

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003) 11-03-0230-04

雌激素对自发性高血压大鼠心肾纤维化的影响

张廷星, 吴可贵, 晋学庆, 谢良地, 郭志军

(福建医科大学附属第一医院高血压研究所, 福建省福州市 350004)

[关键词] 病理生理学; 雌激素对高血压的作用; 纤维化; 自发性高血压; 左室肥厚; 转化生长因子 β_1 ; 大鼠

[摘要] 为探讨雌激素对自发性高血压大鼠心肾纤维化的影响, 将雌性自发性高血压大鼠随机分为假手术、去卵巢雌激素治疗组和去卵巢安慰剂组。分别测量治疗前后大鼠血压和体重, 3 个月后测左心室重和血清雌二醇水平, 采用免疫组织化学方法及计算机图像分析仪检测转化生长因子 β_1 在心脏及肾脏的表达, 采用苦味酸天狼星红染色及计算机图像分析仪检测心肌间质胶原容积分数。结果发现, 去卵巢雌激素治疗组血压和转化生长因子 β_1 在心、肾的表达和左心室重/体重以及心肌间质胶原容积分数等明显低于去卵巢安慰剂组 ($P < 0.05$), 与假手术组无明显差别; 去卵巢安慰剂组上述指标均高于假手术组 ($P < 0.05$)。以上提示, 自发性高血压大鼠去卵巢后血压升高, 雌激素替代治疗后能抑制其血压升高, 抑制其心肾纤维化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Estrogen Replacement Therapy on the Myocardial and Kidney Fibrosis in Spontaneously Hypertensive Rats

ZHANG Ting-Xing, WU Ke-Gui, JIN Xue-Qing, XIE Liang-Di, and GUO Zhi-Jun

(Institute of Hypertension Research, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

[KEY WORDS] Estrogen; Fibrosis; Spontaneously Hypertensive; Left Ventricular Hypertrophy; Transforming Growth Factor- β_1 ; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of estrogen replacement therapy (ERT) on the myocardial and kidney fibrosis in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** SHR were randomly divided into 3 groups: sham operation; ovariectomy with estrogen replacement therapy; ovariectomy treated with placebo. The rats were given normal diet and were killed three months after the operation. Systolic blood pressure, body weight, left ventricular mass were measured. Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in the myocardium and kidney were analyzed by immunohistochemical techniques. Myocardial interstitial collagen was analyzed using picrosirius red technique and computer image analysis system. **Results** Estrogen plasma levels dropped in ovariectomized rats compared with sham operate rats and recovered after estrogen substitution; the systolic blood pressure (SBP) was significantly higher in ovariectomized rats than that in normal group, no obvious change was showed between ovariectomized rats after ERT and sham operate group; TGF- β_1 expression was increased in the left ventricle and kidney of ovariectomized rats, and significantly decreased after ERT compared with ovariectomized group; the left ventricle of heart to body weight ratio in ovariectomized rats was significantly higher than that in sham operate rats. The ratio was decreased after treatment with estrogen; the ovariectomized rats had a higher interstitial collagen volume fraction (CVF), ERT could significantly reduce CVF. **Conclusions** ERT could prevent the increasing of SBP and the kidney and myocardial fibrosis in ovariectomized rats.

绝经后女性心血管疾病的发病率明显上升, 雌激素替代治疗可使心血管疾病发病率下降 30% ~ 50%^[1], 但雌激素的作用机制目前尚未明确。左心室肥厚是心血管疾病的独立危险因素, 不仅心室壁增厚, 心室重量增加, 心肌组织结构也发生许多改变, 最明显的即心肌纤维化, 此类患者急性心肌梗死、心力衰竭、猝死及其他的心血管病危险性增加 6

~ 8 倍。本文观察了雌激素对心、肾纤维化的影响, 以探讨雌激素对心血管系统可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

大鼠购于中国医学科学院实验动物研究所, 福建省高血压研究所动物室饲养, 自由取食、饮水。标准饲料由上海 BK 公司提供。18 只 12 周龄雌性自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 体重 (body weight, BW) 259 ± 8 g, 随机分为假手术安慰剂组 (简称假手术组)、去卵巢 + 雌激素治疗

[收稿日期] 2002-08-28 [修回日期] 2003-03-12

[作者简介] 张廷星, 女, 1972 年出生, 福建省古田人, 硕士, 主治医师, 研究方向为高血压, 联系电话: 0591-3357199-2756, E-mail: tingxing-zhang@163.net。吴可贵, 男, 1937 年出生, 福建省仙游人, 学士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为高血压。

