

[文章编号] 1007-3949(2007)15-03-0181-04

• 实验研究 •

复方丹参滴丸对自发性高血压大鼠 血管壁重建的干预及可能机制

叶 武¹, 叶美颜¹, 冯培芳¹, 陆如凤¹, 冯久贤²

(1. 浙江省中医院心内科, 浙江省杭州市 310006; 2. 上海胸科医院肿瘤分子生物学实验室)

[关键词] 内科学; 自发性高血压大鼠; 血管壁平滑肌细胞增长率; 基质金属蛋白酶 2; 层粘连蛋白; 内皮素 1; 复方丹参滴丸

[摘要] 目的 研究早期、长期辅助运用复方丹参滴丸对自发性高血压大鼠血管壁重建的干预及可能机制。方法 10 周龄自发性高血压大鼠 48 只随机分成 6 组: 治疗前对照组、阴性对照组、络活喜治疗组、复方丹参滴丸后期治疗组、复方丹参滴丸早期治疗组和复方丹参滴丸长期治疗组, 检测胸主动脉壁厚度和血管壁平滑肌细胞增长率, 以及基质金属蛋白酶 2、内皮素 1 和层粘连蛋白相对表达水平。结果 与复方丹参滴丸早期治疗组比, 复方丹参滴丸长期治疗组血管平滑肌细胞增长率明显减少, 而复方丹参滴丸后期治疗组则明显增加。在降压治疗(络活喜)基础上加用复方丹参组其内皮素 1、基质金属蛋白酶 2 表达均有不同程度减少, 而层粘连蛋白增加, 且出现时间在血管平滑肌细胞增长率变化之前。结论 在有效降压治疗基础上早期、长期联合运用复方丹参滴丸可能通过产生生物学效应(基质金属蛋白酶 2 和内皮素 1 表达减少, 层粘连蛋白表达增加)来遏制因此而产生的力学效应(血管平滑肌细胞增长率), 从而改善血管壁的重建和增厚。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Intervention and Possible Mechanism of Fufang Danshen Diwan on Vascular Remodeling of Spontaneously Hypertensive Rats

YE Wu¹, YE Mei-Yan¹, FENG Pei-Fang¹, LU Ru-Feng¹, and FENG Jiu-Xian²

(Department of Cardiology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhejiang, Hangzhou 310006, China)

[KEY WORDS] Spontaneously Hypertensive Rats; Vascular Smooth Muscle Cell Growth Rate; Matrix Metalloproteinase 2; Endothelin 1; Laminin; Fufang Danshen Diwan

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the characteristic and the possible mechanism of vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR) and effect of Fufang Danshen Diwan, when Fufang Danshen Diwan was taken on early stage for long time.

Methods Forty-eight ten-week-old SHR were randomly divided into six groups: the control group before treatment ($n=8$), the negative group ($n=8$) which were fed with 0.9% sodium chloride for 8 weeks, the amlodipine treatment group ($n=8$) which were fed with amlodipine for 8 weeks, Fufang Danshen Diwan later treatment group ($n=8$) which were fed with amlodipine for 8 weeks and then added with Fufang Danshen Diwan for 8 weeks again, Fufang Danshen Diwan early treatment group ($n=8$) which were fed with amlodipine and Fufang Danshen Diwan for 8 weeks, Fufang Danshen Diwan long-term treatment group ($n=8$) which were fed with amlodipine and Fufang Danshen Diwan for 16 weeks and then were executed. All the rats were taken blood pressure before they were executed, and then vascular wall of thoracic aorta were taken out, then the wall thickness (WT) and growth rate of vascular smooth muscle cell (VSMC), the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), endothelin 1 (ET-1) and laminin (LN) were observed.

Results Compared with Fufang Danshen Diwan early treatment group, the VSMC growth rate of Fufang Danshen Diwan long-term treatment group descended obviously, nevertheless, that of Fufang Danshen Diwan later treatment group ascended significantly. Based on lowering blood pressure taking Fufang Danshen Diwan earlier and longer would descended the expression of MMP-2 and ET-1 and ascended the expression of LN, which occurred before VSMC growth rate changed.

Conclusion Based on lowering blood pressure taking Fufang Danshen Diwan on early stage for long time would restrain vascular remodeling by altering biological effect (descended the expression of MMP-2 and ET-1, ascended the expression of LN), as well as mechanic effect (the growth rate of VSMC).

