文章编号:1000-5404(2005)19-1939-04

论著

BRL37344对心衰大鼠血液TNF-α、AngⅡ、ET-1含量及心肌重构的影响

田 颖[1],祝善俊[1],王 江[1],李为民[2],孔一慧[2] ([1]第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037;[2]哈尔滨医科大学第一临床医学院心血管内科,哈尔滨 150001)

提 要:目的 研究β_3肾上腺素能受体激动剂BRL37344对心力衰竭(心衰)大鼠血液肿瘤坏死因子-α(TNF-α),血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)及内皮素-1(ET-1)含量和心肌重构的影响,探讨β_3AR在心衰中的作用。**方法** 用异丙肾上腺素(ISO)诱导大鼠心衰,随机分为2组:心衰(CHF)组30只,BRL组35只,另设正常对照组25只。BRL组大鼠给予BRL-37344尾静脉注射,另外两组同时注射相应剂量的生理盐水。分别在2、6周时从各组选取存活大鼠8只检测TNF-α、AngⅡ、ET-1含量、心肌组织学变化和左室质量/体质量(LVW/BW)。**结果** ①CHF组和BRL组大鼠血浆TNF-α、AngⅡ、ET-1均明显高于正常对照组($P<0.01$),BRL组各项指标也明显高于CHF组($P<0.01$);②病理组织学观察:HE染色和Masson染色均显示心衰大鼠心肌细胞破坏和胶原纤维组织增生明显;③LVW/BW:CHF组和BRL组LVW/BW明显高于对照组($P<0.01$),而BRL组又高于CHF组($P<0.01$)。**结论** BRL-37344能升高心衰大鼠血浆TNF-α、AngⅡ、ET-1含量,并且能促进左室重构,使心衰恶化。

关键词: β_3肾上腺素能受体激动剂;肿瘤坏死因子-α;血管紧张素Ⅱ;内皮素-1;心肌重构
中图法分类号: R446.11;R541.6;R977-11 **文献标识码:** A

Effect ofβ_3-adrenoceptor agonist BRL37344 on the plasma level of TNF-α、AngⅡ、ET-1 and the myocardium remodeling in rat

TIAN Ying[1], ZHU Shan-jun[1], WANG Jiang[1], LI Wei-min[2], KONG Yi-hui[2] ([1]Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Cardiology, The First Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: Objective To explore the effect of BRL37344 (BRL), a kind of β_3-adrenoceptor(β_3-AR) agonist, on the plasma level of tumor necrosis factor-α(TNF-α), angiotension Ⅱ(AngⅡ), endothelin-1(ET-1) and the changes of cardiac tissue in histopathology in normal and progressive congestive heart failure(CHF) rats. **Methods** The model of heart failure in rat was induced by isoproterenol (ISO). The rats were randomly divided into three groups: control group ($n=25$), CHF group ($n=30$), BRL group ($n=35$). BRL group received BRL 0.4 nmol·kg^{-1}·min^{-1} through caudal vein for 10 min twice a week. The other groups received normal saline instead. The following indexes were evaluated at 2nd and 6th week: plasma level of TNF-α, AngⅡ, ET-1, histopathology by HE and Masson staining and the ratio of left ventricular weight to body weight (LVW/BW). **Results** As compared with control group, the plasma level of TNF-α, AngⅡ, ET-1 of CHF and BRL group were increased remarkably($P<0.01$). There were necrotic myocardial cells and proliferative collagen fibers in heart failure rats, especially in BRL group. The ratio of LVW/BW in CHF group and BRL group were significantly increased than that of control group ($P<0.01$) and the ratio of BRL group was also increased than that of CHF group ($P<0.01$). **Conclusion** β_3-AR agonist aggravates cardiac function by increasing the plasma level of TNF-α, AngⅡ, ET-1 and progressing the necrosis of myocardial cells and the proliferation of collagen fibers.

