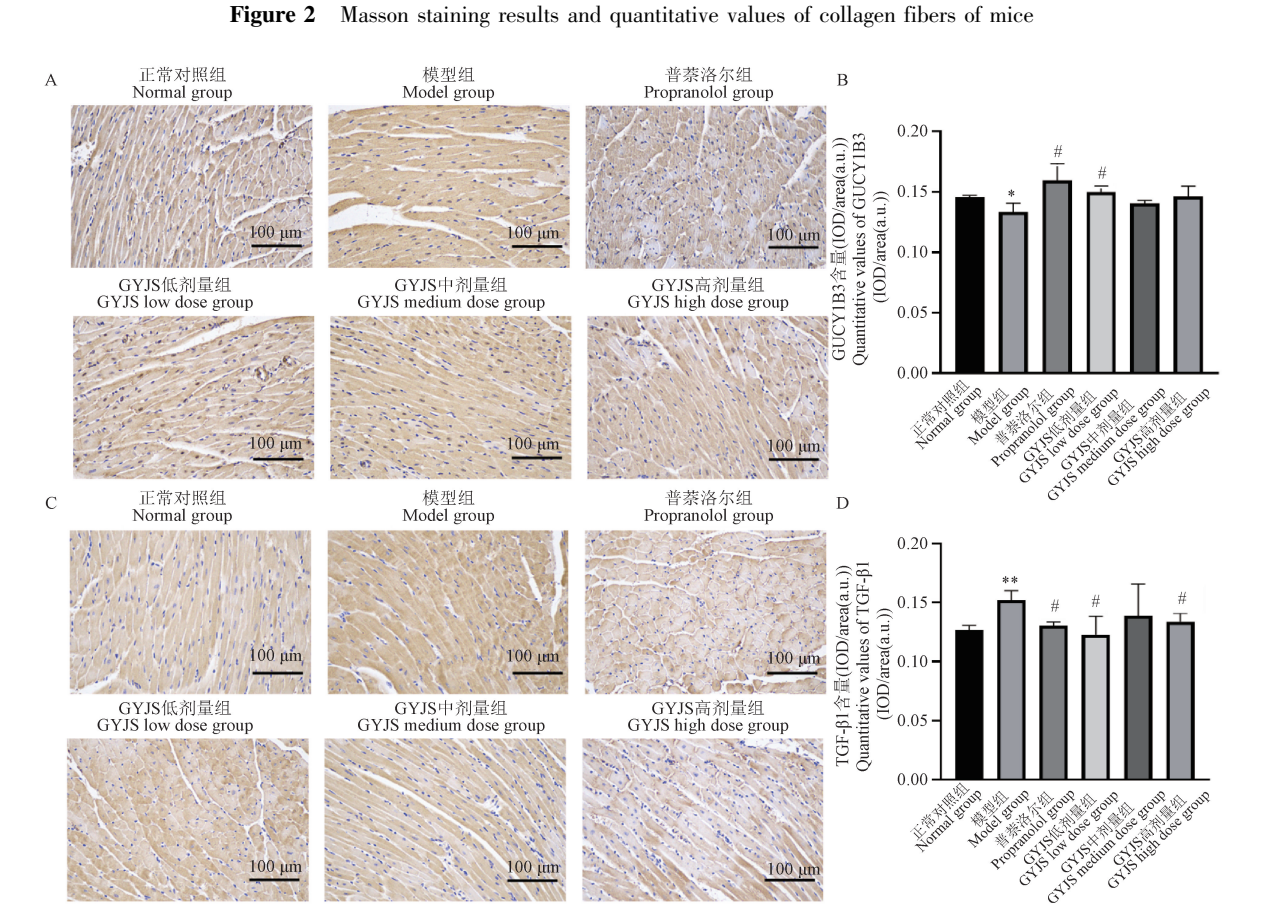


图 3 免疫组化染色结果及 GUCY1B3 和 TGF- β 1 表达情况

Note. A. Expression of GUCY1B3 in myocardial tissue of mice was detected by immunohistochemical staining. B. Effect of GYJS on GUCY1B3 content. C. Expression of TGF- β 1 in myocardial tissue of mice was detected by immunohistochemical staining. D. Effect of GYJS on TGF- β 1 content. Compared with normal group, * $P < 0.05$. (The same in the following tables)

