

辛伐他汀对一氧化氮缺乏性高血压大鼠心肌纤维化的作用¹

易春涛,程晓曙,俞建华,鄢定红,苏海,吴清华

(江西医学院第二附属医院心内科,南昌 330006)

摘要 **目的:**观察辛伐他汀对一氧化氮(NO)缺乏性高血压大鼠心肌纤维化的作用。**方法:**24只WKY大鼠随机分为正常对照组(C组)、硝基精氨酸甲酯(L-NAME)组(L组)和L-NAME+辛伐他汀组(L+S组),8wk后测定大鼠血清和心肌组织血管紧张素II(Ang II)、血管紧张素转换酶(ACE)活性和心肌组织羟脯氨酸浓度,并取大鼠左心室心肌横截面组织作病理形态检测和计算机图象分析。**结果:**L组大鼠血浆ACE活性与C组相比明显降低($P<0.01$),心肌ACE活性则较C组明显增高($P<0.01$),辛伐他汀干预后血浆ACE活性升高,但与L组无显著差异($P>0.05$),心肌ACE活性则比L组有明显降低($P<0.05$);各实验组大鼠血浆Ang II水平与C组比较未显示统计学差异($P>0.05$);L组心肌组织Ang II水平与C组比较显著增加($P<0.01$),L+S组心肌组织Ang II水平则较L组明显降低($P<0.05$);此外,L组心肌羟脯氨酸浓度和左心室胶原容积分数(CVF)和心肌内血管周围胶原面积(PVCA)均比C组明显增高($P<0.01$),L+S组羟脯氨酸浓度和CVF、PVCA值则均较L组明显降低($P<0.05$)。**结论:**辛伐他汀可能通过降低局部心肌组织ACE活性减少Ang II生成,减轻心肌纤维化。

关键词 辛伐他汀;心肌纤维化;血管紧张素II;血管紧张素转换酶;高血压

中图分类号: R971; R965

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2002)04-0306-05

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是高血压左室重构的主要表现之一^[1],形态上主要表现为胶原沉积增多,各型胶原比例失调(I/II型比例增加)和

排列紊乱,大量研究证实,MF与高血压性左室肥厚引起的心功能障碍密切相关^[2],并且是临床上心力衰竭、心律失常和心源性猝死发生的重要病理基础。他汀类药物通过阻断甲羟戊酸合成而抑制胆固醇的生成,具有良好的调脂作用,同时近期的研究表明,他汀类药物还具有包括改善内皮细胞功能、减轻炎症、稳定斑块等作用在内的非调脂作用^[3]。但他汀类药物对一氧化氮(NO)缺乏性高血压大鼠模型MF的研究尚未见报道,本实验旨在用辛伐他汀干预NO缺乏性高血压大鼠,观察辛伐他汀对心肌纤维化的作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 24只成年雄性Wistar-Kyoto大鼠[购自江西医学院实验动物中心,合格证号:赣(动)-96021],起始体重在250~300g,每笼喂养1只。大鼠给予各12h光照/黑暗循环,自由饮水和标准实验室饮食。经2wk适应环境后,随机分为3组($n=8$):(1)正常对照组(C组):常规饮食饮水,夜间喂食前管饲法喂给2ml 5%葡萄糖溶液;(2)L-NAME组(L组):夜间喂养前经管饲法喂入溶于2ml 5%葡萄糖溶液中的L-NAME($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),其余同C组;(3)L-NAME+辛伐他汀组(L+S组):在2ml 5%葡萄糖溶液中另加入辛伐他汀 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,其余同L组。8wk后处死大鼠,采集大鼠血样和心脏。

1.2 生化指标测定

1.2.1 血清及心肌ACE活性测定 马尿酸甘氨酸甘氨酸在血管紧张素I转化酶(ACE)的作用下水解成马尿酸及甘氨酸甘氨酸。用乙酸乙酯提取马尿酸,溶于氯化钠中,采用紫外分光法($\lambda=228$)测定马尿酸量,从而间接测定血清及心肌中ACE活性。

1.2.2 血浆及心肌Ang II测定 将500 μl 大鼠新鲜血液和10%组织匀浆200 μl 加入200 μl 生理盐水、100 μl ^{125}I 标记Ang II和100 μl 抗血清,混匀、离心后吸取上清液,采用放射免疫法对样品放射比活度得出样品浓度。

