

新血府逐瘀汤影响高血压大鼠心肌纤维化的机制研究

吉中强 武文辉 纪文岩

【摘要】目的 通过观察新血府逐瘀汤对高血压大鼠内皮功能及心肌 I 型、III 型胶原的影响,阐明活血化瘀中药干预高血压大鼠心肌纤维化的一种内在机制。**方法** 建立腹主动脉缩窄致肾性高血压大鼠模型成功后,将 40 只大鼠分为五组,其中中药组、卡托普利组应用药物干预,模型组、假手术组、空白组不干预。10 周后大鼠称重,腹主动脉抽血,测量左心室重量指数(LVWI)、血管性血友病因子(vWF)、内皮素(ET)、D-二聚体(D-D),免疫组织化学染色观察心肌 III 型胶原和 I 型胶原心肌组织胶原容积分数(CVF)、心肌血管周围胶原面积(PVCA)的改变。**结果** 用药 10 周后,中药组大鼠血浆 vWF、ET、D-D、血压以及 LVMI 与模型组比较,均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。卡托普利组和中药组的 I 型胶原、III 型胶原 CVF 和 PVCA 较模型组下降($P < 0.05$)。**结论** 新血府逐瘀汤可改善高血压大鼠血管内皮功能及高血压血栓前状态,减少心肌 I 型、III 型胶原的形成,这可能是其防止高血压大鼠心肌纤维化的内在机制之一。

【关键词】 新血府逐瘀汤;高血压;I 型胶原;III 型胶原;免疫组化

Mechanism Study of the Impacts on Myocardial Fibrosis Treated with Modified Xuefu Zhuyu Decoction in the Rats with Hypertension

Ji Zhong-qiang, Wu Wen-hui, Ji Wen-yan

(Shandong Qingdao Haici Medical Group, Qingdao Shandong 266033)

【Abstract】Objective To explain the internal mechanism on the invention for myocardial fibrosis treated with Chinese medicines for activating blood circulation and resolving stasis in the rats with hypertension through the observation of the effects of modified xuefu zhuyu decoction on endothelial function of myocardial collagen I and III in the rats with hypertension. **Methods** After the successful modeling the rats with renal hypertension induced by abdominal aorta stenosis, 40 rats were randomized into 5 groups. Of them, the medicinal intervention was applied in a Chinese medicine group and a captopril group. No any intervention was performed in a model group, a sham-operation group and a blank group. 10 weeks later, the body mass of rat was weighted and blood sample was collected from abdominal aorta. LVWI, vWF, ET and D-D were measured. ELISA was adopted to observe the changes in myocardial collagen III and I. **Results** 10 weeks after medication, in Chinese medicine group, plasma vWF, ET and D-D, blood pressure and LVMI all decreased remarkably as compared with model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In captopril group and Chinese medicine group, CVF and PVCA of collagen I and III decreased as compared with model group ($P < 0.05$) separately. **Conclusion** The modified xuefu zhuyu decoction improves endothelial function and the state before hypertensive thrombosis in the vessels of the rats with hypertension and reduces the formation of myocardial collagen I and III, which may be one of the internal mechanisms on the prevention of myocardial fibrosis in the rats with hypertension.

【Key words】 Modified xuefu zhuyu decoction Hypertension; Myocardial fibrosis; Collagen I; Collagen III; Immunohistochemistry

高血压伴左室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH)引起心功能障碍可能与心肌间质发生重建(remodeling),形成心肌纤维化有关^[1]。血府逐瘀汤可以治疗以胶原代谢异常为主的细胞间基质病

变,这与它抑制血管平滑肌细胞增殖的药理作用有关^[2]。中医虽无高血压病左室纤维化之名,但也早有“阳化气,阴成形”的论述,左室纤维化的病理基础在于瘀血、痰浊两方面^[3],瘀血、痰浊与心肌纤维化是密切相关的。新血府逐瘀汤为血府逐瘀汤加减而成,“新”字体现于不仅加入枳实开胸引气、行血,更加入首乌、山楂、茵陈、泽泻以利湿化痰、调脂

