论著

文章编号:1000-5404(2006)18-1864-03

压力超负荷大鼠心肌营养素-1表达对贝那普利干预的反应

金 丰[1],李隆贵[1],张钰倩[2],耿召华[1],郑宏庭[1] ([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]南京大学生命科学院生物技术系,南京 210093)

提 要:目的 探讨心肌营养素-1(cardiotrophin-1, CT-1)在腹主动脉缩窄所致大鼠压力超负荷心肌肥大模型表达的变化及其与心肌肥大的关系,以及贝那普利(benazepril, Ben)对CT-1表达及心肌肥大的影响。**方法** 用腹主动脉缩窄术建立大鼠压力超负荷性心肌肥厚模型,术后随机分为左室肥厚组($n=7$)和贝那普利干预组($n=7$,贝那普利1 mg·kg^{-1}·d^{-1},灌胃3周),另设一假手术组($n=7$)为对照。干预3周后测定血流动力学指标、左心室质量指数,应用放射免疫分析法测定心肌血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)水平,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测心肌中CT-1 mRNA表达。**结果** 与假手术组比较,左室肥厚组动物的血压与左心室质量指数显著升高($P<0.05$);心肌组织AngⅡ含量和CT-1 mRNA表达水平明显增加($P<0.01$)。贝那普利干预可显著降低血压和左心室质量指数($P<0.05$),同时降低肥厚心肌组织AngⅡ浓度与CT-1 mRNA表达水平($P<0.01$)。**结论** CT-1的过度表达参与了压力超负荷性大鼠心肌肥大的发病过程;贝那普利对CT-1的表达及心肌肥大有抑制作用。

关键词: 心肌肥大;心肌营养素-1;贝那普利
中图法分类号: R392.11;R542.202;R972.1 **文献标识码:** A

Expression level of cardiotrophin-1 and its response to Benazepril intervention in rats with pressure overload-induced cardiac hypertrophy

JIN Feng[1], LI Long-gui[1], ZHANG Yu-qian[2], GEN Zhao-hua[1], ZHENG Hong-ting[1] ([1]Department of Cardiovasology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Biological Technology Uint, School of Life Science of Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of cardiotrophin-1 (CT-1) expression in rats with pressure overload-induced cardiac hypertrophy, and the effects of benazepril on this expression and the concerned cardiac hypertrophy. **Methods** The model of pressure overload was established by constriction of abdominal aorta and divided randomly into hypertrophied group (LVH, $n=7$) and benazepril intervention group(Ben, $n=7$, benazepril 1mg·kg^{-1}·d^{-1} orally)2 weeks later. A sham-operation group (Sham, $n=7$) served as control. Blood pressure and left ventricular mass index (LVMI) were investigated after 3 weeks' treatment. AngⅡ level in myocardium was measured by radioimmunoassay. The mRNA level of CT-1 was examined by RT-PCR. **Results** Compared with the sham group, blood pressure and LVMI in LVH group were increased significantly ($P<0.05$), and AngⅡ level and CT-1 mRNA expression were enhanced significantly ($P<0.01$). Benazepril could decrease blood pressure, LVMI, AngⅡ level and the CT-1 mRNA expression ($P<0.01$) significantly. **Conclusion** The over-expression of CT-1 may play an important role in cardiac hypertrophy, and benazepril can decrease its expression and inhibit cardiac hypertrophy.

Key words: cardiac hypertrophy; cardiotrophin-1; benazepril

心肌肥大的诱导因素非常复杂,多种细胞因子参与其中,其发生发展机制尚不确切;如何预防和逆转心肌肥大已成为当今治疗心血管疾病的重点。心肌营养素-1(cardiotrophin, CT-1)属于白细胞介素-6超家族[1],是新近发现最强的能引导心肌细胞肥大的细胞因子[2]。本研究拟通过建立压力超负荷性心肌肥厚大鼠模型,阐明CT-1与心肌肥厚的关系以及观察贝那普利对二者的干预影响,并对其作用机制进行初步讨论。