1.3 羟脯氨酸浓度测定 羟脯氨酸在氧化剂作用

2002-04-23收稿 2002-05-16修回

1 本课题为江西省自然科学基金资助项目(No0100458)

易春涛,联系作者,男,硕士,副主任医师,现在江西宜春市人民医院心内科(336000)。

Tel: 13006262638 Email: yict@163.com

程晓曙,男,博士,教授,硕士生导师,主要从事临床心血管病的研究。

下所产生的氧化产物与二甲氨基甲醛作用呈现紫红色,根据其显色深浅推算出含量。按操作方法将2%组织匀浆液混匀、水浴、离心后吸取上清液在550 nm、1 cm 处光径测各管吸光度,并根据空白管、标准管、样品管吸光度和标准品浓度计算羟脯氨酸浓度值。

1.4 病理形态学分析

1.4.1 心肌胶原形态学分析 取大鼠左室中段横截面心肌组织,按常规固定、包埋,石蜡组织块3~5 μm 连续切片,切片常规脱蜡,进行常规HE染色和VG纤维染色。VG染色镜下可见胶原纤维呈红色,细胞核呈靛兰色。

1.4.2 心肌胶原定量分析 采用计算机图像分析仪测定左心室心肌切片(内膜和外膜)的心肌胶原容积分数(CVF)和心肌内血管周围胶原面积(PVCA),随机分析5个视野,通过灰度调节来区别胶原和非胶原成分,计算方法:CVF=胶原面积/所测视野面积, PVCA=心肌内小动脉管腔周围胶原面积/小动脉管腔面积,两者均取其均值。

1.5 数据处理和统计 各组结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据方差齐时采用方差分析和 q 检验;方差不齐时采用秩和分析统计。组间比较 $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异具有极显著性。

2 结果

2.1 各组血液及心肌生化指标检测

2.1.1 各组大鼠血清及心肌ACE活性 L组大鼠血清中ACE活性较C组明显降低(24.4 ± 4.3 vs 42.2 ± 7.2 U \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$ pro, $P < 0.01$), L+S组大鼠血清ACE活性较L组升高,但两组间无显著差异($P > 0.05$) (图1); L组大鼠心肌ACE活性较C组明显增高(16.5 ± 2.3 vs 6.3 ± 1.8 U \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$ pro, $P < 0.01$), L+S组大鼠心肌ACE活性则比L组明显降低(9.4 ± 2.6 U \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$ pro, $P < 0.05$) (图2)。

2.1.2 各组血浆及心肌Ang II水平 与C组比较, L组和L+S组大鼠血浆Ang II水平均未见明显升高,分别为(C组: 120.6 ± 56.6 ng \cdot L $^{-1}$, L组: 142.1 ± 67.4 ng \cdot L $^{-1}$ 和L+S组: 111.4 ± 64.7 ng \cdot L $^{-1}$, $P > 0.05$) (图3);但L组心肌Ang II水平较C组显著升高(120.6 ± 23.7 vs 40.2 ± 11.3 ng \cdot L $^{-1}$, $P < 0.01$), L+S组心肌Ang II水平则比L组显著降低(94.6 ± 18.5 ng \cdot L $^{-1}$, $P < 0.05$) (图4)。

2.2 羟脯氨酸浓度 羟脯氨酸在胶原蛋白中所占比例比较恒定,所以心肌内的羟脯氨酸浓度可代表

胶原水平,即MF的程度。L组大鼠心肌羟脯氨酸浓度较C组明显升高(0.96 ± 0.19 vs 0.52 ± 0.10 mg \cdot g $^{-1}$ pro, $P < 0.01$), L+S组心肌羟脯氨酸浓度则比L组显著下降(0.63 ± 0.17 vs 0.96 ± 0.19 mg \cdot g $^{-1}$ pro, $P < 0.05$) (图5)。

