

氯沙坦短期用药对高血压前期大鼠血压和心肌的后效应

朱岫芳¹,石根勇²,王 静¹,周少林¹,杨友田¹

(1. 盐城卫生职业技术学院药学院 江苏盐城 224001; 2. 江苏省疾病预防控制中心毒理室 江苏南京 210000)

摘要:目的 观察氯沙坦短期用药对高血压前期大鼠血压和心肌的影响。方法 24 只 4 周龄雄性自发性高血压大鼠均分 3 组, A 组给生理盐水(NS), B 组于 4 周龄时给 20 mg/kg 氯沙坦, C 组于 12 周龄时给 20 mg/kg 氯沙坦; 另取 8 只 4 周龄雄性京都种 Wistar 大鼠为 D 组, 给 NS 作为正常对照。各组均每天 1 次灌胃给药持续 4 周, 停药后随访观察至 24 周。各鼠分别于 4、8、12、16、20 及 24 周龄时采用尾套法测尾动脉收缩压(SBP); 24 周龄时断头取标本, 称质量法测右心室质量/体质量比(RVW/BW)全心质量/体质量比(HW/BW)、左心室质量/体质量比(LVW/BW); 苏木素-伊红(HE)染色法观察心肌组织形态学变化, 测心肌细胞横断面面积; 放射免疫法测血浆与心肌的血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)和醛固酮(Aldo)水平。结果 SBP 在 8 周龄时 A、C 组明显高于 D 组($P < 0.05$); B 组明显低于 A 组($P < 0.05$), 停药后, B 组 SBP 上升缓慢, 直至 24 周龄时均持续低于 A 组($P < 0.05$), 也明显低于 C 组($P < 0.05$); C 组 16 周龄时 SBP 明显低于 A 组($P < 0.05$), 但仍明显高于 D 组, 且在停药后迅速上升, 至 24 周龄时与 A 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。LVW/BW、HW/BW 及心肌细胞面积, A 组较 D 组明显增加($P < 0.05$), B、C 组较 A 组明显减少或减小($P < 0.05$), B 组较 C 组明显减少或减小($P < 0.05$)。心肌细胞横断面切片光镜下观察, A 组较 D 组心肌细胞肥大、细胞间距增宽和间质纤维增生明显, B 组与 D 组近似, C 组介于 B 组与 A 组之间。血浆与心肌的 AngⅡ和 Aldo 水平, A 组较 D 组明显增高($P < 0.05$), B 组较 A、C 组明显降低($P < 0.05$)。结论 氯沙坦短期用于高血压前期大鼠可获取降压和抗心室重构的后效应。

关键词: 氯沙坦; 高血压; 短期用药; 后效应

中图分类号: R544.1; R972

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)28-3763-03

The after-effect of short-term use of losartan on blood pressure and myocardium in prehypertension rats

Zhu Xiufang, Shi Genyong, Wang Jing, Zhou Shaolin, Yang Youtian

(1. Department of Pharmacy, Yancheng Health Vocational and Technical College, Yancheng, Jiangsu 224006, China; 2. Department of Toxicology, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

Abstract: Objective To observe the influence of losartan on rats' blood pressure and myocardium. Methods To randomly divide 24 4-year-old spontaneously hypertensive male rats into 3 groups. Group A is given normal saline(NS); group B is given losartan 20 mg/kg in 4-week-old; group C is given the same dose in 12-week-old; To take another 4-week-old male wistar rats to form group D, feed NS served as normal comparison. Each group was given NS or losartan one time each day through intragastric administration for 4 weeks. Follow up 24 weeks after stopping the medicine. Rats' SBP were measured through tail cuff method respectively when at 4, 8, 12, 16, 20 and 24 weeks' time. After 24 weeks, cut off the head to take the sample, the RVW/BW, HW/BW, LVW/BW were measured through weighing method. To observe the morphologic change of the cardiac muscles and measure the area of myocardium cell cross section through HE stain method. Radioimmunoassay was used to measure the AngⅡand Aldo level of the blood plasma and myocardium. Results At the age of eight-week, the SBP of group A and C are higher than those of group D($P < 0.05$), group B significantly lower than group A. After stopping the medicine, SBP of group B is slowly increasing and still lower than group A($P < 0.05$) as well as group C ($P < 0.05$) until the 24th week. At the 16th week, SBP of group C is significantly lower than that of group A($P < 0.05$) but higher than group D, but quickly increases after stopping the medicine till the 24th week and there is no significant difference between group A and C($P > 0.05$). About LVW/BW, HW/BW and the area of myocardium cell cross section, group A increased significantly in comparison with group D ($P < 0.05$), group B and C decreased in comparison with group A($P < 0.05$), group B decreased significantly in comparison with group C($P < 0.05$). Through the observation of the area of myocardial cell cross section under the microscopy, group A increased significantly in comparison with group D about myocardial cell fattened and the gap between cells are widened, the fibers of mesenchyma proliferates. group B and D are similar, group C is between group B and A. The level of AngⅡand Aldo in plasma and myocardium of group A increased significantly in comparison with group D ($P < 0.05$), group B decreased significantly in comparison with group A and C($P < 0.05$). Conclusion To use losartan for a short time in treating rats with prehypertension can get the after-effect of reducing blood pressure and anti-ventricular-remodeling.