活血,既解气行血又祛瘀生新,活血而不耗血,诸药合而用之,使气行瘀去,气血兼顾,以活血祛瘀为主,开胸行气为辅,用于临床血瘀分型的高血压病的治疗,取得了较好疗效^[4]。通过比较高血压模型大鼠与灌服新血府逐瘀汤后的高血压大鼠心肌左心室重量指数(LVWI)、心肌 I 型、Ⅲ型胶原及血清血管性假性血友病因子(vWF)、内皮素(ET)、D-二聚体(D-D)的变化,阐明新血府逐瘀汤抑制心肌纤维化与改善高血压大鼠内皮功能及血栓前状态的内在联系。

材料和方法

一、实验材料

1. 实验动物:将 40 只 10 周龄 SPF 清洁级雄性大鼠,青岛市药检所提供,动物合格证号:SCXK(鲁)20030010。随机分为五组:模型组、卡托普利组、中药组、假手术组、空白组,每组 8 只,体重平均(180 ± 17)g。

2. 药品:新血府逐瘀汤处方:当归、生地、桃仁、红花、赤芍、川芎、川牛膝、首乌、泽泻、枳实、生山楂、茵陈。作用与用途:行气活血、补肾养血、利湿化痰。用于高血压病、冠心病、心绞痛、高脂血症等有血瘀见证者。由海慈医疗集团中药制剂室制备,质量标准参照 2006 版《中华人民共和国药典》项下规定。卡托普利片,12.5 mg/片(中美上海施贵宝制药有限公司生产)。

二、方法

1. 模型制备:建立腹主动脉缩窄致肾性高血压大鼠模型采用经典 Anversa^[5]造模方法:中药组、卡托普利组、模型组大鼠经 3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉,按 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药,麻醉后固定于手术台,剪去胸、腰背部被毛,从第 10 胸椎到第 3 腰椎沿正中中线切开皮肤,在左侧季肋下 1.5 ~ 2 cm 距脊柱 1 cm 处,用小血管钳分离一段腹主动脉,在左右肾动脉上方约 0.5 cm 处小心分离腹主动脉,将 7 号针头(直径约 0.13 mm)穿线后平行放置于分离后的腹主动脉并结扎,然后抽出钢针,致使腹主动脉狭窄,最后缝合肌肉及皮肤,术后每只肌肉注射青霉素 10 万 U,以防感染。造模成功后筛选成功模型进行分组:中药组、卡托普利组、模型组。假手术组除未结扎腹主动脉外,其他手术程序相同,空白组未行手术。术后所有大鼠均饲以常规固体饲料及瓶装水,每周测血压 1 次,凡血压比术前增高 20 mm Hg 以上,或高于 150 mm Hg 者确定已形成高血压,造模

成功。

2. 给药方法:造模成功后(术后约 2 周),中药组每天用新血府逐瘀汤水煎液 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,(药物浓度为含生药 $5.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$);卡托普利组以卡托普利 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 用双蒸水 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 稀释后灌胃(药物浓度为 $0.67 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),1 次 $\cdot \text{d}^{-1}$;模型组、假手术组和空白组每日蒸馏水 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃。各组动物每天均禁食 12 h 后灌胃,干预 10 周,每周称重 1 次,根据体重调整药量。

3. 大鼠收缩压及测定:采用 HX2II 大鼠血压心率测定仪(湖南医科大学心血管生理实验室研制)分别测定大鼠安静清醒状态下鼠尾动脉收缩压。

4. 左心室重量指数(LVWI)测定:大鼠称重后抽取腹主动脉血后,处死大鼠,迅速开胸取出心脏,沿房室交界处去除大血管、心房及右心室,用 PBS 液充分冲洗,滤纸吸干,称量左心室(包括室间隔)的湿重,以左室重量与体重之比作为左心室重量指数(LVWI)。

5. 血液指标的测定方法:采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法,定量测定血浆中 vWF、ET 水平和血浆 D-D 水平,试剂盒由上海西唐生物有限公司提供。vWF 原装 ELISA 试剂盒,批号:F4619;ET 原装 ELISA 试剂盒,批号:F4672;D-D 原装 ELISA 试剂盒,批号:F4616。

