

肾去交感神经术对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化及结缔组织生长因子表达的影响

侯 果 邱 璇 王 能 郑晓新 蒋学俊

摘 要 **目的** 观察肾去交感神经术(renal sympathetic denervation,RDN)对心力衰竭大鼠心肌纤维化及心肌组织中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)表达的影响,探讨肾去交感神经术治疗心力衰竭的机制。**方法** 48 只 SPF 级 Wistar 雄性大鼠分成 4 组,分别为心力衰竭 RDN 治疗组(RDN + HF 组)、心力衰竭模型组(Sham + HF 组)、假手术组(Sham 组)及正常对照组,其中 RDN + HF 组和 Sham + HF 组分别进行双侧肾交感神经切除或假手术处后用异丙肾上腺素(isoproterenol,ISO)诱导建立大鼠心力衰竭模型,4 周后行心脏彩超测左心室舒张末期内径(LVEDD)、舒张末期容积(LVEDV)、左心室射血分数(EF%)及收缩百分率(FS%)评估心功能变化并处死大鼠,留取心脏左心室心肌组织行 Masson 染色测定心肌胶原容积分数(CVF);免疫组化法检测心肌组织 CTGF 蛋白表达,RT-qPCR 检测左心室心肌 CTGF mRNA。**结果** 与心力衰竭模型组相比,心力衰竭 RDN 治疗组中反映心室腔扩大的指标 LVEDD 和 LVEDV(LVEDD: 0.65 ± 0.02 vs 0.76 ± 0.04 , $P < 0.05$; LVEDV: 0.77 ± 0.05 vs 0.91 ± 0.04 , $P < 0.05$)均明显减小,反映心肌收缩力的指标 EF 和 FS(EF: $72.66\% \pm 2.82\%$ vs $64.21\% \pm 2.50\%$, $P < 0.05$; FS: $32.55\% \pm 2.95\%$ vs $25.88\% \pm 3.42\%$, $P < 0.05$)均明显增大,反映胶原含量的指标 CVF($13.96\% \pm 2.90\%$ vs $59.69\% \pm 4.93\%$, $P < 0.05$)下降,CTGF 蛋白表达(4.53 ± 0.75 vs 7.06 ± 0.72 , $P < 0.05$)和 mRNA 相对量(6.95 ± 0.73 vs 10.88 ± 0.85 , $P < 0.05$)均减少,但仍高于假手术组(P 均 < 0.05)。**结论** 肾去交感神经术能够改善心力衰竭大鼠心功能并抑制心肌纤维化的进展,其机制可能与下调 CTGF 的表达有关。

关键词 肾去交感神经术 心力衰竭 心肌纤维化 交感神经活性 结缔组织生长因子

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.020

Effect of Renal Sympathetic Denervation on Cardiac Fibrosis and the Expression of Connective Tissue Growth Factor in Chronic Heart Failure Rats. Hou Guo, Qiu Xuan, Wang Neng, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of renal sympathetic denervation(RDN) on cardiac fibrosis and the expression of connective tissue growth factor(CTGF) mRNA and protein in left ventricular(LV) myocardium of rats with heart failure and to explore the underlying mechanisms. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: RDN plus HF, Sham plus HF, Sham and control group($n = 12$ for each group). Bilateral renal sympathectomy or sham operation were performed in RDN plus HF and sham plus HF groups respectively and myocardial fibrosis in rats with heart failure(HF) was induced by isoproterenol(ISO). Four weeks after the ISO was injected, left ventricular end-diastolic diameter(LVEDD), end-diastolic volume(LVEDV), left ventricular ejection fraction(EF)% and the evaluation of the contraction percentage%(FS) were detected to evaluate the cardiac function. Myocardial collagen volume fraction(CVF) were determined by Masson staining. The expression of CTGF in heart tissue was detected by immunohistochemistry and semi-quantitative real time-polymerase(RT-PCR). **Results** Compared with HF model group, LVEDD and LVEDV that represent left ventricular chamber size in RDN group were decreased(LVEDD: 0.65 ± 0.02 vs 0.76 ± 0.04 , $P < 0.05$; LVEDV: 0.77 ± 0.05 vs 0.91 ± 0.04 , $P < 0.05$), EF and FS that represent left ventricular systolic function were significantly increased(EF: $72.66\% \pm 2.82\%$ vs $64.21\% \pm 2.50\%$, $P < 0.05$; FS: $32.55\% \pm 2.95\%$ vs $25.88\% \pm 3.42\%$, $P < 0.05$) were increased, and CVF that represents myocardial collagen content was decreased($13.96\% \pm 2.90\%$ vs $59.69\% \pm 4.93\%$, $P < 0.05$), CTGF protein expression(4.53 ± 0.75 vs 7.06 ± 0.72 , $P < 0.05$) and the relative amount of mRNA(6.95 ± 0.73 vs 10.88 ± 0.85 , $P < 0.05$) were reduced, but still higher than sham group($P < 0.05$). **Conclusion** Renal sympathetic denervation can improve cardiac function and prevent cardiac fibrosis in chronic

