

· 博士之窗 ·

麝香保心丸减轻自发性高血压大鼠 心肌纤维化的研究

武多娇 洪华山[△] 江 琼

摘要 目的 探讨麝香保心丸对自发性高血压大鼠(SHR)心肌纤维化的作用及其可能的机制。方法 将 12 周龄 SHR 大鼠分为麝香保心丸治疗组、苯那普利阳性药物对照组及高血压模型对照组,研究麝香保心丸对治疗 12 周后的 SHR 大鼠收缩压(SBP)、左室重量(LVM)、左室重量指数(LVMI)、左室心肌胶原含量及细胞外基质纤连蛋白(fibronectin, FN)、层粘连蛋白(laminin, LN)、心脏成纤维细胞(cardiac fibroblast, cFb)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的影响。结果 麝香保心丸对 SHR 无明显降压作用,但与苯那普利一样可降低 LVM、LVMI、心肌胶原含量($P < 0.05$)。麝香保心丸可明显降低心肌 LN、FN 含量、心脏成纤维细胞数目和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的表达($P < 0.05$)。结论 麝香保心丸具有独立降压以外的防治 SHR 心肌纤维化作用,其机制可能与减少心肌 TGF- β_1 表达和心脏成纤维细胞数目,减少心肌胶原合成及细胞外基质沉积等因素有关。

关键词 麝香保心丸;自发性高血压大鼠;心肌纤维化;转化生长因子;成纤维细胞

Effect of Shexiang Baoxin Pill in Alleviating Myocardial Fibrosis in Spontaneous Hypertensive Rats WU Duo-jiao, HONG Hua-shan, JIANG Qiong *Department of Cardiovascular Diseases, Institute of Coronary Heart Disease, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou (350001)*

Objective To investigate the effects and mechanisms of Shexiang Baoxin Pill(SBP) on myocardial fibrosis in spontaneous hypertensive rats(SHR). **Methods** SHR of 12 weeks old were divided into the SBP group, the control group(treated with benazepril) and the model control group. The effects on such indexes as systolic blood pressure(SBP), left ventricular mass(LVM), left ventricular mass index(LVMI), content of myocardial collagen(MC) in left ventricle, extracellular matrix fibronectin(FN), laminin(LN), cardiac fibroblast(cFb) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) were determined after 12 weeks of treatment. **Results** SBP had no marked pressure depressive effect, but had the effect similar to that of benazepril in reducing the level of LVM, LVMI and content of MC($P < 0.05$), as well as the content of LN, FN in myocardium, cFb count and TGF- β_1 expression($P < 0.05$). **Conclusion** SBP can prevent and treat myocardial fibrosis, whose action is independent of its hypotensive effect. The mechanism may be associated with such factors as the decrease of MC synthesis in left ventricle and the deposition of extracellular matrix.

Key words Shexiang Baoxin Pill; spontaneous hypertensive rats; cardiac fibroblast; transforming growth factor; fibroblast

高血压或其他压力负荷情况可导致病理性左室肥厚(LVH),左室肥厚以心肌细胞肥大、非心肌细胞增殖、及细胞外基质沉积为特征。上述改变导致心肌僵

硬度增加,舒张功能损害,继而收缩功能减退,甚至发生心力衰竭。1972 年,戴瑞鸿教授在原中药苏合香丸的基础上开始麝香保心丸组方的研制工作,经过多年研究及临床实践证实麝香保心丸治疗冠心病有明显疗效,可显著改善心肌缺血,近期研究又发现其还有促进血管新生作用^[1],本实验通过观察麝香保心丸对自发性高血压大鼠(SHR)心肌纤维化的影响并探讨其可能的机制,为其临床防治高血压心肌纤维化提供科学

作者单位 福建医科大学附属协和医院心内科 福建省冠心病研究所(福州 350001)

通讯作者 洪华山 /Tel 0591-83357896 转 8455 /E-mail honghuashan@medmail.com.cn

[△]为博士研究生

依据。

材料与方法

1 动物及分组 30 只 3 月龄雄性 SHR 大鼠,体重 240~270g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。随机分为:麝香保心丸(SX)组;SHR 空白对照(SHR)组;苯那普利阳性药物对照(Ben)组;每组 10 只。

