文章编号:1000-5404(2006)03-0223-04

论著

螺内酯和缬沙坦对高血压大鼠心肌肥大信号通路的影响

胡钢英,王晋明,江 洪,邓汉华,梁远红 (武汉大学人民医院心内科,武汉 430060)

提 要:目的 观察血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂缬沙坦和盐皮质激素受体拮抗剂螺内酯对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)心肌中活化的丝裂原活化蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinase family, MAPK)(细胞外信号调节激酶[ERK]、c-Jun NH_2-末端激酶[JNK]和p38)的影响。**方法** 将18只雄性SHR随机分为3组,每组6只。其中两组分别用缬沙坦30 mg·kg^{-1}·d^{-1}、螺内酯20 mg·kg^{-1}·d^{-1}溶于饮水灌胃,连续治疗13周;对照组给正常饮水,并与Wistar-kyoto大鼠(WKY)比较。用Western-blot方法检测大鼠心肌磷酸化MAPK的表达。**结果** SHR对照组心肌磷酸化JNK/actin值高于其余3组($P<0.01$),缬沙坦组高于螺内酯组和WKY组($P<0.01$),螺内酯组与WKY水平接近;SHR对照组心肌磷酸化ERK/actin值高于其余3组($P<0.01$),螺内酯和缬沙坦组高于WKY组($P<0.01$),两用药组之间无差异;缬沙坦组磷酸化p38/actin值高于WKY组($P<0.01$),低于SHR对照组和螺内酯组($P<0.01$)。**结论** 醛固酮能促进SHR的心肌肥厚和心肌纤维化,盐皮质激素受体拮抗剂能通过抑制MAPK途径而抑制左室肥厚和心肌纤维化。

关键词:螺内酯;心肌肥厚;左心室;心肌纤维化;SHR;MAPK
中图法分类号:R541.605;R544.1;R972 **文献标识码**:A

Effect of spironolactone and valsartan on expression of the active forms of mitogen-activated protein kinases in myocardium of spontaneously hypertensive rats

HU Gang-ying, WANG Jin-ming, JIANG Hong, DENG Han-hua, LIANG Yuan-hong (Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Objective To investigate the the role of spironolactone and valsartan in the expression of the dually phosphorylated active forms of mitogen-activated protein kinase family (MAPKs) [the extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK), p38] in myocardium of spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** Six-week male SHRs were ramdomly assigned to administrate Spironolactone at dose of 20 mg·kg^{-1}·d^{-1}, or Valsartan of 30 mg·kg^{-1}·d^{-1} or saline water that served as positive control ($n=6$ in each group) for 13 weeks. Six Wistar Kyoto rats (WKY) were used as normal control. Phosphorylation of MAPKs were assessed by Western blotting with phosphospecific antibodies. **Results** The ratio of phospho-JNK/actin in SHR control group was the highest among all groups ($P<0.01$), and that of valsartan group was higher than that of spironolactone group and WKY group ($P<0.01$). There was no significant difference between spironolactone group and WKY group($P>0.05$). The ratio of phospho-ERK/actin in valsartan group and spironolactone group was lower than that in SHR control group($P<0.01$), but higher than that in WKY group($P<0.01$). The difference between valsartan group and spironolactone group was not remarkable ($P>0.05$). The ratio of phospho-p38/actin in spironolactone group was similar to that in SHR control group ($P>0.05$), and that in valsartan group was higher than that in WKY group ($P<0.01$), but lower than that in SHR control group and spironolactone group ($P<0.01$). **Conclusion** These findings show that aldosterone promotes hypertrophy, cardiac remodeling and fibrosis, independent of blood pressure. Mineralocorticoid receptor blockade attenuates phosphorylation of MAPK and ameliorates cardiac remodeling in SHR.

