

减阻剂改善自发性高血压大鼠主动脉重塑

张新禄, 陈海滨, 廖伟明, 刘 博, 梁鸿彬, 刘雪薇, 崔 凯, 修建成

(南方医科大学南方医院心内科, 广东省广州市 510515)

[关键词] 减阻剂; 主动脉重塑; 内皮素 1; 自发性高血压大鼠

[摘要] **目的** 减阻剂(DRP)是一种可以减少流体阻力、增加流体剪切应力的线性高分子化合物,本实验观察静脉应用 DRP 对自发性高血压大鼠(SHR)主动脉重塑的影响。**方法** 24 只 8 周龄雄性 SHR 随机分为 3 组:SHR + 生理盐水组(SHR + NS 组)、SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组,隔日给予静脉注射 NS 或不同剂量的 DRP;8 只年龄匹配的雄性 Wistar 大鼠(WR)作为对照组(WR + NS 组),给予静脉注射 NS。实验开始前及每 20 天记录大鼠体重、尾动脉收缩压、心率。60 天后大鼠麻醉后心脏取血,酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清内皮素(ET)水平。处死大鼠,分离大鼠升主动脉,石蜡包埋,HE 染色观察主动脉形态结构,免疫组织化学法检测主动脉内皮素 1(ET-1)表达。**结果** SHR 各组间体重、心率无显著差异。SHR + 20 mg/L DRP 组血压较 SHR + NS 组明显降低($P < 0.05$),而 SHR + 10 mg/L DRP 组与 SHR + NS 组血压无统计学差异。与 SHR + NS 组相比,SHR + 10 mg/L DRP 组及 SHR + 20 mg/L DRP 组血清 ET 水平显著降低,差异具有统计学意义。主动脉 HE 染色显示,与 WR + NS 组相比,SHR + NS 组主动脉中膜厚度明显增厚($P < 0.05$);静脉应用 DRP 后,与 SHR + NS 组相比,SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组主动脉中膜厚度均显著降低($P < 0.05$);SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组与 WR + NS 组之间主动脉中膜厚度无统计学差异。主动脉免疫组织化学染色显示,ET-1 在血管内皮及中层平滑肌均有表达,SHR 大鼠主动脉表达明显高于 WR 大鼠;经静脉应用 DRP 后,SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组主动脉 ET-1 较 SHR + NS 组显著降低,SHR + 10 mg/L DRP 组与 SHR + 20 mg/L DRP 组之间主动脉 ET-1 无显著差异。**结论** 静脉应用 DRP 可改善 SHR 主动脉重塑,其机制可能与 DRP 通过增加主动脉内血液剪切应力抑制了 ET-1 表达有关,减阻剂可能为治疗高血压引起的主动脉重塑提供新的思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Drag-reducing Polymer Improve Aortic Remodeling in Spontaneous Hypertensive Rat

ZHANG Xin-Lu, CHEN Hai-Bin, LIAO Wei-Ming, LIU Bo, LIANG Hong-Bin, LIU Xue-Wei, CUI Kai, and XIU Jian-Cheng

(Department of Cardiology, Affiliated Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] Drag-reducing Polymer; Aortic Remodeling; Endothelin-1; Spontaneous Hypertensive Rat

[ABSTRACT] **Aim** Certain long-chain water-soluble polymer, known as drag reducing polymer (DRP), when added in minute concentrations, have been shown to decrease peripheral vascular resistance. In this study, the effect of DRP on the hypertension-induced aortic remodeling was evaluated in spontaneous hypertensive rat (SHR). **Methods** 24 male SHR were divided into three groups; 8 male, age matched Wistar rats (WR) as control. The experimental groups of SHR received an intravenous injection of normal saline (SHR + NS group), 10 mg/L DRP (SHR + 10 mg/L DRP group), 20 mg/L DRP (SHR + 20 mg/L DRP group), respectively. The control group only received equal-volume of normal saline (WR + NS group). The whole study spanned 2 months, and body weight, heart rate, systolic blood pressure were measured at the beginning and every 20 days. Then blood sample and aorta were collected. Serum endothelin (ET) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The aorta was stained by hematoxylin-eosin (HE), and aort-

