

芪参健脾方对 SHR 大鼠心肌组织中 MMP-1, MMP-2, MMP-9 和 I, III 型胶原蛋白表达的影响

谷丽艳, 张立德*

(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**观察芪参健脾方对自发性高血压大鼠(SHR)心肌组织内基质金属蛋白酶 1, 2, 9(MMP-1, MMP-2, MMP-9)和 I, III 型胶原蛋白(collagen I, collagen III)表达的影响,探讨其改善高血压心肌纤维化的可能机制。**方法:**采用随机对照法将 60 只 24 周龄的 SHR 分为模型组、培哌普利组、培哌普利联合芪参健脾方组、芪参健脾方高、中、低剂量组,以同龄同种系的京都大鼠(WKY)10 只作为正常组。正常组和模型组给予蒸馏水;培哌普利组用量为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,中药治疗组采用标准水煎工艺,浓缩生药量 $4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,高、中、低剂量组 ig 给药剂量分别为 $40, 20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;培哌普利联合中药组用药为培哌普利 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + 芪参健脾方 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每日 ig 1 次,连续治疗 6 周后处死大鼠。免疫组化法检测各组大鼠心肌组织中 I, III 型胶原蛋白的表达;采用逆转录-多聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测各组大鼠心肌组织中 MMP-1, MMP-2, MMP-9 的 mRNA 表达,采用 Western 免疫印迹(Western blot)法测定各组大鼠心肌组织中 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达。**结果:**与正常组比较,SHR 组心肌呈典型心肌纤维化改变;与 SHR 模型组比较,培哌普利联合中药组、培哌普利组和芪参健脾方高剂量组中 collagen I 和 collagen III 的表达显著下降($P < 0.01, P < 0.05$),中剂量组中 collagen III 的表达也明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,培哌普利组、培哌普利联合中药组和芪参健脾方高剂量组中 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 和蛋白的表达量都显著增加($P < 0.01, P < 0.05$),芪参健脾方中剂量组 MMP-1 蛋白的表达量也明显增加($P < 0.05$)。**结论:**芪参健脾方可通过调节 MMP-1, MMP-2, MMP-9 和 collagen I, collagen III 的水平,从而改善 SHR 大鼠心肌功能,这可能是其抑制 SHR 大鼠的心肌纤维化的机制之一。

[关键词] 芪参健脾方;自发性高血压大鼠;基质金属蛋白酶 1, 2, 9; I 型胶原蛋白, III 型胶原蛋白
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0273-05
[doi] 10.11653/syfyj2013120273

Effect of Qishen Jianpi Decoction on MMP-1, MMP-2, MMP-9, Collagen I and Collagen III in Myocardium in the Rats with Spontaneously Hypertension

GU Li-yan, ZHANG Li-de*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the impacts on protein and mRNA expression of MMP-1, MMP-2, MMP-9, collagen I, collagen III and explore the mechanisms of cardiac collagen fibers. **Method:** Sixty 24-week-old SHR were randomly divided into the model group, perindopril group ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), perindopril associated with Qishen Jianpi decoction group ($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and another 3 groups individually high, middle low dose of Qishen Jianpi decoction ($40, 20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), the normal group is 10 normal arterial pressure WKY at the same age and kind. Gastric infusion was administered continuously for 6 weeks, once per day and the forage feeding was applied normally. At the end of the 6th week, after anesthetized, the heart tissues were separated. Immunohistochemical (IHC) method was to the protein expression of collagen I and collagen III; RT-PCR was to the content of mRNA and Western blot was to the protein expression of myocardial MMP-1, MMP-2,

[收稿日期] 20130124(020)

[基金项目] 辽宁省科技厅计划项目(20102150)

[第一作者] 谷丽艳, 博士研究生, Tel:15942305712, E-mail:syguiliyan@yahoo.com.cn

[通讯作者] *张立德, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合基础教学及科研工作, Tel:024-31207078, E-mail:zhldtem@163.com

MMP-9 in each group. **Result:** The protein expression of collagen I and collagen III was significantly decreased in perindopril group, perindopril associated with Qishen Jianpi decoction group and high dose group compared with model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the expression of collagen III was significantly decreased in middle dose group ($P < 0.05$). The mRNA and the protein expression of MMP-1, MMP-2, MMP-9 was significantly increased in perindopril group, perindopril associated with Qishen Jianpi decoction group and high dose of Qishen Jianpi decoction compared with model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the expression of MMP-1 was significantly increased in middle dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** By regulating the level of MMPs and collagen, Qishen Jianpi decoction could improve the function of hearts, it may be one of the mechanisms prevent the development of arterial blood pressure in SHR and inhibit accumulation of cardiac collagen fibers.