[收稿日期] 2006-09-04 [修回日期] 2007-02-01

[基金项目] 浙江省中医药研究课题(2002C016)

[作者简介] 叶武, 副主任医师, 擅长高血压、冠心病和心律失常的诊治, 联系电话 0571-87072881 或 13588887280, E-mail 为 yewudocor@126.com。冯培芳, 教授, 主任医师, 从事高血压病临床与基础研究。冯久贤, 研究员, 主持上海胸科医院肿瘤分子生物学实验室。

血管壁重建既是高血压的后果又是使血压升高与靶器官损害的原因, 遏制此种恶性循环是目前治疗高血压病的共识, 针对产生血管壁重建的力学效应而采用的降压治疗是众所周知的。本实验在降压治疗的基础上早期、长期加用复方丹参滴丸干预自

发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR), 并动态观察其动力学效应指标血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 与血管壁厚度 (wall thickness, WT) 的增长率及血管壁重建的生物学效应指标基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 和层粘连蛋白 (laminin, LN), 试图为活血化瘀法如何通过生物学效应来遏制血管壁重建提供病理生理基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10 周龄 SHR48 只购自上海高血压研究所 SHR 动物房, 同周龄 8 只 Wistar 大鼠 (为正常对照组) 购自复旦大学实验动物部。参照随机数字表将 48 只 SHR 分成 6 组: 治疗前对照组 ($n=8$): 测血压后处死。④阴性对照组 ($n=8$): 予生理盐水 10 mL/(kg·d) 每日灌胃一次, 8 周后处死。④络活喜治疗组 ($n=8$): 予络活喜 (辉瑞公司提供, 批号 35805007) 以 30 mg/(kg·d) 溶于 2 mL 生理盐水中, 每日灌胃一次, 8 周后处死 ($n=8$); 复方丹参滴丸后期治疗组 (简称后期治疗组, $n=8$): 予络活喜治疗 8 周 (剂量按上), 8 周后在络活喜基础上加用复方丹参滴丸 300 mg/(kg·d) 溶于 2 mL 生理盐水中, 每日灌胃一次继续治疗 8 周后处死。复方丹参滴丸早期治疗组 (简称早期治疗组, $n=8$): 予络活喜加复方丹参滴丸治疗 8 周 (剂量按上), 8 周后处死。复方丹参滴丸长期治疗组 (简称长期治疗组, $n=8$): 予络活喜加复方丹参滴丸治疗 16 周 (剂量按上), 16 周后将动物处死。

1.2 血压测定

各组大鼠在实验入选前及处死前均予血压测定。动物置于 MRB-•A 电脑大鼠血压心率测定仪 (上海市高血压研究所) 的保温箱内 37℃ 加温 15 min, 待尾动脉充分扩张, 鼠尾套入套袖, 动物安静后充气, 测定收缩压, 重复 3 次, 取平均值。

1.3 血管壁厚度及血管平滑肌细胞相对面积增长率测定

动物处死后, 迅速分离主动脉周围结缔组织, 并取出全胸、腹主动脉备用。将 1 cm 胸主动脉置于 25 mL/L 戊二醛固定液固定 24 h, 用磷酸缓冲液洗涤 3 次 (每次 30 min), 然后锇酸固定, 梯度酒精脱水至无水酒精, 取胸主动脉常规石蜡包埋切片, 片厚 3 μm。在每例动脉的连续切片中随机取 16 个血管环, 从中分别间隔取 4 个血管环分裱于 4 张玻片上, 以碱性

复红染 VSMC。每个血管环在周向相互垂直位置取 4 处包含血管各层的测量点, 光镜下观察胸主动脉形态变化, 并用计算机图象分析系统血管参数测量软件 2.0 (华东理工大学自动化研究所开发) 分别测得血管壁厚度及相对面积。增长率 = (后一时相点值 - 前一时相点值) / 前一时相点值 × 100%, 前一时相点值均用治疗前对照组测量值 (10 周龄未经治疗), 后一时相点值为 18 周、26 周各治疗组测量值。

