

本文引用: 王吉静, 徐金义, 杨丽红, 等. 心脏糖皮质激素受体激活影响心肌梗死后心脏重塑[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(8): 663-667. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.08.003.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-08-0663-05

• 实验研究 •

心脏糖皮质激素受体激活影响心肌梗死后心脏重塑

王吉静¹, 徐金义¹, 杨丽红¹, 张恒源¹, 闫菲², 郑帅³, 杜杰³

(1. 郑州大学人民医院(河南省人民医院)心肺功能科, 河南省郑州市 450003; 2. 阜外华中心血管病医院心肺功能科, 河南省郑州市 450000; 3. 首都医科大学附属北京安贞医院北京市心肺血管疾病研究所, 北京市 100029)

[摘要] **[目的]** 观察心脏糖皮质激素受体激活对小鼠心肌梗死(MI)后心脏重塑、心功能的影响及可能机制。**[方法]** 将 28 只雄性 C57BL/6J 小鼠按照随机数字表法分为假手术组、地塞米松组、MI 组和 MI+地塞米松组, 每组 7 只。MI 组结扎小鼠冠状动脉左前降支制作 MI 模型; 假手术组、地塞米松组只绕线不结扎, 并且于手术前 24 h 分别经腹腔注射生理盐水或地塞米松(20 mg/kg); MI+地塞米松组于制作 MI 模型前 24 h 经腹腔注射地塞米松(20 mg/kg)。手术后第 7 天使用小动物超声仪检测心功能指标, 取心脏组织切片, 采用免疫组织化学染色观察糖皮质激素受体激活水平, 采用 Masson 染色观察梗死面积, 采用免疫组织化学染色观察炎症因子 IL-6 和趋化因子 CCL-5 水平。**[结果]** 与 MI 组相比, MI+地塞米松组小鼠的左心室舒张期末内径减小 6.85%, 左心室收缩期末内径减小 6.89%, 左心室舒张期末容积减小 16.11%, 左心室收缩期末容积减小 17.18% (均 $P < 0.05$), 射血分数升高 10.63%, 短轴缩短率升高 13.11% (均 $P < 0.05$), 表明地塞米松预处理可改善小鼠 MI 后心功能; 磷酸化糖皮质激素受体水平升高 1.57 倍; MI 后梗死面积减小 18.4% ($P < 0.05$); 炎症因子 IL-6 表达水平下降 71.4%, 趋化因子 CCL-5 表达水平下降 65% (均 $P < 0.05$)。**[结论]** 心脏糖皮质激素受体激活对小鼠 MI 后的心肌细胞损伤具有拮抗效应, 可改善心肌重塑, 这一作用可能与其抗炎反应有关。

[关键词] 糖皮质激素受体; 心肌梗死; 心脏重塑; 炎症反应

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Activation of cardiac glucocorticoid receptors affects cardiac remodeling after myocardial infarction

WANG Jijing¹, XU Jinyi¹, YANG Lihong¹, ZHANG Hengyuan¹, YAN Fei², ZHENG Shuai³, DU Jie³

(1. Department of Cardiopulmonary Function, People's Hospital of Zhengzhou University (Henan Provincial People's Hospital), Zhengzhou, Henan 450003, China; 2. Department of Cardiopulmonary Function, Fuwai Huazhong Cardiovascular Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China; 3. Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University & Beijing Institute of Cardiopulmonary Vascular Diseases, Beijing 100029, China)

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of cardiac glucocorticoid receptor activation on cardiac remodeling and cardiac function after myocardial infarction (MI) in mice and its possible mechanism. **Methods** 28 male C57BL/6J mice were randomly divided into sham group, dexamethasone group, MI group and MI+dexamethasone group, 7 mice in each group. The MI group ligated the left anterior descending coronary artery in mice to create an MI model; the sham group and the dexamethasone group only wound the thread without ligation, and injected normal saline or dexamethasone (20 mg/kg) by intraperitoneal injection 24 h before the operation; the MI+dexamethasone group was injected with dexamethasone (20 mg/kg) by intraperitoneal injection 24 h before creating MI model. On the 7th day after surgery, small animal ultrasound was used to detect cardiac function indicators, heart tissue slices were taken and immunohistochemical staining was used to observe the activation level of glucocorticoid receptors, Masson staining was used to observe the infarct area, immunohistochemical staining was used to observe the levels of inflammatory factor IL-6 and chemokine CCL-5.

