

[文章编号] 1000-4718(2007)04-0689-04

## 缬沙坦对阿霉素心肌病大鼠的心脏保护作用及机制研究

戚本玲<sup>1</sup>, 刘洪智<sup>2</sup>, 曹林生<sup>2</sup>, 成蓓<sup>1</sup>, 管思明<sup>1</sup>, 刘承云<sup>1</sup>, 张湖萍<sup>1</sup>, 何平<sup>1</sup>, 吴剑萍<sup>2</sup>  
(华中科技大学同济医学院附属协和医院<sup>1</sup>老年病科, <sup>2</sup>心内科, 湖北 武汉 430022)

**[摘要]** 目的: 探讨 AT<sub>1</sub> 受体阻滞剂缬沙坦对阿霉素心肌病(ADR-DCM)大鼠的心脏保护作用及其机制。方法: 雄性 Wistar 大鼠分 3 组:(1)阿霉素心肌病组(ADR-DCM,  $n=25$ ), 阿霉素 2.5 mg/kg, 尾静脉注射, 每周 1 次, 连续 10 周;(2)阿霉素心肌病+缬沙坦治疗组(ARB,  $n=10$ ), 缬沙坦 30 mg/kg, 每天 1 次, 灌胃治疗;(3)正常对照组(CON,  $n=10$ )。12 周时进行超声和血流动力学检测, 氯胺 T 法检测羟脯氨酸及胶原含量, Western 印迹分析检测 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 的表达, 明胶酶谱法检测 MMPs 活性。结果: ARB 组死亡率明显低于 ADR-DCM 组(20% vs 40%,  $P<0.01$ )。ADR-DCM 组大鼠左室内径大于 CON 组, 心功能明显低于 CON 组, ARB 组左室内径增加程度及心功能各项指标变化低于 ADR-DCM 组。ADR-DCM 组心肌羟脯氨酸及胶原含量高于 CON 组, ARB 组显著低于 ADR-DCM 组( $P<0.01$ )。ADR-DCM 组左室心肌 MMP-2、MMP-9 蛋白表达及 MMPs 明胶酶活性明显高于 CON 组( $P<0.01$ ), ARB 组 MMP-2、MMP-9 表达及活性明显低于 ADR-DCM 组( $P<0.01$ ), 而 TIMP-1 的表达在 3 组间均无显著差异( $P>0.05$ )。结论: 缬沙坦部分通过抑制 MMPs 表达及活性逆转 ADR-DCM 左室重构, 改善心功能。

**[关键词]** 多柔比星; 心肌疾病; 基质金属蛋白酶; 缬沙坦; 受体, 血管紧张素

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

### Valsartan protects a rat model of adriamycin - induced dilated cardiomyopathy from left ventricular remodeling and failure