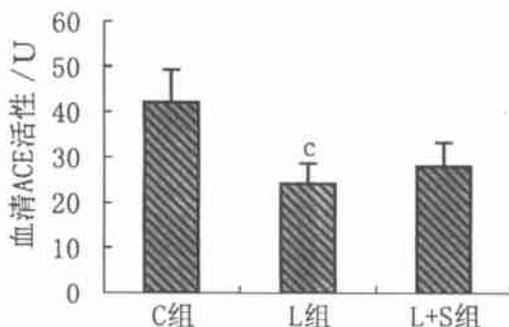


图1 大鼠饲服常水(C组)、硝基精氨酸甲酯(L组)和饲服硝基精氨酸甲酯+辛伐他汀(L+S组)8 wk后血清ACE活性($n=8$)

L组大鼠血清ACE活性与C组比较 $P < 0.01$;各实验组大鼠间血清ACE活性差异无显著性。

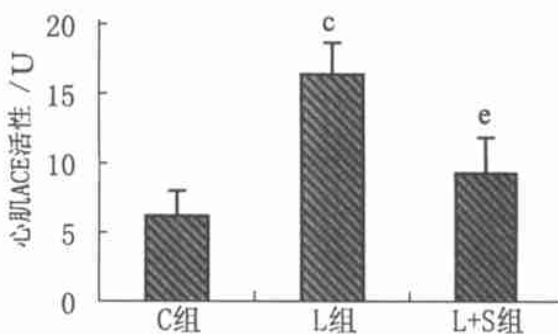


图2 大鼠饲服常水(C组)、硝基精氨酸甲酯(L组)和饲服硝基精氨酸甲酯+辛伐他汀(L+S组)8 wk后血清ACE活性($n=8$)

L组大鼠血清ACE活性与C组比较 $P < 0.01$; L+S组大鼠心肌ACE活性与L组对比, $P < 0.05$ 。

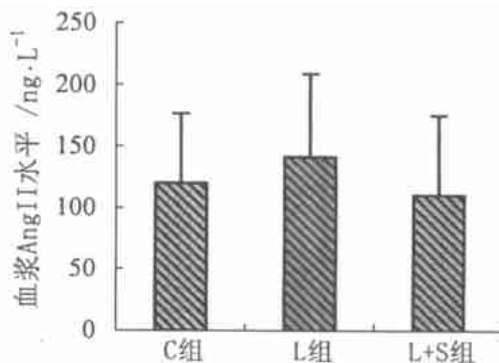


图3 大鼠饲服常水(C组)、硝基精氨酸甲酯(L组)和饲服硝基精氨酸甲酯+辛伐他汀(L+S组)8 wk后血浆Ang II水平($n=8$)

各实验组大鼠间血浆Ang II水平差异无显著性。

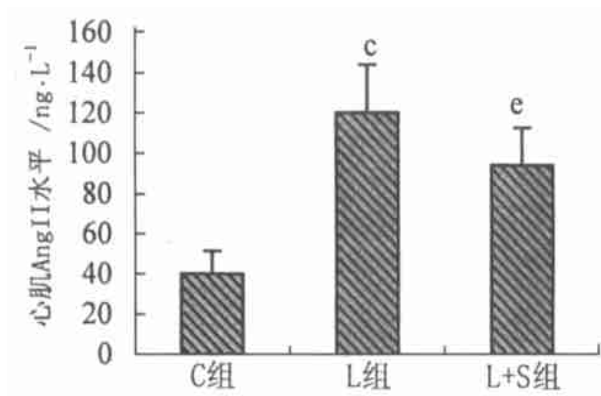


图4 大鼠饲服常水(C组)、硝基精氨酸甲酯(L组)和饲服硝基精氨酸甲酯+辛伐他汀(L+S组)8 wk后心肌AngII水平($n=8$)
L组大鼠心肌AngII水平与C组比较 $P<0.01$; L+S组大鼠心肌AngII水平与L组比较 $P<0.05$ 。

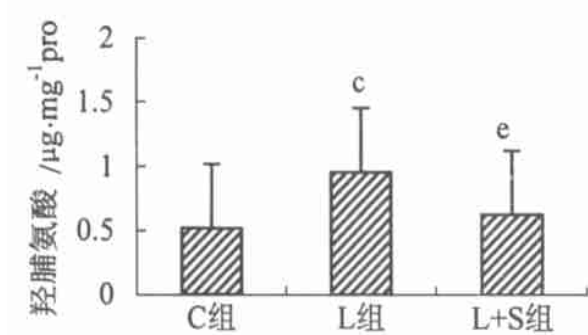


图5 大鼠饲服常水(C组)、硝基精氨酸甲酯(L组)和饲服硝基精氨酸甲酯+辛伐他汀(L+S组)8 wk后心肌羟脯氨酸浓度($n=8$)
L组大鼠心肌羟脯氨酸浓度与C组比较 $P<0.01$; L+S组大鼠心肌羟脯氨酸浓度与L组比较 $P<0.05$ 。

