论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0426-04

rhNRG-1β对阿霉素心肌病大鼠的治疗作用

刘 超,宋耀明,何作云,耿召华 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨rhNRG-1β对阿霉素心肌病(adriamycin-induced dilated cardiomyopathy, ADR-DCM)大鼠损伤心肌的治疗作用。**方法** 雄性SD大鼠52只,参照Schwarz的方法成功制备阿霉素心肌病大鼠23只(余29只死亡),分为:①给药组(rhNRG-1,$n=8$), rhNRG-1β 20 μg/kg;②阴性对照组(赋形剂,$n=8$),注射方法同给药组;③阳性对照组(地高辛,$n=7$),0.0625 mg/kg,注射方法同给药组。另选取同批次正常鼠作为正常对照组(CON,$n=8$)。测定心功能、血流动力学指标,心质/体质量比(HW/BW),室壁厚度,并对心肌组织进行病理学检查及血清肌钙蛋白T、BNP水平测定。**结果** 与正常对照组比较,各模型组LVSP和±dp/dt_{max}均显著降低($P<0.01$), LVEDP明显升高($P<0.01$),左室壁厚度明显下降($P<0.05$),各模型组心肌细胞明显受损,病理评分均升高($P<0.05$),血TNT及血BNP水平明显增高($P<0.05$);与地高辛组、赋形剂组及给药前比较,给药组(rhNRG-1β)给药后LVSP和±dp/dt_{max}值均明显升高($P<0.05$), LVEDP明显降低($P<0.05$),HW/BW比值及左室壁厚度差异无显著性($P>0.05$),心肌细胞坏死、变性程度轻,且病理评分明显降低($P<0.05$),血清肌钙蛋白T(Tropomyosin binding componet, TnT)水平及血脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)水平显著下降($P<0.05$)。**结论** rhNRG-1β可有效减轻阿霉素心肌病大鼠的心肌损伤,改善心功能,纠正心衰。

关键词: rhNRG-1β;地高辛;阿霉素心肌病(ADR-DCM)

中图法分类号: R-332; R542.2; R977.6 **文献标识码:** A

Effects of recombinant human neuregulin-1β on rat model of adriamycin-induced dilated cardiomyopathy

LIU Chao, SONG Yao-ming, HE Zuo-yun, GENG Zhao-hua (Cardiovascular Disease Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of recombinant human neuregulin-1β on a rat model of adriamycin-induced dilated cardiomyopathy (ADR-DCM). Methods Matched adult male Sprague-Dawley rats were administered with 2.5 mg/kg adriamycin intravenously once a week for 10 weeks to establish models of ADR-DCM. The ADR-DCM rats were randomly divided into 3 groups as follows: the rhNRG-1β group (rhNRG-1β, 20 μg/kg, i.v., once a day for 10 d, $n=8$), the negative control group (excipient, $n=8$), and the positive control group (digoxin, 0.062 5 mg/kg, i.v., once a day for 10 d, $n=7$). Another 8 normal SD rats in the same situation served as normal control group (control, $n=8$). Their heart function and hemodynamics were evaluate after the treatment. The ratio of heart weight/body weight was calculated and the thickness of LV parietes was measured. The pathological lesions of cardiac muscle tissues were evaluated after HE staining. Brain contents of natriuretic peptide (BNP) and troponin T (TnT) were determined. The animal treatment was all accorded to the ethical standards. Results Compare with the normal control group, the LVESD and LVEDD of ADR-DCM rats were increased ($P<0.01$), but the LVEF and LVFS were decreased ($P<0.01$); the LVSP and dp/dt_{max} of ADR-DCM rats were decreased ($P<0.01$) but the LVEDP was increased ($P<0.01$). ADR-DCM rats had a decreased thickness of LV parietes ($P<0.05$), damaged cardiac muscle tissues and higher pathological lesions score ($P<0.05$), with increased plasma concentrations of BNP and TnT ($P<0.05$). Compare with the control groups, rhNRG-1 treatment increased the LVSP and dp/dt_{max} ($P<0.05$), decreased LVEDP ($P<0.05$) and the pathological lesions score ($P<0.05$), and had less damaged cardiac muscle tissues and decreased plasma concentrations of BNP and TnT ($P<0.05$). Conclusion rhNRG-1 attenuates left ventricular damage and heart failure in a rat model of ADR-DCM.