QI Ben - ling<sup>1</sup>, LIU Hong - zhi<sup>2</sup>, CAO Lin - sheng<sup>2</sup>, CHENG Pei<sup>1</sup>, GUAN Si - ming<sup>1</sup>, LIU Cheng - yun<sup>1</sup>, ZHANG Hu - ping<sup>1</sup>, HE Ping<sup>1</sup>, WU Jian - ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Department of Geriatrics, <sup>2</sup> Department of Cardiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. E-mail: lzhimd@yahoo.com.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate whether and how AT<sub>1</sub> receptor blocker, valsartan, attenuates left ventricular remodeling and failure in a rat model of adriamycin (ADR) - induced dilated cardiomyopathy. **METHODS:** Weight - matched adult male Wistar rats were randomly divided into 3 groups as follows: 1) the ADR group, in which 2.5 mg/kg of ADR was weekly injected via a tail vein for 10 weeks ( $n=25$ ); 2) concomitant AT<sub>1</sub> receptor blocker valsartan and ADR, in which valsartan was administered by daily gavage at a dose of 30 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> ( $n=10$ ); 3) control group ( $n=10$ ). Hemodynamics and echocardiographic measurements were obtained at 12 weeks after treatment. Finally, left ventricle (LV) samples were collected at 12 weeks. The hydroxyproline content was determined by the methods of chloramines T. The expression of MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were measured by Western blotting. MMP-2 and -9 gelatinolytic activities were measured by gelatin zymography. **RESULTS:** Mortality was significantly lower in valsartan - treated rats than that in ADR rats (20% versus 40%,  $P<0.01$ ). The dilatation of LV cavity was significantly attenuated in ADR - induced dilated cardiomyopathy rats given valsartan. Valsartan partially normalized LV contractile function, which was significantly reduced in ADR rats. The hydroxyproline content was increased in ADR - DCM group and significantly reduced by valsartan treatment ( $P<0.01$ ). The protein levels of LV MMP-2 and MMP-9 were increased in ADR rats and attenuated by valsartan treatment (both  $P<0.01$ ). However, no change in TIMP-1 was observed ( $P>0.05$ ). The activities of LV myocardial MMP-2 and -9 gelatinolytic were increased significantly in ADR rats (both  $P<0.01$ ) and attenuated by valsartan treatment (both  $P<0.01$ ). **CONCLUSION:** Pretreatment with AT<sub>1</sub> receptor blocker valsartan attenuates left ventricular remodeling and failure in a rat model of adriamycin - induced dilated cardiomyopathy.

**[KEY WORDS]** Doxorubicin; Myocardial diseases; Matrix metalloproteinases; Valsartan; Receptors, angiotensin

[收稿日期] 2005-08-31 [修回日期] 2006-03-20

Tel: 027-85351555; E-mail: lzhimd@yahoo.com.cn

阿霉素(adriamycin, ADR)是一种高效、广谱抗肿瘤药物,其最严重的副作用是伴有充血性心力衰竭的扩张性心肌病,预后很差<sup>[1,2]</sup>,机制仍不很清楚。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是一组能特异地降解细胞外基质成分的锌依赖性的酶家族,有研究表明,MMPs参与阿霉素心肌病(adriamycin-induced dilated cardiomyopathy, ADR-DCM)左室重构和心力衰竭的发生发展<sup>[3,4]</sup>。另外,鉴于血管紧张素Ⅱ1型受体(angiotensinⅡ type1 receptor, AT1)部分介导ADR心肌损伤及MMPs表达活性的调控,本研究采用AT1受体阻滞剂缬沙坦对ADR-DCM大鼠进行干预,采用超声及血流动力学评价心功能,Western印迹方法检测ADR-DCM左室心肌中MMP-2、MMP-9及基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的表达,明胶酶谱法检测MMPs明胶酶活性,以探讨AT1受体阻滞剂缬沙坦能否逆转ADR-DCM大鼠左室重构,改善心功能,并进一步探讨其作用机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

健康成年雄性Wistar大鼠,60只,体重(260±38)g,由同济医科大学实验动物中心提供。阿霉素由浙江海门药业有限公司提供。缬沙坦由北京诺华制药有限公司馈赠。羟脯氨酸检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。山羊抗大鼠MMP-2、MMP-9及TIMP-1多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗山羊IgG、ECL免疫印迹发光试剂均购自美国Santa Cruz公司。明胶购自Sigma公司。

### 2 动物分组及模型制备

Wistar大鼠分3组:(1)阿霉素心肌病组(ADR-DCM,  $n=25$ ),参照Schwarz的方法,阿霉素2.5 mg/kg,尾静脉注射,每周1次,连续注射10周,注射完成后观察2周;(2)阿霉素心肌病+缬沙坦治疗组(ARB,  $n=25$ ),在首次注射ADR前2周开始给予缬沙坦每公斤体重每天30 mg灌胃治疗,一直持续到第12周;(3)正常对照组(CON,  $n=10$ ),用相同容量的生理盐水代替ADR,给药方法同ADR组。阿霉素注射完毕2周后,测量左室结构功能,然后处死动物,留取标本,置于-70℃液氮罐中冷冻保存,以检测其它指标。

