

葛根素改善慢性肺心病大鼠肺血管重建机制探讨

李继武, 季亢挺, 张素勤, 范小芳, 龚永生, 杨鹏麟 (温州医学院附属第二医院心内科 肺心病研究室, 浙江 温州 325027)

摘要:目的 探讨葛根素对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺血管重建的作用。方法 图像分析、氯胺 T 法、免疫组化、组织原位杂交技术等方法观察葛根素对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺组织羟脯氨酸含量、肺小血管显微结构、肺动脉管壁 MMP-2、MMP-9 及其基因的影响。结果 ①光镜下葛根素组内弹力板扭曲、中膜平滑肌细胞增生及管腔狭窄程度均明显轻于低 O₂ 高 CO₂ 组。②血浆 NO 含量低 O₂ 高 CO₂ 组低于正常对照组 ($P < 0.01$), 葛根素组高于低 O₂ 高 CO₂ 组 ($P < 0.01$)。③氯胺 T 法发现肺组织羟脯氨酸含量低 O₂ 高 CO₂ 组高于正常对照组 ($P < 0.01$), 葛根素组低于低 O₂ 高 CO₂ 组 ($P < 0.01$)。④肺组织匀浆 MMP-2、MMP-9 含量低 O₂ 高 CO₂ 组高于正常对照组 ($P < 0.01$)。葛根素组肺组织匀浆 MMP-2、MMP-9 含量皆低于低 O₂ 高 CO₂ 组 ($P < 0.01$)。⑤免疫组化、原位杂交法发现肺细小动脉 MMP-2、MMP-9 和 MMP-2mRNA、MMP-9mRNA 平均吸光度值低 O₂ 高 CO₂ 组均高于正常对照组 ($P < 0.01$), 葛根素组均低于低 O₂ 高 CO₂ 组 ($P < 0.01$)。结论 葛根素改善慢性低氧高二氧化碳大鼠肺血管重建, 与其调节 MMPs 表达、抑制肺动脉管壁胶原的沉积有关。

关键词: 葛根素; 低氧; 慢性; 高碳酸血; 高血压; 肺性; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693 (2009) 01-0014-05

Mechanism of Puerarin on Pulmonary Vascular Remodeling in Rats with Chronic Pulmonary Hypertension Induced by Hypoxia and Hypercapnia

LI Jiwu, JI Kangting, ZHANG Suqin, FAN Xiaofang, GONG Yongsheng, YANG Penglin (Department of Cardiology and Institute of Cor Pulmonale, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of puerarin on pulmonary vascular remodeling in rats with pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia and hypercapnia. **METHODS** Thirty Spague-Dawley rats were randomly divided into normal control group (NC), hypoxic hypercapnia group (HH) and hypoxic hypercapnia + puerarin group (HP). Mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and mean carotid arterial pressure (mCAP) were measured. MMP-2, MMP-9 and their mRNA were observed in pulmonary

作者简介: 李继武, 男, 医学硕士, 副主任医师 Tel: (0571) 88086213 E-mail: lijwu@medmail.com.cn

arterioles by the technique of immunohistochemistry and in situ hybridization. **RESULTS** (1) mPAP was significantly higher in rats of HH group than that of NC group and it was much lower in rats of HP group than that of HH group ($P < 0.01$). Differences of mCAP were not significant in three groups. (2) Light microscopy showed media thickness of pulmonary arterioles was much higher in HH group than that of NC group, and vessel cavity turned more straiter in HH group than that of NC group. However, the damage of pulmonary arterioles in HP group was much slighter than that of HH group. (3) The levels of lung homogenates Hyr, MMP-2 and MMP-9 were much higher in rats of HH group than those of NC group ($P < 0.01$), and lower in HP group than HH group ($P < 0.01$). Plasma NO content of group HH was lower than that of group NC ($P < 0.01$), it was higher in group HP than that of group HH ($P < 0.01$). (4) Expression of MMP-2, MMP-9 and their mRNA in pulmonary arterioles were significantly higher in rats of HH groups than those of NC group ($P < 0.01$), and they were lower in rats of HP group than those of HH group ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Puerarin can improve pulmonary vessel remodeling by regulate MMPs system in hypoxic hypercapnic rats.

