

· 基础研究 ·

花生四烯酸环氧化酶-2 途径参与丹参改善老年自发性高血压大鼠的心肌纤维化

王建军^{1*}, 刘 杰²(¹南京军区福州总医院干部病房二科, 福州 350025; ²华中科技大学附属协和医院心血管内科, 武汉 430022)

【摘 要】 目的 探讨丹参对于老年自发性高血压大鼠 (SHR) 心肌纤维化的逆转作用和可能的作用机制——花生四烯酸环氧化酶途径。方法 实验采用 17 个月龄的 SHR 分别连续给予 12 周的丹参注射液和生理盐水对照, 选取同周龄的 WKY 大鼠作为正常对照, 同时选用花生四烯酸环氧化酶-2 (COX-2) 的特异性抑制剂塞来昔布灌胃处理后注射丹参。测定血压、血流动力学、左心室质量指数, HE 染色和 Masson 染色分析心肌细胞的大小或心肌纤维化水平, 左心室心肌 COX-2 的蛋白表达和活性水平。结果 与老年 WKY 大鼠相比, 老年 SHR 高血压对照组血压显著增高[收缩压: (171 ± 12) vs (125 ± 3) mmHg; 舒张压: (115 ± 9) vs (87 ± 3) mmHg; 平均动脉压: (139 ± 10) vs (106 ± 5) mmHg; $P < 0.05$], 心功能恶化[LVEDP: (13.9 ± 1.7) vs (7.6 ± 1.3) mmHg; LVdP/dtmax: (2528 ± 167) vs (3015 ± 217) mmHg/s; -LVdP/dtmax: (1957 ± 134) vs (2501 ± 175) mmHg/s, $P < 0.05$], 左室质量指数增加[(3.45 ± 0.07) vs (2.23 ± 0.06) mg/g, $P < 0.05$], 心肌细胞增大[心肌细胞直径: (23.5 ± 0.4) vs (14.3 ± 0.4) μm, $P < 0.05$], 纤维化严重[心肌间质纤维化指数: (1.66 ± 0.05) % vs (0.64 ± 0.05) %; 心肌血管周围纤维化指数: (139 ± 9) % vs (68 ± 7) %, $P < 0.05$], 心肌 COX-2 的蛋白表达水平增加[(125.8 ± 7.2) vs (47.6 ± 3.8), $P < 0.05$]以及活性增强[(73.9 ± 5.6) vs (56.7 ± 4.4) kU/g, $P < 0.05$]。应用丹参的 SHR 组, 收缩压无显著变化, 其他指标均有显著下降 ($P < 0.05$), 塞来昔布能够部分消除丹参的作用。结论 丹参能显著逆转老年 SHR 的心肌纤维化水平, 该作用可能是通过花生四烯酸环氧化酶途径。

【关键词】 丹参; 大鼠, 近交 SHR; 心肌纤维化; 花生四烯酸环氧化酶

【中图分类号】 Q463; R541.3

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00032

Cyclooxygenase-2 pathway in reversion of myocardial fibrosis by Salvia Miltiorrhiza Bge (SMB) in senescent spontaneously hypertensive rats

