

细胞中 Fas 抗原表达,通过与其配体或特异性单克隆抗体结合,从而诱导细胞的程序性死亡-凋亡^[4]。这充分证实 T 淋巴细胞亚群存在着异常分布,参与 AA 的免疫发病机制。有应用定量免疫组化对 AA 患者骨髓活检细胞进行分析^[5],发现 8 例中的 5 例骨髓残余造血组织中的 T 细胞明显增多。本研究模型组小鼠外周血 CD4⁺ 细胞减少,CD8⁺ 细胞升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降甚至倒置,提示 AA 时外周血中 T 细胞亚群失调 CD4⁺ 细胞减少,CD8⁺ 细胞升高,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降或倒置。异常增高的 CD8⁺ 细胞抑制骨髓造血功能,分泌造血负调控因子,激活的 CD8⁺ 细胞及其分泌的 IFN- α , TNF- γ 等细胞因子可以直接诱发造血干细胞的凋亡^[5]。

IL-6 是具有多种功能的造血调控因子,主要用于早、中期造血干/祖细胞的增生和分化,IL-6 又是 T、B 淋巴细胞增生、分化以及活化的重要调节因子。造血因子 IL-6 代谢紊乱是 AA 病理的一个重要环节^[6]。AA 患者 IL-6 水平提高可能是机体由于造血功能低下,代偿性分泌增加以促进造血^[7]。IL-6 与 AA 患者外周血白细胞及 CD4⁺ 细胞呈负相关,提示 IL-6 变化可能与细胞免疫异常有关,反应细胞因子网络失调在 AA 发病中所起作用的复杂性。本研究也证实 AA 模型小鼠外周血 TNF- α 和 IL-6 明显上升,较正常小鼠组比较有显著性差异。中医无 AA 病名,根据病症属“血虚”、“虚劳”、“萎黄”等范畴,病机为肾阳虚、肾阴虚、肾阴阳两虚或急髓枯,治则为补肾养血,调和阴阳或清热解髓救髓。叶绿素铜钠盐为我院魏克民教授采用现代工艺技术,从蚕砂中提取叶绿素,再络合置铜(Cu²⁺)研制而成。其基本结构是由 4 个吡咯环组成的卟啉环,是一种良好的

造血细胞复合剂。动物实验证实叶绿素铜钠盐不但能升高 AA 小鼠的外周血三系,且对骨髓中多能干细胞、粒-单核祖细胞、红系祖细胞及骨髓有核细胞、骨髓基质细胞的修复均有很好的调节作用^[8]。YST 所用三黄三仙汤集温肾健脾,益气生血于一方。方中黄芪补气益脾生血;仙灵脾、仙茅、补骨脂温肾壮阳;黄精益气养阴,滋补脾肾;仙鹤草补虚止血;黄芩清热安血。近年现代药理学研究证实黄芪、补骨脂、仙茅、仙灵脾等均具刺激骨髓造血及提高机体免疫功能的作用。全方配伍得法,用药精当,共奏健脾补肾、益气生血、刺激骨髓造血之功效,配合蚕砂提取物叶绿素铜钠盐治疗 AA,确能收到较好疗效^[1]。叶绿素铜钠联合三黄三仙汤对 AA 模型小鼠有较好的治疗作用。

参考文献

- 1 蒋慧芳,魏克民.叶绿素铜钠联合三黄三仙汤治疗慢性再生障碍性贫血 33 例临床观察.中国中医药科技,2009,16(3):235
- 2 周永明,黄韬,薛志忠,等.免疫介导再生障碍性贫血的实验研究.中国实验血液学杂志,1998,6(1):59
- 3 王玲玲,周冬枝,刘永惠,等.生血丸 I 号对免疫介导的再生障碍性贫血小鼠骨髓增殖的影响.中国中医基础医学杂志,2002,8(5):53-54
- 4 Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic anemia. Curr Opin Hematol, 2008, 15(3):162-168
- 5 Nakao S. Immune mechanism of aplastic anemia[J]. Int J Hematol, 1997, 66(2):127-134
- 6 张涛,孙秉中,冯琪,等.急性和慢性再生障碍性贫血患者 IL-4, IFN- γ 及 TNF- α 诱生水平的对比研究[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(10):530-532
- 7 陈幸化.骨髓基质细胞在造血调控中的作用[J]. 国外医学(临床生物医学与检验学分册), 2000, 21(1):20
- 8 魏克民.叶绿素铜钠治疗再生障碍性贫血的实验研究[J]. 浙江医学, 1989, 11(4):193-195

