

Ezetimibe/simvastatin compared with atorvastatin or rosuvastatin in lowering to specified levels both LDL-C and each of five other emerging risk factors for coronary heart disease: non-HDL-cholesterol, TC/HDL-C, apolipoprotein B, apo-A-I, or C-reactive protein [J]. *J Clin Lipid*, 2008, 2 (6):436-446.

[7] 杜光,刘宇,刘东,等.液相色谱-串联质谱法(LC-MS)测定血浆中氨氯地平浓度[J].中国药师,2007,10(4):328-329.

[8] 顾洪安,苗积康,张曙华,等.液相色谱-串联质谱法测定人血清中苯磺酸氨氯地平的浓度[J].中国新药与临床杂志,2007,26(10):737-740.

丹参酮 IIA 磺酸钠对心肌纤维化及 Th₁/Th₂ 类细胞因子水平的影响

杨乐¹,王照华¹,李树生¹,杨光田¹,赵立波²

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院急诊内科;2. 药理学系,武汉 430030)

[摘要] 目的 观察丹参酮 IIA 磺酸钠(sodium tanshinone IIA sulfonate, STS)对老年小鼠高血压心肌纤维化及辅助性 T 细胞(Th)亚群 Th₁/Th₂类因子水平的影响。方法 老年小鼠行腹主动脉结扎构建高血压心肌纤维化模型,以 STS 腹腔注射进行干预。观察 STS 对心肌纤维化指标以及 Th₁/Th₂类因子水平的影响。结果 模型组心肌间质可见明显胶原沉积,STS 处理组心肌纤维化程度明显减轻,外周血 Th₁类因子[白细胞介素(IL)-12、干扰素(IFN)- γ]水平下降,而 Th₂类因子(IL-4、IL-5)水平增加;STS 处理组较模型组心肌 I 型胶原表达明显减少。结论 STS 能调控老年小鼠高血压心肌纤维化,机制与调节 Th₁/Th₂类因子水平有关。

[关键词] 丹参酮 IIA 磺酸钠;心肌纤维化;Th₁/Th₂类因子

[中图分类号] R282.71;R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2010)06-0701-03

Effects of Sodium Tanshinone IIA Sulfonate on Cardiac Fibrosis and Th₁/Th₂ Cytokines Levels

YANG Le¹, WANG Zhao-hua¹, LI Shu-sheng¹, YANG Guang-tian¹, ZHAO Li-bo² (1. Department of Emergency Medicine, Tongji Hospital; 2. Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate effects of sodium tanshinone IIA sulfonate (STS) on hypertension-induced cardiac fibrosis and Th₁/Th₂ cytokines in aged mice. **Methods** Hypertension-induced cardiac fibrosis was established by abdominal aorta constriction in aged mice. Some mice were i. g. injected with STS, the control were injected with physiological saline. The cardiac fibrosis and Th₁/Th₂ cytokines were detected. **Results** The collagen fiber was deposited obviously in the cardiac interstitium of the model mice, but less could be seen in STS-treated group. In STS-treated group, Th₁ cytokines (IL-12, IFN- γ) were decreased and Th₂ cytokines (IL-4, 5) were increased. The type I collagen expression in STS-treated group was less than the model. **Conclusion** STS can modulate hypertension-induced cardiac fibrosis in aged mice and the mechanisms may be related to regulation of Th₁/Th₂ cytokines levels.

