

PM_{2.5} 暴露导致老年小鼠可逆性心肌肥大

梁刚¹, 夏瑾¹, 秦国华^{1,2*}, 桑楠¹

1. 山西大学环境与资源学院, 环境与健康研究中心, 山西太原 030006;

2. 暨南大学环境学院, 广州市环境暴露与健康重点实验室, 广东广州 510632

摘要: 本研究采用 10 月龄 C57BL/6 雌性小鼠作为实验模型, 将小鼠分为对照和 PM_{2.5} 染毒组两组。将染毒组小鼠采用 3 mg kg⁻¹ PM_{2.5} 暴露四周后, 分别在最后一次暴露后 1 天、1 周和 2 周处死小鼠。采用苏木素-伊红染色(H&E)对小鼠心脏组织进行观察; 采用荧光定量 PCR 技术检测心肌肥大相关因子 ANP 和 β -MHC 以及基质金属蛋白酶 MMP2 和 MMP9 的 mRNA 水平; 并采用 Western Blot 技术检测 TGF β 1 和 MMP2 的蛋白表达水平。结果发现, 与对照组相比, 经 PM_{2.5} 暴露四周后, 小鼠心肌细胞核质比显著降低, 心脏组织中 ANP、 β -MHC、MMP2 和 MMP9 的 mRNA 表达水平以及 TGF β 1 和 MMP2 的蛋白表达水平显著上升。停止暴露恢复 1 周后, 小鼠心肌细胞核质比降低仍有显著差异, TGF β 1 和 MMP2 蛋白表达水平仍显著上升, 而各基因 mRNA 表达水平与对照组相比无显著变化。停止暴露恢复 2 周后, 小鼠心肌细胞核质比、上述基因的 mRNA 和蛋白表达均无显著性差异。实验表明 PM_{2.5} 暴露可导致小鼠可逆性心肌肥大, 提示 PM_{2.5} 所造成的心肌肥大损伤效应是可逆的, 在暴露停止后机体可以通过自我修复等过程逐渐恢复正常。

关键词: PM_{2.5}; 心肌肥大; 可逆; 恢复

文章编号: 中图分类号: 文献标识码:

PM_{2.5} exposure induced reversible myocardial hypertrophy in aged mice

LIANG Gang¹, XIA Jin¹, QIN Guo-hua^{1,2*}, SANG Nan¹

1. Research Center of Environment and Health, College of Environmental Science and Resources, Shanxi University, Taiyuan

030006, China;

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(NO.21777091);广州市环境暴露与健康重点实验室开放基金资助项目(NO.GZKLEEH201612);环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金资助项目(NO. KF2016-17)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (NO. 21777091), Guangzhou key Laboratory of Environmental Exposure and Health (NO. GZKLEEH201612) and the State key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center of Eco Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences (NO. KF2016-17)

作者简介: 梁刚(1992—), 男, E-mail: lianggangqidai@163.com; * 通讯作者(责任作者), E-mail: qinguojua@sxu.edu.cn

Biography: LIANG Gang(1992—), male, E-mail: lianggangqidai@163.com; * Corresponding author, E-mail: qinguojua@sxu.edu.cn

2.Guangzhou Key Laboratory of Environmental Exposure and Health, School of Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China.

Abstract: 10-month-old C57Bl/6 female mice were divided into control and PM_{2.5} exposure groups. The mice in PM_{2.5} group were exposed to PM_{2.5} (3 mg kg⁻¹) for 4 weeks. Mice were sacrificed 24 h, one week, or two weeks after the final exposure, respectively. Histological assessments were detected by H&E stain. The mRNA levels of myocardial hypertrophy related factors (ANP and β -MHC) and matrix metalloproteinases (MMP2 and MMP9) were analysed by real-time PCR. And the protein levels of TGF β 1 and MMP2 were detected by Western Blot. The results showed that PM_{2.5} significantly decreased the nucleus/cytoplasm ratio, elevated the mRNA levels of ANP, β -MHC, MMP2, and MMP9 of mice hearts compared with the control group. And the protein levels of TGF β 1 and MMP2 in hearts increased significantly after PM_{2.5} exposure. After withdrawal from PM_{2.5} exposure for one week, the nucleus/cytoplasm ratio of myocardial cell in mice was significantly decreased. The protein levels of TGF β 1 and MMP2 increased significantly, while the mRNA levels were restored after withdrawal from exposure to PM_{2.5} for one week. All the above indexes were restored after withdrawal from exposure to PM_{2.5} for two weeks. The results proved that PM_{2.5} exposure caused a reversible myocardial hypertrophy in mice. It indicated that the myocardial hypertrophy by PM_{2.5} exposure is reversible. It could be recovered to normal by self-repair of organism.

