

# 百里香醌对脂多糖诱导大鼠心肌纤维化的保护作用及机制研究<sup>Δ</sup>

蔡伟<sup>1,2\*</sup>, 杨佳丹<sup>3</sup>, 高珊<sup>1</sup>, 李世琴<sup>1</sup>, 王述蓉<sup>4#</sup> (1.西南医科大学药学院, 四川泸州 646000; 2.宜宾市第二中医医院药剂科, 四川宜宾 644000; 3.重庆医科大学附属第一医院药学部, 重庆 400016; 4.西南医科大学附属第一医院药学部, 四川泸州 646000)

中图分类号 R962;R285;R542.2\*3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0464-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.07

**摘要** 目的:探讨百里香醌(TQ)对脂多糖(LPS)诱导的大鼠心肌纤维化(MF)的保护作用及其可能机制。方法:将40只雄性Wistar大鼠随机分为对照组、模型组和TQ低、高剂量组[5、10 mg/(kg·d)],每组10只。除对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水外,其余各组大鼠均腹腔注射LPS复制MF模型,每天1次,连续3周。自造模第1天起,各给药组大鼠均腹腔注射相应药物,每天1次,连续3周。末次给药后,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠血清炎症因子[白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )]含量;称定并计算其心脏质量参数[心脏质量指数(HW/BM)、左心室质量指数(LVW/BW)];采用苏木精-伊红染色法观察其心肌组织病理学变化;采用化学分析法、黄嘌呤氧化酶法或酶联免疫吸附法检测其心肌组织中氧化应激指标[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)]和心肌胶原指标[羟脯氨酸(HYP)、I型胶原蛋白(Col-I)、Col-III]含量或活性;采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测其MF相关调控基因[Col-I、Col-III、基质金属蛋白酶3(MMP-3)、MMP-9、转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、Smad3]的mRNA表达情况。结果:与对照组比较,模型组大鼠心肌细胞肿胀,细胞核大小不一且排列紊乱,纤维增生明显;血清炎症因子含量, LVW/BW, 心肌组织MDA、HYP、Col-I、Col-III含量以及Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 、Smad3的mRNA相对表达量均显著升高( $P < 0.05$ ), SOD活性显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, TQ各剂量组大鼠MF程度均有不同程度的改善; TQ低剂量组大鼠血清IL-1 $\beta$ 含量, 心肌组织MDA、HYP、Col-I含量, TQ高剂量组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量, LVW/BW, 心肌组织MDA、HYP、Col-I、Col-III含量以及TQ各剂量组Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 的mRNA相对表达量均显著降低( $P < 0.05$ ); TQ各剂量组心肌组织SOD活性显著升高( $P < 0.05$ )。其余指标组间比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: TQ对MF模型大鼠具有一定的保护作用, 其作用机制可能与抑制炎症反应和氧化应激反应, 下调Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 的mRNA表达有关。

**关键词** 百里香醌; 脂多糖; 心肌纤维化; 炎症反应; 氧化应激; 调控基因; 大鼠

## Study on Protective Effect and Its Mechanism of Thymoquinone on Myocardial Fibrosis Induced by Lipopolysaccharide in Rats

CAI Wei<sup>1,2</sup>, YANG Jiadan<sup>3</sup>, GAO Shan<sup>1</sup>, LI Shiqin<sup>1</sup>, WANG Shurong<sup>4</sup> (1. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. Dept of Pharmacy, Yibin the Second Hospital of TCM, Sichuan Yibin 644000, China; 3. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the protective effect and its mechanism of thymoquinone (TQ) on myocardial fibrosis (MF) induced by lipopolysaccharide in rats. METHODS: Totally 40 male Wistar rats were randomly divided into control group, model group, TQ low-dose and high-dose groups [5, 10 mg/(kg·d)], with 10 rats in each group. Except that control group was given constant volume of normal saline intraperitoneally, other groups were given LPS intraperitoneally to induce MF model, once a day, for consecutive 3 weeks. Since the first day of modeling, administration group was given relevant medicine intraperitoneally, once a day, for consecutive 3 weeks. After last medication, ELISA method was used to detect the contents of serum inflammation factors (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in rats. Cardiac mass parameters (HW/BM, LVW/BW) were weighed and calculated. HE staining was used to observe the histopathological changes of myocardial tissue. The contents or activities of oxidative stress indicators (MDA, SOD) and myocardial collagen indexes (HYP, Col-I, Col-III) were detected by chemical analysis, xanthine oxidase method or ELISA. mRNA expression of regulation genes (Col-I, Col-III, MMP-3, MMP-9, TGF- $\beta_1$  and Smad3) related to myocardial fibrosis were determined by real-time fluorescence quantitative PCR. RESULTS: Compared with