Key words: recombinant human neuregulin-1β; digoxin; adriamycin; dilated cardiomyopathy

作者简介: 刘 超,女,河北省唐山市人,硕士研究生,医师,主要从事心衰发病机制及治疗方面的研究。E-mail:tsdi_tan@sina.com

通信作者: 宋耀明,电话:(023)68755614

收稿日期: 2008-07-16;**修回日期:** 2008-10-08

Neuregulin-1(NRG-1)是心脏内皮细胞表达的一种跨膜蛋白,结构上属于表皮生长因子(EGF)家族成员,其通过与心肌细胞表面的酪氨酸激酶受体(ErbB2、ErbB3、ErbB4)结合发挥生物学作用。Neuregulin-1-ErbBs 信号系统不仅参与心脏胚胎发育过程调控,并且与心脏结构形成、功能维持、心衰的发生、发展密切相关。本研究通过对阿霉素所致心肌病心衰大鼠外源性给予 NRG-1β,探讨在体条件下 NRG-1β 对阿霉素心肌病(ADR-DCM)大鼠损伤心肌的治疗作用。

1　材料与方法

1.1　材料

清洁级雄性 SD 大鼠由第三军医大学实验动物中心提供,体质量(250 ± 30)g。阿霉素由浙江海门药业有限公司生产,rhNRG-1 及赋形剂由上海泽生公司惠赠。地高辛由上海信谊药厂生产,血清肌钙蛋白检测试剂盒购自 Behring Diagnostic 公司,BNP ELISA 试剂盒(96T AssayMax Rat BNP-32)购自美国 Assaypro 公司。

1.2　方法

1.2.1　动物模型制备　　52 只雄性 SD 大鼠,参照 Schwarz[1] 的方法,阿霉素 2.5 mg/kg,经尾静脉注射,每周 1 次,连续注射 10 周,注射完成后观察 2 周。选取存活动物行心功能检查,将符合心肌病(心室腔明显扩大,收缩功能明显下降)改变的大鼠 23 只分成 3 组:1)给药组(rhNRG-1β,n = 8);2)阳性对照组(地高辛组,n = 7);3)阴性对照组(赋形剂,n = 8)。另选取同批次正常 SD 大鼠作为正常对照组(CON,n = 8)。

1.2.2　给药方法　　①给药组(rhNRG-1β,n = 8),rhNRG-1β 20μg/kg,每天 1 次,静脉注射,连续 10 d;②阳性对照组(地高辛组,n = 7),地高辛 0.062 5 mg/kg,注射方法同给药组;③阴性对照组(赋形剂,n = 8),注射方法同给药组(赋形剂主要成分:5% 注射用甘露醇,0.2% 注射人血白蛋白,10 mmol/L 磷酸盐缓冲液)。④正常对照组:同样饲养条件不加任何处理。

1.2.3　超声心动图检查　　将完成阿霉素注射的存活大鼠用 2% 戊巴比妥钠 0.4 ~ 0.6 ml 经腹腔注射麻醉,进行经胸高频超声心动图检查,在二维切面上显示胸骨旁左心长轴,然后采用 M 型超声心动图方法分别测量左室收缩末期内径(LVESD)、舒张末期内径(LVEDD)、左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS)。检测工作由影像学专业医师完成。

1.2.4　血流动力学测定　　各组别大鼠麻醉后,分离右颈总动脉,从右颈总动脉插管,经多导生物信号分析系统,记录左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大上升速率($+dp/dt_{max}$)、左室内压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)等。

1.2.5　心肌质量及左室壁厚度测定结果　　实验终止、麻醉前测动物体质量(BW),行有创导管和生理记录仪检查后,处死大鼠,立即解剖取心脏,剪去心脏周围组织和血管,吸纸吸干后称全心质量(HW),计算 HW/BW 比值。将左心室中部横向切开,测量左室游离壁的最大厚度。

