熊果苷对心肌纤维化模型大鼠的改善作用及机制研究Δ

张明昊*，吴星霏，吴刘俊，申艳朵，张家乐，谢秉恒，王瑾瑾#（河南中医药大学医学院，郑州 450046）

中图分类号 R965；R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）05-0529-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.05.04

摘 要 目的 研究熊果苷对心肌纤维化（MF）模型大鼠的改善作用及机制。**方法** 采用网络药理学方法预测熊果苷改善MF的潜在靶点并进行分子对接验证。将50只SD大鼠皮下注射异丙肾上腺素（5 mg/kg，每天1次，连续14 d）复制MF模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、卡托普利组（9 mg/kg）和熊果苷低、中、高剂量组（50、100、200 mg/kg），每组10只；另取10只未造模大鼠作为正常组。各组大鼠给予相应药物干预，每天1次，连续28 d。末次给药24 h后，检测大鼠心电图、心脏相关指数[心脏质量指数（HWI）、左心室质量指数（LVWI）]，检测大鼠心肌组织中肌酸激酶（CK）、乳酸脱氢酶（LDH）、N末端前脑钠肽前体（NT-proBNP）、Ⅰ型胶原蛋白（Col Ⅰ）、Col Ⅲ水平，观察大鼠心肌组织病理形态学变化，检测大鼠心肌组织中腺苷脱氨酶（ADA）、腺苷激酶（ADK）蛋白及其mRNA表达水平。**结果** 网络药理学结果显示，熊果苷改善MF的主要靶点为ADA、ADK。分子对接结果显示，熊果苷与ADA、ADK结合稳定。验证实验结果显示，与模型组比较，各给药组大鼠心电图ST波段和T波的振幅有所恢复，心房出现扑动的症状减轻；HWI（熊果苷中剂量组除外）、LVWI和心肌组织中CK、LDH、NT-proBNP、Col Ⅰ、Col Ⅲ水平均显著降低（$P<0.05$）；大鼠心肌纤维化程度减轻；心肌组织中ADA、ADK蛋白及其mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。**结论** 熊果苷可改善MF模型大鼠心脏纤维化和心脏功能，其作用机制可能与上调ADA、ADK蛋白及其mRNA表达，影响核苷酸代谢及胶原生成有关。

关键词 熊果苷；心肌纤维化；网络药理学；腺苷脱氨酶；腺苷激酶

Improvement effect of arbutin on myocardial fibrosis model rats and its mechanism

ZHANG Minghao, WU Xingfei, WU Liujun, SHEN Yanduo, ZHANG Jiale, XIE Bingheng, WANG Jinjin (Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To study the improvement effects of arbutin on myocardial fibrosis (MF) model rats and its mechanism. **METHODS** The network pharmacology was used to predict the potential target of arbutin in improving MF and molecular docking was used to validated. Totally 50 SD rats were given isoprenaline subcutaneously (5 mg/kg, once a day, for 14 consecutive days) to induce the MF model. Modeled rats were randomly divided into model group, captopril group (9 mg/kg), arbutin low-dose, medium-dose and high-dose groups (50, 100, 200 mg/kg), with 10 rats in each group. Another 10 healthy rats were included as normal group. Each group was given the corresponding drugs, once a day, for 28 consecutive days. Twenty-four hours after the final administration, electrocardiograms and heart-related indexes [heart weight index (HWI), left ventricular weight index (LVWI)] of rats were detected; the levels of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) and type Ⅰ collagen (Col Ⅰ) and Col Ⅲ were detected in myocardial tissue of rats; the pathological changes of myocardial tissue were observed, and protein and mRNA expressions of adenosine deaminase (ADA) and adenosine kinase (ADK) were detected in the myocardial tissue of rats. **RESULTS** The results of network pharmacology showed that the main targets of arbutin improving MF were ADA and ADK. The results of molecular docking showed that arbutin bind stably with ADA and ADK. The results of experimental verification showed that compared with model group, the amplitude of ST and T waves in electrocardiogram were improved in administration groups, and the symptoms of atrial flutter were alleviated; HWI (except for arbutin medium-dose group), LVWI, the levels of CK, LDH, NT-proBNP, Col Ⅰ and Col Ⅲ in the myocardial tissue of rats were decreased significantly ($P<0.05$); the degree of myocardial fibrosis in rats decreased; protein and mRNA expressions of ADA and ADK in the myocardial tissue were significantly increased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Arbutin can improve cardiac fibrosis and cardiac function of MF model rats, the mechanism of which may be associated with up-regulating protein and mRNA expressions of ADA and ADK, influencing the nucleotide metabolism and collagen generation.

