

芩丹胶囊对老年自发性高血压大鼠血管外膜 I、Ⅲ型胶原表达的影响

郭雪峰¹ 张继东¹ 姜红² 王博¹ 任敏¹ 冯利¹

摘要 目的 观察芩丹胶囊对老年自发性高血压大鼠 (SHR) 血管外膜 I、Ⅲ型胶原蛋白和基因表达的影响, 并进一步探讨血管外膜重构的可能作用机制。**方法** 32 只 40 周龄老年自发性高血压大鼠随机分为模型组、芩丹胶囊大剂量组[750 mg/(kg·d)]、芩丹胶囊小剂量组[150 mg/(kg·d)]及氯沙坦组[30 mg/(kg·d)], 每组 8 只; 另设老年 Wistar-Kyoto 大鼠为空白对照组和正常药物对照组[芩丹胶囊 750 mg/(kg·d)]; 模型组和空白对照组给予等量生理盐水灌胃, 每天 1 次, 共 12 周。观测各组大鼠收缩压; 免疫组化法观察 I、Ⅲ型胶原在胸主动脉外膜的蛋白表达以及 PCR 检测 mRNA 表达。**结果** 与模型组比较, 芩丹大、小剂量组及氯沙坦组收缩压均明显下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 此 3 组免疫组化中 I、Ⅲ型胶原蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), PCR 显示 I、Ⅲ型胶原 mRNA 在外膜表达也有所降低 ($P < 0.05$)。**结论** 芩丹胶囊不仅能够有效地降低 SHR 大鼠血压, 而且从 I、Ⅲ型胶原表达量明显减少可看出芩丹胶囊对动脉血管外膜重构有明显的抑制及逆转作用。

关键词 芩丹胶囊; 血管重构; I 型胶原; Ⅲ型胶原; 免疫组化; PCR

Effect of Qindan Capsule on Expression of Vascular Adventitial Collagen I and Ⅲ In Old Spontaneous Hypertensive Rats GUO Xue-feng, ZHANG Ji-dong, JIANG Hong, et al *Department of Traditional Chinese Medicine, Qilu Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan (250012)*

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Qindan Capsule (QDC) on gene and protein expression of vascular adventitial collagen I and Ⅲ (VAC1 and VAC3) in spontaneously hypertensive rats (SHR), for further research the possible mechanism of vascular adventitial fibroblasts remodeling. **Methods** Thirty-two SHR, 40 weeks old, were equally randomized into the model group and the three treated groups treated respectively with high (750 mg/Kg·d) and low dosage QDC (150 mg/Kg·d), and losartan (30 mg/Kg·d), once a day for 12 weeks. Besides, a normal blank control group and a normal QDC (750 mg/Kg·d) medicated group were set up with same aged Wistar-Kyoto rats. Systolic blood pressures of rats were monitored, gene and protein expressions of VAC1 and VAC3 in rats' thoracic aortic adventitia were detected at the end of experiment using immune-histochemical staining and real-time quantitative fluorescent PCR respectively. **Results** Compared with the model group, blood pressure as well as the gene and protein expressions of VAC1 and VAC3 were all lower in the two QDC (high and low dosage) treated groups ($P < 0.05$). **Conclusion** QDC could not only effectively reduce the blood pressure in SHR, but also suppress and even reverse their thoracic aorta adventitial vascular remodeling, which is displayed by the obvious lowering of VAC1 and VAC2 expression levels.

KEYWORDS Qindan Capsule; vascular remodeling; vascular adventitial collagen I and collagen Ⅲ; immune-histochemistry; real-time polymerase chain reaction

高血压病是严重危害人类健康的常见心血管疾病之一, 目前我国成人发病率一直呈持续上升的趋势, 而血管重构 (vascular remodeling) 是最早也是最广泛的高血压靶器官损害, 随着对高血压病研究的深入, 血管外膜胶原重塑现象日益受到人们的关注。高血压血管胶

原重塑是指高血压状态下血管胶原结构和功能的改变, 是高血压靶器官损伤及循环紊乱的病理生理基础。以往研究血管重塑多集中在血管内膜、中膜平滑肌细胞的异常变化, 鲜有系统研究血管外膜细胞外基质尤其胶原者, 胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 血管壁主要含有 I 型胶原和 Ⅲ型胶原, 胶原的合成多于降解, 特性构型和排列的异常改变是高血压血管胶原重塑的基本原因, 所以要从根本上解决高血压问题, 其治疗上也要包括逆转高血压血管重塑的胶原基质方面, 这为高血压血