基金项目:湖北省教育厅青年基金资助项目(Q20142104)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科(侯果、邱璇、郑晓新、蒋学俊);441300 湖北医药学院附属随州医院心血管内科(王能)

通讯作者:蒋学俊,电子信箱:xjjiang@whu.edu.cn

heart failure rats, which may associated with decreasing expression of CTGF in myocardial tissue.

Key words Renal sympathetic denervation; Heart failure; Cardiac fibrosis; Sympathomimetic activity; Connective tissue growth factor

慢性心力衰竭为各种心脏疾病的严重和终末阶段,其发生率高,是当今最重要的心血管病之一。心力衰竭的主要发病机制之一为心肌病理性重构,病理形态主要表现为心肌间质纤维化、心肌细胞肥大和心肌细胞凋亡^[1]。交感神经系统的过度激活是导致心肌重构和心力衰竭发生、发展的一个重要组成部分^[2]。交感激活后在心脏及肾脏组织中释放去甲肾上腺素占全身总量的62%,提示肾脏交感神经激活在心力衰竭的起病及进展中至关重要^[3]。肾交感激活后,肾脏传入神经可诱导其他包括心脏交感、中枢交感、骨骼肌交感在内的多脏器交感神经激活^[4],进一步导致去甲肾上腺素释放增加、肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活。目前的研究认为,肾交感激活后,伴随去甲肾上腺素和血管紧张素Ⅱ的释放增加,均可促进心肌纤维化的进展^[5]。结缔组织生长因子(CTGF)是近年新发现的一种促成纤维细胞分裂和胶原沉积的细胞因子,是心肌纤维化的重要标志物,其可促进细胞增殖,合成胶原,诱导细胞外基质沉积并能抑制其降解从而诱导心肌纤维化^[6]。

肾去交感神经术(RDN)已被证明是一个有效减少肾脏交感神经的方式,并且可以降低顽固型高血压患者的血压水平,其作用机制主要跟抑制交感神经过度激活有关^[7]。近期公布的REACH-Pilot试验提示RDN显著改善了心力衰竭患者的心脏功能,且对患者的血流动力学及肾功能均未带来不良影响,也有研究证实RDN可抑制心肌肥厚的进展,提示RDN可能是心力衰竭非药物治疗的新途径^[8,9]。然而RDN对心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响在先前的研究中尚未证实,因此,本研究拟使用异丙肾上腺素诱导的压力负荷心力衰竭大鼠模型探讨RDN对心力衰竭心肌纤维化的影响及其作用机制,旨在为心力衰竭的临床治疗提供实验依据。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物:Wistar 雄性大鼠 48 只,体重 240~280g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。实验动物均在武汉大学人民医院动物房单笼喂养,室内保持清洁、通风,饲料、饮水充足,温度维持在 20~26℃,相对湿度为 40%~70%,饲养环境符合实验条件要求。(2)主要试剂:山羊抗大鼠 CTGF 多克隆抗体(武汉博士德生物制品有限公司),免疫

组化试剂盒(武汉谷歌生物公司),TRIzol RNA 抽提试剂盒(美国 Gibco 公司),反转录酶(美国 Promega 公司),TaqDNA 聚合酶(大连宝生物工程有限公司)。