KEY WORDS Sodium tanshinone IIA sulfonate; Cardiac fibrosis; Th₁/Th₂ cytokines

心肌纤维化是指心肌组织结构中胶原纤维过量积聚或成分发生改变^[1]。该病理变化在高血压、冠心病

等多种老年性心血管疾病中存在,是导致心功能不全、心律失常及慢性心功能衰竭难以逆转的最主要病理损伤之一^[2]。因此研究其发病机制及切实有效防治措施受到高度关注。心肌纤维化免疫学发病机制是 CD₄⁺辅助性 T 细胞(Th)亚群 Th₁/Th₂平衡失调^[3,4],表现为 Th₁类因子[白细胞介素(IL)-2, 12, 干扰素(IFN)- γ 及转化生长因子(TGF)- β 等]表达增加,而 Th₂类因子(IL-4, 5, 13 及 17 等)表达减少。我国传统中药丹参临床上主要用于冠心病的治疗^[5],其对心肌

[收稿日期] 2009-09-11 **[修回日期]** 2010-01-11

[作者简介] 杨乐(1979-),男,湖北武汉人,主治医师,博士,从事急诊内科工作。电话:(0)13667163539, E-mail: leyang66@gmail.com.

[通讯作者] 杨光田(1952-),男,湖北应城人,教授,博士生导师,从事急诊内科工作。电话:(0)13707115752, E-mail: gtyang@tjh.tjmu.edu.cn.

纤维化研究尚少,有研究提示丹参具有调控免疫内环境的潜在能力^[6,7]。因此笔者在本实验中结扎老年小鼠腹主动脉,建立高血压心肌纤维化模型。以丹参酮 II A 磺酸钠(STS)腹腔注射进行干预,观察心肌纤维化指标以及 Th₁/Th₂类因子水平的影响,为探索 STS 抗心肌纤维化发病机制提供初步实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 PMSF 和 leupeptin (Sigma),PVDF 膜(Amersham)、ELISA 试剂盒(南京建成生物公司),抗 I 型胶原抗体(Santa Cruz 公司)。其余试剂为国产分析纯。LS3810 液体闪烁仪(Beckman),垂直电泳仪及转膜系统(Biorad)。STS(纯度 99.5%,武汉医药工业研究院),以 0.9% 氯化钠溶液溶解配成所需浓度。

1.2 动物模型制作及分组 结扎腹主动脉,构建高血压心肌纤维化模型^[8,9]。清洁级老年昆明种小鼠,12 个月龄,体质量(20 ± 2) g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。小鼠腹腔注射氯胺酮(80 mg · kg⁻¹)、甲苯噻嗪(20 mg · kg⁻¹)和阿托品(0.6 mg · kg⁻¹)混合液麻醉后,打开腹腔,在左肾动脉上方分离腹主动脉,选择针头垫扎(27G 直径约 0.6 mm)平行置于动脉外壁,用 5 号丝线对腹主动脉和垫扎针一起进行缩窄,结扎确实后抽出垫扎针,形成腹主动脉缩窄模型。随机分为 4 组,每组 6 只:①假手术组,游离腹主动脉后不结扎;②模型组,行单纯结扎建立模型;③STS 处理组,在形成腹主动脉缩窄后开始给药,以 STS 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹腹腔注射;④对照组,建立模型后给予 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射。各组干预 2 个月后,断头处死动物,进行以下检测。

1.3 胶原体积分数 心脏切下后经大体观察,由心内膜面剪取左室前壁约 1.0 cm × 1.0 cm × 0.5 cm 心肌标本,40 g · L⁻¹多聚甲醛固定 6 h。常规石蜡包埋,连续切片厚 3 μm,采用 Ven Gieson 染色法。切片采用 Leica-Q500MC 型自动图像分析仪行图像分析,计算整个测量范围内的灰度值,计算出胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF)。

1.4 免疫印迹法检测 I 型胶原蛋白表达 取心肌组织匀浆,按照 1 : 9 (W/V)加入裂解液,4 °C 匀浆,冰上放置 1 h,4 °C,12 000 r · min⁻¹离心 30 min (r = 15 cm),上清液用考马斯亮蓝法行蛋白质定量。各组取 30 μg 总蛋白加入上样缓冲液煮沸 3 min 变性,SDS-PAGE 分离蛋白,电转移至硝酸纤维素膜上。3% 脱脂奶粉室温封闭硝酸纤维素膜 30 min,加入 1 : 1 000 稀释的 1 抗 4 °C 孵育过夜,与 1 : 10 000 稀释的 2 抗室温孵育 1 h,再与化学发光试剂温浴 1 min 后曝