<sup>Δ</sup>基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603330);重庆市科卫联合中医药科技项目(No.ZY201802043)

\* 主管药师, 硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:0831-7180125。E-mail:490534361@qq.com

# 通信作者:副主任药师, 硕士。研究方向:临床药学。E-mail:wangshurong11@126.com

control group, there were swollen myocardial cells, disordered nuclei of different sizes and visible fiber hyperplasia in model group; the levels of serum inflammatory factors and LVW/BW, cardiac contents of MDA, HYP, Col-I and Col-III, mRNA expression of Col-III, TGF- $\beta_1$  and Smad3 in model group were increased significantly ( $P <$

0.05), while SOD activity was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the degree of myocardial fibrosis was improved in TQ groups to different extents; serum content of IL-1 $\beta$  and the contents of MDA, HYP and Col- I in cardiac tissue in TQ low-dose group, serum contents of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , LVW/BW and the contents of MDA, HYP, Col- I and Col- III in cardiac tissue of TQ high-dose group as well as mRNA expression of Col- I, Col- III, TGF- $\beta_1$  in TQ groups were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The activities of SOD in cardiac tissue were increased significantly in TQ groups ( $P < 0.05$ ). There was no statistical significance in other indexes among groups ( $P > 0.05$ ). CONCLUSIONS: TQ can protect against MF model rats to certain extent, the mechanism of which may be associated with the inhibition of inflammation reaction and oxidant stress reaction, and down-regulation of mRNA expression of Col- I, Col-III and TGF- $\beta_1$ .

**KEYWORDS** Thymoquinone; Lipopolysaccharide; Myocardial fibrosis; Inflammatory reaction; Oxidative stress; Regulation genes; Rat

心肌纤维化(MF)是高血压、病毒性心肌炎、糖尿病心肌病、心力衰竭等众多心血管疾病发展至终末期的病理表现,可导致患者心肌僵硬增加、心室舒张功能减退,并引发心律失常,甚至导致猝死,是影响心血管疾病患者预后极为重要的因素之一<sup>[1-2]</sup>。MF的形成与转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )的产生和分泌、基质金属蛋白酶(MMP)及金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)的失衡、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)以及炎症反应、氧化应激反应的调控等诸多机制关系密切,其中炎症反应和氧化应激反应在MF的形成过程中发挥着极其重要的作用<sup>[3-4]</sup>。此外,高脂膳食、吸烟、消耗性疾病、2型糖尿病等均可诱发代谢性内毒素血症<sup>[5]</sup>,而体循环中低剂量内毒素或脂多糖(LPS)的慢性刺激又可进一步诱发炎症反应和氧化应激反应,造成心肌胶原纤维的过量积聚,最终导致MF的发生<sup>[6]</sup>。

黑种草(*Nigella glandulifera* Freyn)为毛茛科多年生草本植物。黑种草籽油是采用冷压萃取法从该植物中提取的油类物质,可用于烹饪、医疗和美容,百里香醌(Thymoquinone, TQ)是其中的主要活性成分。近年来研究发现, TQ具有抗炎和抑制氧化应激反应的药理活性,可降低实验动物体内白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、IL-6、IL-18、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽的含量或活性<sup>[7-8]</sup>,具有抗纤维化的药理基础。鉴于此,本研究通过LPS诱导复制大鼠MF模型,初步探讨TQ对模型大鼠的保护作用及可能机制,以期阐明其抗MF的药理作用机制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BH-2型光学显微镜(日本Olympus公司);U-2000型紫外-可见分光光度计(日本Hitachi公司);BS223S型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];CFX Connect™型实时定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司);SpectraMaxM3型酶标仪(美国MDS公司);Centrifuge 5427R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