Key words: losartan; hypertension; short-term medication; after-effect

2003 年美国高血压预防、检测、评估与治疗联合委员会第 7 次报告将血压在 120~139/80~89 mm Hg (1 mm Hg = 0.133kPa) 水平定义为“高血压前期”, 2005 年新修版中国高血压防治指南称之为“正常高值血压”, 这是正常血压与高血压之间的临界状态, 流行病学调查表明我国成年人处在这一状态

的比例达 44%~60% (>2.4 亿人), 其中约 45% 在 10 年后发展为高血压, 且常伴有胰岛素抵抗和血脂代谢等异常^[1-2]。故在高血压前期进行早期干预, 阻止其向高血压方向进展是极为必要的, 已有研究表明^[3-5], 给予血管紧张素系统抑制剂短期治疗幼年期自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat,

SHR),可有效地延缓血压进展并保护靶器官,这对于完善高血压前期的干预策略具有极其重要的意义。因此,本研究从不同角度观察比较血管紧张素受体阻断药(angiotensin receptor blockers, ARB)氯沙坦用于不同周龄自发性高血压大鼠后对其血压和心肌的后续影响,探索其作用机制,以期对高血压前期的有效干预提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 动物与药品 4周龄雄性自发性高血压大鼠和 Wistar 京都种大鼠(Wistar-Kyoto rat, WKY),体质量 110~120 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供;氯沙坦钾(商品名:科素亚, 50 mg/片,杭州默沙东制药有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与饲养 24只4周龄雄性自发性高血压大鼠随机均分为3组。A组给生理盐水(NS),B组于4周龄时给 20 mg/kg 氯沙坦,C组于12周龄时给 20 mg/kg 氯沙坦,另取8只4周龄雄性 WKY 大鼠为 D组,给 NS 作为正常对照。各组均每天1次灌胃给药持续4周,停药后随访观察至24周。每4~6只大鼠1笼,在恒温(22±2)℃、恒湿(55±5)%、通风良好、人工光照明暗各12h的室内饲养,自来水与标准饲料自由取用。各组大鼠于24周龄时禁食不禁水12h后供标本取材。

1.2.2 尾动脉收缩压测定 各鼠分别于4、8、10、12、16、20及24周龄时测定尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)。采用鼠尾气囊+压力换能器血压仪,先将大鼠置入无创血压测定系统的固定器内,鼠尾外露并用40℃恒温水浸泡30min使变软,尾动脉充分扩张后,擦干鼠尾将大鼠移入血压测定系统的温箱内,将鼠尾穿过加压尾套并固定尾套于尾根部,使尾动脉与脉搏传感器紧密接触,同时观察显示器的脉搏波形,在动物安静(约30min)并出现稳定脉搏后尾套充气加压直至脉搏波消失,然后尾套自动放气,当再次出现脉搏波时的血压值即为收缩压,重复测量3次取均值。

1.2.3 心肌指数测定 各鼠在称质量后断头取血,快速取出心脏,剪除血管、心房和瓣膜,分离左右心室,以预冷的 NS 洗去血液且滤纸吸去表面水分后,以电子天平精确称取左右心室与全心质量,计出右心室质量/体质量比值(RVW/BW)、左心室质量/体质量比值(LVW/BW)和全心质量/体质量比(HW/BW)。

1.2.4 心肌细胞横断面的形态观察与面积测定 取左室中段心肌组织,以10%甲醛溶液固定、乙醇梯度脱水再石蜡包埋、切片、行苏木素-伊红(HE)染色。选择横断心肌的切片放大200倍,镜下观察,用BI-2000医学图像分析系统测左室心肌细胞面积,每一标本选取6个视野测定后取平均值。