1.2.6　心肌病理切片(HE 染色)　　用 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋切片后 HE 染色,光镜下观察心肌组织结果。病理评分标准:0 级:正常心肌结构,心肌细胞无萎缩与肥大,无空泡,横纹清晰;心肌排列整齐;心内膜、外膜均无异常;血管及心肌间质无变化。1 级:散在的单个心肌细胞表现为局部肌浆溶解和空泡,而邻近的心肌细胞仍正常。2 级:小至中等范围的成簇心肌细胞表现有萎缩、肌浆溶解和空泡,可见小灶性心肌细胞坏死。3 级:大范围弥漫性心肌细胞萎缩、肌浆溶解或空泡,有较明显的坏死。

1.2.7　生化指标检测　　大鼠处死后留取 3 ml 血,2 000 r/min 离心 10 min 后吸取血清,-70°C 冻存。采用电化学发光法检测血清 TNT。酶联免疫吸附法检测血浆脑利钠肽(BNP)水平。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组数据间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析。

2　结果

2.1　造模

选取 52 只清洁级雄性 SD 大鼠制备模型动物,共有 23 只模型动物造模成功(余 29 只死亡)。造模成功率为:44.2%。

2.2　超声检测结果

与正常对照组大鼠相比,模型组大鼠左室收缩末期内径(LVESD)、舒张末期内径(LVEDD)明显扩大(P < 0.01),左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS)明显降低(P < 0.01)。结果提示采用小剂量、较长周期的阿霉素注射方法能较理想的制备出心肌病心衰动物模型。结果见表 1。

表 1　不同处理组大鼠心脏超声检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVESD(mm)	LVEDD(mm)	LVEF(mm)	LVFS(mm)
正常对照组	8	3.09 ± 0.56	5.92 ± 0.29	85.0 ± 8.0	52.2 ± 2.6
模型组	8	5.64 ± 0.45[a]	6.88 ± 0.49[a]	46.0 ± 6.0[a]	30.1 ± 2.2[a]

a:P < 0.01,与对照组比较,LVDD:左室舒张末期内径;LVSD:左室收缩末期内径;LVEF:左室射血分数;LVFS:左室短轴缩短率

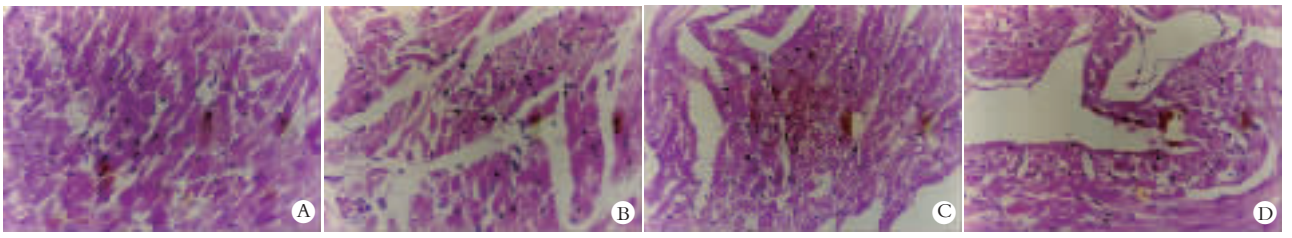
2.3　血流动力学检测结果

与正常对照组比较,各模型组 LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 均显著降低(P < 0.01),LVEDP 明显升高(P < 0.01)。与地高辛组、赋形剂组及模型组(给药前)比较,给药组(rhNRG-1β)LVSP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 值均明显升高(P < 0.05),LVEDP 明显降低(P < 0.05)。见表 2。