### 1.2 药品与试剂

TQ原料药(批号:117M3245F,纯度:>98%)、LPS(批号:113M4068V)均购自美国Sigma Aldrich公司;IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(美国eBioscience公司,批号分别为76851243、76645023、76756032);羟脯氨酸(HYP)、SOD、MDA检测试剂盒,苏木精-伊红(HE)染色液、Trizol总RNA抽提试剂(南京建成生物工程研究所,批号分别为20170219、20170105、20170213、20170806、20170103);大鼠I型胶原蛋白(Col- I)、Col-III ELISA检测试剂盒(上海恪敏生物科技有限公司,批号分别为20170223、20170125);SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒(含SYBR green I、PCR Buffer、无RNase水等试剂,日本TOYOBO公司,批号:QPK-201T);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 动物

清洁级雄性Wistar大鼠40只,4~8月龄,体质量250~300 g,由成都达硕实验动物有限公司提供[生产许可证号:SCXK(川)2015-030]。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模和给药

将40只大鼠适应性喂养1周后,随机分为对照组、模型组[LPS 1 mg/(kg·d)]和TQ低、高剂量组[LPS 1 mg/(kg·d)+TQ 5、10 mg/(kg·d), TQ剂量设置参考文献[9]和本课题组前期预试验结果],每组10只。除对照组大鼠腹腔注射与模型组等体积的生理盐水外,其余各组大鼠均腹腔注射LPS[1 mg/(kg·d)]复制MF模型,每天1次,连续3周<sup>[10]</sup>。自造模第1天起,各给药组大鼠均腹腔注射相应药物(以生理盐水为溶剂),每天1次,连续3周。

### 2.2 血清炎症因子的检测

末次给药后,所有大鼠均禁食24 h,用10%水合氯醛(0.3 mL/kg)进行麻醉,于右心室取血5 mL,3 000 r/min离心10 min,分离上层血清于EP管中,置于4℃冰箱保存。采用ELISA法以酶标仪检测各组大鼠血清中IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量,严格按照相关试剂盒说明书操作。

### 2.3 心脏质量参数的检测

取血后,称定所有大鼠的体质量(BW, g);随后将其处死,开胸取出心脏,除去大血管、心外膜等组织,用生

理盐水清洗、滤纸吸干后,称定其全心质量(HW,mg)和左心室质量(LVW,mg),并计算心脏质量指数(HW/BW,mg/g)和左心室质量指数(LVW/BW,mg/g)。

## 2.4 心肌组织的病理学观察

随机选取“2.3”项下各组大鼠3只的心脏置于4%多聚甲醛中,固定24h;常规石蜡包埋、切片(约4~6 μm)、脱蜡、脱水,行常规HE染色。以中性树胶封片后,置于光学显微镜下观察,每张切片(×200)随机取10个视野进行观察并拍照(经染色后,细胞核呈蓝色,细胞浆及其他组织呈粉色)。

## 2.5 心肌组织中氧化应激和心肌胶原指标的检测

取各组大鼠心脏,以生理盐水清洗、滤纸吸干,取左心室近心尖1/2处心肌下部组织适量,研磨成组织匀浆,检测大鼠心肌组织中氧化应激指标(MDA、SOD)和心肌胶原指标(HYP、Col-I、Col-III)的含量或活性:采用化学分析法以紫外-可见分光光度计检测心肌组织中HYP、MDA含量,采用黄嘌呤氧化酶法以紫外-可见分光光度计检测SOD活性,采用ELISA法以酶标仪检测Col-I、Col-III含量,严格按照相关试剂盒说明书操作。

## 2.6 心肌组织中MF相关调控基因mRNA表达的检测

取“2.5”项下心肌下部组织适量,采用Trizol一步法提取大鼠心肌组织总RNA,使用紫外-分光光度计测定其纯度。将总RNA反转录为cDNA,使用Primer 5.0软件设计Col-I、Col-III、MMP-3、MMP-9、TGF-β<sub>1</sub>、Smad3、β-actin的PCR引物(其序列见表1),使用SYBR Green荧光定量PCR试剂盒,采用实时荧光定量PCR法以实时定量PCR仪进行扩增。反应体系(共50 μL):cDNA 1 μL,上、下游引物对(25 μmol/L)各0.6 μL,2×PCR Buffer 25 μL,20×SYBR green I 0.3 μL,无RNase水22.5 μL。反应条件:94℃预变性4min;94℃变性20s,60℃退火30s,72℃延伸30s,共循环35次。以β-actin为内参,生成各目的mRNA的标准曲线、扩增曲线及熔解曲线,采用相对比值法以CFX Manager™ V2.1软件计算各目的mRNA的相对表达量(即目的mRNA的Ct值与内参mRNA的Ct值的比值,Ct值表示每个反应管内荧光信号强度达到设定阈值时所经历的循环数)。