KEYWORDS arbutin; myocardial fibrosis; network pharmacology; adenosine deaminase; adenosine kinase

Δ**基金项目** 国家自然科学基金项目（No.82104748）；河南省自然科学基金项目（No.202300410253）；河南省高等学校青年骨干教师培养计划（No.2020GGJS109）

＊**第一作者** 高级实验师，硕士。研究方向：基础药理学。E-mail：zhangminghao@hactcm.edu.cn

通信作者 副教授，博士。研究方向：预防医学。E-mail：wangjinjin@hactcm.edu.cn

心肌纤维化（myocardial fibrosis，MF）是多种心血管疾病发展至终末期的共同病理途径，以心肌顺应性下降、僵硬、收缩和舒张功能减退及电生理过程紊乱引发的心律失常和心力衰竭为临床特征[1]。西医治疗MF以强心、利尿、扩张血管及抑制神经内分泌药物为主[2]，虽能改善临床症状，但难以逆转MF进程。中医古籍虽无MF的记载，但依据患者临床表现可将其归为“胸痹”“心悸”“喘证”范畴，慢性心脏疾病使血行不利成瘀，瘀血化生痰饮，痰瘀互结，日久易引发蕴毒，蚀肌伤肉，终至MF[3]。

熊果苷是一种糖苷类化合物，化学名为对苯二酚葡萄糖苷，存在于杜鹃花科植物熊果叶中，具有抑制黑色素形成、抗氧化、抗炎、抑菌、镇咳、祛痰、抗肿瘤等药理作用[4]。有研究表明，熊果苷可以减轻炎症反应，对阵发性心房颤动模型大鼠的心脏具有保护作用[5]。但是熊果苷是否对MF具有改善作用尚不明确。基于此，本研究首先采用网络药理学与分子对接方法预测熊果苷干预MF的潜在靶点，再以卡托普利为阳性对照药物，观察熊果苷对MF模型大鼠心脏功能、病理变化及纤维化的影响，并验证熊果苷改善MF的潜在靶点，以期为挖掘MF的潜在治疗药物奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有BSA124S-CW型电子天平（德国Sartorius公司），BL-420F型生物信号采集系统（成都泰盟软件有限公司），SpectraMax iD3型酶标仪[美谷分子仪器（上海）有限公司]，RM2235型石蜡切片机（德国Leica公司），L720R-3型冷冻离心机（湘仪离心机仪器有限公司），YD-6D型组织包埋机、YD-A型组织摊片机、YD-B型组织烤片机（金华市科迪仪器设备有限公司），CX23型光学显微镜（日本Olympus公司），StepOne™型实时荧光定量PCR仪（美国ABI公司）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有熊果苷对照品（上海毕得医药科技股份有限公司，纯度99.92%，批号RNZ339），卡托普利片（常州制药厂有限公司，批号20081513，规格25 mg/片），盐酸异丙肾上腺素注射液（西南药业股份有限公司，批号210901，规格0.5 mg/mL），羧甲基纤维素钠（CMC-Na）（国药集团化学试剂有限公司，批号20160704），氨基甲酸乙酯（天津市光复科技发展有限公司，批号20210902），苏木素染色液、伊红染色液（福州飞净生物科技有限公司，批号分别为190805、20211009），肌酸激酶（creatine kinase，CK）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）、N末端前脑钠肽前体（N-terminal pro-brain natriuretic peptide，NT-proBNP）酶联免疫吸附测定试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号分别为H491-1、H185、H334-1），Ⅰ型胶原蛋白（type Ⅰ collagen，Col Ⅰ）、Col Ⅲ测定试剂盒（江苏酶免实业有限公司，批号分别为MM-0041R1、MM-0080R1），兔通用型免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司，批号分别为SP-9001、ZLI-9018），兔抗大鼠腺苷脱氨酶（adenosine deaminase，ADA）、腺苷激酶（adenosine kinase，ADK）抗体和TriQuick总RNA提取试剂、cDNA合成试剂盒、实时荧光定量PCR扩增试剂（武汉赛维尔生物科技有限公司，批号分别为GB112099-100、GB112419-100、R1100、G3330、G3320）。

1.3 实验动物

本研究所用动物为健康SD大鼠，雌雄各半，8周龄，体重为180～200 g，购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场，动物生产许可证号为SCXK（豫）2019-0002。所有大鼠分笼饲养，室温为20～22 ℃，相对湿度为55%～60%，正常光照，自由饮水采食。本研究获河南中医药大学实验动物伦理委员会批准，编号为DWLL202201010。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 熊果苷-MF共同靶点筛选

通过PubChem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）搜索关键词“arbutin”获取熊果苷分子结构，导入Swiss Target Prediction数据库（https://www.swisstargetprediction.ch），得到熊果苷预测靶点；以“myocardial fibrosis”为关键词在GeneCard数据库（https://www.genecards.org/）、OMIM数据库（https://www.omim.org）、TTD数据库（https://db.idrblab.org/ttd）中搜索靶点，合并去重后得MF相关靶点；再将熊果苷预测靶点与MF相关靶点导入Venny2.1在线绘图工具（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/），绘制Venny图并得到交集靶点，即为熊果苷干预MF的潜在作用靶点。

2.1.2 熊果苷-MF靶点PPI网络构建与核心靶点筛选

将“2.1.1”项下交集靶点导入String数据库（https://cn.string-db.org）进行蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）分析，得PPI网络图；利用Cytoscape 3.9软件对PPI网络进行拓扑学分析，以度（Degree）值大于平均值为标准筛选核心靶点。

2.1.3 GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析

将“2.1.1”项下交集靶点导入DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov），将物种设定为“Homo sapiens”，以$P \leqslant 0.05$为标准，进行基因本体（gene ontology，GO）功能分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）信号通路富集分析。

2.1.4 分子对接

从TCMSP数据库（https://tcmsp-e.com）中下载熊果苷的mol2结构文件；再从PDB数据库（https://www.rcsb.org）中下载核心靶点蛋白的PDB结构文件，利用AutoDock Tools 1.5.7软件将熊果苷与核心靶点进行分子对接，若结合能＜－5 kJ/mol说明2个分子间具有亲和力，且结合能数值越低表明2个分子间的结合越稳定。