1.2.5 血浆与心肌的血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 和醛固酮(aldosterone, Aldo)水平测定 取血1mL置于预冷的加有酶抑制剂(含0.34 M 二巯基丙醇 10 μL、0.32 M 8-羟基喹啉 5 μL 和 0.30 M 乙二胺四乙酸 10 μL)的试管中,另取1mL血加入含肝素的抗凝试管中。混匀后以4℃、3 000 r/min 离心10 min,取上清液,-70℃保存,留测血浆 Ang II 和 Aldo 水平。称取100 mg 心肌组织加入预冷生理盐水(含有酶抑制剂)1 mL 匀浆,煮沸10 min,3 000 r/min 离心20 min 后取上清液,-70℃保存,留测心肌组织 Ang II 和 Aldo 水平。均采用放射免疫法检测血浆与心肌 Ang II、Aldo 水平,按试剂盒(北京北方生物技术有限公司)内说明书步骤操作,以 SN-682B-3 型放射免疫 γ 计数器记录结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件处理数据,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组尾动脉 SBP 比较 SBP 在4周龄时各组间均无明显差异($P > 0.05$);8周龄时 A、C 两组升至 180 mm Hg 以上,明显高于 D 组($P < 0.05$);B 组仍在正常水平,与 D 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),明显低于 A 组($P < 0.05$),停药后,B 组 SBP 上升缓慢,直至24周龄时均持续低于 A 组($P < 0.05$),也明显低于 C 组($P < 0.05$),但高于 D 组;C 组16周龄时 SBP 明显低于 A 组($P < 0.05$),但仍明显高于 D 组($P < 0.05$),并在停药后迅速上升,至24周龄时与 A 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图1。

2.2 各组心肌指数比较 心肌指数 LVW/BW、HW/BW, A 组较 D 组明显增加($P < 0.05$),B、C 组与 A 组比较明显降低($P < 0.05$),B 组与 C 组比较明显降低($P < 0.05$),RVW/BW 各组间比较均无明显差异($P > 0.05$),见图2。

2.3 心肌细胞横断面的形态与面积 心肌细胞横断面切片光镜下形态观察,A 组与 D 组比较,心肌细胞肥大、细胞间距增宽和间质纤维增生明显;B 组与 D 组近似;C 组细胞形态介于 B 组与 A 组之间。心肌细胞横断面面积,A 组与 D 组比较明显增加($P < 0.05$),B、C 组与 A 组比较明显降低($P < 0.05$),B 组与 C 组比较明显降低($P < 0.05$),见图3、4。

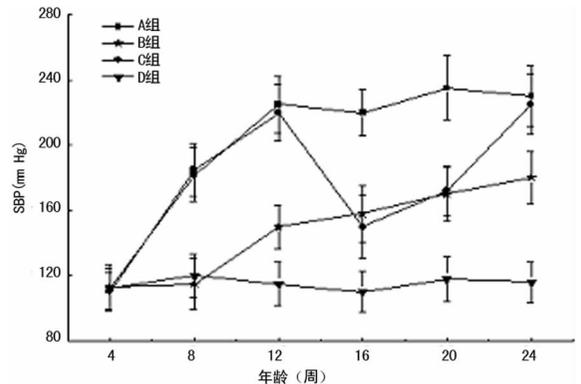
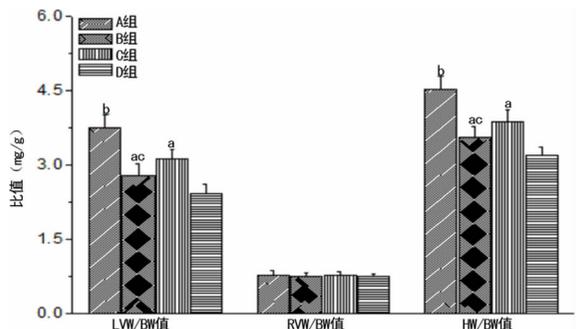