## 2.7 统计学方法

采用SPSS 15.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用双因素方差分析或Dunnett-*t*检验。检验水准 $\alpha$ 为0.05, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TQ对MF模型大鼠血清IL-1β、IL-6、TNF-α含量的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清IL-1β、IL-6、TNF-α含量均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,TQ低剂量组大鼠血清IL-1β含量以及TQ高剂量组大鼠血清IL-1β、IL-6、TNF-α含量均显著降低,

差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );而TQ低剂量组大鼠血清IL-6、TNF-α含量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表2。

表1 PCR引物序列

Tab 1 PCR primers

基因名称	引物序列	扩增产物长度, bp
Col-I	上游:5'-CAGGGTTTCAGAGCACCATT-3'	159
	下游:5'-CGTTGGGTCATTTCACAT-3'	
Col-III	上游:5'-GGCTCAAATGGCTCTCCAG-3'	112
	下游:5'-GGCTCAAATGGCTCTCCAG-3'	
MMP-2	上游:5'-CACTGTGGGTGAAATTCAGA-3'	480
	下游:5'-GTCCGCCAAATAAACCGATC-3'	
MMP-9	上游:5'-CCCACCTACTTTG-GAAACGC-3'	229
	下游:5'-CGAAGATGAATGGAAATACGC-3'	
TGF-β <sub>1</sub>	上游:5'-TGCCTGCAGAGATTCAAG-3'	82
	下游:5'-AGGTAACGCCAGGAATTTGTGCTA-3'	
Smad3	上游:5'-GATGCTTCGTGACATTGGAACCTA-3'	145
	下游:5'-TTCCACGTTTAAATGCTGCTG-3'	
β-actin	上游:5'-TTGTACATGCCCTGCCAGGTC-3'	560
	下游:5'-GCTCCTTATGTCACGCAGATTC-3'	

### 表2 TQ对MF模型大鼠血清IL-1β、IL-6、TNF-α含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 2 Effects of TQ on serum contents of IL-1β, IL-6 and TNF-α in MF model rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	IL-1β, pg/mL	IL-6, pg/mL	TNF-α, ng/L
对照组	7.25 ± 1.32	75.64 ± 6.34	82.34 ± 6.25
模型组	25.48 ± 3.11*	112.31 ± 8.32*	125.26 ± 8.34*
TQ低剂量组	12.59 ± 1.52*	107.23 ± 7.44	121.36 ± 8.56
TQ高剂量组	10.74 ± 1.37*	85.23 ± 5.38*	92.61 ± 6.18*

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. control group,\* $P < 0.05$ ;vs. model group,\* $P < 0.05$

### 3.2 TQ对MF模型大鼠心脏质量参数的影响

与对照组比较,模型组大鼠LVW/BW显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );其余指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与模型组比较,TQ高剂量组大鼠LVW/BW显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );其余指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表3。

### 表3 TQ对MF模型大鼠心脏质量参数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 3 Effects of TQ on cardiac mass parameters in MF model rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	HW/BW, mg/g	LVW/BW, mg/g
对照组	3.85 ± 0.12	3.02 ± 0.16
模型组	3.92 ± 0.24	3.41 ± 0.07*
TQ低剂量组	3.91 ± 0.15	3.31 ± 0.16
TQ高剂量组	3.93 ± 0.17	3.08 ± 0.12*

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$

Note: vs. control group,\* $P < 0.05$ ;vs. model group,\* $P < 0.05$

### 3.3 TQ对MF模型大鼠心肌组织病理变化的影响

对照组大鼠心肌组织细胞排列整齐,横纹清晰,细胞核大小一致;模型组大鼠心肌细胞肿胀,细胞核大小不一,且排列紊乱,可见明显的纤维增生。与模型组比较,TQ各剂量组大鼠心肌细胞上述症状均呈不同程度