### 3 心功能测定

3组大鼠分别于注射完成2周后(第12周),20%乌拉坦腹腔注射麻醉,进行经胸高频超声心动图(GE公司VIVID7彩色超声显像仪)检查,探头频

率为11.4 MHz。在二维切面上显示胸骨旁左心长轴,然后采用M型超声心动图方法分别测量左室收缩末期内径(LVESD)、舒张末期内径(LVEDD)和左室短轴缩短率(FS)。超声检查完毕后24-48 h,再次麻醉大鼠,颈动脉逆行插管到左心室,另一端通过压力换能器输入RM6000型多导生理记录仪,记录左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大上升速率(+dp/dt<sub>max</sub>)、左室内压最大下降速率(-dp/dt<sub>max</sub>)等。

### 4 氯胺T法检测羟脯氨酸及胶原含量

取冻存心肌,经脱水、烘干、称重、加6 mol/L盐酸酸解,离心后取上清,依次加入氯胺T、过氯酸、二氨苯甲醛等,实验步骤严格按照试剂盒说明书操作,最后一步用紫外分光光度计560 nm处测定吸光度(A)值,计算出羟脯氨酸含量,结果以mg/g心肌表示。心肌胶原含量等于羟脯氨酸含量乘以7.46。

### 5 Western印迹法检测大鼠左室心肌中MMP-2、MMP-9及TIMP-1的蛋白水平表达

参照文献<sup>[5]</sup>提取组织蛋白质,用Bradford检测法测定蛋白浓度后分装,置于-70℃保存备用。上样前加入5×SDS加样缓冲液煮沸10 min,20 μg蛋白质样品用10% SDS-PAGE分离后,350 mA恒流湿法电转移1h至硝酸纤维素膜(NC膜),5%脱脂奶粉室温封闭1 h,山羊抗大鼠MMP-2、MMP-9及TIMP-1多克隆抗体4℃过夜,TBS洗膜3次,辣根过氧化物酶标记的兔抗羊Ⅱ抗室温孵育1 h,洗膜3次,滴加免疫印迹发光试剂(ECL试剂)于NC膜上,室温反应5 min。在暗室内曝光,冲洗胶片。利用MGIAS-1000多媒体凝胶成像分析系统测量条带的吸光度值。各目的蛋白将正常对照组设定100作为标准,其它组别均可测得以正常对照为基准的相对灰度值。

### 6 明胶酶谱法(gelatin zymography)测定MMP-2及MMP-9的活性

制备8% SDS-PAGE胶为分离胶(含0.1%明胶),上覆4%的浓缩胶,取20 μL处理后的标本上样,40 mA恒流电泳,温度<4℃。电泳后凝胶置于洗脱液中振荡洗脱2次,每次45 min;置漂洗液(不含Triton X-100的洗脱液)漂洗2次,每次20 min;置于孵育液(50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 μmol/L ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij 35, pH值为7.6)中37℃孵育18 h。经染色液染色3 h,用脱色液脱色后,MMPs显示为位于蓝色背景上的透亮带。凝胶经UVP凝胶扫描仪扫描后存档,GelWorks1D Advanced v 4.01软件进行图像分析测定明胶酶消化条带吸光度值。

### 7 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件,数据资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间比较用单因素方差分析,两两比较用 *S-N-K* 法。

## 结 果

### 1 缬沙坦治疗提高阿霉素心肌病大鼠生存率

阿霉素心肌病组 (ADR-DCM) 大鼠 12 周累计死亡 10 只,死亡原因主要为充血性心力衰竭,生存率为 60%,ARB 组大鼠生存率为 80% ( $P < 0.01$ ),而正常对照组 (CON) 无 1 例死亡。