[收稿日期] 2014-09-15

[修回日期] 2014-12-05

[基金项目] 广东省自然科学基金(S2012010009024)

[作者简介] 张新禄,硕士研究生,研究方向为高血压及冠心病的临床与基础,E-mail 为 zhangxinlulucky@126.com。陈海滨,硕士研究生,研究方向为高血压及冠心病的临床与基础,E-mail 为 172478564@qq.com。通讯作者修建成,博士,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向为高血压及冠心病的临床与基础,E-mail 为 xiujc@126.com。

ic medial thickness was evaluated for each section. The expression of endothelin-1 (ET-1) of aorta was examined by immunohistochemistry. **Results** There was no significant difference between the SHR groups in body weight and heart rate during the treatment period. Systolic blood pressure was significantly reduced in SHR + 20 mg/L DRP group than in SHR + NS group ($P < 0.05$), while there was no significant difference between SHR + 10 mg/L DRP group and SHR + NS group. Compared with the SHR + NS group, the levels of serum ET decreased in SHR + 10 mg/L DRP group and SHR + 20 mg/L DRP group ($P < 0.05$). The medial thickness of the aorta was reduced in SHR + 10 mg/L DRP group and SHR + 20 mg/L DRP group compared with SHR + NS group. The expression of ET-1 of the aorta was significantly attenuated in SHR + 10 mg/L DRP group and SHR + 20 mg/L DRP group. **Conclusions** These results suggest that chronic treatment with DRP can protect against aortic remodeling in spontaneous hypertensive rats, possibly by improving blood shear stress in aorta. DRP may offer a new approach to the treatment of aortic remodeling caused by hypertension.

高血压与动脉重塑有着密切的联系,其特点是内皮依赖性的舒张功能受损和血管结构改变^[1]。研究证实,仅仅降低血压并不能改善或逆转这些改变,而且很多抗高血压药物并不能改善内皮功能受损和血管结构改变^[2-3]。因此,研发改善高血压患者血管内皮功能、结构的药物具有非常重大的临床意义。心血管系统的重塑受血液动力学负荷、神经激素激活以及尚未明确的因素影响,其中内皮素 1 (endothelin-1, ET-1) 主要由内皮细胞释放,作用于分布于心脏、主动脉和脑血管平滑肌细胞的 ET_A 受体,介导血管收缩、平滑肌细胞增生和心钠素的分泌,参与血管重塑、血管形成和细胞外基质合成过程。整个心血管系统被内皮细胞覆盖,并直接感受在其内部流动的血液的血流动力学影响。提高血液流动剪切应力,可以改变内皮细胞排列及结构,并可以抑制 ET-1 表达^[4-6]。减阻剂 (drag-reducing polymer, DRP) 是一类长链大分子物质,纳摩尔级的减阻剂可以显著降低流体阻力,动物实验证实,静脉应用减阻剂可以显著改变血液的流体动力学,提高血液流动的剪切应力^[7-8]。因此,我们设想是否可以通过静脉应用 DRP 提高血液流动的剪切应力来改善自发性高血压大鼠 (spontaneous hypertensive rat, SHR) 的血管重塑。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

健康雄性 SHR 24 只,8 周龄,体重 180 ~ 220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。8 只年龄、性别匹配的 Wistar 大鼠 (Wistar rat, WR), 体重 180 ~ 220 g, 购于南方医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2011-0015。大鼠均喂食标准饲料,饲养在南方医院实验动物中心恒温、恒湿、人工光照明暗各 12 h 的

安静饲养室内。减阻剂聚氧化乙烯购于美国 Sigma 公司,大鼠 ET 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购于上海研辉生物科技有限公司,纤维素膜透析袋为美国 Spectrum 公司产品,苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒购于尚鸿生物科技有限公司,大鼠内皮素 ET-1 一抗购于英国 Abcam 公司。

1.2 动物分组及干预

SHR 随机分为 3 组 (每组 8 只): (1) SHR + 生理盐水 (normal saline, NS) (SHR + NS) 组; (2) SHR + 10 mg/L DRP 组; (3) SHR + 20 mg/L DRP 组。适应性喂养 3 天后,隔日用微量泵于尾静脉以 3 mL/h 速度静脉输注 DRP 或 NS 30 min,连续给药 60 天。8 只年龄匹配的雄性 Wistar 大鼠作为对照组 (WR + NS 组),予静脉注射 NS。实验开始前及每 20 天参考文献[9]方法记录大鼠体重,尾动脉法记录大鼠收缩压及心率。