Results Compared with the MI group, in the MI+dexamethasone group the left ventricular end-diastolic diameter reduced

[收稿日期] 2022-11-09

[修回日期] 2023-03-24

[基金项目] 河南省医学科技攻关联合共建项目(LHGJ20200089)

[作者简介] 王吉静, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管及心脏电生理, E-mail: wangjijing1988@163.com。通信作者徐金义, 主任医师, 研究方向为微创心脏电生理检查, E-mail: 1004222047@qq.com。

by 6.85%, the left ventricular end-systolic diameter reduced by 6.89%, the left ventricular end-diastolic volume reduced by 16.11%, the left ventricular end-systolic volume reduced by 17.18% (all $P < 0.05$), the ejection fraction increased by 10.63%, and the fractional shortening rate increased by 13.11% (all $P < 0.05$), indicating that dexamethasone pretreatment improved cardiac function in mice after MI; the level of phosphorylated glucocorticoid receptor increased 1.57 times; after MI, the infarct area decreased by 18.4% ($P < 0.05$); the expression level of inflammatory factor IL-6 decreased by 71.4%, and the expression level of chemokine CCL-5 decreased by 65% (all $P < 0.05$). **Conclusion** Activation of cardiac glucocorticoid receptors has an antagonistic effect on myocardial cell damage in mice after MI, which can improve myocardial remodeling, this effect may be related to its anti-inflammatory response.

[**KEY WORDS**] glucocorticoid receptor; myocardial infarction; cardiac remodeling; inflammation response

心肌细胞缺血、缺氧可导致心肌损伤,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是最常见和最严重的心脏缺血性疾病之一,因其高致残率和死亡率严重影响公民的生活质量和生命健康。急性期常伴发大量的炎症细胞浸润和因缺血缺氧而导致的细胞凋亡和坏死,进而导致心肌梗死(myocardial infarction, MI)进展过程中心脏重塑恶化和功能失调^[1-5]。AMI等应激情况可诱导糖皮质激素(glucocorticoid, GC)释放增加,糖皮质激素主要与细胞内糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合,通过细胞外及细胞内途径对多种基因进行转录调控,发挥其抗炎、抑制细胞凋亡等作用^[6-7]。心脏GR激活对心肌细胞损伤的影响尚不清楚^[8-9]。本研究团队前期的研究证明,心脏GR激活影响MI后急性期心肌细胞凋亡,进而影响MI后心功能及心脏重塑^[10]。本研究通过小鼠腹腔注射糖皮质激素制作MI模型,观察心脏GR激活对心肌损伤后心功能及其炎症反应的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

12周龄雄性C57BL/6J小鼠28只,由维通利华生物科技有限公司提供,在北京安贞医院实验动物中心所属的SPF级动物房饲养,按照随机数字表法随机分组:假手术组、地塞米松组、MI组和MI+地塞米松组,每组7只小鼠。参照文献^[11],结扎小鼠冠状动脉左前降支制作MI模型;假手术组、地塞米松组只绕线不结扎,并且于手术前24h分别经腹腔注射生理盐水或地塞米松20 mg/kg;MI+地塞米松组于制作MI模型前24h经腹腔注射地塞米松20 mg/kg(美国Sigma公司)。

1.2 超声心动图检测心功能

手术后7天,应用Vevo 2100超声成像系统(加拿大Visual Sonics公司)进行超声心动图检查,探头

频率30 MHz,测量指标:舒张期末室间隔厚度(interventricular septal thickness at end-diastole, IVSTd)、收缩期末室间隔厚度(interventricular septal thickness at end-systole, IVSTs)、左心室舒张期末后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness at end-diastole, LVPWTd)、左心室收缩期末后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness at end-systole, LVPWTs)、左心室舒张期末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩期末内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、计算左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS)、左心室质量(left ventricular mass, LVM)、左心室舒张期末容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩期末容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)。

1.3 Masson染色和免疫组织化学染色

模型建立后第7天取材,肝素生理盐水灌洗心脏,剥离周围组织,心脏浸泡于10%甲醛溶液中固定24h,制作石蜡切片,切片脱蜡至水,采用常规Masson试剂染色和免疫组织化学染色观察梗死面积和炎症细胞浸润。Masson染色和免疫组织化学染色的程序及结果判定参见试剂盒说明书(迈新公司)。参照文献^[12],用尼康显微镜(N90i)采集图像,并使用NIS-Elements Br 3.0进行图像分析。

1.4 统计学分析

应用Prism 5.0统计软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数数据以百分率表示,组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 地塞米松预处理改善小鼠MI后心功能