Key words: β_3-adrenoceptor agonist; tumor necrosis factor-α; angiotension Ⅱ; endothelin-1; myocardium remodeling

作者简介:田 颖(1973-),女,黑龙江省哈尔滨市人,博士研究生,主治医师,主要从事心力衰竭的基础与临床方面的研究。电话:(023)66350239
通讯作者:祝善俊,电话:(023)68755701
收稿日期:2005-01-24;修回日期:2005-03-15

长期以来一直认为人类心脏有 β_1 及 β_2 受体，激动后产生正性肌力作用，而 β_3 受体主要存在于脂肪组织，对心脏作用不大。1996 年 Gauthier 等[1]研究发现，人类心脏同时还存在 β_3 受体。β_3 受体激动后可产生负性肌力作用，其表达在衰竭心脏比非衰竭心脏高 2～3倍，可能参与了心衰的病理生理过程。本研究通过检测心衰大鼠血液中神经激素含量和心肌组织学变化来探讨 β_3 受体在心力衰竭中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料来源

BRL37344 和 ISO 由美国 WakeFores 大学 C. P. Cheng 教授惠赠；放免试剂盒购于北京北免东雅生物技术研究所；Wistar 大鼠由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。

1.2 心衰动物模型建立及分组

选取体质量(200±20)g 雄性 Wistar 大鼠 120 只，1% 戊巴比妥钠 20～25 mg/kg 腹腔注射麻醉，以 340 mg/kg 异丙基肾上腺素[2]于中下腹部皮下注射，每日 1 次，连续 2 d。1 个月后存活的 65 只大鼠经心脏超声检查，全部出现心腔扩大，射血分数降低。心衰大鼠随机分为 CHF 组(30 只)和 BRL 组(35 只)，另设正常对照组 25 只。BRL 组给予 BRL-37344 0.4 nmol·kg^{-1}·min^{-1}尾静脉注射 10 min，每周 2 次，连续 6 周；另外两组同时尾静脉注射相应剂量的生理盐水。分别在 2、6 周时从各组随机选取存活大鼠 8 只进行实验指标的测定。

1.3 放射免疫分析方法测定大鼠血液中 TNF-α、Ang Ⅱ、ET-1 含量

1.3.1 血清 TNF-α 测定　将实验大鼠开胸，采右室血 2 ml 注入试管中，待凝固后分离血清，4 ℃ 3 000 r/min 离心，取上清测定。

1.3.2 血浆 Ang Ⅱ 测定　采右室静脉血 2 ml 在冷水浴冷却的酶抑制剂抗凝管中摇匀，以 1 000 r/min 离心 5 min(最好在 4 ℃离心)，分离取出血浆，再离心(3 500 r/min)15 min，吸取上清液测定。

1.3.3 血浆 ET-1 测定　采右室静脉血 2 ml，注入含 7.5% EDTA 二钠 30 μl 和抑肽酶 40 μl 的试管中混匀，4 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min，分离血浆，再次 4 ℃，3 000 r/min离心 5 min，取上清测定。

1.4 左室质量及左室质量/体质量(LVW/BW)

将大鼠处死，迅速取出心脏并分离左室(包括室间隔)，称量心脏及左室质量，LVW/BW 等于左室质量(mg)/体质量(g)。

1.5 组织学观察

取心室肌分别进行 HE 染色、Masson 染色。

1.5.1 HE 染色并参照 Rona 标准进行病理分级　0 度，无病变；Ⅰ度，心内膜下局灶病变；Ⅱ度，心肌大范围灶性病变，肌纤维肿胀和断裂；Ⅲ度，心肌广泛融合性病变；Ⅳ度，心肌变性坏死。

1.5.2 Masson 染色观察心肌胶原组织变化　用彩色病理图文分析系统检测心肌胶原容积分数(CVF)，即胶原面积与心室面积比。每个组织切片随机选 10 个视野(×200)，CVF 取均值。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件进行统计。组间比较用方差分析；计数资料用秩和检验。

2 结果

2.1 心衰模型成功率及死亡率

皮下注射 ISO 340 mg/mg 4 周时，心脏超声显示所有大鼠都出现心腔扩张，射血分数降低，可确定为心力衰竭大鼠。该心衰模型急性期死亡率为 44.5%，1 个月时死亡率 45.8%。