2. 方法

(1)分组及处理:将 48 只 Wistar 大鼠随机分为心力衰竭 RDN 治疗组(RDN + HF 组)、心力衰竭模型组(Sham + HF 组)、假手术组(Sham 组)及正常对照组(Control 组),每组各 12 只。各组间心率、体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。心力衰竭 RDN 治疗组和模型组分别给予肾去交感神经术及假手术处理后于术后 1 周皮下缓慢注射异丙肾上腺素 5mg/(kg·d),连续 10 天诱导慢性心力衰竭,Sham 组大鼠给予单纯假手术处理后继续喂养。

(2)RDN 模型及心力衰竭模型建立:大鼠肾去交感手术操作及电刺激检测参照 Hu 等^[10]文献,分离双侧肾动脉并通过苯酚涂抹肾动静脉周围方法去除肾交感神经,并使用肾神经电刺激的方法评价肾去神经支配是否彻底。假手术组仅打开腹腔并暴露肾动静脉,不做肾去交感操作。术中严格无菌操作,术后 3 天,青霉素 8 万 U/d 腹腔注射预防感染。饲养 1 周后进行下一步心力衰竭造模,ISO 诱导心肌肥大及心力衰竭模型的方法参照 Yeh 等^[11]文献,皮下缓慢注射异丙肾上腺素 5mg/(kg·d),连续 10 天诱导心力衰竭模型建立。

(3)高频多普勒超声检查:造模结束 4 周后,应用多普勒超声分别测量各组大鼠心脏左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室舒末容积(LVEDV)、左心室射血分数(EF%),短轴缩短率(FS%)。

(4)心肌胶原容积分数(CVF)测定:完成心脏彩超后,将大鼠麻醉固定后开胸取出心脏,分离出左心室并在长轴中点处垂直于长轴将左心室分为两部分,心底部分立即液氮冻存后放置 -80℃ 冰箱用于提取组织 RNA,心尖部分用 10% 甲醛液固定,石蜡包埋后切取 5μm 厚的 2 个相邻截面标本分别行 Masson 染色制成病理切片,每只大鼠选取 1 张切片光镜下观察,胶原纤维呈蓝色,正常心肌呈红色,应用 Image-pro plus 专业病理图像分析软件(美国 Mediacybernetics 公司)计算 CVF。CVF = 心肌胶原纤维面积/所测视野面积 × 100%。每张切片选择 5 个视野计算平均值作为该样本的 CVF。

(5)RT - PCR 检测 CTGFmRNA 表达: 用 Trizol 试剂提取心肌组织总 RNA,测定 RNA 浓度和纯度。CTGF 基因序列从 GenBank 中查阅,使用 Primer Premier5 设计引物,CTGF: forward 5' - CAAGGGC-CTCTTCTGTGACT - 3';reverse 5' - TGGAGATTTTGG-GAGTACGG - 3',扩增片段为 400bp。GAPDH:forward 5' - TGACGGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA - 3'; reverse 5' - CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGA GGG - 3',扩增片段为 460bp。退火温度分别为 56℃,58℃。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5mg/L Goldview),采用 ZF 型紫外透射反射分析仪摄像,采用 Quantity One v4. 6. 2 软件进行定量分析,以 GAPDH 为内参照,目的基因表达水平以其吸光度(A)与内参照 GAPDH 的比值表示。

(6)免疫组化检测 CTGF 蛋白表达:按 CTGF 免疫组织化学试剂盒说明行免疫组化染色,显微镜下观察细胞质出现棕黄色颗粒为阳性表达,每张切片随机选取 5 个视野(×400),应用 Image - pro plus 6. 0 图像分析系统(标准灰度校正后)进行分析,测定平均吸光度(A),取其均值。

3. 统计学方法:采用 SPSS13. 0 统计软件,所有数

据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对所测结果进行正态性及方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般状态观察:Sham 组及对照组 12 只大鼠全部存活,饮食、精神较好,体重增加,心力衰竭组大鼠逐渐出现食欲减退,精神萎靡,活动减少等表现,其中 RDN + HF 组有 3 只死亡,考虑为死亡原因术后出血、感染或心力衰竭。Sham + HF 组死亡 4 只,考虑死亡原因为严重心力衰竭。

