

可溶性环氧化物水解酶抑制剂对压力负荷增加所致小鼠心肌肥厚的影响

许丹焰¹, 赵水平¹, 刘玲¹, 谢小梅²

(中南大学湘雅二医院 1. 心内科, 2. 老年内科, 湖南省长沙市 410007)

[关键词] 内科学; 可溶性环氧化物水解酶抑制剂; 心肌肥厚; 基因, 心房钠尿肽; 基因, α 肌凝蛋白重链; 基因, β 肌凝蛋白重链; 基因, 骨骼肌 α 肌纤蛋白; 核因子 KB

[摘要] 目的 观察可溶性环氧化物水解酶抑制剂对小鼠心脏及心肌肥厚标志基因的影响, 并探讨该类药物影响心肌肥厚的可能机制。方法 观察压力负荷增加及用可溶性环氧化物水解酶抑制剂干预后心脏的病理学改变, 并用半定量逆转录聚合酶链反应法检测心肌肥厚基因(心房钠尿肽基因、 α 肌凝蛋白重链基因、 β 肌凝蛋白重链基因和骨骼肌 α 肌纤蛋白基因)表达的差异, 用 Western 检测核因子 KB 的活化情况。结果 可溶性环氧化物水解酶抑制剂可以明显使心脏重与体重的比值、左心室短轴缩短率和左心室收缩期末腔径明显改善, 并减少压力负荷增加引起的小鼠心肌肥厚基因的表达, 抑制核因子 KB 的表达。结论 可溶性环氧化物水解酶抑制剂能抑制压力负荷增加所致的心肌肥厚, 这一作用有可能通过抑制核因子 KB 途径来实现。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor on Pressure Overload Induced Cardiac Hypertrophy in Mice

XU Dan-Yan¹, ZHAO Shu-Ping¹, LIU ling¹, and XIE Xiao-Mei²

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Geriatrics, Xiangya Second Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor; Cardiac Hypertrophy; Gene, Atrial Natriuretic Peptide; Gene, α Myosin Heavy Chain; Gene, β -Myosin Heavy Chain; Gene Skeletal Muscle α actin; Nuclear Factor KB

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of soluble epoxide hydrolase inhibitor (sEHi) on cardiac hypertrophy.

Methods The pathology changes of the hearts were observed in the pressure overload mice and pressure overload mice fed with sEHi. Semi-quantitative RT-PCR was used to measure the expression of hypertrophy genes: atrial natriuretic peptide (ANP), α myosin heavy chain (α MHC), β -myosin heavy chain (β MHC), skeletal muscle alpha actin (SM α -actin). Western blot was used to measure the changes of nuclear factor (NF)- KB complex.

Results sEHi could significantly decrease both heart weight/body weight ratio and dimension of left ventricular end systolic chamber, increase fractional shortening. It could also reduce hypertrophy gene expression, and inhibit the activity of NF- KB .

Conclusion sEHi might inhibit pressure overload induced cardiac hypertrophy through the effects on NF- KB pathway.

可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (soluble epoxide hydrolase inhibitor, sEHi) 通过抑制可溶性环氧化物水解酶 (soluble epoxide hydrolase, sEH) 的活性抑制环氧化花生四稀酸 (epoxyeicosatrienoic acid, EET) 维持其在组织与血液中的浓度。从而发挥 EET 的生物活性, 主要为血管松弛作用^[1]。这类药物对于高血压的治疗作用是近年来的新的研究热点^[2], 但目前国内外尚没有关于 sEHi 对心肌作用的报道。本研究将 sEHi 应用于心肌肥厚的动物模型, 观察用药后心

脏的心肌肥厚基因表达的变化及心脏的病理学改变, 探讨 sEHi 对心肌肥厚作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