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.30873324)

作者单位: 1. 山东大学齐鲁医院中医科 (济南 250012); 2. 山东大学齐鲁医院心血管功能与重构教育部重点实验室

通讯作者: 张继东, Tel: 13791122619, E-mail: drzjd@sdu.edu.cn

管重塑的研究提出新的切入点。本研究通过整体动物实验观察了芩丹胶囊的降压疗效及其对胸主动脉外膜Ⅰ、Ⅲ型胶原重塑的干预机制。

材料与方法

1 动物 14周龄雄性SHR大鼠40只, 体重(260±20)g; 14周龄雄性Wistar-Kyoto(WKY)大鼠20只, 体重(280±20)g。均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证编号: SCXK(京)2002-0003]。每笼4只, 饲养在(22±2)℃, 相对湿度(55±5)% , 人工光照明暗各12h的普通级动物室中。饲料(由山东大学实验动物中心提供)和自来水供自由饮食, 大鼠40周龄时开始灌胃及测量血压和体重。期间由于大鼠年迈等原因造成12只大鼠死亡, 实际用于实验的共32只SHR, 16只WKY大鼠。

2 药物 芩丹胶囊(成分: 生黄芩、丹参、黄连、钩藤、川芎、地龙、益母草、桑寄生等提取物, 0.35g/粒, 1g药物相当于生药材4g, 院内制剂)由山东大学附属齐鲁医院药剂科提供。氯沙坦, 50mg/粒, 杭州默沙东制药有限公司生产, 批号H20000371。用蒸馏水配置成相应浓度的混悬液, 4℃保存, 备用。

3 主要仪器和试剂 ALC-NIBP型大鼠血压测定仪(上海奥尔科特生物科技有限公司); LKB8800型超薄切片机; Olympus BX51型显微镜(Olympus Corp, 日本); Image-Pro Plus 6.0数字图像分析系统(Media Cybernetics Inc, 美国); Tgradient96型PCR热循环仪(Biometra, 德国); Biofuge-stratos型低温超速离心机(Kendro Ltd, 德国)。主要试剂: SP9001免疫组化试剂盒及浓缩型DAB试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 抗体购自Abcam公司。RNA提取剂(Trizol)购自Invitrogen公司; 聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自Takara公司, 引物由博尚生物技术有限公司合成。

4 实验方法

4.1 分组与给药 32只40周龄雄性SHR大鼠随机分为4组, 模型组、芩丹胶囊大剂量组、芩丹胶囊小剂量组、氯沙坦组, 每组8只; 另设40周龄雄性WKY大鼠为空白对照组及正常药物对照组。芩丹胶囊大剂量组给予芩丹胶囊750mg/(kg·d), 芩丹胶囊小剂量组给予芩丹胶囊150mg/(kg·d), 氯沙坦组给予氯沙坦30mg/(kg·d), 正常药物对照组给予芩丹胶囊750mg/(kg·d)。空白对照组和模型组给予相等剂量生理盐水。每日1次, 连续给药12周。

4.2 血压测量 用ALC-NIBP型大鼠血压测定仪应用尾袖法测量尾动脉收缩压, 测3次, 取其均值。用药

时每2周1次, 共测压6次。

4.3 胸主动脉组织免疫组织化学测定 大鼠末次给药后12h禁食, 不禁水, 10%水合氯醛腹腔注射麻醉。快速打开胸腔, 剪取胸主动脉0.5cm, 生理盐水冲洗后, 4%多聚甲醛固定1周, 常规石蜡包埋后切片, 厚度5μm。石蜡切片脱蜡至水; 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)抗原修复; 体积分数为3%的H₂O₂室温孵育10min, 以消除内源性过氧化物酶活性; 体积分数为5%的正常山羊血清室温孵育20min, 消除背景染色; 加入一抗, 4℃过夜; 加入生物素标记山羊抗兔IgG二抗, 37℃孵育15min; 加辣根酶标记链霉卵白素(S-A/HRP), 37℃孵育15min; 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。同时, 医用图像处理系统(Image-Pro Plus 6.0)处理, 胶原为胞浆表达, 以胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性表现, 每张切片40倍物镜下随机选取8个视野, 测定其光密度值。