Key words: spironolactone; hypertrophy; left ventricular; myocardial fibrosis; SHR; MAPK

心脏作为高血压靶器官损害的主要部位,其局部合成的醛固酮在高血压的发生、发展中起关键作用。研究表明,在心脏重塑中,醛固酮参与了心肌纤维化和心肌肥厚的发病过程,它既可受血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)调节,又可不依赖于Ang Ⅱ的调节,且与其本身的

作者简介:胡钢英(1967-),女,湖北省武汉市人,博士,主治医师,主要从事高血压防治方面的研究。电话:(027)63256686

收稿日期:2005-02-25;修回日期:2005-07-19

升压效果无关[1]。随机的醛固酮评价试验(randomized aldactone evaluation study, RALES)表明,严重心力衰竭患者在常规抗心力衰竭(包括正规使用 ACEI)的同时加小剂量螺内酯——竞争性的盐皮质激素受体拮抗剂,不仅是安全的,且显著降低其死亡率约30%,明显优于安慰剂对照组[2]。但是,此试验未直接阐明螺内酯产生这些有利效应的作用机制。本研究通过观察盐皮质激素受体拮抗剂螺内酯对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)心肌中活化的MAPK的影响,以探讨螺内酯改善心肌重塑和心力衰竭患者预后的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

6周龄雄性 SHR 18只,体质量(82.67±11.37)g,雄性 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠6只,体质量(85.22±15.28)g(均由中国医学科学院动物室提供),缬沙坦由北京诺华公司馈赠,螺内酯购自江苏盐城制药厂。RBP-1型大鼠尾动脉血压心率测定仪由中日友好医院临床医学研究所提供。磷酸化 MAPK 兔抗鼠多克隆抗体(抗磷酸化的 ERK、磷酸化的 JNK 和磷酸化的 p38)(V3281,Promega 公司),actin 小鼠抗哺乳动物抗体(Sc-8432,Santa-Cruz 公司)。Aprotinin(Sigma 公司),丙烯酰胺、双丙烯酰胺(进口分装,亚法公司代理),Bio-Rad 试剂盒、电泳槽(Bio-Rad 公司),其余试剂均为国产试剂纯。

1.2 方法

雄性 SHR 18只,采用摸球法随机分为3组,每组各6只,分别设为 SHR 阳性对照组、螺内酯治疗组、缬沙坦治疗组,6只 WKY 大鼠作为正常对照组。两治疗组分别给予螺内酯 20 mg·kg^{-1}·d^{-1}、缬沙坦 30 mg·kg^{-1}·d^{-1}溶于饮水灌胃,每天1次,连续治疗13组;两对照组不给药物,饮水不限。实验期间所有大鼠由武汉大学人民医院动物房专人饲养,标准室温和照明。

1.3 检验项目

1.3.1 血压测量 按 RBP-1 型大鼠尾动脉血压、心率仪说明方法由同1人测量各组大鼠尾动脉血压。实验前测血压1次,实验后第1、2周各测血压1次,以后每隔2周测1次血压,直到实验结束为止。

1.3.2 左心室重/体重(LVW/BW)、左室壁厚度(LVT)的测定 于鼠龄19周,经腹腔注射戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉,称取体质量后迅速开胸取出心脏,去除心房和右心室组织,保留左心室和室间隔。以 LVW/BW 值和左室壁厚度作为评价左室肥厚的定量指标。

1.3.3 心肌胶原组织学测定(Van Gieson 法) 石蜡切片常规脱蜡、至水,1%酸性品红和0.5%的饱和苦味酸染色。常规封片后,切片装在 Olympns BH-2 型显微镜下观察并摄片,采用 Videopn 32(真彩色分析系统)进行半定量研究,计算胶原容积分数(CVF)。经标准灰度校正后,随机取10个视野,在同等条件下测纤维胶原的阳性染色物质(紫红色)的平均积分光密度值 IOD 值(平均总分减去平均背景积分)。