的改善,且TQ高剂量组较TQ低剂量改善更明显,详见图1。

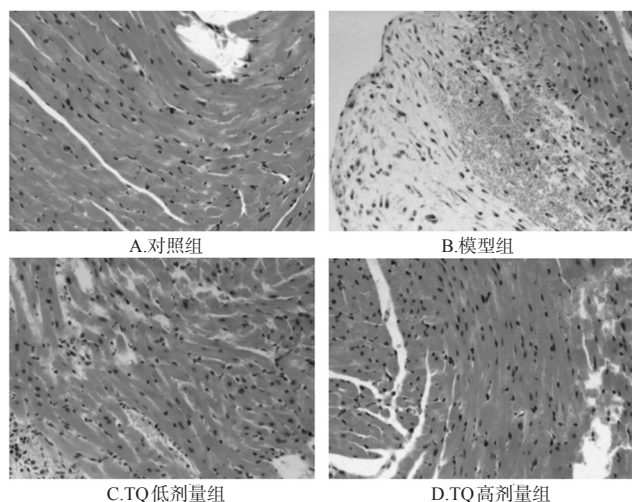


图1 各组大鼠心肌组织病理学切片显微图(HE染色,×200)

Fig 1 Histopathological micrographs of myocardium in rats of each group (HE staining, ×200)

### 3.4 TQ对MF模型大鼠心肌组织中氧化应激指标的影响

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中MDA含量显著升高,SOD活性显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比较,TQ各剂量组大鼠心肌组织中MDA含量均显著降低,SOD活性均显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),详见表4。

表4 TQ对MF模型大鼠心肌组织中氧化应激和心肌胶原指标的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 4 Effects of TQ on oxidative stress and myocardial collagen indexes in myocardial tissue of MF model rats( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	MDA, $\mu\text{mol/L}$	SOD, U/mL	HYP, $\mu\text{g/mL}$	Col-I, ng/mL	Col-III, ng/mL
对照组	1.18±0.11	70.36±7.35	10.25±2.02	42.31±5.12	30.55±4.23
模型组	2.64±0.15*	43.15±5.24*	23.43±1.84*	106.52±8.32*	70.52±7.63*
TQ低剂量组	2.05±0.14 <sup>#</sup>	65.41±7.10 <sup>#</sup>	16.81±1.81 <sup>#</sup>	62.52±5.01 <sup>#</sup>	65.42±5.61
TQ高剂量组	1.57±0.13 <sup>#</sup>	66.32±5.38 <sup>#</sup>	14.62±1.33 <sup>#</sup>	60.51±7.01 <sup>#</sup>	42.52±4.52 <sup>#</sup>

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$

Note: vs. control group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$

### 3.5 TQ对MF模型大鼠心肌组织中心肌胶原指标的影响

与对照组比较,模型组大鼠心肌组织中HYP、Col-I、Col-III含量均显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。与模型组比较,TQ低剂量组大鼠心肌组织中HYP、Col-I含量以及TQ高剂量组大鼠心肌组织中HYP、Col-I、Col-III含量均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );而TQ低剂量组大鼠心肌组织中Col-III含量差异无统计学意义( $P>0.05$ ),详见表4。

### 3.6 TQ对MF模型大鼠MF相关调控基因mRNA表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 、Smad3的mRNA相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );其余基因的mRNA相对表达量均无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,TQ各给药组大鼠Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 的mRNA相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );其余基因的mRNA相对表达量差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),详见表5。

表5 TQ对MF模型大鼠MF相关调控基因mRNA表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 5 Effects of TQ on mRNA expression of cardiac fibrosis-related regulation genes in MF model rats( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	Col-I	Col-III	MMP-2	MMP-9	TGF- $\beta_1$	Smad3
对照组	1.00±0.12	1.00±0.15	1.00±0.13	1.00±0.14	1.00±0.13	1.00±0.08
模型组	2.56±0.26*	2.35±0.16*	0.91±0.15	0.93±0.12	1.84±0.15*	1.54±0.17*
TQ低剂量组	1.64±0.19 <sup>#</sup>	1.52±0.16 <sup>#</sup>	1.01±0.14	0.96±0.15	1.25±0.15 <sup>#</sup>	1.45±0.12
TQ高剂量组	1.54±0.12 <sup>#</sup>	1.24±0.16 <sup>#</sup>	1.03±0.15	1.07±0.19	1.11±0.15 <sup>#</sup>	1.60±0.12