与MI组相比,MI+地塞米松组小鼠的LVEDD

减小 6.85%, LVESD 减小 6.89%, LVEDV 减小 16.11%, LVESV 减小 17.18% (均 $P<0.05$), LVEF 升高 10.63%, FS 升高 13.11% (均 $P<0.05$; 表 1)。

2.2 地塞米松预处理升高小鼠 MI 后磷酸化 GR 表达

免疫组织化学染色结果显示, MI+地塞米松组心肌细胞磷酸化 GR 的表达较 MI 组升高 1.57 倍 ($P<0.05$)。提示地塞米松预处理可增加 MI 后心肌细胞的 GR 激活(图 1)。

2.3 GR 激活减轻小鼠 MI 后梗死面积

Masson 染色结果显示, MI+地塞米松组小鼠心脏梗死面积较 MI 组减少 18.4% ($P<0.05$)。提示地塞米松可以减轻梗死后心肌损伤, 改善心脏重塑(图 2)。

表 1. 超声心动图检测 MI 后心功能

Table 1. Echocardiographic detection of cardiac function after MI

项目	假手术组	地塞米松组	MI 组	MI+地塞米松组
IVSTd/mm	0.89±0.06	0.84±0.04	0.79±0.12	0.78±0.05
IVSTs/mm	1.35±0.03	1.31±0.07	0.98±0.18	0.92±0.65
LVEDD/mm	2.90±0.38	3.10±0.26	4.38±0.17	4.08±0.20 ^a
LVESD/mm	1.62±0.37	1.76±0.27	3.63±0.12	3.38±0.17 ^a
LVPWd/mm	0.73±0.20	0.79±0.18	0.79±0.06	0.74±0.08
LVPWs/mm	1.12±0.18	1.25±0.14	0.93±0.05	0.89±0.14
LVM/mg	74.53±18.45	86.09±14.19	144.50±11.30	115.91±4.70 ^a
LVEDV/ μ L	33.12±11.28	35.55±7.08	95.92±9.97	80.47±7.50 ^a
LVESV/ μ L	10.41±3.79	10.46±0.98	64.60±9.09	53.50±2.59 ^a
LVEF/%	77.15±6.84	74.66±5.68	34.80±2.90	38.50±2.23 ^a
FS/%	44.66±5.80	42.53±4.54	16.40±1.59	18.55±1.39 ^a

注: a 为 $P<0.05$, 与 MI 组比较。

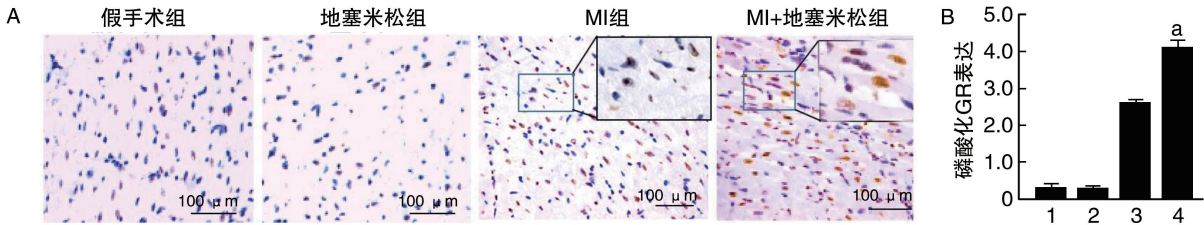


图 1. 免疫组织化学染色观察小鼠 MI 后磷酸化 GR 表达

A 为磷酸化 GR 的免疫组织化学染色结果, 棕色颗粒为阳性染色; B 为阳性染色定量分析。

1 为假手术组, 2 为地塞米松组, 3 为 MI 组, 4 为 MI+地塞米松组。a 为 $P<0.05$, 与 MI 组比较。

Figure 1. The expression of phosphorylated GR after MI in mice observed by immunohistochemical staining

