

强心胶囊对慢性心力衰竭大鼠心肌基质金属蛋白酶 MMP-1、MMP-9 蛋白表达的影响*

□陈 晶** 周景华 (黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)
曹洪欣 (中国中医科学院 北京 100700)

摘 要: 目的: 研究强心胶囊对慢性心力衰竭 (CHF) 大鼠心功能和心肌基质金属蛋白酶 MMP-1、MMP-9 蛋白表达的影响, 探讨 MMPs 在 CHF 发病中的作用及该胶囊防治心肌重塑的作用的机理。方法: 采用腹腔注射阿霉素法制备 CHF 模型。各组相应处理 8 周后, 检测血流动力学、心肌 MMP-1、MMP-9 表达变化。结果: 强心胶囊能提高 CHF 大鼠 $+dp/dt \max$ 、 $-dp/dt \max$ 、LVSP 水平, 降低 LVEDP 水平, 减低心脏重量指数, 降低上调的 MMP-1、MMP-9 表达。结论: 强心胶囊能够改善 CHF 大鼠左室收缩和舒张功能, 降低上调的 MMP-1、MMP-9 蛋白表达及活性, 可能是强心胶囊干预心力衰竭间质重塑的重要机制之一。

关键词: 强心胶囊 慢性心力衰竭 基质金属蛋白酶 心肌重构

一、前 言

慢性心力衰竭 (CHF) 是许多心血管疾病最终的病理转归, 病情呈进行性发展, 且发病率仍在显著持续增加^[1], 与房颤共同成为 21 世纪困扰人类健康的两大顽疾^[2]。最新研究证实心肌 (室) 重塑 (构) 是慢性心力衰竭发生发展的基本机制。

心肌重塑为一系列复杂的分子和细胞机制导致的心肌结构、功能和表型的变化, 包括心肌细胞肥大凋亡, 胚胎基因和蛋白的再表达, 心肌细胞外基质 (ECM) 量和组成的变化。基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一族对细胞外基质成分有特异性降解作

用的锌依赖性蛋白水解酶, 通过影响 ECM 的降解而在心衰发生发展中起重要作用^[3-4]。强心胶囊是基于大量的临床实践、针对慢性心力衰竭的病机的特点而研制纯中药复方制剂, 临床治疗 CHF 收到较好疗效。前期实验研究工作已证明强心胶囊具有降低细胞因子水平, 抑制心肌细胞 凋亡等作用。本实验试图进一步研究强心胶囊对大鼠基质金属蛋白酶蛋白表达的影响, 揭示其防治 CHF 心肌间质重构的可能作用机制。

一、材料与方法

1. 药物及试剂

强心胶囊由炮附子、红人参、黄芪、云茯苓、焦白术、白芍、葶苈子等组成 (由黑龙江中医药大学实验

收稿日期: 2007-12-18

修回日期: 2008-03-10

* 黑龙江省科技厅科技攻关项目 (GC02C123); 强心胶囊治疗充血性心力衰竭的基础研究, 负责人: 陈晶。

** 联系人: 陈晶, 教授, 医学博士, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 中医药治疗慢性心功能不全的基础与临床研究, Tel: 0451-82193498, E-mail: chenjing6385@yahoo.com.cn。

中心制备)。规格:0.4g/粒。卡托普利、参附注射液、灭菌注射用水均为市售品。MMP-1、MMP-9 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。盐酸阿霉素购自深圳万乐药业有限公司。

2. 实验分组及给药

Wistar 雄性大鼠 108 只,体重 230~260g,随机分为正常对照组、模型组、强心胶囊低、中、高剂量组、西药对照组和中药对照组。除正常对照组为 12 只大鼠外,余组数量相同。

参考文献^[5]方法,将盐酸阿霉素用灭菌注射用水 5mL 使之溶解,再加置 0.9% 生理盐水中至 12.5mL,配成浓度为 0.8mg/mL 的阿霉素溶液(避光)。除正常对照组外,其余各组大鼠分别于第 1、3、5 周腹腔注射阿霉素溶液 3mg/kg 体重,于第 2、4、6 周腹腔注射阿霉素溶液 2mg/kg 体重,每周一次,共注射六次。正常对照组同时腹腔注射等容积的生理盐水。