Figure 3 IHC staining results and the expression of GUCY1B3 and TGF- β 1

表 3 小鼠血清中 LDH 和 CK 活力值($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 LDH and CK viability values in mice		
serum($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别 Groups	乳酸脱氢酶 活力/(U/L) LDH activity/ (U/L)	肌酸激酶 活力/(U/mL) CK activity/ (U/mL)
正常对照组 Normal group	10791.37 ± 1533.57	0.42 ± 0.16
模型组 Model group	17074.34 ± 2108.13 ^{***}	0.75 ± 0.23 [*]
普萘洛尔组 Propranolol group	13177.46 ± 1826.50 ^{##}	0.40 ± 0.21 [#]
GYJS 低剂量组 GYJS Low dose group	13717.03 ± 2643.99 [#]	0.47 ± 0.23
GYJS 中剂量组 GYJS medium dose group	13968.82 ± 2394.47 [#]	0.37 ± 0.14 ^{##}
GYJS 高剂量组 GYJS high dose group	14208.63 ± 1595.60 [#]	0.47 ± 0.17 [#]

注:与正常对照组相比,*** $P < 0.001$ 。(下表同)
Note. Compared with the control group, *** $P < 0.001$. (The same in the following tables)

2.6 GYJS 对血清中 NO 和 cGMP 含量的影响

NO 是调节心脏舒张的因子,对心脏具有保护作用。因此,本研究通过测定各组小鼠血清中的 NO 含量,来评估 GYJS 是否能通过增加 NO 含量来改善 ISO 诱导的心肌肥厚。与正常对照组相比,模型组小鼠的 NO 血清含量显著降低($P < 0.05$),与模型组相比,普萘洛尔组、GYJS 低、中、高剂量组可以显著提高小鼠血清中的 NO 含量。

通过 ELISA 法测定小鼠血清中 cGMP 含量,与正常对照组相比,模型组小鼠的 cGMP 血清含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,普萘洛尔组、GYJS 低、中剂量组可以显著升高小鼠血清中的 cGMP 的水平($P < 0.05$),GYJS 高剂量组的 cGMP 水平较模型组升高,但无统计学意义。根据测定结果,提示 GYJS 可以提高 ISO 诱导的小鼠血清中 NO 和 cGMP 含量,测定结果如表 4 所示。

2.7 GYJS 对心肌组织中 SOD、MDA 含量的影响

通过 SOD 和 MDA 试剂盒说明书可知,SOD 活力和 MDA 含量在一定程度上可以反映机体的抗氧化程度。因此,测定小鼠心肌组织中的 SOD 和 MDA 的含量,验证 GYJS 在改善 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚中是否发挥抗氧化作用。测定结果发现,与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠心脏中 SOD 的活力显著降低($P < 0.05$),MDA 的含量显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,普萘洛尔组、GYJS 低、中剂量组可以显著升高小鼠心肌组织中的 SOD 活力,显著降低 MDA 水平,结果如表 5 所示。

表 4 小鼠血清中 NO 和 cGMP 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Results of NO and cGMP levels in mice		
serum($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别 Groups	NO 含量/ ($\mu\text{mol/L}$) NO content/ ($\mu\text{mol/L}$)	cGMP 含量/ (pmol/mL) cGMP content/ (pmol/mL)
正常对照组 Normal group	18.06 ± 5.92	83.52 ± 11.17
模型组 Model group	10.45 ± 3.71 [*]	67.73 ± 4.54 ^{**}
普萘洛尔组 Propranolol group	26.21 ± 14.42 [#]	86.10 ± 17.90 [#]
GYJS 低剂量组 GYJS low dose group	15.54 ± 7.60	86.33 ± 16.24 [#]
GYJS 中剂量组 GYJS medium dose group	22.72 ± 7.23 ^{##}	74.44 ± 5.71 [#]
GYJS 高剂量组 GYJS high dose group	18.88 ± 8.45 [#]	75.69 ± 7.66

