

维生素 D 类似物对心肌肥厚的抑制作用

熊洋洋 李 丹 付 瑜 李斌超 王金荣 徐樱溪 孔 娟

摘 要 **目的** 探讨维生素 D 类似物对自发性高血压大鼠(SHRs)心肌肥厚的治疗作用。**方法** 选取 20 只 1 个月大雄性 SHR,随机分成高血压对照组(C 组, $n=5$)、洛沙坦组(L 组, $n=5$)、帕立骨化醇组(P 组, $n=5$)、洛沙坦与帕立骨化醇联合用药组(LP 组, $n=5$),进行 2 个月不同干预。HE 染色观察 SHR 左心室横断面变化,异硫氰酸荧光素标记的麦胚凝集素对左心室细胞膜染色观察心肌细胞变化,Image J 软件测量心肌细胞直径大小。Northern blot 法观察心肌细胞中心钠素(ANP)和脑钠素(BNP) mRNA 的表达。Western blot 法观察肾脏中肾素蛋白水平表达,实时定量 PCR 观察肾脏中 mRNA 水平表达,RT-PCR 法观察心脏中肾素 mRNA 水平改变。**结果** 与 C 组相比,P 组出现左心室壁变薄,但 LP 组左心室壁变薄更明显,C 组心肌细胞大且间质增生而 LP 组的细胞最小($P<0.01$)、间质最少。心肌细胞中 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达量在 LP 组最低(P 均 <0.05)。肾脏中肾素蛋白在 L 组表达水平最高、在 LP 组表达明显降低,肾脏中肾素 mRNA 在 L 组表达最高、在 P 组表达最低(P 均 <0.05),心脏中的肾素 mRNA 在 L 组表达水平最强、在 LP 组表达水平明显降低。**结论** 维生素 D 类似物与洛沙坦在抑制左心室心肌肥厚中起协同作用。

关键词 自发性高血压大鼠 维生素 D 类似物 心肌肥厚

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.010

Inhibited Effects of Vitamin D Analogs on Cardiac Hypertrophy. Xiong Yangyang, Li Dan, Fu Yu, et al. Department of Nutrition, Sheng Jing Hospital of China Medical University, Liaoning 110004, China

Abstract **Objective** To study the contribution of vitamin D analogs on cardiac hypertrophy in spontaneously Hypertensive Rats. **Methods** Twenty male SHR rats were randomly divided into hypertension control group (C group, $n=5$), losartan group (L group, $n=5$), paricalcitol group (P group, $n=5$), losartan + paricalcitol group (LP group, $n=5$), and there rats were intervene them for 2 months. Staining cross-sections of left ventricles with HE was performed to observe its change. Cardiomyocytes were stained with FITC labeled wheat germ agglutinin and viewed by a fluorescence microscope. Diameter of cardiomyocytes was measured by computer software Image J. The expression of ANP and BNP mRNA in cardiomyocytes were detected by Northern blot. Renin in kidney protein expression was detected by Western blot. the expression of renin mRNA in kidney was observed by real time PCR. observes the expression of renin mRNA in heart was observed by RT-PCR. **Results** Compared with C group, P group's left ventricular become thin and LP group's left ventricular become thinner, C group's cardiomyocytes was big and stroma hyperplasia but LP group's cardiomyocytes was the smallest ($P<0.01$) and stroma was few. LP group's mRNA expression of ANP and BNP in cardiomyocytes was the lowest ($P<0.05$). L group's Renin protein in kidney expression was highest, and the expression in LP group become absolutely low. The expression of renin mRNA in kidney in L group was highest and in P group was lowest ($P<0.05$). The expression of renin mRNA in heart in L group is highest in LP group was lowest ($P<0.05$). **Conclusion** The combination of vitamin D analogs with losartan generates a degree of therapeutic synergism in the attenuation of left ventricular hypertrophy.