1.3.4 磷酸化 ERK、JNK 和 p38 蛋白水平的 Western-blot 检测 参照文献[3]的方法,取大鼠心脏剪碎,加入1 ml 裂解液(Tris-Cl 50 mmol/L, pH 8.0; NaCl 150 mmol/L; Triton X-100 1%; 叠氮钠 0.02%; Aprotinin 1 μg/ml; PMSF 100 μg/ml),冰浴条件下进行组织匀浆;4 ℃,12 000×g 离心 12 min,弃除沉淀,用 Bio-Rad 试剂盒(Lowry 法)对上清液进行蛋白定量,调节蛋白浓度至2 mg/ml,磷酸化 ERK、JNK 和 p38 检测各取 50 μg,分别加入上样缓冲液,100 ℃热变性3 min 后按文献[3]报道的 Western-blot 方法检测磷酸化 ERK、JNK、p38 和 actin,SDS-PAGE 电泳,转膜,抗磷酸化 ERK、JNK 兔抗鼠多克隆抗体按照1∶2 500 稀释,抗磷酸化 p38 兔抗鼠多抗按照1∶500 稀释进行抗原抗体反应,碱性磷酸酶(AP)标记猴抗兔 IgG 二抗按照1∶5 000稀释。另外,抗哺乳动物的 actin 抗体按照1∶100 稀释,碱性磷酸酶(AP)标记的兔抗小鼠 IgG 二抗按照1∶5 000 稀释。用 BCIP/NBT 试剂盒显色,37 ℃ PBS 终止显色,结果用光密度扫描计算机图像分析。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行,单因素方差分析。

2 结果

2.1 螺内酯和缬沙坦对 SHR 血压的影响

治疗13周后,SHR 对照组的血压[(200.83±11.14)mmHg]明显高于 WKY 组[(119.3±0.88)mmHg](P<0.01);缬沙坦治疗组和螺内酯治疗组的血压[分别为(120±1.41)mmHg和(131±1.42)mmHg]明显低于 SHR 对照组(P<0.01);缬沙坦治疗组的血压与 WKY 组之间无明显差异(P>0.05),螺内酯治疗组的血压较 WKY 组有所升高(P<0.05)。

2.2 螺内酯和缬沙坦对 SHR LVW/BW 的影响

SHR 对照组的心脏指数(LVW/BW)高于其他3组(P均<0.01),缬沙坦组和螺内酯组的 LVW/BW 较 SHR 对照组明显减低(P均<0.01),但较 WKY 对照组有所升高(P<0.05,P<0.01);缬沙坦组的左室壁厚度与螺内酯组无差异,这两组的左室壁厚度均低于 SHR 对照组(P<0.01),缬沙坦组的左室壁厚度与 WKY 组接近(P>0.05),螺内酯组高于 WKY 组(P<0.05),见表1。

表1 实验13周后各组大鼠 LVW/BW、LVT 的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	LVW/BW(mg/g)	LVT(mm)
WKY 组	2.52±0.21	3.01±0.07
SHR 对照组	3.81±0.22^{b}	4.20±0.46^{b}
缬沙坦组	2.80±0.11^{ac}	3.10±0.22^{c}
螺内酯组	3.14±0.24^{bcd}	3.50±0.35^{ac}

a: P<0.05, b: P<0.01, 与 WKY 组比较; c: P<0.01, 与 SHR 对照组比较; d: P<0.05, 与缬沙坦组比较

2.3 4组大鼠胶原容积分数的比较

Van Gieson 法染色可清晰显示心肌纤维胶原呈紫红色,分布于心肌细胞间质内。SHR 组分布最多,缬沙坦组和螺内酯组胶原减少,WKY 心肌间质仅见少量胶原纤维染色。两治疗组胶原容积分数(CVF)低于 SHR 对照组(P<0.01),高于 WKY 组(P<0.05)。

