

赤芍总苷对高血压大鼠血管重构基质金属蛋白酶9、金属蛋白酶组织抑制因子1和血管壁氧化应激的干预作用

林忠伟¹, 王卓², 喻婵¹, 张炽明¹, 李稳磊¹, 肖文豪³

(广东药科大学附属第一医院 1. 心内科, 3. 风湿科, 广东省广州市 510080;

2. 中山大学附属第一医院病理科, 广东省广州市 510080)

[关键词] 赤芍总苷; 自发性高血压大鼠; 基质金属蛋白酶9; 金属蛋白酶组织抑制因子1; 氧化应激; 活性氧

[摘要] **目的** 探讨赤芍总苷(TPG)对自发性高血压大鼠(SHR)血管重构基质金属蛋白酶9(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)和血管壁氧化应激的干预作用。**方法** 30只8周龄雄性SHR大鼠随机分为3组:低剂量TPG组(低剂量组, $n=10$)、高剂量TPG组(高剂量组, $n=10$)、对照组($n=10$);另外以Wistar大鼠作为空白组($n=8$)。低剂量组、高剂量组分别以100、200 mg/(kg·d)的TPG灌胃,对照组、空白组以2 mL生理盐水灌胃。8周后,酶联免疫吸附测定法测定血清MMP-9、TIMP-1水平;活性氧(ROS)荧光探针检测胸主动脉壁细胞氧化应激水平;免疫组织化学染色检测主动脉MMP-9、TIMP-1蛋白表达。**结果** 与空白组比较,对照组MMP-9、TIMP-1血清水平及血管壁MMP-9、TIMP-1蛋白表达均明显升高($P<0.05$)。TPG治疗后,MMP-9有所下降,高剂量组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);但TIMP-1在低剂量组、高剂量组、对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组胸主动脉ROS水平明显高于空白组,而低剂量组、高剂量组ROS水平较对照组下降。**结论** 高血压血管重构存在血管氧化应激和MMP-9水平升高;TPG能够抑制动脉氧化应激和MMP-9水平,改善高血压血管重构,可作高血压治疗的辅助药物。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of total paeony glycoside on matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and oxidative stress of vascular remodeling in hypertensive rats

LIN Zhongwei¹, WANG Zhuo², YU Chan¹, ZHANG Chiming¹, LI Wenlei¹, XIAO Wenhao³

(1. Department of Cardiology, 3. Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] total paeony glycoside; spontaneously hypertensive rat; matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; oxidative stress; reactive oxygen species

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the intervention effect of total paeony glycoside (TPG) on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and oxidative stress of vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** 30 male 8 weeks-old SHR rats were randomly divided into 3 groups: low-dose TPG group (low-dose group, $n=10$), high-dose TPG group (high-dose group, $n=10$) and control group ($n=10$); In addition, Wistar rats were used as a blank group ($n=8$). Low-dose group and high-dose group had intragastric administration with 100 and 200 mg/(kg·d) TPG respectively, and control group and blank group had intragastric administration with 2 mL physiological saline. After 8 weeks, serum levels of MMP-9 and TIMP-1 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; Oxidative stress level of thoracic aorta wall cells was determined by reactive oxygen species (ROS) fluorescence probe; Expressions of MMP-9 and TIMP-1 protein in the aorta was detected by immunohistochemical staining.

Results Compared with the blank group, the serum levels of MMP-9 and TIMP-1 and the expressions of MMP-9 and

[收稿日期] 2017-10-30

[修回日期] 2017-12-06

[基金项目] 广东省中医药局科研课题(20142086);广东省自然科学基金项目(2015A030313583)

[作者简介] 林忠伟,医学博士,副主任医师,主要从事高血压、冠心病研究,E-mail为 gdpexn3110@163.com。

TIMP-1 protein in the vascular wall were significantly increased in the control group ($P < 0.05$). After TPG treatment, MMP-9 was decreased, and the difference between high-dose group and control group was statistically significant ($P < 0.05$); However, there was no significant difference in TIMP-1 among low-dose group, high-dose group and control group ($P > 0.05$). The ROS level of thoracic aorta in control group was significantly higher than that in blank group, while the ROS level in low-dose group and high-dose group was lower than that of the control group. **Conclusion** There are the increases of vascular oxidative stress and MMP-9 level in hypertensive vascular remodeling. TPG can inhibit arterial oxidative stress and MMP-9 level and improve vascular remodeling in hypertension. It can be used as an auxiliary remedy for the treatment of hypertension.

