

硫化氢下调血管紧张素Ⅱ 1 型受体表达抑制高血压大鼠心肌重构

黄贤生, 王东明, 郑锦滨

(汕头大学医学院附属第一医院心血管内科, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 硫化氢; 高血压; 心肌重构; 血管紧张素Ⅱ 1 型受体

[摘要] **目的** 通过构建大鼠两肾一夹高血压模型(2K1C)造成心肌重构,观察硫化氢是否存在保护效应并初步探索其可能机制。**方法** 34 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分为对照组、假手术组、手术组和硫化氢组,测量实验前后收缩压、左心室质量指数、全心质量指数、左心室心重比,观察心肌细胞直径、横断面面积以及胶原沉积程度,检测心肌细胞血管紧张素Ⅱ 1 型受体表达情况。**结果** 手术组血压持续增高,左心室质量指数、全心质量指数以及左心室心重比明显增加,镜下观察可见心肌纤维断裂、肌浆肿胀、部分空泡样、颗粒性改变以及灶性坏死、单核细胞浸润。硫化氢组血压呈先升高后下降趋势,左心室质量指数、全心质量指数以及左心室心重比较手术组降低,心肌形态学改变明显减轻。Masson 三色染色显示,硫化氢组血管壁渗出明显弱于手术组。手术组血管紧张素Ⅱ 1 型受体的表达明显上调,硫化氢组血管紧张素Ⅱ 1 型受体表达显著低于手术组。**结论** 硫化氢能减轻两肾一夹模型大鼠的心肌重构,此作用与下调血管紧张素Ⅱ 1 型受体蛋白表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Down-regulation of Angiotensin II Receptor-1 Expression by Hydrogen Sulfide Inhibits Cardiac Remodeling in Hypertensive Rats

HUANG Xian-Sheng, WANG Dong-Ming, and ZHENG Jin-Bin

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

[KEY WORDS] Hydrogen Sulfide; Hypertension; Cardiac Remodeling; Angiotensin II Receptor-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of hydrogen sulfide on cardiac remodeling in rats, after the two-kidneys-one-clip (2K1C) model built. **Methods** 34 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: control group, sham-operated group, 2K1C model group and hydrogen sulfide (H_2S) group. Systolic blood pressure (SBP), the left ventricle weight/body weight (LVW/BW), the heart weight/body weight (HW/BW) and the left ventricle weight/heart weight (LVW/HW) were measured to assess cardiac remodeling. The diameter, the cross-sectional area of the myocardial cells were evaluated by HE stain. Collagen deposition were detected by Masson stain. Angiotensin II receptor-1 (AT1) expression in the myocardial cells were assessed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, SBP increased persistently in 2K1C group and LVW/BW, HW/BW, LVW/HW increased accordingly. While in the H_2S group, SBP elevated transiently and tended to decrease afterward. LVW/BW, HW/BW, LVW/HW decreased in H_2S group compared with 2K1C group. HE stain showed significantly milder myocardial injury in H_2S group than that in 2K1C group. Masson stain showed less collagen deposition in H_2S group than that in 2K1C group. The expression of AT1 receptor was up-regulated in the 2K1C group, which can be reversed by treatment with H_2S . **Conclusion** H_2S can attenuate cardiac remodeling in 2K1C rats by down-regulating AT1 expression.

近年研究发现哺乳动物体内能够内源性合成硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S),在其生理性浓度下

参与调节许多生理过程^[1],尤其是在心血管系统中起着重要的调节作用。 H_2S 已被界定为继一氧化

[收稿日期] 2012-03-02

[作者简介] 黄贤生,硕士,主治医师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 705229580@qq.com。王东明,硕士,主任医师,研究方向为心脏电生理、冠心病的防治,联系电话为 13076371996。郑锦滨,硕士,住院医师,研究方向为动脉硬化性疾病的基础与临床,E-mail 为 147988039@qq.com。

碳、一氧化氮后的第3种气体信号分子^[2]。目前许多研究证实硫化氢能够通过多条途径而起到强大的心肌保护效应。尚有研究表明H₂S能通过舒张血管降低大鼠的自发性高血压^[3]。本研究拟构建大鼠两肾一夹高血压模型,缩窄一侧肾动脉引起急性肾缺血,继而激活循环中的肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS),通过血压升高以及RAS对心脏的直接作用造成心肌重构,观察外源性H₂S干预能否减轻心肌重构,以验证H₂S对高血压心肌重构的保护作用,并初步探索其可能机制。从而为心肌肥厚、心肌纤维化的治疗提供新的思路,为硫化氢或其化合物作为一种心血管新药的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与动物分组