表 5 小鼠心肌组织中 SOD 活力和 MDA 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Determination of SOD activity and MDA content in mice myocardial tissues ($\bar{x} \pm s, n = 6$)		
组别 Groups	SOD 酶活力/ (U/mg prot) Activity of SOD enzyme/(U/mg prot)	MDA 含量/ (nmol/mg prot) MDA content/ (nmol/mg prot)
正常对照组 Normal group	139.49 ± 21.18	0.97 ± 0.26
模型组 Model group	111.67 ± 17.56 [*]	1.37 ± 0.18 [*]
普萘洛尔组 Propranolol group	148.42 ± 30.91 [#]	1.00 ± 0.30 [#]
GYJS 低剂量组 GYJS low dose group	154.76 ± 40.43 [#]	1.06 ± 0.20 [#]
GYJS 中剂量组 GYJS medium dose group	150.88 ± 39.25 [#]	1.05 ± 0.13 ^{##}
GYJS 高剂量组 GYJS high dose group	137.34 ± 47.58	1.03 ± 0.10 ^{##}

2.8 GYJS 对 ANP、BNP、GUCY1B3、PKG I、PDE5A mRNA 表达水平的影响

为进一步了解 GYJS 改善小鼠心肌肥厚的机制研究,通过 RT-qPCR 检测了心肌肥厚标志物 ANP、BNP 和 GUCY1B3、PKG I、PDE5A mRNA 基因的表达情况。检测结果发现,与正常对照组比较,模型组的 ANP、BNP mRNA 表达水平显著增加($P < 0.001$),见表 6,说明心肌肥厚模型造模成功;与模型组比较,普萘洛尔组、GYJS 低、中、高剂量组可以显著降低 ANP、BNP mRNA 表达水平,除了 GYJS 低剂量组的 BNP mRNA 表达无统计学差异外,其他组均具有统计学差异。通过检测 GUCY1B3、PKG I、

PDE5A mRNA 基因的表达水平发现,与正常对照组相比,模型组的 GUCY1B3、PKG I mRNA 水平有不同程度下调($P < 0.01$),PDE5A mRNA 水平显著上调($P < 0.001$);与模型组相比,普萘洛尔组、GYJS 低、中、高剂量组的 GUCY1B3、PKG I mRNA 水平有不同程度的显著上升,PDE5A mRNA 表达水平显著降低,该结果提示 GYJS 可能通过调控 sGC-cGMP-PKG 信号通路来改善小鼠心肌肥厚,结果如表 7 所示。

3 讨论

心肌肥厚是心脏受各种病理、生理因素刺激的代偿反应。然而,长期的心肌肥大具有发展为各种心血管疾病的风险。因此,有效预防心肌肥厚的发

表 6 各组小鼠心肌组织中 ANP 和 BNP mRNA 相对表达量的比值($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Ratio of relative ANP and BNP mRNA expression in myocardial tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	ANP	BNP
正常对照组 Normal group	1.08 ± 0.48	1.01 ± 0.13
模型组 Model group	4.98 ± 0.37 ^{***}	3.19 ± 0.34 ^{***}
普萘洛尔组 Propranolol group	2.58 ± 0.33 ^{##}	1.65 ± 0.29 ^{##}
GYJS 低剂量组 GYJS low dose group	3.76 ± 0.60 [#]	2.89 ± 0.14
GYJS 中剂量组 GYJS medium dose group	3.06 ± 0.08 ^{###}	1.98 ± 0.13 ^{##}
GYJS 高剂量组 GYJS high dose group	3.18 ± 0.47 ^{##}	2.33 ± 0.35 [#]