2. 各组大鼠多普勒超声比较:如表 1 所示,对照组与 Sham 组心功能指标比较差异无统计学意义($P > 0. 05$);与对照组相比,RDN + HF 组和 Sham + HF 组心功能下降,表现在 LVEDD、LVEDV 值增加,EF、FS 值降低($P < 0. 05$);与 Sham + HF 组相比,RDN + HF 组心功能改善,LVEDD、LVEDV 值减小($0. 65 \pm 0. 02$ vs $0. 76 \pm 0. 04$, $0. 77 \pm 0. 05$ vs $0. 91 \pm 0. 04$, $P < 0. 05$),EF、FS 值增加($72. 66 \pm 2. 82$ vs $64. 21 \pm 2. 50$, $32. 55 \pm 2. 95$ vs $25. 88 \pm 3. 42$, $P < 0. 05$)。

表 1 4 组大鼠左心室结构和功能的多普勒超声检查结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(n)	LVEDD(cm)	LVEDV(ml)	EF(%)	FS(%)
RDN + HF	9	$0. 65 \pm 0. 02^{* \#}$	$0. 77 \pm 0. 05^{* \#}$	$72. 66 \pm 2. 82^{* \#}$	$32. 55 \pm 2. 95^{* \#}$
Sham + HF	8	$0. 76 \pm 0. 04^{\#}$	$0. 91 \pm 0. 04^{\#}$	$64. 21 \pm 2. 50^{\#}$	$25. 88 \pm 3. 42^{\#}$
对照组	12	$0. 56 \pm 0. 04$	$0. 67 \pm 0. 02$	$86. 40 \pm 2. 74$	$45. 03 \pm 5. 58$
Sham	12	$0. 57 \pm 0. 03$	$0. 66 \pm 0. 02$	$85. 05 \pm 2. 35$	$46. 88 \pm 3. 12$

与 Sham 组比,* $P < 0. 05$;与 Sham + HF 组比, $^{\#}P < 0. 05$

3. 各组大鼠心肌组织 Masson 染色及心肌纤维化指标比较:如图 1 所示,对照组与 Sham 组心肌无明显胶原沉积;与 Sham 组比较,Sham + HF 组有大量胶原纤维沉积,CVF(%)明显升高,差异有统计学意义($59. 69 \pm 4. 93$ vs $3. 38 \pm 2. 06$, $P < 0. 05$),RDN + HF 组可减少 Sham + HF 组的这种 CVF 升高趋势,差异有统计学意义($13. 96 \pm 2. 90$ vs $59. 69 \pm 4. 93$, $P < 0. 05$)。

4. 各组大鼠心肌组织 CTGF mRNA 的表达:如图 2 所示,与 Sham 组比较,Sham + HF 组 CTGF mRNA 的相对表达量明显升高($10. 88 \pm 0. 85$ vs $4. 60 \pm 0. 59$, $P < 0. 05$);与 Sham + HF 组比较,RDN + HF 组 CTGF mRNA 相对表达量减少($6. 95 \pm 0. 73$ vs $10. 88 \pm 0. 85$, $P < 0. 05$)。

5. 各组大鼠心肌组织 CTGF 蛋白的表达:如图 3 所示,免疫组化法检测大鼠心肌组织 CTGF 的表达水平,图中棕黄色颗粒代表 CTGF,可见 CTGF 在心肌细胞和心肌间质均有表达,尤其在心肌细胞质中高表达。与 Sham 组比较,Sham + HF 组 CTGF 表达水平明显升高($7. 06 \pm 0. 72$ vs $2. 35 \pm 0. 99$, $P < 0. 05$);与 Sham + HF 组比较,RDN + HF 组 CTGF 表达水平明显下降($4. 53 \pm 0. 75$ vs $7. 06 \pm 0. 72$, $P < 0. 05$)。

讨 论

慢性心力衰竭是各种器质性心脏病的最终结局,已成为危害人类健康的最主要疾患之一。心肌纤维化是慢性心力衰竭心肌重构的重要组成部分,在心肌重构过程中细胞外基质中的主要组成成分胶原蛋白会不断累聚并占据细胞和血管之间的间隙从而导致