Key words: PM_{2.5}; myocardial hypertrophy; reversible; restore

1 引言(Introduction)

近年来, 随着我国工业化步伐的快速前进, 化石燃料的燃烧、汽车尾气的排放和金属冶炼等带来了严重的大气污染, 大气污染形势日益严峻, 对人类健康造成的恶劣影响也日益突显, 大气污染已成为广泛关注的环境和社会问题。其中, 大气颗粒物是影响人类健康的主要污染物之一。PM_{2.5}是指环境空气中空气动力学当量直径 $\leq 2.5\mu\text{m}$ 的颗粒物, 也称为细颗粒物。

PM_{2.5}是目前影响我国空气质量状况的关键指标。最近一项全球性疾病负担评估排名将 PM_{2.5} 作为世界范围内死亡和致残的主要因素之一(Lim et al., 2012)。除了对呼吸系统的影响外, PM_{2.5} 对心血管系统的损害也日益受到关注, 国内外流行病学研究均发现, PM_{2.5} 所造成的心血管疾病(CVD)与其所致肺部疾病的后果相等甚至更严重(Brook et al., 2010; Zhou et al., 2014)。谢鹏等(2009)对我国人群大气颗粒物污染进行的 meta 分析发现, PM_{2.5} 浓度每增加 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 人群心血管疾病的住院率增加 2.81%, 死亡率增加 0.53% (95%CI: 1.45%~2.74%)。

研究证实: PM_{2.5} 对雄性自发性高血压大鼠的心脏有一定的急性毒作用, 可引起心脏重构, 心脏组织中转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的 mRNA 表达明显升高(董晨等, 2006; Chin

et al., 2015)。最新研究报道, 长期暴露于浓缩大气颗粒物(concentrated ambient particulate matter, CAP)可引起自发性高血压大鼠可逆性心脏功能障碍和心肌肥大(Ying et al., 2009)。

目前, 大量的临床试验已经证明, 长期暴露于 $PM_{2.5}$ 与左心室肥厚(LVH)有关(Ying et al., 2015), 也有研究表明, 长期暴露于 CAP 引起了 C57BL/6 小鼠心肌肥大(Chin et al., 2015), 但对停止 $PM_{2.5}$ 暴露后对心肌肥大/纤维化恢复状况的研究甚少。不同人群对 $PM_{2.5}$ 的敏感性有所不同, 流行病学研究发现, 相较于正常人群, 老年人、妇女及冠心病和糖尿病患者暴露于 $PM_{2.5}$ 后心血管疾病的发病和病死风险程度更高(Lee et al., 2014; Brook et al., 2010)。在前期研究的工作中, 我们分别对 4 周、4 月及 10 月龄 C57BL/6 小鼠进行了 $PM_{2.5}$ 染毒, 发现 10 月龄小鼠对 $PM_{2.5}$ 最为敏感, 其心脏功能紊乱及心肌肥大/纤维化程度最为严重。因此, 在本研究中, 我们对 10 月龄 C57BL/6 小鼠进行为期 4 周的 $PM_{2.5}$ 暴露后, 对停止暴露后分别恢复 1 天、1 周和 2 周三个时间点的心脏病理学切片进行了观察, 以心肌细胞 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)和心房钠尿肽(Atrial natriuretic peptide, ANP)作为心肌细胞肥大标志物来确定心肌肥大随恢复时间变化的状况, 并检测了 TGF- β 1 和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)MMP2 和 MMP9 的表达水平。

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 $PM_{2.5}$ 采集及其悬浊液的制备

在 2012 和 2013 年之间, 采用石英滤膜和 TH-150 CIII 型智能中流量空气采样器采集了太原市大气中 $PM_{2.5}$ 。采样流量为 $100 L/min^{-1}$, 每天采样时间设置为 22 h, 并在采样前后称量石英滤膜的重量, 将采集完成的滤膜密封在铝箔中, $4^{\circ}C$ 储藏。将滤膜剪碎、超声振荡、过滤后, 在真空中冷冻干燥。