2.2 放射免疫分析测定结果

CHF 组和 BRL 组各项指标较对照组均明显升高，BRL 组更加明显，见表 1。

表 1 BRL-37344 对血浆 TNF-α，Ang Ⅱ 及 ET-1 水平的影响
($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of BRL-37344 on the plasma level of TNF-α, Ang Ⅱ and ET-1 ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Week	TNF-α(ng/ml)	Ang Ⅱ(pg/ml)	ET-1(pg/ml)
Control	2	0.28±0.10	41.91±12.13	235.34±52.32
	6	0.30±0.11	40.80±13.11	224.31±48.19
CHF	2	0.82±0.25 **	85.30±21.14 **	392.51±58.67 **
	6	1.14±0.21 **#	102.20±23.45 **	430.52±51.33 **
BRL	2	0.83±0.19 **	95.45±21.44 **	423.56±59.45 **▲▲
	6	1.40±0.26 **#	150.52±26.13 **▲▲##	522.41±53.34 **▲▲##

**: $P<0.01$, *vs* control; ▲▲: $P<0.01$, *vs* CHF; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* 2nd week

2.3 病理结果

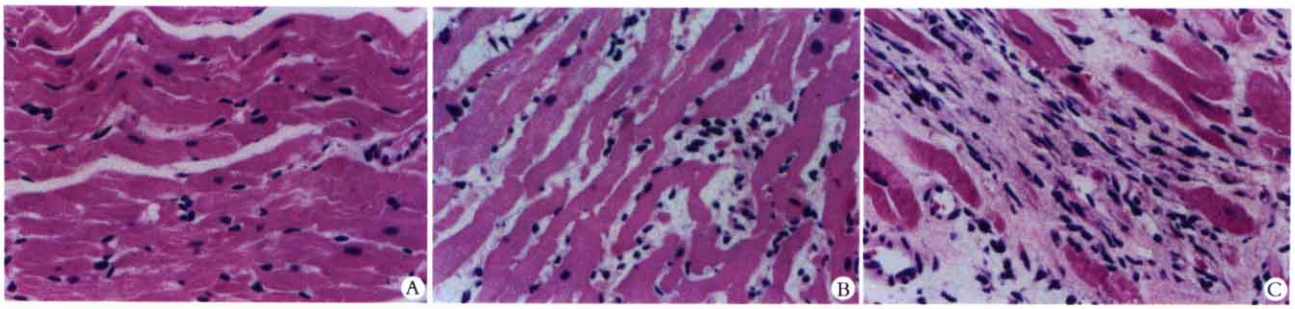
肉眼可见，CHF 组大鼠心脏呈现心肌坏死，类似心肌梗死病理变化，但呈弥漫性，且冠状动脉是通畅的。BRL 组则病变更为广泛，甚至出现大片状坏死和室壁瘤。

2.3.1 HE 染色　CHF 组心肌细胞肥大变性，排列紊乱，结缔组织增生，白细胞反应明显。BRL 组则变化更加明显，甚至出现心肌纤维断裂。见表 2 和图 1。

表 2 大鼠心肌组织病理损伤结果($n=8$)

Tab 2 Histopathologic changes of cardiac tissue ($n=8$)

Group	Week	Pathological section of myocardium				
		0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
Control	2	8	0	0	0	0
	6	8	0	0	0	0
CHF	2	0	1	4	3	0
	6	0	0	3	5	0
BRL	2	0	0	2	6	0
	6	0	0	1	6	1



A：Control；B：CHF；C：BRL

图 1　大鼠心肌组织 HE 染色结果（HE×200）

Fig 1　Histopathology of cardiac tissue by HE staining（HE×200）

2.3.2　Masson 染色　　Masson 染色可观察到 CHF 组和 BRL 组大鼠心肌胶原组织明显增生。CHF 组 CVF 在 2 周时为（13.50±3.12）%，同对照组比较 $P<0.05$；6 周时 CVF 为（16.21±3.87）%，与 2 周时相比 $P<0.05$。BRL 组 CVF 在 2 周时为（14.18±3.54）%，与 CHF 组无明显差异（$P>0.05$）；6 周时 CVF 为（20.51±4.18）%，与 2 周时及同一时间 CHF 组比较 P 均 <0.05。