[**Key words**] Qishen Jianpi decoction; SHR; MMP-1; MMP-2; MMP-9; collagen I; collagen III

在高血压病的诸多慢性并发症中高血压性心脏病危害性最大,长期血压升高所致心肌纤维化是其特异性改变,其发生机制至今不明。现代中医认为高血压患者多为气血壅滞,关键病机为气血失调,脉道不利,导致脾气虚血瘀,可以健脾益气活血法防治高血压及其并发症。临床观察芪参健脾方,降压疗效稳定,对缓解高血压心脏并发症症状也有很好的调节作用。本研究观察芪参健脾方对自发性高血压大鼠(SHR)心肌组织中基质金属蛋白酶 1, 2, 9 (MMP-1, MMP-2, MMP-9) 和 I, III 型胶原蛋白(collagen I, collagen III)表达的影响,探讨芪参健脾方抑制 SHR 大鼠心肌纤维化的机制,以期 of 中药治疗高血压心肌纤维化的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 24 周龄 WKY 大鼠,雄性,10 只,体重 330 ~ 360 g; 24 周龄自发性高血压大鼠(SHR),雄性,60 只,体重 340 ~ 380 g。购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,动物许可证编号 SCXK(沪)2007-0005。清洁条件下喂食标准饲料,自由饮水。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司),核酸电泳仪(Power/PAC300 Bio-Rad),凝胶成像仪(Kodak digital science 1D),752-C 紫外分光光度计,DYY-III 型电泳仪(北京六一仪器厂),DYCZ-40D 型迷你转印电泳槽(北京六一仪器厂)。MMP-1, MMP-2, MMP-9 和 collagen I, collagen III 单克隆抗体购于 Ptg Lab 公司,Trizol 试剂(Invitrogen),RT-PCR 试剂盒(Thermo Scientific ABgene Ltd. AGent house),PCR 引物由大连宝生物公司合成。

1.3 药物 培哌普利片(施维雅天津制药有限公司,购自辽宁省中医院)。芪参健脾方药:黄芪 30 g,茯苓 15 g,炒白术 15 g,甘草 10 g,丹参 15 g,夏枯草 10 g,泽泻 30 g,各饮片购自辽宁省中医院。采用标准水煎工艺,浓缩为含生药量 4 g·mL⁻¹。

2 方法

2.1 分组与对照 WKY 大鼠 10 只为正常对照组; SHR 60 只随机分为 6 组:模型组、培哌普利组(西药组)、培哌普利联合中药组(中加西组)、芪参健脾方药高、中、低剂量组。正常组和模型组给予蒸馏水;培哌普利组用药量为 0.4 mg·kg⁻¹,中药治疗高、中、低剂量组 ig 给药剂量分别为 40, 20, 10 g·kg⁻¹;培哌普利联合中药组用药为培哌普利 0.4 mg·kg⁻¹ + 芪参健脾方 20 g·kg⁻¹。ig 1 次/d,连续 6 周。

2.2 心肌组织中 collagen I, collagen III 的表达 各组大鼠给药 6 周后,3% 戊巴比妥钠 ip 麻醉,即刻取出心脏,4 °C 生理盐水灌洗,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片,切片厚 6 μm。切片常规脱蜡,3% H₂O₂ 室温 5 ~ 10 min 以灭活内源性过氧化物酶。0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复,山羊血清封闭,滴加一抗后 4 °C 过夜。滴加生物素化二抗,DAB 苏木素复染,脱水,透明,封片。采用美国 Medcybernetic 公司的 Image Pro Plus 医学图像分析系统进行图像分析,镜下随机取 5 个视野(×400),每个视野为 2592 × 1944 像素点,分别测出阳性反应细胞的总面积(Area)和平均积分吸光度(IA)。