赤芍总苷(total paeony glycoside, TPG)为赤芍的总提取物,主要为单萜苷类化合物,具有抗血栓、抗凝血的作用^[1]。本课题组在前期研究中发现 TPG 具有抑制高血压血小板活化功能^[2],但对高血压血管重构的研究尚未见报道。近年来研究表明,赤芍联合川穹可以使高脂饮食的兔血管动脉硬化斑块逆转,降低斑块中基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达^[3]。TPG 能够抑制糖尿病大鼠氧化应激水平而对糖尿病肾损害具有保护作用^[4];本课题组在既往研究中也发现高血压主动脉的氧化应激水平升高^[5]。TPG 是否具有对高血压动脉细胞外 MMP-9、金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)和氧化应激水平起抑制作用,目前尚无相关报道。本研究应用 TPG 对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)进行灌胃处理,研究 TPG 对高血压大鼠循环和主动脉 MMP-9、TIMP-1 以及动脉壁活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及 TPG 制备

8 周龄雄性 SHR 大鼠 30 只作为实验组,8 周龄雄性 Wistar 大鼠 8 只作为空白组,均为 SPF(specific pathogen free)级,体重 120~140 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供。TPG 由中药赤芍利用乙醇回流法提取获得,流程如下:将赤芍根除杂质,粉碎过 60 目筛,以 70%乙醇回流提取,减压浓缩,过 D101 大孔吸附树脂柱,3 倍量蒸馏水洗,再用 3 倍量的乙醇洗脱,收集 20%洗脱组分,减压回收乙醇,剩余浸膏于真空干燥器中干燥;TPG 纯度达 95%以上。TPG 灌胃剂量参考既往文献所描述剂量^[6]。将实验组的 SHR 大鼠随机分为低剂量 TPG 组(简称低剂量组, $n = 10$)、高剂量 TPG 组(简称高剂量组, $n = 10$)和对照组($n = 10$)。低剂量组、高剂量组

分别以 100、200 mg/(kg·d)的 TPG 经生理盐水溶解至 2 mL 后灌胃;每周测量大鼠体重,随体重调整给药剂量,连续 8 周。对照组、空白组同一时间进行同等量生理盐水灌胃。实验前后分别使用安徽正华生物设备有限公司生产的 ZH-HX-Z 型无创尾动脉血压测量系统经尾动脉测血压。

1.2 血清 MMP-9、TIMP-1 水平测定

8 周后,经静脉采血,4℃、3000 r/min 离心 15 min,取血清-20℃冰箱保存待测。采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法按试剂盒说明测定各组清 MMP-9、TIMP-1 水平。MMP-9 ELISA 试剂盒由欣博盛生物科技有限公司提供;TIMP-1 ELISA 试剂盒由 R&D 公司提供。

1.3 免疫组织化学检测

两组中胸主动脉组织切片依序取 3 张分别行 MMP-9 免疫组织化学染色。步骤如下:切片经二甲苯脱蜡,乙醇脱二甲苯,磷酸盐缓冲液洗涤,经微波修复,3%过氧化氢溶液浸泡后,分别滴加入一抗 MMP-9;4℃孵育过夜后,加二抗,37℃孵育 30 min,联苯二胺显色,显微镜下观察到阳性区变黄色,蒸馏水中止反应,苏木素复染,水性封片剂封片。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件,对组织玻片的免疫组织化学结果进行平均光密度(optical density, OD)分析,每张切片随机取 3 个高倍视野进行观察,选取阳性区域测定灰度值并取平均 OD 值,同一组织的 3 张切片再次取平均值。试剂:一抗 MMP-9 抗体(货号:A-AJ1503b, Abgent 公司, San Diego, CA);二抗(Dako 公司)。

1.4 氧化应激水平测定

取胸主动脉冰冻切片以 ROS 荧光探针二氢乙啶溶液加到主动脉环上,在 37℃避光孵育 30 min,在荧光显微镜下,用绿光激发,观察和拍摄动脉环红色发射图像,ROS 阳性细胞在整个核区被染成红色;观察动脉环染色情况。

1.5 统计学处理

数据统计采用 SPSS 17.0 for Windows 软件计算

完成, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 t 检验; 单因素多组间比较, 方差齐时, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间多重比较应用 LSD 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组体重、血压和血清 MMP-9、TIMP-1 水平比较

