

压力超负荷性肥大心肌中血管紧张素 ① 和肿瘤坏死因子 α 表达的变化及其相互关系

苏兴利¹, 高广道², 张润岐¹, 王佐贤¹, 王新风², 刘进军², 林元喜²

(1. 陕西医学高等专科学校病理生理学教研室, 陕西省西安市 710068;

2. 西安交通大学医学院病理生理学教研室, 陕西省西安市 710063)

[关键词] 病理学; 心肌肥大机制; 酶联免疫吸附法; 心肌肥大; 血管紧张素 ① ; 肿瘤坏死因子 α ; 开搏通

[摘要] 为探讨压力负荷性肥大心肌中肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 ① 的表达及其与心肌肥大的关系, 采用腹主动脉缩窄法复制压力超负荷性心肌肥大动物模型, 于术后 42 天测定心肌肥大指数, 并用放射免疫法测定血浆及左心室肌血管紧张素 ① 含量; 用酶联免疫吸附法测定血清及左心室肌肿瘤坏死因子 α 含量。结果发现, 术后 42 天左心室心肌明显肥大; 心室肌肿瘤坏死因子 α 、血管紧张素 ① 含量分别比假手术组增高约 6 倍和 1 倍($P < 0.01$); 主动脉缩窄术后开搏通干预能显著抑制心肌肥大的发展, 使心室肌肿瘤坏死因子 α 含量下降 64.14% ($P < 0.01$), 但未恢复到假手术组水平($P < 0.01$); 心室肌血管紧张素 ① 含量下降 45.73% ($P < 0.01$), 与假手术组无显著性差异。结果提示, 压力负荷增加心肌血管紧张素 ① 含量, 引起心肌组织肿瘤坏死因子 α 含量升高, 可能是压力超负荷性心肌肥大的主要调控路径之一。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Relation of Expression of Tumor Necrosis Factor- α and Angiotensin ① in Hypertrophic Myocardial on Stress Load

SU Xing-Li¹, GAO Guang-Dao², ZHANG Run-Qi¹, WANG Zu-Xian¹, WANG Xin-Feng², LIU Jin-Jun², and LIN Yuan-Xi²

(1. Department of Pathophysiology, Shanxi Medical College, Xi'an 710068, China; 2. Department of Pathophysiology, Medical college of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710063, China)

[KEY WORDS] Cardiac Hypertrophy; Angiotensin ① ; Tumor Necrosis Factor- α ; Captopril; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Ratior Immunity

[ABSTRACT] **Aim** To clarify the relation of expression change of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and angiotensin ① (Ang ①) in hypertrophic myocardial on stress load. **Methods** Sampling blood and extirpate heart after 42 days in the cardiac hypertrophy model of exceed stress load were made by abdomen aorta constriction; determining hypertrophic exponent and the concentration of Ang ① in the plasma and myocardium by Ratior immunity; determining TNF- α in serum and left ventricle by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Left ventricle showed obvious hypertrophy after operation 42 days; the concentration of TNF- α and Ang ① in myocardium heighten 6 folds and 1 fold than controls ($P < 0.01$); Being treated by Captopril can restrain the progress of left ventricle hypertrophy after operation and descend the content of TNF- α in myocardium 64.14% ($P < 0.01$), but can not descend to the level of sham operated group ($P < 0.01$). Being the content of Ang ① descend 45.73% ($P < 0.01$) and had no marked significance to the level of sham operated group. **Conclusions** The activation of cardiac renin-angiotensin system (RAS) by excess stress load result to heighten TNF- α in myocardium and it is probably one of the major adjusting path of myocardial hypertrophy.