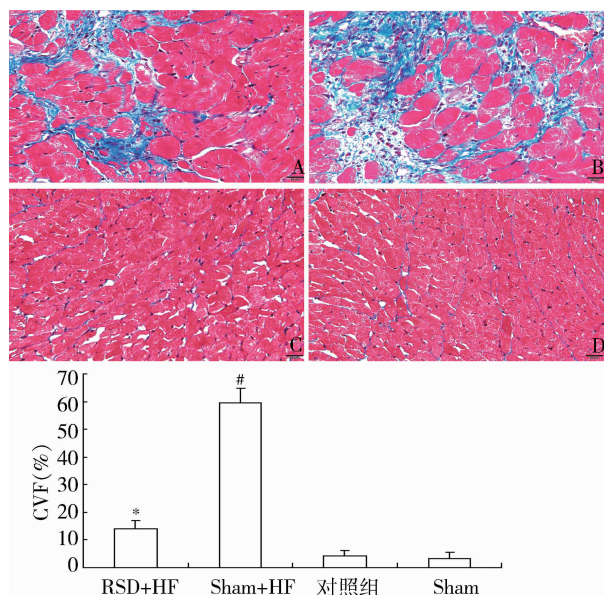


图1 心肌组织 Masson 染色 (×400)

A. 心力衰竭 RDN 治疗组 (RDN + HF 组); B. 心力衰竭模型组 (Sham + HF 组); C. 假手术组 (Sham 组); D. 正常对照组。蓝色为胶原纤维, 红色为正常心肌组织。与 Sham + HF 组比, * $P < 0.05$; 与 Sham 组比, # $P < 0.05$

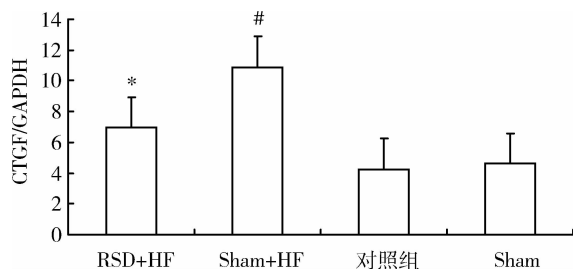


图2 各组大鼠心肌组织 CTGF mRNA 表达水平

与 Sham + HF 组比, * $P < 0.05$; 与 Sham 组比, # $P < 0.05$

纤维化^[12]。心肌纤维化会使正常心肌细胞减少, 导致心室壁僵硬而影响心室顺应性和功能, 并且随着心脏肌纤维、血管和细胞外基质重构的进展, 最终会引起心室壁厚度和心室腔内径及压力的变化从而导致心脏功能障碍。当心脏排出量不足, 心腔压力升高时, 机体会全面启动神经内分泌机制进行代偿导致交感神经系统和 RAAS 系统的过度激活, 反过来又促进心肌病理性重构。而交感神经系统在心力衰竭时对心肌重构起着至关重要的作用, 持续的交感神经系统过度激活可以改变心脏表型而导致肥大和纤维化从而使心脏出现收缩和舒张功能障碍及各种心律失常^[13]。研究表明, 肾交感神经的过度激活在高血压及慢性心力衰竭的发生、发展中起着关键的作用^[14]。肾去交感神经术 (RDN) 可以通过选择性毁坏肾动脉

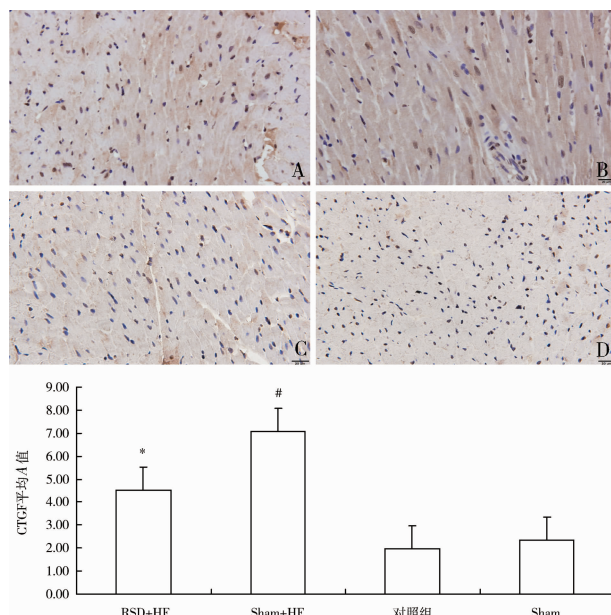


图3 各组心肌组织 CTGF 蛋白的表达 (×400)