2.3 心肌组织中 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达 引物序列由大连宝生物公司合成。MMP-1 上游引物序列:5'-CCAAATCCCATCCAGC-CAACA-3',下游引物序列:5'-CCTCACAAACG-GCAGCGTCA-3',扩增长度 361 bp。MMP-2 上游引物:5'-CACTGTGGGTGGAATTGAGA-3',下游引物:5'-GTCCGCCAAATAAACCGATC-3',扩增长度 480 bp。MMP-9 上游引物:5'-CCCCTTACTTTG-GAAACGC-3',下游引物:5'-CGAAGATGAATG-GAAATACGC-3',扩增长度 229 bp。 β -actin 引物上游:5'-TTGTCACATGCCCTGCCAGGTC-3',下游引

物:5'-GCTCCTTATGTCACGCAGATTC-3', 扩增长度 560 bp。取各组大鼠心肌组织 100 mg, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 752-C 紫外分光光度计测定其纯度及含量。将总 RNA 逆转录成 cDNA, 再取 5 μL 反转录产物进行 PCR。循环参数为预变性 95 °C 2 min, 变性 95 °C 30 s, 退火 54 °C 30 s, 延伸 72 °C 1 min, 共 35 个循环, 终延伸 72 °C 10 min 后 4 °C 保存。取各组 PCR 扩增产物 5 μL, 加 1 μL Loading Buffer 混匀, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 15 min, 用凝胶成像分析系统观察并拍摄电泳图象, 定量分析各组基因表达强度, 目的片断与 β-actin 吸光度(A) 比值作为目的片断 mRNA 的相对含量。每个样品重复 3 次。

2.4 心肌组织 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达 取各组大鼠 100 mg 心肌组织, 提取总蛋白, 4 °C 离心 10 min, 取上清, BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 与 5 × SDS 上样缓冲液 100 °C 煮沸 5 min, 以每孔 60 μg, 加入体积分数为 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中, 电泳, 转膜 3 h。用质量浓度为 5% 的脱脂奶粉在 37 °C 条件下封闭 1 h。一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 4 次, 在暗室用 ECL 发光, 图像扫描并分析结果。采用所测目的蛋白条带与内参 β-actin 条带的 A 比值来表示目的蛋白的表达水平。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠心肌组织中 collagen I, collagen III 表达

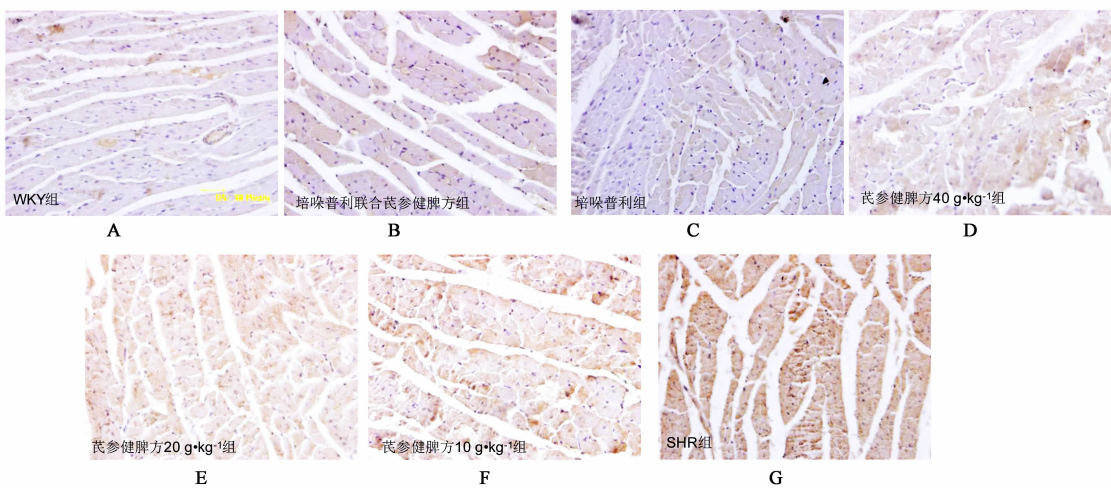
的影响 胶原蛋白表达情况见图 1 和图 2, 结果表明, WKY 组大鼠心肌组织胶原纤维分布比较均匀、纤细, 心肌间质无纤维化现象; 与 WKY 组相比, SHR 组 collagen I 和 collagen III 表达显著增加 ($P < 0.01$), 并呈典型心肌肥厚改变, 心肌细胞排列杂乱无章, 被深入的纤维分隔紧裹, 细胞间网络增粗变密, 心肌纤维走向紊乱, 可见溶解断裂, 细胞间质纤维化增多。与 SHR 组相比, 培哌普利联合芪参健脾方组、培哌普利组和芪参健脾方高剂量组 collagen I 和 collagen III 的表达显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 芪参健脾方对 SHR 大鼠心肌组织内胶原蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	collagen I	collagen III
WKY	-	70 440 ± 102	73 640 ± 115
培哌普利 + 芪参健脾方	4 × 10 ⁻⁴ + 20	96 726 ± 116 ³⁾	95 724 ± 236 ³⁾
培哌普利 + 芪参健脾方	4 × 10 ⁻⁴	104 201 ± 233 ²⁾	109 655 ± 785 ³⁾
培哌普利 + 芪参健脾方	40	110 994 ± 294 ²⁾	150 966 ± 716 ²⁾
培哌普利 + 芪参健脾方	20	180 962 ± 65	217 845 ± 844 ²⁾
培哌普利 + 芪参健脾方	10	206 498 ± 939	253 830 ± 738
SHR	-	221 447 ± 968 ¹⁾	307 920 ± 844 ¹⁾