心肌肥大是心肌细胞对持续负荷增加的一种适应性反应。初期的心肌肥厚有一定的代偿意义, 但

心肌肥大过程中发生的心肌重建(remodeling)最终可导致心力衰竭。目前对心肌肥大的发病机制仍不完全明了。近年关于肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)在心肌肥大及心力衰竭中的作用受到研究者高度关注^[1,2], 但研究资料多为在培养细胞上获得。本研究通过缩窄大鼠腹主动脉制造压力超负荷性心肌肥大模型, 探讨持续压力超负荷所致心肌肥大时心肌 TNF- α 与心肌血管紧张素 ① (angiotensin ① , Ang ①)的变化及其相互关系。

[收稿日期] 2003-05-28 [修回日期] 2003-11-05

[基金项目] 陕西省卫生厅青年科研基金(200009)项目

[作者简介] 苏兴利, 男, 1971 年 4 月出生, 陕西省长安县人, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为心肌肥大的发生机制。E-mail: suxingli@hotmail.com。高广道, 男, 1944 年出生, 陕西省西安市人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心力衰竭的机制研究。张润岐, 男, 1957 年 8 月出生, 陕西省岐山县人, 副教授。王佐贤, 男, 1942 年 11 月出生, 山西省万荣县人, 教授。王新风, 女, 1975 年 2 月出生, 山东, 助教, 在读博士研究生, 研究方向为心力衰竭的发生机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型

成年健康雄性 Wistar 大鼠, 体重为 220~280 g, 由第四军医大学实验动物中心提供。随机分为三组, 每组 30 只: 腹主动脉缩窄组: 戊巴比妥钠复合麻醉后, 于左肾动脉上方小心分离约 3 mm 长的腹主动脉, 套以内径为 0.8 mm 银夹缩窄腹主动脉。术后常规饲养 6 周。④假手术组: 除不以银夹缩窄腹主动脉外, 其余操作同腹主动脉缩窄组。⑤开搏通干预组: 腹主动脉缩窄术后 3 天以自由饮水方式给予开搏通[75 mg/(kg·d)]。各组分别在术后 6 周以戊巴比妥钠麻醉后称体重、腹主动脉采血、摘取心脏。测量全心重、右室游离壁重、左室重(包括左室游离壁和室间隔), 并计算心室重与体重比值(V/Bwt, Hermann Wilson's 公式)作为心肌肥大指数。

1.2 血浆及左心室肌组织血管紧张素 ②含量测定

将大鼠腹腔动脉血 3 mL, 置于含抗凝剂和抑制剂(0.3 mol/L EDTA-Na₂, 0.34 mol/L 8-羟基喹啉和 0.32 mol/L 二巯基丙醇)的试管中, 4 000 g 离心 15 min; 取左心室肌组织约 500 mg, 剪碎, 加入 3 mL 0.1 mol/L 醋酸置于玻璃匀浆器制备组织匀浆, 上述操作均在冰浴中进行。心肌匀浆 10 000 g 离心 20 min, 上清液以放射免疫法(放射免疫试剂盒由北京福瑞生物公司提供)测定 Ang ②含量。

表 1. 腹主动脉缩窄术后 42 天心室重与体重比值的变化

Table 1. The changes of V/Bwt after aorta constriction 42 days

分 组	n	体重 (kg)	心室重 (g)	心室重/体重	左心室重/体重	右心室重/体重
假手术组	26	0.34 ± 0.03	1.01 ± 0.11	2.94 ± 0.11	2.07 ± 0.09	0.8732 ± 0.010
腹主动脉缩窄组	27	0.35 ± 0.03	1.47 ± 0.19 ^a	4.3 ± 0.5 ^a	3.39 ± 0.04 ^a	0.866 ± 0.0136
开搏通干预组	27	0.32 ± 0.04	1.03 ± 0.13 ^b	3.2 ± 0.3 ^{ab}	2.40 ± 0.03 ^{ab}	0.818 ± 0.0113

a: $P < 0.01$, 与假手术组比较; b: $P < 0.01$, 与腹主动脉缩窄组比较。

2.2 压力负荷增加致血浆及心肌组织血管紧张素 ②含量变化

大鼠腹主动脉缩窄术后 42 天, 血浆 Ang ②虽较假手术组有轻度升高(升高约 7.5%), 但无显著性差异; 术后开搏通干预组大鼠血浆 Ang ②浓度较腹主动脉缩窄组和假手术组明显降低($P < 0.01$)。结果表明实验剂量的开搏通已明显抑制大鼠循环肾素-血管紧张素系统活性。腹主动脉缩窄术后心肌中 Ang ②的含量较假手术组升高约 1 倍; 开搏通干预后心肌组织中 Ang ②含量已显著低于腹主动脉缩窄组, 与假手术组无明显差异。对照实验中心肌 Ang