最后以PyMOL软件分析分子对接结果，以验证以上网络药理学结果的可靠性。

2.2 实验验证

2.2.1 造模、分组与给药

大鼠适应性饲养1周后，按5 mg/kg皮下注射异丙肾上腺素进行造模，每天1次，连续14 d。造模完成后测定每只大鼠心电图，当大鼠心电图出现T波高耸及ST段呈弓背抬高，则表明MF大鼠模型造模成功[6]。将50只造模成功的大鼠按体重随机分为模型组、卡托普利组（阳性对照，9 mg/kg，为临床等效剂量）和熊果苷低、中、高剂量组（50、100、200 mg/kg，剂量根据文献[5]设置），每组10只；另取10只未经造模的大鼠作为正常组。各给药组大鼠均灌胃给药（临用时用0.1% CMC-Na溶液将药物制成混悬液），灌胃体积均为10 mL/kg；正常组和模型组大鼠灌胃等体积0.1% CMC-Na溶液；每天1次，连续28 d。

2.2.2 大鼠心电图检测

末次给药24 h后，各组大鼠先称重，然后腹腔注射1 g/kg氨基甲酸乙酯进行麻醉，固定四肢，接入导联电极，采用BL-420F生物信号采集系统记录Ⅱ导联心电图，观察大鼠心电图中ST段及T波变化。

2.2.3 取材及处理

待心电图检测完成后，将大鼠颈椎脱臼处死，解剖取心脏，去除周围组织，以生理盐水洗涤后，观察心脏外观形态。采用滤纸吸尽心脏表面液体后称重，然后去除心房及右心室壁，留取左心室，称重。将左心室一分为二，其中一份用4%多聚甲醛固定，另一份用液氮速冻后于－80 ℃下储存。

2.2.4 大鼠心脏相关指数检测

统计各组大鼠体重、心脏重量与左心室重量，计算心脏质量指数（heart weight index，HWI）和左心室质量指数（left ventricle weight index，LVWI），以此来评价心脏病变程度。其中，HWI＝心脏质量（mg）/体重（g），LVWI＝左心室质量（mg）/体重（g）。

2.2.5 大鼠心肌组织中心脏功能及纤维化指标水平检测

称取“2.2.3”项下冻存的心肌组织0.1 g，加入0.9 mL冰生理盐水制备10%匀浆液，以3 000 r/min离心10 min；取上清液，按照相应试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪测定大鼠心肌组织中CK、LDH、NT-proBNP、Col Ⅰ、Col Ⅲ水平。

2.2.6 大鼠心肌组织病理形态学观察

取“2.2.3”项下以4%多聚甲醛固定的心肌组织，经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后制作病理切片（厚度4 μm）。切片经二甲苯脱蜡后，一部分进行苏木素-伊红（HE）染色，然后采用光学显微镜观察心肌组织病理形态学变化。一部分切片进行Masson染色，其中肌纤维呈红色，胶原纤维呈蓝绿色；每只大鼠心肌组织切片在光学显微镜下随机选取1个视野，以蓝绿色为阳性染色，采用Image-Pro Plus 6.0软件测定每个视野中蓝绿色阳性面积与染色总面积，计算阳性面积百分比，以此评价心肌组织纤维化情况。

2.2.7 大鼠心肌组织中ADA、ADK蛋白表达水平检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.2.6”项下制备的组织切片，经二甲苯脱蜡、水化后，用柠檬酸盐缓冲液热修复8 min，待温度降至室温后，依次用H_2O_2孵育10 min、山羊血清孵育30 min，然后滴加ADA（稀释比例为1∶1 000）、ADK（稀释比例为1∶300）抗体，4 ℃孵育过夜；次日切片于37 ℃复温30 min，滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗孵育20 min，磷酸盐缓冲液浸洗，DAB显色10 min，自来水冲洗终止；切片再以苏木素复染3 min，盐酸乙醇分化，自来水再次冲洗蓝化，经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后镜检。每只大鼠心肌组织切片在400倍镜下随机选取1个视野，以棕黄色为阳性染色，采用Image-Pro Plus 6.0软件测定每个视野中积分光密度（integrated optical density，IOD）值，以IOD值表示目的蛋白表达水平。

2.2.8 大鼠心肌组织中ADA、ADK mRNA水平检测

取大鼠心肌组织100 mg，加入1 mL TriQuick试剂充分研磨匀浆后提取组织中总RNA，检测总RNA浓度及纯度，然后将其逆转录为cDNA，并以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR扩增条件如下：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共40个循环。以*GAPDH*基因为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达水平。PCR引物序列由武汉塞维尔生物科技有限公司合成，具体见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
ADA	上游：TCTCTCGCTCCCAGACTTCCT	116
	下游：CTTCCTTTGCCTTCATCTCCAC	
ADK	上游：AGAAATAGCCAGAAAGACGCAGG	198
	下游：GACAGAAACCCTCCTACAAATGC	
GAPDH	上游：CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游：GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.2.9 统计学方法

数据采用SPSS 24.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐时组间两两比较采用LSD-*t*检验，方差不齐时组间两两比较采用Dennett's检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 熊果苷-MF靶点筛选和PPI网络构建结果