2.3 病理形态分析

2.3.1 胶原形态定性分析 与C组大鼠相比,8周后L组大鼠出现明显的心肌纤维化。HE染色下见心肌组织内细胞质、胞核着色,形态正常,但细胞排列疏松;同时VG染色见左心室心肌间质纤维胶原明显增多、增粗,胶原明显积聚;心肌内小动脉管壁肥厚,周围有大量胶原堆积,并可见胶原伸入心肌间质。辛伐他汀干预后,大鼠左心室心内膜、心外膜及心肌小动脉周围的胶原均明显减少。

2.3.2 胶原形态定量分析 L组大鼠心肌CVF和PVCA显著高于C组[CVF(%): 3.6 ± 0.4 vs 2.0 ± 0.2 , $P<0.01$; PVCA(%): 1.8 ± 0.4 vs 0.6 ± 0.2 , $P<0.01$]; L+S组CVF和PVCA均比L组显著下降[CVF(%): 2.5 ± 0.2 , $P<0.05$, PVCA(%): 0.9 ± 0.3 , $P<0.05$]; (见图6, 图7)。

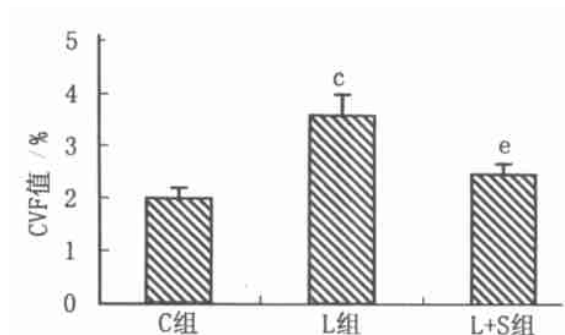


图6 大鼠饲服常水(C组)、硝基精氨酸甲酯(L组)和饲服硝基精氨酸甲酯+辛伐他汀(L+S组)8 wk PVCA值($n=8$)
L组大鼠CVF值与C组比较 $P<0.01$; L+S组大鼠CVF值与L组比较 $P<0.05$ 。

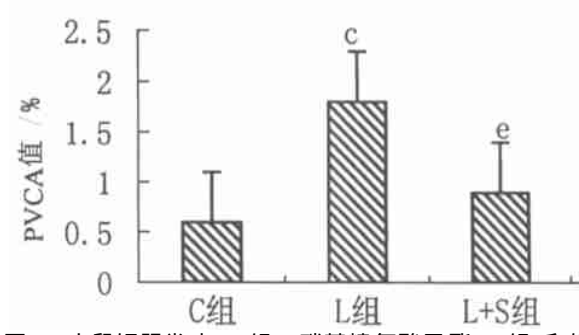


图7 大鼠饲服常水(C组)、硝基精氨酸甲酯(L组)和饲服硝基精氨酸甲酯+辛伐他汀(L+S组)8 wk后PVCA值($n=8$)
L组大鼠PVCA值与C组比较 $P<0.01$; L+S组大鼠PVCA值与L组比较 $P<0.05$ 。

3 讨论

他汀类药物为胆固醇合成限速酶3-羟基-3-甲基戊酸辅酶A(HMG-CoA)还原酶的抑制剂,其作用机理是抑制体内胆固醇合成限速酶向甲羟戊酸转化,减少肝细胞内胆固醇的生成,从而限制胆固醇的生成。由于甲羟戊酸等异戊二烯类物质还参与了蛋白质的脂质修饰、细胞内DNA合成等许多胆固醇合成以外的生物学作用,因而他汀还具有广泛的非调脂作用。其中他汀减少高血压负荷下心肌AngII生成、抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡、抗纤维化作用^[4]可能对MF有重要影响。本研究发现,8周辛伐他汀的干预明显减轻NO缺乏性高血压大鼠心肌间质及小动脉周围纤维化,并明显减少CVF和PVCA,抑制包括细胞外膜、内膜和外周小动脉等心肌间质在内的心肌纤维化。

