

高血压对心血管纤维化及sFRP2表达的影响

徐尧, 马春辉, 李志勇

Effect of hypertension on cardiovascular fibrosis and sFRP2 expression

XU Yao, MA Chunhui, LI Zhiyong

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202409055>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

度拉糖肽联合二甲双胍对肥胖型2型糖尿病患者机体代谢、体脂成分及血清脂肪因子的影响

Effects of dulaglutide combined with metformin on body metabolism, body fat composition and serum adipokines in obese patients with type 2 diabetes mellitus

药学实践与服务. 2024, 42(7): 305-309 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202305032

正极性驻极体联合5-氟尿嘧啶对瘢痕成纤维细胞生长抑制的协同作用

Synergistic effect of positive electret combined with 5-fluorouracil on growth inhibition of scar fibroblasts

药学实践与服务. 2024, 42(6): 244-247 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310027

七味脂肝方对非酒精性脂肪性肝炎动物模型的药效学评价

Pharmacodynamic effects of Qiwei Zhigan prescription on non-alcoholic steatohepatitis in animal model

药学实践与服务. 2024, 42(9): 389-398 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202404096

全反式维甲酸对肝星状细胞活化及氧化应激的作用和机制探索

Exploration of the role and mechanism of all-trans retinoic acid on activation and oxidative stress of hepatic stellate cell

药学实践与服务. 2024, 42(7): 291-296 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202312054

黄芪甲苷衍生物治疗慢性心力衰竭小鼠的药效评价及作用机制研究

Efficacy and mechanism of astragaloside IV derivatives on chronic heart failure in mice

药学实践与服务. 2024, 42(5): 190-197 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202310004

巴戟天丸组方对A β 损伤成骨细胞的作用及基于网络药理学的机制研究

The roles of Bajitianwan formula on A β -injured osteoblasts and the mechanism based on network pharmacology

药学实践与服务. 2024, 42(7): 285-290, 296 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202305011



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

高血压对心血管纤维化及 sFRP2 表达的影响

徐 尧, 马春辉, 李志勇 (海军军医大学影像医学系影像病理学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 探讨自发性高血压对大鼠心脏和主动脉组织重构的影响, 特别关注心脏和主动脉组织中胶原纤维、弹力纤维含量以及心脏中分泌卷曲蛋白 2 (sFRP2) 的含量变化。**方法** 选取 28 周龄的 SHR (Spontaneously Hypertensive rat) 大鼠和同龄的 WKY (Wistar-Kyoto rat) 大鼠作为实验动物。通过计算心重指数来评估心脏重塑大体指标。采用热碱法从大鼠胸主动脉中分离胶原纤维和弹力纤维, 并使用生化分析方法测定其含量。此外, 通过 H&E 染色、天狼猩红染色和地衣红染色对左心室和胸主动脉的组织切片进行病理学评估。蛋白免疫印迹实验用于测定心脏组织中 sFRP2 蛋白的表达水平。**结果** 相较于 WKY 大鼠, SHR 大鼠心重指数明显增加 ($P < 0.001$), 生化分析和病理切片染色结果显示, SHR 组主动脉中胶原纤维含量较 WKY 组高, 而弹力纤维含量较低, 但两组间的差异未达到统计学意义; SHR 组心脏中胶原纤维含量较 WKY 组明显增高 ($P < 0.01$), 蛋白免疫印迹实验结果显示, 两组大鼠心脏组织中 sFRP2 蛋白的表达水平无显著差异。**结论** 在自发性高血压大鼠模型中, 心脏及主动脉组织的重构现象可能涉及多种复杂的分子机制, 而不仅仅是胶原纤维和弹力纤维含量的变化。自发性高血压病的进展及其导致靶器官损害的机制仍需进一步研究。

[关键词] SHR 大鼠; 高血压; 胶原纤维; 弹力纤维; sFRP2 蛋白

[文章编号] 2097-2024(2025)00-0001-05 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202409055