光、显影和定影,最后对结果进行吸光度扫描分析。

1.5 ABC-ELISA 方法检测外周血 Th₁/Th₂类因子水平 抽取静脉血 1 mL,静置 20 min,4 000 r · min⁻¹离心(r = 15 cm),分离血清,并置于 - 20 °C 冰箱保存备用。采用酶联免疫吸附双抗体夹心 ABC-ELISA 方法,检测 Th₁类因子(IL-12、IFN-γ)及 Th₂类因子(IL-4, 5)水平,具体操作按说明书。

1.6 统计学方法 所有数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 12.0 统计软件包进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 STS 对心肌间质胶原体积分数的影响 STS 处理组、对照组、模型组和假手术组心肌间质胶原体积分数分别为 (19.36 ± 4.78)% , (33.81 ± 5.93)% , (34.11 ± 6.12)% , (15.75 ± 5.22)% ;与模型组比较,STS 处理组和假手术组心肌间质胶原体积分数均明显下降(均 P < 0.05)。对照组和模型组差异无显著性(P > 0.05)。

2.2 STS 对 I 型胶原蛋白表达的影响 见图 1。结果显示,和假手术组比较,作为心肌间质的主要结构胶原,模型组心肌间质可见 I 型胶原蛋白表达增加;而 STS 处理组较模型组心肌 I 型胶原蛋白含量明显下调(P < 0.05)。提示 STS 在心肌纤维化中具有重要调控作用。

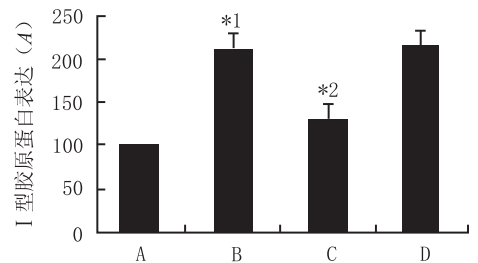


图 1 4 组小鼠心肌 I 型胶原蛋白表达的比较

A. 假手术组;B. 模型组;C. STS 处理组;D. 对照组。与假手术组比较,*¹P < 0.01;与模型组比较,*²P < 0.05

Fig. 1 Effect of STS on the expression of collagen type I

A. Sham operation group ; B. Model group; C. STS-treated group ; D. Control group; Compared with control group, *¹P < 0.01; Compared with model group, *²P < 0.05

2.3 STS 对外周血 Th₁/Th₂类因子水平的影响 见图 2。结果显示,和假手术组相比,模型组 Th₁类因子(IL-12、IFN-γ)表达增加,而 Th₂类因子(IL-4, 5)表达减少。与模型组相比,STS 处理组外周血 Th₁类因子水平下降,而 Th₂类因子水平增加。说明 STS 在调控 Th₁/Th₂类因子平衡方面具有重要作用。

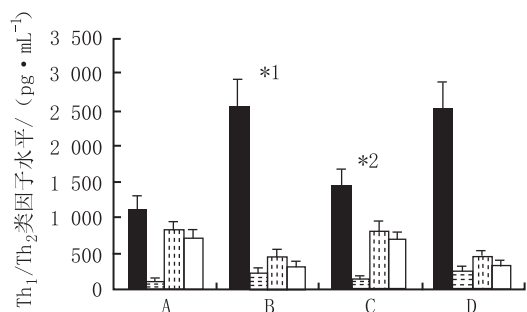


图 2 4 组小鼠外周血 Th₁/Th₂ 类因子水平的比较

■ INF- γ ▨ IL-12 ▤ IL-4 □ IL-5

A. 假手术组; B. 模型组; C. STS 处理组; D. 对照组。与假手术组比较, $^1P < 0.01$; 与模型组比较, $^2P < 0.01$

Fig. 2 Effect of STS on Th₁/Th₂ cytokines in peripheral blood of mice

A. Sham operation group; B. Model group; C. STS-treated group; D. control group; Compared with control group, $^1P < 0.01$; Compared with model group, $^2P < 0.01$