2.2 实验动物处理

体重 18~24 g 的 10 月龄 C57BL/6 雌性小鼠 54 只, 购自南京君科生物工程有限公司, 随机分为 2 组, 每组 27 只, 分别为对照组和 $PM_{2.5}$ 组。小鼠在不锈钢笼中, 12 h 昼夜周期循环, 保证外界温度为 $(24 \pm 2)^{\circ}C$, 湿度为 $50\% \pm 5\%$ 。两组小鼠均采用咽后壁滴注法, 将小鼠麻醉后置于倾斜平台上, 轻轻将舌头拉起, 将生理盐水或 $3 mg kg^{-1} PM_{2.5}$ 悬浊液从舌根注入, 每 2 天滴注 1 次, 共暴露 4 周。 $PM_{2.5}$ 暴露剂量是根据小鼠的通气量 ($90 mL/min$) 及中国环境空气质量标准 (GB3095-2012) 日平均 $PM_{2.5}$ 二级浓度限值 ($75 \mu g/m^3$) 的 3 倍来计算得到的, 在重污染情况下, 小鼠每天吸入的 $PM_{2.5}$ 量: $75 \mu g/m^3 \times 3 \times 90 mL/min \times 10^{-6} \times 60 min \times 24 h = 0.02916 mg$; 以小鼠体重平均 20g 来计算每日吸入的 $PM_{2.5}$ 剂量: $0.02916 mg \div 0.02 kg = 1.458 mg/kg bw$ 。因为每 2 天进行一次染毒, 则每次染毒量应为 $1.458 \times 2 = 2.916 \approx 3 mg/kg bw$ 。每组小鼠分别

于暴露后 1 天、1 周或 2 周被处死，取出心脏组织，每组取 3 只小鼠的左心室心尖部进行固定，其余组织液氮速冻后转入-80℃冰箱中保存。

2.3 HE 染色组织学分析

将小鼠处死后，立即取出心脏组织，在 4% 的多聚甲醛中固定，用常规梯度酒精和二甲苯脱水，用石蜡包埋。组织切成 5 μm 厚的切片常规脱蜡烘干后，苏木素染色，蒸馏水洗涤，氨水反蓝 30 s，蒸馏水洗涤。伊红染色 3 min，蒸馏水洗涤。脱水，晾干，封片，显微镜下观察并拍照。使用图像 IPWIN32 软件进行分析，以细胞核面积与细胞质面积之比量化得到心肌细胞核质比。

2.4 总 RNA 的提取与荧光定量 PCR

称取 80~100 mg 心脏组织，用 Trizol 匀浆提取总 RNA，通过测定 RNA 在 260 nm 处的吸光度来定量。使用 PrimeScript™ 反转录试剂盒(TaKaRa)将提取的 RNA 反转录成 cDNA，放置于-80℃备用。使用 Analytikjena 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应，所需引物均采用 Primer Premier 5.0 软件进行设计，所用引物的序列见表 1。

PCR 反应总体积为 20 μL，其中含有 1 μL cDNA，10 μL SYBR Premix Ex Taq，上、下游引物各 1 μL 和 7 μL dd H₂O。反应条件为：95℃ 预变性 3 min；95℃ 20 s，55℃ 20 s，72℃ 20 s，扩增 45 个循环。所有 PCR 扩增片段的大小均经过溴化乙啶染色的琼脂糖凝胶电泳证实，最终结果以目的基因与内参基因 GAPDH 表达的比值来表示。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物序列

Table 1 Primers used in real time PCR

基因	基因 bank 号	引物
GAPDH	NM_008084	上游: 5-CTTTGGCATTGTGGAAGGGC-3 下游: 5-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3
ANP	NM_008725.2	上游: 5-GCTTCGGGGGTAGGATTGAC-3 下游: 5-CACACCACAAGGGCTTAGGA-3
b-MHC	NM_080728.2	上游: 5-TCTTGCTACCCAGCTCCA-3 下游: 5-TTCCACCTAAAGGGCTGTGC-3
MMP2	NM_008610.2	上游: 5-GCCCCATGAAGCCTTGT-3 下游: 5-TAGCGTCTCGGACAGAAT-3
MMP9	NM_013599	上游: 5-CCGACTTTGTGGTCTTCCC-3 下游: 5-TTTGGAATCGACCCACGTCT-3