注: 与 WKY 组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$; 与 SHR 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对大鼠心肌组织 MMP-1, MMP-2, MMP-9 mRNA 表达的影响 与 WKY 组比较, SHR 模型组大鼠心肌 MMP-1, MMP-2, MMP-9 的表达量明显减少 ($P < 0.01$); 经治疗 6 周后, 培哌普利组、培哌普



A. WKY 组; B. 培哌普利联合芪参健脾方 0.4 mg·kg⁻¹ + 20 g·kg⁻¹; C. 培哌普利 0.4 mg·kg⁻¹ 组; D. 芪参健脾方 40 g·kg⁻¹ 组; E. 芪参健脾方 20 g·kg⁻¹ 组; F. 芪参健脾方 10 g·kg⁻¹ 组; G. SHR 组 (图 2 同)

图 1 各组大鼠心肌组织中 Collagen I 的表达 (免疫组化法, ×200)

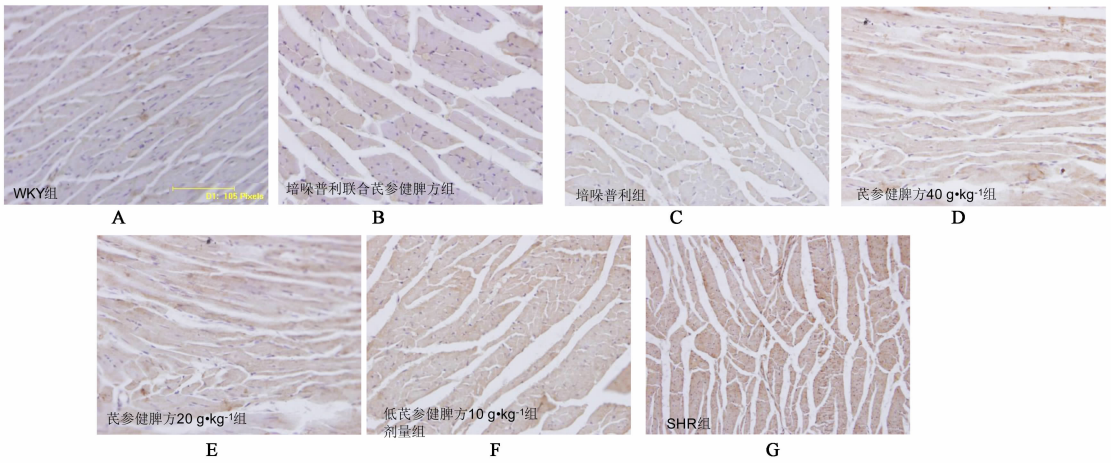
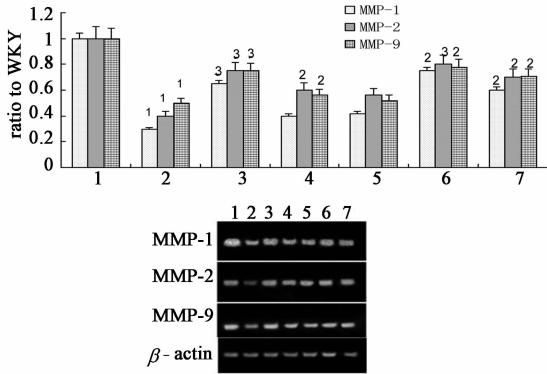