经筛选得到熊果苷潜在靶点共14个，MF相关靶点共4 409个，两者的交集靶点共8个。将8个交集靶点导入String数据库后，获得熊果苷-MF靶点PPI网络图（图1），该PPI网络图共包括8个节点和4条边，Degree平均值为1，平均局部聚集系数为0.625。

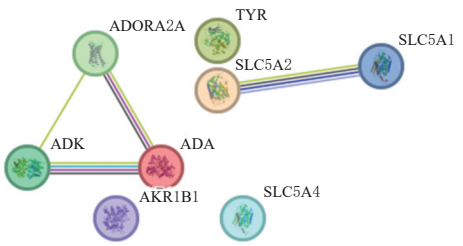


图1　熊果苷-MF靶点PPI网络图

3.1.2　GO功能富集和KEGG信号通路富集分析结果

根据$P \leqslant 0.05$筛选出17个GO功能条目和3条KEGG信号通路，结果见图2。根据以上网络药理学结果预测，熊果苷干预MF的核心靶点为ADA、ADK。

3.1.3　分子对接验证结果

以熊果苷为载体，与ADA、ADK 2个核心靶点进行分子对接，详见图3。结果表明，熊果苷与ADA、ADK的结合能分别为−6.6、−6.8 kJ/mol，均＜−5 kJ/mol，表明熊果苷与ADA、ADK结合稳定。

3.2　实验验证结果

3.2.1　大鼠心电图测定结果

正常组大鼠心电图波形正常；模型组大鼠心电图ST波段下移，T波低平且心房出现扑动；与模型组比较，卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠心电图ST波段和T波的振幅均有所恢复，心房出现扑动的症状减轻。结果见图4。

3.2.2　大鼠心脏相关指数测定结果

与正常组比较，模型组大鼠HWI、LVWI均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠上述指标水平（熊果苷中剂量组HWI除外）均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

3.2.3　大鼠心肌组织中CK、LDH、NT-proBNP水平测定结果

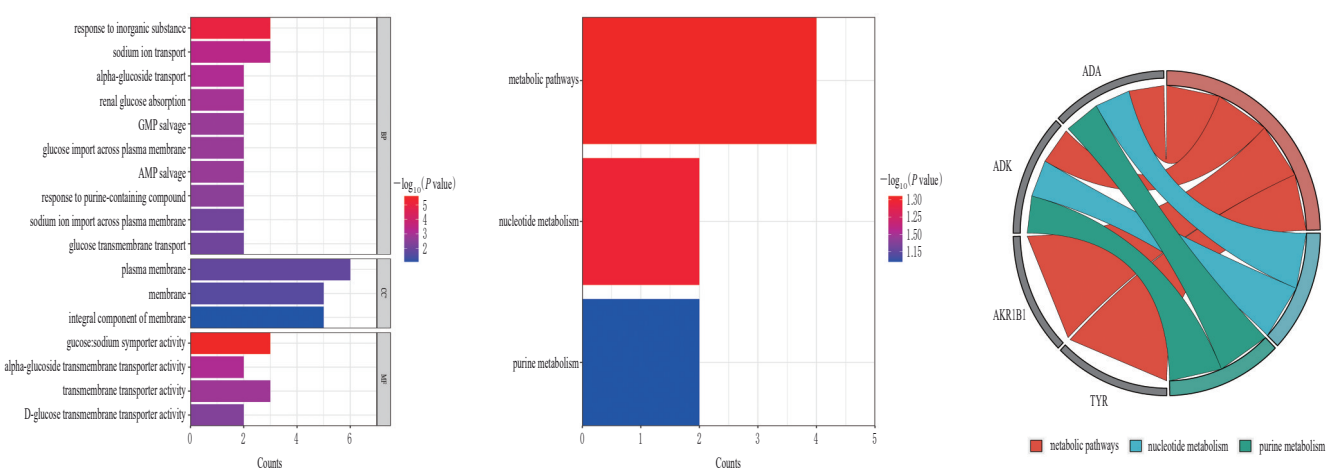
与正常组比较，模型组大鼠心肌组织中CK、LDH、NT-proBNP水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠心肌组织中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

3.2.4　大鼠心肌组织中Col Ⅰ、Col Ⅲ水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠心肌组织中Col Ⅰ、Col Ⅲ水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠心肌组织中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