健康雄性SPF级SD大鼠34只,体重210±10 g,购自汕头大学医学院实验动物中心。按随机化原则分成如下各组:对照组,7只,不做任何处理;假手术组,7只,无菌手术开腹,仅分离左肾动脉,未结扎肾动脉;手术组,10只,无菌手术开腹,结扎左肾动脉;H₂S组,10只,无菌手术开腹,结扎左肾动脉后,NaHS 14 μmol/(kg·d)腹腔注射给药^[4]。所有大鼠饲养11周^[5]后处死取标本检测各项指标。

1.2 动物模型制作

本实验利用两肾一夹模型(two-kidneys-one-clip, 2K1C),按参考文献建模^[6]。模型制作主要步骤如下:健康雄性SD大鼠,用10%水合氯醛按100 g体重0.33 mL剂量腹腔注射麻醉后,将大鼠固定于操作台,常规消毒铺巾,做腹部正中切口,暴露并钝性分离左肾动脉,用直径0.25 mm的针灸针放置于肾动脉上方,用1号缝合线连同针灸针一起结扎,打结牢固后抽出针灸针以形成肾动脉狭窄。关闭腹腔之前,给予青霉素40万U清洗腹腔,逐层缝合肌肉、皮肤切口。假手术组除了不放置针灸针和缝线结扎外其它操作同手术组。术毕立即给予青霉素40万U腹腔注射加强预防感染。之后各组大鼠自由进食及饮水。

1.3 标本处理

所有大鼠在手术前及处死前(术后第11周)通过尾动脉测压仪测量收缩压(systolic blood pressure, SBP)。处死前秤取体重,处死后取出心脏,立即称取全心重量以及左心室重量并分别计算左心室重

量与体重之比(LVW/BW)做为左心室质量指数(LVMI),全心重量与体重之比(HW/BW)做为全心质量指数,以及左心室重量与全心重量比值(LVW/HW)做为左心室心重比。取大鼠心尖部心室肌组织,做组织切片,HE和Masson常规染色,血管紧张素Ⅱ1型受体(angiotensin Ⅱ receptor-1, AT1)免疫组织化学染色,光镜下观察结果。

1.4 常规HE染色、Masson法胶原染色

心肌组织切片烤热后于二甲苯和梯度乙醇中脱蜡水化,苏木精染色5 min,流水稍洗,1%盐酸乙醇迅速分化,流水稍洗,促蓝液返蓝数秒,流水冲洗,依次行HE染色和Masson染色。光镜下观察、摄片。每张Masson染色切片选取3个无血管视野(×40)。

1.5 免疫组织化学染色

将心肌组织切片置于60℃烤箱中30 min,依次行二甲苯与梯度乙醇脱蜡水化,蒸馏水冲洗2 min×3次;抗原修复,蒸馏水冲洗3 min×3次;3% H₂O₂室温孵育10 min, PBS冲洗3 min×3次;山羊血清封闭后室温孵育15 min,滴加1:150兔抗鼠一抗工作液(AT1单抗)37℃孵育2 h, PBS冲洗3 min×3次;加入抗兔二抗工作液后于37℃温箱孵育15 min, PBS洗3 min×3次;加入ABC复合物之类的抗体后37℃温箱孵育15 min, PBS洗3 min×3次;室温下DAB显色6 min,自来水充分冲洗;复染,脱水,透明,封片。每张切片中随机各取3个无血管视野。

1.6 免疫印迹分析AT1受体表达

取适量心肌组织用细胞裂解液(100 mmol/L Tris-HCl, 4% SDS, 20% 甘油, 蛋白酶抑制剂亮抑蛋白酶肽10 g/L)匀浆, 4℃, 12 000 g离心10 min, 取上清保存于-20℃。BCA法蛋白质定量。相同量蛋白质用于10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转移至PVDF膜, 3%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和5%脱脂奶粉溶液(溶于TBS-T缓冲液中)室温封闭2 h, 兔抗AT1抗体或小鼠抗β-肌动蛋白抗体4℃孵育过夜, TBS-T溶液洗膜4次, 每次15 min。室温下加辣根过氧化物酶标记兔抗羊IgG二抗, 孵育2 h, 同前法洗膜4次, 用增强化学发光法显色, X光片曝光显影, Labwork凝胶成像分析系统摄像分析。将各组AT1蛋白的面积灰度值减去背景灰度值与经过同样处理的β-actin灰度值的比值进行半定量分析。