1.3 减阻剂制备

精确称取 50 mg 聚氧化乙烯 (减阻剂),加入 25 mL 生理盐水,配制成浓度为 2000 mg/L 的溶液,将配好的减阻剂溶液装入分子截留量为 50000 的透析袋中,于生理盐水中透析 24 h,用生理盐水将透析后的溶液稀释为 10 mg/L 及 20 mg/L 两种浓度,采用孔径 0.2 μm 的滤膜过滤除菌后存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.4 血清 ET 水平测定

静脉给药 60 天后,实验大鼠以 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,打开胸腔后心脏取血 5 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后室温下以 2000 r/min 离心 15 min,小心吸取上层淡黄色血清放入超低温冰箱 -80 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存待测。血清 ET 水平测定严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.5 主动脉形态结构测量及免疫组织化学染色

心脏采血后从升主动脉起始部至降主动脉处分离大鼠主动脉,用 10% 中性甲醛溶液固定 48 h 后进行石蜡包埋,制成 4 μm 厚的切片,每组选取 3 个

样本,进行 HE 染色,另取 3 个样本进行免疫组织化学实验,中性树脂封固。在 OLYBAS 显微镜下观察采集各个切片放大 400 倍图像数张,并用 Image-Plus 6.0 专业图像分析软件分析已采集图像,测量主动脉中膜厚度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间总体均数比较采用 One-way ANOVA 检验,多个样本均数间的多重比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1. 各组各时间点收缩压比较($\bar{x} \pm s, n = 8; \text{mmHg}$)

Table 1. Comparison of systolic blood pressure at different time points in each group($\bar{x} \pm s, n = 8; \text{mmHg}$)

分 组	基线水平	20 天时	40 天时	60 天时
WR + NS 组	109.90 ± 14.62	112.30 ± 9.42	111.10 ± 9.61	117.00 ± 9.00
SHR + NS 组	168.50 ± 14.88 ^a	189.30 ± 8.69 ^a	204.50 ± 13.02 ^a	223.40 ± 12.06 ^a
SHR + 10 mg/L DRP 组	171.10 ± 22.83 ^a	181.90 ± 24.32 ^a	188.30 ± 21.25 ^a	208.60 ± 23.68 ^a
SHR + 20 mg/L DRP 组	171.60 ± 20.51 ^a	179.30 ± 9.61 ^{ab}	186.30 ± 11.27 ^{ab}	195.10 ± 27.12 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与 WR + NS 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 SHR + NS 组比较。

2.2 静脉应用 DRP 对血清 ET 水平的影响

与 SHR + NS 组大鼠血清 ET 相比,SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组血清 ET 均显著降低($51.35 \pm 5.47 \text{ ng/L}$ 比 $75.24 \pm 11.00 \text{ ng/L}$, $45.24 \pm 15.74 \text{ ng/L}$ 比 $75.24 \pm 11.00 \text{ ng/L}$, 均 $P < 0.05$;图 1),差异具有统计学意义。

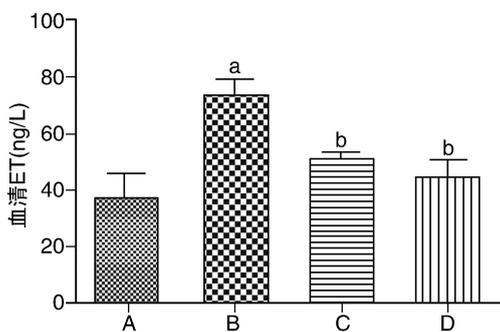


图 1. 各组血清 ET 水平比较($n = 8$) A 为 WR + NS 组, B 为 SHR + NS 组, C 为 SHR + 10 mg/L DRP 组, D 为 SHR + 20 mg/L DRP 组。a 为 $P < 0.05$,与 WR + NS 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 SHR + NS 组比较。

Figure 1. Comparison of serum ET levels in each group ($n = 8$)