可溶性环氧化物水解酶抑制剂 (sEHi) 由美国加州大学戴维斯分校 Bruce Hommock-Nipavan Chiamvimonvat 教授惠赠; TRIZOL, 反转录试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国); 细胞浆及细胞核蛋白提取试剂盒 (PIERCE 美国); IKB , p- IKB 及 P65 单克隆抗体 (Santa Cruze, 美国)

1.2 动物心肌肥厚模型的制作

雄性 C57BL/6 8 周龄小鼠分成 3 组: 假手术组 17 只, 手术组 29 只, 手术+药物组 (简称药物组) 22

[收稿日期] 2006-01-03 [修回日期] 2006-05-16

[作者简介] 许丹焰, 博士, 主治医师, 研究方向为血脂异常与心血管疾病。赵水平, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂异常与心血管疾病。刘玲, 博士, 副教授, 研究方向为血脂异常与心血管疾病。通讯作者谢小梅, 博士, 副教授, 研究方向为血脂异常与心血管疾病, 联系电话 13873146887。

只。所有动物以 0.5 mL 苯巴比妥 (50 g/L) 麻醉后, 气管插管, 人工呼吸, 剖开胸腔, 分离主动脉。用 7 号尼龙线将升主动脉与 27 号针头平行结扎在一起, 迅速抽出针头, 关闭胸腔, 缝合切口^[3], 其中假手术组动物不结扎升主动脉。

1.3 给药方法

药物组动物在饮水中给予终浓度为 100 mg/L 的 sEHi, 直至手术后 3 周, 另两组动物在相同时间饲以普通饮水。手术后一次性皮下注射 100 μ L sEHi 使其终浓度达到 10 mg/kg。

1.4 B 型超声探查

用异氟烷气体迅速麻醉动物后, 用 15L8 acuson 探头 (Sequoia C512 B 超机) 测量各组小鼠心脏左心室收缩期末和舒张期末腔径、收缩期末和舒张期末室壁厚度, 计算左心室短轴缩短率 (fractional shortening, FS), $FS = (\text{舒张期末腔径} - \text{收缩期末腔径}) / \text{舒张期末腔径} \times 100\%$ 。

1.5 取材

深度麻醉动物后称体重, 抽血后取心脏, 拍照,

精确称重, 计算心脏重与体重值比值, 心尖放入液氮中保存。

1.6 半定量逆转录聚合酶链反应

用半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 基因、 α 肌凝蛋白重链 (α -myosin heavy chain, α -MHC) 基因、 β 肌凝蛋白重链 (β -myosin heavy chain, β -MHC) 基因和骨骼肌 α 肌纤蛋白 (skeletal muscle α -actin, SM-actin) 基因的表达。其操作步骤是, 提取组织总 RNA, 测定 A260/A280 值以估计标本量和纯度。以 4 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA, 将 cDNA 分别按 1:1、1:5 和 1:10 稀释以作为 PCR 反应的模板, 所用引物序列见表 1, GAPDH 作为内对照。PCR 反应条件是: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 30 次循环, 最后进行 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析系统记录结果, 待测基因 mRNA 相对表达量以其 PCR 产物扩增带密度值与 GAPDH 扩增带密度值的比值表示。

表 1. 基因名称及引物序列

基因	引物正义序列	引物反义序列	产物长度 (bp)
ANF	GGTAGGATTGACAGGATTGGAG	GTGATAGATGAAGGCAGGAAG	216
β -MHC	GCCAAACACCAACCTGTCCAAGTTC	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC	200
α -MHC	GGAAGAGTGAGCGGCCATCAAGG	CTGCTGGAGAGGTTAATCCTCG	301
SM- α actin	CAGGACGACAATCGACAATC	AATGGCTGGCTTAATGCCT	194
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	300

1.7 Western 印迹

细胞质及细胞核蛋白用试剂盒提取后分别进行蛋白定量, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜, 5% 去脂牛奶室温封膜 30 min, 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜后二抗室温作用 2 h, 洗膜后用 ECL 显色液处理使 X 光片显色。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 Sigma Stat 软件包进行 ANOVA 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 可溶性环氧化物水解酶抑制剂对小鼠心脏病理学改变的影响

