丹酚酸A对压力超负荷大鼠心功能减退和心室重构的改善作用

丁　超[1],谢利平[2],李荣成[1]

([1]六安市立医院心内科,安徽　六安　237000;[2]南京医科大学病理生理学系,江苏　南京　210029)

[摘　要]　**目的**:探讨丹酚酸A(Sal A)对压力超负荷大鼠心功能减退和心室重构的改善作用。**方法**:采用主动脉缩窄法(TAC)制备压力超负荷大鼠模型,并连续给予5 mg/(kg·d)的Sal A灌胃处理,同时部分压力超负荷大鼠仅注射等体积的生理盐水(saline),假手术(Sham)仅行开胸处理而不行TAC,依据实验设计将大鼠分为4组:Sham-saline组、TAC-saline组、Sham-Sal A组和TAC-Sal A组。分析12周后4组的血流动力学、心功能、心脏解剖学指标;采用HE、Masson's三重及特异性荧光探针DHE染色分析心肌细胞的形态学、纤维化及活性氧自由基水平;免疫印迹法检测心肌细胞凋亡相关基因的蛋白水平。**结果**:与Sham-saline组比较,TAC处理可导致心率、左室收缩期平均压力、左室内压最大上升速率、Bcl-2(抑制凋亡基因)水平降低($P < 0.05$),左室舒张末期压力、心肌直径、胶原容积分数、心脏体重比、心肌荧光强度、Bax和Cleaved caspase-3(促凋亡基因)水平升高;给予Sal A处理的压力超负荷大鼠,以上指标均获改善,且差异有统计学意义;但左室收缩期平均压力、心脏体重比、心肌直径、胶原容积分数、凋亡相关基因的水平仍与Sham-saline组有差异($P < 0.05$);Sal A处理对Sham大鼠的各项指标无影响。**结论**:Sal A可改善压力超负荷大鼠的心功能减退及包括心肌肥大、纤维化及凋亡在内的心室重构,具有较好的保护作用。

[关键词]　丹酚酸A;心功能减退;心肌肥大;心肌凋亡;心室重构

[中图分类号]　R541.6　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2014)01-012-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140103

Improving effect of salvianolic acid A on pressure overload-induced cardiac dysfunction and ventricular remodeling in rats

Ding Chao[1],Xie Liping[2],Li Rongcheng[1]

(*[1]Department of Cardiology,Lu'an Municipal Hospital,Lu'an 237000;[2]Department of Pathophysiology,NJMU,Nanjing 210029,China*)

[Abstract]　**Objective**:To explore the improving effect of Salvianolic acid A (Sal A) on pressure overload-induced cardiac dysfunction and ventricular remodeling in rats. **Methods**:The pressure overload rat model was established by transverse aortic constriction (TAC). The Sal A was applied at the concentration of 5 mg/(kg·d) by gavage for continuous 12 weeks,and some rats with pressure overload were treated with the same volume of saline. The rats were assigned into 4 groups:Sham-saline,TAC-saline,Sham-Sal A and TAC-Sal A. Twelve weeks later,hemodynamic conditions,heart function and heart anatomy indicators were analyzed among 4 groups. Hematoxylin-eosin (HE),Masson's triple staining and specific fluorescent probe DHE were performed to analyze the morphology,fibrosis and reactive oxygen species levels of myocardial cell. The protein levels of apoptosis related genes were evaluated by Western blotting. **Results**:Compared with the Sham-saline group,TAC operation led to a decrease of heart rate,mean left ventricular systolic pressure,left ventricular pressure maximal rate and protein level of Bcl-2 (anti-apoptosis gene),and an increase of left ventricular end-diastolic pressure,cardiac diameter,collagen volume fraction,heart weight ratio,myocardial fluorescence intensity and protein levels of Bax and Cleave caspase-3 (pro-apoptotic gene). After the treatment with Sal A,the above indicators got attenuated. However,there were still significant differences on mean systolic pressure of left ventricular,heart weight ratio,cardiac diameter,collagen volume fraction and protein levels of apoptosis-related genes between the group of Sham-saline and the group of TAC-Sal A ($P < 0.05$). The treatment with Sal A had no effect on the indicators of Sham rats. **Conclusion**:Sal A can improve pressure overload-induced cardiac dysfunction and attenuate and protect ventricular remodeling including myocardial hypertrophy,fibrosis and apoptosis.