2.3 各组大鼠主动脉中膜厚度的比较

与 WR + NS 组相比,SHR + NS 组主动脉中膜厚度明显增厚($164.97 \pm 8.35 \mu\text{m}$ 比 $126.63 \pm 8.47 \mu\text{m}$,

2 结 果

2.1 大鼠血压变化趋势

SHR 各组间体重、心率无显著差异;各组各个观察点尾动脉收缩压变化趋势见表 1。给药 20 天起 SHR + 20 mg/L DRP 组血压较 SHR + NS 组明显降低($179.30 \pm 9.61 \text{ mmHg}$ 比 $189.30 \pm 8.69 \text{ mmHg}$, $P < 0.05$),且 SHR + 20 mg/L DRP 组血压增长平缓,而 SHR + 10 mg/L DRP 组与 SHR + NS 组血压始终无统计学差异。

$P < 0.05$);而静脉应用 DRP 后,与 SHR + NS 组相比,SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组主动脉中膜厚度均显著降低($132.73 \pm 14.01 \mu\text{m}$ 比 $164.97 \pm 8.35 \mu\text{m}$, $135.46 \pm 13.26 \mu\text{m}$ 比 $164.97 \pm 8.35 \mu\text{m}$, 均 $P < 0.05$),差异具有统计学意义。SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组与 WR + NS 组之间主动脉中膜厚度无统计学差异(图 2)。

2.4 各组大鼠主动脉 ET-1 表达比较

主动脉免疫组织化学染色显示,ET-1 在血管内皮及中层平滑肌均有表达,SHR 大鼠主动脉表达明显高于 WR 大鼠。经过静脉应用 DRP 后,SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组主动脉 ET-1 表达较 SHR + NS 组显著降低;SHR + 10 mg/L DRP 组与 SHR + 20 mg/L DRP 组之间 ET-1 表达无显著差异(图 3)。

3 讨 论

减阻剂是一类长链大分子物质,既往研究表明,向液体中加入极微量的此类高分子物质后,可有效减少湍流,明显降低流体阻力。目前 DRP 广泛应用于工业管道运输(石油、天然气)、消防、灌溉、泄洪、航空航天及潜艇等领域。近年来,国内外学者逐渐开展了 DRP 在医学领域的应用研究,初步结

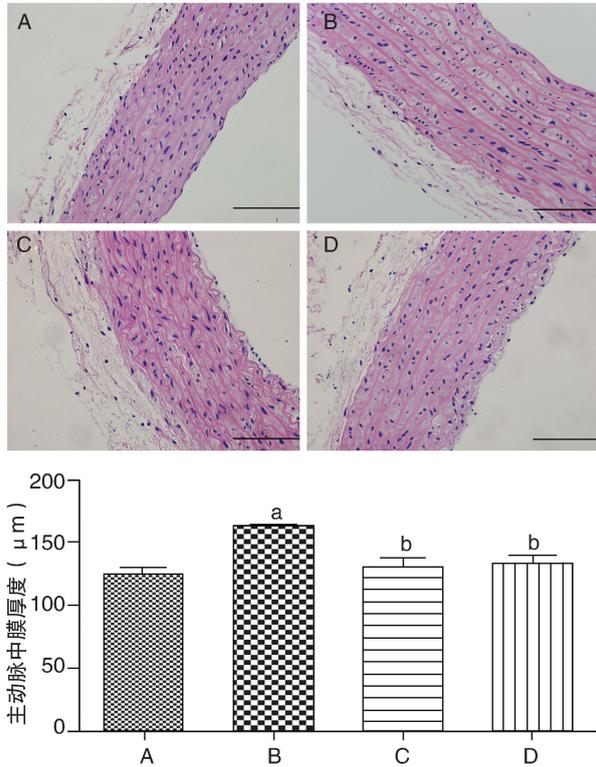


图 2. 各组主动脉中膜厚度比较 HE 染色, 比例尺: 100 μm 。A 为 WR + NS 组, B 为 SHR + NS 组, C 为 SHR + 10 mg/L DRP 组, D 为 SHR + 20 mg/L DRP 组。a 为 $P < 0.05$, 与 WR + NS 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SHR + NS 组比较。