组(简称治疗组,雌二醇 E2,倍美力,美国惠氏-艾尔斯特制药公司)和去卵巢安慰剂组(简称去卵巢组)。雌激素治疗组每天给予雌激素 1 mg/kg 给药(灌胃)一次,共 3 个月。各组均于 3 个月后处死。

1.2 血压、血清雌二醇、左心室重和体重的测定

采用 RBP-1 型大鼠血压测定仪(中日友好医院临床研究所制造)在大鼠清醒状态下间接测量尾动脉收缩压。用化学发光法测定血清雌二醇浓度。

动物称重后断头处死,取出心脏,先剪去周围结缔组织,再剪去心房和右心室游离壁,称量左心室重(left ventricular mass, LVM),以左心室重与体重比(LVM/BW)表示左心室肥厚的程度。

1.3 免疫组织化学染色

在心脏冠状沟下 1 mm 处,取左心室心肌横切面,同时取肾脏横切面,分别用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,制片,切片厚约 6 μ m。采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶法(SP 法)免疫组织化学染色检测心脏及肾脏转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 的表达(抗 TGF- β_1 、SP 试剂盒和 DAB 试剂盒均购自北京中山生物有限公司)。随机选取心内膜下心肌和肾脏皮质 5 个视野,计算机图像分析仪测定每个视野吸光度值,计算单位面积平均积分吸光度值。

1.4 左心室心肌胶原容积分数的测定

在心脏冠状沟下 1 mm 处取左心室心肌横切面,用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,制片,切片厚约 6 μ m。苦味酸天狼星红染色法使胶原特殊染色,心肌细胞呈黄色,胶原呈红色。采用计算机图像分析仪(Australia, VP32)测量胶原容积分数(collage volume fraction, CVF) (左心室胶原面积/所测视野面积),随机取 5 个视野,以均值作为该心肌的 CVF。

1.5 统计学分析

用 SPSS 统计软件处理。计量数据采用均数 \pm 标准差的形式。组间比较采用多样本均数的 one-way ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 治疗前后血清雌二醇浓度和血压的变化

去卵巢组雌激素水平明显低于假手术组(234 ± 30 比 476 ± 26 ng/L, $P < 0.05$), 予雌激素替代治疗后,血清雌二醇浓度接近生理水平,与假手术组没有明显的区别(426 ± 28 比 476 ± 26 ng/L, $P > 0.05$), 可见每天 1 mg/kg 雌激素替代治疗能使雌二醇达到生理浓度。实验前 3 组大鼠血压没有明显差别, 3 个

月后,去卵巢组血压明显高于实验前和假手术组(188 ± 8 比 169 ± 6 mm Hg; 188 ± 8 比 174 ± 8 mm Hg, $P < 0.05$); 治疗组血压与实验前及假手术组比较没有明显区别(169 ± 8 比 174 ± 7 mm Hg; 171 ± 6 比 174 ± 7 mm Hg, $P > 0.05$)。

2.2 雌激素对左心室肥厚的影响

去卵巢组大鼠左心室重/体重明显高于假手术组($P < 0.05$), 予雌激素替代治疗后 LVW/BW 与假手术组没有明显的差别。

表 1. 雌激素对各组大鼠体重、左心室重和左心室重/体重的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of estrogen on LVM, BW and LV/BW of SHR

| 分 组 | 体重 (g) | 左心室重 (mg) | 左心室重/体重 (mg/g) |
|------|--------------|----------------|----------------------------|
| 假手术组 | 258 \pm 17 | 990 \pm 88 | 3.9 \pm 0.1 |
| 去卵巢组 | 258 \pm 8 | 1 170 \pm 85 | 4.6 \pm 0.4 ^a |
| 治疗组 | 261 \pm 17 | 906 \pm 68 | 3.9 \pm 0.2 ^b |

$P < 0.05$, a: 与假手术组比较; b: 与去卵巢组比较。

2.3 雌激素对心脏和肾脏转化生长因子 β_1 表达的影响

免疫组织化学结果可见,心脏和肾脏 TGF- β_1 的表达以去卵巢组棕黄色阳性颗粒最多,而雌激素治疗组与假手术组无明显差别(图 1, Figure 1)。去卵巢组心脏和肾脏组织 TGF- β_1 表达均高于假手术组($P < 0.05$), 雌激素替代治疗组 TGF- β_1 表达降低,与假手术组没有明显的差别(表 2, Table 2)。