图 2 各组大鼠心肌组织中 Collagen III 的表达(免疫组化法, ×200)

利联合芪参健脾方组和芪参健脾方高剂量组中 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达量较模型对照组显著增加 ($P < 0.01, P < 0.05$)。见图 3。



1. WKY 组; 2. SHR 组; 3. 培哚普利 0.4 mg·kg⁻¹ 组;
4. 芪参健脾方 10 g·kg⁻¹ 组; 5. 芪参健脾方 20 g·kg⁻¹ 组;
6. 培哚普利 0.4 mg·kg⁻¹ + 芪参健脾方 20 g·kg⁻¹ 组;
7. 芪参健脾方 40 g·kg⁻¹ 组

与 WKY 组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 SHR 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (图 4 同)
图 3 芪参健脾方对 SHR 大鼠心肌 MMP-1, MMP-2, MMP-9 的 mRNA 表达的影响

3.3 对大鼠心肌组织 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响 与 WKY 组相比, SHR 组大鼠 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05$); 与 SHR 组相比, 培哚普利联合中药组, 培哚普利组和中药高剂量组 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达量明显上升 ($P < 0.01, P < 0.05$); 与 SHR 组相比, 芪参健脾方中剂量组 MMP-1 蛋白的表达量也明显增加 ($P < 0.05$), 见图 4。

4 讨论

高血压是当前危害人类健康的重大疾病之一, 心脏是高血压疾病主要的靶器官之一, 血压升高所致心肌肥大、纤维化等表现, 最终会导致心肌工作能

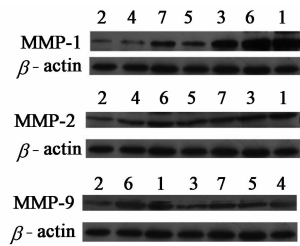


图 4 芪参健脾方对各组大鼠心肌 MMP-1, MMP-2, MMP-9 蛋白表达的影响 (Western blot 法)

力下降, 引发高血压性心脏病^[1]。传统中医认为高血压是由于七情所伤, 阴阳平衡失调所致, 而现代中医对高血压病因病机的认识呈多元化, 芪参健脾方中黄芪补气健脾, 茯苓、炒白术健脾渗湿, 丹参、泽泻活血祛瘀, 全方有健脾益气活血之效。另有研究已经证明补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证和肝阳上亢证具有显著的关联性^[2]。通过临床观察, 芪参健脾方降压疗效稳定, 对缓解高血压心脏并发症症状也有很好的调节作用。

大量流行病学调查和实验研究结果显示, 在高血压性心肌纤维化的发生、发展过程中心肌内胶原蛋白和基质金属蛋白酶发挥着非常重要的作用。心肌胶原目前发现有 5 种, 其中主要以 collagen I 和 collagen III 为主, I 型约占心肌胶原总数的 80%, 胶原纤维粗, 伸展性和弹性小, 有很强的抗牵拉特性而用于保持室壁的强度; III 型约占 11%, 纤维较细, 胶原伸展和弹性大, 与室壁弹性有关。心肌胶原网络在维护心脏结构和功能完整性上起重要作用^[3], 而 I/III 型比值可反映心肌纤维化程度。血压升高所造成肥厚心肌的病理学改变主要表现为心肌间质纤维化、肌纤维走向紊乱, 同时肥厚心肌内 I 型胶原蛋白的表达明显增加, 说明间质增生与 I 型胶原表达的上调密切相关^[4]。有研究表明, 包括心肌梗死后

心室重构在内的心肌损伤,都有 III 型胶原的合成明显增加,血清前胶原蛋白 III (PⅢNP) 的增加,对预后预测有一定的指导意义^[5-6]。本实验中观察到 SHR 大鼠血压升高,心脏压力负荷增加所造成的心肌病理学的改变,包括间质纤维增生,肌纤维紊乱, collagen I 和 collagen III 的表达显著增加等,芪参健脾方可有效降低 collagen I 和 collagen III 的表达,特别是与培哌普利合用疗效显著,说明芪参健脾方可抑制心肌间质纤维化的过程,改善心肌功能。