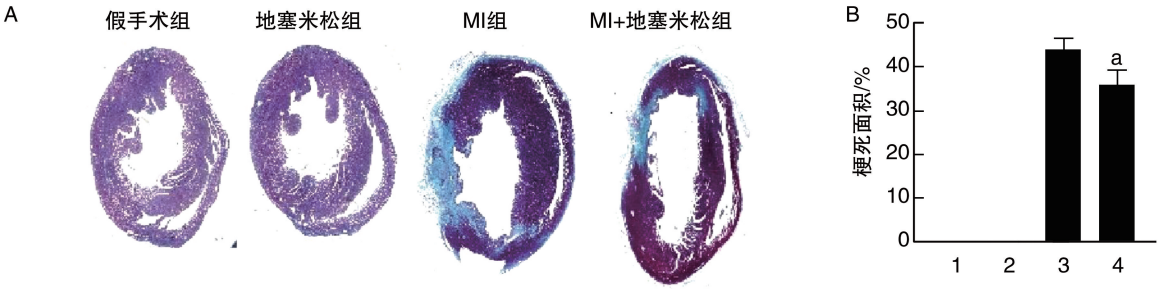


图 2. Masson 染色观察小鼠 MI 后梗死面积

A 为 Masson 染色观察小鼠 MI 后梗死面积, B 为梗死面积定量分析。

1 为假手术组, 2 为地塞米松组, 3 为 MI 组, 4 为 MI+地塞米松组。a 为 $P<0.05$, 与 MI 组比较。

Figure 2. The infarct area after MI in mice observed by Masson staining

2.4 GR 激活减轻心脏组织炎症因子和趋化因子水平

免疫组织化学染色结果显示, 地塞米松组梗死交界区 IL-6 和 CCL-5 的表达与假手术组相比无统计学差异, 而 MI+地塞米松组梗死交界区 IL-6 和 CCL-5 的表达与 MI 组相比下降 71.4%、65.0% (均

$P<0.05$)。提示 GR 激活可以减轻梗死后心肌组织 IL-6 和 CCL-5 的表达(图 3)。

3 讨论

心肌损伤是心肌细胞缺血、缺氧所造成的细胞

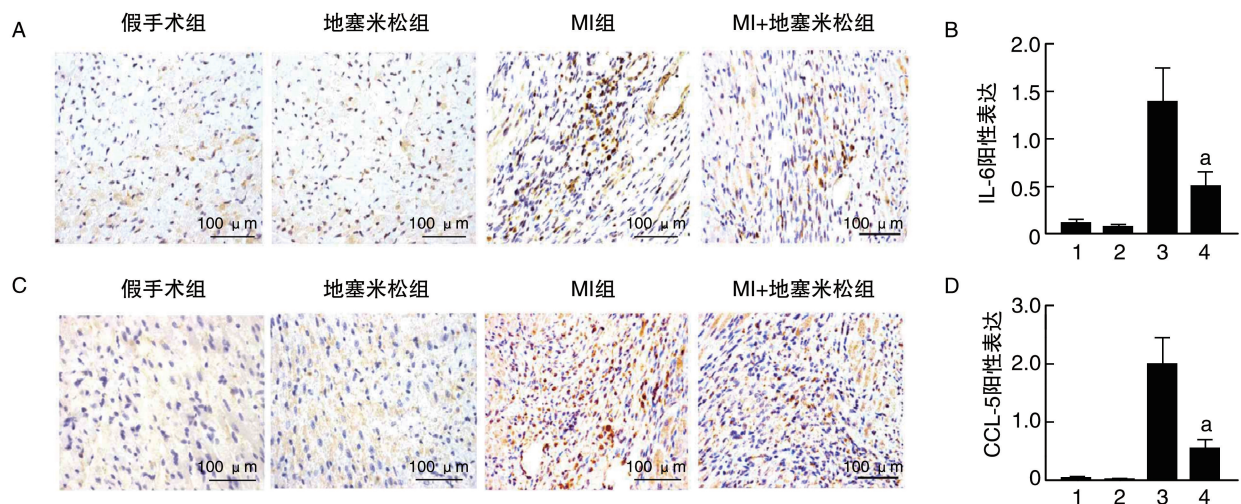


图3. 免疫组织化学染色观察小鼠 MI 后心脏组织 IL-6 和 CCL-5 的表达

A 为免疫组织化学染色观察小鼠 MI 后心脏组织 IL-6 的表达,黄色颗粒为 IL-6 染色阳性,蓝色为细胞核;B 为 IL-6 染色阳性定量分析;C 为免疫组织化学染色观察小鼠 MI 后心脏组织 CCL-5 的表达,黄色颗粒为 CCL-5 染色阳性,蓝色为细胞核;D 为 CCL-5 染色阳性定量分析。

1 为假手术组,2 为地塞米松组,3 为 MI 组,4 为 MI+地塞米松组。a 为 $P < 0.05$,与 MI 组比较。

Figure 3. The expression of IL-6 and CCL-5 in cardiac tissue of mice after MI observed by immunohistochemical staining