WANG Jianjun^{1*}, LIU Jie²(¹Cadre's Ward, Fuzhou General Hospital, Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China; ²Department of Cardiology, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the roles of Salvia Miltiorrhiza Bge (SMB) in improving myocardial fibrosis in aged spontaneously hypertensive rats and the possible mechanisms——cyclooxygenase pathway of arachidonic acid. **Methods** The 17-month-old SHR rats were given consecutive SMB injection or saline control for 12 weeks, while the age-matched WKY rats were selected as normal control. Meanwhile, celecoxib, the specified arachidonic acid cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, was administrated intragastrically before SMB injection. The blood pressure, hemodynamic index and left ventricular mass index were determined. HE staining and Masson staining were performed to analyze the size of myocardial cells or the level of myocardial fibrosis, as well as left ventricular myocardial expression and activity level of COX-2 protein. **Results** Compared with the elderly WKY rats, senescent SHR had higher blood pressure[systolic blood pressure: (171 ± 12) vs (125 ± 3)mmHg; diastolic blood pressure: (115 ± 9) vs (87 ± 3)mmHg; mean artery pressure: (139 ± 10) vs (106 ± 5)mmHg, $P < 0.05$], deteriorious heart function[LVEDP: (13.9 ± 1.7) vs (7.6 ± 1.3)mmHg; LVdP/dtmax: (2528 ± 167) vs (3015 ± 217)mmHg/s; -LVdP/dtmax: (1957 ± 134) vs (2501 ± 175)mmHg/s, $P < 0.05$], increased left ventricular mass index[(3.45 ± 0.07) vs (2.23 ± 0.06)mg/g, $P < 0.05$], increased myocardial cells[diameter: (23.5 ± 0.4) vs (14.3 ± 0.4)μm, $P < 0.05$], severe fibrosis[myocardial interstitial fibrosis index: (1.66 ± 0.05)% vs (0.64 ± 0.05)%; myocardial perivascular fibrosis index: (139 ± 9)% vs (68 ± 7)%, $P < 0.05$], elevated expression[(125.8 ± 7.2) vs (47.6 ± 3.8), $P < 0.05$] and activity level of myocardial COX-2 protein[(73.9 ± 5.6) vs (56.7 ± 4.4)kU/g, $P < 0.05$]. Except the systolic blood pressure, other indicators in SMB-treated SHR were significantly reduced. The administration of celecoxib partially abolished the effect of SMB. **Conclusion** SMB therapy can reverse myocardial fibrosis in senescent spontaneously hypertensive rats, which may be through cyclooxygenase pathway.

收稿日期: 2011-07-14; 修回日期: 2011-10-10

通讯作者: 王建军, Tel: 0591-22859354, E-mail: wjjun1991@sina.com

【Key words】 Salvia Miltiorrhiza Bge; spontaneously hypertensive rats; myocardial fibrosis; cyclooxygenase pathway of arachidonic acid

高血压左心室肥大是心肌纤维对于慢性的压力或容量负荷的适应性反应,是高血压患者发生充血性心力衰竭、冠心病、心律失常以及猝死等心血管事件的重要独立危险因素。肥大左心室中增加的胶原纤维的沉积使心功能不断恶化,继而引起心力衰竭^[1]。有效的降血压药物治疗不仅能降低血压,更应该能够改善心肌的病理重构或纤维化^[2]。丹参具有多种心血管保护功能,唐忠志等^[3]研究表明,丹参虽然不能有效地降低血压,但在预防和逆转心肌纤维化方面具有重要的作用。但丹参对于老年自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 心肌纤维化的作用并不清楚,而且逆转纤维化的机制也并不清楚,本实验旨在研究丹参对于老年 SHR 心肌的作用和可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

17 个月的老年雄性 SHR (北京维通利华公司), 体质量 (418 ± 6) g, 随机分为高血压对照组和高血压丹参组。同期选择 17 个月的老年雄性 WKY 大鼠作为对照, 体质量 (476 ± 10) g。丹参组连续给予 12 周的丹参注射液 (雅安三九药业有限公司提供) 腹腔注射, 剂量为 $1\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 1ml 注射液含丹参生药 1.5g, 即 SMB-treated SHR。其他两组大鼠分别连续给予 12 周相同容积的生理盐水注射液。同时, 为了进一步观察丹参的作用机制, 我们选择了 8 只 SHR 大鼠, 在丹参注射液腹腔注射的同时, 给予花生四烯酸环氧酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 特异性抑制剂塞来昔布灌胃处理, 即 Celecoxib-treated SHR。

1.2 血压测定

采用无创大鼠尾动脉压测量连续每周检测血压和心率。血压仪为澳大利亚 Powerlab 公司生产的 ML125/R, 8sp 生物信号采集与处理系统。每次测定血压重复 3 次, 取平均值。

1.3 血流动力学评价

12 周后每只大鼠称重, 麻醉后颈部气管插管接小动物呼吸机维持呼吸。分离右侧颈总动脉, 用充有肝素生理盐水溶液的 PE-50 聚乙烯管插入右侧颈总动脉, 经 PowerLab 数据分析处理系统记录动脉血压, 并对血压信号进行处理, 同步记录动脉血压。进

一步插管进入左心室内, 记录左室舒张末期压力 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) 左室内压最大上升速率 (LVdP/dtmax) 用于评价心脏收缩功能, 左室内压最大下降速率 ($-\text{LVdP}/\text{dtmax}$) 用于评价心脏舒张功能。