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$

Note: vs. control group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$

### 4 讨论

TQ作为一种天然活性成分,除具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化作用外,还具有抑制肝纤维化<sup>[11]</sup>、肾纤维化<sup>[9]</sup>和肺纤维化<sup>[12]</sup>的药理作用,具有一定的抗纤维化药理基础,但对于其是否能够有效抑制MF的形成及其可能机制,目前尚鲜有报道。MF是影响心血管疾病患者预后的重要因素,加之临床尚缺乏理想的治疗手段,故抗MF新药的研发具有重要的临床意义<sup>[1-2]</sup>。为此,本研究初步探讨了TQ对MF模型大鼠的保护作用及其可能机制。

MF动物模型的复制方法包括压力超负荷诱导、免疫损伤诱导、缺血诱导、炎症诱导等,其中LPS诱导较为常用。LPS是革兰氏阴性菌细胞壁中的一种成分,可与宿主细胞细胞膜上的Toll样受体(TLRs)结合,随后依次与接头蛋白(MyD88)、白细胞介素1受体相关激酶(IRAKs)结合,启动与天然免疫和炎症反应相关的基因转录,诱导机体免疫应答的发生,并促进多种细胞因子和生长因子的释放,导致心肌组织结构紊乱并最终进展为MF<sup>[5,13]</sup>。前期研究表明,TQ具有抗炎效应,能够降低实验动物体内IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18、TNF- $\alpha$ 水平<sup>[7-8]</sup>,故本研究参考文献[10]方法,选用LPS诱导复制MF大鼠模型,用以探讨TQ对其相关指标的影响。

IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 是炎症反应中重要的炎症因子,在MF发生发展的过程中具有促进作用。其中,IL-1 $\beta$ 可上调多种MMP蛋白的表达水平,并提高纤连蛋白的表达水平;IL-6可激活细胞内JAK/STAT、Ras/Raf等信号通路,使心肌成纤维细胞胶原合成显著增加,并诱导心肌

成纤维细胞向肌成纤维细胞转化;TNF- $\alpha$ 可能参与了心肌细胞的坏死和凋亡过程,并限制TIMP的表达<sup>[14]</sup>。本研究采用ELISA法检测各组大鼠血清炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )的含量。结果显示,与对照组比较,模型组大鼠上述炎症因子含量均显著升高,差异均有统计学意义。这提示LPS可增加大鼠血清炎症因子的表达,MF模型复制成功。与模型组比较,TQ低剂量组大鼠血清IL-1 $\beta$ 含量以及TQ高剂量组大鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均显著降低。这表明低、高剂量TQ可不同程度地降低MF模型大鼠血清中炎症因子的表达,与Alkharfy KM等<sup>[15]</sup>的研究结果基本一致,提示TQ抗MF作用可能与其抗炎作用有关。

心肌胶原过度沉积是MF形成的关键因素及病理基础。在正常生理条件下,心肌胶原适度表达,可有助于维持心脏的几何构型,并保证心肌舒缩的协调性;然而在致病条件下,心肌胶原的过度沉积可增加心室壁的僵硬,降低其顺应性,最终导致MF的发生<sup>[2]</sup>。同时,氧化应激可通过多种信号通路导致心肌细胞坏死、凋亡,促进血管内皮功能紊乱,从而加速MF的形成与发展<sup>[4,16]</sup>。由此可见,氧化应激和心肌胶原相关因子(如MDA、SOD、HYP、Col-I、Col-III)参与了MF的发生与发展过程。其中,氧化应激是由活性分子(如活性氧簇)的生成增加或清除减少而抗氧化酶(如SOD)活性减弱所致;同时,作为脂质过氧化物产物的MDA亦可间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度<sup>[16]</sup>。HYP是胶原组织的主要成分之一,是胶原中特有的氨基酸成分,约占胶原氨基酸总量的13%,其表达水平可间接反映心肌胶原的含量<sup>[17]</sup>。心肌胶原共有5种类型,在心肌组织中以Col-I和Col-III为主。Col-I有较大的抗牵拉性,主要用于保持心室壁的力量;Col-III具有较强的伸展性和弹性,与心室肌有效收缩及泵血功能有关<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,与对照组比较,模型组大鼠心肌细胞肿胀,细胞核大小不一且排列紊乱,纤维增生明显,其LVW/BW以及心肌组织中MDA、HYP、Col-I、Col-III含量均显著升高,SOD活性显著减弱。这提示LPS可促进大鼠心肌细胞纤维化,并增加其心肌胶原含量,降低其抗氧化能力。与模型组比较,TQ各剂量组大鼠心肌细胞纤维化程度呈现不同程度的改善,TQ高剂量组大鼠LVW/BW、心肌组织Col-III含量以及TQ各剂量组大鼠心肌组织MDA、HYP、Col-I含量均显著降低,TQ各剂量组大鼠心肌组织SOD活性均显著升高。这提示TQ具有一定的抗氧化应激活性,并可减轻MF模型大鼠的MF程度。