[Key words]　salvianolic acid A;cardiac dysfunction;myocardial hypertrophy;myocardial apoptosis;ventricular remodeling

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(01):012-017]

左心室压力超负荷常见于高血压,而长期压力超负荷可导致心室重构,最终会发生心功能减退,是多种心血管事件的主要危险因素[1]。心室重构主要包括心肌肥大、纤维化及凋亡[2]。因此延缓、逆转心室重构和改善心功能对降低心血管风险有重要意义。丹参是一种常用的药物,具有心血管保护作用[3-5],而丹酚酸 A(salvianolic acid A,Sal A)是丹参的药效成分,具有多种生物活性,如抗氧化应激、清除自由基及降低炎症反应等,在心肌缺血方面有保护作用[6]。因此,推测 Sal A 对压力超负荷导致的心功能减退和心室重构也可能有保护作用并可改善相关症状。故本研究通过给予主动脉缩窄法诱导的压力超负荷大鼠 Sal A 处理并分析对其心功能减退和心室重构的影响,现将结果报道如下。

1　材料和方法

1.1　材料

雄性成年 Sprague Dawley 大鼠(北京维通利华公司),体重 280~300 g。丹酚酸 A 由中国医学科学院药物研究所制备 (纯度> 90%),HE 染色液购自美国 Sigma-aldrich 公司,Masson 三色染色试剂盒购自福建迈新生物技术有限公司, 活性氧荧光探针-二氢乙啶(DHE)购自上海英骏公司,兔抗鼠 Bax、Bcl-2 单克隆抗体、ECL 化学发光试剂盒均购自美国 Santa Cruz 公司, 兔抗鼠 Cleaved caspase-3 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2　方法

1.2.1　动物与分组

56 只雄性成年 SD 大鼠, 根据实验设计随机分为 4 组(n=14):Sham-saline 组(假手术 + 生理盐水治疗)、TAC-saline 组(TAC 手术 + 生理盐水治疗)、Sham-Sal A 组(假手术 + Sal A 治疗)和 TAC-Sal A 组 (TAC 手术 + Sal A 治疗)。Sham-Sal A 和 TAC-Sal A 组均给予连续 12 周的 Sal A5 mg/(kg·d)灌胃处理,Sham-saline 组和 TAC-saline 组均给予同体积的生理盐水作对照。所有大鼠饲养于 SPF 环境中,12 h 明暗周期、温湿度可控,标准饲料和饮用水可随意摄取。

1.2.2　主动脉缩窄法 (transverse aortic constriction, TAC)制备压力超负荷大鼠模型

参考文献[7]采用 TAC 法制备压力超负荷大鼠模型,采用腹腔注射 0.3 ml/kg 10%水合氯醛的方法进行麻醉,取仰卧位,固定头部及四肢,经喉行气管插管并给予机械通气,剪除胸部毛,采用碘伏消毒,在左侧第二肋水平开胸,钝性游离肌肉和血管,暴露横向主动脉弓, 将剪掉针尖的 8 号针头与主动脉平行放置,在无名动脉(头臂干)和左颈总动脉之间用 4-0 号手术线结扎,将针头抽出,关闭胸腔并缝合。术后肌注青霉素抗感染。所有操作均严格遵守无菌原则。随机选取 6 只大鼠在 TAC 手术前,于仰卧位行颈部正中切口,暴露气管和颈动脉区域,给予机械通气,然后行左右侧颈动脉插管,采用 PowerLab 数据分析处理系统记录 TAC 手术前后双侧的血压。

