

圣地红景天对自发性高血压大鼠左室重构的影响及其机制探讨

杨 芮, 刘 凯, 陈晓平[△]

四川大学华西医院 心内科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨圣地红景天对自发性高血压大鼠(SHR)左室重构的影响。方法 将 30 只雄性 SHR 随机分为治疗组与对照组,分别予以圣地红景天 500 mg/(kg·d)和蒸馏水灌胃,共 8 周,每两周测尾动脉收缩压(SBP)一次。实验结束时,测量大鼠体质量(BM)与左室质量(LVM),计算左室质量指数(LVMI=LVM/BM);采用放射免疫法分别测定血浆与心肌组织匀浆上清液中血管紧张素 II(Ang II)、醛固酮(ALD)以及心肌组织匀浆上清液蛋白含量,计算心肌匀浆上清液每克蛋白 Ang II 与 ALD 含量;将左室心肌切片分别进行胶原染色及免疫组化技术处理,用 Simple PCI 全自动图像分析系统检测心肌胶原容积分数(CVF)、心肌细胞 Ang II 1 型受体(AT₁)灰度值。结果 与对照组比较,治疗组 SBP 下降($P<0.05$)、LVMI(mg/g, 2.84 ± 0.13 vs. 2.97 ± 0.12 , $P=0.044$)、心肌 CVF(%, 4.41 ± 0.53 vs. 4.89 ± 0.53 , $P=0.021$)、血浆 Ang II (ng/L, 77.61 ± 14.12 vs. 92.59 ± 16.64 , $P=0.042$)与 ALD(ng/L, 73.52 ± 18.61 vs. 90.11 ± 19.67 , $P=0.005$)、心肌组织匀浆上清液中 Ang II (ng/g·protein, 40.03 ± 5.36 vs. 46.02 ± 6.78 , $P=0.005$)与 ALD(ng/g·protein, 37.61 ± 6.25 vs. 43.70 ± 5.09 , $P=0.049$)均降低。而圣地红景天对心肌细胞 AT₁ 蛋白表达的影响与对照组比较差异无统计学意义。结论 圣地红景天可改善 SHR 左室重构,其机制与降压作用、肾素-血管紧张素系统(RAS),特别是心肌局部 RAS 的受抑有关。

【关键词】 圣地红景天 高血压 左室重构 肾素-血管紧张素系统

Effect of Rhodiola Sacra on Left Ventricular Remodeling and Its Mechanism in Spontaneously Hypertensive Rats

YANG Rui, LIU Kai, CHEN Xiao-ping[△]. Division of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: chenxp2@yahoo.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Rhodiola Sacra on left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHRs). **Methods** 30 male SHRs were randomly allocated into a treatment and a control group, which were intragastric administered with Rhodiola Sacra 500 mg/(kg·d) and water respectively. Tail systolic blood pressure (SBP) was monitored every two weeks. After 8 weeks, the body mass (BM) and left ventricle mass (LVM) of the rats were measured for computing the left ventricle mass index (LVMI). Plasma and myocardial homogenate angiotensin II (Ang II), aldosterone (ALD) and the protein of myocardial homogenate were detected respectively by radioimmunoassay, and then the quantity of Ang II and ALD per gram protein was calculated. Myocardial specimen slides were stained with method of Masson staining, and myocardial collagen volume fraction (CVF) was calculated by a Computer Image System. Protein expression of Ang II type 1 receptor (AT₁) in left ventricular myocardium were detected by immunohistochemistry technique, and calculated by a Computer Image System. **Results** Compared with the control group, there was a obvious decrease in SBP ($P<0.05$), LVMI (mg/g, 2.84 ± 0.13 vs. 2.97 ± 0.12 , $P=0.044$), myocardial CVF (%), 4.41 ± 0.53 vs. 4.89 ± 0.53 , $P=0.021$), plasma Ang II (ng/L, 77.61 ± 14.12 vs. 92.59 ± 16.64 , $P=0.042$), plasma ALD (ng/L, 73.52 ± 18.61 vs. 90.11 ± 19.67 , $P=0.005$), myocardial Ang II (ng/g·protein, 40.03 ± 5.36 vs. 46.02 ± 6.78 , $P=0.005$) or myocardial ALD (ng/g·protein, 37.61 ± 6.25 vs. 43.70 ± 5.09 , $P=0.049$), whereas no significant difference was observed in the protein expression of AT₁ in left ventricular myocytes between the two groups. **Conclusion** Rhodiola Sacra may prevent left ventricular remodeling in SHRs, which is probably attributed to blood pressure lowering and inhibition of RAS, especially myocardial RAS.