表 2　不同处理组大鼠流动力学检测指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$+dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)
正常对照组	8	6 988.43 ± 221.09	7 102.20 ± 587.69	121.22 ± 11.37	5.57 ± 0.84
模型组(给药前)	8	2 215.89 ± 208.66[a]	3 796.36 ± 315.09[a]	89.01 ± 5.79[a]	27.59 ± 6.25[a]
给药组	8	4 201.22 ± 188.98[ab]	5 211.05 ± 434.55[ab]	109.89 ± 15.68[ab]	12.66 ± 4.31[ab]
阳性对照组	7	3 221.07 ± 349.44[a]	4 558.99 ± 513.66[a]	93.37 ± 9.50[a]	19.85 ± 7.09[a]
阴性对照组	8	2 105.89 ± 238.74[a]	3 886.63 ± 344.06[a]	96.01 ± 4.63[a]	25.64 ± 5.58[a]

a:P < 0.01,与正常对照组比较,b:P < 0.05 与其他两对照组及模型组比较



A:阿霉素模型(给药前)组; B:赋形剂组; C:地高辛组; D:用药组

图1 不同处理组的心肌病大鼠的病理学观察 (HE×200)

2.4 心肌质量及左室壁厚度测定结果

与正常对照组比较,各模型组 HW/BW 比值差异无显著性($P>0.05$),但左室壁厚度明显下降($P<0.05$)。说明各模型组动物室壁普遍变薄。与地高辛组、赋形剂组及模型组(给药前)比较,给药组(rhNRG-1β)HW/BW 比值及左室壁厚度差异无显著性($P>0.05$)。

2.5 心肌病理切片及病理评分结果

正常组:心肌病理评分 0 分,心肌细胞无萎缩与肥大,无空泡,横纹清晰,心肌排列整齐,心内外膜无异常,血管和间质无变化;阿霉素模型(给药前)组:心肌病理评分 3 分,大面积心肌细胞溶解坏死;赋形剂组:心肌病理评分 3 分,大面积心肌细胞溶解坏死;地高辛组:心肌病理评分 2.5~3 分,较大面积心肌细胞溶解坏死,心肌排列紊乱;用药组:心肌病理评分 1 分,部分心肌细胞正常,散在心肌细胞可见局部肌浆溶解,局部可见单个心肌细胞空泡变。

与正常对照组(0.00±0.00)相比,模型组心肌细胞明显受损,病理评分均升高($P<0.05$)。与地高辛组(2.05±0.71)、赋形剂组(2.77±0.35)及模型组(给药前)(2.79±0.44)比较,给药组(rhNRG-1β)心肌细胞坏死、变性程度轻,且病理评分(1.09±0.62)明显降低($P<0.05$)。见图 1。

2.6 生化指标检测结果

与正常对照组相比,各模型组血 TNT 含量及血 BNP 水平明显增高($P<0.05$),与地高辛组、赋形剂组及模型组(给药前)比较,给药组(rhNRG-1β)可显著降低血 TNT($P<0.05$)及血 BNP 水平($P<0.05$)。见表 4。

表4 不同处理组大鼠血 TNT 及血 BNP 检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TNT(ng/ml)	BNP(μg/L)
正常对照组	0.339±0.080	0.20±0.05
模型组(给药前)	24.25±16.97[a]	0.49±0.04[a]
给药组	1.47±0.62[ab]	0.22±0.04[ab]
阳性对照组	19.73±11.09[a]	0.31±0.07[a]
阴性对照组	23.45±17.89[a]	0.47±0.04[a]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较, b: $P<0.05$,与其他两对照组及模型组(给药前)比较

3 讨论

最新的研究表明 Neuregulin-1 – ErbB 信号系统在心脏有着更广泛的生理作用且与交感–迷走神经系统相互作用调节心脏功能。近年来相关研究成果较为丰富。实验证实 NRG-1 或 ErbB2 缺陷(NRG-1or ErbB2-deficient)的小鼠将会发展成扩张型心肌病[2,3]。体外实验表明,NRG-1 可调控心肌细胞存活、肥大、增殖、肌原纤维的重组以及心肌细胞-细胞间的作用,并且 NRG-1 还可减少由于氧化应激和 anthracycline(化疗药物)导致的心肌细胞凋亡[4]。Sawyer 等[5]用阿霉素诱导培养的成年大鼠心室细胞(ARVMs),导致细胞排列紊乱,应用 NRG-1β(10 ng/ml)后,显著减轻了这种排列紊乱。在体实验表明 Neuregulin-1-ErbB 信号系统具有抗心肌毒性等作用[6]。Liu 等[7]将外源性 Neuregulin-1β(rhNRG-1β)应用于正常和缺血性心肌病、扩张型心肌病、病毒性心肌病等动物模型,结果显示短期静脉内注射 rhNRG-1,并不改变发育正常的犬和鼠的血流动力学及心脏收缩性,但是改善了 3 种模型动物心脏的作功能力,存活时间。新近报道关于 Neuregulin(NRG)对快速起搏所致猴心力衰竭心肌细胞损伤的保护作用及可能机制的研究中发现快速起搏状态下连续 10 d 静脉注射给予 3 μg/kg rhNRG-1β 后,左心室的最大压力上升速度($LVdp/dt_{max}$)显著升高,脑钠肽水平降低;快速起搏诱导的心肌细胞凋亡受到明显抑制;同时心肌组织蛋白激酶 B 活性显著增强,Bcl-xl 蛋白水平也明显增加,提示 NRG 保护快速起搏所致猴心力衰竭心肌细胞损伤[8]。