4.4 PCR检测Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的表达反应 12周时另取膈上约1cm胸主动脉, 提取组织总RNA, 检测其浓度和纯度后, 在PCR热循环仪中逆转录为cDNA(表1)。参照试剂盒说明书, 配制反应体系。PCR反应在罗氏公司LightCycler中进行。反应程序为: 95℃预变性10s, Ⅰ型胶原55℃退火5s, 72℃延伸40s, 共45个循环, Ⅲ型胶原54℃退火5s, 72℃延伸10s, 共45个循环, 每个循环结束后采集荧光信号, 最后绘制熔解曲线。当荧光信号强度超过基线(baseline)时, 其阈值循环数(Ct值)被记录下来。Ct值被认为与被扩增基因的初始浓度密切相关。采用2^{-ΔΔCt}方法, 将Ct值转换为实验组Ⅰ、Ⅲ型胶原基因表达相对于对照组的倍数, 可以直接得到的目的基因相对于参照基因的定量。

表1 PCR检测中引物序列

名称	引物	长度
cDNA. Ⅰ型胶原引物上游	5'-GGCATAAAGGGTCATCGTC- 3'	714 bp
cDNA. Ⅰ型胶原引物下游	5'-GAACCTTCGCTTCCATACTC- 3'	714 bp
action引物上游	5'-GACAGGATCGCAGAAGGAGATTACT	142 bp
action引物下游	5'-TGATCCACATCTGCTGGAAGGT	142 bp
Ⅲ型胶原引物上游	5'-CCCAGAACATTACATACCACT- 3'	190 bp
Ⅲ型胶原引物下游	5'-GTCTTGCTCCATTCACCAG- 3'	190 bp

5 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 16.0统计软件处理数据, 应用方差分析和两样本t检验进行统计, P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠收缩压的比较(图1) 从给药第

4周起, 苓丹胶囊大、小剂量组、氯沙坦组大鼠收缩压与模型组比较均下降, 其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。给药6周到12周间, 苓丹胶囊大剂量组比小剂量组血压下降更为显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2 苓丹胶囊对老年自发性高血压大鼠胸主动脉 I、Ⅲ型胶原免疫组化中表达 (表2, 图2、3) 结果显示, 模型组较空白对照组 I、Ⅲ胶原表达明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；苓丹胶囊大、小剂量组及氯沙坦组表达较模型组均减少 ($P < 0.05$)。空白对照组和正常药物对照组 I、Ⅲ型胶原表达量比较差异

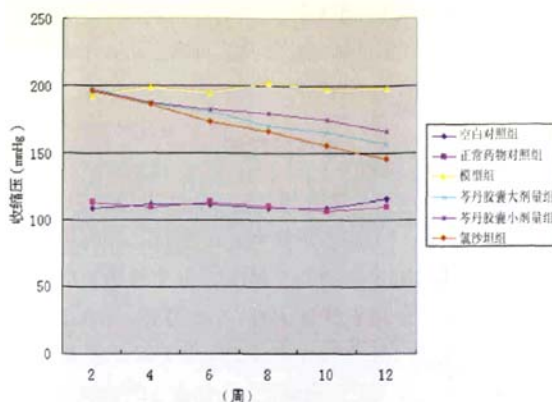
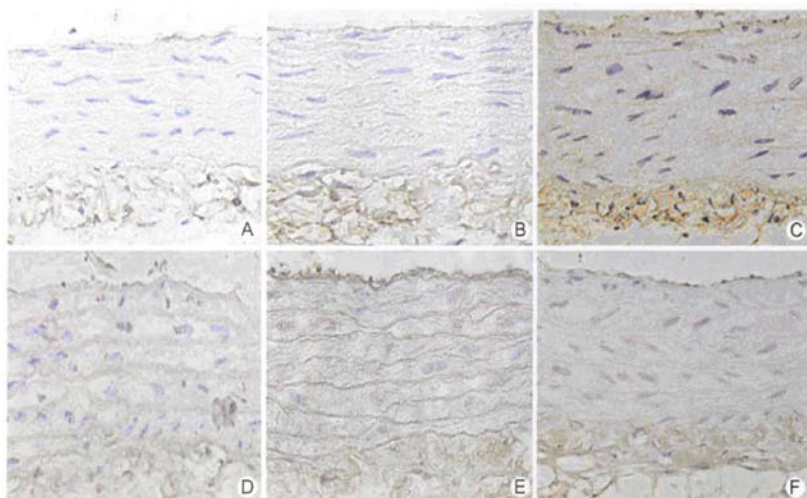