1.4 逆转录聚合酶链反应法测定基质金属蛋白酶 2、内皮素 1 和层粘连蛋白

用 Trizol 试剂从上述主动脉组织中提取总 RNA, 二步法 RT-PCR 技术检测由血管壁内皮细胞及增生的平滑肌细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞所表达的 MMP-2、内皮素 1 和 LN。引物设计参照 Gene bank 资料, 引物由上海申发生物科技有限公司合成。内皮素 1 引物: 上游为 5'-CGT TGC TCC TGC TCC TCC TTG ATG-3', 下游为 5'-AAG ATC CCA GCC AGC ATG GAG AGC G-3', 扩增片长 546 bp; MMP-2 引物: 上游为 5'-CTA TTC TGT CAG CAC TTT GG-3', 下游为 5'-CAG ACT TTG GTT CTC CAA CTT-3', 扩增片长 309 bp; LN 引物: 上游为 5'-GCC AGA AAT CAA GAA AGG AAG-3', 下游为 5'-GCA TTT GCA TCC ACA TCT AGG-3', 扩增片长 216 bp; β-actin 引物 (设计参照 Gene bank 资料): 上游为 5'-ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA-3', 下游为 5'-ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG-3', 扩增片长 318 bp。反应体系 (20 μL) cDNA 1 μL, 10 × buffer 2 μL, MgCl₂ 1.5 μL, 脱氧核三磷酸 (dNTP, Promega 公司) 0.32 μL, 耐热的 DNA 聚合酶 (Tag DNA 聚合酶, 华美公司) 2.8 μL, 加去离子水至 20 μL。内皮素 1、LN 和 MMP-2 分别按以下反应条件在 PCR 扩增仪 (MJ. Research, INC, USA) 上进行。PCR 扩增程序及条件见表 1, PCR 产物经琼脂糖凝胶进行电泳, 用凝胶数码成像分析系统对 PCR 产物进行半定量分析, 以内皮素 1、LN、MMP-2 mRNA 扩增产物条带的吸光度值与同管内参 β-actin 条带的吸光度值之比为内皮素 1、LN 和 MMP-2 的相对表达水平。

表 1. PCR 扩增程序及条件

	预变性	变性	退火	延伸	循环	再延伸
内皮素 1	94℃ 3 min	94℃ 40 s	50℃ 30 s	72℃ 60 s	30 次	72℃ 7 min
LN	95℃ 5 min	95℃ 60 s	58℃ 60 s	72℃ 120 s	37 次	72℃ 5 min
MMP-2	94℃ 4 min	94℃ 30 s	55℃ 30 s	72℃ 60 s	30 次	72℃ 5 min

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件包分析,服从正态分布,则作方差齐性检验,方差齐,则作 t 检验;方差不齐则用 t' 检验。多个样本与同一样本比较用 Dunnett t test,多个样本间两两比较用 q 检验,治疗前后血压变化及 WT 与 VSMC 相对面积增长率变化比较用 ANOVA 分析,若不服从正态分布则用秩和检验。WT 与 VSMC 增长率的相关性用直线相关及 F 检验,VSMC 增长率与 MMP-2、内皮素 1、LN 相关性用偏相关及 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠血压比较

治疗前对照组、阴性对照组、络活喜治疗组、复方丹参滴丸后期治疗组和早期治疗组、长期治疗组治疗前收缩压分别为 193.3 ± 5.1 、 192.4 ± 7.2 、 193.2 ± 6.9 、 191.7 ± 6.3 、 192.1 ± 5.4 和 192.8 ± 5.8 mmHg,经 ANOVA 分析,差异无显著性($F = 0.103$, $P = 0.958$),具有可比性。Wister 大鼠收缩压为 126.1 ± 7.0 mmHg,显著低于治疗前对照组($t = 18.24$, P

< 0.05);经 8 周治疗后阴性对照组大鼠收缩压(194.3 ± 6.8 mmHg)无明显降低($P > 0.05$),而络活喜治疗组(158.0 ± 11.8 mmHg)、复方丹参滴丸早期治疗组(158.0 ± 10.7 mmHg)与阴性对照组、治疗前对照组比血压明显降低($P < 0.001$),但络活喜治疗组与复方丹参滴丸早期治疗组比较,差异无显著性($P = 0.925$);复方丹参滴丸后期治疗组血压(156.0 ± 10.6 mmHg)与复方丹参滴丸长期治疗组(157.0 ± 10.9 mmHg)比较差异无显著性($P > 0.05$),说明降血压是络活喜的作用。

2.2 各组大鼠血管平滑肌细胞与血管壁厚度增长率比较

与阴性对照组比,络活喜治疗组和复方丹参滴丸早期治疗组、后期治疗组及长期治疗组的 WT 与 VSMC 增长率均显著减慢,说明降压治疗确能抑制血管壁的增厚。与络活喜治疗组、复方丹参滴丸早期治疗组及后期治疗组比,复方丹参滴丸长期治疗组 VSMC 和 WT 增长率明显减少,表明只有长期、早期联合运用复方丹参滴丸才能遏制血管壁的增厚(表 2)。