### 2 心脏超声及血流动力学测定结果

ADR-DCM 组左室收缩末期内径 (LVESD) 及舒张末期内径 (LVEDD) 大于 CON 组 (均  $P < 0.01$ ),左室短轴缩短率 (FS) 显著低于 CON 组 ( $P < 0.01$ ),左室收缩压 (LVSP)、左室内压最大上升速率 ( $+dp/dt_{max}$ )、左室内压最大下降速率 ( $-dp/dt_{max}$ ) 均显著低于 CON 组 (均  $P < 0.01$ ),左室舒张末压 (LVEDP) 明显高于 CON 组 ( $P < 0.01$ )。而 ARB 组左室内径扩大程度低于 ADR-DCM 组,心功能变化轻于 ADR-DCM 组,FS、LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 、 $-dp/dt_{max}$  高于 ADR-DCM 组,LVEDP 低于 ADR-DCM 组 (均  $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠超声心动图及血流动力学检测结果

Tab 1 The results of hemodynamics and echocardiographic measurements in different groups or rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Index	CON (n=10)	ADR-DCM (n=15)	ARB (n=8)
LVESD (mm)	2.8 ± 0.3	4.6 ± 0.3*	3.7 ± 0.4**
LVEDD (mm)	5.6 ± 0.3	6.6 ± 0.4*	6.0 ± 0.4#
FS (%)	50.6 ± 2.8	30.5 ± 1.4*	42.1 ± 2.9**
LVSP (mmHg)	131.1 ± 6.0	112.0 ± 6.0*	105.7 ± 4.8**
LVEDP (mmHg)	4.1 ± 0.4	22.6 ± 3.0*	13.8 ± 2.9**
$+dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	6 026.1 ± 184.0	4 073.1 ± 302.1*	5 134.0 ± 437.5**
$-dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	5 078.6 ± 217.0	2 885.5 ± 303.9*	3 845.0 ± 346.9**

\* $P < 0.01$  vs CON group; # $P < 0.01$  vs ADR-DCM group.

### 3 左室心肌羟脯氨酸及胶原含量

ADR-DCM 组左室心肌中羟脯氨酸及胶原含量高于 CON 组,ARB 组增加程度较低,见表 2。

表 2 各组大鼠左室心肌中羟脯氨酸及胶原含量变化

Tab 2 The hydroxyproline and collagen content of left ventricular myocardium in different groups or rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Index	CON (n=10)	ADR-DCM (n=15)	ARB (n=8)
(mg/g myocardium)			
Hydroxyproline	3.52 ± 0.89	5.86 ± 1.43*	4.68 ± 1.27**
Collagen content	26.26 ± 6.65	43.72 ± 10.70*	37.48 ± 9.85**

\* $P < 0.01$  vs CON group; # $P < 0.01$  vs ADR-DCM group.

### 4 左室心肌 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白表达

Western 印迹法检测结果显示,ADR-DCM 组左室心肌中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达显著高于 CON 组 ( $P < 0.01$ ),ARB 组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显低于 ADR-DCM 组 (均  $P < 0.01$ ),而 TIMP-1 蛋白表达组间没有显著差异 (均  $P > 0.05$ ),见图 1。