除心肌胶原相关因子外,TGF- $\beta_1$ /Smads通路和MMP也是影响MF的重要机制,其中TGF- $\beta_1$ 和Smad3是TGF- $\beta_1$ /Smads通路的关键因子,MMP-2和MMP-9是MMP的主要代表,TGF- $\beta_1$ 、Smad3的上调以及MMPs的下调均有可能促进MF进展<sup>[2]</sup>。由此可见,Col-I、Col-

III、MMP-3、MMP-9、TGF- $\beta_1$ 、Smad3等的mRNA表达与MF有关。本研究通过实时荧光定量PCR法检测后发现,与对照组比较,模型组大鼠Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 、Smad3的mRNA相对表达量均显著升高。这提示上述基因可能参与了MF的发生。与模型组比较,TQ各剂量组大鼠Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 的mRNA相对表达量均显著降低;而模型组大鼠MMP-2、MMP-9的mRNA相对表达量与对照组比较,TQ各剂量组大鼠MMP-2、MMP-9、Smad3的mRNA相对表达量与模型组比较,差异均无统计学意义。这提示TQ抗MF作用可能与下调Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 的mRNA表达有关,上述基因可能是TQ作用靶点之一;而MMP与MF的发生及TQ抗MF作用是否相关尚有待后续研究深入探讨。

综上所述,TQ对MF模型大鼠具有一定的保护作用,其作用机制可能与抑制炎症反应和氧化应激反应,下调Col-I、Col-III、TGF- $\beta_1$ 的mRNA表达有关。但MF的发病机制复杂,且各致病因素相互影响、相互依存,故上述结论及具体作用机制仍有待后续研究进一步证实。

### 参考文献

- [1] IACOPO F, LORENZO C, CALOGERO E, et al. Review in translational cardiology: microRNAs and myocardial fibrosis in aortic valve stenosis, a deep insight on left ventricular remodeling[J]. *J Cardiovasc Echogr*, 2016, 26(4):109-114.
- [2] HEYMANS S, GONZÁLEZ A, PIZARD A, et al. Searching for new mechanisms of myocardial fibrosis with diagnostic and/or therapeutic potential[J]. *Eur J Heart Fail*, 2015, 17(8):764-771.
- [3] BAO JW, SUN B, MA PP, et al. Rosuvastatin inhibits inflammatory response and resists fibrosis after myocardial infarction[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(1):238-245.
- [4] VILAHUR G, CASANÍ L1, PEÑA E, et al. Silybum marianum provides cardioprotection and limits adverse remodeling post-myocardial infarction by mitigating oxidative stress and reactive fibrosis[J]. *Int J Cardiol*, 2018. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.06.030.
- [5] LEW WY, BAYNA E, MOLLE ED, et al. Recurrent exposure to subclinical lipopolysaccharide increases mortality and induces cardiac fibrosis in mice[J]. *PLoS One*, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0061057.
- [6] LEW WY, BAYNA E, MOLLE ED, et al. Myocardial fibrosis induced by exposure to subclinical lipopolysaccharide is associated with decreased miR-29c and enhanced NOX2 expression in mice[J]. *PLoS One*, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107556.
- [7] SHATERZADEH-YAZDI H, NOORBAKSH MF, HAYATI F, et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of thymoquinone[J]. *Cardiovasc Hematol Disord*

# HPLC法同时测定雌激素类药物尼尔雌醇片和己烯雌酚片中主药含量<sup>Δ</sup>

孙婷<sup>1\*</sup>, 张菁<sup>1</sup>, 刘云<sup>2</sup>, 姜建国<sup>1#</sup>, 蒋凝<sup>1</sup>(1.河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2.石家庄市食品药品监督管理局检验中心, 石家庄 050011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0469-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.08