KEY WORDS: puerarin; hypoxia; chronic; hypercapnia; hypertension; pulmonary; matrix metalloproteinases

肺血管结构重建 (structural remodelling) 是低氧性肺动脉高压的主要病理生理基础, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 堆积被认为是肺动脉压力持续增高的主要因素之一。葛根素 (puerarin) 是单体-异黄酮化合物, 研究证实其具有抑制肺动脉管壁胶原堆积从而肺血管结构重建^[1], 但机制不明。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是降解 ECM 最重要的一类酶。本实验复制与慢性阻塞性肺疾病病理生理相似的低氧高二氧化碳肺动脉高压大鼠模型^[2], 观察葛根素对 MMPs 的影响, 以研究其稳定 ECM 从而抑制肺血管结构重建的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

二级雄性 SD 大鼠由本院实验动物中心提供, 兔抗大鼠多克隆抗体 MMP-2, MMP-9 (Santa Cruz 公司产品)、SABC 试剂盒以及 MMP-2, MMP-9 多聚寡核苷酸探针购自武汉博士德生物工程有限公司, ALKPHOS 标记二抗 (美国 Pharmingen 公司产品) 购自深圳晶美生物工程有限公司。羟脯氨酸检测试剂盒、NO-2/NO-3 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。葛根素注射液为浙江康恩贝制药股份有限公司产品, 批号: 228901。其余均为市售分析纯试剂。

1.2 慢性低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠模型的复制及动物处理

雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 (180 ~ 220) g, 随机分成 3 组, 每组 10 只: 正常对照组 (NC 组)、低氧高二氧化碳 4 周组 (HH 组), 低氧高二氧化碳 4 周 + 葛根素组 (HP 组), 每天低氧前葛根素腹腔注射 (20 mg · kg⁻¹)。将后 3 组动物放入常压低氧高二氧化碳舱内, 舱内吸入气氧浓度为 9% ~ 11%, CO₂ 浓度为 5% ~ 6%, 每天 9 h, 每周 6 d。对照组大鼠除吸入空气外, 其他饲养条件与低氧组相同。

动物饲养到规定时间后, 用戊巴比妥钠 (35

mg · kg⁻¹, ip) 麻醉。右心导管法测量肺动脉压力, 用 SJ-42 型四道生理记录仪记录肺动脉压力波, 计算肺动脉平均压 (mPAP)。左颈总动脉插管测颈动脉压 (mCAP) 后取血 4 mL, 分别注入预冷含 10% EDTA 二钠 30 μL、抑肽酶 40 μL 及含肝素 40 μL 的两个试管中, 混匀, 离心 (4 °C, 2 000 × g, 10 min), 取上清, -70 °C 保存备测。放血处死动物, 迅速剪开胸腔取出右下肺, 部分即置于液氮内冷冻待测, 余肺置于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片。剪去右心房组织, 沿室间隔边缘剪下右心室, 分别称取右心室游离壁 (RV) 和左心室加室间隔 (LV + S) 的重量, 并计算 RV/(LV + S) 的重量比, 作为右室肥大的指标。

1.3 光镜标本制作及观察

取右下肺, 常规石蜡制片 (NC, HH 和 HP 组各 8 只), Weigert 弹力纤维染色, 每张切片随机选直径 50 ~ 200 μm 肺细小动脉五支, 用图像分析仪心肺血管分析软件 (华东理工大学研制) 测定肺细小动脉管壁面积/管总面积 (vessel wall area/total area, WA/TA)、管腔面积/管总面积 (vessel lumen area/total area, EA/TA) 和肺细小动脉平均中膜厚度 (mean media thickness in pulmonary arterioles, mMTPA)。

1.4 一氧化氮代谢产物 (NO₂-/NO₃-) 含量的测定

采用放免法测定肺匀浆中 ET-1 含量 (试剂盒由北京北免东雅研究所提供), 于 FL-2008G 自动 γ 免疫计数仪中测定放射活性。采用硝酸还原酶法测定血浆 NO₂-/NO₃-含量 (试剂盒购自南京建成生物工程研究所)。均按说明书操作。

1.5 肺匀浆羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyr) 含量测定

采用氯胺 T 法, 具体实验方法按照试剂盒说明书操作。

1.6 肺组织匀浆 MMP-2, MMP-9 含量测定

采用我院分子生物实验中心建立的痕量蛋白酶

免疫杂交分光光度法,即改良的 Western blot 法^[6]。肺组织冰浴匀浆取上清,先用一抗捕获上清中的欲检蛋白,再用碱性磷酸酶标记的二抗结合欲检的免疫复合物,经分离、纯化和浓缩后检测试液中碱性磷酸酶的含量,实验数据从 752 分光光度计上读取。