2.3.3　LVW/BW 结果　　CHF 组和 BRL 组 LVW/BW 比较对照组增大，并呈时间依赖性，BRL 组更加明显，见表 3。

表 3　大鼠左室质量/体质量（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3　Ratio of LVW/BW（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Week	Weight(g)	LV weight(mg)	LVW/BW (mg/g)
Control	2	318±61	632±85	1.88±0.31
	6	371±73	656±76	1.84±0.42
CHF	2	314±51	787±69	2.50±0.27 **
	6	368±56	846±89	2.67±0.25 **
BRL	2	291±33	865±83	2.69±0.34 **▲▲
	6	320±62	896±75	2.842±0.45 **▲

**：$P<0.01$，*vs* control；▲：$P<0.05$，▲▲：$P<0.01$，*vs* CHF

3　讨论

一个确切的动物模型的建立是动物实验成功的首要条件之一。皮下注射 ISO 对动物在原发打击之后避免了其它持续损伤因素的存在，如增大后负荷、冠脉供血不全、病毒感染、特异性炎症系统刺激、细胞因子释放等，因此能很好的反映心衰的自然病理过程。Teerlink 等[2]报道，在致心衰剂量 ISO 造成心肌弥漫性坏死后，其产生的病理变化与心肌梗死相似，HE 染色心肌纤维排列紊乱，不均匀增大，细胞结构不完整，胞核增多、增大，可见空泡变，小灶状肌溶解，心肌间质增生，心肌有断裂现象。Masson 染色可见坏死区被蓝色的胶原纤维所取代。

众所周知，心衰时许多神经激素系统激活导致细胞因子和血管活性物质含量增加。TNF-α 是近年来发现的可能参与心衰发生发展过程中重要的细胞因子。Levine 等[3]首先报道心衰患者血浆 TNF-α 水平上升，且与心功能分级直接相关[4]，并促进心衰的进展和恶化[5]，血浆 TNF-α 升高的患者预后不良[6]。Ang Ⅱ能直接引起外周血管收缩，并提高交感神经系统活性，促进心衰发展，心衰时 Ang Ⅱ也会反应性增加。而 ET 被认为是迄今发现的最强的内源性缩血管肽[7]，还有类似生长因子的作用，可促进平滑肌和心肌细胞的增殖，参与心肌重构。人心力衰竭时血浆 ET 可增加 3 倍，实验动物心衰模型中增加 2 倍。本实验中，心衰大鼠血浆 TNF-α、Ang Ⅱ及 ET-1 含量明显增加，应用 β_3 受体激动剂后，增加更明显，并且呈时间依赖性增长。由此推测 β_3 受体激动剂可能通过激活交感神经系统和肾素系统-血管紧张素系统，刺激 Ang Ⅱ和 ET-1 释放使心功能恶化；同时 TNF-α 的增多，后者也可促进ET-1分泌，加重恶化心功能及损害心肌的作用。

本研究中 CHF 组和 BRL 组 LVW/BW 明显增加，证明了 ISO 诱导的心衰模型准确、可靠，引起心室腔扩大和心肌质量的改变，心肌间质重塑，心肌细胞的增生、肥大，信号传导障碍等，并且随着时间的推移而逐渐加重，导致心功能恶化。BRL 组较 CHF 组 LVW/BW 增加更明显，表明 BRL 组左室重构更加显著，说明 β_3 选择性激动剂有加重心衰的作用。CHF 组大鼠心肌细胞排列紊乱，呈现不均匀性肥大，细胞结构不完整，胞核增多、增大。心肌纤维断裂，排列紊乱，结缔组织增生，白细胞反应明显。BRL 组改变程度更重，出现心肌坏死，有的部位很少见到心肌组织，完全被胶原纤维所取代，说明 β_3 受体激动剂参与并促进了心肌重构。

心衰时出现心肌重构已得到公认，β_3 受体激动剂使心肌重构进展可以从某种程度上解释其对心功能的恶化作用，可能的机制是 β_3 受体促进心衰恶化，通过增加循环中神经激素含量促进心肌重构。TNF-α 通过诱导心肌细胞凋亡，刺激原癌基因表达，促进心肌细胞肥大等途径参与心肌重构[8,9]。Ang Ⅱ在细胞水平

促进心肌细胞的生长与胶原纤维增生，促进心肌间质纤维化[10]。在器官组织水平，引起血管平滑肌收缩，心肌肥厚，心室前后负荷增加，细胞凋亡，这些作用都会引起并加速心肌重构。ET 对心肌细胞有直接毒性作用，能够促进心肌细胞发生非适应性肥大，引起心室重构；ET 长期刺激心肌收缩，增加能量消耗，加重心衰。至于 β_3 受体能否直接参与心肌重构目前尚不清楚。