大鼠饲养至 16 周龄, 体重在各组之间的比较,

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。8、16 周龄 SHR (实验组) 较同周龄 Wistar 大鼠 (空白组) 比较, 血压明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组血清 MMP-9、TIMP-1 水平均明显升高, 与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TPG 治疗后, MMP-9 水平有所下降, 高剂量组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但 TIMP-1 水平变化不大, 低剂量组、高剂量组、对照组组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1. 各组大鼠体重、血压及血清 MMP-9、TIMP-1 水平比较

Table 1. Comparison of body weight, blood pressure and serum MMP-9 and TIMP-1 levels in each group

| 分 组 | <i>n</i> | 16 周龄体重 (g) | 8 周龄血压 (mmHg) | 16 周龄血压 (mmHg) | MMP-9 (μg/L) | TIMP-1 (μg/L) |
|------------|----------|--------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 低剂量组 | 10 | 275.65±16.20 | 152.52±20.26 ^a | 222.0±18.3 ^a | 108.76±15.94 | 63.65±10.78 ^a |
| 高剂量组 | 10 | 269.56±15.34 | 154.67±24.34 ^a | 216.0±15.4 ^a | 70.88±9.80 ^b | 61.64±9.68 ^a |
| 对照组 | 10 | 268.34±10.87 | 153.96±28.66 ^a | 224.0±14.5 ^a | 122.56±26.31 ^a | 64.78±14.59 ^a |
| 空白组 | 8 | 272.48±11.67 | 135.23±20.87 | 146.0±24.6 | 68.70±19.64 | 42.68±13.34 |
| <i>F</i> 值 | | 0.256 | 4.368 | 9.014 | 26.56 | 9.89 |
| <i>P</i> 值 | | 0.789 | 0.040 | 0.000 | 0.000 | 0.013 |

a 为 $P < 0.05$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 主动脉壁 MMP-9、TIMP-1 蛋白表达水平

免疫组织化学染色结果显示, 对照组主动脉壁 MMP-9 蛋白表达明显升高, 与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而低剂量组、高剂量组与对照组比较, MMP-9 蛋白表达水平有所下降, 高剂量

组更为明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SHR 大鼠主动脉壁 TIMP-1 蛋白表达升高, 与 Wistar 大鼠 (空白组) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组、低剂量组、高剂量组组间 TIMP-1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1)。

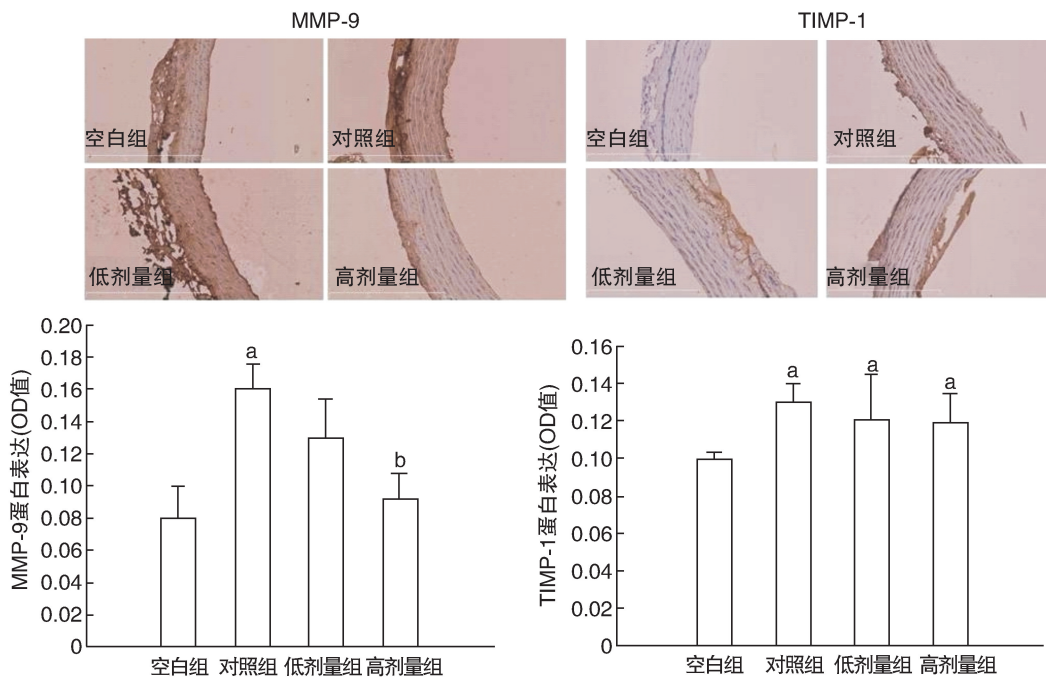


图 1. 免疫组织化学染色检测主动脉壁 MMP-9、TIMP-1 蛋白表达 显微镜图放大倍数为 200 倍。a 为 $P < 0.05$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 1. Expressions of MMP-9 and TIMP-1 protein in the aortic wall detected by immunohistochemical staining