(收稿:2010-01-15)

贝那普利对年轻自发性高血压大鼠左室心肌胶原的影响

孙绍贤 李海涛 刁增利 唐蕊 赵红 宋文静

摘要 目的 探讨贝那普利对年轻自发性高血压大鼠左室心肌间质及血管周围胶原影响及其机制。**方法** 16 只自发性高血压大鼠(SHR)投币法随机分为模型组($n=8$)、贝那普利治疗组($n=8$)。7 只 WKY 大鼠为正常血压大鼠组。治疗组给予贝

基金项目:河北省教育厅资助项目(2004120);河北省卫生厅资助项目(04263);华北煤炭医学院附属医院资助项目(08009)

作者单位:063000 唐山,华北煤炭医学院附属医院心内科(孙绍贤、李海涛、刁增利、唐蕊、赵红、宋文静);066000 河北省秦皇岛市妇幼保健院内科(孙绍贤);063000 河北省唐山工人医院分院心内科(唐蕊);053000 河北省衡水市第四人民医院心内科(宋文静)

通讯作者:李海涛,电子信箱:lihaitao@126.com

那普利[10mg/(kg·d)]灌胃,1次/日,其余两组蒸馏水灌胃。治疗12周后,颈动脉插管,测颈动脉收缩压(SBP)和舒张压(DBP);血清及左室心肌组织血管紧张素Ⅱ浓度(AngⅡ),应用苦味酸-天狼猩红染色法,计算机图像分析软件分析左室心肌组织切片胶原容积分数(CVF)和心肌小动脉周围胶原面积与小动脉管腔面积比(PVCA/LA),观察血管周围胶原;用偏光显微镜观察并分析Ⅰ型胶原、Ⅲ胶原,计算Ⅰ/Ⅲ型胶原比值,观察左室心肌间质胶原。**结果** 治疗12周后,模型组颈动脉SBP、DBP、左室AngⅡ、CVF、PVCA/LA及Ⅰ/Ⅲ型胶原比值均显著高于正常血压大鼠(WKY)对照组($P<0.01$);而贝那普利治疗组各指标与模型组比较,均显著性下降($P<0.01$),有效降低SHR的SBP、DBP、CVF、PVCA、Ⅰ/Ⅲ型胶原,降低心肌局部AngⅡ表达,可预防SHR心肌纤维化。**结论** 早期应用贝那普利治疗降低SHR心肌胶原,可预防心肌纤维化的形成,机制可能与降低心肌局部AngⅡ表达有关。

关键词 贝那普利 年轻自发性高血压大鼠 血管紧张素Ⅱ 心肌纤维化

The Effect of Benazepril on Left Ventricular Myocardial Interstitial Fibrosis in Early Spontaneous Hypertensive Rats. Sun Shaoxian, Li Haitao, Diao Zengli, Tang Rui, Zhao Hong, Song Wenjing. Department of Cardiology, The Affiliated Hospital, North China Coal Medical University, Hebei 063000, China