A. 心力衰竭 RDN 治疗组 (RDN + HF 组); B. 心力衰竭模型组 (Sham + HF 组); C. 假手术组 (Sham 组); D. 正常对照组。与 Sham + HF 组比, * $P < 0.05$; 与 Sham 组比, # $P < 0.05$

外膜的肾交感神经纤维, 从而达到降低肾交感神经活性来阻断交感神经过度兴奋, 已经成为高血压及其他慢性交感活性亢进病如心力衰竭、高血压合并心肌肥厚、高血压合并糖耐量异常及慢性肾功能不全等的研究热点^[7]。目前已有研究者展开 RDN 对心肌重构作用的研究, Brandt 等^[15]于 2012 年第 1 次证明了 RDN 显著降低左心室质量并能改善舒张功能, Wang 等^[16]的研究提示 RDN 抑制了心力衰竭犬心房肌的重构; Clayton 等^[17]的研究证实 RDN 可改善心力衰竭兔模型的心功能。Hu 等^[18]研究证实, RDN 可明显改善心肌梗死大鼠模型的心肌重构。

肾去交感神经的方法被广泛的运用于多种实验模型, 为肾去交感神经在后期的临床应用中奠定了坚实的基础。研究显示化学交感神经阻断术与经皮导管肾脏交感神经射频消融术均能明显降低肾去甲肾上腺素溢出并能减低肾交感神经活性, 早期 Fajardo 等^[19]通过在实验动物犬肾动脉里注射 6-羟多巴胺来达到肾去交感神经的目的。目前, 建立大鼠肾去交感神经模型的最常见的方法是手术剥离肾动脉外膜的交感神经后用苯酚涂抹血管进行化学消融, 从而直接损伤神经纤维和神经元达到去肾交感神经的目的, 本实验复制了此肾去交感神经的方法, 并通过肾神经电刺激的方法评价肾去神经支配是否彻底, 在去交感

支配前,肾神经干近端电刺激 10 ~ 30s 可诱导明显交感反应(收缩压上升 5 ~ 10mmHg,心率上升 8 ~ 15 次/分,肾动脉收缩使肾脏颜色变苍白),而去神经支配后,电刺激上诉反应消失,提示肾去交感神经建模成功^[18]。

目前建立大鼠心力衰竭模型的方法主要有缩窄腹主动脉法、结扎冠状动脉法、药物诱导以及快速起搏等,其中药物诱导法主要是使用儿茶酚胺类药物异丙肾上腺素(ISO),使大鼠心率加快、心肌持续强烈收缩,心肌细胞出现坏死、纤维化,导致心肌病理性重构,最终引起心力衰竭,是一种无创的模型制作方法,操作简便,省时省力,可重复性高。本实验通过 ISO 诱导大鼠心力衰竭模型后行心脏超声多普勒检查和心肌病理 Masson 染色可见心力衰竭组(RDN + HF 组和 Sham + HF 组)较对照组(Sham 组对照组)心功能明显下降且出现心肌纤维化,提示心力衰竭造模成功。本实验中心力衰竭 RDN 治疗组(RDN + HF 组)较心力衰竭模型组(Sham + HF 组)心功能指标 LVIDD 和 LVEDV 降低,EF% 和 FS% 值增加,表明 RDN 可改善心力衰竭大鼠心功能,同时病理实验心力衰竭大鼠心肌 Masson 染色显示可见大量胶原纤维沉积,心力衰竭 RDN 治疗组(RDN + HF 组)CVF 较心力衰竭模型组(Sham + HF 组)降低,表明 RDN 可抑制心力衰竭大鼠心肌纤维程度。

近年的研究证实,结缔组织生长因子(CTGF)对心肌纤维化起着重要作用,其可促进细胞增殖,合成胶原,诱导细胞外基质沉积并能抑制其降解,并能促进诸如纤溶酶激活物抑制因子和金属蛋白酶组织抑制因子等蛋白酶抑制因子的表达^[19]。还可通过介导细胞黏附聚集、促进血管形成等特性促进心肌纤维化的发展^[20]。在慢性心力衰竭、心肌梗死及心肌炎后的心肌纤维化进展中,都可观察到 CTGF 的表达异常增多。交感神经系统激活后引起去甲肾上腺素释放增加和 Ang II 上调,均可促进转化生长因子- β (TGF- β)介导的心肌纤维化,而 TGF- β 可强有力的诱导 CTGF 的表达,与 TGF- β 协同作用可产生持久性纤维化。本实验结果证实,CTGFmRNA 和蛋白表达水平,在假手术(Sham)和对照组相比较无明显差异,表明假手术并未影响 CTGF 的表达。而心力衰竭组(Sham + HF 组)CTGF 的表达水平明显高于假手术组,提示 CTGF 参与心力衰竭的进展,RDN 治疗组(RDN + HF)明显抑制 CTGF 的升高趋势,证明了 RDN 能够抑制心力衰竭大鼠 CTGF 的表达。