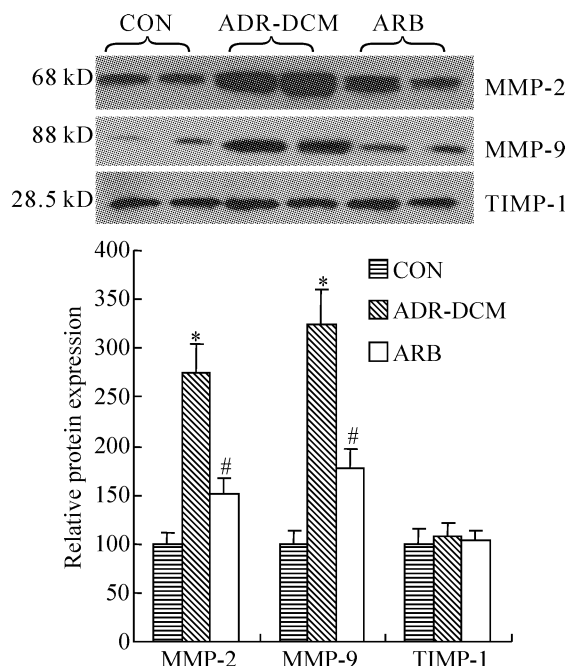


Fig 1 Protein expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 by Western blotting in different groups of rats.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . Compared with CON group, the expression of MMP-2 and MMP-9 in ADR-DCM group was significantly increased, \* $P < 0.01$ ; Compared with ADR-DCM group, the expression of MMP-2 and MMP-9 in ARB group was significantly decreased, # $P < 0.01$ ; but the expression of TIMP-1 did not change.

图 1 各组大鼠左室心肌 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达量比较

### 5 左室心肌明胶酶活性测定结果

明胶酶谱法检测结果显示,ADR-DCM 组左室心肌中 MMP-2、MMP-9 明胶酶活性均高于 CON 组 ( $P < 0.01$ ),ARB 组 MMP-2、MMP-9 明胶酶活性显著低于 ADR-DCM 组 (均  $P < 0.01$ ),见图 2。

## 讨 论

ADR 是临床常用的广谱抗肿瘤抗生素,对急性慢性白血病、恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌和胃癌等疗效较好,长期使用阿霉素治疗最严重的不良反应是伴有充血性心力衰竭的扩张性心肌病,而限制了其临床应用,其机制目前尚不十分明确<sup>[1,2]</sup>。因此,探讨阿霉素心肌病 (ADR-DCM) 的发病机制,寻找有效

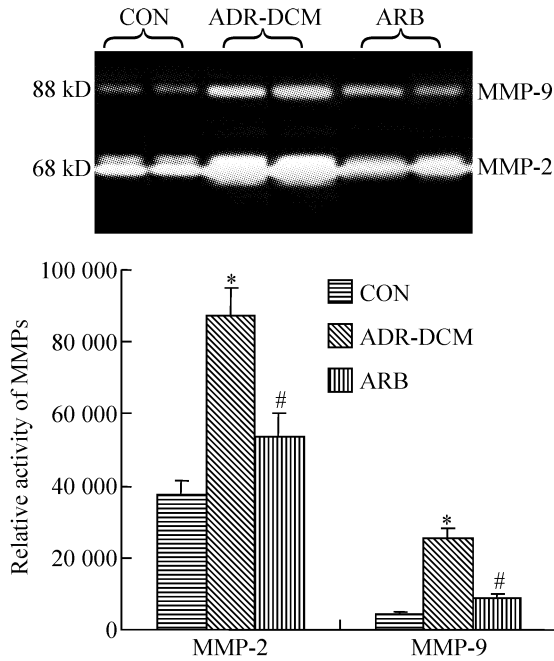


Fig 2 The comparison of LV myocardial MMP - 2 and MMP - 9 gelatinolytic activity in different groups of rats.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ . Compared with CON group, the MMP - 2 and MMP - 9 gelatinolytic activity in ADR - DCM group was significantly increased, \*  $P < 0.01$ ; Compared with ADR - DCM group, the MMP - 2 and MMP - 9 gelatinolytic activity in ARB group was significantly decreased, #  $P < 0.01$ .

图2 各组大鼠左室心肌 MMP - 2、MMP - 9 明胶酶活性比较的防护药物,具有重要意义。

Toko 等<sup>[6]</sup>研究发现,AT1 基因敲除小鼠或野生型小鼠用 AT1 受体拮抗剂 RNH - 6270 干预可防止阿霉素引起的急性和慢性心肌损伤,可见 AT1 受体介导的血管紧张素 II 信号转导通路在阿霉素心肌损伤中起重要作用。本研究发现,AT1 受体阻滞剂缬沙坦可明显改善生存率,降低左心室扩大程度,改善心脏收缩舒张功能,左室心肌中 MMP - 2、MMP - 9 蛋白表达及明胶酶活性显著低于 ADR - DCM 组。有研究表明,AT1 受体阻滞剂氯沙坦可通过降低 MMP - 1 和 MMP - 2 的表达与活性逆转叙利亚灰鼠心肌病模型左室重构和纤维化<sup>[7]</sup>,氯沙坦可通过降低 MMPs 的表达与活性从而使急性心肌梗死大鼠心功能变化减轻<sup>[8]</sup>。可见,AT1 受体阻滞剂发挥心脏保护作用的下游机制之一便是对 MMPs 的表达与活性的抑制作用。