1.4 左心室质量指数

大鼠称重后过量麻醉处死, 取出心脏用冰磷酸盐缓冲液冲洗血污后称重。剪去心房和右心室游离壁, 将左心室和室间隔准确称重。计算心脏质量指数 (heart mass/body mass, HM/BM) 和左心室质量指数 (left ventricular mass/body mass, LVM/BM)。

1.5 病理切片

静脉注射过量的氯化钾注射液使心脏收缩停止于舒张期, 快速将心脏取出并用冰磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 冲洗。心脏置于 4% 中性福尔马林溶液中室温固定 8~12h, 然后梯度乙醇脱水。取左心室中部冠状切面包埋于石蜡中, 石蜡切片机上做 $5\mu\text{m}$ 切片, HE 染色, Masson's 染色。HE 染色用于观察单个心肌细胞直径, Masson's 染色用于评价心肌纤维化水平。心肌纤维化分为心肌间质纤维化和心肌血管周围纤维化, 二者共同评价心肌纤维化水平^[4]。

1.6 Western 免疫印迹法检测心肌 COX-2 蛋白表达

速取处死动物, 取出心脏左室前壁心肌, 液氮中冷冻, 保存于 -80°C 备用。提取所取心肌中的蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。从每组标本蛋白质样品中取 $50\mu\text{g}$, 凝胶电泳分离, 转膜, 封闭后加入兔抗 COX-2 的单克隆抗体 (Canda, Santa Cruz)。再加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体, 最后加入 ECL 试剂一曝光。使用 β -Actin 作为内参。将 Western blot 条带进行光密度值扫描。COX-2 的表达方式: COX-2 光密度/ β -Actin 光密度。

1.7 酶联免疫法检测外周血 COX-2 活性

使用酶联免疫 (ELISA) 的方法检测心肌 COX-2 活性, 试剂盒为西班牙 Cayman 公司, 批号为 760151 的 COX-2 试剂盒。按照说明书进行操作后, 使用美国 Bio-tek 公司的 ELX800NB 酶标仪读取。标准曲线 R 值为 0.9935。

1.8 统计学处理

所有指标均用“均数 $\pm$ 标准误”表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验, SNK 法做两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹参对血压和心率的影响

高血压组大鼠收缩压、舒张压、平均动脉压明显高于 WKY 大鼠, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在连续 12 周的检测中, 四组血压很平稳, 丹参组、塞来昔布组与高血压组比较, 收缩压、舒张压、平均动脉压差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 1)。

表 1 四组的血流动力学指数
Table 1 Hemodynamic indexes of four groups

(n=8)

组别	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	MAP (mmHg)	心率 (次/min)	LVEDP (mmHg)	dP/dtmax (mmHg/s)	-dP/dtmax (mmHg/s)
WKY	125 ± 3	87 ± 3	106 ± 5	267 ± 10	7.6 ± 1.3	3015 ± 217	2501 ± 175
SHR	171 ± 12*	115 ± 9*	139 ± 10*	258 ± 7	13.9 ± 1.7*	2528 ± 167*	1957 ± 134*
丹参处理 SHR	165 ± 7*	108 ± 8*	130 ± 6*	246 ± 9	9.2 ± 0.8*#	2917 ± 185#	2308 ± 163#
塞来昔布处理 SHR	168 ± 9*	105 ± 7*	133 ± 5*	249 ± 7	10.4 ± 1.2*#	2933 ± 176#	2195 ± 128*

注: SBP: 收缩压; DBP: 舒张压; MAP: 平均动脉压; LVEDP: 左室舒张末压; SHR: 自发性高血压大鼠。与 WKY 组比较, * $P < 0.05$; 与 SHR 组比较, # $P < 0.05$

2.2 丹参对血流动力学的影响

高血压大鼠的血流动力学测定表明, 部分老年高血压大鼠心力衰竭, 心功能较差, 丹参可以改善高血压大鼠的心功能, 改善 LVEDP、LVdP/dtmax、-LVdP/dtmax; 塞来昔布对 SHR 的 LVEDP、-LVdP/dtmax 有显著改善作用, 但对 LVdP/dtmax 没有影响, 说明其可以取消丹参对心脏舒张功能的影响, 但不能取消丹参对心脏收缩功能的影响 (表 1)。

2.3 丹参对心脏解剖学指标的影响

高血压大鼠的心脏质量及体质量比明显高于正常对照组, 显示老年 SHR 呈现严重的左心室肥大。丹参对 SHR 的体质量并无改善, 但可以明显降低左心室质量和左心室质量指数。塞来昔布能够取消丹参对左心室质量的影响, 但未能取消丹参对左心室质量指数的影响 (表 2)。