Effect of hypertension on cardiovascular fibrosis and sFRP2 expression

XU Yao, MA Chunhui, LI Zhiyong (Department of Pathology, Faculty of Medical Imaging, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of spontaneous hypertension on the remodeling of cardiac and aortic tissues in rats, with special attention to the changes in the content of collagen fibers, elastic fibers and secreted Frizzled-related protein 2 (sFRP2) in cardiac and aortic tissues. **Methods** 28-week-old SHR rats (Spontaneously Hypertensive rats) and WKY (Wistar-Kyoto rats) of the same age were selected as experimental animals. Cardiac load is assessed by calculating the cardiac weight index. Collagen fibers and elastic fibers were isolated from the rat thoracic aorta by hot alkali method, and their content was determined by biochemical analysis. In addition, pathological evaluation of tissue sections of the left ventricle and thoracic aorta was performed by H&E staining, Sirius red staining, and lichen red staining. Western blotting was used to determine the expression level of sFRP2 protein in cardiac tissues. **Results** Compared with WKY rats, the heart weight index of SHR rats increased significantly ($P < 0.001$), and the results of biochemical analysis and staining of pathological sections showed that the content of collagen fibers in the aorta in the SHR group was higher than that in the WKY group, while the content of elastic fibers was lower, but the difference did not reach statistical significance. The content of collagen fibers in the heart of the SHR group was significantly higher than that in the WKY group ($P < 0.01$). Western blotting showed that there was no significant difference in the expression level of sFRP2 protein in heart tissues between the two groups. **Conclusion** The remodeling of cardiac and aortic tissues in a rat model of spontaneous hypertension may involve complex molecular mechanisms, not just changes in the content of collagen fibers and elastic fibers. The detailed mechanism of the progression of spontaneous hypertension and target organs damage still need further investigation.

[Key words] SHR rats; hypertension; collagen fibers; elastic fibers; sFRP2.

[基金项目] 上海市科技创新行动计划(201409004600), 上海市自然科学基金(23ZR1477400)

[作者简介] 徐 尧, 硕士研究生, 研究方向: 心脑血管药理学, Email: 1136079123@qq.com

[通信作者] 李志勇, 博士, 副教授, 硕导, 研究方向: 心脑血管药理学, Email: lizhiyong0811@aliyun.com

高血压是最常见的心血管系统疾病, 是全球性重大公共卫生议题, 也是众多心血管疾病、慢性肾脏病和认知功能障碍最重要的独立危险因素^[1-3]。根据 2018 年的统计数据, 我国成人高血压患病率为 27.5%, 且总人群高血压患病率也在持续增高, 现存高血压患者约 2.45 亿, 其中自发性高血压占

比超过 90%^[4-5]。高血压病是一种全球性的常见病、多发病,严重危害人类健康。每年我国因心脑血管病导致的死亡占国民总死亡的 40% 以上,其中约 70% 脑卒中死亡和 50% 心肌梗死与高血压密切相关,致残率、致死率高。研究还表明高血压患者更容易伴发精神心理问题,为非高血压患者的 2.69 倍^[4]。高血压给家庭和社会带来巨大负担。因此,高血压病不仅仅是一个健康医学问题,更是一个亟待解决的社会问题。现阶段研究明确大多数高血压病是可以防控的,积极有效的防控高血压,可以大大降低急性心脑血管事件发生和死亡风险^[5]。

心脏重构和血管重构是高血压病及其并发症的重要病理生理学基础^[6]。因此,深入理解心脏和主动脉组织在自发性高血压病理状态下的动态变化,对于延缓自发性高血压患者心脏和主动脉重构进程,减轻相关症状具有显著的临床意义^[7]。文献回顾显示,分泌卷曲蛋白 2 (Secreted Frizzled-related protein 2, sFRP2) 通过 Wnt 信号通路对心脏的发育和各种心血管病理生理状况有着重要影响,对心脏纤维化、心肌肥大以及心血管重塑有重要作用;在 sFRP2 基因敲除小鼠的心肌梗死模型中,心脏纤维化程度显著降低^[8]。sFRP2 能够促进胶原纤维的合成,且 sFRP2 基因敲除小鼠心脏成纤维细胞对 I 型胶原的合成能力显著减弱^[8],提示 sFRP2 可能是心脏和主动脉重构的关键基因。但其在自发性高血压大鼠心血管组织的表达变化,及其对胶原纤维、弹力纤维含量的影响尚无研究报道。本研究旨在通过对比 SHR 大鼠和 WKY 大鼠的心脏和主动脉的一系列生化指标以及病理切片 H&E、天狼猩红、地衣红染色结果,明确自发性高血压对心脏和主动脉重构的主要病理改变。同时,本研究还将探讨两组大鼠心室 sFRP2 蛋白含量的变化,以期明确 sFRP2 是否参与了自发性高血压引起的心脏和主动脉重构,为延缓自发性高血压的疾病进程、预防并发症提供新的视角和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