1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 13.0软件进行统计学分析。组间比较采用方差分析, 两组间均数比较应

用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 大鼠收缩压变化

在单侧肾动脉结扎前、后分别测量鼠尾 SBP, 结扎后 8 天大鼠 SBP 明显升高, 提示造模成功。结扎单侧肾动脉后、处死大鼠前(术后第 11 周)再次测量鼠尾 SBP, H₂S 组 SBP 明显低于手术组(表 1)。

表 1. 手术前、术后第 8 天以及实验终点时大鼠收缩压 (mmHg)
Table 1. Systolic pressure in rats before and 8 days, 11 weeks after the operation (mmHg)

分 组	<i>n</i>	手术前	术后第 8 天	术后第 11 周 (实验终点)
对照组	7	125.8 ± 12.7	127.9 ± 11.5	126.7 ± 10.5
假手术组	7	126.2 ± 13.7	126.1 ± 6.2	125.5 ± 9.3
手术组	10	129.2 ± 10.5	157.3 ± 2.5	155.0 ± 4.6 ^b
硫化氢组	10	129.3 ± 8.3	157.3 ± 3.7 ^c	137.1 ± 1.1 ^a

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.001$, 与对照组比较; c 为 $P<0.001$, 与手术前比较。

2.2 大鼠心脏指数变化

我们前期实验证实 2K1C 模型可以引起心肌重构^[6], 模型建立后第 11 周处死大鼠发现手术组 LVW/BW、HW/BW、LVW/HW 与对照组比较均有明显增加。硫化氢组与手术组相比, 上述指标均有

明显下降, 提示 H₂S 可减轻心肌肥厚(表 2)。

表 2. 各组大鼠心脏指数比较
Table 2. Comparison of LVW/HW, HW/BW and LVW/BW in each group

分 组	<i>n</i>	LVW/HW (g/g)	HW/BW (g/g)	LVW/BW (g/g)
对照组	7	0.174 ± 0.008	0.253 ± 0.011	0.688 ± 0.023
假手术组	7	0.179 ± 0.009	0.256 ± 0.010	0.700 ± 0.032
手术组	10	0.205 ± 0.027 ^b	0.282 ± 0.029 ^a	0.725 ± 0.029 ^a
硫化氢组	10	0.175 ± 0.009 ^d	0.254 ± 0.014 ^c	0.690 ± 0.017 ^c

a 为 $P<0.01$, b 为 $P<0.001$, 与对照组比较; c 为 $P<0.01$, d 为 $P<0.001$, 与手术组比较。

2.3 心肌结构改变

与假手术组比较, 手术组心肌细胞明显淡染, 普遍肥大, 心肌纤维嗜酸性增强, 呈现局灶性肌浆模糊, 可见断裂心肌纤维、肌浆肿胀、部分空泡样和颗粒性改变, 并且出现灶性坏死, 单核细胞浸润, 替代以成纤维细胞, 细胞间隙明显增宽。部分心肌细胞核固缩, 部分肿大透亮、溶解。血管壁各层均增厚, 管周基质增多, 与周围心肌细胞间隙增大。与手术组比较, 硫化氢组心肌细胞结构变化相对较小, 细胞排列较规则, 心肌纤维结构较清晰, 局灶性心肌纤维断裂、空泡样改变以及成纤维细胞替代均较少, 细胞间隙稍有增宽, 提示心肌损伤较轻(图 1)。