高血压引起的主要心脏病理改变是左室肥厚和MF。业已证实,在影响MF的诸多因素中,RAS激活、AngII水平增高是导致MF的主要原因^[5],RAS

不仅作为循环内分泌系统参与血压调节,而且以局部 RAS 的形式存在于心、脑、肾等组织,在肥厚及纤维化的心肌中,肾素、血管紧张素原、血管紧张素转换酶、Ang II-1 型受体 mRNA 表达均增加,提示心脏局部 RAS 参与心肌肥厚和纤维化的发生^[6]。Unger 等^[7]的研究发现,虽然自发性高血压大鼠(SHR)的血浆 RAS 活性不高,但 SHR 心肌组织中 RAS 活性升高,对 RAS 敏感性增加,提示在 SHR 中局部 RAS 也可能直接发挥作用。本研究未发现 NO 缺乏性高血压大鼠血浆 Ang II 水平增加,这与相关文献报道结果类似。但已有研究^[8]证实,在 L-NAME 诱导的 NO 缺乏性高血压大鼠中, L-NAME 可增加大鼠心肌局部 ACE 活性和 Ang II 含量,并通过上调 AT1 受体的表达和增强受体后信号传导^[9]来增强 RAS 的作用。我们以前的研究^[10]也发现在本型高血压大鼠模型中,存在心肌局部 ACE 活性和 Ang II 水平的增高,因而在 NO 缺乏性高血压大鼠模型中心脏局部 RAS 的作用也是增强的。有证据^[11]表明心脏组织局部的 RAS 起着比循环中 RAS 更重要的作用,并且在心肌纤维化中发挥重要的作用。

本研究结果表明辛伐他汀的干预可降低心肌局部 ACE 活性,使 Ang II 生成减少, MF 程度减轻。辛伐他汀对 MF 的作用机制目前尚不清楚,但 ACE 可能是其中最重要的一个环节。人和许多其他哺乳动物的心脏内存在包括抑糜素敏感性血管紧张素生成酶在内的多条生成 Ang II 的途径,其中主要为 ACE 途径和促胃胰酶途径,最近的实验也显示在活体动物中,心脏内生成 Ang II 的途径仍以 ACE 途径为主^[12]。ACE 是 Ang II 生成的限速因素, ACE 活性决定 Ang II 生成量,而 Ang II 水平是导致 MF 的主要原因之一。以往研究证实,在 MF 的发生机制中, RAS 尤其是局部 RAS 起着重要的作用,而且 RAS 中起主要作用的活性介质是 Ang II^[2]。辛伐他汀可能主要通过抑制 ACE 活性的抑制而减少 Ang II 生成,阻滞 RAS 作用,减轻心肌纤维化。Mitani 等^[13]也发现他汀能显著降低主动脉狭窄兔高血压模型中组织 ACE 活性,同时还能减少高脂血症患者血小板 AT1 受体表达的增殖,抑制 Ang II 或血小板衍生生长因子(PDGF)与受体作用后信号传导。

此外, Takewakis 等^[14]的研究还表明心肌肥厚和 MF 的分子机制中包括 Na^+/K^+ 交换和其基因表达,有证据表明他汀能抑制 Na^+/K^+ 的交换,辛伐他汀可能还通过抑制 Na^+/K^+ 交换途径而影响心肌肥厚及 MF 过程。