表 2. 雌激素对各组大鼠心脏和肾脏转化生长因子 β_1 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effect of estrogen on the expression of TGF- β_1 in the left ventricle and kidney

| 分 组 | 左心室 TGF- β_1 吸光度 | 肾脏 TGF- β_1 吸光度 |
|------|--------------------------------|--------------------------------|
| 假手术组 | 0.265 \pm 0.018 | 0.263 \pm 0.027 |
| 去卵巢组 | 0.286 \pm 0.018 ^a | 0.287 \pm 0.026 ^a |
| 治疗组 | 0.266 \pm 0.011 ^b | 0.256 \pm 0.012 ^b |

$P < 0.05$, a: 与假手术组比较; b: 与去卵巢组比较。

2.4 雌激素对左心室心肌胶原容积分数的影响

去卵巢组心肌肥厚的同时其间质胶原含量与假手术组比较明显增多(胶原容积分数为 5.17 ± 0.66 比 3.87 ± 0.38 , $P < 0.05$), 雌激素替代治疗后其心肌间质胶原显著减少,接近假手术组水平(胶原容积分数为 4.12 ± 0.32 比 3.87 ± 0.38 , $P > 0.05$) (图 2,

Figure 2)。

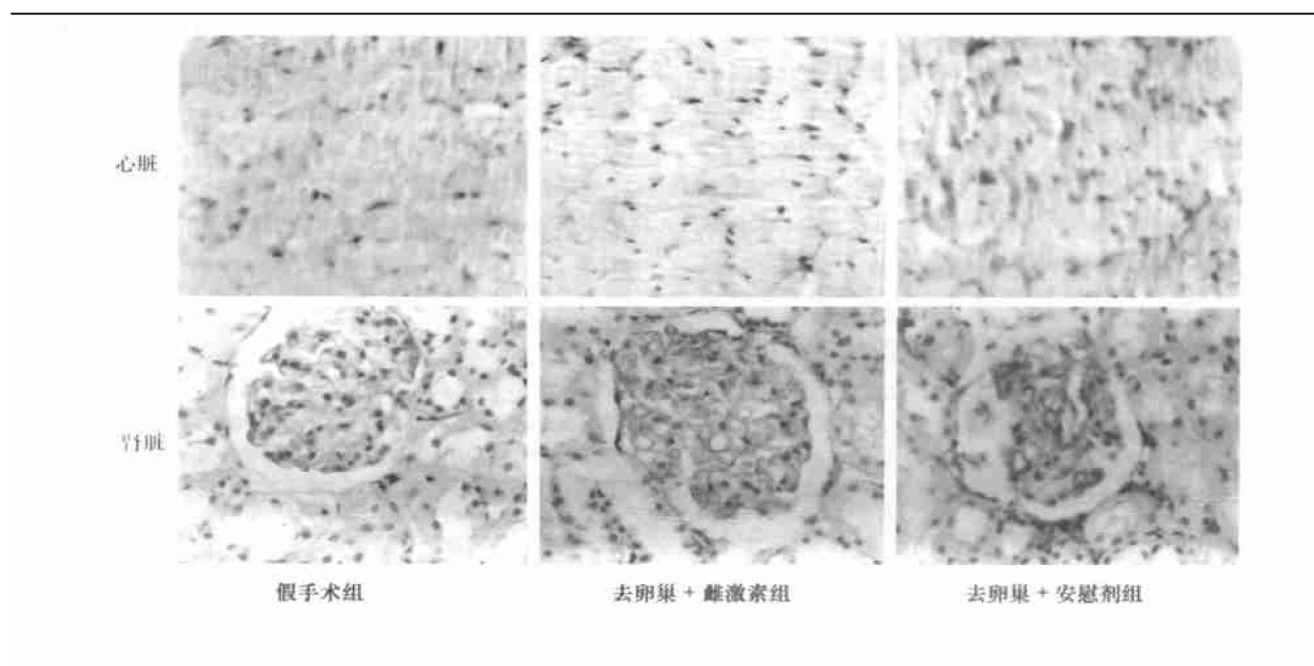


图 1. 雌激素替代治疗 3 个月对心脏和肾脏转化生长因子 β_1 表达的影响($\times 200$) 棕黄色颗粒为阳性产物, 以去卵巢安慰剂组表达最高; 雌激素替代治疗组与假手术组没有明显的区别。

Figure 1. Effect of estrogen on the expression of $TGF-\beta_1$ in the left ventricle and kidney($\times 200$)