【Key words】 Rhodiola Sacra Hypertension Left ventricular remodeling Renin-angiotensin system

失常、猝死、心力衰竭等紧密相关。该病理过程的形成和发展与肾素-血管紧张素系统 (renin angiotensin system, RAS) 的激活关系密切。在 RAS 系统中, 血管紧张素 II (Ang II) 是最为重要的效应分子, 目前研究证实高血压导致的心血管系统形态学和功能上的改变为 Ang II 1 型受体 (AT₁) 被 Ang II 激活后 (即 Ang II - AT₁ 级联反应) 的主要效应, 而阻断 RAS 能够有效阻断甚至逆转这种重构进程^[1,2]。红景天为景天科红景天属多年生草本或亚灌木植物, 多分布于北半球高寒地带, 种类繁多, 包括圣地红景天、长鞭红景天、高山红景天、狭叶红景天、喜马拉雅红景天和 大花红景天等, 全草均可入药。红景天苷为红景天主要有效成分, 具有心血管生物活性, 在藏医中被用来改善循环, 治疗高血压与糖尿病^[3], 机制可能由它对交感神经及与循环 RAS 系统的相互作用的抑制有关^[4], 然而其对于 LVRM 的影响未见研究报道。本研究通过体外实验初步探讨圣地红景天对高血压、LVRM 及 RAS 系统的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性自发性高血压大鼠 (SHR), 购自北京维通利华实验动物有限公司, 鼠龄 11 周 ± 4 d, 体质量 220~270 g, 分为 5 只/笼, 室温 17~21 °C, 相对湿度 40%~50%, 减少噪声干扰, 予以通用鼠粮喂养。

1.2 药物、主要试剂和仪器

圣地红景天干粉 (西藏药业)、Ang II 与醛固酮 (ALD) 放射免疫分析试剂盒 (北京北方生物技术研究); 兔抗大鼠 AT₁ 多抗 (BA0582)、SA1022 试剂盒 (博士德生物工程有限公司)、BP-6 动物无创血压测定仪、BP-6 无创动物血压测量系统与 BL-420E⁺ 生物机能实验系统 (泰盟科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理 将 30 只 SHR 随机分为治疗组与对照组, 每组 15 只。治疗组予以圣地红景天 500 mg/(kg·d), 溶于蒸馏水 2 mL 中灌胃, 每日一次; 对照组则予以等量蒸馏水灌胃, 共 8 周。每周称体质量一次, 根据体质量调整药物剂量。在进行适应性血压测量后开始实验, 每两周在灌胃前测尾动脉收缩压 (SBP)。实验期间两组大鼠各死亡 3 只。

1.3.2 测尾动脉收缩压 用 BP-6 动物无创血压测量系统测量已在 35 °C 测试箱中预热 15 min 大鼠的尾动脉收缩压 3 次, 取平均值。

1.3.3 血液与心肌标本的留取 实验第 8 周结束时, 禁食禁饮 12 h, 称体质量 (BM), 予以戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内麻醉, 剪开胸腔, 心脏穿刺抽血 3 mL, 注入预先冷却并加有抑肽酶与肝素试管中, 摇匀, 再以 1000 r/min 离心 5 min, 取血浆冷冻待检。同时立即处死大鼠, 取出心脏, 用眼科剪去除心房与右室游离壁, 保留左室游离壁和室间隔, 剖开左心室, 以滤纸吸干后称左室质量 (LVM)。之后, 迅即取 3 mm×6 mm 大小游离壁心肌于 10% 中性甲醛中固定 24 h, 而剩余心肌马上在 0.2 mmol/L 的冰醋酸 (15 mg 心肌组织加 1 mL 冰醋酸) 中煮沸 15 min, 取其中 200 mg 剪碎后加入 0.8 mL 生理盐水中在冰水冷浴的情况下进行超声匀浆 (NEWTOWN, CT USA), 同一强度 8 s×10 次。然后以 10 000 r/min 离心 10 min, 留上清液冷冻待检。