1.2.3　血流动力学及心功能评价

待各组大鼠连续处理 12 周后,每组取 8 只采用 0.3%戊巴比妥钠充分麻醉后,取仰卧位,在颈部正中线作长约 3 cm 的纵切口,切口气管并给予维持性通气。止血钳钝性分离右侧颈总动脉并剪开,保留一斜面, 采用肝素预先处理的 PE-50 聚乙烯管插入血管,用手术线结扎固定。采用 PowerLab 数据分析处理系统记录平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP)和心率(heart rate,HR),进一步插管至左室内, 记录左室收缩期平均压力 (left ventricular systolic pressure,LVSP)、左室舒张末期压力(left ventricular end-diastolic pressure,LVEDP)和左室内压最大上升速率 (the maximum rate change of left ventricular pressure,LVdP/dtmax)。

1.2.4　心脏的解剖学指标比较

处死大鼠、称重并记录体重(body weight,BW),完整取出心脏,滤纸吸干后称重记录心脏重量(heart weight,HW),计算心脏体重比值(HW/BW)。

1.2.5　心肌病理学指标检测

将 1.2.4 取出的心脏组织适当修剪,采用 4%中性福尔马林固定 8~12 h,经梯度酒精脱水,取左心室中部冠状切面部分并用石蜡包埋, 切成厚 5 μm 的片子,分别采用 HE 染色和 Masson's 三重染色观察心肌细胞的形态和胶原纤维的增生情况。采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析心肌细胞直径和胶原容积分数。指标观察采用单盲法并均由两位观察者独立评价。

1.2.6　心肌活性氧自由基水平

采用 DHE 心肌切片染色来评价活性氧自由基水平。取 1.2.4 中的左心室中部冠状切面,采用组织包埋剂包埋并用冰冻切片机切片 (5 μm), 加入 2 μmol/L DHE 染色 15 min,避光反应,采用荧光显微镜进行观察。

1.2.7　心肌凋亡相关基因的蛋白水平

采用 Western blot 法检测 Bax、Cleaved caspase-3

(促凋亡基因)和 Bcl-2(抑制凋亡基因)的蛋白水平。具体步骤如下,简述如下:采用过量麻药处死大鼠(n = 6),快速取左心室组织并采用预冷的 PBS 冲洗,冰上剪碎,充分匀浆处理,以 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清后加入裂解液,12 000 r/min 离心 10 min,取上清于低温冰箱保存,采用二喹啉甲酸(BCA)蛋白法检测蛋白浓度。将蛋白与上样缓冲液混匀后煮沸 10 min。每孔取 30 μg 蛋白质上样,行 10%% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用半干转法转膜,加入脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入 Bax (1:200)、Cleaved caspase-3(1:100)及 Bcl-2(1:100)的一抗,4℃孵育过夜,同时以 β-actin 作为内参(1:3 000),加入二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。采用化学发光法进行胶片显影,采用 Gel-Pro analyzer 进行目的条带的光密度分析,最终结果以目的条带的光密度与内参的比值作为最终结果。

1.3　统计学方法

采用 SPSS16.0 软件包处理,各指标均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法,$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　TAC 手术前后左右颈总动脉血压

TAC 术前,左侧和右侧的颈动脉血压分别为(72.27 ± 5.05)mmHg 和(74.36 ± 4.37)mmHg,术后分别为 (53.64 ± 4.82)mmHg 和 (112.68 ± 8.44) mmHg;两组术前的左右侧颈动脉血压无差异(P > 0.05),TAC 术后右颈动脉的血压升高,与术前及左侧比较,差异均有统计学意义(P < 0.05);左侧 TAC 术后血压值低于术前(P < 0.05),提示 TAC 手术各组之间动脉缩窄程度相当,有可比性(图 1)。