参考文献

- 1 Takewakis S, Kuro-o M, Hiroi Y, *et al.* Activation of Na^+-H^+ antiporter (NHE-1) gene expression during growth hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995; 27: 729-42
- 2 Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis functional significance and regulatory factors[J]. Cardiovasc Res, 1993; 27: 341-7
- 3 Davignon J, Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins[J]. Curr Opin Lipidol, 1999; 10: 543
- 4 Oi S, Haneda J, Osaki J, *et al.* Lovastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat heart cells[J]. Eur J pharmacol, 1999; 376: 139-46
- 5 Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis[J]. Cardiovasc Res, 2000; 47: 1-3
- 6 Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype[J]. Circ Res, 1993; 73: 413-8
- 7 Unger T, Ganten D, Lang RE, *et al.* Effect of converting enzyme inhibitors on tissue converting enzyme and angiotensin II: therapeutic implication[J]. Am J Cardiol, 1987; 59: 18D-22D
- 8 Kobayashi N, Hara K, Watanabe S, *et al.* Effect of imidapril on myocardial remodeling in L-NAME-induced hypertensive rats is associated with gene expression of NOS and ACE mRNA[J]. Am J Hypertens, 2000; 13: 199-207
- 9 Henion D, Dechaux Em, Dowell FJ, *et al.* Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclooxygenase-2[J]. Br J Pharmacol, 1997; 121: 83-90
- 10 易春涛,程晓曙,俞建华,等. 辛伐他汀对一氧化氮缺乏性高血压大鼠心脏局部肾素-血管紧张素系统的影响. 中国临床药理学与治疗学[J]. 2002; 7: 227-30
- 11 Ohta K, Kims S, Wanibuchi D, *et al.* Contribution of local renin-angiotensin system to cardiac hypertrophy, phenotypic modulation, and remodeling in TGR(mRen2) 27 transgenic rats[J]. Circulation, 1996; 94: 785-91
- 12 Chih- chang W, Meng QC, Palmer R, *et al.* Evidence for Angiotensin-converting enzyme- and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart *in vivo*[J]. Circulation, 1999; 99: 2583-9
- 13 Mitani H, Bandoh T, Ishikawa J, *et al.* Inhibitory effects of fluvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, on the increase in vascular ACE activity in cholesterol-fed rabbits[J]. Br J Pharmacol, 1996; 119: 1269-75
- 14 Takewakis S, Kuro-o M, Hiroi Y, *et al.* Activation of Na^+-H^+ antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995; 27: 729-42

Effects of simvastatin on myocardial fibrosis in NO-deficient hypertensive rats

YI Chun-Tao, CHENG Xiao-Shu, YU Jian-Hua, YAN Ding-Hong, SU Hai, WU Qing-Hua

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Jiangxi Medical College, Nanchang 33000)

ABSTRACT **AIM:** To investigate the effects of simvastatin on myocardial fibrosis in NO-deficient hypertensive rats. **METHODS:** Twenty-four male Wistar-Kyoto rats were divided into three groups: Control (C) group, L-NAME (L) group, and L-NAME plus Simvastatin (L+S) group. The levels of ACE and Ang II in plasma and myocardial tissue, and the contents of hydroxyproline concentration in myocardial tissue were measured after 8 weeks. The values of CVF, PVCA and the hydroxyproline concentration (HC) were studied using the methods of pathological examination combined with computed processing. **RESULTS:** The activity of ACE in serum in L group was lower than that in C group ($P < 0.01$). Simvastatin treatment did not significantly increase the activity of ACE compared with L group ($P > 0.05$). However, the activity of ACE in myocardial tissue was lower than

that of C group ($P < 0.05$). Although the levels of Ang II in plasma were not altered by L-NAME ($P > 0.05$), the concentrations of Ang II in myocardial tissue ($P < 0.01$) were significantly increased in L group compared to C group. Simvastatin significantly decreased the levels of Ang II in myocardial tissue ($P < 0.05$). The hydroxyproline concentration and the value of PVCA and CVF in L group were significantly higher than that in C group ($P < 0.01$), which were significantly attenuated by simvastatin treatment ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Simvastatin may decrease the production of Ang II and attenuate myocardial fibrosis via reducing the activity of ACE in NO-deficient hypertensive rats.

KEY WORDS simvastatin; angiotensin II; myocardial fibrosis; angiotensin-converting enzyme; hypertension; NOS inhibitor

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学主办, 安徽医科大学临床药理研究所编辑出版的全国性学术杂志。本刊主要刊登药理学研究论文, 辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊, 主要刊登药理学研究论文, 多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖, 被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊, 并被几乎所有国内检索期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。1997年曾名列美国《CA》收录的中国医药期刊第1名。

《中国药理学通报》为月刊, 大16开120页, 印刷质量高, 每期定价12.00元, 全年144.00元。邮发代号: 26-52, 请及时向当地邮局订阅, 漏订读者请直接汇款至我刊编辑部, 免收邮寄费。地址: 安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部, 邮编: 230032, 联系人: 武明静。电话: 0551-5161221; E-mail: huanghs@mail.hf.ah.cn