2.5 总蛋白的提取与 Western blot

取小鼠心脏组织 50~80 mg，加入 1ml 蛋白裂解工作液进行匀浆，裂解工作液成分为：1% Nonidet P40，1 mmol/LEDTA，125 mmol/L sodium fluoride，0.5 mmol/L sodium vanadate，2.5 μg/mL aprotinin，5 μg/mL pepstatin，50 μg/mL leupeptin，25 μmol/L PMSF，25 μg/mL trypsin inhibitor。匀浆至无组织块，4℃下

放置 20 min, 13000 r/min 离心 15 min, 取出上清液, 以 BSA 为标准蛋白, 使用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, -80°C 下储存备用。用 Western Blot 方法检测目的基因蛋白表达水平, 以 $50\ \mu\text{g}$ 蛋白上样量, 加入蛋白上样缓冲液, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 将目的蛋白电转至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 封闭, 加相应一抗与特定蛋白发生免疫反应, 4°C 孵育过夜, 洗一抗, 加荧光二抗与一抗结合孵育, 洗二抗, 使用 LI-COR Odyssey 红外荧光系统扫描检测, 结果表示为目的蛋白与 GAPDH 蛋白的灰度比值。

2.6 数据统计学处理

用 SPSS 统计软件进行统计分析数据, 用 origin 软件作图, 结果以均值 \pm 标准误(mean \pm SE)的形式来表示, 用 One way ANOVA 法检验处理组与对照组的显著性差异。当 $P < 0.05$ 时被认为具有统计学显著性。

3 结果(Results)

3.1 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露导致老年小鼠可逆性心肌细胞肥大

如图 1 所示, HE 染色结果显示, 老年 C57BL/6 雌性小鼠经 $3\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}\ \text{PM}_{2.5}$ 暴露 4 周后, 心肌纤维明显增粗并趋于紊乱, 心肌细胞胞浆染色变淡。根据核质比结果分析可知, 与对照组相比, 4 周暴露后恢复 1 天及恢复 1 周组的心肌细胞核质比显著降低, 提示 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露可导致心肌细胞肥大, 恢复 2 周组心肌细胞核质比与对照组相比无显著变化, 表明 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露所致心肌细胞肥大是可逆的, 在停止暴露 2 周后可有效恢复。

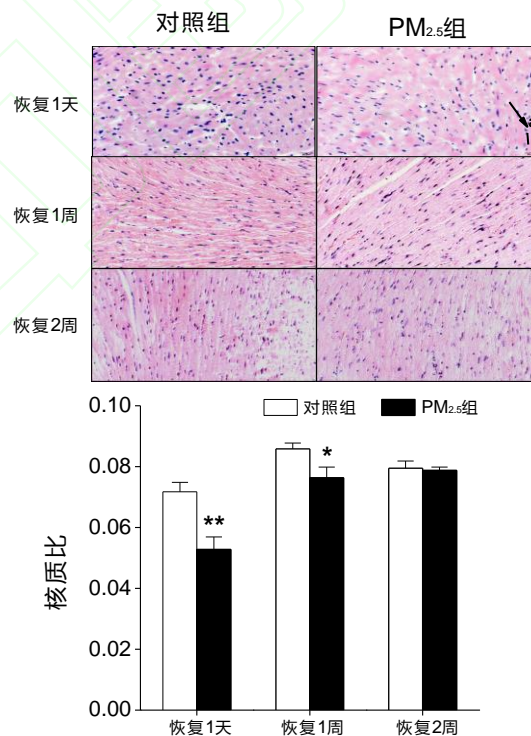


图 1 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露后恢复不同时间心脏组织学检测 (a, 增粗的心肌纤维)

Fig.1 Histological assessments of $\text{PM}_{2.5}$ -exposed hearts after withdraw $\text{PM}_{2.5}$ for different time.