1.3.4 左室质量指数的计算 左室质量指数 (LVMI) 为 LVM 与 BM 的比值。

1.3.5 血浆及心肌匀浆上清液 Ang II 与 ALD 含量的检测 按放免试剂盒要求用放免技术测定血浆及心肌匀浆上清液 Ang II 与 ALD 含量, 用 BCATM Assay kit 测定心肌匀浆上清液蛋白浓度, 计算心肌匀浆上清液每克蛋白 Ang II 与 ALD 含量。

1.3.6 心肌胶原容积分数 (CVF) 的检测 将心肌标本行 MASSON 三色法染色, 胶原呈蓝色, 在 Simple PCI 图像分析系统上测量随机选取的 10 个 (200 倍) 视野中胶原面积 (不含血管与心外膜下组织), 分别除以全视野面积, 取平均值。

1.3.7 心肌 AT₁ 蛋白表达的检测 将心肌标本分别进行 AT₁ 免疫组化 SP 染色, 一抗滴度 (1:200), 二抗滴度 (1:200), DAB 显色, 苏木素复染, 然后在 Simple PCI 图像分析系统上测量 10 个随机选取放大 400 倍视野中染色阳性细胞 (呈棕黄色) 的灰度值, 取平均值。

1.4 统计学方法

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验分析, $\alpha_{\text{双侧}} = 0.05$ 。

2 结果

2.1 圣地红景天对 SHR 血压的影响

SHR 的收缩血压在实验期间随时间增加而增加, 两组 SHR 尾动脉 SBP 在实验前差异无统计学意义, 但在实验的第 2、4、6、8 周时, 圣地红景天治疗组较对照组降低 (*P* 均 < 0.05)。见表 1。

表 1 两组 SHR 治疗前后血压的变化

Table 1 The change of systolic blood pressure (SBP) before and after treatment between two groups of spontaneously hypertensive rats (mmHg)

Group	n	0 week	2 nd week	4th week	6th week	8th week
Control	15	145.64±5.64	157.25±9.26	166.81±9.00	169.58±9.44	169.47±8.60
Treatment	15	145.78±5.69	149.50±5.75*	149.50±5.75*	155.89±9.14*	154.67±8.67*

* $P < 0.05$, vs. control group. 1 mmHg=0.1333 kPa

2.2 圣地红景天对 SHR 左室重构的影响

经过 8 周圣地红景天的治疗, 治疗组中 LVMI 与 CVF 都明显低于对照组 (P 均 < 0.05)。见表 2、图 1。

2.3 圣地红景天对 SHR RAS 系统的影响

治疗组 SHR 血浆 Ang II 和 ALD 含量低于对照组 ($P < 0.05$), 心肌匀浆上清液中每克蛋白 Ang II 和 ALD 含量也明显降低, 而两组 SHR 左室心肌细胞的 AT₁ 蛋白表达则差异没有统计学意义。见

表 3、图 2。

表 2 实验结束时自发性高血压大鼠的左室质量指数与心肌胶原容积分数

Table 2 Left ventricle mass index (LVMI) and myocardial collagen volume fraction (CVF) of spontaneously hypertensive rats at the end of the experiment

Group	n	LVMI (mg/g)	CVF (%)
Control	15	2.97±0.12	4.89±0.53
Treatment	15	2.84±0.13*	4.41±0.53*

* $P < 0.05$, vs. control group

表 3 圣地红景天对自发性高血压大鼠 RAS 系统的影响

Table 3 Effects of Rhodiola Sacra on rennin-angiotensin system (RAS) in spontaneously hypertensive rats

Group	n	Plasma Ang II (ng/L)	Plasma ALD (ng/L)	Myocardial Ang II (ng/g · protein)	Myocardial ALD (ng/g · protein)	Myocardial AT ₁
Control	15	92.59±16.64	90.11±19.67	46.02±6.78	43.70±5.09	141.85±4.93
Treatment	15	77.61±14.12*	73.52±18.61*	40.03±5.36*	37.61±6.25*	141.62±4.58