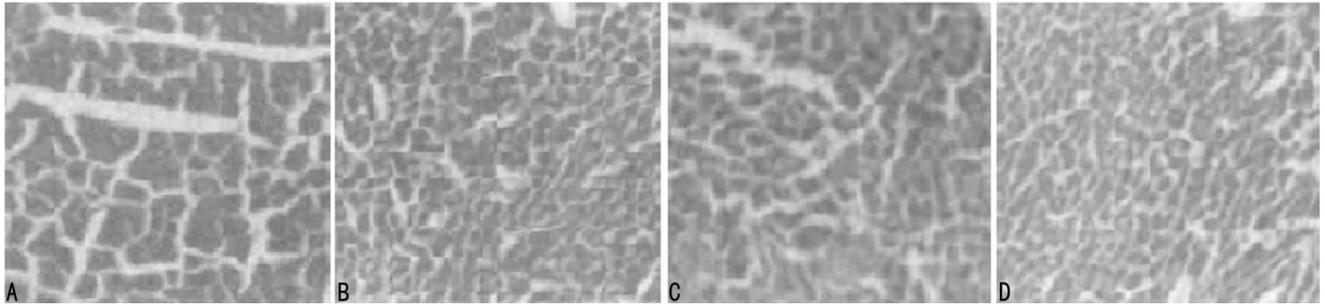
图1 各组大鼠不同周龄尾动脉 SBP 的变化($n=8$)



^a: $P < 0.05$,与 A 组比较;^b: $P < 0.05$,与 D 组比较;^c: $P < 0.05$,与 C 组比较。

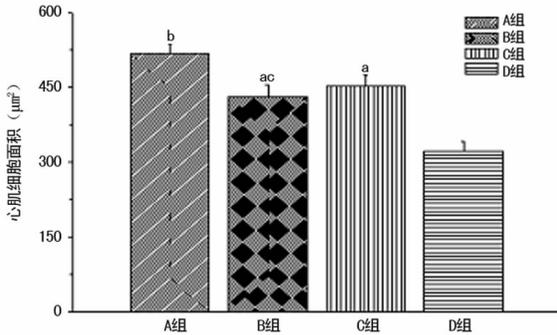
图2 24周龄时各组大鼠心肌指数的比较($n=8$)

2.4 血浆与心肌的 Ang II 和 Aldo 水平 24周龄时血浆、心肌中 Ang II 和 Aldo 水平,A 组与 D 组比较明显增高($P < 0.05$),B 组与 A 组比较明显降低($P < 0.05$),B 组与 C 组比较明显降低($P < 0.05$),见图5、6。



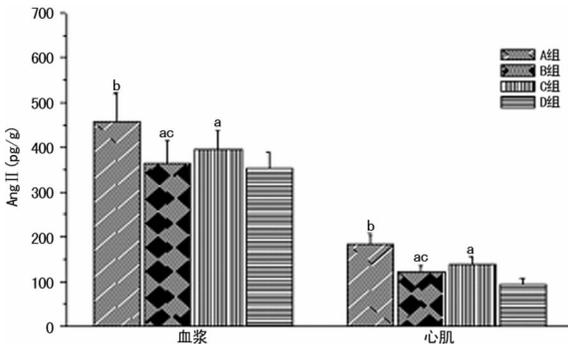
A:A组;B:4周龄B组;C:12周龄C组;D:D组

图3 各组大鼠心肌细胞 HE 染色后的形态观察(×200)



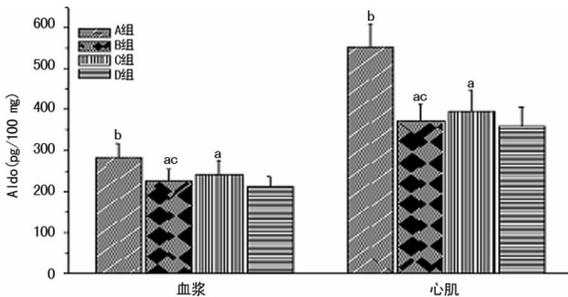
a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; b: $P < 0.05$, 与 D 组比较; c: $P < 0.05$, 与 C 组比较。

图4 24周龄时各组大鼠心肌细胞面积的比较(n=8)



a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; b: $P < 0.05$, 与 D 组比较; c: $P < 0.05$, 与 C 组比较。

图5 24周龄时各组大鼠血浆和心肌的 Ang II 水平(n=8)



a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; b: $P < 0.05$, 与 D 组比较; c: $P < 0.05$, 与 C 组比较。

图6 24周龄时各组大鼠血浆和心肌的 Aldo 水平(n=8)

3 讨论

自发性高血压大鼠是 1963 年日本学者 Okamoto 等通过对 WKY 中血压自然偏高的个体选择培育形成, 研究表明, 自发性高血压大鼠在 4~5 周龄时血压维持正常, 以后逐渐升高,