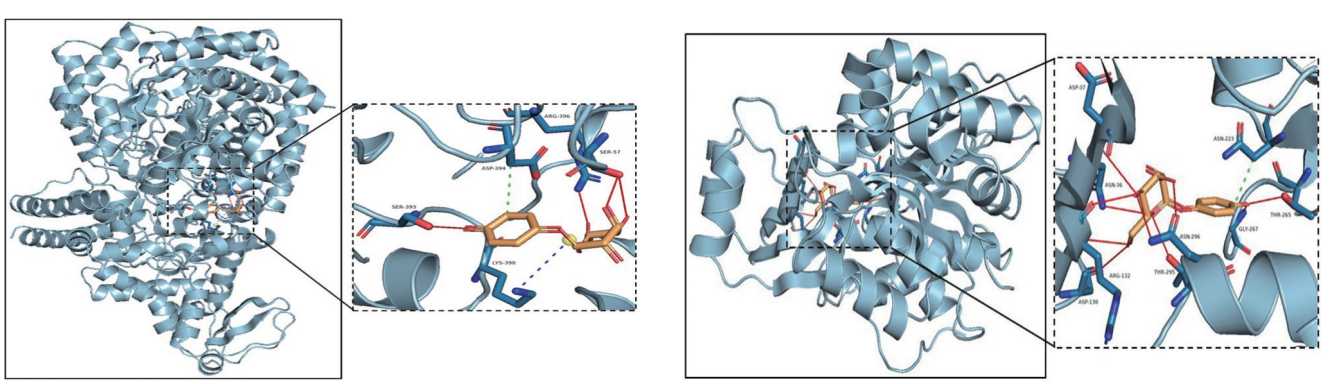
3.2.5　大鼠心肌组织病理形态学观察结果

HE染色结果显示（图5A），正常组大鼠心肌结构完整，横纹清晰，无纤维组织增生和炎症细胞浸润；模型组



A. GO功能富集分析　　B. KEGG信号通路富集分析　　C. KEGG信号通路-靶点分析

图2　熊果苷干预MF的GO功能富集和KEGG通路富集分析图



A. 熊果苷与ADA的分子对接　　B. 熊果苷与ADK的分子对接

注：红色实线代表氢键；绿色虚线代表疏水作用；蓝色虚线代表盐桥。

图3　熊果苷与ADA、ADK的分子对接图

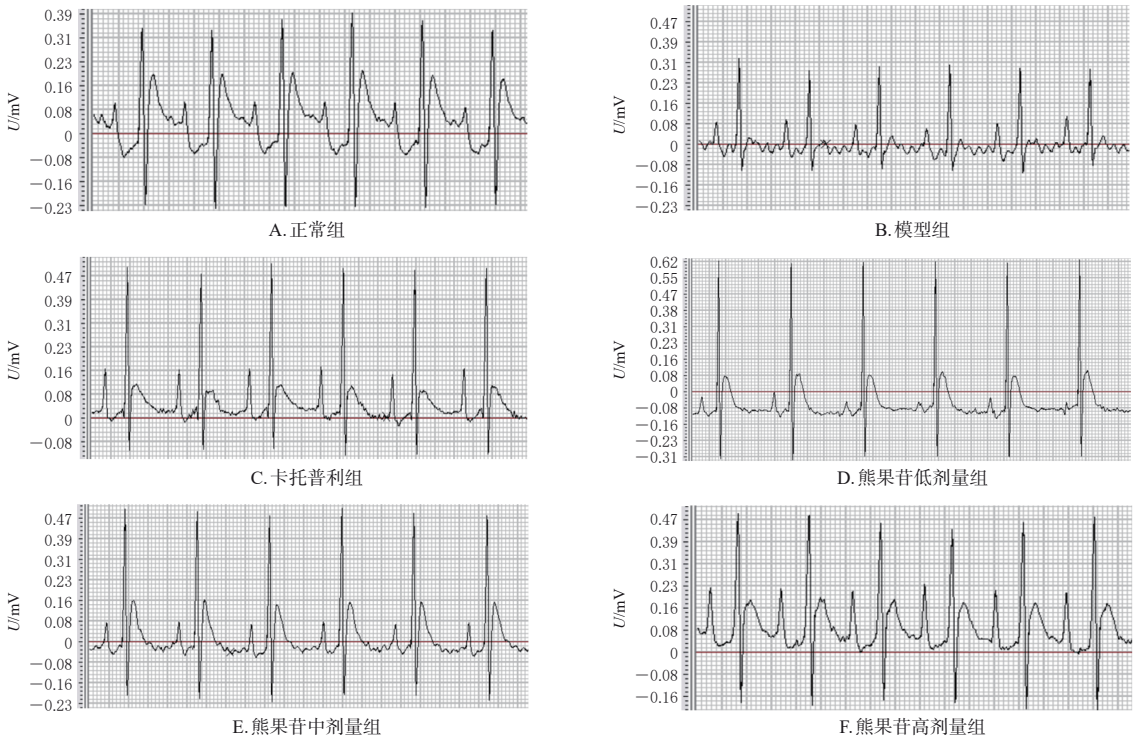


图4　熊果苷对大鼠心电图的影响结果

表2　熊果苷对大鼠心脏相关指数和心肌组织中CK、LDH、NT-proBNP、Col Ⅰ、Col Ⅲ水平的影响结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	HWI/(mg/g)	LVWI/(mg/g)	CK/(U/L)	LDH/(U/L)	NT-proBNP/(ng/L)	Col Ⅰ/(ng/mL)	Col Ⅲ/(ng/mL)
正常组	2.83±0.06	1.36±0.06	227.98±69.83	120.54±14.52	807.34±42.60	6.50±0.67	9.34±0.65
模型组	3.63±0.19[a]	2.06±0.09[a]	562.82±62.75[a]	190.78±19.86[a]	1 147.61±126.59[a]	16.32±1.17[a]	17.97±0.77[a]
卡托普利组	2.97±0.16[b]	1.61±0.16[b]	330.65±68.43[b]	142.70±4.05[b]	839.05±36.45[b]	9.45±0.42[b]	13.12±0.55[b]
熊果苷低剂量组	3.38±0.16[b]	1.82±0.10[b]	469.70±37.89[b]	156.41±6.20[b]	1 034.89±38.41[b]	12.84±0.72[b]	15.76±0.60[b]
熊果苷中剂量组	3.47±0.07	1.82±0.16[b]	417.93±73.49[b]	147.55±4.59[b]	889.58±34.12[b]	10.01±0.89[b]	13.19±1.20[b]
熊果苷高剂量组	3.03±0.19[b]	1.45±0.11[b]	345.92±66.55[b]	128.51±15.09[b]	811.60±85.05[b]	9.15±0.72[b]	12.57±1.26[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