2.3 主动脉氧化应激水平

取胸主动脉切片经 ROS 荧光探针孵育后,在荧光显微镜以绿光激发,可以观察动脉形态和 ROS 阳性细胞表达。空白组大鼠主动脉环阳性细胞少或

无,对照组血管环中可见较多阳性细胞核染成红色,说明血管氧化性高;低剂量组和高剂量组阳性细胞数较对照组减少,以高剂量组为明显,说明 TPG 治疗后明显抑制了血管氧化水平(图 2)。

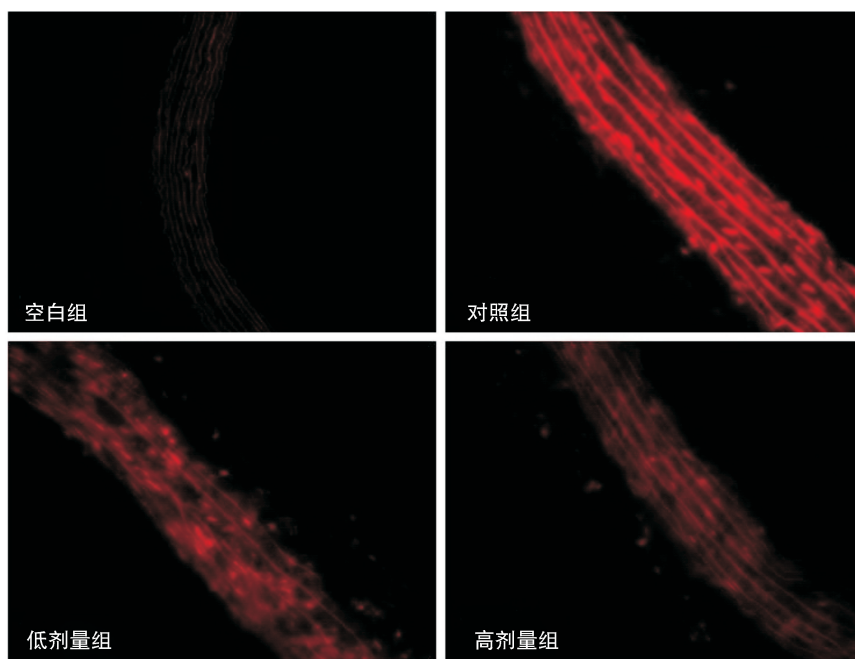


图 2. ROS 荧光探针检测胸主动脉壁细胞氧化水平(200×)

Figure 2. Oxidation level of thoracic aorta wall cells detected by ROS fluorescence probe(200×)

3 讨论

赤芍是传统的活血化瘀类中药,TPG 为赤芍的主要活性成份,有较强的抗动脉粥样硬化作用。近年来发现,细胞外基质的合成与降解是高血压病心血管重塑的重要特征;与基质代谢密切相关的酶如 MMP 及其特异抑制剂 TIMP 在高血压病早期血管重构中起着十分重要的作用。TIMP 与 MMP 以 1:1 结合从而抑制 MMP 活性,二者互相拮抗,其动态平衡是保持细胞间质稳态的关键。MMP-9 可以作为早期血管硬化的信号^[7],在高血压病早期血管重构中起重要作用。有学者发现,赤芍可以使高脂饮食的兔血管动脉硬化斑块逆转,降低斑块中 MMP-9 表达^[3]。本课题组早期研究发现 16 周龄高血压大鼠主动脉发生高血压血管重构现象,并且血管壁 MMP-9 表达升高^[5]。氧化应激是指机体组织或细胞内氧自由基生成增加和清除能力降低,导致 ROS 在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程;过量的 ROS 引起细胞和组织损伤。血管壁内可产生多种 ROS,它们独自或联合参与了高血压血管内皮损伤的发生与发展过程。病理情况下,ROS 产生