图1 各组大鼠治疗后血压测定结果



注: A为空白对照组; B为正常药物对照组; C为模型组; D为苓丹胶囊大剂量组; E为苓丹胶囊小剂量组; F为氯沙坦组; 图3同

图2 各组 I 型胶原蛋白表达 (免疫组化, $\times 400$)

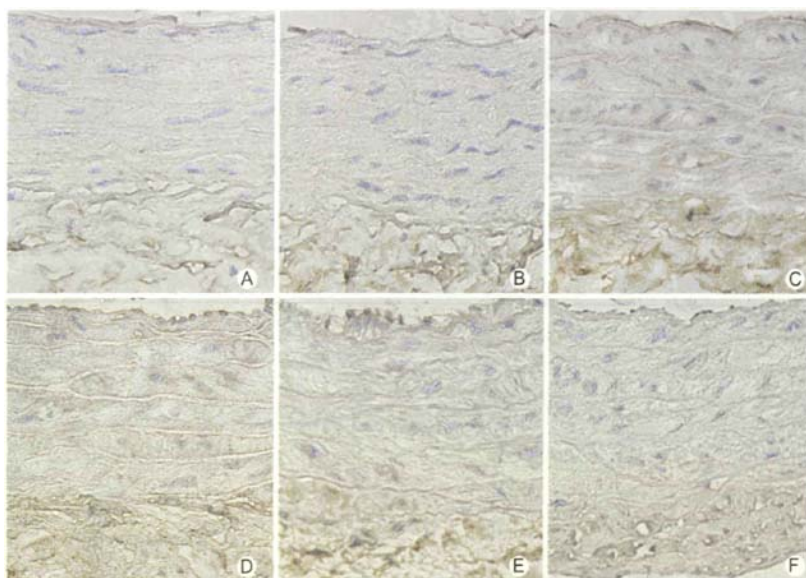


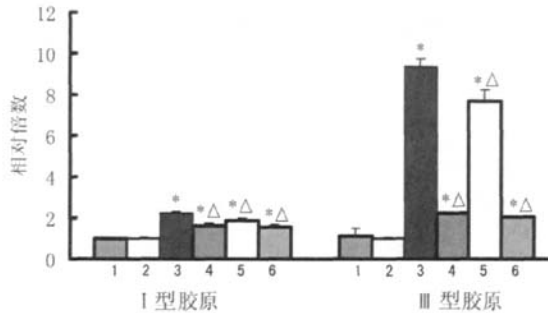
图3 各组 Ⅲ 型胶原蛋白表达 (免疫组化, $\times 400$)

表2 各组 I、Ⅲ型胶原光密度值比较 (OD值, $\bar{x} \pm s$)					
组别	n	I型胶原	n	Ⅲ型胶原	
空白对照	8	3049.53 ± 1323.42	6	3127.07 ± 1100.27	
正常药物对照	8	3698.20 ± 1479.29	6	3277.82 ± 1036.87	
模型	8	11133.41 ± 1288.25*	6	11474.29 ± 1020.43*	
芩丹胶囊大剂量	8	4809.25 ± 1880.79 [△]	6	4659.10 ± 1176.98 [△]	
芩丹胶囊小剂量	8	7901.35 ± 2316.48 ^{△▲}	6	7685.29 ± 1403.21 ^{△▲}	
氯沙坦	8	3865.71 ± 917.66 [△]	6	3789.17 ± 556.59 [△]	

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$; 与芩丹胶囊大剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

无统计学意义 ($P > 0.05$), 芩丹胶囊大剂量组与小剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但与氯沙坦组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 实时定量PCR检测结果 (图4) 模型组大鼠胸主动脉壁 I、Ⅲ型胶原mRNA表达量与空白对照组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。芩丹胶囊大、小剂量组及氯沙坦组大鼠胸主动脉壁 I、Ⅲ型胶原表达与模型组比较有所减少, 差异均有统计意义 ($P < 0.05$)。



注: 1为空白对照组; 2为正常药物对照组; 3为模型组; 4为芩丹胶囊大剂量组; 5为芩丹胶囊小剂量组; 6为氯沙坦组; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 与模型组比较, [△] $P < 0.05$