1.7 MMP-2、MMP-9 的免疫组化检测(SABC 法)

肺组织石蜡切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢室温处理 10 min,滴加一抗(1:180),37℃孵育 1 h,再滴加二抗, SABC,3,3-二氨基苯联胺(DAB)显色,阳性结果呈棕黄色。随机选取直径 50~200 μm 的肺内动脉 10 条,用图像分析仪心肺血管分析软件(华东理工大学研制)检测所选血管管壁平均吸光度值作为 MMP-2、MMP-9 的相对含量。

1.8 肺细小动脉 MMP-2、MMP-9 的组织原位杂交

1.8.1 寡核苷酸探针:地高辛标记的多聚寡核苷酸探针序列, MMP-2:①5'- GTTGC AGCTC TCCTT GGGGC AGCCA TAGAA - 3'; ②5'- GGAAG CGGAA TGGAA ACTTG CAGGG CTGTC - 3';③5'- CCAAA CTTCA CGCTC TTCAG ACTTT GGTTC - 3'。MMP-9:①5'- GCTAT CCAGC TCACC GGTCT CGGGC AGGGA - 3'; ②5'- GGGAA GACGC ACAGC TCTCC CGCCG AGTTG - 3';③5'- TAGGT CACGT AGCCC ACTTG GTCCA CCTGG - 3'。

1.8.2 杂交过程 石蜡切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢室温处理 10 min 去除内源性过氧化物酶,柠檬

表 1 慢性低氧高二氧化碳及葛根素对大鼠肺动脉平均压、颈动脉平均压、右心室肥大和肺血管结构的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab 1 Effect of hypoxia-hypercapnia and puerarin on mPAP,mCAP,RV/(LV+S),WA/TA,EA/TA ,PAMT of rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	mPAP/mmHg	mCAP/mmH	RV/LV+S	WA/TA	EA/TA	PAMT
NC	11.26±0.97	135.8±7.2	0.20±0.04	0.46±0.08	0.55±0.08	17.25±3.06
HH	21.76±1.36 ¹⁾	131.9±4.5	0.42±0.07 ¹⁾	0.70±0.10 ¹⁾	0.31±0.10 ¹⁾	33.05±2.85 ¹⁾
HP	12.55±0.9 ²⁾	133.5±7.5	0.23±0.03 ²⁾	0.49±0.22 ²⁾	0.52±0.11 ²⁾	18.21±3.12 ²⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与低氧高 CO₂ 组比较,²⁾ $P < 0.01$,
Note:Compared with control group,¹⁾ $P < 0.01$;compared with hypoxic hypercapnia group,²⁾ $P < 0.01$

2.3 葛根素对肺组织匀浆 Hyr 含量的影响

肺组织匀浆 Hyr 含量低 O₂ 高 CO₂ 组高于正常

对照组($P < 0.01$),葛根素组低于低 O₂ 高 CO₂ 组, ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 慢性低 O₂高 CO₂及葛根素对大鼠肺匀浆 Hyr,NO,MMP-2,MMP-9 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effect of hypoxia-hypercapnia and puerarin on Hyr,MMP-2,MMP-9,TIMP-2 of pulmonary tissue in rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	Hyr/mg · g ⁻¹	NO/umol · L ⁻¹	MMP-2/U · mL ⁻¹	MMP-9/U · mL ⁻¹
NC	3.9±0.6	17.2±3.2	13.59±1.96	14.28±2.63
HH	15.3±1.2 ¹⁾	10.5±2.1 ¹⁾	32.00±4.59 ¹⁾	29.16±3.14 ¹⁾
HP	7.6±1.4 ²⁾	15.9±2.5 ²⁾	14.26±1.83 ²⁾	16.55±3.21 ²⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与低氧高 CO₂ 组比较,²⁾ $P < 0.01$,
Note:Compared with control group,¹⁾ $P < 0.01$;compared with hypoxic hypercapnia group,²⁾ $P < 0.01$

2.4 肺组织匀浆 MMP-2、MMP-9 含量的变化

肺组织匀浆 MMP-2、MMP-9 含量低 O₂ 高 CO₂

组高于正常对照组($P < 0.01$)。葛根素组肺组织匀浆 MMP-2、MMP-9 含量皆低于低 O₂ 高 CO₂ 组($P <$

酸稀释的胃蛋白酶消化,滴加探针,封闭,滴加鼠抗地高辛,滴加生物素化羊抗兔 IgG,DAB 显色,阳性结果呈棕黄色。图像分析软件检测 MMP-2、MMP-9 mRNA 相对含量,方法同“1.7”部分。