阿霉素是一种广谱高效的蒽醌类广谱抗肿瘤化疗药物,由于阿霉素与心肌组织的亲和力明显高于其他组织,因此具有严重的心脏毒性。长期使用阿霉素对心脏的慢性毒性作用主要是与累计量有关的扩张性心肌病和充血性心力衰竭。本研究结果提示模型组大鼠 LVESD、LVEDD 明显扩大,LVEF、LVFS 明显降低,该模型与人类扩心病特征极为相似,采用小剂量、较长周期的阿霉素注射方法能较理想的制备出心肌病心衰动物模型。本实验分组设置阴性对照组、阳性对照组、正常对照组,参考 rhNRG-1β 对慢性心衰作用的量效与时效关系的研究结果静脉给予外源性 rhNRG-1β 连续 10 d 后测定血流动力学,心质量/体质量比,室壁厚度等指标并对心肌组织进行病理学检查及进行血清肌钙

蛋白 T 及 BNP 水平测定,结果显示给药组模型动物血流动力学得到了明显改善,心肌组织病理切片明显提示心肌变性、坏死程度减轻,作为心肌损伤标志物的血 TNT 水平明显降低提示心肌损伤减轻,而心功能损伤标志物血 BNP 水平明显下降说明模型大鼠心衰程度明显减轻。本实验结果提示给予外源性 rhNRG-1β 可有效减轻阿霉素心肌病大鼠的心肌损伤,改善心功能,纠正心衰。

综上所述,尽管 Neuregulin-1-ErbB 信号系统参与心脏功能调节、减轻心肌损伤的分子机制尚不完全清楚,但 rhNRG-1β 作为一种区别于常规抗心衰治疗药物的新型药物,其作用正在被越来越多的研究所证实。

参考文献:

[1] Schwarz E R, Pollick C, Dow J, *et al*. A small animal model of non-ischemic cardiomyopathy and its evaluation by transthoracic echocardiography[J]. Cardiovasc Res, 1998, 39(1):216 – 223.

[2] Garcia-Rivello H, Taranda J, Said M, *et al*. Dilated cardiomyopathy in Erb-b4-deficient ventricular muscle[J]. Am J Phy-siol Heart Circ Physiol, 2005, 289(3):H1153 H1160.

[3] Liu F F, Stone J R, Schuldt A J, *et al*. Heterozygous knockout of neuregulin-1 gene in mice exacerbates doxorubicin-induced heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(2):H660 H666.

[4] Lemmens K, Doggen K, De-Keulenaer G W. Role of neuregulin-1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease: implications for therapy of heart failure[J]. Circulation, 2007, 116(8): 954 – 960.

[5] Sawyer D B, Zuppinger C, Miller T A, *et al*. Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1beta and anti-erbB2: potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity[J]. Circulation, 2002, 105(13):1551 – 1554.

[6] Lemmens K, Doggen K, Keulenaer GW. Neuregulin-1 and its potential role in the control of cardiac function[J]. Heart Fail Monit, 2008, 5(4): 119 – 124.

[7] Liu X, Gu X, Li Z, *et al*. Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(7): 1438 – 1447.