1.3 血清及左心室肌组织肿瘤坏死因子 α 含量的测定

大鼠腹腔动脉血 3 mL, 置于无热源的试管中, 4 000 g 离心 15 min; 取左心室肌组织约 500 mg, 剪碎, 加入 3 mL 冰冻生理盐水于玻璃匀浆器制备组织匀浆, 13 800 g 离心 10 min。取上清液以酶联免疫吸附法(酶联免疫试剂盒由深圳晶美生物公司提供)测定 TNF-α 含量。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 统计软件(SPSS for Windows 10.0)对所得数据进行分析。各数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据处理根据方差齐性分析的结果, 采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异标准。

2 结果

2.1 压力负荷增加后心室重与体重比值的变化

大鼠腹主动脉缩窄术后 42 天, 心室重与体重比值和左心室重与体重比值与假手术组相比显著增高, 分别高出对照组 44.46% 和 63.61%; 右心室重与体重比值与假手术组相比无明显差异; 开搏通干预组与腹主动脉缩窄组相比, 其心室重与体重比值和左心室重与体重比值显著低于腹主动脉缩窄组($P < 0.01$; 表 1, Table 1)。

②含量与血浆 Ang ②含量的变化, 明显可见腹主动脉缩窄术后心肌 Ang ②含量与血浆 Ang ②含量无直接关系。

表 2. 各实验组血浆及左心室心肌血管紧张素 ②含量变化

Table 2. The concentration of Ang ② in plasma and myocardium in the three groups

分 组	n	左心室 (10^{-9} /g)	血浆 (10^{-6} /L)
假手术组	12	0.64 ± 0.12	0.16 ± 0.04
腹主动脉缩窄组	12	1.26 ± 0.29 ^a	0.17 ± 0.05
开搏通干预组	13	0.68 ± 0.09 ^b	0.131 ± 0.023 ^{ab}

a: $P < 0.01$, 与假手术组比较; b: $P < 0.01$, 与腹主动脉缩窄组比较。

2.3 压力负荷增加致血清及心肌组织中肿瘤坏死因子 α 含量变化

三组血清中均未检测到 TNF- α , 而心肌组织中均能检出, 假手术组含量极低, 腹主动脉缩窄组心肌中 TNF- α 含量较假手术组升高近 6 倍 ($P < 0.01$), 开搏通干预组心肌中 TNF- α 含量较腹主动脉缩窄组显著降低 ($P < 0.01$), 但仍高于假手术组 ($P < 0.01$)。

表 3. 各实验组心肌组织中肿瘤坏死因子 α 含量

Table 3. The concentrations of TNF- α in myocardium in the three groups

分 组	n	左心室 ($10^{-9}/g$)
假手术组	14	0.064 $\pm$ 0.025
腹主动脉缩窄组	14	0.46 $\pm$ 0.12 ^a
开搏通干预组	14	0.17 $\pm$ 0.04 ^{ab}

a: $P < 0.01$, 与假手术组比较; b: $P < 0.01$, 与腹主动脉缩窄组比较。

3 讨 论

心肌内源性 Ang Ⅱ是引起心肌肥大、心脏纤维化重要的效应分子之一^[3,4], 本实验进一步验证持续压力负荷增加, 激活心肌肾素-血管紧张素系统, 在压力负荷性心肌肥厚发生中起重要的调控作用。