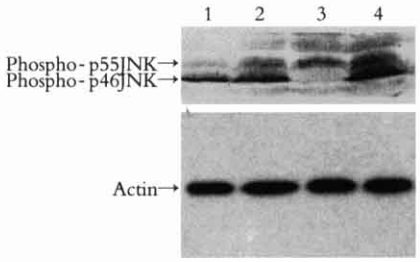
2.4　螺内酯和缬沙坦对 SHR 心肌磷酸化的 JNK、ERK 和 p38 的影响

①心肌磷酸化 JNK/actin 值（表 2，图 1）：4 组之间有显著性差异，$F=73.618$，$P<0.01$；其中 SHR 对照组高于其余 3 组（$P<0.01$）；缬沙坦组高于螺内酯组和 WKY 组（$P<0.01$）；螺内酯组与 WKY 水平接近。②心肌磷酸化 ERK/actin 值（表 2，图 2）：4 组之间有显著性差异，$F=108.616$，$P<0.01$；其中 SHR 对照组高于其余 3 组（$P<0.01$）；缬沙坦组和螺内酯组高于 WKY 组（$P<0.01$）；两用药组之间无差异。③心肌磷酸化 p38/actin 值（表 2，图 3）：4 组之间有显著性差异，$F=121.619$，$P<0.01$；其中螺内酯组磷酸化 p38/actin 值与 SHR 对照组接近（$P>0.05$）；缬沙坦组高于 WKY 组（$P<0.01$），低于 SHR 对照组和螺内酯组（$P<0.01$）。

表 2　螺内酯和缬沙坦对 SHR 心肌磷酸化 JNK、ERK 和 p38 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

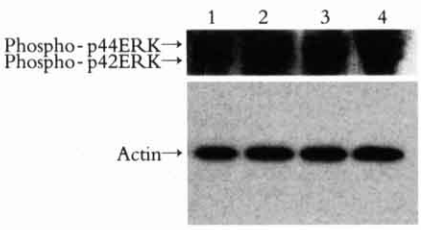
组别	Phospho-JNK/actin	Phospho-ERK/actin	Phospho-p38 /actin
WKY 组	0.087 ±0.019	0.781 ±0.04	0.982 ±0.09
SHR 对照组	0.244 ±0.025[a]	1.389 ±0.01[a]	1.639 ±0.05[a]
缬沙坦组	0.162 ±0.015[ac]	1.035 ±0.09[ab]	1.130 ±0.09[ab]
螺内酯组	0.089 ±0.024 [bc]	1.065 ±0.05[ab]	1.603 ±0.06[ac]

a：$P<0.01$，与 WKY 组比较；b：$P<0.01$，与 SHR 组比较；c：$P<0.01$，与缬沙坦组比较



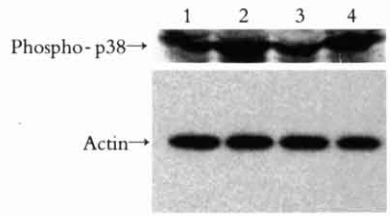
1：螺内酯组；2：缬沙坦组；3：WKY 组；4：SHR 对照组

图 1　心肌磷酸化 JNK 蛋白水平的 Western blot 检测



1：WKY 组；2：SHR 对照组；3：缬沙坦组；4：螺内酯组

图 2　心肌磷酸化 ERK 蛋白水平的 Western blot 检测



1：WKY 组；2：SHR 对照组；3：缬沙坦组；4：螺内酯组

图 3　心肌磷酸化 p38 蛋白水平的 Western blot 检测

3　讨论

心肌肥大是高血压最为常见的并发症，是心血管疾病的独立危险因素。MAPK 信号通路的逐级激活是各种肥大因子（内皮素、Ang Ⅱ、压力负荷等）刺激的共同通路。心肌肥大受许多细胞外因素的影响。各种肥大刺激分别通过 Ras/Raf 途径、蛋白激酶 C、Ca^{2+} 途径进入细胞内后，绝大多数通过 MAPK 以转位方式进入细胞核，MAPKs 一旦被激活，能使核内、核外的不同底物磷酸化[3]，激活其下游的底物如原癌基因 C-fos、C-Jun、C-myc 等的表达，调控细胞生长反应，调节细胞基因转录和蛋白合成，导致心肌细胞肥大和成纤维细胞增殖从而形成左室肥大。