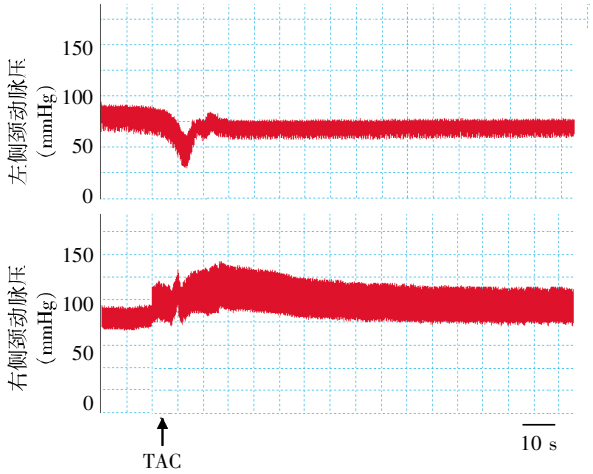


图 1　TAC 手术前后左右颈动脉的血压记录图

Figure 1　The recording chart of blood pressure of right carotid artery before and after TAC

2.2　4 组血流动力学心功能指标比较

与 Sham-saline 组比较,TAC-saline 组的 HR、LVSP、LVdP/dtmax 水平降低 (P < 0.05),LVEDP 水平升高(P < 0.05);但给予 Sal A 处理,可改善压力超负荷大鼠的以上恶化指标,如 TAC-Sal A 组的 HR、LVSP、LVdP/dtmax 水平升高,且与 TAC-saline 组的差异有统计学意义(P < 0.05),但 LVSP 水平仍与 Sham-saline 组有差异 (P < 0.05)。Sal A 处理对 Sham 大鼠的各项指标无影响(表 1)。

表 1　4 组血流动力学及心功能指标比较

Table 1　The hemodynamics and cardiac function of 4 groups　(n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	MAP (mmHg)	HR(次/min)	LVSP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	LVdP/dtmax(mmHg/s)
Sham-saline	91.3 ± 6.7	367.5 ± 11.3	135.7 ± 10.9	7.4 ± 1.8	3 014 ± 223
TAC-saline	89.7 ± 9.4	356.4 ± 8.5[a]	122.5 ± 9.2[a]	13.2 ± 2.7[a]	2 605 ± 167[a]
Sham-Sal A	92.5 ± 7.2	370.2 ± 10.6[b]	137.2 ± 11.4[b]	7.8 ± 1.6[b]	3 128 ± 259[b]
TAC-Sal A	88.6 ± 8.3	364.7 ± 9.6[b]	128.5 ± 9.3[abc]	8.7 ± 1.9[b]	2 967 ± 178[b]

与 Sham-saline 比较,[a]P < 0.05;与 TAC-saline 比较,[b]P < 0.05;与 Sham-Sal A 比较,[c]P < 0.05。

2.2　4 组心脏解剖学指标比较

与 Sham-saline 组比较,TAC-saline 组的 HW/BW 水平升高(P < 0.05);但给予 Sal A 处理,可改善压力超负荷大鼠的以上恶化指标,如 TAC-Sal A 组的 HW/BW 水平低于 TAC-saline 组,且差异有统计学意义 (P < 0.05),但 HW/BW 水平仍与 Sham-saline 组有差异(P < 0.05)。Sal A 处理对 Sham 大鼠的各项指标无影响(表 2)。

表 2　4 组的心脏解剖学指标比较

Table 2　The heart anatomy indicators of 4 groups　(n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	BW(g)	HW/BW(g/kg)
Sham-saline	345.7 ± 11.2	2.4 ± 0.4
TAC-saline	353.2 ± 9.8	3.3 ± 0.6[a]
Sham-Sal A	357.9 ± 12.0	2.6 ± 0.3[b]
TAC-Sal A	361.7 ± 15.7	2.9 ± 0.2[abc]

与 Sham-saline 比较,[a]P < 0.05;与 TAC-saline 比较,[b]P < 0.05;与 Sham-Sal A 比较,[c]P < 0.05。