表 2. 各治疗组大鼠血管平滑肌细胞与血管壁厚度增长率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

观察指标	经 8 周治疗后 SHR(18 周龄)			再经 8 周治疗后 SHR(26 周龄)	
	阴性对照组	络活喜治疗组	早期治疗组	后期治疗组	长期治疗组
VSMC 增长率	0.281 ± 0.028	0.096 ± 0.023^a	0.088 ± 0.015^a	0.082 ± 0.027^a	0.028 ± 0.099^{abcd}
WT 增长率	0.108 ± 0.238	0.014 ± 0.220^a	0.010 ± 0.239^a	0.009 ± 0.210^a	-0.032 ± 0.212^{abcd}

a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组比; b 为 $P < 0.05$, 与络活喜治疗组比; c 为 $P < 0.05$, 与早期治疗组比; d 为 $P < 0.05$, 与后期治疗组比。

2.3 各组大鼠胸主动脉壁内皮素 1、基质金属蛋白酶 2 和层粘连蛋白基因表达的差异

与正常对照组比较,治疗前对照组内皮素 1、MMP-2 基因表达增加,而 LN 基因表达减少($P < 0.05$);与阴性对照组比,络活喜治疗组、复方丹参滴丸早期治疗组和后期治疗组、长期治疗组内皮素 1 和 MMP-2 基因表达减少,而 LN 基因表达增加($P <$

0.05);与络活喜治疗组比,复方丹参滴丸早期治疗组和后期治疗组、长期治疗组内皮素 1 和 MMP-2 基因表达减少,而 LN 基因表达增加($P < 0.05$),提示在降压治疗基础上加用丹参滴丸都会使血管壁内皮素 1、MMP-2 表达减少和 LN 表达增加更明显,出现的时间在 VSMC、WT 增长率变化之前(表 3 和图 1)。

表 3. 各组大鼠胸主动脉壁内皮素 1、基质金属蛋白酶 2 和层粘连蛋白的聚合酶链反应产物相对光密度值

	正常对照组	治疗前对照组	阴性对照组	络活喜治疗组	早期治疗组	后期治疗组	长期治疗组
内皮素 1	154.6 ± 1.6	204.3 ± 1.3^a	228.5 ± 0.9	201.4 ± 0.8^b	193.4 ± 0.6^{bc}	198.6 ± 0.7^{bc}	165.4 ± 0.9^{bcde}
MMP-2	177.9 ± 1.2	224.1 ± 1.3^a	227.3 ± 1.1	214.2 ± 1.4^b	212.0 ± 1.0^{bc}	215.0 ± 1.0^{bc}	189.3 ± 0.7^{bcde}
LN	231.8 ± 1.2	184.8 ± 1.0^a	181.0 ± 1.2	194.5 ± 0.9^b	212.5 ± 1.9^{bc}	205.5 ± 0.9^{bc}	220.8 ± 1.3^{bcde}

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比; b 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组比; c 为 $P < 0.05$, 与络活喜治疗组比; d 为 $P < 0.05$, 与早期治疗组比; e 为 $P < 0.05$, 与后期治疗组比。

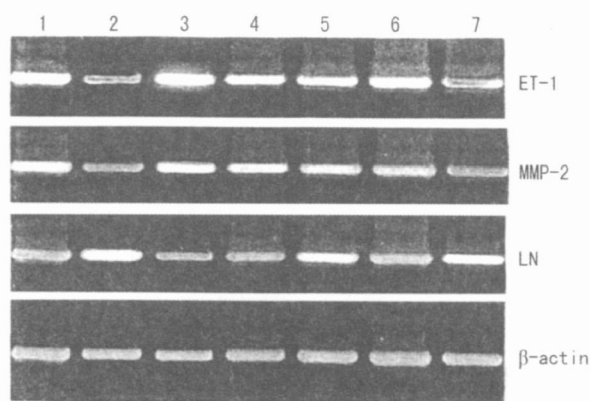


图1. 大鼠内皮素1、基质金属蛋白酶2和层粘连蛋白扩增产物的琼脂凝胶电泳结果 1~7分别为治疗前对照组、正常对照组、阴性对照组、络活喜治疗组、复方丹参滴丸早期治疗组、复方丹参滴丸后期治疗组和复方丹参滴丸长期治疗组。

2.4 血管平滑肌细胞与血管壁厚度增长率相关性 及血管平滑肌细胞增长率与内皮素1、基质金属 蛋白酶2和层粘连蛋白的偏相关性分析

血管壁厚度增长率与VSMC增长率呈正相关($r = 0.524$, $P < 0.05$), 提示血管壁因VSMC增长而增厚。VSMC增长率与内皮素1($r = 0.41$, $P = 0.009$)、MMP-2呈显著正相关($r = 0.43$, $P = 0.007$), 与LN呈显著负相关($r = -0.38$, $P = 0.006$); 内皮素1与MMP-2呈显著正相关($r = 0.39$, $P = 0.005$); 内皮素1($r = -0.35$, $P = 0.043$)、MMP-2($r = -0.40$, $P = 0.033$)与LN呈显著负相关。