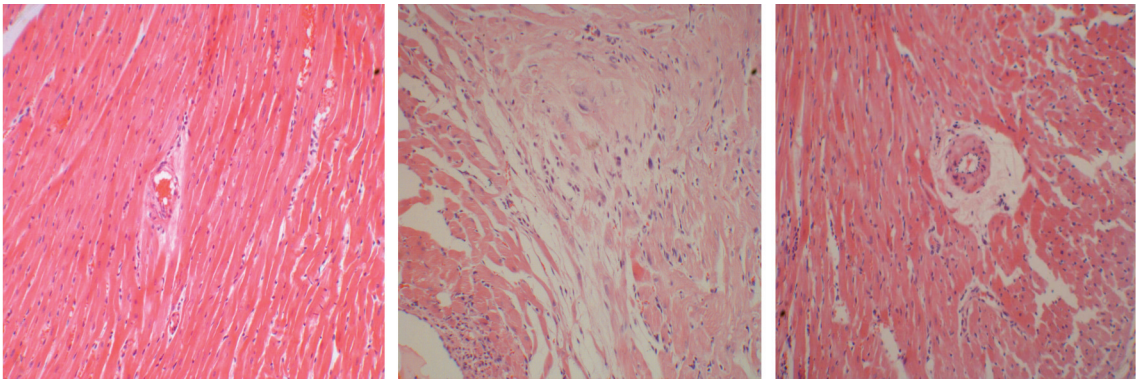


图 1. 心肌细胞 HE 染色 (×400) 左为假手术组, 中为手术组, 右为硫化氢组。
Figure 1. HE stain of myocardium (×400)

2.4 心肌组织胶原含量变化

与假手术组相比, 手术组无论是动脉还是静脉, 血管壁各层、尤其是外膜以及外膜周围细胞的间隙内可见大量蓝染, 细胞间隙内亦有灶性蓝染, 动脉血管壁明显增厚, 中膜及内膜明显, 可见大量渗出。硫化氢组管周虽也有细胞间隙灶性蓝染, 管

壁较对照组有不同程度的增厚, 周围可见有少许渗出, 但与对照组的改变接近, 无明显差异, 表明其胶原沉积较少(图 2)。

2.5 免疫组织化学检测心肌组织 AT1 表达变化

与假手术组比较, 手术组心肌细胞的 AT1 受体表达明显上调, 而硫化氢组 AT1 受体的表达仅轻度

上调(图3)。

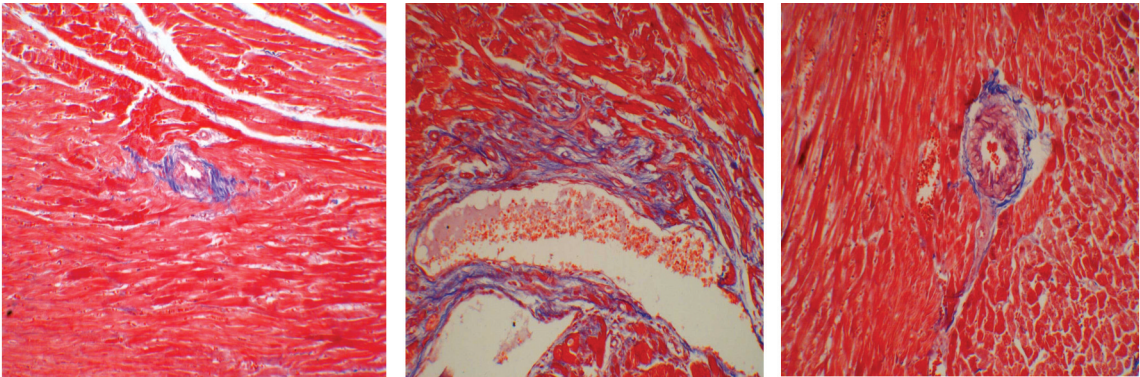


图2. 心肌细胞 Masson 染色 (×400) 左为假手术组,中为手术组,右为硫化氢组。

Figure 2. Masson stain of myocardium (×400)