1 材料与方法

1.1 试剂和药品

AngⅡ放免试剂盒(北京北方生物技术研究所);PCR引物

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30000071)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000071)
作者简介: 金 丰(1975-),男,湖南省衡阳市人,博士研究生,医师,主要从事心肌病、心力衰竭发病机制方面的研究。电话:13908315698,E-mail: jinf01@sina.com
通讯作者: 李隆贵,电话:(023)68755135
收稿日期: 2006-05-14;**修回日期:** 2006-07-12

(北京奥科生物工程有限公司); TaKaRa Taq™/RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司);Trizol(Invitrogin);贝那普利由北京诺华公司提供(商品名:洛丁新)。

1.2　实验动物模型的建立及分组

健康雄性 Wister 大鼠 21 只,体质量 180～220 g,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。2% 戊巴比妥钠(2 ml/kg)腹腔麻醉,左上腹切口,在双肾动脉上方 0.2 cm 处用 8 号针头与腹主动脉一同结扎,随后抽出枕头,形成腹主动脉缩窄病理模型。术后 2 周将存活大鼠随机分为肥厚组和贝那普利组,各组 7 只。另设假手术组 7 只。手术组其中之一予以贝那普利灌胃给药(1 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$),余两组灌等量生理盐水,疗程 3 周。

1.3　血流动力学参数检测

2% 戊巴比妥钠(2 ml/kg)腹腔麻醉大鼠,导管内充满肝素,右颈总动脉逆行插管至左心室,另一端接压力换能器输入多媒体生物信号记录仪系统,记录分析后得左室收缩压(systolic blood pressure, SBP),舒张压(diastolic blood pressure, DBP),平均动脉压(mean arterial blood pressure, MABP)。

1.4　心肌肥大检测和标本留取

将麻醉大鼠迅速开胸取出心脏,冰生理盐水洗净,滤纸吸干,沿房间沟剪掉两心房,剪掉主肺动脉,紧贴室间隔分离左心室(室间隔属左心室),用电子天平称取左心室质量,左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI) = 左心室质量/体质量。沿左心室长轴中点处留取部分心肌组织再次用灭菌的生理盐水冲洗,滤纸吸干,用锡铂纸包裹并作好标记,在 -70 ℃ 下保存,用于检测 AngⅡ。

1.5　心肌 AngⅡ含量采用放射免疫法检测

按说明书操作。

1.6　逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测心肌中 CT-1 mRNA 表达

用 Trizol 提取心肌组织中的总 RNA,用紫外分光光度计测总 RNA 纯度和含量,按照 TaKaRa *Taq*™/RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。选取 β-actin 为内参,扩增产物的 DNA 全长 764 bp,上游引物:5′-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3′;下游引物:5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3′;CT-1 的扩增产物的 DNA 全长 482 bp,上游引物:5′-TCTATGGCTAGTGAGTGAGC-3′;下游引物:5′-AGCGAGCAAGCAAAGCAAGA-3′。逆转录条件:42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,4 ℃保持。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,共进行 30 个循环;72 ℃ 5 min,4 ℃保持。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,经紫外线透射分析拍摄电泳条带。以 β-actin 为内参照,结果以 CT-1/β-actin 光密度比值表示。

1.7　统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　术后 5 周各实验组血流动力学指标和左心室质量指数与 Sham 组比较

LVH 组 SBP、DBP 和 MABP 显著增加($P<0.05$);LVMI 亦显著增高($P<0.05$)。与 LVH 组比较,Ben 组的上述指标显著降低($P<0.05$),见表 1。

表 1　各实验组血流动力学参数的比较($n=7$)

组别	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	MABP(mmHg)	LVMI(mg/g)
Sham	151.12 ± 12.37	119.67 ± 11.38	134.59 ± 12.68	2.04 ± 0.45
LVH	196.81 ± 14.99[a]	167.52 ± 11.40[a]	183.57 ± 12.12[a]	2.40 ± 0.32[a]
Ben	169.56 ± 11.51[b]	147.87 ± 11.21[b]	164.33 ± 11.23[b]	2.11 ± 0.38[b]

Sham:假手术组; LVH:心肌肥厚组; Ben:贝那普利组
a: $P<0.05$, 与 Sham 组比较; b: $P<0.05$, 与 LVH 组比较

2.2　压力超负荷性心肌肥厚大鼠心肌 AngⅡ含量及贝那普利的干预影响

LVH 组心肌 AngⅡ含量与 Sham 组比较明显增加($P<0.01$);与 LVH 组比较,Ben 组的心肌组织中 AngⅡ含量显著降低($P<0.01$),但仍与 Sham 组有显著差异($P<0.01$),见表 2。