* $P < 0.05$, vs. control group

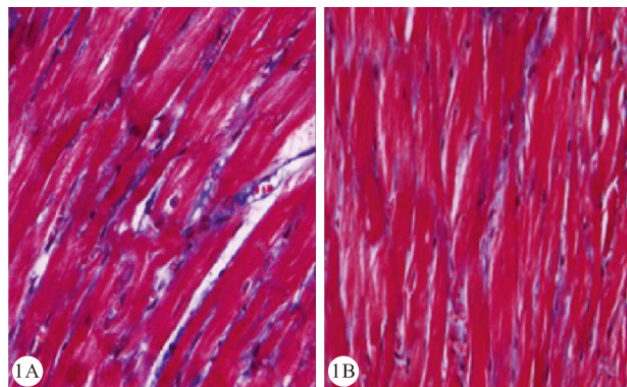


图 1 左室游离壁心肌胶原染色断面。Masson ×200

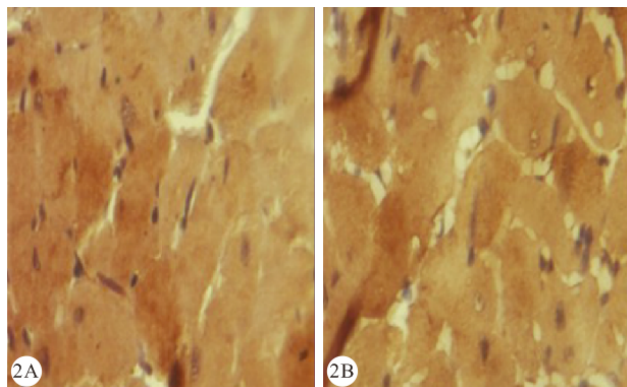
图 2 大鼠左室游离壁心肌 AT₁ 蛋白的表达。SP ×400

Fig 1 A section of left ventricular free wall of SHR stained with method of Masson staining. Masson ×200 Fig 2 Express of AT₁ protein of left ventricular free wall of SHR dealt by immunohistochemistry technique. SP ×400

A: Control group; B: Treatment group

3 讨论

已有研究表明在慢性超负荷的压力和容量作用下, 高血压左室重构主要表现为左室肥厚与心肌间质纤维化。病理学改变为左室质量增加、左室质量指数增大、室壁增厚等, 其中左室质量指数由于排除了个体大小因素的影响, 能更好地评价左室重构。组织学改变则以心肌细胞肥大与心肌间质纤维化为主, 后者具体表现为成纤维细胞增殖、胶原合成增

加^[5]。本实验研究结果显示经过圣地红景天治疗 8 周后, 能有效降低 SHR 的 LVMI 和 CVF, 有效降压的同时降低 SHR 血浆及心肌组织中 Ang II 与 ALD 浓度, 但对心肌细胞 AT₁ 蛋白表达无影响。

既往研究发现, 慢性心脏压力负荷与内皮素增加及心肌组织 RAS 的激活, 尤其是 Ang II 浓度增高是导致心肌细胞肥大与心肌纤维化发生的主要机制^[6,7]。RAS 包括循环 RAS 与局部组织 (如心脏) RAS^[1]。研究发现, RAS 的激活, 特别是心肌局部

RAS 的激活,在高血压左室重构中占据着重要地位^[8-10],而 Ang II 则是 RAS 中最重要生物活性物质,其绝大部分生物学效应都是通过 AT₁ 介导的^[7],高血压使得左心室压力超负荷,心肌细胞机械伸长,可通过自分泌和旁分泌的方式使局部 Ang II 产生与释放异常增加,而心肌 Ang II 浓度增高又可促进心肌 AT₁ 的转录和表达的增加^[11-15]。Ang II 是一种心肌细胞促增殖因子,在左室重构中所起的作用主要是通过心肌细胞与成纤维细胞上的 AT₁ 介导完成^[1]。另外,Ang II 可刺激心肌组织中 ALD 的合成与释放,而且心肌也可通过自分泌和旁分泌的方式产生 ALD,并与成纤维细胞胞浆中的盐皮质激素受体结合,在转录水平调节 I、III 型胶原合成^[14-16]。本实验发现圣地红景天可抑制 SHR 左室心肌组织中 Ang II 与 ALD,但对心肌细胞 AT₁ 蛋白表达无影响,提示圣地红景天抑制心肌局部 RAS 的激活,是改善 SHR 左室重构的重要因素。