3 讨论

高血压等多种心血管疾病可导致心肌重塑, 包括心肌细胞肥大和间质纤维化。重塑可加重心肌缺血缺氧, 降低顺应性, 最终致心力衰竭。因此防治心肌重塑是医学研究重点, 然而目前治疗策略主要着眼于心肌细胞肥大, 对间质纤维化研究相对滞后。新近研究提示, 免疫失衡是心肌纤维化的重要发病机制; 在心肌纤维化患者及动物模型均发现: Th₁ 型应答倾向于成纤维细胞活化与增殖, 基质沉积和纤维化形成; 而 Th₂ 型应答则促进正常组织结构恢复^[10]。对心肌纤维化免疫失衡调控将给心肌重塑带来新的治疗靶点, 然而目前用中草药干预这一过程的研究尚少^[11]。

我国传统中药丹参具有抗缺血低氧、改善微循环、抑制血小板黏附聚集功能和抗血栓形成作用, 临床上主要用于冠心病的治疗。但其对心肌纤维化的作用报道较少。本实验以 STS 处理高血压心肌纤维化老年小鼠, 观察其对胶原分布、Th₁/Th₂ 类因子水平以及 I 型胶原纤维表达的影响。结果显示: 与模型组比较, STS 处理组间质纤维化程度明显减轻; 且外周血 Th₁ 类因子 (IL-12、IFN- γ) 水平下降, 而 Th₂ 类因子 (IL-4, 5) 水平增加; STS 处理组较模型组心肌 I 型胶原含量明显增加。

以上结果提示, STS 在调控高血压心肌纤维化的

免疫学发病机制方面具有重要作用; 本课题组拟进一步深入研究 STS 对心肌纤维化的具体调控机制及对 Th₁/Th₂ 平衡的干预机制。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.06.003

[参考文献]

- [1] BROWN L. Cardiac extracellular matrix: a dynamic entity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289 (3): 973-974.
- [2] SUN Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81 (3): 482-490.
- [3] SATOH M, MINAMI Y, TAKAHASHI Y, et al. Immune modulation: role of the inflammatory cytokine cascade in the failing human heart [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2008, 5 (2): 69-74.
- [4] YU Q, HORAK K, LARSON D F. Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling [J]. *Hypertension*, 2006, 48 (1): 98-104.
- [5] ZHAO B L, JIANG W, ZHAO Y, et al. Scavenging effects of *salvia miltiorrhiza* on free radicals and its protection for myocardial mitochondrial membranes from ischemia reperfusion injury [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 38 (6): 1171-1182.
- [6] 祝 绚, 鲍依稀, 李 进, 等. 云芝糖肽丹参酮 II A 对荷瘤小鼠的抗肿瘤及免疫调节作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2008, 24 (6): 526-529.
- [7] 李晓静, 周 敏, 李晓辉, 等. 丹参酮 II A 对免疫性血管炎细胞因子和血小板的影响及其作用机制 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 15 (1): 8-12.
- [8] 杨 涛, 张 伟, 张 雷. 大鼠腹主动脉缩窄模型的制备及其效果的探讨 [J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29 (1): 24-26.
- [9] 孙庆怡, 陈润芬, 李洪波, 等. 腹主动脉结扎大鼠心肌胶原网络重塑的实验研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2000, 28 (2): 128-131.
- [10] CEHNG X, LIAO Y H, GE H, et al. Th₁/Th₂ functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation [J]. *J Clin Immunol*, 2005, 25 (3): 246-253.
- [11] 武多娇. 心肌纤维化药物治疗的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9 (12): 1327-1332.