本实验中三组大鼠血清均未检测出 TNF- α , 与离体实验结果相似^[5,6]。正常时血清 TNF- α 含量极低, 当心衰发生时 TNF- α 表达明显上调, 进入循环血液的 TNF- α 增多, 在血清中就能被检测到。本实验中腹主动脉缩窄组已发生明显的心肌肥大, 虽实验中未进行心功能测定, 而腹主动脉缩窄组与假手术组大鼠在术后六周中体重增长程度相同; 术后存活率无差异; 术后六周收集血液及心脏标本时注意观察了动物表现, 腹主动脉缩窄组无呼吸困难, 未见肺淤血、水肿等变化。提示本实验中腹主动脉缩窄组存在明显的心肌肥大, 无明显的心力衰竭, 即心功能尚处于代偿阶段。本实验肥大心肌组织中 TNF- α 水平显著升高, 表明肥大未衰竭心肌组织中 TNF- α 的表达即已明显上调, 但循环血中尚无 TNF- α 。

腹主动脉缩窄术后早期开搏通干预使心肌肥大程度显著减轻, 心肌 Ang Ⅱ含量基本维持在假手术

组水平的同时, 也使心肌组织中的 TNF- α 表达虽未维持在假手术组水平却已较腹主动脉缩窄组显著降低。这一结果提示压力负荷性心肌肥大、心肌 Ang Ⅱ及心肌 TNF- α 水平三者间可能存在着内在的相互联系。开搏通干预后可使心肌 TNF- α 含量明显下降, 提示心肌 TNF- α 的产生可能与心肌组织产生的 Ang Ⅱ有关, 但开搏通干预组 TNF- α 与假手术组比较仍然明显增高, 其可能原因是心肌中还存在 TNF- α 产生的其他途径^[7]。我们对腹主动脉缩窄组心室肌组织 Ang Ⅱ与左心室重/体重比值的相关程度及 TNF- α 与左心室重/体重的相关程度进行比较, 结果发现, TNF- α 与左心室重/体重比值的相关性 ($r = 0.881$, $P < 0.01$) 大于 Ang Ⅱ与左心室重/体重比值的相关性 ($r = 0.782$, $P < 0.01$)。提示 TNF- α 与左心室重/体重比值可能具有更为直接的关系。

细胞培养实验发现, 一定浓度的 TNF- α 可使培养的心肌细胞呈现肥大效应^[8], 因此本实验提示心肌内源性 TNF- α 在慢性压力超负荷性心肌肥大的发生发展中起着重要的调控作用, 而此时心肌中肾素-血管紧张素系统激活是心肌中 TNF- α 表达上调的重要调控因素, 但并非唯一因素。

[参考文献]

- [1] Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, 1990, **323** (4): 236-241
- [2] Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadam T, Kubota T, Li YY, et al. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *JACC*, 2000, **35** (3): 537-544
- [3] 曹政, 王家宁, 杨桂元, 李建军. 醛固酮促进血管紧张素 Ⅱ诱导大鼠心脏成纤维细胞合成胶原. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 135-138
- [4] 中景平, 李瑞峰, 雷立权, 高广道. 心肌梗死大鼠心肌成纤维细胞对血管紧张素 Ⅱ的反应性. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 115-117
- [5] Bryant D, Becker L, Richardson J, Shalton J, Franco F, Peshock R, et al. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*, 1998, **97** (14): 1375-381
- [6] Stamm C, Friehs I, Cowan DB, Moran AM, Cao-Danh H, Duebener LF, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves postischemic recovery of hypertrophied hearts. *Circulation*, 2001, **104** (12 suppl 1): I350-355
- [7] Yokoyama T, Sekiguchi K, Tanaka T, Tomaru K, Arai M, Suzuki T, et al. Angiotensin Ⅱ and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol*, 1999, **276** (6 Pt 2): H1968-976
- [8] Higuchi Y, Otsu K, Nishida K, Hirotani S, Nakayama H, Yamaguchi O, et al. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF- κ B activation in tumor necrosis factor-induced cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **34** (2): 233-240

(此文编辑 文玉珊)