在第 5 周腹腔注射阿霉素后,开始灌胃给药,强心胶囊低、中、高剂量组分别给予 0.66、1.32 和 2.64g/kg·d⁻¹ 强心胶囊混悬液;西药对照组给予 2.31mg/kg·d⁻¹ 卡托普利悬液;正常对照组和模型组给予同体积生理盐水灌胃;中药对照组腹腔注射 1.84mL/kg·d⁻¹ 参附注射液。强心胶囊三个剂量组、西药对照组、正常对照组和模型组灌胃给药或给水的同时,腹腔注射 1.8mL/kg·d⁻¹ 注射用生理盐水,中药对照组在腹腔注射参附注射液的同时,口服给予 1mL/100g 体重生理盐水,各组连续给药四周。

3. 取材与指标检测

末次给药 24 小时后,麻醉大鼠,采用右侧颈总动脉插管,利用 MedLab 6.2 生物信号采集处理系统检测大鼠血流动力学的变化,然后采血,处死大鼠,心脏称重,计算心脏重量指数(心脏湿重/体重),切取心室肌组织置于 4% 多聚甲醛液中,固定、常规

石蜡包埋,S-P 免疫组化检测,并运用彩色病理图像分析系统分析。每组随机选取 10 个视野,利用显微摄像系统在 200X 下输入计算机,通过灰度调节分析阳性目标总面积与统计场总面积比值,取平均值进行统计分析。

4. 统计方法

计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示,SPSS11.5 软件包处理数据,组间比较用方差分析。

二、结 果

1. 对 CHF 大鼠心功能的影响(见表 1)

表 1 结果表明,模型组与正常对照组比较,各项指标均存在较为显著的差异,+dp/dt max、-dp/dt max 和 LVSP 明显降低,LVEDP 显著升高,强心胶囊高剂量能显著提高 CHF 大鼠 +dp/dt max、-dp/dt max 和 LVSP 水平;降低 LVEDP 水平,提示本胶囊能够改善 CHF 大鼠左室收缩和舒张功能。

2. 强心胶囊对 CHF 大鼠心脏重量指数和 MMP-1、MMP-9 蛋白表达的影响(见表 2)

表 2 结果表明,CHF 大鼠心脏重量指数明显增加,强心胶囊和卡托普利均能显著降低 CHF 大鼠心脏重量指数,以强心胶囊高剂量效果最为显著的。免疫组化结果显示,正常心肌组织 MMP-1、MMP-9 蛋白未见明显阳性表达,CHF 大鼠心肌组织 MMP-1、MMP-9 蛋白表达多。图像分析结果也显示蛋白

表 1 强心胶囊对 CHF 大鼠心功能的影响 ($\bar{X} \pm S$ n=8)

组别	LVEDP (mmHg)	LVSP (mmHg)	+dp/dtmax (mmHg/s)	-dp/dtmax (mmHg/s)	HR (次/分)
正常对照	6.92±1.85**	139.62±24.62**	6861.4±1449.0**	6077.7±1305.3**	383.49±44.00**
模型	19.08±5.81	99.61±17.38	4497.3±1526.4	3879.4±795.9	433.02±28.77
中对组	13.21±3.58*	112.56±13.78*	5941.4±947.1*	5006.3±1017.8*	396.85±26.92*
西对组	12.52±4.46*	125.38±26.72*	6248.8±1211.1*	5316.3±1387.5*	401.62±30.38*
低剂量	15.70±2.04	109.68±15.46	5248.6±834.0	4638.0±1204.1	411.67±32.53
中剂量	13.95±3.74*	117.23±16.49*	5927.7±1203.6*	5124.3±1082.5*	404.04±29.57*
高剂量	11.90±2.59**	120.05±20.85*	6164.1±1440.8*	5567.0±1062.8**	392.04±24.51**

注: LVEDP:左室舒张末期压; LVSP:左室内压峰值; HR:心率; +dp/dtmax:心室内压上升最大速率; -dp/dtmax:心室内压下降最大速率;与模型比较: *P<0.05, **P<0.01