表 2 四组的解剖学指标
Table 2 Anatomy indicators of four groups

(n=8)

组别	BM(g)	LVM(g)	LVMI(mg/g)
WKY	496 ± 14	1.13 ± 0.02	2.23 ± 0.06
SHR	427 ± 13*	1.86 ± 0.03*	3.45 ± 0.07*
丹参处理 SHR	448 ± 10*	1.37 ± 0.03*#	2.98 ± 0.07*#
塞来昔布处理 SHR	437 ± 10*	1.79 ± 0.04*	3.09 ± 0.05*#

注: BM: 体质量; LVM: 左室质量; LVMI: 左室质量指数; SHR: 自发性高血压大鼠。与 WKY 组比较, * $P < 0.05$; 与 SHR 组比较, # $P < 0.05$

2.4 丹参对心脏病理学指标的影响

心肌 HE 染色表明, 丹参可以降低 SHR 的心肌

细胞直径, 塞来昔布不能取消丹参对心肌细胞直径的降低作用 (图 1)。Masson 染色表明, 丹参可以改善心脏的纤维化, 尤其是改善心肌内血管周围的纤维化, 塞来昔布可以取消丹参改善心肌血管周围纤维化的作用 (图 2)。四组的组织病理学指标情况见表 3。

2.5 心肌组织 COX-2 的表达水平

Western blot 结果表明, SHR 心肌组织中 COX-2 的蛋白表达水平增加。应用丹参后, SHR 心肌组织中的 COX-2 水平降低, 塞来昔布能够取消该作用 (图 3)。

2.6 心肌组织 COX-2 的活性

ELISA 结果表明, SHR 心肌组织中 COX-2 的活性增加 ($P < 0.05$)。应用丹参后, SHR 心肌组织中的 COX-2 活性降低, 塞来昔布能够取消该作用 (表 4)。

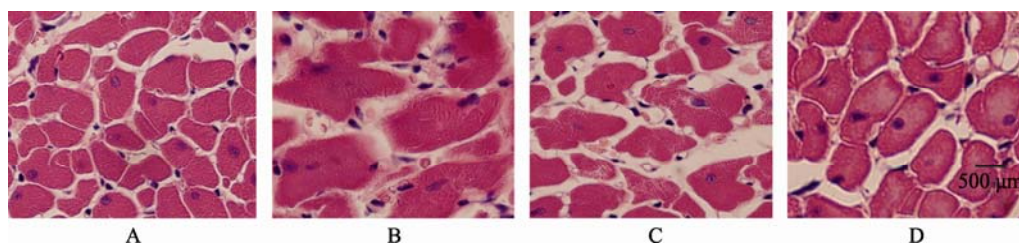


图 1 四组心肌的心肌细胞直径比较

Figure 1 Myocardial cell diameter of four groups (HE staining ×200)

A: WKY; B: SHR; C: 丹参处理 SHR; D: 塞来昔布处理 SHR

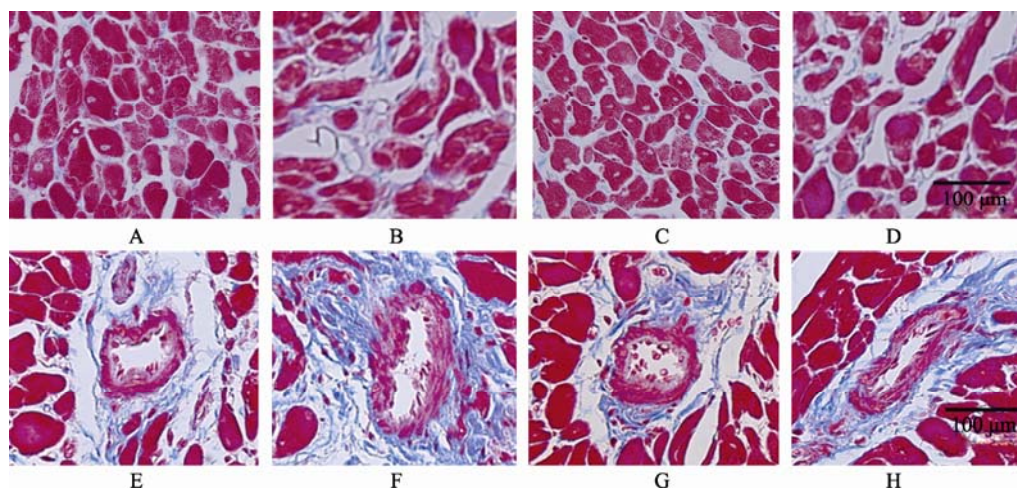


图 2 四组心肌的心肌纤维化水平比较

Figure 2 Myocardial fibrosis of four groups (Masson staining $\times 200$)

