

抗纤益心方对扩张型心肌病心力衰竭大鼠心肌基质金属蛋白酶-1 及其抑制剂表达的影响

王振涛^{1*} 韩丽华¹ 柴松波¹ 杨凤鸣¹ 惠玲²

(1. 河南省中医院心血管病研究室, 河南省郑州市东风路 6 号, 450011; 2. 河南省南阳市中医院)

基金项目: 河南省高校新世纪优秀人才支持计划资助项目(2005HANCET-07)

* 通讯作者: wzht62@yahoo.com.cn, (0371)60908742

[摘要] 目的 观察抗纤益心方对扩张型心肌病心力衰竭大鼠心肌基质金属蛋白酶-1(MMP-1)及其抑制剂(TIMP-1)表达的影响。方法 将 100 只 Wistar 雄性大鼠随机分为正常组 10 只、模型组 90 只, 采用自主饮用呋喃唑酮水溶液建立动物模型。8 周后造模成功 70 只, 随机分为模型组、卡托普利组、抗纤益心方高剂量组、抗纤益心方低剂量组、中西药联用组, 每组 14 只, 每日分别灌胃生理盐水、卡托普利 10、125mg/kg、抗纤益心方 18、8g/kg、抗纤益心方 4、7g/kg、抗纤益心方高剂量和卡托普利混合溶液, 干预 8 周。每组大鼠随机选取 6 只进行免疫组化法染色, 检测心肌基质 MMP-1 及 TIMP-1 的表达。结果 与模型组比较, 中西药联用组、抗纤益心方高剂量组和卡托普利组均明显下调 MMP-1 表达($P < 0.05$), 上调 TIMP-1 表达($P < 0.05$); 抗纤益心方低剂量组能下调 MMP-1 表达($P < 0.05$), 但 TIMP-1 表达与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 抗纤益心方能够下调与心肌纤维化有关的 MMP-1 的表达, 并上调 TIMP-1 的表达, 可能是通过减轻扩张型心肌病心力衰竭大鼠心肌组织纤维化, 从而抑制心室重构的作用机制之一。

[关键词] 抗纤益心方; 扩张型心肌病; 心力衰竭; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制因子

Effect of Kangxian Yixin Formula on MMP-1 and TIMP-1 Expressions in Dilated Cardiomyopathy Heart Failure Rats

WANG Zhentao¹, HAN Lihua¹, CHAI Songbo¹, YANG Fengming¹, HUI Ling²

(1. Henan Provincial Hospital of TCM, Zhengzhou 450011; 2. Nanyang Municipal Hospital of TCM, Henan Province)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Kangxian Yixin Formula (Formula for relieving fibrosis and tonifying the heart) on the expression of myocardial matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). **Methods** One hundred Wistar male rats were randomized into normal group, 10 rats, and model group, 90 rats. The dilated cardiomyopathy models were established by raising with furazolidone solution for 8 weeks. Then 70 successfully made models were randomized into 5 groups, i. e. model group, captopril group, Kangxian Yixin Formula high-dose and low-dose groups, and integrated Chinese and western medicine group, with 14 in each. The models were given normal saline, captopril 10, 125mg/kg, Kangxian Yixin Formula 18, 8g/kg or 4, 7 g/kg, and the mixture of Kangxian Yixin Formula high-dose and captopril respectively as intervention for 8 weeks. Six rats of each group randomly selected were treated with immunohistochemical staining for measuring the expressions of MMP-1 and TIMP-1. **Results** Compared with the model group, the MMP-1 expression in the integrated Chinese and western medicine group, Kangxian Yixin Formula high-dose group, and captopril group was significantly down-regulated ($P < 0.05$), the TIMP-1 expression up-regulated ($P < 0.05$). MMP-1 expression in the Kangxian Yixin Formula low-dose group was down-regulated ($P < 0.05$), while its TIMP-1 expression was not different from that in the model group ($P > 0.05$). **Conclusion** Kangxian Yixin Formula could effectively down-regulating MMP-1 expression and up-regulating TIMP-1 expression. This may be one of its functional mechanisms in inhibiting the remodeling of ventricle of heart through relieving the myocardial fibrosis of dilated cardiomyopathy heart failure rats.