Key words Spontaneously hypertensive rats; Vitamin analogs; Cardiac hypertrophy

近年来,随着生活水平提高、人口老龄化加重,心血管疾病已成为发生率增长最快,致残率、致死率、医

疗费用最高的疾病之一。心肌肥厚主要发生在长期压力负荷过重情况下,通过心肌总量增加、收缩力加强使心脏得以维持正常代偿,但这种代偿功能也有不利之处,主要因为肥大的心肌需氧增加,而冠状动脉供血量往往不能予以满足,造成心肌缺血,最终导致充血性心力衰竭或心源性猝死。因此心肌肥厚已成为心血管事件的独立危险因素。国内外研究表明,在心血管疾病患者体内 25 羟维生素 D 水平明显低于

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971401,81170065);辽宁省攀登学者计划项目;辽宁省十百千计划项目

作者单位:110004 沈阳,中国医科大学附属盛京医院临床营养科(熊洋洋、付瑜、李斌超、王金荣、徐樱溪、孔娟);110043 沈阳,中国人民解放军第 463 医院体检科(李丹)

通讯作者:孔娟,电子信箱:kongjl@sj-hospital.org

正常人,心力衰竭患者降低程度更明显,提示可通过补充维生素 D 降低心血管疾病的发生率^[1,3]。

如上提到人体内 25 羟维生素 D 水平与心血管疾病及严重程度呈负相关,而维生素 D 的心血管效应可能是通过部分调节肾素血管紧张素系统(RAS)来完成,但一直没有确凿的证据^[4]。而药理学上常用于治疗心血管病的药物主要为血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素 II 受体阻断剂^[5]。因此为了进一步证实维生素 D 对心血管疾病的治疗作用及相关机制,本研究以自发性高血压大鼠(SHR)心脏模型为载体,选取维生素 D 类似物帕立骨化醇及血管紧张素 II 受体阻断剂洛沙坦,通过单独和联合给药方式探讨维生素 D 对心肌肥厚的抑制作用。

材料与方法

1. 主要试剂与仪器:帕立骨化醇(美国雅培公司),洛沙坦(德国勃林格殷格翰),异硫氰酸荧光素标记的麦胚凝集素(美国 Sigma 公司)。倒置荧光显微镜(德国莱卡公司,DMI3000B),蛋白浓度测定试剂盒(美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像仪(美国 SynGene 公司),蛋白质凝胶强度定量分析软件(UNSCAN-凝胶版本 5.3),Trizol(美国 Invitrogen 公司),PCR 仪及实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2. 动物分组及干预:20 只 SPF 级 1 个月龄雄性 SHR 大鼠(中国医科大学实验动物中心提供)随机分成 4 组($n=5$),分别干预 2 个月。(1)高血压对照组(C 组):丙二醇:水=80:20 的混合液 100 μ l 腹腔注射,每周 3 次。(2)洛沙坦组(L 组):30mg/(kg·d)溶解在饮水水中。(3)帕立骨化醇组(P 组):400ng/kg 溶解在丙二醇中腹腔注射,每周 3 次。(4)洛沙坦与帕立骨化醇联合用药组(LP 组):在饮用洛沙坦水溶液的同时腹腔注射帕立骨化醇。2 个月后 10% 水合氯醛麻醉处死。

3. 组织学处理方法:新取下来的心脏经 4% 的多聚甲醛(pH7.2 的 PBS 配制)过夜固定后,进行石蜡包埋,切成 3 μ m 的石蜡切片经过脱蜡脱水后进行 HE 染色。低倍显微镜下对心脏进行整体观察,比较左心室壁厚薄差异,心肌细胞膜用异硫氰酸荧光素标记的麦胚凝集素进行染色,用倒置荧光显微镜观察横断心肌细胞大小及其间质增生情况。每组随机筛选 30 个细胞,用 Image J 软件测量心肌细胞直径大小。