图4 各组 I、Ⅲ型胶原mRNA表达相对倍数

讨 论

近年来研究发现, 外膜对血压升高的反应先于血管中膜和内膜, 且最为灵敏^[1], 而且外膜的这种变化是高血压血管结构改变的最早征象之一^[2]。血管外膜的主要细胞成分是成纤维细胞 (adventitial fibroblasts, AF), Wilcox等^[3]研究发现AF转变为肌成纤维细胞 (myofibroblasts, MF)、增殖、迁移、分泌细胞外基质是血管损伤后血管重塑的重要内容。胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 通过观察胸主动脉病理切片在镜下所示, 模型组均出现外膜细胞增生活跃, 血管管壁增厚, 有些出现断裂、剥脱, 内弹力层破坏, 内径、中膜、外膜比值降低, 这与Duarte等^[4]的报道一致。赵军礼^[5]认为 I、Ⅲ型胶原排列紊乱, 含量增加是血管再狭窄形成的重要机制, Tozzi CA^[6]曾指出胶原细胞的过度表达与血管重塑有关。在正常动脉壁中, I型和Ⅲ型胶原是构

成细胞外基质 (ECM) 的主要成分, 骨桥蛋白 (OPN) 能够直接与 I 型胶原相结合, 并与 Ⅲ型胶原发生相互作用^[7], 对此王博^[8]已经证实了OPN基因的表达与在血管重构过程中起重要作用的胶原网络的重构有着密切的关系。

本研究结果显示, 芩丹胶囊大、小剂量组, 氯沙坦组的血压和模型组比较, 从灌胃开始到结束一直成下降趋势, 这与王博等^[9]的报道一致。空白对照组与正常药物对照组比较差异无统计学意义, 说明芩丹胶囊对正常大鼠无明显影响。芩丹胶囊不仅能够有效地降低SHR大鼠血压, 而且能够通过下调血管外膜I、Ⅲ型胶原的合成、分泌及成纤维细胞的分化, 进而抑制血管外膜的重塑。从免疫组化中观察到, 模型组外膜上, I、Ⅲ型胶原阳性颗粒表达量最多, 氯沙坦组最少, 这与AnSJ^[10]对氯沙坦能有效抑制胶原表达的报道一致, Image-Pro Plus 6.0软件分析结果显示, 模型组光密度值高于空白对照组, 芩丹大、小剂量组和氯沙坦组的光密度值虽然有所增多, 但仍低于模型组。Estrada KD^[11]曾在文献中报道胶原的表达增多可引起肺动脉高压, 可见胶原的高表达对于高血压重构有着重要意义。本实验通过荧光PCR发现, 芩丹胶囊能有效降低胶原mRNA表达, 与模型组比较, 经芩丹治疗的SHR动脉壁 I、Ⅲ型胶原 mRNA的表达量与外膜厚度均明显减少, 推测芩丹胶囊对SHR动脉壁形态学的影响与下调胶原基因的表达量有关。

肝热血瘀证是高血压病临床常见证, 肝热阳亢、瘀阻脉络是其重要的病机变化。芩丹胶囊以清热平肝、活血通络为基本治法, 方中黄芩、黄连、钩藤清热泻火、平肝潜阳, 丹参、川芎、地龙活血化瘀通络, 辅以益母草、桑寄生化瘀利水、补益肝肾。郑进^[12]等观察到川芎嗪组 I 型胶原纤维密度值明显低于模型组和生理盐水组 ($P < 0.05$), 认为川芎嗪可抑制腹膜黏连组织中 I 型胶原的蛋白表达。还有钩藤提取物给予SHR后, 可抑制血管内皮细胞生成自由基, 保护内皮细胞的功能^[13]。陈锋^[14]认为黄芩通过抑制TGF- β 1和Ⅲ型胶原表达水平, 减少细胞外基质的异常沉积。宋德明等^[15]的研究也发现川芎嗪、丹参对培养心肌成纤维细胞的胶原合成有抑制作用。本实验证实了芩丹胶囊具有良好的降压作用, 通过减少 I、Ⅲ型胶原的蛋白质及mRNA表达来改善SHR血管胶原重塑。这对高血压血管重构的防治及药物干预研究具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Schulze-Bauer CA, Regitnig P, Holzapfel GA, et al. Mechanics of the human femoral adventitia including the high-pressure response[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282 (6): H2427-2440.