大鼠心肌结构损伤，可见坏死灶，纤维组织明显增生，心肌间质可见炎症细胞浸润；卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠心肌结构排列较整齐，纤维组织增生减少，无坏死灶且未见炎症细胞浸润。

Masson染色结果显示（图5B），正常组大鼠心肌组织仅有少量胶原蛋白沉积，胶原染色呈蓝绿色；模型组大鼠心肌组织有大量胶原蛋白沉积；卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠心肌组织中胶原蛋白沉积情况有不同程度改善。与正常组[(11.72±0.52)%]比较，模型组大鼠心肌组织中阳性面积百分比[(61.04±1.08)%]显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，卡托普利组和熊果苷低、中、高剂量组大鼠心肌组织中阳性面积百分比[分别为(15.77±1.93)%、(15.75±2.07)%、(16.75±1.49)%、(15.97±1.61)%]均显著降低（$P<0.05$）。

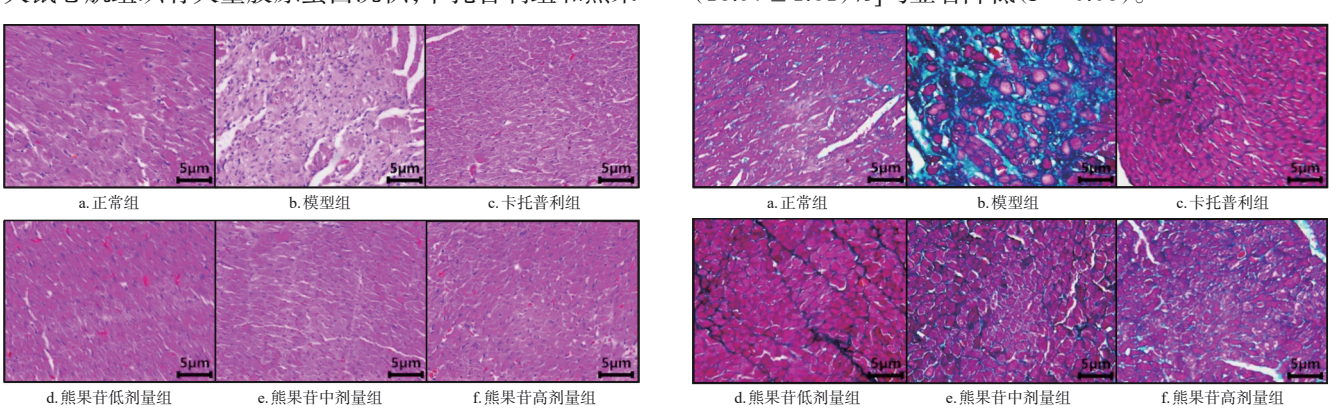


图5　熊果苷对大鼠心肌组织病理形态学的影响显微图

3.2.6　大鼠心肌组织中ADA、ADK蛋白表达水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠心肌组织中ADA、ADK蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠心肌组织中ADA、ADK蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图6、表3。