4. 蛋白提取:在冰上操作,心脏取下后放入配好的 500 μ l Leamlli buffer 中,用剪刀剪碎后匀浆机进一步匀碎,5min 煮沸使蛋白变性。然后 12000r/min、5min 离心取上清,美国 Bio-Rad 公司蛋白浓度试剂盒进行蛋白浓度测定,-20℃ 分装冻存。

5. RNA 的抽提:剪黄豆一半大小的组织放入 700 μ l Trizol 中,冰上剪碎组织匀浆。放入 240 μ l 氯仿震荡 100 次,4℃ 下 13000r/min 离心 15min,取上清放入 1.5ml EP 管中。加入 1ml 异丙醇上下翻转,冰上静止 10min。4℃ 下 13000r/min 离心 20min,倒掉上清,用纸巾吸干多余水分,留下白色小点状沉

淀。配好的洗涤液(7ml 乙醇与 3ml DEPC 水混合)洗涤沉淀两次,倒掉洗涤液后留下点状沉淀,加入 80 μ l DEPC 水。看到沉淀溶解后,抽取 1 μ l 进行 RNA 浓度测定,其余 RNA 保存备用。

6. Northern blot 法分析心肌细胞中 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达量:RNA 提取后,在 100V 电泳下,不同分子质量的 RNA 在 1% 的琼脂糖变性胶上被分开。电泳结束后将胶块置于紫外线灯下,观察 RNA 的完整性以及条带位置,将 RNA 从变性胶转移到尼龙膜上。用三磷酸腺嘌呤脱氧核苷酸标记的 cDNA 探针在 63℃ 的杂交溶液中进行杂交,将尼龙膜用 ddH₂O 漂洗片刻,用滤纸吸去膜上水分。用薄型塑料纸将膜包好,置于暗盒中,在暗室中压上 X 线片。把暗盒置 -70℃ 进行放射自显影。然后定性及定量观察不同处理组心肌细胞中 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达差异。

7. 肾素 mRNA 表达检测:心脏中肾素采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法,取 1 μ g 总 RNA,进行反转录。反转录条件为:42℃ 60min,99℃ 2min。肾素引物序列(5'→3')为上游引物:CGAGTTGATGGGGTTGTGG,下游引物:TGAATCTGCCAGACACCACT,内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物序列(5'→3')为:上游引物:AACGACCCCTTCATTGACCTC,下游引物:CCTTGACTGTGCCGTTGAAGT。PCR 反应参数:预变性 94℃ 4min,变性 94℃ 45s,退火 60℃ 45s,延伸 72℃ 45s,终末延伸 72℃ 5min,4℃ 终止,共 32 个循环。取 10 μ l 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察肾素 mRNA 表达水平变化。肾脏中肾素采用实时定量 PCR 检测,反应参数:94℃ 变性 20s,60℃ 退火 20s,72℃ 延伸 20s,3 步组成 40 个循环。目的基因和 GAPDH 产物倍数按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

8. 统计学方法:实验数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行两样本均数的 t 检验,多样本均数的方差分析及最小显著差法进行组间比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 自发性高血压大鼠左心室壁改变:经两个月不同干预后,联合用药组心脏体积最小、心室壁最薄、组织疏松。对照组心脏体积大、室壁厚、组织质密。洛沙坦组和维生素 D 类似物组分别介于两者之间。详见图 1。

2. 自发性高血压大鼠心肌细胞改变:未用药组心肌细胞大并间质增生而联合用药组的细胞最小、间质最少,详见图 2。随机选取其中 30 个细胞进行测量,对照组心肌细胞最大(直径 $0.138\pm 0.029\mu$ m),洛沙坦组心肌细胞(直径 $0.122\pm 0.031\mu$ m)小于对照组,但差异无统计学意义。帕立骨化醇组心肌细胞(直径 $0.118\pm 0.016\mu$ m)和联合用药组心肌细胞(直径 $0.106\pm 0.022\mu$ m)与对照组相比差异均有统计学意义,详见图 3。