2 药物 麝香保心丸由上海和黄药业有限公司生产(成分:麝香、人参提取物、人工牛黄、肉桂、苏合香、蟾酥、冰片,每丸 22.5 mg,批号 A030704),苯那普利原药由北京诺华制药公司提供(批号:1020008000)。

3 试剂及仪器 兔抗人多克隆抗体工作液 fibronectin(Novocastra),鼠抗人单克隆抗体工作液 laminin(LAM-89, Novocastra),鼠抗人单克隆抗体工作液波形蛋白 Vimentin(V9, Novocastra),鼠抗人单克隆抗体浓缩液 TGF-β₁(1:100, TGFβ17, Novocastra),成套免疫组化试剂盒(SP-9000)及显色剂均购自北京中山生物技术有限公司。大鼠血压心率测定仪(RBP-1B 型,北京中日友好医院临床研究所制造),显微镜(Olympus BX41, Japan),计算机辅助图像分析系统(Image-Pro Plus, Version:4.5, Media Cybernetics, Inc. USA),大鼠灌胃器(14 号穿刺针,自制),电子天平(FA2004 型,上海天平仪器厂)。

4 方法

4.1 SHR 模型鉴定 在大鼠清醒状态下无创性测定尾动脉收缩压≥150 mmHg。

4.2 给药方法 每日 8:00 SX 组每只大鼠予麝香保心丸 112.5 mg/kg 溶于 1.5 ml 蒸馏水中灌胃;Ben 组予苯那普利 5 mg/kg 溶于 1.5 ml 蒸馏水中灌胃,SHR 组予等量蒸馏水。24 周龄时,称体重及测血压后处死。

4.3 观察项目及检测方法

4.3.1 血压测量 治疗前、治疗 1 周时、治疗 12 周后测量大鼠尾动脉收缩压(SBP)。

4.3.2 左心室重量及其与体重比的测定 动物称重后以 10%氯化钾静脉注射处死,取出心脏,先剪去周围大血管,吸干血液,剪去心房和右心室游离壁,称取左心室重量(LVM),计算左心室重及其与体重比[左心室重量指数(LVMI),mg/g],以了解左心室肥厚的程度。

4.3.3 大鼠胶原的定性及定量分析 在左室心肌冠状沟下约 1 mm 处,取左室心肌横切面。用 10%PBS 甲醛液固定,石蜡包埋,制片,切片厚约 5

μm,行苦味酸天狼星红染色。心肌细胞呈黄色,胶原呈红色。应用显微镜计算机辅助图像分析系统,在苦味酸天狼星红染色下,采用 Brilla^[2]等描述的方法,随机分析 5 个视野,通过灰度调节来区分胶原和非胶原成分,测量心肌胶原容积分数(CVF)和心肌内血管周围胶原面积(PVCA)。计算方法:CVF=胶原面积/总面积,其中胶原面积不包括血管周围胶原面积;PVCA=心肌内小动脉管腔周围胶原面积/动脉管腔面积。

4.3.4 免疫组化 SP 法。切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶活性,fibronectin(FN),laminin(LN)用胃酶修复,Vimentin,TGF-β₁用微波修复,正常山羊血清工作液消除非特异性染色,用如下抗体:FN、LN、Vimentin、TGF-β₁为一抗置湿盒 4℃ 孵育过夜。通用型生物素标记羊抗兔、鼠 IgG 室温 10 min,以上各步骤间用 PBS(pH 7.2~7.4)冲洗 3 min 共 3 次。辣根酶标记链霉卵白素室温反应 10 min,LN、FN、TGF-β₁用 DAB 显色,阳性信号呈棕黄色;Vimentin 用 AEC 显色,阳性信号呈红色。镜下控制反应时间,蒸馏水中止反应,苏木素复染。DAB 显色切片经酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;AEC 显色不经酒精脱水和二甲苯透明,水性封片剂封片。阴性对照以 PBS 代替一抗。每个标本随机取 10 个视野,图像分析系统计算抗体 FN、LN 表达的光密度值(OD),阳性面积与总面积比;同样每个标本取 10 个视野计算 TGF-β₁、Vimentin 阳性细胞占该视野细胞总数的比率。