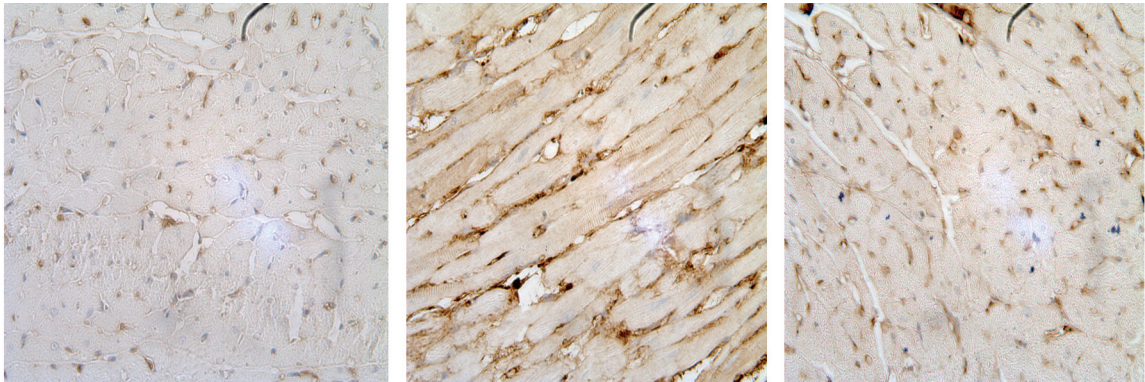


图3. 心肌细胞 AT1 受体免疫组织化学染色结果 (×400) 左为假手术组,中为手术组,右为硫化氢组。

Figure 3. Immunohistochemistry of AT1 in cardiomyocyte (×400)

2.6 免疫印迹法检测心肌组织 AT1 蛋白表达

假手术组 AT1 表达水平较低,而手术组 AT1 蛋白水平显著上调,其 AT1 蛋白水平是假手术组的大约 5 倍($P<0.01, n=3$)。经硫化氢干预后,AT1 蛋白水平显著回落,硫化氢组 AT1 水平显著低于手术组($P<0.01, n=3$)。但硫化氢组 AT1 蛋白水平仍然高于假手术组,其约为假手术组的 3 倍(图4)。

3 讨 论

2K1C 模型是经典的血管紧张素 II (Ang II) 依赖性肾性高血压模型。一侧肾动脉结扎致狭窄后造成急性肾缺血,引起肾素分泌增加,继而激活 RAS,使该系统的主要效应因子 Ang II 浓度明显增加。已有大量研究证实 Ang II 对心脏具有毒性作用^[7,8],是造成心肌重构的主要因子之一。血压升高以及 RAS 成员对心脏的直接作用可造成心肌组织损伤^[9-11]。本实验采用两肾一夹造模,术后大鼠

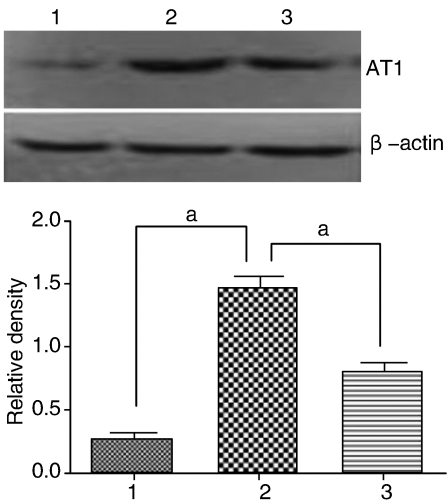


图4. 心肌细胞 AT1 受体表达的免疫印迹分析 1 为假手术组,2 为手术组,3 为硫化氢组。a 为 $P<0.01, n=3$ 。

Figure 4. Western blot of AT1 expression

SBP 明显升高,伴随着 AT1 受体表达增加,说明模型构建成功。研究结果发现,结扎大鼠肾动脉后出

现血压升高、AT1 受体表达上调同时,出现左心室肥厚,左心室质量指数、全心质量指数、左心室心重比均较对照组明显增加($P < 0.001$),提示已经出现了心肌重构。HE 染色提示心肌细胞结构破坏,Masson 染色证实间质胶原纤维增多,表明心肌重构的存在。

H_2S 是有毒气体,但近年研究发现,内源性硫化氢在其生理浓度下(大鼠 $45.6 \pm 14.2 \mu\text{mol/L}$,人体 $10 \sim 100 \mu\text{mol/L}$)能与其它内源性气态信号分子之间相互作用,起到强大的心脏保护效应^[12-14]。本研究发现,在 2K1C 模型中加入硫氢化钠作为供体,以提供外源性硫化氢进行干预以后,大鼠收缩压出现短暂升高后降低,心肌肥厚程度较手术组明显减轻,显微检查也发现心肌细胞破坏程度、间质纤维化程度明显减轻,AT1 表达下降,均提示硫化氢存在抗心肌重构的保护效应。