Abstract Objective To study the effect of benazepril on left ventricular myocardial fibrosis and mechanism in the early spontaneously hypertensive rats. **Methods** Normal Wistar-Kyoto (WKY, $n=7$) rats were used as control, and spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly to receive placebo ($n=8$) or benazepril tablets ($n=8$). Benazepril [10mg/(kg·d), qd] was given to rats for 12 weeks. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) of the carotid artery were detected. Angiotensin Ⅱ of blood-serum and left ventricular myocardium tissue were determined. Picrosirius red staining combined with computed myocardial fibrosis were employed to evaluate the collagen volume fraction (CVF), and perivascular collagen area/luminal area ratio (PVCA/LA). Type Ⅰ and Ⅲ collagen were measured with polarimicroscope, then Ⅰ/Ⅲ type collagen rate was calculated. **Results** Compared with WKY group, SBP, DBP, CVF, PCVA/LA and Ⅰ/Ⅲ type collagen rate all increased markedly in the SHR group. And Benazepril groups showed obvious reduction in muscle Ang Ⅱ ($P<0.01$), CVF ($P<0.01$), PCVA/LA ($P<0.01$) and Ⅰ/Ⅲ type collagen rate ($P<0.01$), and SBP ($P<0.01$) DBP ($P<0.01$) after 12 weeks. **Conclusion** Chronic administration of Benazepril could inhibit and prevent the development of myocardial fibrosis in the early spontaneously hypertensive rats. Decreasing Ang Ⅱ of myocardium tissue may be involved in the inhibition mechanism of myocardial fibrosis by Benazepril Tablets.

Key words Benazepril Tablets; Early spontaneously hypertensive rats; Angiotensin Ⅱ; Myocardial interstitial fibrosis

高血压心肌纤维化是一个慢性渐进过程,早期有效的药物干预对高血压心肌纤维化的发生发展将起到积极的预防作用^[1,2]。有些研究发现,血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)改善心脏左室重构的作用不依赖于其降压作用^[3]。自发性高血压大鼠(SHR)主要特征:有自发性高血压症状,高血压发病率高,血压高于200mmHg,动物对抗高血压药物有反应,该品系为筛选抗高血压药物的最适动物模型,是研究原发性高血压的最好模型。SHR于6周龄时血压开始升高,但不稳定,血管周围纤维化已经出现,但无心肌间质纤维化;至10周龄时左室肥厚和心肌纤维化已经建立,并且随着鼠龄的增加而逐渐加重。24周后血压趋于稳定,心肌间质纤维化明显增加^[4]。因此,本实验选用年轻SHR作为实验对象,选用6周龄的SHR,探讨口服贝那普利对早期SHR左室心肌间质及血管周围胶原的影响,从而研究该药物对心肌纤维化的影响及其机制,为临床高血压患者应用贝那普利提供理论基础。

材料与方法

1. 动物模型、分组及给药方法:SHR购自北京维通利华实验动物有限公司,WKY购自上海斯克莱斯实验动物有限公司,所选用大鼠均为雌性,5周龄。16只SHR随机分为两组:高血压模型组($n=8$)和贝那普利治疗组($n=8$)。并用7只同龄的WKY大鼠作正常血压对照组($n=7$)。购回后饲养1周,贝那普利治疗组大鼠自6周龄开始灌胃贝那普利[10mg/(kg·d)],另外两组用相当容量蒸馏水灌胃,3组大鼠灌胃1次/日,共12周。给药12周后处死3组大鼠。饲养中模型组和贝那普利治疗组各死亡1只老鼠。

2. 检测内容:(1)血压测定及采血:3组大鼠治疗12周后,称体重,乌拉坦1g/kg腹腔内注射麻醉,颈动脉插管,待血压稳定后,BL-420生物功能实验系统检测颈动脉收缩压(systolic blood pressure,SBP)、舒张压(diastolic blood pressure,DBP)。测3次取其均值作为该样本的血压。之后采取腹主动脉采血1ml,放入事先有酶抑制剂(0.3mol/L EDTA 10μl 0.32mol/L二巯基丙醇 5μl 0.34mol/L 8-羟基喹啉硫酸盐 10μl)抗凝管中,上下颠倒数次,混匀后放入4℃冰箱1~2h,取出后2500r/min,4℃离心7min,分离血浆。-20℃保存待测AngⅡ。取出心脏,测左心室重量,计算左心室重量/体重