5 统计学方法 数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析和 *q* 检验。

结 果

1 各组大鼠收缩压的变化 见表 1。各组大鼠 12 周龄时(治疗前)收缩压差异无显著性;治疗 1 周后,Ben 组收缩压下降,与 SHR 组比较,差异有显著性(*P*<0.01),SX 组与 SHR 组比较,差异无显著性(*P*>0.05);治疗 12 周时,SHR 组收缩压明显高于 Ben 组(*P*<0.01),SX 组与 SHR 组比较差异无显著性(*P*>0.05),表明麝香保心丸对 SHR 的收缩压影响不明显。

表 1 各组大鼠 SBP 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SBP(mmHg)		
		治疗前	治疗 1 周	治疗 12 周
SHR	10	160±5	162±18	179±22
SX	10	157±5	160±15 [△]	170±18 [△]
Ben	10	163±7	145±8*	151±11*

注:与 SHR 组比较,**P*<0.01;与 Ben 组比较,[△]*P*<0.01

2 各组大鼠 LVM、LVMI 比较 见表 2。经过 12 周药物干预, Ben 组左室肥厚程度明显减轻, 其 LVM、LVMI 较 SHR 组显著下降 ($P<0.01$), 分别下降 12.8%、10.2% ;与 SHR 组比较, SX 组左室纤维化程度也有减轻 ($P<0.05$), LVM、LVMI 分别下降 6.2%、4.3%。

表 2 各组大鼠 LVM 及 LVMI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVM(g)	LVMI
SHR	10	1.09±0.09	3.72±0.20
SX	10	1.02±0.13 ^{*△}	3.56±0.37 ^{*△}
Ben	10	0.95±0.11 ^{**}	3.34±0.33 ^{**}

注:与 SHR 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与 Ben 组比较, [△] $P<0.05$

3 各组大鼠 CVF、PVCA 比较 见表 3。24 周龄时, SHR 大鼠心肌间质及血管外膜已经有大量胶原纤维沉积; Ben 组胶原沉积明显减轻, CVF、PVCA 较 SHR 组有显著下降 ($P<0.01$);与 SHR 组比较, SX 组左室纤维化程度也有减轻 ($P<0.05$), CVF、PVCA 分别下降 14.5%、17.5%, 而 Ben 组分别下降 28.6%、33.3%。

表 3 各组大鼠 CVF、PVCA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CVF	PVCA
SHR	10	0.07±0.01	1.77±0.31
SX	10	0.06±0.02 [*]	1.46±0.32 [*]
Ben	10	0.05±0.01 ^{**}	1.18±0.17 ^{**}

注:与 SHR 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$

4 各组大鼠心肌中 FN、LN 表达比较 见表 4。与 SHR 组比较, SX 组同 Ben 组一样可显著降低 FN、LN 表达 ($P<0.05$), 并且 SX 组与 Ben 组组间差异无显著性 ($P>0.05$)。

表 4 各组大鼠心肌中 FN、LN 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FN		LN	
		OD 值	抗原表达阳性面积/总面积	OD 值	抗原表达阳性面积/总面积
SHR	10	0.22±0.01	0.10±0.03	0.79±0.68	0.11±0.05
SX	10	0.19±0.02 [*]	0.07±0.02 [*]	0.15±0.01 [*]	0.07±0.02 [*]
Ben	10	0.18±0.03 [*]	0.06±0.01 [*]	0.10±0.02 [*]	0.07±0.01 ^{**}

注:与 SHR 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$

5 各组大鼠 TGF- β_1 、cFb 表达比较 见图 1。SHR 组大鼠心肌内有大量 TGF- β_1 、Vimentin 表达, Ben 组和 SX 组均有下降的趋势; Ben 组可显著降低 TGF- β_1 的表达, 与 SHR 组、SX 组比较, 差异均有显著性 ($P<0.01$, $P<0.05$), 且作用较 SX 组强; SX 组中 Vimentin 的表达较 Ben 组有减少, 但差异无显著性。