甄志军等^[17]证实红景天苷可抑制 SD 大鼠血管平滑肌血管紧张素转换酶(ACE)-RNA 的表达水平。邓天吉等^[18]研究发现,圣地红景天具有持久降压作用,此次动物实验亦证实降低 SHR 血浆中 Ang II 与 ALD 浓度,能有效降低 SHR 血压,故圣地红景天改善 SHR 左室重构的作用与其降压作用可能有关。但抑制 RAS 的具体环节尚不明确,有待于进一步研究证实。

综上所述,本实验表明圣地红景天既有降压作用,又可改善 SHR 左室重构作用,并初步揭示了其部分作用机制主要是通过抑制 RAS,特别是心肌局部 RAS,有密切的关系。这为圣地红景天在治疗及改善高血压重构方面提供了重要的理论和实验基础。但仍需进一步研究其确切的分子基础。

参 考 文 献

- Williams B. Angiotension II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. *Am J Cardiol*,2001;87(8,supple1):10-17.
- Kim S, Yoshiyama M, Lzumi Y, *et al.* Effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin receptor on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure. *Circulation*,2001;103(1):148-154.
- Kwon YI, Jang HD, Shetty K. Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type II diabetes and hypertension. *Asia Pac J Clin Nutr*,2006;15(3):433-441.
- Shih CD, Kuo DH, Huang CW, *et al.* Autonomic nervous system mediates the cardiovascular effects of *Rhodiola sacra* radix in rats. *J Ethnopharmacol*,2008;119(2):284-290.
- Doering CW, Jalil JE, Janiki JS, *et al.* Collagen network remodeling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res*,1988;22(10):686-695.
- Swynghedauw B, Chevalier B, Medigue C, *et al.* Molecular basis of the regression of cardiac hypertrophy. *J Card Fail*,1996;2(4 Suppl):S21-S27.
- Brooks WW, Bing WW, Robinson KG, *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*,1997;96(11):4002-4010.
- Black MJ, Bertram JF, Campbell JH, *et al.* Angiotensin II induces cardiovascular hypertrophy in perinodpril-treated rats. *Hypertension*,1995;13(6):571-711.
- Mascareno E, Siddiqui MA. The role of Jak/STAT signaling in heart tissue rennin- angiotensin system. *Mol Cell Biochem*,2000;212(1-2):171-175.
- Gordon M. *Angiotension II Antagonists*. London:Science Press Ltd,1998;1-39.
- Sadoshima J, Tzumo S, Xu Y, *et al.* Autocrine releases of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes *in vitro*. *Cell*,1993;75(5):977-984.
- Yamazaki T, Kornuro J, Kudoh S, *et al.* Angiotension II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res*,1995;77(2):258-265.
- Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, *et al.* Angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res*,1993;73(3):439-447.
- Slight SH, Joseph J, Ganjam VK, *et al.* Extral-adrenal mineralocorticoids and cardiovascular tissue. *Mol Cell Cardiol*,1999;31(6):1175-1184.
- Brilla CC, Zhou G, Matsubara L, *et al.* Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*,1994;26(7):809-820.
- Robert V, Silestre JS, Charlemagne D, *et al.* Biological determinants of aldosterone induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension*,1995;26(4):971-987.
- 甄志军,李志华,李剑等.红景天苷对大鼠血管平滑肌 ACE 基因表达的影响. *西北药学杂志*,2002;17(4):163-164.
- 邓天吉,贺俊生,王德威.红景天强生剂治疗高血压 70 例效果观察. *华西药学杂志*,1994;9(2):128-129.

(2012-07-19 收稿,2012-10-25 修回)

编辑 沈进