Key Words Kangxian Yixin Formula (Formula for relieving fibrosis and tonifying the heart); dilated cardiomyopathy; matrix metalloproteinase-1 (MMP-1); heart failure; tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1)

扩张型心肌病心力衰竭具有很高的病死率和致残率。心肌重塑是引起该病最终出现心力衰竭的重要机制, 而心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的改变又是心肌重塑的一个决定性方面。在正常机体组织, ECM 处于产生和降解的动态平衡中, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,

MMPs)是体内参与 ECM 降解最主要的酶系, 是心肌重塑的重要推动力量^[1]。研究表明, 心肌基质金属蛋白酶-1(MMP-1)的激活在心肌细胞外基质重构引起的进行性心肌重构中起重要作用^[2]。而心肌基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)为 MMP-1 的特异性抑制剂, 故 MMP-1 和 TIMP-1 之间的平衡对

维持心脏胶原代谢的稳定具有重要的意义^[3]。本研究采用自主饮用呋喃唑酮水溶液建立扩张型心肌病大鼠模型,观察抗纤益心方对大鼠心肌基质 MMP-1 及 TIMP-1 表达的影响,探讨其抑制心肌纤维化的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与药物

Wistar 雄性大鼠 100 只,SPF 级,体重(61.9±7.0)g,由郑州大学动物中心提供,合格证号:510116。清洁环境中饲养,室内温度在 25℃左右。

抗纤益心方干浸膏(药物组成:党参 30g,黄芪 30g,茯苓 15g,白术 15g,丹参 30g,川芎 12g,红花 12g,赤芍 12g,泽兰 15g,益母草 30g)由河南省中医院制剂室提供,每克干浸膏相当于生药 4g;呋喃唑酮片(福建省三明天泰制药有限公司生产,批号:20050204);卡托普利片(常州制药厂生产,批号:200502242);戊巴比妥钠[中国医药(集团)上海化学试剂公司生产,批号:F20021216]。

1.2 试剂与仪器

MMP-1 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,bs-0424R);TIMP-1 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,bs-0415R);兔两步法二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,PV-6001);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZLI-9032)。

JY-1001 型精密电子天平(上海民桥电子仪器有限公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司,型号 SM-2000R);光学显微镜(日本 Olympus 公司);摄影显微镜(德国 Leica 公司);Image-Pro Plus6.0(IPP)图像处理分析系统(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.3 模型制备、分组与给药

将 100 只大鼠采用随机数字表法分为模型组 90 只和正常组 10 只。造模方法参照文献^[4],模型组在饮水中加呋喃唑酮片(1kg 水加 700mg 呋喃唑酮片),呋喃唑酮水溶液每日更换 1 次,造模时间为 8 周。8 周后模型组共存活 70 只大鼠,将存活的模型组大鼠行超声心动图检查,与正常组大鼠比较,左心室腔扩大,室壁变薄,左心室射血分数<40%作为造模成功的标志,采用随机数字表将造模大鼠分为 5 组,分别为模型组、卡托普利组、抗纤益心方高剂量组、抗纤益心方低剂量组、中西药联用组,每组 14 只。正常组大鼠常规饲养,不进行药物干预。

造模 8 周后开始药物干预,在保证药物剂量的前提下,调整浓度使每组给药容积为 0.5ml/kg。模

型组每日灌胃与治疗组同等容积的生理盐水;卡托普利组每日灌胃卡托普利 10.125mg/kg;抗纤益心方低剂量组每日灌胃抗纤益心方 4.7g/kg;抗纤益心方高剂量组每日灌胃抗纤益心方 18.8g/kg;中西药联用组动物同时灌胃卡托普利及抗纤益心方高剂量。所有模型组大鼠同时饮用呋喃唑酮水溶液(1kg 水加 700mg 呋喃唑酮片),干预 8 周后处死。