- [2] Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, et al. Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (39): 36727-36733.
- [3] Wilcox JN, Okamoto EI, Nakahara KI, et al. Perivascular responses after angioplasty which may contribute to postangioplasty restenosis: a role for circulating myofibroblast precursors[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 947: 68-90.
- [4] Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats[J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 133 (1): 117-124.
- [5] 赵军礼, 陈镜合, 孙宝贵, 等. 莪术油对大鼠血管损伤后 I、III 型胶原的影响[J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2004, 12 (6): 359-362.
Zhao JL, Chen JH, Sun BG, et al. Effects of oleum curcumae aromaticae oil on type I and type III collagen in injured rat arteries[J]. *Chin J Intervent Cardiol*, 2004, 12 (6): 359-362.
- [6] Tozzi CA, Thakker-Varia S, Yu SY, et al. Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 18 (4): 497-510.
- [7] Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, et al. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (3): 1729-1735.
- [8] 王博, 张继东, 冯进波, 等. 芩丹胶囊对自发性高血压大鼠血管重构以及骨桥蛋白基因表达的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2007, 23 (3): 157-160.
Wang B, Zhang JD, Feng JB, et al. Effects of Qindan Capsule on remodeled vascular phenotype and osteopontin in spontaneous hypertensive rats[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2007, 23 (3): 157-160.
- [9] Wang B, Zhang JD, Wang SH, et al. Effects of Qindan Capsule on blood pressure, endothelin, calcitonin gene-related peptide and angiotensin II in spontaneous hypertensive rats[J]. *Chin J Integr Med*, 2006, 12 (4): 287-291.
- [10] An SJ, Boyd R, Wang Y, et al. Endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290 (2): H700-708.
- [11] Estrada KD, Chesler NC. Collagen-related gene and protein expression changes in the lung in response to chronic hypoxia[J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2009, 8 (4): 263-272.
- [12] 郑进, 陶映雪, 宋旭东, 等. 川芎嗪对大鼠腹膜黏连中 I、III 型胶原蛋白表达的影响[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2007, 9 (2): 147-148.
Zheng J, Tao YX, Song XD, et al. Effects of ligustrazine on the expression of type I or III collagens in the formation of peritoneal adhesions in rats[J]. *J N Chin Coal Med Coll*, 2007, 9 (2): 147-148.
- [13] Got H, Sakakibara I, Shimada Y, et al. Vasodilator effect of extract prepared from uncariae ramulus on isolated rat aorta[J]. *Am J Chin Med*, 2000, 28 (2): 197-203.
- [14] 陈锋, 熊伟, 何庆. 黄芩对皮肤瘢痕形成过程中转化生长因子- β 1 及胶原蛋白 III 表达的影响[J]. *实用医院临床杂志*, 2007, 4 (5): 32-33.
Chen F, Xiong W, He Q. Effect of Scutellaria Baicalensis Georgi on the expression of TGF- β 1 and collagen protein III during the formation of skin scar[J]. *J Clin Med*, 2007, 4 (5): 32-33.
- [15] 宋德明, 苏海, 吴美华, 等. 川芎嗪、丹参对心肌成纤维细胞胶原合成和细胞增殖的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 1998, 18 (7): 423-425.
Song DM, Su H, Wu MH, et al. Effects of tetramethylpyrazine and radix salviae miltiorrhizae on collagen synthesis and proliferation of cardiac fibroblasts[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 1998, 18 (7): 423-425.

(收稿: 2010-01-08 修回: 2010-08-02)

《中西医结合肝病杂志》2011 年征订启事

《中西医结合肝病杂志》由中国中西医结合学会与湖北中医学院主办。系中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊；中国期刊全文数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、万方数据——数字化期刊群入网期刊、美国《化学文摘》收录期刊。

本刊严格遵循“基础与临床并重”、“普及与提高兼顾”、“中西医结合”的办刊宗旨，如实报道国内外中西医防治肝病的新理论、新成果、新进展、新动向、新疗法、新药物、新经验。深受广大肝病临床医务人员和研究人员的喜爱。

本刊所设栏目有专论、临床论著、基础理论研究、学术探讨、实验研究、临床检验、影像学诊断、肝病治疗新技术、老中医心法、经验交流、病理报告、讲座、综述、海峡之窗、会议纪要、患者之友、思路与方法、译文等。

本刊为双月刊，逢双月月末出版，国际大 16 开，64 页，单价 8.00 元，全年订价 48.00 元。国内外公开发行，邮发代号：38-179，可在全国各地邮局订阅；如错过邮局订阅时间，可直接汇款至中西医结合肝病杂志社邮购。

编辑部地址：武汉市武昌区花园山 4 号；邮编：430061；电话：027-88929354，88854726；E-mail: zxygbzz@163.com