手术组小鼠结扎升主动脉 3 周后, 心脏体积明显增大 (图 1), 其 FS 较假手术组明显下降, 左心室

收缩期末腔径及心脏重/体重值比值明显大于假手术组, 而药物组的上述指标较手术组明显改善, 与假手术组无明显差异 (表 2)。

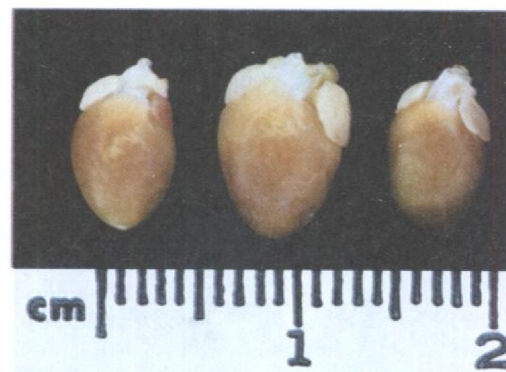


图 1. 各组小鼠心脏外观的比较 左为假手术组, 中为手术组, 右为药物组。

表 2. 各组小鼠心脏的病理学指标

分 组	左心室	收缩期末	心脏重/体重
	短轴缩短率	左心室腔径(mm)	(mg/g)
假手术组	47.2% ± 0.02%	1.38 ± 0.03	5.69 ± 0.05
手术组	24.7% ± 0.02% ^a	2.38 ± 0.07 ^a	9.99 ± 0.08 ^a
药物组	47.8% ± 0.02%	1.49 ± 0.04	5.86 ± 0.04

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组及药物组比较。

2.2 可溶性环氧化物水解酶抑制剂对小鼠心肌肥厚基因 mRNA 表达的影响

将 cDNA 模板按比例稀释后, 半定量 RT-PCR 检测结果发现, 手术组小鼠心脏中 ANP、 α -MHC、SM- α -actin 的表达明显升高, β -MHC 表达下降, 而应用 sE-Hi 治疗的用药组小鼠的上述基因的表达呈相反改变 ($P < 0.05$, 图 2 和表 3)。

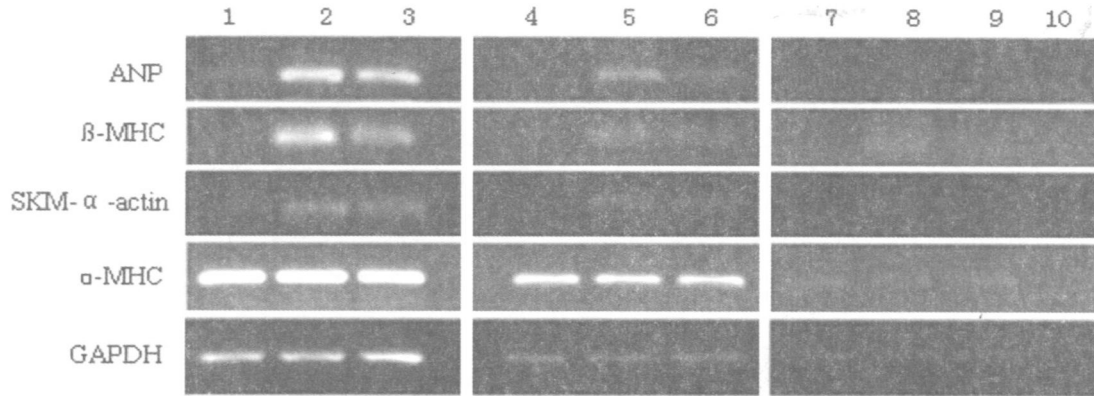


图 2. 不同稀释浓度时各组小鼠心肌肥厚基因表达的比较 1,4 和 7 为假手术组, 2,5 和 8 为手术组, 3,6 和 9 为药物组, 10 为空白模板对照。1~3、4~6 和 7~9 的 DNA 模板分别为 1:1、1:5 和 1:10 稀释。