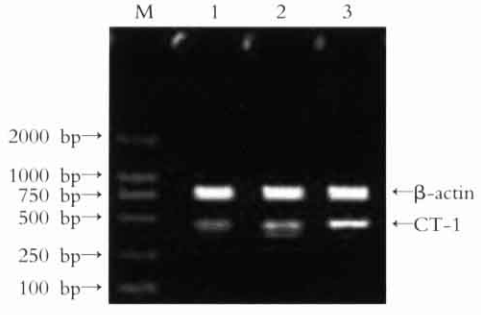
2.3　压力超负荷性心肌肥厚大鼠心肌 CT-1 mRNA 表达变化及贝那普利的干预影响

与 Sham 组比较,LVH 组 CT-1mRNA 表达显著升高($P<0.01$)。经贝那普利干预后,与 LVH 组比较,Ben 组 CT-1mRNA 显著降低($P<0.01$),但仍与 Sham 组有显著差异($P<0.01$),见表 2、图 1。

表 2　各实验组大鼠 AngⅡ及 CT-1 表达比较($n=7$)

组别	AngⅡ(心肌,pg/mg)	CT-1/β-actin
Sham	750.13 ± 170.28	0.195 ± 0.015
LVH	1512.34 ± 189.76[a]	0.402 ± 0.022[a]
Ben	801.24 ± 126.89[ab]	0.345 ± 0.020[ab]

Sham:假手术组; LVH:心肌肥厚组; Ben:贝那普利组
a: $P<0.01$, 与 Sham 组比较; b: $P<0.01$, 与 LVH 组比较



M: 标准(DL 2000); 1:假手术组; 2:治疗组; 3:肥大组

图 1　各实验组大鼠 CT-1 mRNA 表达电泳图

3　讨论

压力负荷增加是临床心肌肥厚发生的主要原因,心肌肥大又是多种心血管疾病的独立危险因素,阐明心肌肥大的发生机制对多种心脏疾病的治疗具有重要意义。早期心肌肥大是心脏维持有效心输出量的一种代偿机制,但持久的心肌肥大会导致心脏进入失代偿阶段,继而发生不可逆转的心肌肥大和扩张,心肌收缩力下降,导致心力衰竭[3,4]。

本实验采用缩窄腹主动脉制备压力超负荷性心肌肥厚模型。实验结果显示肥厚组 SBP、DBP 和 MABP

明显增高($P<0.05$)；LVMI 明显增加($P<0.05$)，说明心脏压力超负荷病理模型构建成功。实验观察到肥厚组心肌中 AngⅡ含量显著增加；贝那普利干预后，LVMI 显著降低伴随心肌的 AngⅡ含量下降。研究表明，肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的激活在心肌肥大及心室重构过程中发挥了重要作用。AngⅡ作为 RAAS 的重要效应肽是一种非常重要的致心肌细胞肥大因子，在压力负荷升高时表达增加[5]。AngⅡ在与 AT1R 结合后，激活磷脂酶产生多种磷脂来源的第二信使，使心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增加，使多种信号途径被启动，通过原癌基因的高度表达，引起心肌细胞肥大和间质增生，导致心室重构[6]。经贝那普利干预能有效地阻断 AngⅡ的生成以及其介导的心肌肥大效应，从而逆转心室重构。

心肌营养素-1(cardiotrophin，CT-1)是白细胞介素-6 超家族中最强的导致心肌细胞肥大的细胞因子[2]。CT-1 在与 GP130/白血病抑制因子复合物结合后，通过 Janus 络氨酸蛋白激酶/信号转导和转录激活因子、MAPK 细胞外信号调节激酶的激酶(MEK)-ERK，以及磷脂酰肌醇 3 激酶和 AKT(蛋白激酶 B)等信号通路引发心肌肥大[7]。最近研究表明 AngⅡ和 CT-1 均能通过 JAK/STAT 信号途径促进心肌细胞肥大[8]。本研究显示肥厚组 CT-1 表达明显增加，表明在压力超负荷性心肌肥厚中存在 CT-1 过度表达，且与 RAAS 激活关系密切。可以推测，CT-1 在心室重构的发生发展过程中可能具有重要作用。