1.4 心肌取材

动物麻醉后,迅速打开胸腔,取出心脏,滤纸吸干水分,剪去左、右心房及右心室,然后从心尖处沿冠状面切取心肌组织,放入 10%中性缓冲甲醛中固定,石蜡包埋,制备厚 4μm 组织切片。

1.5 MMP-1、TIMP-1 阳性表达平均光密度(OD)值的测定

采用免疫组化法染色组织切片,每组大鼠随机选取 6 只进行免疫组化法染色。光镜下,每只大鼠观察 6 张切片,每张切片在图像分析系统上随机选取相等的 5 个高倍视野(×400),测定 OD 值。平均光密度值越大,代表阳性染色越强,染色质含量越高。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行统计分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间比较符合正态分布采用单因素方差分析,不符合正态分布采用非参数检验。

2 结果

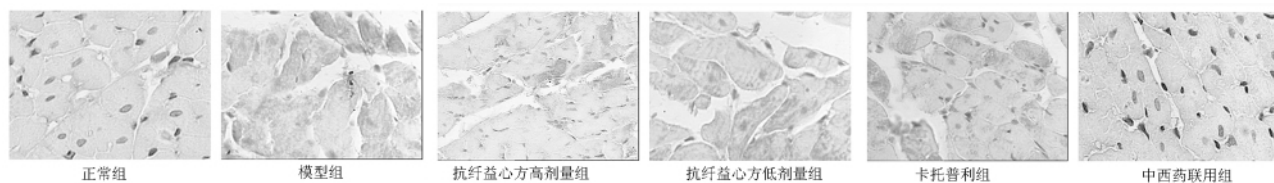
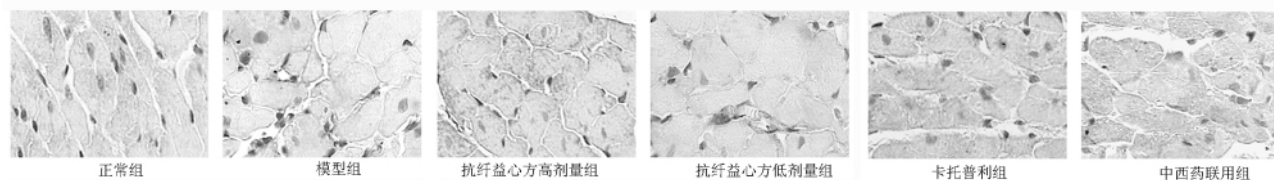
2.1 各组大鼠 MMP-1、TIMP-1 阳性表达的比较

图 1、图 2 示,各组大鼠 MMP-1 和 TIMP-1 的阳性染色呈棕黄色或棕褐色,阳性区域主要分布于心肌细胞和间质胞浆中,模型组 MMP-1 和 TIMP-1 阳性染色最重;正常组 MMP-1 和 TIMP-1 阳性染色最轻;而各药物组较正常组 MMP-1 和 TIMP-1 阳性染色加重,而较模型组 MMP-1 和 TIMP-1 阳性染色减轻。

2.2 各组大鼠 MMP-1、TIMP-1 的 OD 值比较

表 1 示,与模型组比较,中西药联用组、抗纤益心方高剂量组、抗纤益心方低剂量组和卡托普利组 MMP-1 阳性表达减少($P < 0.05$);各药物组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

与模型组比较,中西药联用组、抗纤益心方高剂量组和卡托普利组 TIMP-1 阳性表达增加($P < 0.05$);抗纤益心方低剂量组与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);各药物组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