2.3　4 组的心肌直径、纤维化指标比较

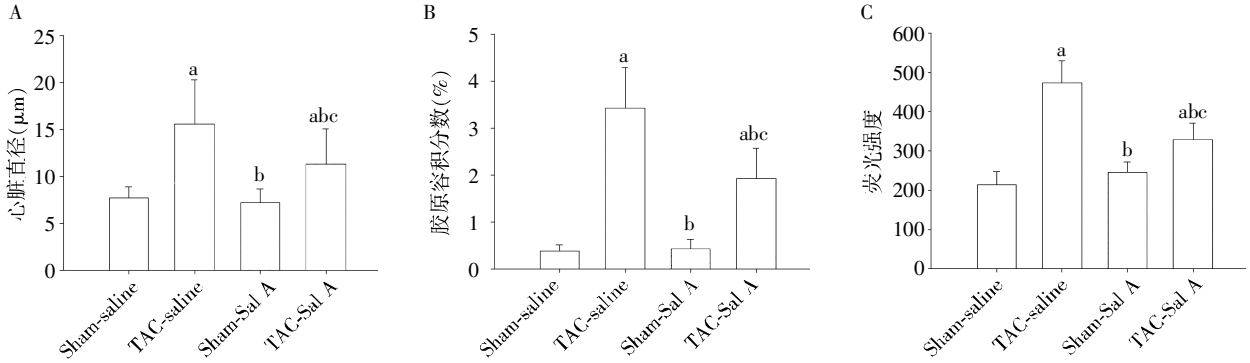
与 Sham-saline 组比较,TAC-saline 组的心肌直径和胶原容积分数水平升高($P < 0.05$);但给予 Sal A 处理,可改善压力超负荷大鼠的以上恶化指标,如 TAC-Sal A 组的心肌直径和胶原容积分数水平低于 TAC-saline 组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),但两指标水平仍与 Sham-saline 组有差异($P < 0.05$)。Sal A 处理对 Sham 大鼠的各项指标无影响(图 2~4)。

2.4　4 组的心肌活性氧自由基水平比较

与 Sham-saline 组比较,TAC-saline 组的心肌荧光强度增强($P < 0.05$);但给予 Sal A 处理,可改善压力超负荷大鼠的以上恶化指标,如 TAC-Sal A 组的荧光强度低于 TAC-saline 组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),但仍与 Sham-saline 组有差异($P < 0.05$)。Sal A 处理对 Sham 大鼠的各项指标无影响(图 1,图 5)。

2.5　4 组凋亡相关基因的蛋白水平比较

与 Sham-saline 组比较,TAC-saline 组的 Bcl-2 水平降低,Bax 和 Cleaved caspase-3 水平升高($P < 0.05$);但给予 Sal A 处理,可改善压力超负荷大鼠的



与 Sham-saline 比较,$^{a}P < 0.05$;与 TAC-saline 比较,$^{b}P < 0.05$;与 Sham-Sal A 比较,$^{c}P < 0.05$。

图 2　4 组的心肌直径、纤维化及活性氧自由基水平比较

Figure 2　The diameter, fibrosis and reactive oxygen species level of 4 groups

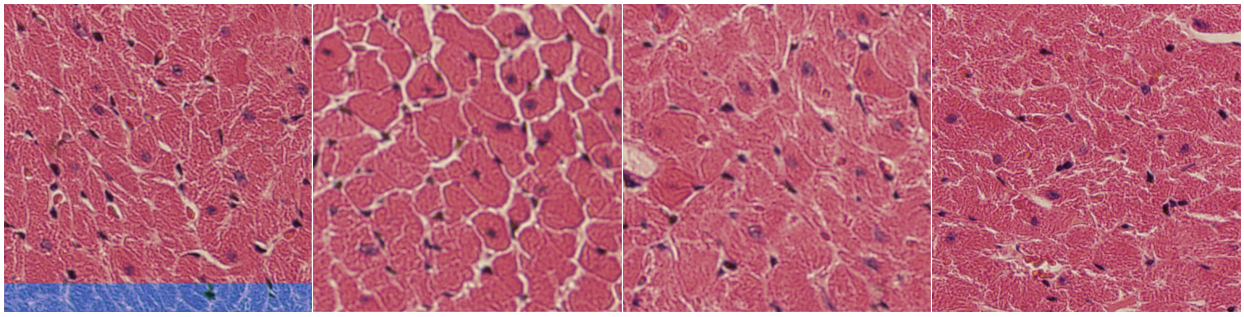


图 3　4 组的心肌 HE 染色图(×400)