3 讨论

我们曾在2003年结束的研究中运用的是20周龄的SHR, 服药方式和剂量与本研究相同而服药时间为8周, 研究结果提示对VSMC增长无遏制作用^[1], 事实上4~16周时SHR的VSMC增长最迅速^[2], 故本研究选10周龄SHR, 服药时间为16周, 这样可较早较长期合用丹参滴丸。众所周知的力学效应是: 血压增高时, 血管壁一定要以管径的缩小或管壁的增厚来维持与血压增高相适应的管壁张力^[3]。本实验所取的标本为胸主动脉, 以管壁增厚为主。内皮素1由血管壁内皮细胞表达, 是VSMC强有力的促有丝分裂原之一, 在VSMC异常增生中起重要作用^[4]。MMP-2属基质金属蛋白酶类, 体内许多炎性细胞因子都能诱导或刺激MMP-2在转录水平的表达^[5], 动脉管壁中增生的VSMC能分泌MMP-2, MMP-2参与高血压主动脉重塑^[6]。高血压致内皮损伤后的内皮细胞也能分泌MMP-2, 且MMP-

2的分泌量随血压增高而增加。MMP-2作用底物之一为LN, 在动脉壁中膜, 每个细胞都有一层含有LN等组成的基膜围绕^[7], LN是细胞发生迁移的屏障和VSMC保持收缩表型的物质基础。对胸主动脉而言, 血压升高所产生的血管壁增厚, 其主要原因是VSMC增生(早、中期)。本研究结果提示: 增生的VSMC及血压升高使血管壁应力增加导致内皮细胞损伤与MMP-2、内皮素1表达增加而LN表达减少。

本研究结果表明, 早期、长期在降压治疗基础上合用复方丹参滴丸可使血管壁MMP-2、内皮素1表达减少, LN表达增加, 继之产生VSMC及WT增长率减慢, 能改善血管壁重建, 对高血压的靶器官保护具有较大的临床意义。

从中医观点看, 高血压病属祖国医学“眩晕”、“头痛”、“肝风”、“中风”等范畴, 徐凤芹^[8]研究发现高血压病病人有血瘀者约占76.7%, 且瘀血程度呈极高危>高危>中危>低危趋势, 符合中医久病入络观点, 李辉等^[9]对303例高血压病相关病证的临床调查分析中发现肝阳上亢、肝肾阴虚、肝风痰浊、气阴两虚等证候中均伴有血瘀证存在, 为活血化瘀法治疗高血压病提供了可靠的依据。本研究所用丹参滴丸成分为丹参、三七(活血化瘀)、冰片(消炎), 众多研究显示此药能通过和降脂、抗氧化和钙拮抗剂等作用来消除动脉粥样硬化^[10], 是否因此众多的作用导致本研究的结果还有待探讨。

[参考文献]

- [1] 刘艳, 冯培芳, 冯久贤. 血府逐瘀汤干预自发性高血压大鼠胸主动脉重建[J]. 浙江中西医结合杂志, 2004, 14(10): 600.
- [2] 冀凯农, 姜宗来, 杨向群. SHR主动脉结构重建[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(4): 82-86.
- [3] Liu SQ, Fung YC. Indicial functions of arterial remodeling in response to locally altered blood pressure [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(39): 2147-155.
- [4] Ehringer WD, Wang OL, Haq A, Miller FN. Bradykinin and α -thrombin increase human umbilical vein endothelial macromolecular permeability by different mechanisms [J]. *Inflammation*, 2000, 24: 175-193.
- [5] Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinase in cardiac cell [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 42(1): 162-172.
- [6] Ergul A, Portik-Dobos V, Giulianini AD. Stress upregulates arterial matrix metalloproteinase expression and activity via endothelin A receptor activation [J]. *Am J Physiol*, 2003, 54(5): H225-232.
- [7] 韩启德, 文允缙. 血管生理学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997; 3-17.
- [8] 徐凤芹. 高血压中医治疗[M]. 北京: 金盾出版社, 2001; 218-219.
- [9] 李辉, 徐贵成, 刘坤. 高血压相关病证的临床调查分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(3): 142-144.
- [10] 全欧中医药学会联合会, 中药专家特别小组编. “复方丹参滴丸”[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002; 31-88.

(此文编辑 许雪梅)