讨 论

无论何种原因引起心肌损伤, 只要病变持续, 终将导致心肌纤维化的发生。高血压性心肌病在病理上除

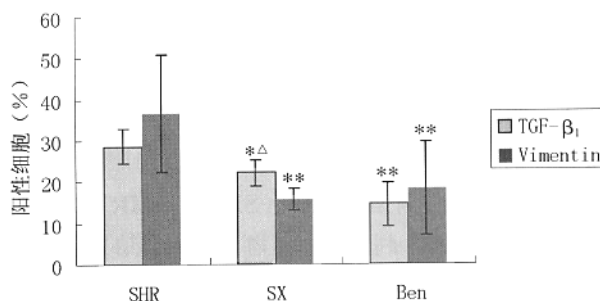


图 1 各组大鼠 TGF- β_1 、Vimentin 表达

注:与 SHR 组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$;与 Ben 组比较, [△] $P<0.05$

心肌细胞肥大外, 突出表现为广泛的心肌间质性纤维化。心肌纤维化包括成纤维细胞的增殖, 细胞外基质 (ECM) 的沉积, 心肌间质胶原合成和降解比例失调等多个方面的改变。SHR 是一种慢性高血压动物模型, 在第 6 周可自发性血压升高, 24 周龄时可产生明显高血压症状和心肌反应性纤维化。本实验 24 周龄 SHR 大鼠血压较 12 周升高, 心肌间质及血管周围有明显胶原沉积, 苯那普利治疗 12 周后心肌纤维化程度明显减轻, 与相关文献^[3]报道一致。

麝香保心丸是否同苯那普利一样对 SHR 心肌纤维化有减轻作用, 其作用机制如何以及两药间效果的比较尚未见报道。本实验以苯那普利为阳性对照, 结果发现麝香保心丸同苯那普利一样, 可降低左室肥厚及心肌纤维化的指标如 LVM、LVMI、CVF、PVCA 等, 其作用强度相当于苯那普利的 50%; 并且可减少 SHR 大鼠心肌细胞外基质中 FN、LN 的合成, 其作用强度与苯那普利相比无明显差异, 进一步探讨其机制, 发现麝香保心丸同苯那普利一样, 可明显减少心肌 TGF- β_1 表达和 cFb 数目。苯那普利组在降压的同时可减轻 SHR 心肌纤维化程度, 而麝香保心丸在本实验中对收缩压无影响, 说明麝香保心丸减轻 SHR 心肌纤维化是独立于降压作用的。已有实验显示, SHR 大鼠中循环激素的变化和高血压本身不是引起间质纤维化的主要原因, 心脏内局部因素的异常在其形成过程中起主要的作用^[4]。麝香保心丸对 FN、LN 作用效果显著, 考虑其减轻心肌纤维化作用主要与减少 ECM 沉积有关, 但由于时间的限制, 在以后的研究中如果加入分子生物学方法, 则可更系统地观察其对 ECM 的影响。

以往研究证明, 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 在高血压左室肥厚和心肌纤维化的发生和发展过程中起了很重要的作用, RAAS 中起主要作用的活性介质是血管紧张素 II (Ang II), Ang II 通过其 1 型