Figure 3　Myocardium HE staining of 4 groups (×400)

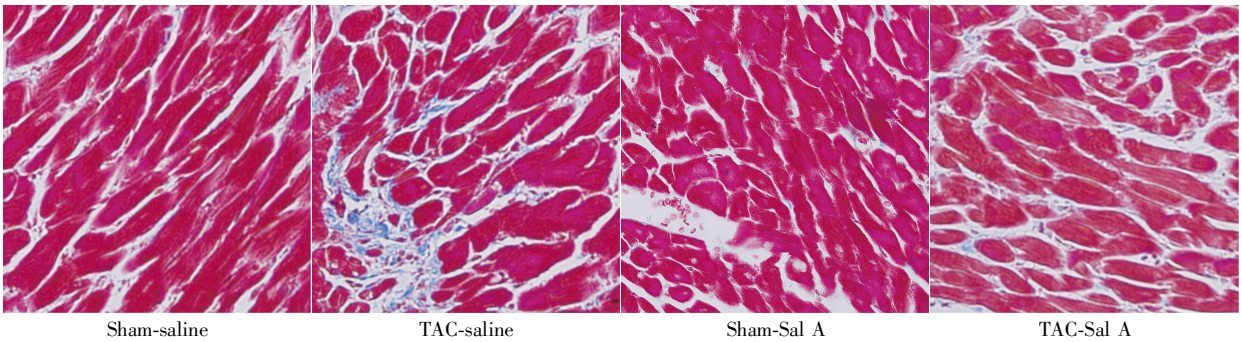


图 4　4 组的心肌 Masson's 三重染色图(×400)

Figure 4　Myocardium Masson's triple staining of 4 groups (×400)

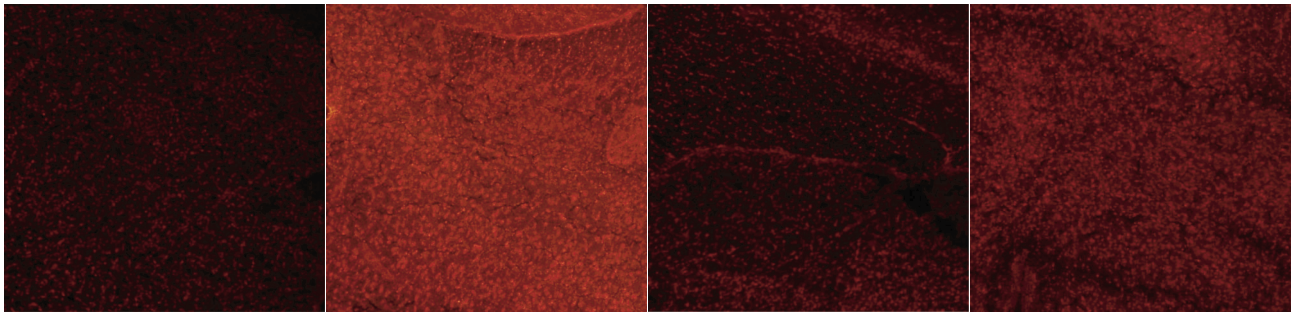
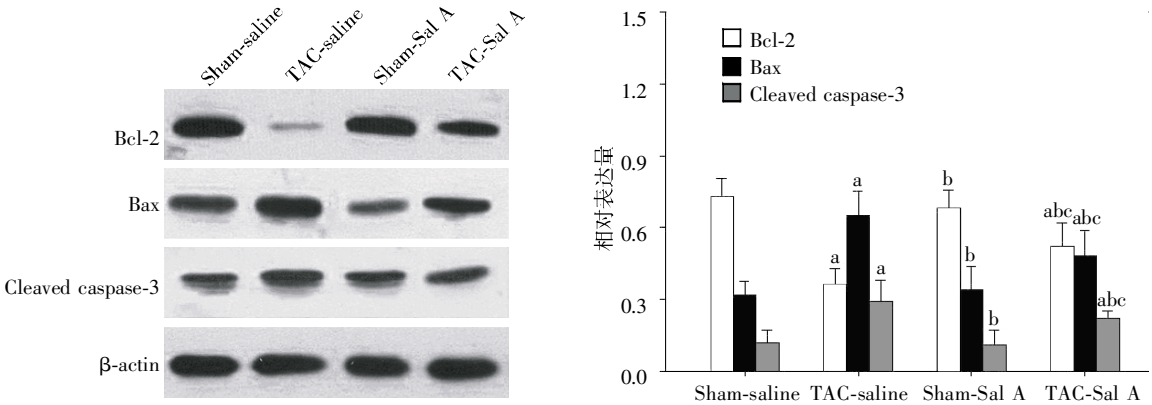