含量明显升高,与正常对照组相比,差异显著 ($p < 0.01$);表明 ADR 诱导慢性心力衰竭大鼠心肌 MMP-1、MMP-9 蛋白表达增强。经治疗后,各组心肌 MMP-1、MMP-9 蛋白表达均下调,其中强心胶囊中、高剂量组降低 MMP-1 效果显著与卡托普利组相当,强心胶囊高剂量降低 MMP-9 效果显著 ($p < 0.01$)。

三、讨 论

ECM 是存在于细胞之间的动态的网络结构,由胶原、蛋白聚糖、糖蛋白、糖胺多糖及弹力纤维等物质构成,对维持心肌细胞排列,协调心肌收缩性及维持左心室几何形状起着重要的作用。心肌重构不仅表现为心肌细胞的凋亡、坏死和肥大,ECM 成分合成或降解代谢失衡也是引起 CHF 左心室扩大及心肌重构的重要方面^[6]。心衰时,ECM 的变化可表现为纤维胶原的过度沉积或不适当降解。对细胞外基质成分有特异性降解作用的基质金属蛋白酶 (MMPs) 通过影响 ECM 的降解而在心衰发生发展中起重要作用^[3-4]。大多数 MMPs 在正常成人组织中低水平地表达,以无活性的酶原形式存在,病理的情况下,潜在型的 MMPs 被激活,表达上调。

King MK^[7]研究发现在心脏快速起搏所致心衰模型中,伴随着左室扩大和功能下降,心肌 MMP 水平升高呈时间依赖性。许多国外学者^[8-9]在大鼠的高血压心衰模型中观察到心肌内 MMP2、MMP9、MMP1 含

量及活性较正常大鼠明显增高。MMPs 活性的升高导致正常的纤维胶原降解增加及进行性心室扩张。调解 MMPs 的活性为限制心肌间质重构和预防心衰提供了一个重要治疗手段^[10]。

目前已发现的 MMPs 家族成员有 20 多种,在心脏中表达的有 MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9。I、III 型胶原是心肌间质主要组成成分,I 型胶原组成的粗纤维束构成了网络支架,III 型胶原则形成较细的纤维网状结构。而 MMP-1 具有降解 I、II、III 型胶原的作用,MMP-9 主要水解明胶、变性胶原和 IV 型胶原,但近来研究则表明其能持续降解间质的纤维类胶原,从而在细胞外基质胶原重塑过程中发挥重要作用。

阿霉素所致慢性心功能不全模型是目前实验研究最常选用的动物模型之一。本实验结果表明,阿霉素能造成心肌收缩和舒张功能减退,使心肌肥厚、心脏重量指数增加。病理形态学显示模型组心肌细胞胞浆可见颗粒变性和散在的空泡变性,心肌纤维肿胀、断裂、轮廓不清,受累较重组的心肌纤维肥厚,肌原纤维溶解消失,呈小灶状坏死,部分纤维灶性增生,均符合心力衰竭心肌重塑的病理改变。同时心力衰竭大鼠心肌基质金属蛋白酶蛋白表达较正常对照组显著增加,药物治疗后,其表达不同程度下降。由此提示,伴随心力衰竭发生基质金属蛋白酶表达增加,活性升高。这与国外学者^[8-9]报道相一致。

强心胶囊是根据温阳化饮益气活血法而组方,是我们经大量临床实践而拟定的。方中首选辛热之制附子补火温肾,助阳通脉,重在温补真阳,以图其本,臣以红人参、黄芪补脾肺之气,佐以甘淡渗利之茯苓,健脾渗湿,以利水邪;白术甘温补中,健脾燥湿,以扶脾之运化,茯苓白术相须为用,一健一渗,脾土健运,小便通利,水湿得除。葶苈子辛开苦降,开肺利窍,下气行水,上三味药与附子合用,温肾阳使水有所主,健脾土使水有所制,治水之中有利水之用,既可化已停之水饮,又可杜其生成之源,而使水饮之邪速去,从而易于阳气的恢复。佐以丹参、三七、元胡,疏通心脉,活血化瘀,白芍活血脉,利小