综上所述,RDN 具有改善心力衰竭大鼠心功能,抑制心肌重构过程中心肌纤维化的进展,并且可降低心力衰竭大鼠心肌 CTGF 表达,提示 RDN 可能通过抑制 CTGF 表达来延缓心力衰竭心肌纤维化的发生发展,从而改善心功能。但是 RDN 抑制 CTGF 表达的机制尚不清楚,可能与其广泛地阻断 NE、Ang II 的生物学作用和下调 TGF- β 等表达从而有效地直接或间接抑制心肌组织表达 CTGF 有关,笔者未监测血浆肾素活性指数来反映交感神经系统的活动,并且缺乏其他治疗心力衰竭的方式的对照,比如 ACEI 类药物,无法比较 RDN 与其他治疗策略是否具有优势。此外,由于存在肾交感神经再生或全身交感系统参与的反馈调节,该疗法的长期安全性及有效性亟需更多循证医学的证据证实,这些都需要后续研究进一步深入。

参考文献

- 1 Cohn JN. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2000, 35(3): 569 – 582
- 2 Petersson M, Friberg P, Eisenhofer G, *et al.* Long – term outcome in relation to renal sympathetic activity in patients with chronic heart failure[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26:906 – 913
- 3 Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, *et al.* Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity[J]. *Circulation*, 1986, 73(4): 615 – 621
- 4 Dibona GF. Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension[J]. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2002, 11(2): 197 – 200
- 5 Lim H. Role of transforming growth factor – β in the progression of heart failure[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2584 – 2596
- 6 Daniels A. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis[J]. *Acta Physiol*, 2009, 195: 321 – 338
- 7 Sánchez – Álvarez C. Renal sympathetic denervation in the treatment of resistant hypertension[J]. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 2014, 87: 527 – 535
- 8 Davies JE, Manisty CH, Petraco R, *et al.* First – in – man safety evaluation of renal denervation for chronic systolic heart failure: primary outcome from REACH – Pilot study[J]. *International Journal of Cardiology*, 2013, 162(3): 189 – 192
- 9 Mahfoud F, Urban D, TeUer D, *et al.* Effect of renal denervation on left ventricular mass and function in patients with resistant hypertension: data from a multi – centre cardiovascular magnetic resonance imaging trial[J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(33): 2224 – 22316
- 10 Hu J, Ji M, Niu C, *et al.* Effects of renal sympathetic denervation on post – myocardial infarction cardiac remodeling in rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45986

(下转第 92 页)

殖分化异常有关,还与其凋亡障碍有关^[12]。本实验应用流式细胞仪分别检测作用 24、48 及 72h 各组细胞的凋亡情况。结果显示,作用 72h 实验组的细胞凋亡率为 23.34%,明显高于相同作用时间下空白组的 7.95%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而且随着作用时间的延长,疏肝化痰祛瘀方诱导 MCF-7 细胞的凋亡率逐渐增高,与作用时间呈正相关,提示疏肝化痰祛瘀方含药血清对乳腺癌细胞系的抑制效果具有时间依赖性。本实验提示,疏肝化痰祛瘀方通过抑制乳腺癌细胞的增殖,诱导其凋亡来发挥其抗肿瘤的作用,是该方剂发挥临床疗效的机制之一。

然而凋亡是通过基因调控的程序性死亡,其过程涉及一系列的基因激活、表达、调控以及相关信号转导通路的调节^[13-15]。疏肝化痰祛瘀方影响 MCF-7 细胞增殖与凋亡的具体作用靶点,相关基因调节情况及作用通路,今后将开展进一步研究。