受体(AT1R)介导胶原生成,同时,多种细胞因子如白介素-1(IL-1)转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)均具有致纤维化作用。TGF- β_1 是多种细胞因子中最重要的促纤维化细胞因子之一。心肌成纤维细胞(cardiac fibroblast, cFb)是心肌TGF- β_1 的细胞起源,而TGF- β_1 又可以刺激cFb分裂增生并合成大量ECM、抑制ECM降解酶,使cFb活化及表型转化,同时增加ECM受体表达,促进ECM与细胞黏附。目前TGF- β_1 已被公认为器官纤维化的治疗靶标。Pinto YM等^[5]报道Ren2大鼠中,应用非特异性TGF- β_1 表达抑制剂曲尼司特治疗可减少TGF- β_1 表达,减轻左室胶原积聚及外周血管纤维化。cFb表面存在高亲和力的AT1R。Sun Y^[6]报道体外培养中,TGF- β_1 以无活性形式被释放、激活后,促进cFb分化和增殖,而此作用可被Ang II的AT1R拮抗剂氯沙坦减弱,说明TGF- β_1 表达也是经过AT1R诱导而发挥作用。因此,cFb无疑在心肌纤维化的发生和发展中扮演着重要角色^[7]。罗心平等^[8]发现麝香保心丸可降低2周时心肌梗死大鼠心肌Ang II及血浆醛固酮(ALD)水平,从而对大鼠心肌梗后左室胶原改建有良好作用。Sarkissian SD等^[9]发现依那普利通过凋亡抑制SHR大鼠心肌中cFb异常增殖,从而逆转高血压左室肥厚及心肌纤维化。本实验中使用波形蛋白(Vimentin,间充质细胞标志)作为成纤维细胞的标志性蛋白,发现麝香保心丸可减少心肌中TGF- β_1 、cFb表达,因此推测麝香保心丸对心肌胶原合成和细胞外基质的影响可能是通过对TGF- β_1 、cFb的影响而起作用,麝香保心丸对SHR心肌纤维化的上述作用是否有其他因素参与尚需今后进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 汪珊珊,李 勇,范维琥,等.麝香保心丸对鸡胚绒毛尿囊膜及培养的血管内皮细胞的促血管生成作用.中国中西医结合杂志 2003 23(2):128—131.
- 2 Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. Circ Res 1991 69(1):107—115.
- 3 Ke YS, Cao H, Yang T. Effect of combination of valsartan with benazepril on blood pressure and left ventricular hypertrophy in SHR. Acta Pharmacol Sin 2000 21(11):1043—1047.
- 4 Brilla CG, Matsubara L, Weber KT. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. Hypertension 1996 28(2):269—275.
- 5 Pinto YM, Pinto-Sietsma SJ, Philipp T, et al. Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor β_1 attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2)27 rat. Hypertension 2000 36(5):747—754.
- 6 Sun Y, Zhang J, Zhang JQ, et al. Local angiotensin II and transforming growth factor- β_1 in renal fibrosis of rats. Hypertension 2000 35(5):1078—1084.
- 7 Butt RP, Bishop JE. Mechanical load enhances the stimulatory effect of serum growth factors on cardiac fibroblast procollagen synthesis. J Mol Cell Cardiol 1997 29(4):1141—1151.
- 8 罗心平,曾治宇,施海明,等.麝香保心丸对大鼠心肌梗塞后左室胶原改建影响的研究.中国中医基础医学杂志 1998 4(7):20—22.
- 9 Der Sarkissian SD, Marchand EL, Duguay D, et al. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. Cardiovasc Res 2003 57(3):775—783.

(收稿 2004-11-29 修回 2005-01-04)

第六次全国中西医结合血瘀证及活血化瘀研究学术大会和继续医学教育班征文通知

中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会拟于2005年8月19—21日在吉林省延吉市召开“第六次全国中西医结合血瘀证及活血化瘀研究学术大会和继续医学教育班”(授I类15学分),同时举办敖东血府逐瘀口服液和敖东利脑心胶囊专题研讨会,并设立“敖东血府逐瘀口服液杯”、“敖东利脑心胶囊杯”优秀学术论文奖。征文内容包括上述两药在动脉粥样硬化性疾病,以及属于中医血瘀证的其他各科疾病的基础及临床研究。论文经大会专家评审委员会统一审稿评出以下奖项:特等奖各1名,一等奖各2名,二等奖各5名,三等奖各10名,分别给予8 000元、5 000元、3 000元、2 000元的学术赞助。对优秀论文可向中国中西医结合杂志等推荐发表。征文要求(1)来稿请寄全文及1 000字以内的摘要1份;(2)请自留底稿,恕不退稿;(3)截止日期2005年7月31日;无论文者,欢迎报名参加学习班。来稿请寄:北京卫生部中日友好医院中医心肾科(100029),联系人:杜金行,刘燕,联系电话:010-84205053,传真:010-64284945, E-mail: shizajiang@163.com