心衰早期 β_1/β_2 受体可抵消 β_3 受体的负性肌力作用，但是晚期 β_3 受体调节失衡，对其进行阻滞也许会对心衰有利，这为临床心衰的治疗开辟了新的思路，开发新的 β_3 受体阻滞剂也许会对心衰有益。

参考文献：

[1] Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, *et al*. Functional β_3-adreoceptor in the human heart[J]. J Clin Invest, 1996, 98(2): 556-562.

[2] Teerlink J R, Pfeffer J M, Pfeffer M A. Progressive ventriclar remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats[J]. Circ Res, 1994, 75(1): 105-113.

[3] Levine B, Kalman J, Mayer L, *et al*. Elevated circulationg levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure[J]. N Engl J Med, 1990, 323(4): 236-241.

[4] Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C R, *et al*. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)[J]. J Am Coll Cardiol, 1996, 27(5): 1201-1206.

[5] Young J B. Heart failure is a fever: the cytokine connection[J]. Cleve Clin J Med, 2000, 67(11): 801-803.

[6] Anker S D, Ponikowski P P, Clark A L, *et al*. Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronci heart failure[J]. Eur Heart J, 1999, 20(9): 683-693.

[7] Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, *et al*. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure[J]. Nature, 1996, 384(6607): 353-355.

[8] Bozkurt B, Kribbs S B, Clubb F J Jr, *et al*. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats[J]. Circulation, 1998, 97(14): 1382-1391.

[9] Kubota T, Miyagishima M, Frye C S, *et al*. Overexpression of tumor necrosis factor-α activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(7): 1331-1344.

[10] Asmar R, Madonna O, Brissac A M, *et al*. Comparison between the effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin Ⅱ antagonists[J]. Therapie, 1998, 53(3): 253-270.

（编辑 龙 亮）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)19-1942-01

1 例原发性红热痛的诊断与治疗

Diagnosis and treatment of one case of primary erythermalgia

周 瑜，蒋晓江，严家川 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所脑三科，重庆 400042）

患者，女，50 岁，四肢末端灼性疼痛 2 个月余，加重 7 d 入院。患者于 2 个月前无明显诱因出现四肢肢端疼痛，下肢为重，双侧对称，为针刺样、烧灼样剧烈疼痛，呈持续性，阵发性加重，站立、运动或受热后加重，休息、抬高肢体及浸入冷水中减轻。四肢肢端皮色发红，皮温增高。家族史、个人史无特殊。入院查脑神经(-)，四肢运动正常，无深浅反射障碍。血常规、大小便常规、肝功、肾功、生化、血脂、血糖、血沉、狼疮细胞、抗"O"、类风湿因子、自身抗体、肌酶谱、甲状腺素全套、肿瘤标记物、性激素、HIV 等检查均正常。诊断"红斑性肢痛症"，给予阿司匹林 50 mg，3 次/d；卡马西平 0.1 g，3 次/d；腺苷钴胺 1 mg，1 次/d；维生素 C 2 g，1 次/d；地塞米松 10 mg，1 次/d 等治疗 12 d 后患者症状无明显好转。改用"氯丙嗪 25 mg，3 次/d；赛庚啶 4 mg，3 次/d；多虑平 25 mg，1 次/晚"治疗 3 d 后患者疼痛症状开始缓解，6 d 后疼痛明显缓解，皮温降低，颜色变淡。症状好转出院。最后诊断：原发性红热痛。

讨论

原发性红热痛（primary erythermalgia，PETA）是一种原因不明的以肢端红、肿、热、痛为临床特点的末梢血管功能性疾病，是少见的阵发性血管扩张性周围神经自主神经疾病，是一种常染色体显性遗传疾病。症状可随环境温度、局部因素、精神状态等改变而改变。患者在运动、行走、站立、遇热时症状容

（下转 1945 页）

作者简介：周 瑜（1980-），女，重庆市人，医师，主要从事植物神经功能障碍方面的研究。电话：13101255252

收稿日期：2005-03-25；修回日期：2005-06-26