酶标仪、低温离心机 (Thermal, 美国); 水浴锅 (上海力康医疗设备有限公司); 涡旋混匀器 (大连竞迈生物科技有限公司); 倒置显微镜、石蜡包埋机、全自动组织脱水机、烤片机 (徕卡, 德国)。BCA 蛋白浓度测定试剂盒、4% 多聚甲醛、Tubulin 抗体、山羊抗鼠 IgG 抗体 (上海碧云天生物技术有限公司); 二甲苯 (武汉赛维尔生物科技有限公司);

0.1M PBS、浓盐酸 (国药集团化学试剂有限公司); 羟脯氨酸测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); H&E 染色试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 天狼猩红染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 地衣红弹力纤维染色试剂盒 (北京博奥生物技术有限公司); sFPR2 抗体 (Abcam, 美国)。

1.2 实验动物

28 周龄 SPF 级 SHR 和 WKY 大鼠,由必凯科翼生物科技有限公司提供,所有实验大鼠均饲养在独立通气笼盒 (IVC) 系统中,温度 (24±2) °C,相对湿度为 40% ~ 60%,饲养期间笼盒内保持清洁,大鼠在笼内自由活动、进食及饮水,动物房内照明系统为自动控制 (12 h 照明、12 h 黑暗)。动物实验标准均依照国家《实验动物护理使用卫生指南》,并经过海军军医大学医学研究伦理委员会批准,实验动物处置符合动物伦理学标准。

1.3 实验方法

1.3.1 心脏重量指数的测定

首先,称量并记录大鼠体重,在大鼠被深度麻醉并处于稳定状态后,进行开胸手术以暴露心脏,并通过灌流技术清除血液。接着,小心地取出心脏组织,使用精确的天平进行称重并计算心脏重量指数 (CWI),计算公式 $CWI(mg/g) = \text{心脏全重}(mg) / \text{体重}(g)$ 。

1.3.2 主动脉组织胶原纤维含量、弹力纤维含量的测定

由于弹力纤维比较稳定能抵抗热碱的消化,而胶原纤维会在热碱中溶解,所以我们通过热碱法分离胶原纤维和弹力纤维,通过准确称量确定弹力纤维的含量。将主动脉组织样品在玻璃碾磨器中充分碾磨,充分碾磨后移到玻璃管中,加入 PBS 清洗两次样品。后加入 dd H₂O,离心后去除上清。加入乙醇乙醚,室温静置 2 h,去除样品中的脂类成分。离心后去上清。真空干燥。称重记录,并将重量调整到尽可能一致。样品放入有螺帽的离心管中。加入 0.3% 的 SDS 过夜,去除其中可溶性蛋白,后离心去除上清。加入 0.1M 的 NaOH,再次离心去除上清以减少残留的 SDS。再次加入 0.1M 的 NaOH,在沸水中煮 15min×3 次。静置冷却,离心后将上清吸入离心管中。加入 0.5 ml 热水洗两次,将上清移入另一离心管中。将沉淀和上清真空干燥两小时后冻干。冻干后对沉淀称重记录作为胶原的含量。对于上清中的冻干粉加 6M 的盐酸,97 °C 加热 24 h 后真空干燥。在盐酸裂解产物中加入 1ml dd H₂O,5000×g 离心 5 min 将上清移入

另一离心管中。分离后得到的样品直接进行羟脯氨酸的测定。由于羟脯氨酸在胶原蛋白中占13.4%，在弹性蛋白中占极少量，其它蛋白中均不存在。因此测定羟脯氨酸的量能反映组织的胶原纤维含量情况。具体实验方法参考羟脯氨酸测定试剂盒说明书。

1.3.3 主动脉石蜡切片 H&E 染色、天狼星红染色、地衣红染色

大鼠取胸主动脉固定于4%多聚甲醛中，48小时后包埋成蜡块，用蜡块切片机将组织切成4 μm厚的组织切片。H&E染色后进行胸主动脉形态学检测。天狼星红染色后测算胸主动脉壁胶原纤维容积分数(collagen volume fraction, CVF), $CVF\% = \text{胶原纤维面积} / \text{视野组织总面积} \times 100\%$ ，以评估血管纤维化。地衣红染色后测算胸主动脉壁弹力纤维容积分数(elastic fibers volume fraction)，弹力纤维容积分数=弹力纤维面积/视野总面积 $\times 100\%$ ，以评估血管弹力纤维含量的变化。用倒置显微镜拍摄染色切片图像，利用ImageJ pro软件分析结果。