国内外研究发现,硫化氢可能通过以下方式起到保护心肌、抑制心肌重构的作用:(1)通过减少脂质过氧化、增加抗氧化作用以及抑制氧化应激而保护心肌^[15];(2)通过前凋亡信号效应来限制细胞程序性死亡^[16];(3)通过舒张动脉,降低平均动脉压^[11]来减轻心脏后负荷;(4)通过减少胶原 I 和 III、弹力蛋白、转化生长因子 $\beta 3$ (transforming growth factor- $\beta 3$, TGF- $\beta 3$) 蛋白的表达,且降低溶胶原(蛋白) I 和 III 的 mRNA 表达,以及保护心肌内小动脉的肥大和心肌纤维化,并且通过减少心肌活性氧(reactive oxygen species, ROS)和共轭二烯水平,从而减少心肌纤维化^[17];(5)抑制平滑肌细胞增殖及迁移^[18];(6)开放肌纤维膜三磷酸腺苷敏感性钾通道(ATP-sensitive potassium channel, KATP),增加细胞活力,改善细胞功能,从而起到心脏保护效应^[1]。而我们发现硫化氢抑制心肌重构还与下调 AT1 表达有关。

目前关于硫化氢作为信号分子的研究尚处于动物实验阶段,硫化氢在什么条件以及何种浓度下适合进行人体实验仍有待于进一步探讨。未来是否能像药物一样使用硫化氢用于治疗心血管疾病,有可能成为心血管研究领域所关注的课题。

[参考文献]

- [1] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener[J]. EMBO J, 2001, 20(21): 6 008-016.
- [2] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? [J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1 792-798.

- [3] Yan H, Du JB, Tang CS. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(1): 22-27.
- [4] Linder AE, Bendhack LM. Endothelin-1-induced contraction is impaired in the tail artery of renal hypertensive rats[J]. Vascular Pharmacology, 2002, 39(1-2): 77-82.
- [5] 张春雨, 杜军保, 闫辉, 等. 新型内源性气体信号分子硫化氢对低氧性肺血管胶原重塑的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 7(28): 21-25.
- [6] 郑锦滨, 王东明. 硫化氢对两肾一夹模型所致大鼠心脏损害的作用[J]. 汕头大学医学院学报, 2011, 24(3): 153-155.
- [7] Brown NJ. Aldosterone and vascular inflammation[J]. Hypertension, 2008, 51(2): 161-167.
- [8] Sciarretta S, Paneni F, Palano F, et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and inflammatory processes in the development and progression of diastolic dysfunction[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(5-6): 467-477.
- [9] Schriiff EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers[J]. Am J Med, 2002, 113(5): 409-418.
- [10] Verdecchia P, Angeli F, Repaci S, et al. Comparative assessment of angiotensin receptor blockers in different clinical settings[J]. Vasc Health Risk Manag, 2009, 5: 939-948.
- [11] Helle F, Hultström M, Skogstrand T, et al. Angiotensin II-induced contraction is attenuated by nitric oxide in afferent arterioles from the nonclipped kidney in 2K1C[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(1): F78-F86.
- [12] Johansen D, Ytrehus K, Baxter GF. Exogenous hydrogen sulfide (H_2S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K-ATP channels[J]. Basic Res Cardiol, 2006, 101(1): 53-60.
- [13] Olson KR, Whitfield NL. Hydrogen sulfide and oxygen sensing in the cardiovascular system[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(10): 1 219-234.
- [14] Elsej DJ, Fowkes RC, Baxter GF. Regulation of cardiovascular cell function by hydrogen sulfide (H_2S) [J]. Cell Biochem Funct, 2010, 28(2): 95-106.
- [15] Su YW, Liang C, Jin HF, et al. Hydrogen sulfide regulates cardiac function and structure in adriamycin-induced cardiomyopathy [J]. Circ J, 2009, 73(4): 741-749.
- [16] Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 33(5): 906-913.
- [17] Shi YX, Chen Y, Zhu YZ, et al. Chronic sodium hydrosulfide treatment decreases medial thickening of intramyocardial coronary arterioles, interstitial fibrosis, and ROS production in spontaneously hypertensive rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(4): H2 093-100.
- [18] Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, et al. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide[J]. J Biochem, 2009, 146(5): 623-626.

(此文编辑 曾学清)