图 1 各组大鼠 MMP-1 免疫组化染色比较($\times 400$)图 2 各组大鼠 TIMP-1 免疫组化染色比较($\times 400$)表 1 各组大鼠 MMP-1、TIMP-1 的 OD 值比较($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	MMP-1	TIMP-1
正常组	6	0.2530 $\pm$ 0.0244 Δ	0.6969 $\pm$ 0.0380 Δ
模型组	6	0.4523 $\pm$ 0.0242	0.4680 $\pm$ 0.0251
卡托普利组	6	0.2951 $\pm$ 0.0275* Δ	0.6167 $\pm$ 0.0327* Δ
抗纤益心方高剂量组	6	0.2956 $\pm$ 0.0234* Δ	0.6387 $\pm$ 0.0327* Δ
抗纤益心方低剂量组	6	0.3762 $\pm$ 0.0263* Δ	0.5210 $\pm$ 0.0554*
中西药联用组	6	0.2830 $\pm$ 0.0264 Δ	0.7152 $\pm$ 0.0365 Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

心室重构是扩张型心肌病发生、发展的基本病理环节,而 ECM 重构(间质成纤维细胞的增生及其合成的心肌胶原含量增加)是心室重构的重要组成部分。心肌细胞间质时刻处于一个动态的合成—降解过程中,一旦动态平衡被打破,胶原网络发生重建,必将加重心室重构^[5]。MMP-1 是一个含锌蛋白酶家族,能降解所有的细胞外基质成分。MMP-1 的激活将导致胶原变性、降解和合成新的纤维组织,作为胶原降解和结构改形第一步的胶原变性可能是过分暴露于基质金属蛋白酶的结果^[6]。因此,MMP-1 的激活在心肌细胞外基质重构引起的进行性心肌重构中起重要作用。TIMP-1 阻断 MMPs 与底物结合,从而抑制其溶解胶原和明胶的活性,延缓心室重构的发展^[2]。扩张型心肌病心肌中存在的 MMP/TIMP 平衡及活性的破坏,必然导致基质胶原代谢紊乱,ECM 积聚,心肌细胞滑移,最终导致心脏重构^[7]。

本研究测定实验扩张型心肌病心力衰竭大鼠 MMP-1 及 TIMP-1 阳性表达发现,抗纤益心方高剂量同卡托普利具有相同的降低 MMP-1 和升高 TIMP-1 的作用($P > 0.05$),提示抗纤益心方有抑制心肌纤维化的作用;与正常组比较,中西药联用组降低 MMP-1 及升高 TIMP-1 差异无统计学意义($P > 0.05$),表明两药合用可能对 MMP-1 的降低及 TIMP-1 的升高有协同作用;抗纤益心方低剂量对 MMP-1 的影响与模型组比较差异有统计学意义

($P < 0.05$)。

抗纤益心方为我院治疗扩张型心肌病心力衰竭的常用有效方剂。在常规西药治疗的基础上运用,能够明显改善扩张型心肌病患者的心力衰竭症状;与西药长期合用能够使部分患者的左心室内径明显减小,本研究即在此基础上设计进行。但本研究仅选择了能够影响心肌纤维化的 MMP-1 和 TIMP-1 进行检测,未对反映心肌纤维化的胶原指标,以及 MMP-1、TIMP-1 的变化与胶原指标的相关性进行研究,为本研究的不足之处。

参考文献

- [1] Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implication[J]. Bratisl Lek Listy, 2005,106(3):127-132.
- [2] 黄荣杰,刘唐威,庞玉生. 扩张型心肌病大鼠肿瘤坏死因子 α 及基质金属蛋白酶 1 的表达[J]. 基础医学与临床, 2005,25(5):424-428.
- [3] Phatharajaree W, Phrommintikul A, Chattipakorn N. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction [J]. Can J Cardiol, 2007,23(9):727-733.
- [4] 黄荣杰,刘唐威,伍伟锋,等. 呋喃唑酮制备大鼠扩张型心肌病模型[J]. 中国病理生理杂志, 2003,23(10):2147-2150.
- [5] 祝善俊,徐成斌. 心力衰竭基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社,2001:465.
- [6] Li YY, Feng YQ, Kadokami T, et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97(23):12746-12751.
- [7] Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilation in rat models of systolic chamber dysfunction[J]. Circulation, 2001,103(1):155-160.

(收稿日期:2010-10-20;修回日期:2011-04-15)