H&E染色、天狼星红染色、地衣红染色流程：石蜡切片常规脱蜡至水，按照试剂盒说明书进行染色操作。电吹风吹干样片，自然晾干。

1.4 心脏组织中 sFPR2 蛋白的表达

取适量心脏组织至2 ml 高速离心管，加入蛋白裂解液后，使用高通量匀浆仪匀浆240s。取出高速离心管，离心(12000 \times g, 20 min)。将上清液转移至另一干净1.5 ml EP管中，后进行蛋白浓度测定，剩余样品加入5 \times 蛋白上样缓冲液，97 $^{\circ}$ C变性10 min得到蛋白样品。

使用10% SDS-PAGE凝胶进行电泳，电泳条件为：150 V, 60 min。使用PVDF膜进行转膜，转膜条件为100 V, 60 min。转膜结束后，使用快速封闭液封闭15 min，之后使用1 \times TBST缓冲液洗膜，5 min \times 3次。加入一抗(1:1000稀释)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日去除一抗孵育液，使用1 \times TBST缓冲液洗

膜，5 min \times 3次。加入二抗孵育液(1:2000稀释)常温孵育1h，用1 \times TBST缓冲液洗去二抗5 min \times 4次，结束后即可进行扫膜。

1.5 统计学处理

实验所得数据采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学处理。为了评估两组间的差异性，采用独立样本t检验(双尾)进行比较。设定显著性水平为0.05，即当P值小于0.05时，认为两组间的差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 SHR与WKY心重指数的影响

SHR大鼠的平均体重(363.25 \pm 30.79)g，平均心脏重量(1.15 \pm 0.05)g，WKY大鼠平均体重(383.55 \pm 48.08)g，平均心脏重量(0.83 \pm 0.12)g，SHR组的CWI较WKY组明显增加(** $P < 0.001$)(图1)。

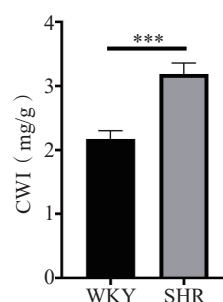


图1 SHR组与WKY组心重指数比较统计图
(** $P < 0.001$, $n=10$)

2.2 大鼠心脏切片天狼星红染色

观察心脏切片天狼星红染色并利用ImageJ pro软件分析发现SHR组较WKY组胶原纤维增多，胶原纤维容积分数明显增加且差异有统计学意义(图2)。

2.3 心脏组织 sFRP2 蛋白表达情况

对SHR组与WKY组大鼠的心脏组织进行sFRP2蛋白表达水平进行检测，两组大鼠在左、右心室的sFRP2蛋白表达水平上并无显著性差异(图3)。

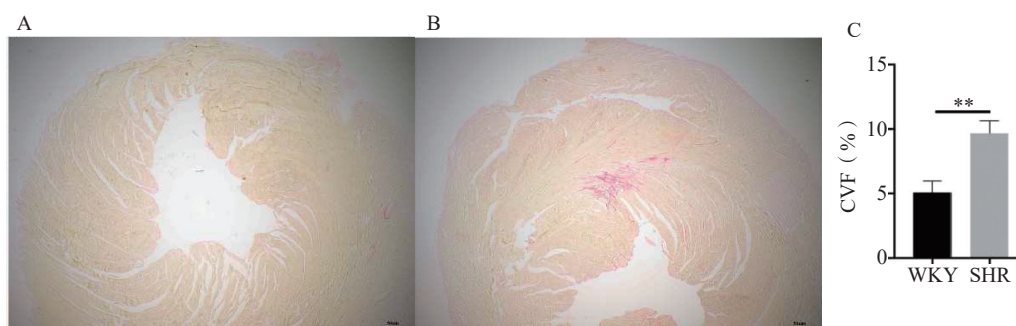


图2 两组大鼠心脏组织石蜡切片天狼星红染色典型图片和胶原纤维容积分数 CVF%。
($CVF\% = \text{胶原纤维面积} / \text{视野组织总面积} \times 100\%$)统计图(** $P < 0.01$, $n=10$)