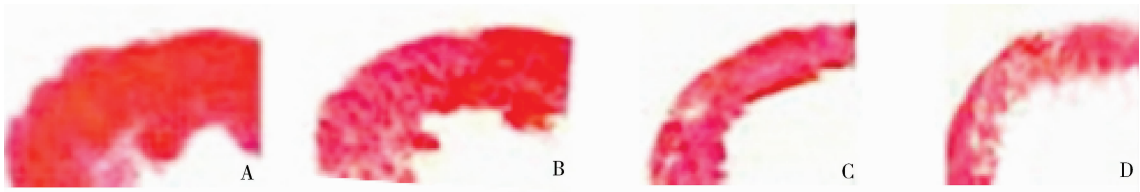


图 1 心脏横断面 HE 染色 (× 500)
A. C 组; B. L 组; C. P 组; D. LP 组

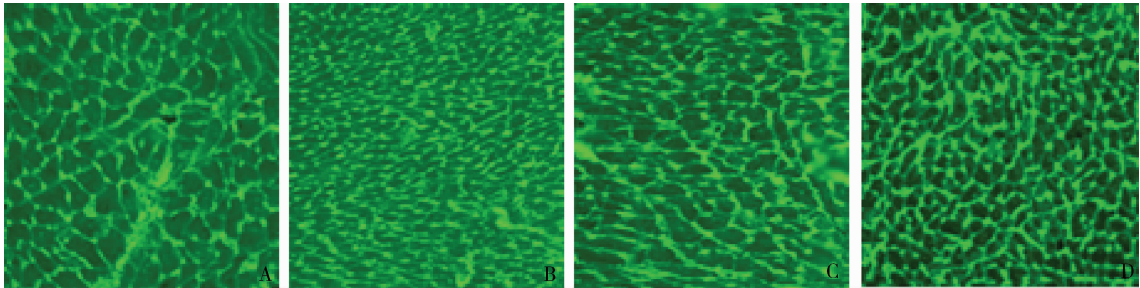


图 2 心肌细胞膜组织染色 (免疫荧光染色, × 200)
A. C 组; B. L 组; C. P 组; D. LP 组

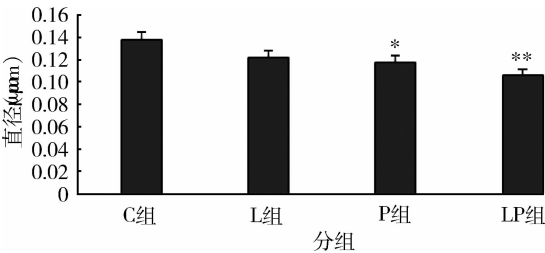


图 3 心肌细胞直径大小测定
与 C 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. Northern blot 法分析心肌细胞中 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达量改变: mRNA 在对照组的表达量最高, 在联合用药组表达最低, 详见图 4A。通过对图 4A 的定量分析可知: 除 L 组外, 与对照组相比 P 组及 LP 组中 ANP 和 BNP 的 mRNA 表达量差异均具有统计学意义。帕立骨化醇组中 ANP 表达量与对照组相比 $P < 0.01$, 联合用药组中 BNP 的表达量与对照组相比 $P < 0.01$ 。详见图 4B。