功能受损,而 MI 是心肌损伤的常见原因,是全球因心脏病发病和死亡的首要因素。MI 后,早期心肌细胞释放炎症因子、炎症细胞浸润,促进了细胞凋亡或坏死,而大量细胞的凋亡或坏死,导致进展期心脏结构重塑失衡和功能衰竭^[1-5]。

糖皮质激素以其抗炎及免疫抑制作用广泛应用于临床炎症及免疫相关疾病。生理或病理性应激均可以导致循环系统糖皮质激素升高,糖皮质激素与 GR 结合,通过多种途径发挥其调节作用^[6-7]。

研究发现,心肌细胞特异敲除 GR 小鼠自发性出现心肌肥厚和左心室收缩功能异常,最终死于心力衰竭,而基因表达显示,心肌细胞缺失 GR 后,大量与心血管疾病相关的基因发生改变,包括影响钙离子转移、增加氧化应激、增加细胞死亡等基因表达增加,而抑制心肌肥厚、促进细胞存活等基因表达下调^[7]。然而,GR 如何影响缺血缺氧心肌组织的相关研究仍较少^[8-9]。

本研究发现,给予外源性糖皮质激素后,梗死后心脏组织 GR 激活明显增加,进一步观察发现,GR 激活增加可明显减轻小鼠 MI 后左心室舒张/收缩期末内径和容积,减轻小鼠心脏质量,增加其射血分数和短轴缩短率,提示 MI 后心功能明显改善;而通过对小鼠心脏组织切片行 Masson 染色发现,心脏组织 GR 激活增加可减轻小鼠心肌梗死面积,减轻 MI 后心脏重塑。综上所述,心脏 GR 激活可改善 MI 后心脏重塑,保护 MI 后心功能。

研究发现,GR 激活对梗死后心肌细胞的影响与早期抗凋亡作用有关,有研究发现糖皮质激素可以通过诱导心肌细胞 Bcl-xL 等抗凋亡基因的表达减少 MI 后心肌细胞凋亡^[13];另有研究发现,地塞米松组细胞凋亡及 Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显低于对照组,减轻急性 MI 大鼠的心肌损伤^[14]。本研究团队前期也通过动物实验及体外细胞实验证实 GR 激活可以减轻早期细胞凋亡和坏死,体外细胞实验证实给予 GR 拮抗剂 RU486 后,抗细胞凋亡作用消失^[10]。

MI 后的病理过程包括三个阶段:炎症期、纤维增殖期和恢复期,而炎症过程是心肌损伤和心脏结构及功能受损的基础,炎症细胞的浸润和炎症因子的释放是 MI 进展的重要因素之一^[15],由于免疫细胞的重要调控作用,MI 及心肌缺血再灌注损伤的病理过程也被认为是炎症应答的过程^[16]。糖皮质激素在各种疾病中具有强大的抗炎作用,Oakley 等^[7]报道,心肌细胞 GR 敲除小鼠的抗炎基因减少。本研究通过对 MI 后心脏组织切片行免疫组化染色发现,MI 后心脏组织 CCL-5、IL-6 的表达明显升高,而地塞米松预处理后心脏组织 CCL-5、IL-6 的表达明显降低。

有研究表明,内皮 GR 的缺失可通过影响细胞因子和趋化因子加重肾脏纤维化过程^[17],而细胞因子 IL-6 水平与 MI 后心脏功能明显相关,特异性敲除 IL-6 可以通过调节 M2 巨噬细胞和成纤维细胞,

进而改善 MI 后心脏重塑和心功能^[18]。趋化因子 CCL-5 对 MI 后中性粒细胞和巨噬细胞的激活起着非常重要的作用,而抑制趋化因子 CCL-5 的表达,能显著减小梗死面积,改善心功能^[19-20]。

巨噬细胞通过表型转化在 MI 后各个阶段中都扮演重要的角色^[21],且在动脉粥样硬化早期,激活的内皮细胞促进循环单核细胞募集,同样依赖内皮细胞表达的趋化因子如 CCL-5 及趋化因子配体 CXCL-1 等^[22]。因此,糖皮质激素可能通过抑制 CCL-5、IL-6 的表达,调节巨噬细胞的表型转化,从而保护心脏功能。

本研究通过外源性给予地塞米松,观察到 MI 后心肌细胞 GR 激活增加,同时 MI 后心功能明显改善,提示心脏 GR 激活可改善心脏重塑,保护心脏受损细胞,这一作用可能与其抑制炎症细胞浸润和炎症因子分泌有关。