本研究结果表明，用醛固酮受体拮抗剂治疗 SHR 与用 AT_1 受体拮抗剂治疗得到的结果既相似，又有不同之处。螺内酯组和缬沙坦组的血压均较 SHR 对照组明显下降，但缬沙坦组的血压低于螺内酯组，与 WKY 组接近。螺内酯组和缬沙坦组的 LVW/BW 均较 SHR 对照组明显减低，但较 WKY 对照组有所升高。说明螺内酯和缬沙坦均能抑制 SHR 左室肥大，而螺内酯发挥此效应不依赖于血压。

本研究中 Western blot 结果显示：SHR 对照组心肌磷酸化 JNK/actin 值高于其余 3 组，缬沙坦组高于螺内酯组和 WKY 组，螺内酯组与 WKY 组水平接近；缬沙坦组和螺内酯组心肌磷酸化 ERK/actin 值均低于 SHR 对照组，高于 WKY 组，两用药组结果接近：螺内酯组磷酸化 p38/actin 值与 SHR 对照组无差异，缬沙坦组高于 WKY 组，低于 SHR 对照组和螺内酯组。从以上结果可看出，螺内酯对 JNK 活化的抑制作用优于缬沙坦，这两种药物对 ERK 活化的抑制作用相当，而缬沙坦能抑制 p38 的活化，螺内酯则不能，说明这两种药物对 MAPK 作用的靶点以及作用的程度不尽相同。以上结果还表明，螺内酯能抑制 SHR 心肌中 JNK 和 ERK 的活化，醛固酮在 SHR 心肌 JNK 和 ERK 的活化中起重要作用，作用机制可能与其能上调心肌 AT_1 受体密度和 ACE 基因的作用[4,5]有关，而 JNK 和 ERK 在转录因子 AP-1 复合物形成中起着重要作用。因此，醛固酮可使 JNK 和 ERK 活化，这与 Fiebeler 等[6]报道的 AP-1 和 NF-κB 受醛固酮的活化结果一致。而 MAPK →AP-1、NF-κB 信号通路在心肌肥大和心肌纤维化的发展中起着重要的作用。另一方面，盐皮质激素受体被阻断后，大量醛固酮堆积，可通过负反馈机制使 AngII 的分泌减少；醛固酮可使心肌组织对 AngII 反应性增高，用螺内酯后可降低心肌组织对 AngII 反应性。因此，螺内酯可抑制 SHR 的心肌肥大和心肌纤维化。

本实验结果还显示，螺内酯和缬沙坦对 SHR 左室

肥大和心肌MAPK活化的抑制作用均不完全，对MAPK作用的靶点不一致。这是因为醛固酮除受AngⅡ的调节外，还受其他因素如钾离子、促肾上腺皮质激素的调控[1]。因此醛固酮在心血管疾病发病中起着重要的作用，它既有依赖于AngⅡ的一面，还具有独立于AngⅡ的一面，例如，原发性醛固酮增多症的患者AngⅡ水平很低，但是其左室肥大和卒中的发病率明显高于高血压病患者[7]。但是螺内酯对MAPK作用的靶点与缬沙坦不一致的确切机制目前尚不清楚。

综上所述，缬沙坦和螺内酯均能抑制SHR的心肌肥大和心肌纤维化，但作用均不完全。以上结果说明高血压左室重塑一部分由AngⅡ介导，另一部分由醛固酮介导，两者的作用既相互促进，又互为独立。因此，在临床高血压的治疗中，理论上可将AT_1受体拮抗剂与螺内酯联合使用以提高疗效，减少并发症和病死率。至于其具体疗效如何，还有待于多中心随机对照的临床试验进一步证实。

参考文献：

[1] ZANNAD F, DOUSSET B, ALLA F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship[J]. Hypertension, 2001, 38(5): 1227-1232.