基质金属蛋白酶 (MMPs) 属锌依赖性内肽酶家族,在组织重构和器官发生、炎症调控、肿瘤疾病等多种生理过程中发挥作用^[7-8]。人体内表达有 20 多种 MMPs,其中 MMP-1 是胶原酶、主要水解底物是纤维类胶原,即 I, II, III 型胶原。MMP-2 和 MMP-9 是明胶酶,主要水解底物是变性胶原及基膜的主要成分 IV 型胶原。MMPs 不仅在基质降解中起作用,还可以调节胶原的合成。心肌的间质包括间质细胞和基质,而胶原是基质的主要成分,心肌间质胶原的蓄积一方面是胶原的过量生成,另一方面是胶原降解受到抑制,该抑制作用主要与基质金属蛋白酶 (MMPs) 以及金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 有关,两者的动态平衡对维持正常的胶原代谢具有十分重要意义。有研究显示,用黄芪皂苷 IV 干预大鼠心肌成纤维细胞培养系统后, I, III, IV 型胶原, TIMP-1, -2 的 mRNA 表达水平有所下降,而 MMP-1, -2, -9 的 mRNA 表达水平有所上升^[9],说明黄芪皂苷 IV 可减少心肌成纤维细胞胶原形成,其机制可能为抑制胶原的合成、增加胶原降解有关。其他相关研究也提示,中药黄芪有效成分一方面可通过抑制 TIMPs 的表达、另一方面也可以促进 MMPs 的表达^[10],可使包括胶原在内的细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 蛋白降解增强,心肌纤维化病变则相应减轻,在本研究中也证实此观点。芪参健脾方可提高 SHR 大鼠心肌组织中 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 和蛋白的含量,提示芪参健脾方抗心肌纤维化效应可能与调节胶原代谢有关的基质金属蛋白酶 MMP-1, MMP-2 和 MMP-9 的表达有关。

中医药降压的研究有很多,有研究证明天麻钩藤饮可明显降低血压,改善高血压病患者的临床症状,治疗组舒张压 (DBP) 下降比对照组更明显^[11]。有效控制高血压心肌纤维化是预防高血压性心脏病的重要途径,健脾益气活血法防治心肌损伤是一种具有中医特色的有效方法,活血化瘀中药煎剂能阻止心肌胶原异常增生,可从多个环节对心肌细胞外基质合

成与降解进行调控,从而改善心肌纤维化^[12]。

本研究提示芪参健脾方中药与培哌普利联合应用对改善 SHR 大鼠心肌损伤有协同作用,可能是通过调节胶原生成与降解系统各因子的平衡来发挥对心肌形态和功能的保护作用,改善高血压进程中心肌纤维化,为中医药防治高血压性心脏病提供新的研究思路。

[参考文献]

- [1] Berk B C, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease[J]. J Clin Invest, 2007, 117(3):568.
- [2] 胡小勤,曾学文,唐亚平,等. 补阳还五汤、天麻钩藤饮与高血压病气虚血瘀证、肝阳上亢证关联性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):203.
- [3] Schwartz A J, Wilson D A, Weber K T. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses[J]. Am J Vet Res, 2002, 63(11):1564.
- [4] 盛瑞,顾振纶,谢梅林,等. EGCG 抑制心肌肥厚胶原生成和细胞增殖[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9):1095.
- [5] Claridge M W, Hobbs S D, Quick C R, et al. ACE inhibitors increase type III collagen synthesis: a potential explanation for reduction in acute vascular events by ACE inhibitors[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004, 28:67.
- [6] Magga J, Puhakka M, Hietakorpi S, et al. Atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction[J]. J Appl Physiol, 2004, 96:1306.
- [7] Bäck M, Ketelhuth D F, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2010, 52(5):410.
- [8] Li X, Wu J F. Recent developments in patent anticancer agents targeting the matrix metalloproteinases (MMPs) [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2010, 5(2):109.
- [9] 陈羽. 黄芪皂苷 IV 对大鼠心肌成纤维细胞胶原影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(7):553.
- [10] 张召才. 黄芪甲甙对慢性心肌炎心肌纤维化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(8):728.
- [11] 邱泽安. 天麻钩藤饮治疗社区高血压病[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15):252.
- [12] 李赛美. 加味桃核承气汤及不同提取物对糖尿病大鼠心肌纤维化的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(4):236.

[责任编辑 聂淑琴]