(mg/g)。(2)血浆及组织血管紧张素Ⅱ测定原理:组织血管紧张素Ⅱ(AngiotensinⅡ,AngⅡ)浓度测定取新鲜心肌组织100mg,匀浆后取上清液测定AngⅡ。采用竞争机制原理,避免测定血浆及组织AngⅡ含量。试剂盒购于北京北方生物技术研究所。(3)大鼠CVF、PVCA/LA、I/Ⅲ型胶原测定与计算:取左室中段横截面心肌组织,常规10%缓冲中性甲醛固定、包埋、制成石蜡切片,苦味酸-天狼猩红染色法使胶原染色,心肌细胞呈黄色,胶原呈红色。采用Brilla等^[5]介绍的方法,用Nikon E600POL偏振光显微镜-Pixerra Penguin 150ES CCD-Image Pro Plus5.5图像分析系统,通过光镜观察,灰度调节区别胶原和非胶原成分,测量心肌切片的胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF)和心肌血管周围胶原面积与管腔面积,并计算其比值(perivascular collagen area/luminal area ratio,PVCA/LA),用偏光显微镜观察,黄、红色为I型胶原,绿色为Ⅲ型胶原,计算I/Ⅲ型胶原比值^[4]。计算方法:CVF=胶原面积/(心肌面积+胶原面积),胶原面积不包括血管周围胶原面积。PVCA/LA=小动脉管腔周围胶原面积/动脉管腔面积。

3. 统计学处理:应用SPSS13.0软件进行统计学处理,所有数据以均数±标准差表示,采用One-way ANOVA方差分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

结 果

1. 治疗12周后3组大鼠体重、颈动脉收缩压及舒张压比较:由表1可见,与正常血压大鼠对照组比较,模型组颈动脉收缩压、舒张压明显升高,具有统计学意义($P<0.01$),说明模型是成功的。治疗12周后,贝那普利治疗组收缩压、舒张压明显降低,具有统计学意义($P<0.01$);各组之间体重无统计学意义(P

>0.05)。说明贝那普利具有很好的降压作用。

表 1 3 组大鼠体重、收缩压、舒张压变化 (n = 7)

组别	大鼠体重(g)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)
贝那普利治疗组	317.86 ± 22.99	143 ± 14▲	111 ± 11▲
高血压模型组	333.29 ± 36.56	200 ± 24*	137 ± 13*
正常血压大鼠对照组	303.86 ± 32.93	129 ± 20	98 ± 12

与正常血压大鼠对照组相比,* $P<0.01$;与高血压模型组相比,▲ $P<0.01$

2. 3 组大鼠血浆及心肌AngⅡ、CVF、PVCA/LA和I/Ⅲ型胶原比值变化:由表2可以看出,与正常血压大鼠对照组比较,高血压模型组CVF、PVCA和I/Ⅲ型胶原比值显著上升($P<0.01$),表明模型组大鼠左心室出现了心肌胶原增多,出现纤维化;而治疗组CVF和PVCA/LA显著下降 $P<0.01$,具有显著性统计学意义,I/Ⅲ型胶原亦下降, $P<0.05$,左室纤维化程度明显减轻。模型组心肌组织AngⅡ明显上升($P<0.01$);治疗组左室心肌组织AngⅡ浓度明显下降($P<0.01$)。而各组血浆中AngⅡ浓度无统计学差异。说明苯那普利治疗组能够预防及减轻心肌纤维化,其作用机制可能与降低心肌局部AngⅡ浓度有关,与血浆中的AngⅡ无关。但与正常血压大鼠相比,治疗组的CVF仍高, $P<0.05$,差异具有统计学意义,说明贝那普利不能完全逆转心肌间质的纤维化,可能还存在其他纤维化机制。

表 2 3 组血浆及心肌组织 AngⅡ、CVF、PVCA/LA 和 I /Ⅲ型胶原比值变化 (n = 7)