6. I 型和Ⅲ型胶原定量分析:用免疫组织化学方法对 I 型和Ⅲ型胶原进行分析,测量心肌组织胶原容积分数(CVF)和心肌血管周围胶原面积(PVCA)。在 SABC 法胶原染色下,采用 Brilla 等^[6]描述的方法,测量心肌组织胶原容积分数(CVF)和心肌血管周围胶原面积(PVCA)。通过灰度调节来区分胶原和非胶原。计算方法:CVF = 胶原面积/视野总面积,其中胶原面积不包括血管周围胶原面积。随机分析 5 个视野,取其均值作为该心脏的 CVF。PVCA = 壁内小动脉管腔周围胶原面积/动脉管腔面积。每一标本取 4 根壁内小动脉横截面进行测量,取其均值作为该心脏的 PVCA。

三、统计学处理

应用 SPSS15.0 软件包进行统计学分析,各组数据结果以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据之间显著性检验用多个样本均数比较的方差分析程序检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 用药 10 周后,中药组大鼠血浆 vWF、ET 和 D

表 1 不同组别 vWF、ET、D-D、收缩压、LVWI 的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	vWF(%)	ET(pg · L ⁻¹)	D - D(mg · L ⁻¹)	收缩压(mm Hg)	LVWI(mg · g ⁻¹)
空白组	8	177.5 ± 42.2	92.8 ± 21.4	2.88 ± 0.35	128.13 ± 4.58	3.16 ± 0.29
假手术组	8	167.9 ± 31.3 ^d	98.6 ± 20.3 ^c	3.18 ± 0.81 ^c	128.13 ± 5.31 ^{ef}	3.18 ± 0.18 ^c
模型组	8	232.2 ± 38.9 ^b	128.2 ± 32.4 ^a	4.12 ± 0.95 ^a	187.75 ± 6.54 ^a	3.57 ± 0.25 ^a
中药组	8	167.1 ± 46.5 ^d	102.9 ± 62.1 ^c	3.16 ± 0.85 ^c	149.75 ± 7.55 ^{ac}	3.24 ± 0.39 ^c
卡托普利组	8	178.1 ± 68.9 ^d	97.6 ± 18.9 ^c	2.97 ± 0.61 ^c	132.49 ± 2.67 ^{ef}	3.19 ± 0.21 ^c

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与中药组比较,^f $P < 0.05$

-D 与模型组比较,明显下降,结果有统计学差异($P < 0.01$),中药组大鼠血压、LVWI 与模型组比较,明显下降。结果见表 1。

2. 卡托普利组和中药组的 I 型胶原和 III 型胶原 CVF 和 PVCA 较模型组下降($P < 0.05$)。结果见表 2、表 3。

表 2 各组大鼠 I 型胶原定量分析($\bar{x} \pm s, %$)

组 别	n	CVF	PVCA
空白组	8	3.88 ± 1.17	1.28 ± 0.39
假手术组	8	3.79 ± 1.05	1.14 ± 0.22
模型组	8	6.48 ± 0.54 ^{bc}	1.63 ± 0.34 ^{bc}
中药组	8	5.35 ± 1.15 ^{cd}	1.25 ± 0.35 ^{cd}
卡托普利组	8	5.33 ± 1.12 ^{cd}	1.29 ± 0.31 ^{cd}

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与假手术组比较,^c $P < 0.01$;与模型组比较,^d $P < 0.05$

表 3 各组大鼠 III 型胶原定量分析($\bar{x} \pm s, %$)

组 别	n	CVF	PVCA
空白组	8	4.08 ± 1.22	1.08 ± 0.32
假手术组	8	4.16 ± 1.21	1.09 ± 0.23
模型组	8	6.29 ± 0.78 ^a	1.64 ± 0.26 ^a
中药组	8	5.13 ± 0.97 ^b	1.31 ± 0.38 ^{ab}
卡托普利组	8	5.11 ± 0.99 ^b	1.26 ± 0.26 ^{ab}