3.2 PM_{2.5} 暴露可致小鼠心肌肥大相关基因 mRNA 表达上升

如图 2 所示, PM_{2.5} 暴露后恢复 1 天组中, ANP、 β -MHC、MMP2 和 MMP9 的 mRNA 表达水平均显著升高。表明 PM_{2.5} 暴露 4 周可以引起老年小鼠心肌肥大标志物 ANP 和 β -MHC 的 mRNA 表达升高, 同时, MMP2 和 MMP9 表达也升高。恢复 1 周组和恢复 2 周组中, 上述基因的 mRNA 表达水平与对照组相比均无显著性差异。

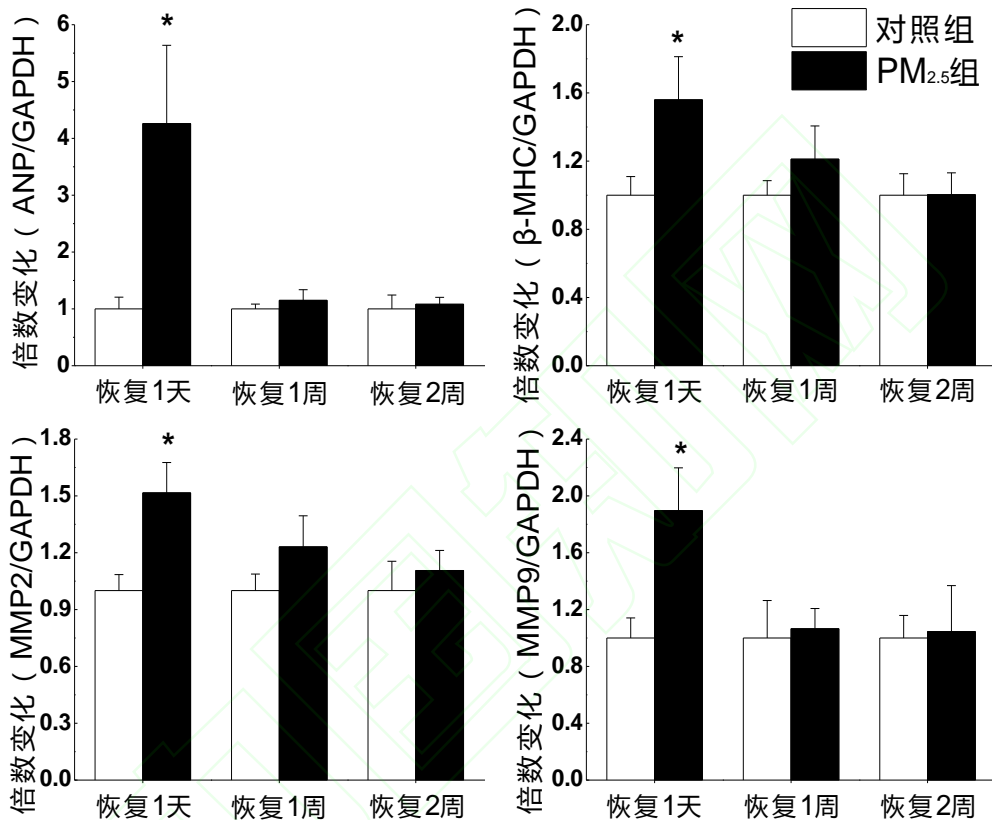


图 2 PM_{2.5} 暴露后恢复不同时间对心肌肥大相关基因 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of myocardial hypertrophy related genes mRNA levels in mice after withdraw PM_{2.5} for different time.

3.3 PM_{2.5} 暴露导致小鼠 TGF β 1 和 MMP2 蛋白表达上升

如图 3 所示, 与对照组相比, PM_{2.5} 暴露后恢复 1 天组和恢复 1 周组小鼠心脏组织中 TGF β 1 和 MMP2 的蛋白表达显著升高, 而恢复 2 周组无显著性差异。心肌肥大/纤维化状况明显改善, 恢复两周后, 心肌细胞基本恢复正常。