在 10~12 周龄左右血压将持续稳定于 200 mm Hg 以上, 故自发性高血压大鼠在 4~10 周龄即相当于高血压前期, 之后即相当于成人的临床高血压期, 目前其已被作为研究高血压前期和高血压的常用模型。ARB 氯沙坦的降压作用早已被基础研究和临床研究所证实, 本研究主要观察其对高血压前期短期用药的后效应。结果表明, 在 4 周龄幼年期即高血压前期短暂用药, 可使停药后的血压上升缓慢, 且血压值与同龄不予干预组和成年后给药组的大鼠比较均明显降低。研究结果还表明, 高血压前期短期用药, 其后的心肌指数、心肌细胞横断面面积、血浆与心肌的 Ang II 和 Aldo 水平等均明显低于不予干预大鼠, 也低于成年后给药大鼠。研究结果显示氯沙坦短暂用于幼年高血压前期大鼠可获取停药后降压、抗心室重构的后效应。关于氯沙坦停药后存在后效应的机制目前存在着不同的解释。研究显示, 自发性高血压大鼠的循环 Ang II 和 Aldo 水平均明显高于 WKY 大鼠, 表明其肾素-Ang-Aldo 系统活性明显高于 WKY, 由此多数观点^[6-7]认为氯沙坦的作用可能与“肾素-血管紧张素 (renin-angiotensin system, RAS) 系统阻断记忆”相关, 自发性高血压大鼠青春期为高血压发生的“关键时期”, 此时血压升高与血管肥厚之间存在着由 RAS 介导的“肾血管放大”效应, 即血压升高导致阻力血管重构、肾小球灌注减少、肾素合成增多, RAS 的激活又进一步升高血压, 加重血管的肥厚, 呈往复循环。而氯沙坦早期应用通过阻断 Ang II 作用, 降低血压、减轻阻力血管肥厚, 从而打断了这种恶性循环^[6-8]。本研究结果所显示的血浆与心肌局部 Ang II 和 Aldo 水平的组间差异也证实了这个观点。

高血压前期人群是我国高血压的易感人群和心脑血管病的高危人群, 也是我国目前和今后高血压防治的关键人群。对于这个群体采用绿色的生活方式干预已经成为共识, 然而, 是否在此基础上加用药物干预, 这是目前尚在争论的问题^[9-10, 2]。处在高血压前期阶段的人群在我国是一个较为庞大的社会群体, 无论选择怎样的干预策略, 都将是波及广泛、影响巨大的。启动药物持续干预不仅涉及个体的差异性、依从性以及药物作用的两重性等问题, 还涉及资源、经费等若干的社会问题。如果能对这个群体选择性制定短期用药策略, 而能获得持久的用药后效应, 这将对心血管疾病的防治具有不可估量的意义。是否可行, 还需要更多地研究探索。

参考文献:

[1] 成丽娟, 张述萍, 刘芳, 等. 不同干预措施预防高血压前期人群发生高血压的效果[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19 (7): 652-657.
 [2] 朱岫芳, 季宏建, 李波, 等. 高血压前期(下转第 3768 页)