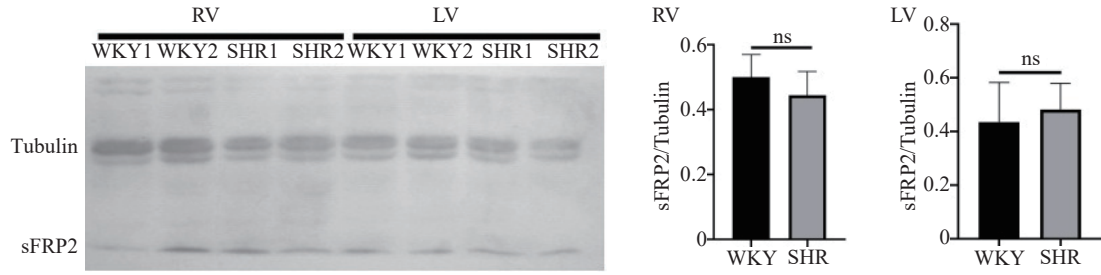


图3 两组大鼠的心脏组织 sFRP2 蛋白免疫印迹条带和心脏组织 sFRP2 水平比较

2.4 SHR 组和 WKY 组主动脉组织中胶原纤维含量、弹力纤维含量比较

在对 28 周龄自发性高血压大鼠(SHR 组)与同龄的正常血压对照组大鼠(WKY 组)的主动脉组织进行比较分析时,观察到 SHR 组的弹力纤维含量显著低于 WKY 组,而胶原纤维含量则呈现轻微升高的趋势,但并未达到统计学意义($P=0.0886$)。此外,SHR 组主动脉组织中胶原纤维与弹力纤维的比值较 WKY 组有显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)(见表 1)。

2.5 大鼠主动脉石蜡切片 H&E 染色、天狼星红染色和地衣红染色

观察 H&E 切片,在 200 倍镜下测量主动脉厚度发现 SHR 组较 WKY 组主动脉管壁明显增厚且

表 1 主动脉组织胶原纤维和弹力纤维含量

项目	SHR	WKY	P
胶原纤维含量(%)	39.64±2.55	36.59±2.03	0.0886
弹力纤维含量(%)	15.02±2.69	17.19±2.32	0.1552
胶原纤维/弹力纤维	0.38±0.09	0.47±0.07	0.0347*

* $P<0.05$,与SHR组比较

差异具有统计学意义($P<0.005$),观察天狼猩红染色和地衣红染色切片并利用 ImageJ pro 软件分析发现 SHR 组较 WKY 组胶原纤维增多、纤维网结构疏松、弹力纤维含量减少。但胶原纤维面积占比与弹力纤维面积占比差异并无统计学意义(图 4)。