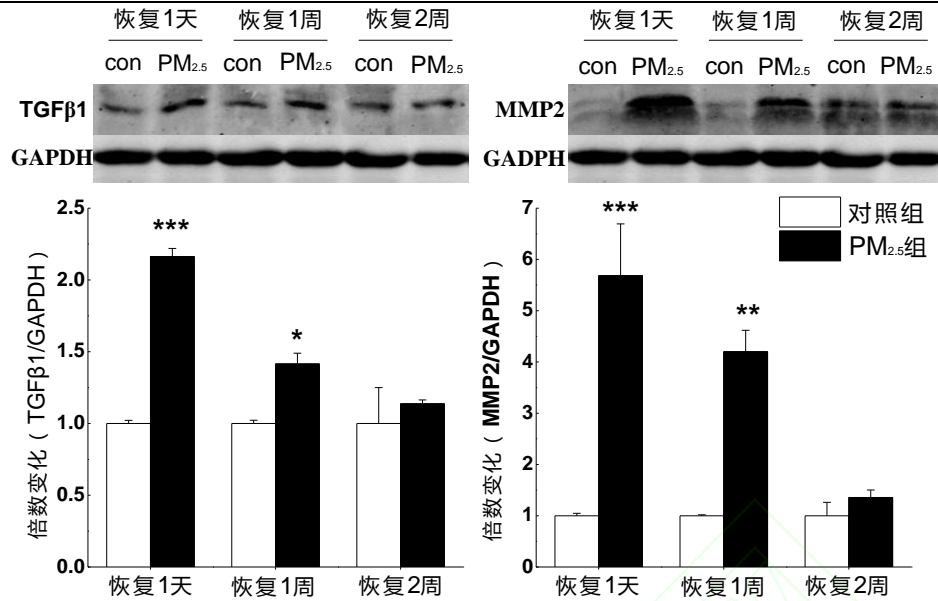


图3 PM_{2.5}暴露后恢复不同时间对 TGFβ1 和 MMP2 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of TGFβ1 and MMP2 protein levels in mice after withdraw PM_{2.5} for different time.

4 讨论(Discussion)

左室心肌肥大是心血管事件中一个强有力的独立预测因子。流行病学研究已经证明长期暴露于 PM_{2.5} 与 LVH 有关(Ying et al., 2009), 研究表明, 抽烟可导致高血压模型大鼠心肌肥大的发生(Meurrens et al., 2007)。短期 CAP 暴露引起了血管紧张素 II 处理的小鼠左心室肥厚(Ying et al., 2009), 9 个月 CAP 暴露可致小鼠心肌肥大(Wold et al., 2012)。CAP 暴露 15 周可诱导高血压大鼠心肌肥大的发生, 在停止暴露 5 周后恢复正常(Ying et al., 2009)。我们的研究发现 PM_{2.5} 暴露 4 周可致老年小鼠心肌细胞核质比降低, 反映有心肌肥大的发生, 但停止暴露 2 周后心肌细胞可自我恢复至正常水平。

心肌肥大是指心肌细胞体积增大为特征的重塑过程, 早期可代偿性出现心室壁增厚与心肌收缩能力增强, 但在持久病理性应激情况下, 逐渐严重的心肌肥大伴随着间质纤维化、收缩功能失调以及基因表达、能量代谢和电生理特征异常, 最终可出现失代偿性心功能衰竭, 是多种心血管疾病的独立危险因素。ANP 为胚胎期表达基因, 在正常心肌细胞中表达量很低, 在病理状态下, 心肌组织胚胎期基因重演, ANP mRNA 表达量明显增加, 为病理性心肌肥大的可靠指标。β-MHC 基因表达量在发育、衰老、压力超负荷、心肌肥厚、运动等生理病理条件下会发生改变(Zile et al., 2002)。因此, 在本研究中将 ANP 与 β-MHC 这两种基因作为心肌肥大标志物, 来反映心肌肥大情况。在心肌肥大的过程中, 往往伴随着心肌纤维化的发生, 主要表现为间质中胶原的合成增加和分解减少。心肌组织中的 MMPs 主要由心肌成纤维细胞分泌, 介导心肌细胞外基质的降解。TGFβ1 在心肌肥厚和纤维化发生过程中促进心肌细胞的生长、成纤维细胞的激活和细胞外基质的沉积(Schiller et al., 2004), 可通过多重途径促进心肌纤维化的发生与发