本研究尚存在一些不足,仅观察了 MI 后 7 天的改变,缺乏进一步观察小鼠的生存率及心脏重塑情况;本研究缺乏体外细胞实验进一步验证相关结果。

[参考文献]

- [1] WELLINGS J, KOSTIS J B, SARGSYAN D, et al. Risk factors and trends in incidence of heart failure following acute myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2018, 122(1): 1-5.
- [2] PRABHU S D, FRANGOGIANNIS N G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis[J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112.
- [3] HOJO Y, SAITO T, KONDO H. Role of apoptosis in left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. *J Cardiol*, 2012, 60(2): 91-92.
- [4] LIU Y L, YANG L Q, YIN J M, et al. MicroRNA-15b deteriorates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating Bcl-2 and MAPK3[J]. *J Investig Med*, 2018, 66(1): 39-45.
- [5] LI T T, YAN Z P, FAN Y J, et al. Cardiac repair after myocardial infarction: a two-sided role of inflammation-mediated[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 1077290.
- [6] CAIN D W, CIDLOWSKI J A. Immune regulation by glucocorticoids[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(4): 233-247.
- [7] OAKLEY R H, CRUZ-TOPETE D, HE B, et al. Cardiomyocyte glucocorticoid and mineralocorticoid receptors directly and antagonistically regulate heart disease in mice[J]. *Sci Signal*, 2019, 12(577): eaau9685.
- [8] LIU B, ZHANG T N, KNIGHT J K, et al. The glucocorticoid receptor in cardiovascular health and disease[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 8.
- [9] IVY J R, GRAY G A, HOLMES M C, et al. Corticosteroid receptors in cardiac health and disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2022, 1390: 109-122.
- [10] 王吉静, 徐金义, 姬艳芳, 等. 糖皮质激素受体激活对心肌细

胞损伤后影响的实验研究[J]. *中国心血管杂志*, 2020, 25(3): 258-262.

WANG J J, XU J Y, JI Y F, et al. Experimental study on the effect of glucocorticoid receptor activation on cardiomyocytes after injury[J]. *Chin J Cardiovasc Med*, 2020, 25(3): 258-262.

- [11] GAO E H, LEI Y H, SHANG X Y, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse[J]. *Circ Res*, 2010, 107(12): 1445-1453.

- [12] FRACCAROLLO D, BERGER S, GALUPPO P, et al. Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2011, 123(4): 400-408.

- [13] XU B B, STROM J, CHEN Q M. Dexamethasone induces transcriptional activation of Bcl-xL gene and inhibits cardiac injury by myocardial ischemia[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668(1/2): 194-200.

- [14] CHENG X D, ZHANG R Z, WEI S L, et al. Dexamethasone alleviates myocardial injury in a rat model of acute myocardial infarction supported by venoarterial extracorporeal membrane oxygenation[J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 900751.

- [15] LIEHN E A, POSTEA O, CURAJ A, et al. Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(23): 2357-2362.

- [16] 董亚兰, 胡德胜. 动脉粥样硬化的炎症应答特征及运用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(4): 304-312.

DONG Y L, HU D S. Characteristics and application of inflammatory response in atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(4): 304-312.

- [17] SRIVASTAVA S P, ZHOU H, SETIA O, et al. Loss of endothelial glucocorticoid receptor accelerates diabetic nephropathy[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2368.

- [18] JING R, LONG T Y, PAN W, et al. IL-6 knockout ameliorates myocardial remodeling after myocardial infarction by regulating activation of M2 macrophages and fibroblast cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(14): 6283-6291.

- [19] FABRIZIO M, VINCENT B, SÉBASTIEN L, et al. CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(15): 1964-1974.

- [20] BRAUNERSREUTHER V, PELLIEUX C, PELLI G, et al. Chemokine CCL5/RANTES inhibition reduces myocardial reperfusion injury in atherosclerotic mice[J]. *J Mol Cell Cardio*, 2010(4): 789-798.

- [21] 叶晓妙, 杭燕雯, 胡伟. 巨噬细胞在心肌梗死后的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(10): 917-920.

YE X M, HANG Y W, HU W. Research progress on the role of macrophages after myocardial infarction[J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(10): 917-920.

- [22] 肖素军, 赵明. 动脉粥样硬化与免疫[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(4): 277-286.

XIAO S J, ZHAO M. Atherosclerosis and immunity[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(4): 277-286.

(此文编辑 文玉珊)