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

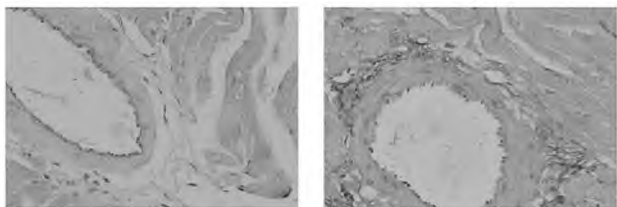
3. 免疫组织化学染色模型组心肌细胞肥大,动脉外膜纤维化增多,胶原纤维呈黄色,分布于动脉周围,管壁厚度/管腔直径增加,间质的纤维化和胶原蛋白过量堆积,可见大量 I 和 III 型胶原表达, I 和 III 型胶原比值减小,结果见图 1。

4. 中药组心肌细胞肥大不明显,动脉外膜胶原纤维少,分布于动脉周围,管壁厚度/管腔直径正常,间质胶原蛋白量少,结果见图 2。

5. 卡托普利组心肌细胞肥大不明显,动脉外膜胶原纤维少,分布于动脉周围,管壁厚度/管腔直径正常,间质胶原蛋白量少,结果见图 3。

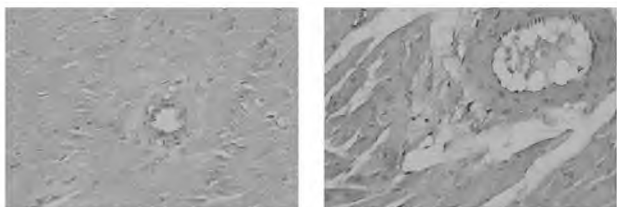
讨 论

心肌纤维化(MF)是高血压患者心肌重塑的组织学结构成分之一,它是指在心肌的正常组织结构中胶原纤维过量积聚,心脏组织中胶原浓度显著升高或胶原成分发生改变,这种病理变化与心律失常



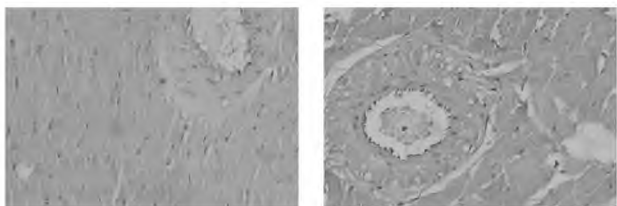
心肌血管周围 I 型胶原 心肌血管周围 III 型胶原

图 1 模型组 SABC 法胶原染色(× 200)



心肌血管周围 I 型胶原 心肌血管周围 III 型胶原

图 2 中药组 SABC 法胶原染色(× 200)



心肌血管周围 I 型胶原 心肌血管周围 III 型胶原

图 3 卡托普利组 SABC 法胶原染色(× 200)

及心功能障碍甚至心脏性猝死密切相关。高血压心肌纤维化的发生已被证实是一个由众多体液因子参与并共同调节的过程,其中肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)被认为是最重要的调节机制,此外血管内皮及内皮衍生因子对心肌纤维化的发生与转归起着重要作用。

国外学者 Lipg 等^[7]认为,高血压存在血栓前状态(PTS),且 PTS 与高血压靶器官损害有关。虽然近年来强调控制血压,但是高血压所致的靶器官损害和心血管事件仍很严重,这除了对血压的控制力度和危险因素重视不够外,可能还与忽视高血压的 PTS 有关。高血压血栓前状态主要表现在:血管内皮细胞损伤,血小板被激活或功能亢进,凝血活性抗进,纤溶因子含量减少或功能减弱,血液黏度增高。血压高时由于血流高剪切应力、血流瘀滞、血

管内皮损伤等因素的作用,高血压患者的凝血、纤溶、血小板等系统发生显著变化,出现血浆 D-二聚体、vWF、ET 等水平升高。所以内皮功能损害时,血浆 ET 和 vWF 显著升高是反映高血压 PTS 的可靠指标。而高血压患者血浆中 ET 水平的高低与心肌纤维化的形成有一定的关系。