展。CAP 暴露引起血管紧张素 II 处理的小鼠左心室肥厚的同时, 也发现 ANP、MMP2 和 TGF β 表达上升(Ying et al., 2009)。9 个月 CAP 暴露致小鼠心肌肥大的同时, 也发现 ANP、 β -MHC 和 TGF β 表达上升(Wold et al., 2012)。我们的研究表明, PM_{2.5} 暴露 4 周可致小鼠心肌肥大相关基因 ANP、 β -MHC、MMP2 和 MMP9 mRNA 表达上升, 但停止暴露 1 周后 mRNA 可经机体自我恢复至正常水平。而 MMP2 和 TGF β 1 的蛋白水平在 PM_{2.5} 暴露 4 周表达上升, 在停止暴露 2 周后蛋白表达可恢复至对照组水平。

本研究证实了 PM_{2.5} 暴露可以引起正常血压的老年小鼠可逆性心肌肥大。但实验也存在有一定的局限性, 对心肌肥大恢复的分子机制并未做深入研究, 在下一步工作中我们将对其分子机制进行深入研究。但本研究结果为大气污染诱发的心肌肥大的预防和治疗提供了理论基础。

4 结论(Conclusions)

1)老年小鼠经 PM_{2.5} 暴露 4 周可导致心肌细胞核质比降低、心肌肥大标志物(ANP 与 β -MHC)及相关基因(MMP2、MMP9 和 TGF β 1)表达升高。

2)停止 PM_{2.5} 暴露后恢复两周, 心肌细胞核质比、心肌肥大标志物及相关基因表达基本恢复正常。

责任作者简介: 秦国华(1977-),女,山西潞城人,教授,博士,主要从事环境与健康方面的研究.发表论文 50 余篇.

参考文献(References):

- Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsel L, Kaufman JD. 2010. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 121 (21) : 2331 - 2378.
- Chin MT. 2015. Basic mechanisms for adverse cardiovascular events associated with air pollution [J]. *Heart*, 101 (4) : 253 - 6.
- 董晨,曹强,宋伟民. 2006. 大气 PM_{2.5} 对自发性高血压大鼠心脏的急性毒作用[J]. *劳动医学*, 23(2):96-99.
- Lee BJ, Kim B, Lee K. 2014. Air pollution exposure and cardiovascular disease [J]. *Toxicol Res*, 30(2):71-75.
- Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 380(9859):2224-2260.
- Meurrens K, Ruf S, Ross G, Schleefer R, von Holt K, Schlüter KD. 2007. Smoking accelerates the progression of hypertension-induced myocardial hypertrophy to heart failure in spontaneously hypertensive rats [J]. *Cardiovascular research*, 76 (2) : 311 - 322 .
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. 2004. TGF- β induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing [J]. *Journal of dermatological science*, 35 (2) : 83 - 92.

Wold LE, Ying Z, Hutchinson KR, Velten M, Gorr MW, Velten C, Youtz DJ, Wang A, Lucchesi PA, Sun Q, Rajagopalan S. 2012. Cardiovascular remodeling in response to long-term exposure to fine particulate matter air pollution [J]. *Circulation. Heart failure*, 5 (4) : 452 -461.

谢鹏,刘晓云,刘兆荣,李涪涪,白郁华. 2009. 我国人群大气颗粒物污染暴露-反应关系的研究[J]. *中国环境科学*, 29(10):1034-1040.

Ying Z, Xie X, Bai Y, Chen M, Wang X, Zhang X, Morishita M, Sun Q, Rajagopalan S. 2015. Exposure to concentrated ambient particulate matter induces reversible increase of heart weight in spontaneously hypertensive rats [J]. *Particle Fibre Toxicology*, 12(1):15.

Ying Z, Yue P, Xu X, Zhong M, Sun Q, Mikolaj M, Wang A, Brook RD, Chen LC, Rajagopalan S. 2009. Air pollution and cardiac remodeling: a role for RhoA/ Rho- kinase [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296(5): H1540-50.

Zhou M, Liu Y, Wang L, Kuang X, Xu X, Kan H. 2014. Particulate air pollution and mortality in a cohort of Chinese men [J]. *Environmental Pollution*, 186:1-6.

Zile MR, Brutsaert DL. 2002. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment [J]. *Circulation*, 105 (12) : 1503 - 1508.