[8] 李　江, 强　鸥, 王　莉. Neuregulin 对快速起搏所致猴心力衰竭心肌细胞凋亡及磷脂酰肌醇 3 激酶信号转导途径的影响[J]. 中南大学学报:医学版, 2007, 32(3):408 – 412.

(编辑　王　红)

(上接 422 页)

1.3　治疗

1 例血 β-HCG 定量 136 U/L,直接行全身麻醉气管插管后宫腔镜下宫颈妊娠组织清除术。3 例血 β-HCG 定量大于 500 U/L,入院后予 MTX 20 mg 肌肉注射每日 1 次,共 5 日。此 3 例治疗后复查超声及血 β-HCG 定量,超声提示宫颈异常占位血流信号减弱,血 β-HCG 下降至 500 U/L 以下再行宫腔镜手术。检查见宫颈妊娠物位于宫颈管,4 例均见典型绒毛样组织。采用等离子环形电极电切清除妊娠组织,创面予球形电凝止血。1 例宫腔镜清除妊娠病灶后创面出血多,超过 200 ml,立即行腹腔镜下双侧子宫动脉阻断术,阻断后宫颈创面出血明显减少,继续创面电凝止血,止血效果好。

1.4　术后随访

患者术后平均阴道流血时间 21 d(16 ~ 34 d),血 β-HCG 平均 22.5 d(16 ~ 39 d)降至正常。患者术后随访至今月经周期及月经量较术前均无明显变化。

2　讨论

宫颈妊娠一经诊断,应积极处理。近年来临床应用较多的有药物治疗、刮宫治疗和动脉介入治疗等。各种治疗方法各有不足。药物化疗治疗时间长,血 HCG 下降缓慢;介入治疗和介入化疗可能导致卵巢功能下降;刮宫术可能致无法控制的出血,最终无法避免子宫切除。近来有人在腹腔镜辅助下行子宫动脉阻断术,然后行刮宫术治疗宫颈妊娠,取得了良好的效果,手术平均时间 119 min,术中平均出血 125 ml[2]。但该方法对宫颈妊娠部位较深者仍可能发生漏吸或组织残留。

对本组 4 例宫颈妊娠病例,我们先采用药物治疗减少宫颈妊娠局部血液循环,之后在宫腔镜直视下清除妊娠物,并予创面止血。优点在于彻底清除妊娠病灶,治疗时间短,术后月经恢复快,阴道流血时间短。1 例宫腔镜下病灶清除后出血较多的患者我们立即采用腹腔镜下子宫动脉阻断的方法减少了宫颈创面出血,可达到介入栓塞的效果,而且避免了放射线对卵巢的损伤。

研究表明孕囊较大,有胎心血管搏动或 HCG 较高的宫颈妊娠患者保守治疗成功率相对较低。我们选择血 β-HCG 相对较低、妊娠局部血流信号欠丰富的患者入组,且在 β-HCG 降至 500 U/L 以下之后进行手术,试图避免孕囊绒毛丰富、血流丰富的病例术中出现难以控制的出血。本治疗方法要求手术者操作熟练,而且要求能熟练掌握腹腔镜下子宫动脉阻断术,在出血较多情况下能迅速阻断子宫动脉血流。

宫颈妊娠是一种发病率较低的异位妊娠,国内外的治疗经验不多[3],我们也仅选择 4 例适合病例进行腔镜治疗,对于病例的选择、术中术后处理所以仍需长期探索,积累经验,为临床治疗提供更多信息。

关键词: 宫颈妊娠;宫腔镜

中图法分类号: R714.22　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] Sherer D M, Dalloul M, Santoso P, *et al*. Complete abortion of a nonviable cervical pregnancy followin g methotrexate treatment. Am – J – Perinatol, 2004, 21(4):223 – 226.

[2] Kung F T, Lin H, Hsu T Y, *et al*. Differential diagnosis of suspected cervical pregnancy and conservative treatment with the combination of laparoscopy – assisted uterine artery ligation and hysteroscopic endocervical resection. Fertil Steril, 2004, 81(6):1642 – 1649.

[3] 李爱军. 宫颈癌合并妊娠 6 例治疗体会[J]. 郑州大学学报:医学版, 2006, 41(5):1020 – 1021.

(编辑　栾　嘉)