1.9 统计学方法

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 软件进行组间 t 检验。

2 结果

2.1 葛根素对肺动脉平均压(mPAP),RV/LV+S 及平均颈总动脉压(mCAP)的影响

随着低氧时间的延长 mPAP,RV/LV+S 逐渐升高,低 O₂ 高 CO₂ 组高于正常对照组($P < 0.01$)。而 HP 组 mPAP,RV/LV+S 低于 HH3 周组($P < 0.01$)。各组间 mCAP 无变化($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 肺细小动脉显微结构的变化

正常对照组肺细小动脉内弹力板自然弯曲,管壁均匀一致;低氧高二氧化碳组内弹力板扭曲,中膜平滑肌层明显增厚,平滑肌细胞增生,可见玻璃样变,管壁厚薄不均,管腔偏心状;葛根素用药组内弹力板扭曲明显减轻,中膜平滑肌层变薄,管壁均匀一致。WA/TA,mMTPA 低氧高二氧化碳组较正常对照组明显增高($P < 0.01$),EA/TA 明显降低($P < 0.01$);葛根素用药组 WA/TA,mMTPA 较低氧高二氧化碳组明显减轻($P < 0.01$),EA/TA 明显增高($P < 0.01$)。见表 1。

0.01)。见表2。
2.5 葛根素对肺组织匀浆 NO 含量的影响
低 O₂ 高 CO₂ 组血浆 NO 明显低于正常对照组 ($P<0.01$),葛根素组 NO 含量较低 O₂ 高 CO₂ 组升高 ($P<0.01$)。见表2。

2.6 葛根素对肺细小动脉 MMP-2 ,MMP-9 相对含量的影响

肺细小动脉 MMP-2 ,MMP-9 平均吸光度值低, O₂ 高 CO₂ 组高于正常对照组 ($P<0.01$)。葛根素用药组肺细小动脉 MMP-2、MMP-9 平均吸光度值都

表3 各组肺细小动脉 MMP-2、MMP-9 和 MMP-2mRNA、MMP-9mRNA 平均吸光度的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 3 Changes of MMP-2,MMP-9 and their mRNA in pulmonary arterioles of rats chronically exposed to hypoxia-hypercapnia ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组 别	平均吸光度			
	MMP-2	MMP-9	MMP-2mRNA	MMP-9mRNA
NC	0.045 ± 0.007	0.050 ± 0.003	0.058 ± 0.006	0.059 ± 0.012
HH	0.191 ± 0.012 ¹⁾	0.211 ± 0.013 ¹⁾	0.201 ± 0.009 ¹⁾	0.204 ± 0.017 ¹⁾
HP	0.096 ± 0.008 ²⁾	0.089 ± 0.007 ²⁾	0.101 ± 0.006 ²⁾	0.096 ± 0.009 ²⁾

注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与低氧高 CO₂组比较,²⁾ $P<0.01$,
Note:Compared with control group,¹⁾ $P<0.01$;compared with hypoxic hypercapnia group,²⁾ $P<0.01$

3 讨论

肺动脉高压时,ECM 包括胶原、弹性蛋白、糖蛋白如腱蛋白 (tenascin, TN)、纤维连接蛋白等 (fibronectin, FN)^[3-4] 等的沉积增多是肺血管重建的重要组织学特征之一。MMPs 作为降解 ECM 最重要的一类酶体系,在肺动脉高压和肺血管重建的发生发展中起重要作用,Tozzi、Thakker^[5-6] 等却在大鼠低氧后常氧恢复中发现肺血管 MMP-3,TIMP-1 表达升高,通过降解低氧时肺血管壁堆积的 ECM 而改善肺血管重建。

葛根素系豆科植物野葛干燥根中的提取物,其主要成分为 8-D-吡喃葡萄糖-4,7-二羟基异黄酮甙,具有抗凝、改善微循环及减轻氧自由基损伤^[7-8] 等作用。本实验发现葛根素能显著降低慢性低 O₂ 高 CO₂ 大鼠 mPAP。光镜下发现葛根素组大鼠肺小动脉中膜平滑肌细胞增生、管壁增厚及血管腔狭窄程度皆较慢性低 O₂ 高 CO₂ 组明显减轻,提示葛根素具有明显地抑制肺动脉高压及肺血管重建的作用。实验中还发现,葛根素可明显降低慢性低 O₂ 高 CO₂ 大鼠肺匀浆 H₂O₂ 含量,抑制肺血管壁 I 型胶原及 I 型前胶原 mRNA 含量的增加,减少肺血管壁胶原堆积从而改善肺血管重建。