[2] PITT B, ZANNAD F, REMME W J, *et al*. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure[J]. N Engl J Med, 1999, 341(10): 709-717.

[3] SUGDEN P H, CLERK A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium[J]. Circ Res, 1998, 83(4): 345-352.

[4] ROBERT V, HEYMES C, SILVESTRE J S, *et al*. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis[J]. Hypertension, 1999, 33(4): 981-986.

[5] WANG J, YU L, SOLENBERG P J, *et al*. Aldosterone stimulates angiotensin-converting enzyme expression and activity in rat neonatal cardiac myocytes[J]. J Card Fail, 2002, 8(3): 167-174.

[6] FIEBELER A, SCHMIDT F, MULLER D N, *et al*. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-κB activation in angiotensin Ⅱ-induced cardiac injury[J]. Hypertension, 2001, 37(2 Part 2): 787-793.

[7] TAKEDA Y, YONEDA T, DEMURA M, *et al*. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2002, 105(6): 677-679.

（编辑　薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)03-0226-01

胰岛素泵治疗糖尿病22例临床观察

钱才凤，陈婷婷　（江苏省姜堰市人民医院内分泌科，姜堰 225500）

持续皮下注射胰岛素简称胰岛素泵，能模拟正常人体胰岛素生理性分泌方式，更符合生理需要，有利于糖尿病的强化治疗。我院于2004年10月至2005年6月用胰岛素泵强化治疗糖尿病22例，取得较满意的疗效，报告如下。

1　资料与方法

1.1　对象

2004年10月至2005年6月在我院内分泌科住院的糖尿病患者，均符合1997年美国糖尿病协会(ADA)的标准，我们从中选出50例，病程2个月至19年，口服降糖药无效，口服75 g葡萄糖粉C肽、胰岛素释放试验均低平，无高峰出现需用胰岛素治疗的糖尿病患者。其中1型糖尿病3例，2型糖尿病47例，伴糖尿病酮症酸中毒3例，视网膜病变11例，周围神经病变16例，肾病7例，围手术期2例，随机分为持续皮下胰岛素注射组(CSⅡ)(22例)和常规4次胰岛素注射组(MSⅡ)(28例)；CSⅡ组男16例，女6例，年龄13～76(56.2±9.6)岁；MSⅡ组28例，男性19例，女性9例，年龄19～74(53.7±7.9)岁。两组病人在病程、年龄、体质量、血压、血脂、肾功能等无明显差别。

1.2　方法

治疗组采用CSⅡ法，对照组采用MSⅡ法，MSⅡ组3餐前皮下注射诺和灵R胰岛素(丹麦诺和诺德公司生产)和睡前注射诺和灵N胰岛素，CSⅡ组均使用诺和灵笔芯R胰岛素，由丹纳胰岛素泵(韩国秀逸有限公司制造)经导管持续皮下输注基础量及3餐前追加量胰岛素，初起量按公式(血糖克数－0.1)×3×体质量(kg)[1]，用美国强生公司稳步型血糖仪监测3餐前及后2 h血糖，必要时加测午夜及凌晨3点、5点血糖变化，按照监测的血糖值调整胰岛素的基础量及餐前量，血糖控制满意为空腹<7.0 mmol/L，餐后2 h<10 mmol/L。

1.3　观察指标

观察治疗前及治疗后的3餐前及餐后2 h的血糖、胰岛素用量、达到控制满意所需时间、低血糖反应、注射部位、局部反应等。

1.4　统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS统计软件进行t检验。

（下转230页）

作者简介：钱才凤(1966～)，女，江苏省姜堰市人，副主任医师，主要从事糖尿病治疗进展方面的研究，发表论文5篇，电话：(0523)5894680。

收稿日期：2005-07-21；修回日期：2005-11-15