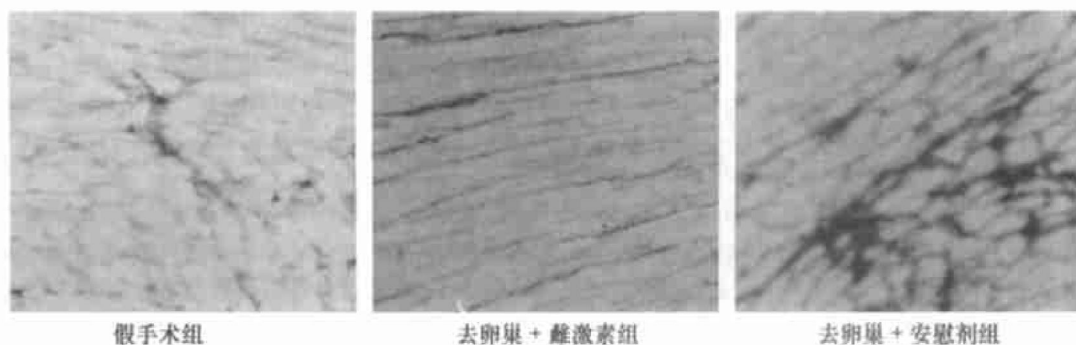


图 2. 雌激素替代治疗 3 个月对心肌间质胶原含量的影响($\times 200$) 胶原呈红色, 心肌呈黄色, 去卵巢组心肌间质的胶原含量明显增多、增粗, 雌激素替代治疗组与假手术组没有明显差别。

Figure 2. Effect of estrogen on myocardial collagen

3 讨论

雌激素替代治疗可调节血脂代谢^[2,3], 但雌激素调节血脂的作用只能解释 25% ~ 50% 雌激素对心血管的保护作用, 而 50% ~ 75% 的效应来源于非脂质因素^[4], 如: 调节凝血系统^[5]、抑制肾素-血管紧张素系统^[6]和抗氧化作用^[2]等。本实验采用双侧卵巢切除的大鼠模拟建立绝经模型, SHR 卵巢切除后血清雌二醇浓度显著降低, 反映了人工绝经后的状

态, 予雌激素替代治疗(每天 1 mg/kg)后血清雌二醇显著高于切除卵巢大鼠, 接近生理水平, 与假手术组差别没有显著意义, 可模拟绝经后的雌激素替代疗法。

绝经及雌激素替代治疗对血压的影响还存在着争论^[7]。大量流行病学研究结果表明绝经前女性高血压的发病率低于同龄男性, 绝经后发病率增加, 提示雌激素可能影响血压水平; 另外一个现象也支持

雌激素影响血压水平,即血压随着正常的月经周期而波动,月经黄体期(此时雌激素的水平最高)的血压低于排卵期^[8]。本实验研究发现 SHR 去卵巢后收缩压明显升高,而雌激素替代治疗后血压没有明显的升高,这提示绝经可能与血压升高有关,而雌激素替代治疗可抑制血压的升高。可能由于血中雌激素水平降低,影响细胞内外电解质的分布,从而影响血管收缩舒张因子之间的平衡以及血管平滑肌的增殖和功能^[9];雌激素具有的类似钙拮抗剂作用^[6]也可能对血压产生影响。

高血压左心室肥厚是心血管疾病的独立危险因素,因此对高血压患者的治疗不仅要降低血压,而且还要逆转左心室肥厚。本实验结果表明雌激素替代治疗不仅能抑制大鼠左心室肥厚,这与国外研究结果相类似^[6],而且还可以减少心肌间质胶原,减轻了心肌胶原的沉积和间质的增生,即抑制心肌的纤维化。雌激素对抑制心肌纤维化的作用机制还不清楚,部分可能得益于雌激素对血压的有益影响。