本实验发现葛根素能明显降低低 O₂ 高 CO₂ 大鼠肺小动脉 MMP-2,MMP-9 的含量,考虑其降低肺

低于低 O₂ 高 CO₂ 组 ($P<0.01$)。见表3。
2.7 葛根素对肺细小动脉 MMP-2mRNA、MMP-9mRNA 相对含量的影响

正常对照组肺细小动脉管壁 MMP-2、MMP-9 染色浅淡,肺细小动脉 MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA 平均吸光度值低 O₂ 高 CO₂ 组较正常对照组高 ($P<0.01$)。葛根素组肺细小动脉 MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA 平均吸光度值低于低 O₂ 高 CO₂ 周组 ($P<0.01$),见表3。葛根素组肺细小动脉管壁染色明显较低 O₂ 高 CO₂ 周组浅淡。

动脉高压,改善肺血管壁胶原堆积与干预基质金属蛋白酶表达有关。通过调节肺血管 MMPs 的表达抑制 ECM 的沉积。有关国外研究发现细胞内钙离子拮抗剂明显抑制 MMPs 的分泌。Gurjar 等^[9] 研究发现 NO 通过抑制转录因子 NF-KB 的活化来抑制 MMP-2、MMP-9 的表达。氧自由基能够激活 MMPs。国内研究表明葛根素具有钙拮抗剂样作用^[10]、抑制氧自由基、升高高血压患者血浆 NO、降低 ET-I 水平^[11-12]。本实验室先期工作也发现葛根素能够明显升高低 O₂ 高 CO₂ 大鼠血浆 NO 水平、降低 ET-I 含量,抑制氧自由基的产生,故认为葛根素可能通过钙离子拮抗使细胞内钙离子水平降低、抑制氧自由基的产生和升高 NO 水平等作用,减少 MMPs 的分泌,稳定 ECM 的合成与降解平衡,从而改善肺血管重建。

REFERENCES

[1] GONG YS, LI JW, YANG PL. Effect of puerarin on pulmonary arterioles wall collage metabolism of chronic hypoxiahypercapnia rats[J]. Chin J Pathophysiol, 2003,19(9):1261-1264
[2] XU ZJ, WU ZY, YU LS. Changes of plasme endothelin and pulmonary arteriolar micromorphometric indexes in pulmonary hypertensive rats induced by hypoxia and hypercapnia[J]. Chin J Pathophysiology, 1997,13(4):383-385.
[3] TODOROVICH-HUNTER L, JOHNSON D J, RANGER P, et al. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive

- pulmonary hypertension induced by monocrotaline; a biochemical and ultrastructural study[J]. Lab Invest, 1988, 58(2): 184-195.
- [4] PROSSER I W, STENMARK K R, SUTHAR M, et al. Regional heterogeneity of elastin and collagen gene expression in intralobar arteries in response to hypoxic pulmonary hypertension as demonstrated by in situ hybridization[J]. Am J Pathol, 1989, 135(6): 1073-1088.
- [5] TOZZI C A, THAKKER V S, BANNETT R F, et al. Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 18(4): 497-510.
- [6] THAKKER V S, TOZZI C, POLLANI G J, et al. Expression of matrix-degrading enzymes in pulmonary vascular remodeling in the rat[J]. Am J Physiol, 1998, 275 (2 Pt 1): L398-406.
- [7] ZHU QL, LU XR. Research of Pharmacologic actions and clinical application on puerarin[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1997, 28(11): 693-695.
- [8] TAO ZH. Research of new drug puerarin[J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 1993, 2(6): 1-3.
- [9] SPRINGMAN E B, ANGELTON E L, BIRKEDAL H, et al. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase; evidence for the role of a Cys 73 active site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(1): 364-368.
- [10] CHEN JB, HUANG CX, LI GS. Influence of puerarin on K^+ and Ca^{2+} in reperfusion Injury cardiac myocytes[J]. Chin Crit Care Med(中国危重病急救医学), 1999, 11(1): 48-49.
- [11] HUAN ZQ, WU W, HUANG YS. Effects of puerarin on plasma endothelin and nitric oxide in patients with essential hypertension[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 1999, 16(3): 13-15.
- [12] KUANG ZY, WU W, HUANG YS. Effects of Puerarin, Radix Salviae Miltiorrhizae and Ligustrazine Injections on the Level of Hydroxy-free Radicals[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 1998, 9(2): 92.

收稿日期: 2008-01-20