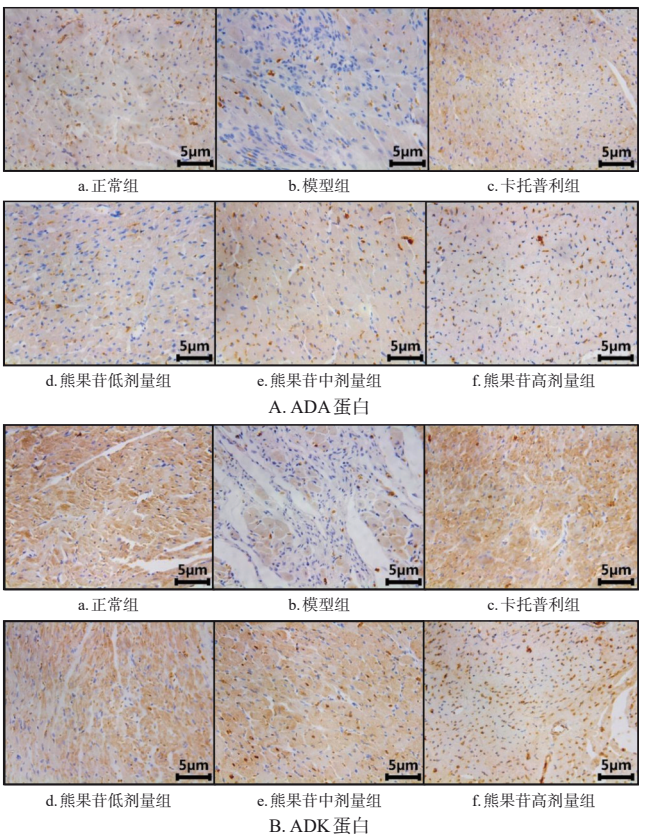


图6　各组大鼠心肌组织中ADA、ADK蛋白表达的免疫组化图

表3　各组大鼠心肌组织中ADA、ADK蛋白和mRNA表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	ADA		ADK	
	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
正常组	1 451.59±26.53	1.00±0.00	6 737.28±37.37	1.00±0.00
模型组	582.52±12.62[a]	3.54±0.49[a]	752.29±12.67[a]	0.76±0.22[a]
卡托普利组	1 745.13±32.91[b]	16.50±1.33[b]	6 036.65±36.01[b]	4.05±0.70[b]
熊果苷低剂量组	973.87±7.82[b]	5.43±0.49[b]	3 223.51±3.82[b]	1.29±0.23[b]
熊果苷中剂量组	1 857.19±52.06[b]	7.14±0.92[b]	4 716.33±5.31[b]	1.67±0.24[b]
熊果苷高剂量组	1 320.32±17.38[b]	9.02±1.61[b]	5 980.75±20.17[b]	2.68±0.22[b]

a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

3.2.7　大鼠心肌组织中ADA、ADK mRNA表达水平测定结果

与正常组比较，模型组大鼠心肌组织中ADA mRNA表达水平显著升高（$P<0.05$），ADK mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，卡托普利组和熊果苷各剂量组大鼠心肌组织中ADA、ADK mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

4　讨论

MF是心脏功能减退的关键环节，西医的治疗手段往往只能改善纤维化症状[2]，难以达到根治目的。中医学理论认为，摄生不当，内伤七情，致气虚阳弱，加之外感时淫，气血津液运行受阻于脉络之中，而脉中之血停滞即为瘀血，络中之津液凝固即成痰饮，以上无形之邪攻于心包络脉，引起心脉功能受损，出现胸痛、胸闷、心慌、气喘等MF之典型临床症状[7]。MF由心肌细胞外基质（extracellular matrix，ECM）沉积引起，ECM可归为“沉积之毒”，故当以“祛瘀、解毒”为治疗原则。熊果苷具有抗炎、抗氧化作用，可促进局部组织血液循环，排出沉积毒素[4,8]，符合中医对MF的治疗理念，故本研究选择熊果苷为MF的干预药物加以研究。卡托普利是一种血管紧张素转化酶抑制剂，也是临床上治疗MF的常用药物，因此本研究以其为阳性对照药。

异丙肾上腺素是一种儿茶酚胺类物质，可通过激动心肌细胞β_1受体而兴奋心脏，使心脏强烈而持续地收缩，导致心率加快、心肌组织缺血并伴有CK、LDH水平升高。其中，CK、LDH是心脏功能的重要指标，二者水平升高提示心肌受损，最终发生MF[9]。相关研究发现，异丙肾上腺素诱导构建的MF模型具有周期短、技术难度低的优势，且与临床上急性MF的病理学变化较为一致[10]。因此，本研究选择异丙肾上腺素诱导构建大鼠MF模型。本研究结果发现，熊果苷可显著恢复模型大鼠心电图ST波段和T波振幅，降低模型大鼠HWI、LVWI（熊果苷中剂量组LVWI除外）和心肌组织中CK、LDH水平，改善大鼠心肌组织纤维化病变。

NT-proBNP是由心肌细胞分泌的一种稳定的多肽类神经激素，其水平与心房压力紧张性呈正相关；左心室功能障碍时血液中NT-proBNP水平亦明显高于正常水平[11]。本研究结果显示，熊果苷可显著降低模型大鼠心肌组织中NT-proBNP水平，表明熊果苷可改善MF模型大鼠心室功能。

目前有关熊果苷治疗心肌损伤和改善纤维化的文献报道较少，具体机制需进一步探讨。本研究通过网络药理学和分子对接技术初步研究了熊果苷改善MF的分子机制，结果显示，熊果苷主要通过核苷酸代谢通路干预MF过程，涉及的核心靶点为ADA、ADK，且熊果苷与ADA、ADK结合稳定。目前有研究表明，ADA、ADK均广泛存在于心肌组织中，参与核苷酸代谢过程；其中ADA可催化腺苷脱氨基生成肌苷和氨，ADK可将腺苷转化为单磷酸腺苷[12]。因此，ADA、ADK水平决定了心肌组织中的腺苷浓度。当二者缺乏或者活性受到抑制时，会使心肌细胞中腺苷积累，大量腺苷通过被动扩散或核苷转运蛋白转出细胞，从而激活细胞表面的腺苷A2A受体，而该受体可通过刺激成纤维细胞和结缔组织生长因子促进Col Ⅰ、Col Ⅲ生成[13]。胶原是ECM的重要组分，在创面愈合和组织修复过程中具有积极意义，

但其过量积累会造成器官损伤和功能障碍，导致纤维化[14-15]。此外，肌苷是细胞合成三磷酸腺苷的主要原料，可改善心肌细胞的能量代谢；当ADA缺乏时，可使肌苷合成减少和心肌细胞能量代谢受到抑制，从而间接加剧纤维化进程[16]。本研究结果发现，MF模型大鼠Col Ⅰ、Col Ⅲ水平均显著升高，心肌组织中ADA、ADK蛋白及ADK mRNA表达水平均显著降低，ADA mRNA表达水平显著升高，这表明以ADA、ADK为主要靶点的核苷酸代谢过程受到了抑制，胶原蛋白过度生成。经熊果苷干预后，MF模型大鼠心肌组织中上述指标表达水平均显著升高。

综上所述，熊果苷可改善MF模型大鼠心脏纤维化程度和心脏功能，其作用机制可能与上调ADA、ADK蛋白及其mRNA表达，影响核苷酸代谢及胶原生成有关。

参考文献

[1] 惠菊，徐培斌，潘阳，等. 解毒通络方对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌纤维化作用及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志，2020，40(9)：1107-1111.
HUI J，XU P B，PAN Y，et al. Effect and mechanism of Jiedu tongluo formula on myocardial fibrosis induced by isoproterenol in rats[J]. Chin J Integr Tradit West Med，2020，40(9)：1107-1111.