过多和(或)抗氧化能力降低,使得 ROS 大量蓄积而引起氧化损伤,可损害血管内皮,导致血管内皮功能障碍、顺应性降低,血管功能及结构发生改变,最终促进了高血压的发生和发展^[8]。同时,氧化应激可以促进动脉粥样硬化的发生^[9],促进包括高血压在内的心血管疾病的病理过程^[10]。ROS 可直接改变血管功能,引起心血管重构,表现为细胞排列紊乱,肌细胞伸长和重建等^[11-12]。研究表明 MMP-9 和氧化应激在高血压等心血管疾病中具有重要的作用^[13]。

本研究通过对 16 周龄 SHR 大鼠血清 MMP-9、TIMP-1 水平进行检测,发现两者水平均明显升高,同时运用免疫组织化学染色观察主动脉 MMP-9、TIMP-1 蛋白水平,ROS 探针检测血管壁氧化应激水平,发现 SHR 的实验组 MMP-9、TIMP-1 表达明显增强,氧化应激水平明显升高。说明主动脉壁存在明显血管重构改变,与既往研究^[5]相一致。TPG 可以抑制 MMP-9 和氧化应激水平,并在高剂量 TPG 治疗组中可见 MMP-9 和氧化应激水平下降程度具有统计学意义。表明 TPG 具有抗氧化及保护血管重构及损伤的作用,类似他汀类药物对高血压血管重

构的治疗作用^[14];其机制可能是提高超氧化物歧化酶活性和降低丙二醛水平,在提高血管内皮细胞抗氧化能力及促进一氧化氮释放方面产生协同作用^[15]。但 TPG 对 TIMP-1 水平影响不大,具体原因有待进一步研究明确。

总之,在高血压血管重构中,存在大动脉细胞外基质 MMP-9 增加,血管氧化应激水平升高,TPG 不仅降低血清 MMP-9 水平,同时抑制主动脉 MMP-9 的生成及氧化应激水平。该研究不仅深化了高血压靶器官损害的机制,同时也为高血压血管重构的临床治疗提供了新的研究方向。

[参考文献]

- [1] 伍章保,王汀,刘青云,等. 赤芍总苷抗凝血作用机制研究[J]. 安徽中医学院学报, 2007, 26(3): 39-42.
- [2] 肖文豪,王卓,李瑞莹,等. 赤芍总苷对自发性高血压大鼠血小板 sCD40L 和炎症因子的干预作用[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(4): 481-484.
- [3] 张璐,薛梅,马晓娟,等. 赤芍川芎有效部位对兔动脉粥样硬化基质金属蛋白酶的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(6): 514-518.
- [4] Su J, Zhang P, Zhang JJ, et al. Effects of total glucosides of paeony on oxidative stress in the kidney from diabetic rats[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(3-4): 254-260.
- [5] Lin Z, Wang Z, Li G, et al. Fibulin-3 may improve vascular health through inhibition of MMP-2/9 and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(5): 3805-3812.
- [6] 徐红梅,刘青云,戴敏,等. 赤芍总苷对大鼠血小板功能的影响[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2003, 26(1): 141-144.
- [7] Dhingra R, Pencina MJ, Schrader P, et al. Relations of matrix remodeling biomarkers to blood pressure progression and incidence of hypertension in the community[J]. *Circulation*, 2009, 119(8): 1101-1107.
- [8] Cave AC, Brewer AC, Narayanananicker A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(5-6): 691-728.
- [9] 陈瑗,周玫. 氧化应激-炎症在动脉粥样硬化发生发展中作用研究的新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(10): 757-762.
- [10] Jahandideh F, Majumder K, Chakrabarti S, et al. Beneficial effects of simulated gastro-intestinal digests of fried egg and its fractions on blood pressure, plasma lipids and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115006.
- [11] Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension[J]. *Hypertens Res*, 2011, 34(6): 665-673.
- [12] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(6): H2181-H2190.
- [13] Bahrehmand F, Vaisi-Raygani A, Kiani A, et al. Matrix metalloproteinase 9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: correlation with systemic inflammatory markers and oxidative stress[J]. *Lupus*, 2015, 24(6): 597-605.
- [14] 李慧颖,李静. 阿托伐他汀对高血压病早期肾损害患者 MMP-9 及 TIMP-1 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(6): 607-612.
- [15] 梁日欣,黄璐琦,刘菊福,等. 药对川芎和赤芍对高脂血症大鼠降脂、抗氧化及血管内皮功能的实验观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 43-45.

(此文编辑 曾学清)