图5　4组的心肌DHE染色图(×400)

Figure 5　Myocardium DHE staining of 4 groups (×400)

以上恶化指标,如TAC-Sal A组的Bcl-2水平升高,Bax和Cleaved caspase-3水平降低,且与TAC-saline组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Sal A处理对Sham大鼠的各项指标无影响(图6)。



与Sham-saline比较,$^aP < 0.05$;与TAC-saline比较,$^bP < 0.05$;与Sham-Sal A比较,$^cP < 0.05$。

图6　4组凋亡相关基因的蛋白水平比较

Figure 6　The protein level of apoptosis-related genes of 4 groups

3　讨　论

压力超负荷状况会加重心肌的病理性改变,导致预后不良。心肌重构一般包括心肌肥大、纤维化及心肌凋亡等常见病理反应,三者可相互影响[2]。心脏是压力超负荷的重要靶器官,而心肌肥厚是长期心肌压力超负荷的代偿适应表现,此过程会发生复杂的信号通路激活,病理上表现为通过增加心肌总量来加强心室收缩力,维持正常血循环,但随着心肌缺氧加重,会伴发供血不足,最终导致心肌缺血[8]。心肌纤维化的主要表现为细胞间质中胶原沉积增多,同时各型胶原的比例和排列紊乱,可发展为心源性猝死等[9]。心肌凋亡可导致心肌细胞数量减少,影响心室收缩能力,主要表现为凋亡相关基因的异常表达,同时在压力超负荷模型中可发现多种与凋亡相关信号通路的表达上调[10-11]。因此,延缓、逆转心室重构及改善心功能减退是降低压力超负荷导致心血管风险的可行措施。

丹参是一种公认的心血管保护药物,对心肌梗死、心力衰竭等心血管病均有较好的防治效果[3-5]。Sal A是丹参的水溶性成分,属于近年来丹参药效成分的研究热点。以往对丹参的研究主要集中在脂溶性成分,如丹参酮等,但随着对其水溶性成分的系统研究,发现了包括Sal A在内的多种药效活性成分。研究指出,Sal A对缺血/再灌注心肌具有保护作用,可减少心律失常的发生率、改善心功能,同时可预防心肌细胞缺氧-复氧损伤并提高细胞内能量代谢[12]。本研究发现:给予压力超负荷大鼠Sal A灌胃处理,可改善其降低的HR、LVSP、LVdP/dtmax及升高的LVEDP水平,表明Sal A对心功能减退症状同样有效,提示其可延缓心功能恶化。研究指出,Sal A对内皮细胞具有保护作用,提示保护内皮功能可能是Sal A发挥作用的途径之一[13]。张莉等[14]的研究指出Sal A对心肌细胞有保护作用,可提高其他不