表 7 各组小鼠心肌组织中 GUCY1B3、PKG I 和 PDE5A mRNA 相对表达量的比值($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Ratio of relative expression of GUCY1B3, PKG I and PDE5A mRNA in myocardial tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	GUCY1B3	PKG I	PDE5A
正常对照组 Normal group	1.01 ± 0.18	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.03
模型组 Model group	0.29 ± 0.03 ^{**}	0.33 ± 0.02 ^{****}	4.28 ± 0.63 ^{***}
普萘洛尔组 Propranolol group	0.69 ± 0.08 ^{##}	0.72 ± 0.10 ^{##}	2.08 ± 0.25 ^{##}
GYJS 低剂量组 GYJS low dose group	0.38 ± 0.01 ^{##}	0.55 ± 0.02 ^{###}	3.27 ± 0.38
GYJS 中剂量组 GYJS medium dose group	0.62 ± 0.09 ^{##}	0.65 ± 0.07 ^{##}	2.11 ± 0.18 ^{##}
GYJS 高剂量组 GYJS high dose group	0.73 ± 0.07 ^{###}	0.72 ± 0.07 ^{###}	0.72 ± 0.07 ^{###}

生和发展至关重要。心肌细胞肥大和心肌间质纤维化通常是心肌肥厚的病理表现,全心重指数和左心室重量指数是心肌肥厚的重要检测指标^[12]。目前已有研究证实,ANP 和 BNP 是心肌肥大的标志物^[13],TGF-β1 是心肌纤维化的标志蛋白,可通过 Smad 家族途径加速心肌纤维化进程^[14]。在本次研究中,与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠的全心重指数、左心室重量指数、TGF-β1 表达量、心肌肥大标志物 ANP、BNP mRNA 的表达水平均显著性升高,综合 HE 染色和 Masson 染色结果,初步提示 ISO 能够在体内诱导心肌肥大病理改变的同时伴有心肌肥大和心肌纤维化标志物的升高,说明本次研究用 ISO 药物已成功构建小鼠心肌肥厚模型。

血清中 LDH 和 CK 水平升高预示心肌损伤^[15]。通过测定小鼠血清中的 LHD 和 CK 含量,与正常对

照组相比,模型组小鼠血清中的 LDH 和 CK 含量均显著性上升,经普萘洛尔、GYJS 药物干预后,LDH 和 CK 活力均显著性降低。提示 GYJS 可以有效减轻 ISO 所致心肌损伤。

氧化应激与病理性心肌肥大的发生发展密切相关,是遗传性和获得性心肌肥大的关键触发因素^[16]。MDA 作为脂质过氧化的产物,在肥大的心脏组织中显著升高,而 SOD 作为维持机体氧化-抗氧化平衡的关键酶,是抵御氧化损伤的第一道防线,在心肌肥大模型 SOD 的活性显著降低^[17]。本次研究发现,经过 GYJS 干预后能够显著降低 ISO 诱导的小鼠心肌组织中 MDA 含量,同时恢复 SOD 的活性。这说明 GYJS 在改善 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚中发挥了一定的抗氧化作用。