表 3. cDNA 模板不同稀释浓度时各组小鼠心肌肥厚基因的 mRNA 的表达与 GAPDH 的比值

基因名称	1:1			1:5			1:10		
	假手术组	手术组	药物组	假手术组	手术组	药物组	假手术组	手术组	药物组
ANP	1.03 ± 0.21	1.27 ± 0.17 ^a	1.12 ± 0.23	0.89 ± 0.13	1.24 ± 0.12 ^b	0.95 ± 0.14	0.80 ± 0.14	1.11 ± 0.20 ^b	0.86 ± 0.03
β -MHC	1.21 ± 0.25	0.35 ± 0.13 ^a	1.28 ± 0.17	1.01 ± 0.13	1.24 ± 0.15 ^b	1.13 ± 0.26	0.86 ± 0.19	1.20 ± 0.18 ^b	0.90 ± 0.12
SM- α -actin	0.98 ± 0.01	1.08 ± 0.13 ^a	1.10 ± 0.13	0.90 ± 0.12	1.05 ± 0.14 ^a	0.94 ± 0.16	0.78 ± 0.17	0.94 ± 0.02 ^b	0.81 ± 0.16
α -MHC	1.52 ± 0.17	1.50 ± 0.12	1.51 ± 0.14	1.44 ± 0.11	1.39 ± 0.18 ^a	1.43 ± 0.15	1.35 ± 0.12	1.25 ± 0.13 ^b	1.34 ± 0.19

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组和药物组比较。

2.3 可溶性环氧化物水解酶抑制剂对小鼠心肌核因子 κ B 信号传导通路的影响

从开始结扎到结扎后 3 h, 手术组 κ B 蛋白较结

扎前表达逐渐减少而 P65 和 p- κ B 表达逐渐增加, 至 6 h 基本恢复至结扎前水平。而在药物组, κ B、p- κ B 和 P65 的表达无明显波动(图 3)。

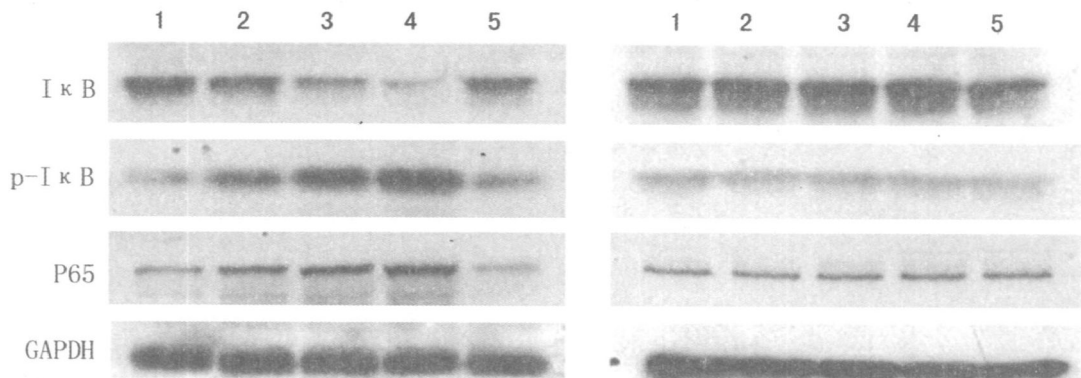


图 3. 可溶性环氧化物水解酶抑制剂对核因子 κ B 各成分的影响 左为手术组, 右为药物组。1 为结扎前, 2 为结扎后 30 min, 3 为结扎后 1 h, 4 为结扎后 3 h, 5 为结扎后 6 h。