**摘要** 目的:建立同时测定尼尔雌醇片和己烯雌酚片中主药含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Symmetry C<sub>18</sub>, 流动相为 0.02 mol/L 乙酸铵水溶液-乙腈(40:60, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 20 μL。结果:尼尔雌醇、己烯雌酚检测质量浓度线性范围均为 0.01~0.5 mg/mL (*r* 均为 0.999 9); 定量限分别为 187、192 ng/mL, 检测限分别为 56、58 ng/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 1% (*n*=6); 加样回收率分别为 99.13%~100.80% (RSD=0.52%, *n*=9)、99.20%~100.90% (RSD=0.58%, *n*=9)。结论:该方法灵敏度高、重复性好, 可用于同时测定雌激素类药物尼尔雌醇片中尼尔雌醇和己烯雌酚片中己烯雌酚的含量。

**关键词** 高效液相色谱法; 雌激素类药物; 尼尔雌醇; 己烯雌酚; 含量测定

## Simultaneous Determination of Main Components in Estrogenic Hormone Drug Nilestriol Tablets and Diethylstilbestrol Tablets by HPLC

SUN Ting<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, LIU Yun<sup>2</sup>, JIANG Jianguo<sup>1</sup>, JIANG Ning<sup>1</sup> (1.Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2.Shijiazhuang Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

*Drug Targets*, 2018, 18(1):52-60.

- [8] CHEN Y, WANG B, ZHAO H. Thymoquinone reduces spinal cord injury by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and apoptosis via PPAR-gamma and PI3K/Akt pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6):4987-4994.
- [9] BARGI R, ASGHARZADEH F, BEHESHTI F, et al. Thymoquinone protects the rat kidneys against renal fibrosis [J]. *Res Pharm Sci*, 2017, 12(6):479-487.
- [10] NOROUZI F, ABARESHI A, ASGHARZADEH F, et al. The effect of Nigella sativa on inflammation-induced myocardial fibrosis in male rats[J]. *Res Pharm Sci*, 2017, 12(1):74-81.
- [11] ASGHARZADEH F, BARGI R, BEHESHTI F, et al. Thymoquinone restores liver fibrosis and improves oxidative stress status in a lipopolysaccharide-induced inflammation model in rats[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2017, 7(6):502-510.
- [12] POURGHOLAMHOSSEIN F, SHARIFIFAR F, RA-SOOLI R, et al. Thymoquinone effectively alleviates lung fibrosis induced by paraquat herbicide through down-regulation of pro-fibrotic genes and inhibition of oxidative stress[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016. DOI: 10.1016/j.etap.2016.06.019.
- [13] CHEN X, TANG Y, GAO M, et al. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in myocardial fibrosis in rat offspring[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5):10986-10996.
- [14] KAWARATANI H, MORIYA K, NAMISAKI T, et al. Therapeutic strategies for alcoholic liver disease: focusing on inflammation and fibrosis: review[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2):263-270.
- [15] ALKHARFY KM, AHMAD A, JAN BL, et al. Thymoquinone reduces mortality and suppresses early acute inflammatory markers of sepsis in a mouse model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.028.
- [16] WANG LP, FAN SJ, LI SM, et al. Oxidative stress promotes myocardial fibrosis by upregulating K<sub>cs</sub>3.1 channel expression in AGT-REN double transgenic hypertensive mice[J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(9):1061-1071.
- [17] XIAO T, LUO J, WU Z, et al. Effects of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and PI3K/AKT1-regulated autophagy in diabetic rats[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2):1765-1773.
- [18] 吴限, 黎明江, 李莎. 心肌纤维化病理染色鉴定方法的综合评价[J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(9):34-37.

Δ 基金项目: 国家科技重大专项课题(No.2017zx09101001); 河北省科技计划项目(No.162777244)

\* 高级工程师, 硕士。研究方向: 药物分析、仿制药疗效与质量一致性评价研究。电话: 0311-85212008。E-mail: 122547652@qq.com

# 通信作者: 主任药师, 硕士。研究方向: 药物分析、仿制药疗效与质量一致性评价研究。电话: 0311-85212008。E-mail: me-shall1983@126.com

(收稿日期: 2018-10-17 修回日期: 2018-12-07)

(编辑: 张元媛)