A,E: WKY; B,F: SHR; C,D: 丹参处理 SHR; D,H: 塞来昔布处理 SHR; A,B,C,D: 显示心肌间质纤维化; E,F,G,H: 显示心肌血管周围纤维化

表 3 四组的组织病理学指标

Table 3 Histopathologic indicators of four groups

(n=8)

组别	心肌细胞直径 (μm)	心肌间质纤维化指数 (%)	心肌血管周围纤维化指数 (%)
WKY	14.3 ± 0.4	0.64 ± 0.05	68 ± 7
SHR	$23.5 \pm 0.4^*$	$1.66 \pm 0.05^*$	$139 \pm 9^*$
丹参处理 SHR	$18.6 \pm 0.3^{*#}$	1.57 ± 0.06	$97 \pm 6^{*#}$
塞来昔布处理 SHR	$19.9 \pm 0.4^{*#}$	$1.60 \pm 0.06^*$	$128 \pm 7^*$

注: 与 WKY 比较, $^*P < 0.05$, 与 SHR 比较, $^{*#}P < 0.05$

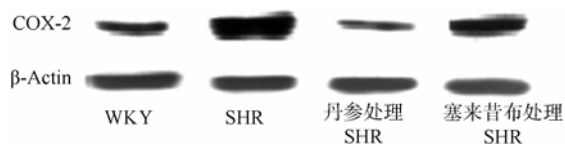


图 3 Western blot 检测 COX-2 蛋白表达情况

Figure 3 COX-2 protein expression by Western blot (n=8)

表 4 COX-2 的活性及表达情况

Table 4 COX-2 activity and expression

(n=8)

组别	COX-2 表达	COX-2 活性 (kU/g)
WKY	47.6 ± 3.8	56.7 ± 4.4
SHR	$125.8 \pm 7.2^*$	$73.9 \pm 5.6^*$
丹参处理 SHR	$31.7 \pm 3.2^{*#}$	$58.7 \pm 4.3^{*#}$
塞来昔布处理 SHR	$118.9 \pm 6.8^*$	$60.7 \pm 5.1^*$

注: COX-2: 环氧化酶; SHR: 自发性高血压大鼠。与 WKY 比较, $^*P < 0.05$; 与 SHR 比较, $^{*#}P < 0.05$

3 讨论

长期的高血压会导致左心室肥厚, 高血压左心室肥厚主要表现为左心室质量指数增加, 心肌细胞肥大, 心肌的纤维化。心肌的纤维化可以分为心肌间质的纤维化和心肌血管周围的纤维化^[5]。持久的高血压和心肌的纤维化增加了非心肌细胞在心脏中所占的比例, 对于心脏的收缩和舒张功能产生显著的负面影响, 最终会导致心力衰竭, 这在老年性长

期高血压中更明显。

SHR 是目前公认的最接近于人类原发性高血压的动物模型, 在 13 周时血压已近于稳定, 在老年时会出现不同程度的左心衰竭和明显的心肌纤维化, 是良好的研究左心室心肌纤维化的动物模型^[6]。中药抗纤维化一直是值得关注和研究的领域, 丹参作为传统的中药, 含有重要的心血管活性成分丹参酮 A, 具有较强的抗氧化, 清除自由基, 改善微循环的作用。诸多研究明确表明, 丹参具有能抵抗肝脏的损伤和抗肝纤维化的作用^[7]。研究表明, 丹参可能通过降低肾素-血管紧张素-醛固酮系统, 达到预防和逆转纤维化, 改善心内皮细胞的功能^[3]。虽然机制并不十分明确, 但丹参降低和逆转心肌纤维化的作用已十分明确。很多降压药物对于老年性顽固性高血压患者作用并不十分遂愿, 因此我们研究了丹参对于老年高血压大鼠的作用。研究表明, 丹参也可以有效地改善并部分逆转左心室的肥厚和心肌的纤维化, 对于心肌血管周围的纤维化尤其明显。