NO 由 NO 合成酶产生,并通过 NO-cGMP 通路

保护心肌细胞。NO 与 sGC 酶结合并激活该酶,进而产生第二信使 cGMP, cGMP 含量升高时激活了 PKG 酶的活性, PKG 酶通过磷酸化其靶蛋白,最终调节信号通路来对心肌产生保护作用^[18]。PDE5A 是一个重要的磷酸二酯酶(PDEs)同工酶,它可以与 cGMP 作用而使其降解失活。有研究表明,口服 PDE5A 抑制剂可以阻断 cGMP 的固有分解代谢,可抑制心肌细胞肥大^[19]。GUCY1B3 是 sGC 的 β 亚基,目前已有研究表明可以通过上调 GUCY1B3 的表达改善心肌细胞损伤和细胞凋亡,在心肌梗死中发挥重要作用^[20],还可以通过调节 NO-sGC-cGMP-PKG 通路可以来预防大鼠心肌损伤^[21],通过调节 sGC-cGMP-PKG 途径可以抑制氧化应激诱导的心肌损伤^[22]。在本次研究中,测定了小鼠血清中 NO、cGMP 含量, IHC 染色检测 GUCY1B3 在心肌组织中的表达,以及检测 GUCY1B3、PKG I 和 PDE5A 的 mRNA 表达水平。研究结果发现,与正常对照组比较, ISO 诱导的小鼠血清中 NO、cGMP 水平和 GUCY1B3、PKG I mRNA 表达显著降低, PDE5A mRNA 表达水平显著上升,经过 GYJS 药物干预后,可以显著升高 NO、cGMP 含量,上调 GUCY1B3、PKG I mRNA 水平和降低 PDE5A mRNA 的表达。

综上所述,本研究发现桂郁金水提物可缓解 ISO 致小鼠心肌肥厚,可上调心肌 GUCY1B3、PKG I mRNA 的表达,降低心肌 PDE5A mRNA 的表达,推测 GYJS 改善 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚的机制可能与 sGC-cGMP-PKG 信号通路相关。由于心肌肥厚发病机制复杂性, GYJS 在改善心肌肥厚的机制探究方面仍值得进一步探索,在研究了 cGMP、PKG I 和 PDE5A 的 mRNA 表达水平的基础上,可以再测定其相应蛋白含量的表达情况,进一步阐明 GYJS 改善心肌肥厚的作用与 sGC-cGMP-PKG 信号通路的相关性,为 GYJS 改善心肌肥厚奠定重要的研究基础。

参 考 文 献(References)

- [1] WOLF C M. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics and clinical perspectives [J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2019, 9(2): S388-S415.
- [2] NAGOOR MEERAN M F, LAHAM F, AZIMULLAH S, et al. α -Bisabolol abrogates isoproterenol-induced myocardial infarction by inhibiting mitochondrial dysfunction and intrinsic pathway of apoptosis in rats [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 453(1/2): 89-102.
- [3] GYONGYOSI A, ZILINYI R, CZEGLEDI A, et al. The role of autophagy and death pathways in dose-dependent isoproterenol-induced cardiotoxicity [J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(19): 2192-2198.
- [4] 刘景艳, 朱亮, 蔡月琴, 等. 不同因素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌梗大模型建立影响的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 651-658.
LIU J Y, ZHU L, CAI Y Q, et al. A comparative study on the effects of different factors on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy model in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 651-658.
- [5] CHEN L, ZHOU X, DENG Y, et al. Zhenwu decoction ameliorates cardiac hypertrophy through activating sGC (soluble guanylate cyclase) -cGMP (cyclic guanosine monophosphate) -PKG (protein kinase G) pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 300: 115705.
- [6] 唐丽清, 覃琴, 冯柏林, 等. 桂郁金醇提物含药血清对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中药材, 2019, 42(11): 2651-2657.
TANG L Q, QIN Q, FENG B L, et al. Protective effect of serum containing alcohol extract from curcuma kwangsiensis on HUVECs injury induced by hydrogen peroxide [J]. J Chin Med Mater, 2019, 42(11): 2651-2657.
- [7] 俞献文, 唐丽清, 覃琴, 等. 桂郁金多糖对 H_2O_2 致人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 146-152.
YU X W, TANG L Q, QIN Q, et al. Protective effect and mechanism of polysaccharides from curcuma kwangsiensis radix on HUVECs injured by H_2O_2 [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(23): 146-152.
- [8] 陈琼芳, 王钢, 唐丽清, 等. 吉马酮改善 H_2O_2 诱导的脐静脉血管内皮细胞氧化应激损伤的作用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3564-3571.
CHEN Q F, WANG G, TANG L Q, et al. Effect of germacrone in alleviating HUVECs damaged by H_2O_2 -induced oxidative stress [J]. Chin J Chin Mater Med, 2017, 42(18): 3564-3571.
- [9] 陈琼芳, 李钊飞, 王钢, 等. 吉马酮对缺氧缺糖损伤 BMECs 细胞抗凝和纤溶功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(4): 44-49.
CHEN Q F, LI Z F, WANG G, et al. The influence of germacrone on anticoagulant and fibrinolytic function of BMECs injured by OGD [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2016, 32(4): 44-49.
- [10] 林国彪, 苏姜羽, 杨秀芬. 桂郁金提取物的抗炎镇痛作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 171-173.
LIN G B, SU J Y, YANG X F. Anti-inflammatory and analgesia effects of extract of curcuma kwangsiensis [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2011, 17(16): 171-173.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2011.
CHEN Q. Research methods in pharmacology of Chinese materia medica [M]. Beijing: People's Health Press; 2011.
- [12] 陈啟艳, 孙媛, 高春华, 等. 红芪多糖通过调控 PI3K/Akt 信