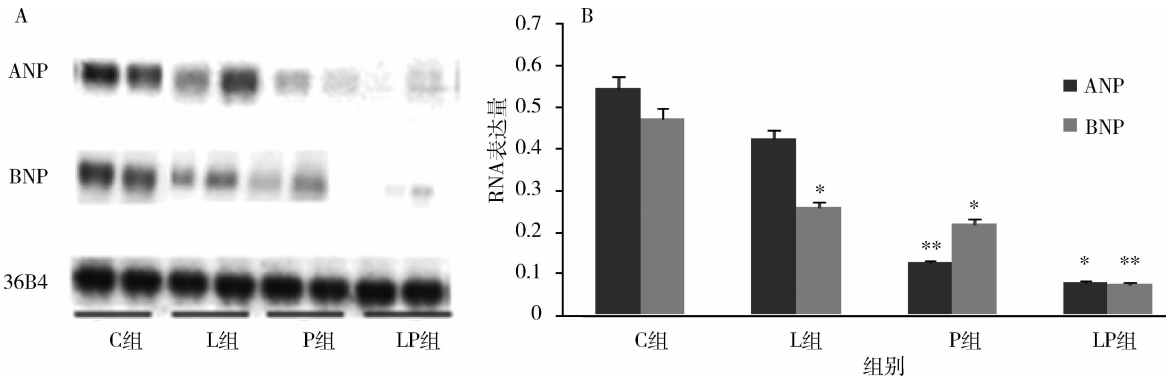


图 4 心肌细胞中 ANP 和 BNP 的 RNA 表达的定性及定量检测
A. Northern blot 法分析各组心肌细胞中 ANP 和 BNP 的 RNA 表达;
B. ANP、BNP RNA 的定量表达, 与 C 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. 肾脏中肾素蛋白及 mRNA 水平的变化: 肾脏中肾素蛋白质的表达在洛沙坦组最高, 在联合用药组表达明显降低, 详见图 5A。其次对其 mRNA 表达进

行检测: 肾脏中肾素 mRNA 在帕立骨化醇组表达最低, 在洛沙坦组表达最高。与对照组相比洛沙坦组和帕立骨化醇组差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 联

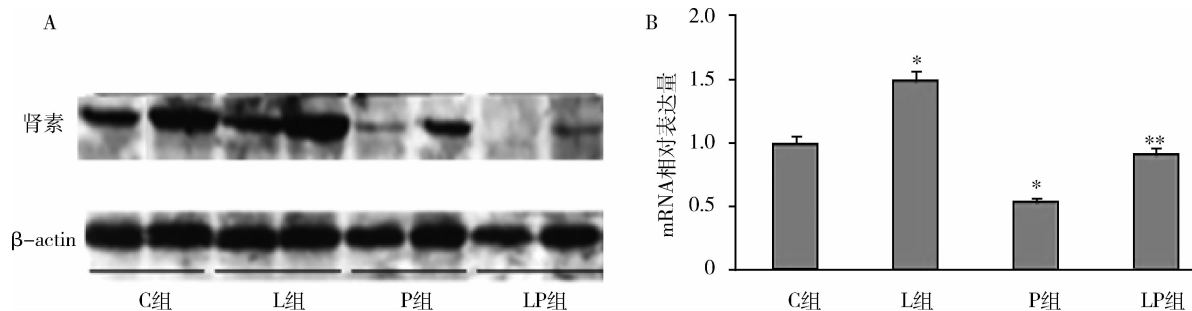


图5 肾脏中肾素蛋白及 mRNA 表达水平检测

A. Western blot 法分析各组肾脏中肾素蛋白表达;

B. 实时定量 PCR 分析肾脏中肾素 mRNA 表达,与 C 组比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

合用药组 mRNA 表达也相应降低与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),详见图 5B。

5. 心脏中肾素 mRNA 转录水平的检测:通过常规 PCR 检测发现在维生素 D 类似物组和联合用药组,心脏中肾素的 mRNA 表达出现了与肾脏中近似相同的变化,联合用药组表达最低,其次为维生素 D 类似物组,表达最高的为对照组,详见图 6。