组别	血 AngⅡ (pg/ml)	心肌 AngⅡ (pg/ml)	CVF (%)	PVCA/LA (%)	I /Ⅲ胶原比值
贝那普利治疗组	1570.26 ± 77.94	230.88 ± 40.44▲▲	1.76 ± 0.48*▲▲	0.50 ± 0.24▲▲	15.9 ± 2.69▲
高血压模型组	1533.11 ± 53.34	436.11 ± 72.41**	2.69 ± 0.59**	0.98 ± 0.33**	20.8 ± 6.08**
正常血压大鼠对照组	1562.77 ± 57.02	223.97 ± 64.51	1.08 ± 0.47	0.30 ± 0.11	13.8 ± 2.38

* $P<0.05$,** $P<0.01$,与正常血压大鼠对照组相比;▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$,与高血压模型组相比

3. 心肌组织病理形态学观察:(1)偏光镜观察治疗12周后心肌小动脉周围胶原的影响:见136页彩图5~彩图7(石蜡切片天狼猩红苦味酸染色×200)。在偏振光下,I型胶原显示红色或黄色,Ⅲ型胶原显示绿色,本试验心肌小动脉周围胶原以红色为主,故表明以心肌小动脉周围胶原I型胶原为主。正常血压大鼠血管周围少量的胶原,高血压模型组血管周围胶原显著增加,而治疗组血管周围胶原有所减少。(2)偏光镜观察治疗12周后心肌间质胶原的影响,见136页彩图8~彩图10(石蜡切片天狼猩红苦味酸

染色×200)。在偏振光下,I型胶原显示红色或黄色,Ⅲ型胶原显示绿色,本试验表明心肌间质胶原以I型胶原为主。模型组心肌间质胶原纤维表达水平显著增高,治疗组胶原纤维表达水平降低。

讨 论

高血压心肌纤维化在形态上主要表现为心肌间质中胶原的异常堆积。胶原纤维主要堆积在心肌细胞间隙及心肌内血管外膜外,心肌内血管壁的胶原亦增多,胶原纤维的硬度很大,少量的胶原增加即可明显增加心肌的硬度,早期主要损害其舒张功能^[6]。

在原发性高血压尤其是自发性高血压大鼠(SHR)动物模型主要以间质及血管周围纤维化为主,且持续时间较长,心肌细胞变性、坏死的数量较少,程度较轻。Martin Paul 和 Daniel A 等分别研究发现^[7,8],高血压心脏病患者不论其心室负荷状况如何,左右心室都存在心肌纤维化,因而指出,血流动力学机制并非是心肌纤维化的唯一机制,体液因子、激素和代谢等因素均参与心肌纤维化。近十几年来的研究结果显示^[9,10],循环和心肌局部肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活与心肌纤维化密切相关,尤其血管紧张素Ⅱ与心肌纤维化关系密切。研究发现单独的血压升高不伴循环中 RAAS 激活,只引起心肌细胞肥大而不引起心肌纤维化,相反,如果 RAAS 激活,血压正常的大鼠也会出现心肌纤维化^[11]。Ang Ⅱ作为一种生长因子,可使成纤维细胞增生并合成胶原增加。Ang Ⅱ是维持和升高血压的关键因子。