号通路对异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚的改善作用 [J]. 中成药, 2023, 45(11): 3598–3603.

CHEN Q Y, SUN Y, GAO C H, et al. Effects of Hedysarum polybotys polysaccharide on isoproterenol-induced mouse myocardial hypertrophy via PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(11): 3598–3603.

[13] XU C N, KONG L H, DING P, et al. Melatonin ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating Atg5-dependent autophagy and activating the Akt/mTOR pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(10): 165848.

[14] BAS E, ANWAR M R, VAN DE WATER T R. TGF β -1 and WNT signaling pathways collaboration associated with cochlear implantation trauma-induced fibrosis [J]. Anat Rec (Hoboken), 2020, 303(3): 608–618.

[15] 张静怡, 张博男, 张春来, 等. 白藜芦醇对异丙肾上腺素所致小鼠心肌肥厚的保护作用 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(10): 1885–1888.

ZHANG J Y, ZHANG B N, ZHANG C L, et al. Protective effect of Resveratrol on isoprenaline-induced cardiac hypertrophy in mice [J]. Chin J Clin Electron Ed, 2014, 8(10): 1885–1888.

[16] RAMACHANDRA C J A, CONG S, CHAN X, et al. Oxidative stress in cardiac hypertrophy: from molecular mechanisms to novel therapeutic targets [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 166: 297–312.

[17] RASTEGAR MOGHADDAM S H, HOSSEINI M, SABZI F, et al. Cardiovascular protective effect of nano selenium in hypothyroid rats: protection against oxidative stress and cardiac fibrosis [J]. Clin Exp Hypertens, 2022, 44(3): 268–279.

[18] RUPPERT M, KORKMAZ-ICÖZ S, LI S, et al. Comparison of the reverse-remodeling effect of pharmacological soluble guanylate cyclase activation with pressure unloading in pathological myocardial left ventricular hypertrophy [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1869.

[19] TAKIMOTO E, CHAMPION H C, LI M, et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy [J]. Nat Med, 2005, 11(2): 214–222.

[20] WANG X, DU W, LI M, et al. The β subunit of soluble guanylyl cyclase GUCY1B3 exerts cardioprotective effects against ischemic injury via the PKC ϵ /Akt pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 3071–3081.

[21] WEI Q, ZHU T, XIAO X, et al. Dioscin attenuates myocardial damages in diabetic rats maybe by regulating NO-sGC-cGMP-PKG pathway [J]. Ann Clin Lab Sci, 2019, 49(1): 97–104.

[22] XUE M, LI T, WANG Y, et al. Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice [J]. Clin Sci, 2019, 133(15): 1705–1720.

[收稿日期] 2024-05-28