Figure 2. Comparison of aortic medial thickness in each group

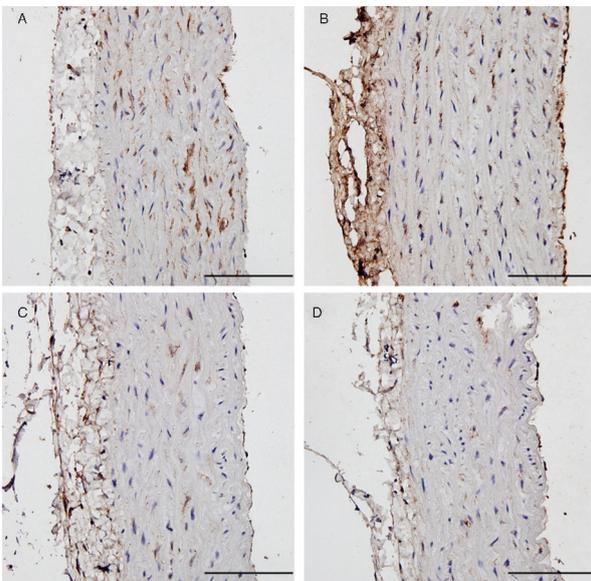


图 3. 各组主动脉 ET-1 免疫组织化学染色 比例尺: 100 μm 。A 为 WR + NS 组, B 为 SHR + NS 组, C 为 SHR + 10 mg/L DRP 组, D 为 SHR + 20 mg/L DRP 组。

Figure 3. Immunohistochemical detection for ET-1 expression of the aorta in each group

果显示, 静脉应用减阻剂后可显著减低血流阻力, 明显增加组织器官微循环的血流灌注, 对于缺血性心血管疾病、失血性休克、脑卒中、糖尿病等疾病的治疗有重要的潜在价值^[10-11]。本实验室前期研究证实, 静脉应用 DRP 后可显著增加大鼠腹主动脉血流速度, 而不影响粘度, 由公式计算可得主动脉内血液流动剪切应力显著增加^[12-13]。

高血压是内皮损伤的始动因素之一, 内皮功能紊乱又可促进高血压的发生与进展, 研究表明, 在高血压状态下, 主要表现为内皮依赖性舒张功能减弱和(或)内皮依赖性收缩功能增强以及血管壁炎症反应增强等^[14]。ET 是迄今所知最强的缩血管物质, 共有 4 个亚型: ET-1、ET-2、ET-3、ET-4, 其中收缩血管作用最强的是 ET-1。ET-1 主要由内皮细胞释放, 作用于分布于心脏、主动脉和脑血管平滑肌细胞的 ET_A 受体, 介导血管收缩、平滑肌细胞增生和心钠素的分泌, 参与血管重塑、血管形成和细胞外基质合成过程, 并参与了许多疾病, 包括高血压、动脉粥样硬化或纤维化的病理过程。研究表明高血压患者内皮细胞释放 ET-1 增加, 血管及心脏 ET-1 基因表达上调, 增加的 ET-1 又可进一步升高血压, 促进主动脉血管平滑肌增殖, 加重主动脉重塑^[15]。

内皮细胞受到刺激合成并释放 ET, 其调控主要在基因转录水平; 体外实验证实, 升高的剪切应力可显著抑制内皮细胞 ET 表达^[4]。本实验结果表明, 静脉应用 DRP 后, 通过增加主动脉内血液流动的剪切应力, 抑制内皮细胞分泌 ET; 静脉应用 DRP 后, 与 SHR + NS 组大鼠相比, SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组血清 ET 显著降低, 差异具有统计学意义。因此我们推断, SHR + 20 mg/L DRP 组血压较 SHR + NS 组明显降低, 与减少的 ET 介导血管收缩、平滑肌细胞增生和心钠素的分泌作用减弱, 内皮功能改善有关。