转化生长因子- β_1 是一种具有多种生物活性的细胞因子,对许多器官和组织的生长和分化起着重要的作用,TGF- β_1 能调节细胞增殖、分化、免疫反应以及刺激细胞外基质增生。心脏的 TGF- β_1 是由心肌细胞和成纤维细胞产生的,可促进多种心肌外基质成分的合成,促进心肌纤维化^[10]。TGF- β_1 在肾脏过度表达可促进系膜细胞外基质堆积,体外实验研究证实 TGF- β_1 可刺激培养小鼠肾小球系膜细胞、上皮细胞和近曲小管上皮细胞的细胞外基质合成增加^[11],细胞外基质堆积是各种慢性肾脏疾病进展的共同特征。不管病因如何,在以进行性肾纤维化为特征的肾脏疾病,TGF- β_1 常是导致纤维化的最后的、共同的中介物,可见 TGF- β_1 的表达水平可间接反映心肌与肾脏的纤维化。本研究结果 TGF- β_1 在去卵巢组大鼠心脏与肾脏的表达明显高于未去卵巢组,去卵巢后予雌激素替代治疗,TGF- β_1 的表达明显降低,达到了未去卵巢组的水平。雌激素缺乏会增加 TGF- β_1 在心肾表达的增加,而补充雌激素后其表达降低,提示绝经后补充雌激素可通过降低 TGF- β_1 的表达延缓心肾的纤维化而发挥心血管保护作用,这可能是雌激素对心血管作用的机制之一。

目前,雌激素对心血管的作用机制仍不明确,心血管系统存在雌激素受体,这为雌激素对心血管的保护作用提供了分子基础^[12]。目前报道较多的是对肾素-血管紧张素系统的影响。文献[13]报道雌

激素能抑制去卵巢大鼠肾、肺和主动脉等部位血管紧张素转化酶 mRNA 的表达及活性,雌激素可抑制体内血管平滑肌 AT1 受体 mRNA 的表达^[14]。实际上,绝经后口服雌激素使血管紧张素原升高,但是, Schunkert 等^[15]证实不管口服或皮下应用雌激素都能抑制血浆肾素水平。总之,雌激素有可能抑制肾素-血管紧张素系统,从而使血压降低,减少 TGF- β_1 在心肾的表达^[11,16],抑制左心室肥厚和心、肾纤维化而达到保护心血管的作用。目前,以心血管保护为目的的雌激素替代治疗仍没有得到广泛的应用,很重要的原因就是雌激素对心血管作用的机制还不完全明确,有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Pelzer T, Shamim A, Neyens L. Estrogen effects in the heart. *Mol Cell Biochem*, 1996, **160-161**: 307-313
- [2] 刘彤,沈璐华. 雌激素抑制去卵巢家兔实验性主动脉粥样硬化的形成. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (4): 321-324
- [3] Bush TL, Battett CE, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, et al. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation*, 1987, **75** (6): 1 102-109
- [4] Roesch DM, Tian Y, Zheng W, Shi M, Verbalis JG, Shandberg K. Estradiol attenuates angiotensin-induced aldosterone secretion in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 2000, **141** (12): 4 629-636
- [5] 张莹,朱广瑾,段岩平. 雌激素对血液凝固与纤维蛋白溶解的影响及对心血管的保护. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 57-61
- [6] Modena MG, Muia N Jr, Aveta P, Molinari R, Rossi R. Effects of transdermal 17 β estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension*, 1999, **34** (5): 1 041-046
- [7] Aepfelbacher FC, Messerli FH. Hemodynamics and Pathogenesis. *Hypertension in Postmenopausal Women*. New York: Marcel Dekker, 1996, 79-99
- [8] Bradshaw KD. Postmenopausal Hypertension Put into Perspective. *Hypertension in Postmenopausal Women*. New York: Marcel Dekker, 1996, 231-240
- [9] Staessen JA, Bieniaszowski L, Broens I, Fagard R. The epidemiology of Menopause and Its Association with Cardiovascular Disease. *Hypertension in Postmenopausal Women*. New York: Marcel Dekker, 1996, 43-78
- [10] Brand T, Schneider MD. The TGF β superfamily in myocardium: ligands, receptors, transduction, and function. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, **27** (1): 5-18
- [11] Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE. Transforming growth factor β 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int*, 1997, **51** (5): 1 553-567
- [12] 阮云军,吴赛珠,孟素荣,周可祥,翁心植,朱小虎,等. 雌激素替代治疗对去卵巢大鼠动脉雌激素受体表达的影响. *中华老年医学杂志*, 2000, **19** (5): 358-360
- [13] Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chajppell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin converting enzyme mRNA. *Hypertension*, 1999, **33** (1 Pt 2): 323-328
- [14] Nickening G, Baumer AT, Grobhe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, et al. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*, 1998, **97** (22): 2 197-201
- [15] Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derckx HM, Kurzinger S, Riegger AJ, et al. Effect of estrogen replacement therapy on renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation*, 1997, **95** (1): 39-45
- [16] Lijnen P, Petrov V. Antagonism of the renin-angiotensin-aldosterone system and collagen metabolism in cardiac fibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1999, **21** (3): 215-227

(此文编辑 朱雯霞)