本研究还发现缬沙坦可明显降低 ADR - DCM 大鼠心脏胶原容积分数,显著逆转心脏间质纤维化,心脏纤维化不仅是心肌间质中的基质胶原的增加,也有胶原类型、组分以及相互连接的改变,细胞外基质改变可直接影响心肌收缩功能<sup>[9]</sup>。缬沙坦逆转 ADR - DCM 大鼠左室间质重构作用除与降低 RAS 系统、内皮素等致纤维化因子有关外,尚与其下调

MMP - 2、MMP - 9 的表达和活性有关。有研究表明,MMPs 不仅在基质降解中起作用,而且也可以调节胶原的合成。MMPs 可能通过直接的基质组份降解、调节基质素的形成和细胞外基质 (ECM) 释放胰岛素样生长因子 (IGF) 以及成纤维细胞生长因子 (FGF) 等生物活性因子而参与纤维化和重构的过程<sup>[10]</sup>。最终结果常常是 MMPs 活性增高伴随纤维化的加重,而抑制 MMPs 表达和活性后可使纤维化减轻,正如本研究结果所示。

综上,ADR - DCM 左室心肌中 MMPs 表达和活性上调,AT1 受体阻滞剂可通过下调 MMPs 表达与活性部分逆转 ADR - DCM 左室重构,减轻心功能变化,AT1 受体阻滞剂有望成为一类新的防治 ADR - DCM 的药物,其用于防治 ADR - DCM 的最佳剂量和时机尚需进一步通过临床研究确定。

[参 考 文 献]

- [1] Fujisaki G, Inokuchi C, Murashige N. Doxorubicin - induced myocardial injury [J]. N Engl J Med, 2004, 351 (18): 1908 - 1909.
- [2] Simpson C, Herr H, Courville KA, et al. Concurrent therapies that protect against doxorubicin - induced cardiomyopathy [J]. Clin J Oncol Nurs, 2004, 8 (5): 497 - 501.
- [3] Bai P, Mabley JG, Liaudet L, et al. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin - induced cardiotoxicity [J]. Oncol Rep, 2004, 11 (2): 505 - 508.
- [4] 刘洪智, 戚本玲, 曹林生, 等. 基质金属蛋白酶在阿霉素心肌病左室重构中的表达与意义 [J]. 临床心血管病杂志, 2005, 21 (1): 26 - 29.
- [5] Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats [J]. Am J Physiol, 2001, 280 (2): H674 - H683.
- [6] Toko H, Oka T, Zou Y, et al. Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin - induced cardiomyopathy [J]. Hypertens Res, 2002, 25 (4): 597 - 603.
- [7] Dixon IM, Ju H, Reid NL, et al. Cardiac collagen remodeling in the cardiomyopathic Syrian hamster and the effect of losartan [J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29 (7): 1837 - 1850.
- [8] 潘静薇, 秦永文, 郑 兴. 洛沙坦对急性心肌梗死后大鼠心肌间质金属蛋白酶活性的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16 (9): 800 - 804.
- [9] Fedak PW, Smookler DS, Kassiri Z, et al. TIMP - 3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy [J]. Circulation, 2004, 110 (16): 2401 - 2409.
- [10] Ergul A, Portik - Dobos V, Hutchinson J, et al. Down - regulation of vascular matrix metalloproteinase inducer and activator proteins in hypertensive patients [J]. Am J Hypertens, 2004, 17 (9): 775 - 782.