3 讨论

心脏重构与心律失常、心力衰竭和猝死等密切

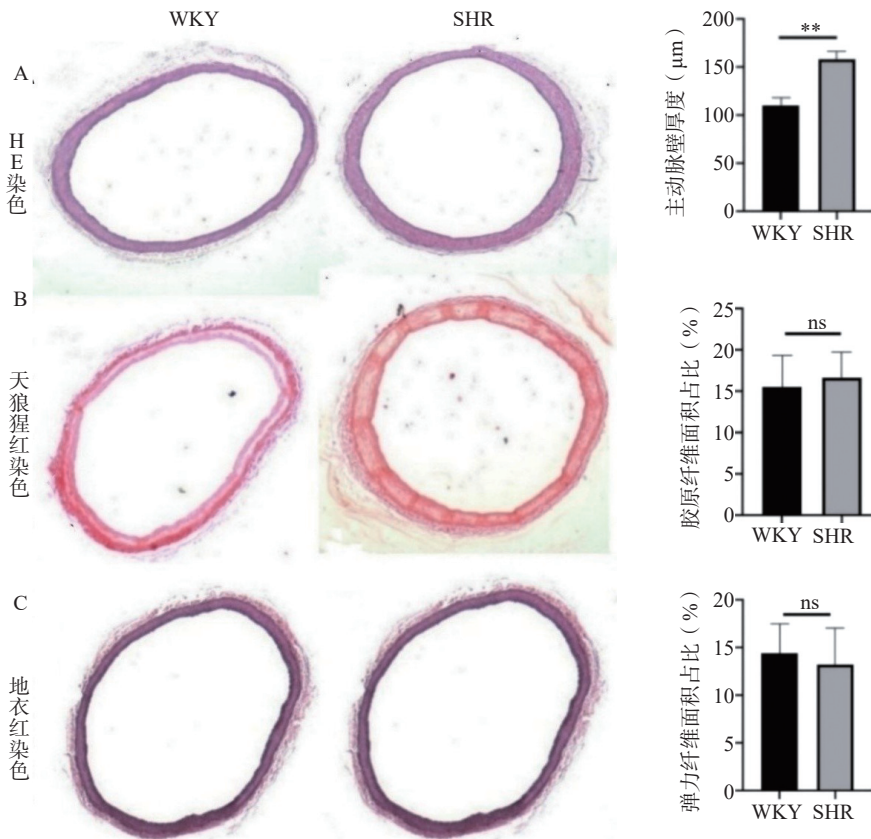


图4 WKY 组与 SHR 组主动脉石蜡切片染色比较

A. H&E 染色主动脉厚度比较(** $P<0.005$, $n=10$); B.天狼猩红染色胶原面积占比比较; C.地衣红染色弹力纤维面积占比比较

相关,临床上,心脏重构主要表现为心腔扩大、心肌肥厚以及心脏收缩和舒张功能障碍,是心脏疾病进展至终末期的必经阶段^[9]。血管重构是内外环境的变化引起的血管结构异常改变,导致血管功能障碍^[6]。心脏和血管重构是高血压病及其并发症造成靶器官功能损害的病理生理学基础^[10-11],明确高血压病所致的心脏和血管重构对于缓解高血压病程发展以及预防高血压病所致的并发症具有重要意义^[12]。本研究发现,与对照组WKY大鼠相比,自发性高血压大鼠的心脏组织中胶原纤维含量明显增加,回顾既往研究,在心梗及心衰小鼠模型动物中,心脏组织胶原纤维含量增加伴随着sFRP2蛋白表达的增加^[8],而我们通过蛋白免疫印迹实验发现两组大鼠心脏组织sFRP2蛋白表达水平并无差异,该结果提示,自发性高血压引起的心脏重构可能和sFRP2蛋白无关,而可能涉及其他纤维化相关蛋白的表达水平改变;回顾已有的研究,运用病理染色手段评估自发性高血压大鼠的主动脉组织中胶原含量增加具有统计学差异,而我们的研究并没有得到相同的结果。我们运用了热碱法分离主动脉组织中的胶原纤维和弹力纤维并对其进行定量分析,也没有得到和既往研究相同的结果,我们的研究显示在自发性高血压大鼠的主动脉组织中胶原纤维含量呈增加趋势,而弹力纤维含量呈减少趋势,综合既往的研究以及我们的研究结果,我们认为自发性高血压引起的主动脉组织重构可能不仅仅是胶原纤维和弹力纤维含量的简单变化,还可能影响胶原纤维和弹力纤维的交联方式,从而影响疾病的进程及其并发症的发生。未来的研究需要进一步探索这些潜在的重构机制,以期对高血压及其并发症的预防和治疗提供新的策略。

【参考文献】

- [1] HARVEY A, MONTEZANO A C, LOPES R A, et al. Vascular fibrosis in aging and hypertension: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(5): 659-668.
- [2] KLAG M J, WHELTON P K, RANDALL B L, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men[J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(1): 13-18.
- [3] QI Y, HAN X Y, ZHAO D, et al. Long-term cardiovascular risk associated with stage 1 hypertension defined by the 2017 ACC/AHA hypertension guideline[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(11): 1201-1210.
- [4] 中国高血压防治指南修订委员会, 中国高血压防治指南(2024年修订版)[J]. *中华高血压杂志*, 2024, 32, 603-700.
- [5] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2020概要[J]. *中国循环杂志*, 2021, 36(6): 521-545.
- [6] VAN VARIK B J, RENNENBERG R J, REUTELINGSPERGER C P, et al. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases[J]. *Front Genet*, 2012, 3: 290.
- [7] LIU M Y, LI N, LI W A, et al. Association between psychosocial stress and hypertension: a systematic review and meta-analysis[J]. *Neurol Res*, 2017, 39(6): 573-580.
- [8] KOBAYASHI K, LUO M, ZHANG Y, et al. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(1): 46-55.
- [9] LEWINGTON S, CLARKE R, QIZILBASH N, et al. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies[J]. *Lancet*, 2002, 360(9349): 1903-1913.
- [10] WANG Z W, CHEN Z, ZHANG L F, et al. Status of hypertension in China[J]. *Circulation*, 2018, 137(22): 2344-2356.
- [11] KOLESNYK I U M, KOLESNYK M I U, ABRAMOV A V. Pathological remodeling of myocardium in spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus: the role of mitochondrial dysfunction[J]. *Fiziol Zh*, 2014, 60(3): 18-26.
- [12] LUFT F C. Twins in cardiovascular genetic research[J]. *Hypertension*, 2001, 37(2 Pt 2): 350-356.

【收稿日期】 2024-09-25 【修回日期】 2025-01-13

【本文编辑】 陈盛新