高血压属中医“眩晕”“头痛”范畴,多以阳亢阴虚、痰湿壅盛为主。随着高血压病中西医结合研究的进展,近年来很多学者认为脉络瘀阻与高血压病有着密切的联系,并提出活血化瘀的新治法^[8],在辨证论治基础上参以活血化瘀法治疗高血压病较单纯的辨证论治更具有优势。血府逐瘀汤能调节血瘀证动物模型血管内皮细胞的内分泌功能^[9],改善体内的纤溶系统作用,舒张血管及抑制血小板聚集,同时证实血瘀证病理状态的形成与血管内皮细胞的损伤有密切关系^[10]。新血府逐瘀汤为血府逐瘀汤加减而成,方中以桃仁、红花、赤芍、川芎、牛膝、山楂活血化瘀,为君药;生地、当归、首乌养血活血,为臣药;枳实行气、川芎行气活血,泽泻利湿化痰,为佐使药,体现出活血化瘀与疏肝理气的良好组合,按照“气行则血行”的理论,该汤剂重在活血化瘀,调达气机,行气止痛,凉血清热,养血润燥,适用于血瘀证或气滞血瘀证的患者。

本实验研究结果证实,服用新血府逐瘀汤的高血压大鼠心肌细胞肥大不明显,动脉外膜胶原纤维少,管壁厚度/管腔直径正常,Ⅰ和Ⅲ型胶原比值正常,同时大鼠内皮功能明显改善,血浆 D-二聚体、vWF、ET 水平明显下降,LVWI 值降低,明显优于未用药组。这就提示新血府逐瘀汤在改善高血压心

肌纤维化方面,除了它行气活血及抑制血管平滑肌细胞增殖的药理作用外,可能与其防治高血压血栓前状态及改善内皮功能有关,这在高血压并发症的防治中有积极的意义和广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] Weber KT, Janicki JS, Pick R. Myocardial fibrosis in nonhuman primate with pressure overload hypertrophy [J]. Am J Pathol, 1989, 135 (5): 771 - 781.

[2] 丁志山, 高承贤. 血府逐瘀汤对心肌成纤维细胞增殖和胶原合成的影响 [J]. 中药材, 2002, 25(7): 481 - 483.

[3] 严灿, 张新春, 邓中炎, 等. 心肌康对高血压病性左室肥厚逆转的临床作用观察及机理探讨 [J]. 中国中医药科技, 1995, 2(5): 17 - 18.

[4] 庄小梅. 活血化瘀方治疗原发性高血压及对血管内皮功能的影响 [J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(7): 10 - 11.

[5] Anversa P, Hagopian M, Loud AV. Quantitative radioautographic localization of protein synthesis in experimental cardiac hypertrophy [J]. Lab Invest, 1973, 29(3): 282.

[6] Brill CG, Janieh JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension [J]. Cir Res, 1991(69): 107.

[7] Lipg HY. Targert organ damage and the prothombotic state in hypertension [J]. Hypertension, 2000, 36(6): 975 - 977.

[8] 段学忠, 杨丁友, 孙西庆, 等. 益脉降压流浸膏对老年高血压病患者血小板活化、纤溶活性及血管紧张素Ⅱ的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(7): 508 - 510.

[9] 王奇, 陈云波, 梁伟雄, 等. 血瘀证兔模型血管内皮细胞内分泌功能变化及血府逐瘀汤作用的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(6): 31.

[10] 陈云波, 王奇, 赖世雄. 血瘀证兔模型血清对培养的血管内皮细胞形态结构的影响 [J]. 中医研究, 2001, 14(6): 13 - 16.

(收稿日期: 2011 - 02 - 17)

· 信息 ·

全国中医药博士科技创新与成果转化学术会议征文通知

由中华中医药学会主办,《世界中西医结合杂志》社承办的全国中医药博士科技创新与成果转化学术会议将于 2011 年 9 月召开。征文要求如下:

1. 征文内容:(1)中医文献研究的创新与成果;(2)中医基础理论研究的创新与成果;(3)中医临床研究的创新与成果;(4)中药研究的创新与成果;(5)针灸、按摩、气功等疗法的创新与成果。
2. 征文要求:(1)注明作者姓名、单位、邮编,以 Word 文档形式将稿件发送至 zyybs_zhengwen@126.com,来稿注明“全国中医药博士科技创新与成果转化学术会议征文”标题;(2)截稿日期:2011 年 8 月 1 日。
3. 联系人:王贵生 李晨 电话:010-64822253
4. 通讯地址:北京市朝阳区北四环东路 115 号院 6 号楼 109 室 邮编 100101