参考文献

- 1 吴在德.外科学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2003:327
- 2 黄哲雷,陈万青,吴春晓,等.北京、上海、林州和启东地区女性乳腺癌发病及死亡的时间趋势[J].肿瘤,2012,8:47-50
- 3 陈杨,王成华,余晓琪,等.乳腺癌辨证分型与临床分期及分子标志物的相关性分析[J].新中医,2012,44(9):47-49
- 4 顾群浩,蔡照弟,张胜华.乳腺癌辨证分型与雌孕激素受体的相关性分析[J].辽宁中医杂志,2004,31(6):463-464

- 5 邓晶晶,袁青.针刺术后胃肠 Cajal 间质细胞超微结构的影响及机制研究[J].中华中医药学刊,2012,30(5):1162
- 6 万越,陈守华,顾禾等.硼替佐米联合表阿霉素对乳腺癌细胞增殖与凋亡的影响[J].山东大学学报:医学版,2012,50(2):43-46
- 7 黄建生,黄宏.乳腺癌中医病因病机浅析[J].中医杂志,2011,52(24):2154-2155
- 8 张小玲.逍遥散加味缓解乳腺癌内分泌治疗不良反应 84 例[J].浙江中西医结合杂志,2011,21(11):754-756
- 9 刘胜,花永强,孙霏平,等.试论乳腺癌痰毒瘀结病机的理论基础与临床应用[J].中西医结合学报,2007,5(2):122-123
- 10 张玉人.扶正解郁方对抑郁障碍型乳腺癌所诱导的髓系抑制细胞的干预作用研究[D].北京:北京中医药大学,2011
- 11 客蕊,华东,徐英杰,等.独角莲含药血清对肿瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用的研究[J].中医药学报,2011,39(2):37-40
- 12 Otsuki T, Kanno T, Fujita Y, *et al.* Adenosine receptor-mediated p53-dependent apoptosis in lu-65 human lung cancer cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 30(1): 210
- 13 Luo QK, He ZH, Zhang XF, *et al.* Effects of matrine on expression of Nrf2 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2012, 22(13): 1981-1985
- 14 Shiratori H, Knsino T, Uesugj M, *et al.* Acceleration of lung metastasis by up-regulation of CD44 expression in osteosarcoma-derived cell transplanted mice[J]. Cancer Lett, 2001,170(2): 177-182
- 15 Qavi HB, Wyde PR, Khan MA. In vitro inhibition of HHV-6 replication by sophocarpanes [J]. Phytother Res, 2002, 16(2): 154-159

(收稿日期:2015-01-13)

(修回日期:2015-01-20)

(上接第 83 页)

- 11 Yeh JL. KMUP-1 attenuates isoprenaline-induced cardiac hypertrophy in rats through NO/cGMP/PKG and ERK1/2/calcineurin A pathways[J]. British Journal of Pharmacology, 2010, 159: 1151-1160
- 12 Segura AM. Fibrosis and heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2014,19: 173-185
- 13 Esler M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management[J]. Journal of Applied Physiology, 2010, 108:227-237
- 14 Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure [J]. Eur Heart J, 2012, 33(9):1058-1066
- 15 Brandt MC, Mahfoud F, Reda S, *et al.* Renal sympathetic denervation reduces left ventricular hypertrophy and improves cardiac function in patients with resistant hypertension [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59:901-909
- 16 Wang X, Zhao Q, Huang H, *et al.* Effect of renal sympathetic de-

vation on atrial substrate remodeling in ambulatory canines with prolonged atrial pacing[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64611

- 17 Clayton SC, Haack KKV, Zucker IH. Renal denervation modulates angiotensin receptor expression in the renal cortex of rabbits with chronic heart failure[J]. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2011, 300(1): 31-39
- 18 Hu J, Ji M, Niu C, *et al.* Effects of renal sympathetic denervation on post-myocardial infarction cardiac remodeling in rats [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45986
- 19 Fajardo J, Lopez-Novoa JM. Effect of chemical sympathectomy on renal hydroelectrolytic handling in dogs with chronic caval constriction [J]. Clin Physiol Biochem, 1986, 4:252-256
- 20 Davidson EN, Vitters EL, Mooren FM, *et al.* Connective tissue growth factor/CCN2 overexpression in mouse synovial lining results in transient fibrosis and cartilage damage[J]. Arthritis & Rheumatism, 2006, 54(5): 1653-1661

(收稿日期:2015-05-24)

(修回日期:2015-06-17)