3 讨论

本研究通过不完全结扎小鼠的升主动脉引起压力负荷增加制作小鼠心肌肥厚的动物模型, 实验结果发现与仅结扎的实验组手术组相比, 应用 sEHi 能使小鼠的左心室短轴缩短率, 左心室壁厚度及心脏重/体重比值均显著降低, 接近假手术组, 由此可见, sEHi 能阻止压力负荷增加所致的心肌肥厚。

在个体正常发育过程中, ANP、 α -MHC 和 SM- α -actin 表达逐渐减少, β -MHC 逐渐增多, 而在心肌肥厚时, 出现“返祖”现象, ANP、 α -MHC 和 SM- α -actin 表达增多, 而 β -MHC 减少, 因此, ANP、 α -MHC、SM- α -actin 和 β -MHC 被称为“心肌肥厚的标志基因”。本研究发现在手术组中心肌肥厚的标志基因的改变与其他报道一致^[4], 而应用 sEHi 干预后, 上述基因的改变明显变小, 因此可以从基因水平证明 sEHi 能阻止压力负荷增加所致的心肌肥厚。并且在实验中采用不同倍数逐步稀释 cDNA 模板, 使基因表达的差异在适当浓度模板存在时表现更为明显。

核因子 κ B 是细胞内重要的信号传导通路, 参与炎症、免疫、细胞生存、生长等众多基因的调节^[5], 并在心肌肥厚的发生发展中起重要作用^[6]。在核因子 κ B 通路被激活时, 与其结合的抑制因子 I κ B 被磷酸化并脱离, 使得 P65/P50 亚基游离并进入细胞核内启动下游的反应。核因子 κ B 属早期反应的信号传导通路, 因此在本研究中观察 0~6 h 中核因子 κ B 活化情况。在手术组, I κ B 表达逐渐减少, p-I κ B 及核提取物中 P65 表达逐渐增多, 与 Cook 等^[7]的结果一致, 表明结扎后小鼠体内核因子 κ B 通路被激活。

而 sEHi 干预作用后, 未见上述蛋白的变化, 提示核因子 κ B 通路的激活被 sEHi 抑制, 更进一步证实了干扰核因子 κ B 通路是治疗心肌肥厚的有效途径这一假说^[8]。

目前, 国外有关 sEHi 类制剂用于治疗实验性高血压的进展很快, 正在投入大规模的临床研究, 但尚没有关于 sEHi 对心肌肥厚方面的报导。本文为 sEHi 对心肌肥厚的作用, 以及可能的机制的研究提供了有益的思路, 其更深一步的机制及临床价值有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function [J]. *Prog Lipid Res*, 2004, **43** (1): 55-90
- [2] Jung O, Brandes RP, Kim IH, Schweda F, Schmidt R, Hammock BD, et al. Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension [J]. *Hypertension*, 2005, **45** (4): 759-765
- [3] Ding B, Price RL, Goldsmith EC, Borg TK, Yan X, Douglas PS, et al. Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anokis and the progression to early failure [J]. *Circulation*, 2000, **101** (24): 2 854-862
- [4] Fredj S, Bescond J, Louault C, Delwail A, Lecron JC, Potreau D. Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation [J]. *J Cell Physiol*, 2005, **4** (2): 428-436
- [5] Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2002, **35** (1): 28-40
- [6] Gupta S, Purcell NH, Lin A, Sen S. Activation of nuclear factor-kappaB is necessary for myotrophin-induced cardiac hypertrophy [J]. *J Cell Biol*, 2002, **159** (6): 1 019-028
- [7] Cook SA, Novikov MS, Ahn Y, Matsui T, Rosenzweig A. A20 is dynamically regulated in the heart and inhibits the hypertrophic response [J]. *Circulation*, 2003, **108** (6): 664-667
- [8] Purcell NH, Molkenin JD. Is nuclear factor kappaB an attractive therapeutic target for treating cardiac hypertrophy [J]? *Circulation*, 2003, **108** (6): 638-640

(此文编辑 胡必利)