本实验表明, 丹参能显著降低左心室质量指数, 减小心肌细胞的直径和面积, 降低了心肌的间质纤维化和血管周围的纤维化。心肌的病理改变除了要考虑组织解剖学的改变, 也要考虑功能的改善。因

此我们也研究了丹参对于左心室功能的影响,研究表明,老年 SHR 呈现了一定程度的心力衰竭, LVEDP 平均值大于 13mmHg, 丹参可以有效地降低了 LVEDP, 改善左心室的收缩功能。本研究血压测定结果表明, 丹参并未能有效地降低高血压大鼠的血压, 这与郑智^[8]等研究类似, 说明丹参并不能改变高血压大鼠的心脏负荷, 但李伟等^[9]研究发现白花丹参能够显著降低 SHR 的血压波动性, 提高压力感受器的敏感性。而血压的波动性与心、脑、肾等器官损伤的程度密切相关, 对于高血压靶器官和并发症的预防和治疗具有重要的作用。

在心肌纤维化的形成过程中, 炎症起了至关重要的作用。炎症细胞可以释放花生四烯酸, 花生四烯酸有三条代谢途径: 经环氧酶代谢形成前列环素及血栓素 A 等; 经脂加氧酶代谢产生白三烯及羟基廿碳四烯酸; 经细胞色素 P450 (CYP) 途径代谢为廿烷四烯酸及表氧化廿碳三烯酸。COX-2 代谢途径是目前研究最明确的心肌间质纤维化形成的途径^[10]。为了证明 COX-2 途径通路参与了丹参抑制高血压心肌纤维化的作用, 作者进一步使用了特异性抑制剂塞来昔布阻断花生四烯酸环氧酶信号通路, 观察阻断该途径是否可取消丹参的作用, 研究表明, COX-2 抑制剂能部分消除丹参抑制老年 SHR 的心肌纤维化的作用。作者认为除了 COX-2 参与丹参抑制心肌纤维化之外, 还有其他途径共同参与了高血压心肌纤维化的途径, 如研究报道基质金属蛋白酶途径、肿瘤坏死因子途径等均参与了高血压的心肌纤维化途径。本研究选取了在丹参抗纤维化作用中发挥重要作用的 COX-2 途径, 以观察花生四烯酸环氧酶信号通路在丹参抗心肌纤维化的作用。研究发现, 丹参能够降低 COX-2 的表达, 说明丹参可能是通过 COX-2 途径改善老年 SHR 心肌纤维化的。

【参考文献】

- [1] Balakumara P, Jagadeeshb G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: Can the muddy waters be cleared[J]? *Pharmacol Res*, 2010, 62(5): 365-383.
- [2] van Zwieten PA. The influence of antihypertensive drug treatment on the prevention and regression of left ventricular hypertrophy[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(1): 82-91.
- [3] 唐忠志, 郑智, 唐瑛, 等. 丹参对自发性高血压大鼠心肌纤维化的逆转作用及其机制研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2002, 31(3): 292-294.
- [4] Kurisu S, Ozono R, Oshima T, *et al.* Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis[J]. *Hypertension*, 2003, 41(1): 99-107.
- [5] Gao S, Long CL, Wang RH, *et al.* K(ATP) activation prevents progression of cardiac hypertrophy to failure induced by pressure overload via protecting endothelial function[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(3): 444-456.
- [6] Xu Q, Chakravorty A, Bathgate RA, *et al.* Relaxin therapy reverses large artery remodeling and improves arterial compliance in senescent spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2010, 55(5): 1260-1266.
- [7] 陶艳艳, 刘成海. 丹参及其化学成分抗肝纤维化作用机制研究进展[J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(2): 145-148.
- [8] 郑智, 韩少杰, 任大宏. 丹参对自发性高血压大鼠左室肥厚及心脏局部醛固酮的作用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2002, 11(1): 22-24.
- [9] 李伟, 王德忠, 朱京涛, 等. 白花丹参对清醒自发性高血压大鼠血压及血压波动性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(2): 200-202.
- [10] Levick SP, Loch DC, Taylor SM, *et al.* Arachidonic acid metabolism as a potential mediator of cardiac fibrosis associated with inflammation[J]. *J Immunol*, 2007, 178(2): 641-646.

(编辑: 周宇红)