内皮细胞分泌 ET-1 主要通过旁分泌的形式作用于动脉中膜平滑肌细胞, 促进血管平滑肌细胞生长及迁移^[16]。由免疫组织化学染色结果可见, ET-1 在血管内皮及中膜平滑肌均有表达, 且 SHR 大鼠主动脉表达明显高于 WR 大鼠, 相应的, SHR 大鼠主动脉中膜平滑肌厚度显著高于 WR 大鼠; 而经过 2 个月 DRP 静脉输注, SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组主动脉 ET-1 较 SHR + NS 组显著降低, 减弱了 ET-1 对主动脉血管平滑肌增殖的促进作用, 相应的, SHR + 10 mg/L DRP 组、SHR + 20 mg/L DRP 组主动脉中膜平滑肌厚度较 SHR + NS 组显著降低, 且 SHR + 10 mg/L DRP 组与 SHR + 20 mg/L

DRP 组之间主动脉 ET-1 表达量和主动脉中膜厚度无显著差异。血压本身也会影响主动脉重塑, 血压增高时主动脉中膜厚度增加, SHR + 10 mg/L DRP 组与 SHR + NS 组之间血压无统计学差异, 而 SHR + 10 mg/L DRP 组血清 ET 及主动脉 ET-1 表达均较 SHR + NS 组显著降低, 主动脉中膜平滑肌厚度也显著降低, 故排除了血压因素的影响, 证明静脉应用 DRP 能显著抑制 ET-1 表达, 改善自发性高血压大鼠主动脉重塑。

综上所述, 本研究观察了静脉应用 DRP 对 SHR 主动脉重塑的影响, 结果表明, 静脉应用 DRP 通过增加血液流动的剪切应力抑制 ET-1 表达及主动脉中层平滑肌增殖, 显著改善了主动脉重塑, 并有潜在的降血压作用。

[参考文献]

[1] Simon G. Pathogenesis of structural vascular changes in hypertension[J]. *J Hypertens*, 2004, 22(1): 3-10.

[2] Ghiadoni L, Magagna A, Versari D, et al. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function[J]. *Hypertension*, 2003, 41(6): 1 281-286.

[3] Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications[J]. *Drugs*, 2002, 62(2): 265-284.

[4] Vozzi F, Bianchi F, Ahluwalia A, et al. Hydrostatic pressure and shear stress affect endothelin-1 and nitric oxide release by endothelial cells in bioreactors[J]. *Biotechnol J*, 2014, 9(1): 146-154.

[5] Malek AM, Zhang J, Jiang J, et al. Endothelin-1 gene suppression by shear stress: pharmacological evaluation of the role of tyrosine kinase, intracellular calcium, cytoskeleton, and mechanosensitive channels[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(2): 387-399.

[6] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress [J]. *Nature*, 2005, 437

(7057): 426-431.

[7] Faruqui FI, Otten MD, Polimeni PI. Protection against atherogenesis with the polymer drag-reducing agent Separan AP-30[J]. *Circulation*, 1987, 75(3): 627-635.

[8] Chen X, Zha D, Xiu J, et al. A new hydrodynamic approach by infusion of drag-reducing polymers to improve left ventricular function in rats with myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 147(1): 112-117.

[9] 王文峰, 罗玉梅, 万新红. MicroRNA-195 与 TGF- β 1/Smads 信号通路在自发性高血压大鼠心脏重构中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(2): 121-126.

[10] Macias CA, Kameneva MV, Tenhunen JJ, et al. Survival in a rat model of lethal hemorrhagic shock is prolonged following resuscitation with a small volume of a solution containing a drag-reducing polymer derived from aloe vera [J]. *Shock*, 2004, 22(2): 151-156.

[11] Pacella JJ, Kameneva MV, Csikari M, et al. A novel hydrodynamic approach to the treatment of coronary artery disease[J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(19): 2 362-369.

[12] 李小红, 郭凤霞, 杨沁, 等. 自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 和 ET-1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 875-880.

[13] Hu F, Zha D, Du R, et al. Improvement of the microcirculation in the acute ischemic rat limb during intravenous infusion of drag-reducing polymers [J]. *Biorheology*, 2011, 48(3-4): 149-159.

[14] Topper JN, Gimbrone MA Jr. Blood flow and vascular gene expression; fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype[J]. *Mol Med Today*, 1999, 5(1): 40-46.

[15] Khalil RA. Modulators of the vascular endothelin receptor in blood pressure regulation and hypertension [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2011, 4(3): 176-186.

[16] Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs [J]. *Circulation*, 2000, 102(19): 2 434-440.

[此文编辑 陈如意(实习)/曾学清]