胶原基质的主要结构蛋白为Ⅰ型和Ⅲ型胶原。心肌胶原Ⅰ、Ⅲ型的变化可以反映心肌组织的重塑。心肌纤维化主要表现为胶原沉积增多、各型胶原纤维比例失调(Ⅰ/Ⅲ型比例增加)和排列紊乱。而自发性高血压大鼠主要为Ⅰ型胶原增多。本研究采用了年轻 SHR 为研究对象,SHR 与临床高血压的病理生理过程最接近,有实验提示,在 SHR 中的循环 RAAS 并不激活,本实验亦反映了贝那普利对 SHR 循环中的 RAAS 不影响,对心脏组织局部 RAAS 作用情况,与文献一致^[12]。本实验模型组收缩压、舒张压、心肌胶原容积分数、心肌血管周围胶原面积和管腔比值、Ⅰ/Ⅲ型胶原比值,心肌局部 Ang Ⅱ浓度均显著高于 WKY 组($P < 0.05$)。应用贝那普利治疗后,与模型组比较,血压、心肌局部 Ang Ⅱ及 CVF 和 PVCA/LA 均明显下降,提示贝那普利能明显抑制 SHR 心脏局部 ACE 活性,减少心肌组织局部 Ang Ⅱ生成,能降低总胶原纤维含量及Ⅰ/Ⅲ型胶原比值,以Ⅰ型胶原降低为主,从而干预了高血压心肌纤维化。但与正常血压大鼠对照组比较,治疗组 CVF 仍然升高($P < 0.05$),差异有统计学意义,提示贝那普利不能完全逆转心肌纤维化,不能达到正常水平,提示高血压病发生左室心肌间质纤维化的机制是多方面的,心肌局部

的 RAS 仅为可能机制之一^[13]。由此可见,早期长期口服贝那普利对高血压心肌纤维化发生发展的有一定干预作用,可能降低心肌组织局部 Ang Ⅱ浓度为其机制之一,但不除外其他因子影响。

(致谢:武警医学院心脏病研究所提供偏振光显微镜使用,在此表示衷心感谢!)

参考文献

- 1 Kathleen H, Berecek T, Phyllis R, *et al.* Effects of early perturbation of the renin angiotensin system on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats[J]. *Vascular Pharmacology*, 2005, 42: 93 - 98
- 2 Mukherjee D, Sen S. Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats [J]. *Circulation*, 1990, 67: 1474 - 1480
- 3 Mantero F, Lucarelli G. Aldosterone antagonists in hypertension and heart failure [J]. *Ann Endocrinol*, 2000, 61(1): 53 - 60
- 4 Lillian R, Peter W. Collagen and Picrosirius red staining: A Polarized light assess - ment of fibrillar hue and spatial distribution Braz [J]. *morphol Sci*, 2005, 22(2): 1 - 12
- 5 Brilla CG, Maisch B, Zhou G, *et al.* Hormonal regulation of cardiac fibroblast function [J]. *Eur Heart*, 1995, 16: 45 - 50
- 6 Bodh I. Jugdutt. Remodeling of the Myocardium and Potential Targets in the Col - lagen Degradation and Syn - thesis Pathways [J]. *Current Drug Targets cardiovascular and Haematological Disorders*, 2003, 3: 1 - 30
- 7 Martin P, Ali P, Reinhold K. Physiology of Local Renin - Angiotensin Systems [J]. *Physiol Rev*, 2006, 86: 47 - 803
- 8 Daniel A. Duprez. Role of the renin - angiotensin - aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *Journal of Hypertension*, 2006, 24, (6): 983 - 991
- 9 于学军,何作云,戚文航. SHR 心肌组织内血管紧张素转换酶活性的变化及西拉普利的作用[J]. *高血压杂志*, 2001, 9(3): 256 - 258
- 10 李瑾,方宁远,陆惠华,等. 依那普利对自发性高血压大鼠心脏局部血管紧张素转换酶及左室肥厚的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24(11): 1053 - 1055
- 11 Jugdutt, B. I. Monocytosis after acute myocardial infarction and left ventricular remodeling. (Editorial) [J]. *Am Coll Cardiol*, 2002, 39: 247 - 250
- 12 Daniel A, Duprez. Role of the renin - angiotensin - aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review [J]. *Journal of Hypertension*, 2006, 24 (6): 983 - 991
- 13 陈水龙,徐尚华,谢良地,等. 苯那普利逆转 SHR 大鼠左室肥厚的量效关系研究[J]. *福建医药杂志*, 2006, 5: 67 - 68

(收稿:2010-01-20)