表 2 强心胶囊对 CHF 大鼠心脏重量指数、MMP-1、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{X} \pm s$)

组别	n	心脏重量指数 (mg/g)	MMP-1	MMP-9
正常对照	11	2.71±0.52**	0.078±0.018**	0.058±0.017**
模型	9	4.36±0.92	0.208±0.067	0.153±0.051
中对照组	10	3.33±0.72*	0.151±0.044*	0.113±0.041
西对照组	11	3.23±0.88*	0.131±0.047**	0.096±0.038*
低剂量	9	3.66±0.53	0.171±0.047	0.122±0.042
中剂量	10	3.35±0.67*	0.129±0.048**	0.098±0.033*
高剂量	12	3.03±0.69**	0.091±0.024**	0.077±0.022**

注:与模型比较;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

便,又可敛阴和营,制约附子刚燥之性。全方选药精当,配伍严谨,诸药合用,共奏温阳化饮益气活血之功,临床治疗 CHF 收到较好疗效。既往研究证实,本方通过拮抗肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的激活抑制心肌重塑。本研究进一步发现强心胶囊还能明显降低 CHF 大鼠基质金属蛋白酶蛋白表达,阻止胶原降解及基质改建,有效调控细胞外基质代谢,并提高衰竭心脏的射血功能,提示对 MMPs 表达及活性的影响可能是强心胶囊干预心力衰竭间质重塑的重要机制之一。

参考文献

- 1 张玉英.心力衰竭的流行病学及诊治现状.中国循环杂志,2004,19(1):74~76.
- 2 陈国伟.充血性心力衰竭研究的若干进展.现代实用医学,2002,14(1):1~3.
- 3 Sackner-Bernstein JD. The myocardial matrix and the development and progression of ventricular remodeling. Curr Cardiol Rep, 2000, 2(2): 112~119.
- 4 Lee RT, Lammerding J. Signaling pathways that influence extracellular remodeling. J Card Fail, 2002, 8 (6): 339~343.
- 5 徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验方法学,第3版.人民卫生出版社,2003,9.
- 6 陈晓锋,顾振纶等.基质金属蛋白酶在心衰中作用的研究进展.中国药理学通报,2004,20(2): 137~140.
- 7 King MK, Coker ML, Gold berg A, *et al.* selective matrix metal-lo-proteinase inhibition with developing heart failure: effects on left ventricular function and structure. Circ Res, 2003, 92(2): 177~185.
- 8 Peterson JT, Hallak H, Johnson L, *et al.* matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. Circulation, 2002, 103 (6): 2304 ~ 2309.
- 9 Nishikawa N, Yamamoto K, Sakata Y, *et al.* Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. Cardiovasc Res, 2003, 57(3): 766~774.
- 10 杨志宏.心室重构及心衰时基质金属蛋白酶的活性变化.国外医学.生理.病理科学与临床分册,2002,22(5): 522~524.

Effects of Qiangxin Capsule on MMP-1 and MMP-9 Expression of Matrix Metalloproteinase in Rat with Congestive Heart Failure

Jing Chen, Zou Jinghua

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Hongxin Cao

(China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

We studied the effects of Qiangxin Capsule on MMP-1 and MMP-9 expression of matrix metalloproteinase in rats with congestive heart failure, in a move to understand the role of MMPs in CHF, and therapeutic effects of Qiangxin Capsule in remodeling interstitial tissue of cardiac. In the study, we established a rat model intraperitoneally injected with doxorubicin (ADM). Haemo-dynamics, MMP-1, and MMP-9 were measured 8 weeks after the injection. Results indicate that the Qiangxin Capsule has enhanced the level of +dp/dt max, -dp/dt max, and LVSP of CHF rat, with a reduced LVEDP level. Heart weight index has also gone down with declined MMP-1 and MMP-9 expressions and activities. Obviously, the Qiangxin Capsule reduces MMP-1 and MMP-9 expressions and activities, which makes an important mechanism allowing the Qiangxin Capsule to interfere in cardiac failure related interstitial remodeling.

Keywords: Qiangxin Capsule, congestive heart failure, MMPs myocardial remodeling

(责任编辑:王 瑀,责任译审:邹春申)