良刺激的耐受情况。

本研究从心肌肥厚、凋亡及纤维化三个方面来分析 Sal A 对压力超负荷导致心室重构的保护作用。Sal A 处理可改善压力超负荷大鼠的心肌直径、胶原容积分数、心脏体重比,以上从形态学和病理学上证实 Sal A 对心肌肥厚及纤维化有改善作用。压力超负荷大鼠的 Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白水平上升,且 Bcl-2 水平降低,表明压力超负荷大鼠出现心肌凋亡, 而给予 Sal A 处理后尽管与正常大鼠有差异,但异常的凋亡相关基因的蛋白水平均获改善。以上证据指出 Sal A 对压力超负荷大鼠的心室重构有保护作用。研究指出氧化应激在发生心室重构的发生、发展中起促进作用,改善氧化应激相关指标可逆转心室重构[15]。本研究采用 DHE 探针染色发现,未处理的压力超负荷大鼠的活性氧自由基水平较高,而给予 Sal A 处理后其水平降低,提示 Sal A 具有改善氧化应激的作用,为改善心室重构的可能机制。

本研究中血流动力学数据和病理学均有差异,血流动力学的长期改变是心肌细胞重构的基础,而心肌细胞重构反过来可以加剧血流动力学的改变,两者是相辅相成的,探讨两者的相关意义对于压力超负荷导致心功能减退及心室重构的研究和治疗具有重要价值,本研究下一步将深入两者的关系。

综上所述,Sal A 可改善压力超负荷大鼠的心功能及包括心肌肥大、纤维化及凋亡在内的心室重构。

[参考文献]

[1] Hua Y,Xu X,Shi GP,et al. Cathepsin K knockout alleviates alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. Hypertension,2013,61(6):1184-1192

[2] Chan W,Duffy SJ,White DA,et al. Acute left ventricular remodeling following myocardial infarction:coupling of regional healing with remote extracellular matrix expansion[J]. JACC Cardiovasc Imaging,2012,5(9):884-893

[3] Fu J,Huang H,Liu J,et al. T anshinone IIA protects cardiac myocytes against oxidative stress-triggered damage and apoptosis[J]. Eur J Pharmaco,2007,568(1-3):213-221

[4] Shan H,Li X,Pan Z,et al. Tanshinone IIA protects against sudden cardiac death induced by lethal arrhythmias via repression of microRNA-1 [J]. Br J Pharmacol,2009,158(5):1227-1235

[5] Yang L,Zou X,Liang Q,et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate depresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through MEK/ERK pathway [J]. Exp Mol Med,2007,39(1):65-73

[6] 于翠翠,刘军锋,车　鑫,等. 丹酚酸 A 中有关物质含量的测定方法 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):94-97

[7] Hill JA,Karimi M,Kutschke W,et al. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload[J]. Circulation,2000,101(24):2863-2869

[8] 张新磊,李明慧,杨少华,等. 人参皂苷 Rg1 对心肌肥厚模型大鼠的保护作用及机制研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(3):332-336

[9] 唐忠志,郑　智,唐　瑛,等. 丹参对自发性高血压大鼠心肌纤维化的逆转作用及其机制研究[J]. 华中科技大学学报:医学版,2002,31(3):292-294

[10] You J,Wu J,Jiang G,et al. Olmesartan attenuates cardiac remodeling through DLL4/Notch1 pathway activation in pressure overload mice [J]. J Cardiovasc Pharmacol,2013,61(2):142-151

[11] Takefuji M,Wirth A,Lukasova M,et al. G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced-cardiac remodeling and heart failure [J]. Circulation,2012,126(16):1972-1982

[12] 杨秀颖,强桂芬,张　莉,等. 丹酚酸 A 对缺血/再灌注心肌的保护作用研究 [J]. 中国药理学通报,2011,27(8):1072-1076

[13] Yang XY,Qiang GF,Zhang L,et al. Salvianolic acid A protects against vascular endothelial dysfunction in high-fat diet fed and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Asian Nat Prod Res,2011,13(10):884-894

[14] 张　莉,张维库,赵　莹,等. 丹酚酸 A 的研究与进展[J]. 中国中药杂志,2011,36(19):2603-2609

[15] 周淑娴,周　艳,雷　娟,等. 氧化应激对大鼠心肌梗死后心室重构的影响 [J]. 南方医科大学学报,2008,28(11):2030-2034

[收稿日期] 2013-07-25