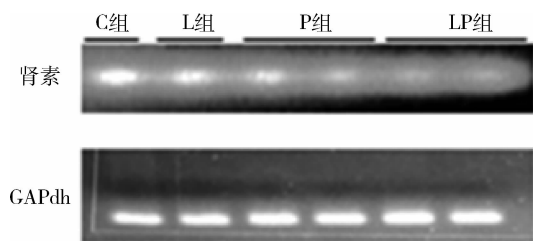


图6 心脏中肾素 mRNA 的表达检测

讨 论

维生素 D 的生物活性形式为 1、25 羟骨化三醇,对体内细胞增殖分化、激素平衡分泌等一系列生理功能起到关键作用^[6]。因此补充适量维生素 D 是保持身体健康的一个重要途径,但维生素 D 在临床应用中具有显著升高血钙的主要毒性不良反应作用。帕立骨化醇是雅培公司研发的一种维生素 D 类似物,同维生素 D 一样通过结合维生素 D 受体(VDR)而发挥相应的生理效应,同时具有轻微影响血钙的优点^[7]。随着 VDR 在不同组织表达的发现,相应的生理功能被揭示。帕立骨化醇的作用也得到证明,在肾脏疾病、心血管疾病、免疫炎症反应、肿瘤等方面都有一定疗效。

肾素-血管紧张素系统(RAS)是人体内重要的体液调节系统。RAS 既存在于循环系统,也存在于血管壁、心脏、中枢、肾脏和肾上腺等组织。在正常情况下,它对心血管系统的正常发育,心血管功能稳态、电解质和体液平衡的维持,以及血压的调节均有重要

作用。其正常的链式反应为,血浆或组织中的肾素底物即血管紧张素原,在肾素的作用下水解为血管紧张素 I (Ang I)。Ang I 在血管紧张素转换酶(ACE)作用下,C 末端水解切去 2 个氨基酸残基转换为血管紧张素 II (Ang II)。Ang II 与血管平滑肌上的血管紧张素 II 受体结合,从而导致血管收缩血压升高。而心肌肥厚主要由于长期压力负荷过大所造成,因此本研究选取自发性高血压大鼠作为心肌肥厚模型。Ang II 受体阻断剂洛沙坦对其进行干预时,结果如图 1 所示,心肌肥厚有轻微改善。但比较心肌细胞直径时,如图 3 所示差异并无统计学意义。一种可能为长期应用 Ang II 受体阻断剂出现受体脱敏作用^[8]。另一种可能为负反馈调节肾素增高,肾素通过肾素受体起作用间接导致心肌肥厚^[2]。

维生素 D 类似物进行干预时,出现心肌肥厚缓解现象且心肌细胞直径大小差异具有统计学意义。于是笔者采用维生素 D 类似物与洛沙坦联合治疗其结果如图 1 ~ 图 3 所示,心肌肥厚出现显著改善,心室壁变薄、心肌细胞变小。笔者也观察到心肌肥厚的标志性基因 ANP 和 BNP 出现明显变化,结果如图 4 所示,在维生素 D 类似物组和联合用药组 ANP 和 BNP 的 mRNA 水平均出现了不同程度明显下降。为了分析其可能原因,笔者研究了肾素的变化如图 5、图 6 所示,Ang II 受体阻断剂洛沙坦组出现肾素升高现象,进一步阐明该系统的负反馈调节机制;在维生素 D 类似物组和联合用药组无论是肾脏还是心脏中,均出现肾素下调现象,进一步证明了维生素 D 类似物抑制了肾素受体,或维生素 D 类似物作用于肾素启动子抑制了肾素基因的转录,降低体内肾素水平,从而抑制了心肌肥厚^[4]。

在本实验中笔者发现肾素在心肌肥厚中可能发挥关键作用,维生素 D 类似物通过下调肾素起到抑

制心肌肥厚的作用。因此可以针对该途径进一步研究维生素 D 类似物,使其有望成为新一代治疗临床心肌肥厚的药物。

参考文献

- 1 李敏,于慧会,时景璞. 25 羟维生素 D 水平与心血管疾病关系的 Meta 分析[J]. 中华疾病控制杂志,2011,16(11):939-942
- 2 Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, *et al.* Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease[J]. *Circulation*,2008,117:503-511
- 3 Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, *et al.* 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study[J]. *Arch Intern Med*, 2008,168(12):1174-1180
- 4 Yuan W, Pan W, Kong J, *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. [J] *J Biol Chem*