[2] 乔松彦，乔淳，胡延立，等. 温阳活血利水方辅助西医治疗慢性心力衰竭的疗效及对心肌纤维化指标、炎症相关因子的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2019，17(22)：3546-3549.
QIAO S Y，QIAO C，HU Y L，et al. Therapeutic effect of Wenyang huoxue lishui recipe on chronic heart failure and its influence on myocardial fibrosis index and inflammatory related factors[J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis，2019，17(22)：3546-3549.

[3] 昝树杰，赵娜娜，王凯. 中医药治疗心肌纤维化的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2021，19(20)：3500-3503.
ZAN S J，ZHAO N N，WANG K. Research progress of treating myocardial fibrosis with traditional Chinese medicine[J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis，2021，19(20)：3500-3503.

[4] 刘晓婷，王鑫璇. 熊果苷的药理作用及机制研究进展[J]. 食品与发酵工业，2022，48(2)：309-316.
LIU X T，WANG X X. Research progress on the pharmacological action and mechanism of arbutin[J]. Food Ferment Ind，2022，48(2)：309-316.

[5] 徐银丽，徐登月，于立明，等. 熊果苷对乙酰胆碱-氯化钙混合液诱导心房颤动大鼠心脏保护作用及其机制研究[J]. 临床军医杂志，2022，50(4)：350-354.
XU Y L，XU D Y，YU L M，et al. Cardioprotective effect and mechanism of arbutin on atrial fibrillation induced by acetylcholine chloride mixture in rats[J]. Clin J Med Off，2022，50(4)：350-354.

[6] ZHANG X Q，QU H Y，YANG T，et al. Astragaloside Ⅳ attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway[J]. Cell Cycle，2022，21(21)：2309-2322.

[7] 柳金英，张惠敏，田蕾，等. “瘀毒”致心力衰竭心肌纤维化理论依据初探[J]. 中华中医药杂志，2018，33(9)：4027-4030.
LIU J Y，ZHANG H M，TIAN L，et al. Theoretical research on “stasis-toxin” in myocardial fibrosis of heart failure[J]. China J Tradit Chin Med Pharm，2018，33(9)：4027-4030.

[8] ROAT P，HADA S，CHECHANI B，et al. Madhuca indica：a review on the phytochemical and pharmacological aspects[J]. Pharm Chem J，2023，57(2)：284-295.

[9] 潘建衡，曹占鸿，李娜，等. 常见心肌纤维化模型的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志，2021，37(1)：84-88.
PAN J H，CAO Z H，LI N，et al. Current situation of common myocardial fibrosis model[J]. Chin J Clin Pharmacol，2021，37(1)：84-88.

[10] 徐为民，孙志，陈欢，等. 两种心肌纤维化动物模型基本情况比较[J]. 中国实验诊断学，2018，22(4)：708-711.
XU W M，SUN Z，CHEN H，et al. Comparison of two animal models of myocardial fibrosis[J]. Chin J Lab Diagn，2018，22(4)：708-711.

[11] SENNI M，LOPEZ-SENDON J，COHEN-SOLAL A，et al. Vericiguat and NT-proBNP in patients with heart failure with reduced ejection fraction：analyses from the VICTORIA trial[J]. ESC Heart Fail，2022，9(6)：3791-3803.

[12] SECORD E，HARTOG N L. Review of treatment for adenosine deaminase deficiency（ADA）severe combined immunodeficiency（SCID）[J]. Ther Clin Risk Manag，2022，18：939-944.

[13] DE BOER I H，KHUNTI K，SADUSKY T，et al. Diabetes management in chronic kidney disease：a consensus report by the American diabetes association（ADA）and kidney disease：improving global outcomes（KDIGO）[J]. Diabetes Care，2022，45(12)：3075-3090.

[14] ZHANG M，WANG C P，WANG R N，et al. Adenosine kinase promotes post-infarction cardiac repair by epigenetically maintaining reparative macrophage phenotype [J]. J Mol Cell Cardiol，2023，174：88-100.

[15] TISCHLIK S，OELKER M，ROGNE P，et al. Insights into enzymatic catalysis from binding and hydrolysis of diadenosine tetraphosphate by *E. coli* adenylate kinase[J]. Biochemistry，2023，62(15)：2238-2243.

[16] 马久程，王兆楠，殷栋，等. 腺苷及其受体在皮肤创面愈合与纤维化中的作用[J]. 生命科学，2022，34(12)：1485-1492.
MA J C，WANG Z N，YIN D，et al. Adenosine and its receptors in skin wound healing and fibrosis[J]. Chin Bull Life Sci，2022，34(12)：1485-1492.

（收稿日期：2023-08-26　修回日期：2023-12-23）
（编辑：唐晓莲）