本研究表明，经药物干预后的贝那普利组，随 LVMI 的减轻和 AngⅡ的降低，CT-1 表达明显下调。贝那普利可能是通过阻断 AngⅡ的生成，从而有效地抑制了由 AngⅡ介导的细胞因子如 CT-1 基因的过度表达。这可能是贝那普利在 RAAS 系统以外的对心肌肥厚干预作用的又一途径。这说明 CT-1 与血管紧张素系统关系密切，以及心肌细胞肥大的调节机制由多种细胞因子参与其中，它们相互联系及其制约，从而构成了一个极其复杂的网络。CT-1 在心室重构过程中的确切作用以及能被贝那普利下调的确切机制仍有待进一步研究。

参考文献：

[1] PENNICA D, KING K L, SHAW K J, *et al*. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(4): 1142-1146.

[2] JOUGASAKI M, TACHIBARA I, LUCHNER A, *et al*. Augmented cardiac cardiotrophin-1 in experimental congestive heart failure[J]. Circulation, 2000, 101(1): 14-17.

[3] GUPTA S, PURCELL N H, LIN A, *et al*. Activation of nuclear factor-kappaB is necessary for myotrophin-induced cardiac hypertrophy[J]. J Cell Boil, 2002, 159(6): 1019-1028.

[4] PURCELL N H, MOLKENTIN J D. Is nuclear factor kappaB an attractive therapeutic target for treating cardiac hypertrophy[J]? Circulation, 2003, 108(6): 638-640.

[5] KALLEN K J. The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1592(3): 323-343.

[6] DOSTAL D E, HUNT R A, KULE C E, *et al*. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(11): 2893-3902.

[7] TAKAHASHI N, SAITO Y, KUWAHARA K, *et al*. Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38(1): 185-192.

[8] FREED D H, BOROWIEC A M, ANGELOVSKA T, *et al*. Induction of protein synthesis in cardiac fibroblasts by cardiotrophin-1: integration of multiple signaling pathways[J]. Cardiovasc Res, 2003, 60(2): 365-375.

(编辑 栾 嘉)

(上接 1863 页)

采用 AO 微型钢板螺钉固定，患指开始活动的时间是术后 1～3 周，平均骨折愈合时间为 5.2 周，优良率 88.5%。克氏针固定组患指开始活动的时间是 4～6 周，平均骨折愈合时间为 8.1 周，优良率为 71.3%。

对于手部开放性骨折，在应用 AO 钢板螺钉内固定时，应注意软组织的覆盖。对于污染严重，皮肤缺损或延期闭和伤口的患者应慎用钢板固定。由于克氏针固定不占用骨折局部的有效空间，对局部软组织刺激性小，是治疗开放性骨折的有效方法。对于掌指骨头骨折，远端骨折块较小且常与侧带关节囊相连，钢板螺钉固定相对困难，克氏针固定有较大优势。

两种内固定方法比较，从骨折愈合时间、关节功能恢复和感染率看，AO 内固定具有一定优势。而克氏针固定对于开放性骨折，掌指骨头骨折有其特殊优势。

关键词：骨折固定术；掌骨；指骨；AO 微型钢板

中图法分类号：R687.32 文献标识码：B

参考文献：

[1] CLINIC ASSESSMENT COMMITTEE. Total active flexion scale, American society for surgery of the hand report[M]. New Orleans: Clinical Assessment committee, 1976: 35-37.

[2] NUNLEY J V, KLOEN P. Biomechanical and functional testing of plate fixation devices for proximal phalangeal fractures[J]. J Hand Surg (Am), 1991, 16(6): 991-998.

[3] PREVEL C D, EPPLEY B L, JACKSON J R, *et al*. Mini and micro plating of phalangeal and metacarpal fractures: a biomechanical study[J]. J Hand Surg (Am), 1995, 20(1): 44-49.

[4] 劳 杰，顾玉东，徐建光，等. 应用 AO 微型不锈钢板内固定治疗手部骨折[J]. 中华手外科杂志，2002，18(2)：66-68.

(编辑 汪勤俭)