2007,282(9):29821-29830

- 5 陈玲,邹栩. 全球心血管药物研发动态[J]. 中国新药杂志,2010,19(1):8-16
- 6 Ebert R, Schutze N, Adamski J, *et al.* Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease[J]. *Mol Cell Endocrinol*,2006,248(1-2):149-159
- 7 吴淑燕,顾洒洒,李晓莉,等. 维生素 D 类似物帕立骨化醇的药理作用研究进展[J]. 中国药理学杂志,2011,46(22):1700-1703
- 8 Lakshmikanthan S, Zieba BJ, Ge ZD, *et al.* Ras-related protein 1 in smooth muscle and endothelium is required for maintenance of vascular tone and normal blood pressure[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2014, 34(7):1486-1494

(收稿日期:2014-11-15)

(修回日期:2014-12-02)

益髓生血颗粒对血红蛋白 H 病患者抗氧化损伤和细胞因子水平的影响

褚娜利 吴志奎 张新华 王文娟 程艳玲 方素萍

摘要 **目的** 研究益髓生血颗粒对血红蛋白 H 病患者抗氧化损伤和造血相关细胞因子水平的影响。**方法** 采用安慰剂平行对照实验方法,选择 30 例血红蛋白 H 病患者,随机分为治疗组和对照组,每组 15 例,治疗组给予益髓生血颗粒进行治疗,对照组给予安慰剂进行治疗,疗程均为 3 个月。动态监测治疗前后患者 Hb、RBC、HbH 的水平;检测治疗前后血清及红细胞氧化与抗氧化损伤指标(SOD、MDA、GSH-Px)和细胞因子(SCF、GM-CSF、IL-3)活性。**结果** 自益髓生血颗粒治疗 1~3 个月,治疗组患者疗效性血液指标 Hb 水平与治疗前相比显著升高($P<0.01$, $P<0.05$);RBC 疗后 1、3 个月水平与疗前相比显著升高($P<0.05$);Ret 水平治疗后有升高的趋势。对照组经安慰剂治疗后血液指标 Hb、RBC、Ret 水平与疗前相比均无明显改善。经益髓生血颗粒治疗 3 个月后,治疗组患者红细胞 SOD、GSH-Px 水平与疗前相比显著升高($P<0.01$);MDA 水平与疗前相比,显著降低($P<0.01$);血清 SOD 水平与疗前相比显著升高($P<0.01$);对照组各指标水平均无明显变化。经益髓生血颗粒治疗 3 个月后,治疗组患者 SCF 水平与疗前相比显著升高($P<0.05$);GM-CSF、IL-3 水平与疗前相比无明显变化;对照组各指标水平均无明显变化。**结论** 益髓生血颗粒治疗地中海贫血有良好的临床疗效,能显著改善患者血液参数水平。益髓生血颗粒的疗效生物学机制之一与提高 HbH 病患者抗氧化损伤能力和造血正调控细胞因子 SCF 活性有关。

关键词 血红蛋白 H 病 益髓生血颗粒 血液参数 抗氧化损伤 细胞因子

中图分类号 R552

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.011

Level of Anti-oxidative Damage and Cytokine in Patients of HbH Disease Treated by Yisui Shengxue Granule. Chu Nali, Wu Zhikui, Zhang Xinhua, *et al.* Guang'anmen Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract Objective To study the influence of Yisui Shengxue granule on the levels of anti-oxidative damage and cytokine of patients with HbH disease. **Methods** A randomized single-blinded trial was designed. Thirty patients with HbH disease were divided into two groups;15 patients in YSSXG-treated group and 15 in placebo parallel control group. The patients in the two groups were assigned to receive either YSSXG or placebo for three months. The blood parameters [hemoglobin (Hb), red blood cell (RBC) and reticulocytes

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173167);国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2010CB530406)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院(褚娜利、吴志奎、程艳玲、方素萍);530021 南京,中国人民解放军第 303 医院(张新华);100069 北京,首都医科大学(王文娟)

通讯作者:吴志奎,博士生导师,电子信箱:gamwuzhikui@sina.com