人工肝治疗肝功能衰竭及终末期肝病是目前研究的热点,但肝细胞来源是生物人工肝应用的瓶颈问题^[5];细胞移植又存在免疫排斥反应及移植后细胞不易存活等因素的影响。BMSC 在特定的条件下具有向肝细胞分化的潜能,且肝脏干细胞亦可能来源于骨髓干细胞^[6-7]。顾劲扬等^[8]发现猪 BMSC-肝细胞共培养能够促进肝细胞生长,因此体外共培养 BMSC-肝细胞有可能为生物人工肝的细胞来源提供新的途径。Yannak 等^[9]应用静脉注射 BMSC 培养基明显提高急性肝衰竭大鼠存活率,证实细胞培养基能有效治疗急性肝功能衰竭,提示干细胞分泌功能是治疗急性肝衰竭的重要机制,且旁分泌产生的各种细胞因子可能发挥了关键作用,利用细胞因子治疗有望为肝功能衰竭提供新的治疗途径。本实验通过 SD 大鼠 BMSC-肝细胞共培养,证实 BMSC 能够明显促进肝细胞增殖和延长肝细胞的生存时间,为解决生物人工肝细胞来源提供了新的实验依据。BMSC 除了可少量分化为相应组织细胞如肝细胞外,尚可合成 IL-6、IL-7、IL-8、IL-10 及粒细胞集落刺激因子 G(G-CSF)等多种细胞因子^[10-11]。董巧凤等^[12]证实 BMSC 在体外可以促进 Th2 细胞分泌 IL-10。本实验通过抗体芯片检测共培养上清液中的细胞因子,发现除 IL-10 升高外,IL-1、IL-6 亦明显升高,间接证实 IL 在治疗肝功能衰竭时发挥了重要作用,其机制可能与 IL-6、IL-10 促进多种细胞增殖,刺激细胞生长,促进细胞分化及 IL-10 发挥免疫抑制功能,间接抑制自然杀伤细胞(NK)活性有关。综上所述,BMSC-肝细胞共培养,BMSC 可能通过分泌 IL-1、IL-6 和 IL-10 促进肝细胞生长,延长肝细胞生存时间。通过体外共培养 BMSC-肝细胞有望为生物人工肝提供细胞来源,亦为利用细胞因子治疗肝功能衰竭提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(1):156-164.
- [2] Sakaida I, Terai S, Nishina H, et al. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis [J]. *Med Mol Morphol*, 2005, 38(4):197-202.
- [3] Seglen PO, Brinchmann MF. Purification of autophagosomes from rat hepatocytes [J]. *Autophagy*, 2010, 6(4):542-547.
- [4] Ponticelli C, Aroldi A. Osteoporosis after organ transplantation [J]. *Lancet*, 2001, 357 (9268):1623.
- [5] 王英杰. 人工肝在肝衰竭中的应用与评价 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2013, 16(1):20-21.
- [6] Bishi DK, Mathapati S, Cherian KM, et al. In vitro hepatic trans-differentiation of human mesenchymal stem cells using sera from congestive/ischemic liver during cardiac failure [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e92397.
- [7] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells [J]. *Science*, 1999, 284(5417):1168-1170.
- [8] 顾劲扬, 施晓雷, 张悦, 等. 骨髓间充质干细胞维持猪肝细胞形态与功能的实验研究 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2010, 16(2):130-133.
- [9] Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(1):108-119.
- [10] Rafii S, Meeus S, Dias S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13(1):61-67.
- [11] Haynesworth SE, Baber M, Caplan A. Cytokine expression by human marrow derived mesenchymal progenitor cells in vitro; effects of dexamethasone and IL-1 alpha [J]. *J Cell Physiol*, 1996, 166(3):585-592.
- [12] 董巧凤, 贺韦东, 尹哲, 等. 骨髓间充质干细胞的体外扩增及其对 T 淋巴细胞产生 IFN- γ 和 IL-10 的影响 [J]. *现代免疫学*, 2007, 27(2):140-144.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-06-12)

(上接第 3765 页)

- [1] 是否启动药物干预及怎样早期干预 [J]. *医学争鸣*, 2013, 35(3):23-26.
- [3] Baumann M, Janssen BJ, Hermans JJ, et al. Transient AT1 receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age [J]. *J Hypertens*, 2007, 25(1):207-215.
- [4] Baumann M, Megens R, Bartholome R, et al. Prehypertensive renin-angiotensin-aldosterone system blockade in spontaneously hypertensive rats ameliorates the loss of long-term vascular function [J]. *Hypertens Res*, 2007, 30(9):853-861.
- [5] Baumann M, Sollinger D, Roos M, et al. Prehypertensive preconditioning improves adult antihypertensive and cardioprotective treatment [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(3):1121-1126.
- [6] Ishiguro K, Sasamura H, Sakamaki Y, et al. Developmental activity of the renin-angiotensin system during the "critical period" modulates later L-NAME-induced hypertension and renal injury [J]. *Hypertens Res*, 2007, 30(1):63-75.
- [7] Sasamura H, Hayashi K, Ishiguro K, et al. Prevention and regression of hypertension: role of renal microvascular protection [J]. *Hypertens Res*, 2009, 32(8):658-664.
- [8] 杨宝峰. *药理学* [M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:201-208.
- [9] 夏碧桦, 冉群钗. 高血压前期患者血管功能损害的预警指标 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(4):681-683.
- [10] 吴寿岭, 钟吉文, 王丽晔, 等. 高血压前期人群中心脑血管事件发生情况及影响因素 [J]. *中华高血压杂志*, 2012, 20(3):247-251.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-06-22)