

皮下注射异丙肾上腺素诱导小鼠心肌肥厚模型

张文斌 唐其柱 李 金 向仕钊 胡哲夫

摘 要 **目的** 探讨皮下注射异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)在诱导小鼠心肌肥厚模型中的作用。**方法** 将雄性 C57 品系的小鼠随机分为药物组(ISO 组)与生理盐水组(NS 组),分别皮下注射剂量为 5mg/kg 的 ISO 与等体积的生理盐水,每日 2 次,注射 2 周后取材。用射血分数、心重体重比、肺重体重比、心肌细胞横截面积、和 ANP 表达量去验证心肌肥厚模型构建情况;Western blot 法用于检测心肌肥厚相关信号通路改变情况。**结果** ISO 组与 NS 组相比,射血分数降低,心重体重比、肺重体重比升高,心肌细胞横截面积和 ANP 表达水平升高,证明 ISO 成功诱导了心肌肥厚模型;ISO 组 P-ERK、P-JNK 与 NS 组相比表达增强,证明了 ISO 是通过 MAPK 家族信号通路诱导心肌肥厚模型。**结论** 皮下注射异丙肾上腺素能够成功的通过激活 MAPK 家族信号通路诱导小鼠心肌肥厚模型,该法简单、经济、可靠。

关键词 异丙肾上腺素 动物模型 心肌肥厚

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.025

Subcutaneous Injection of Isoprenaline Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. Zhang Wenbin, Tang Qizhu, Li Jin, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate effects of subcutaneous injection of isoprenaline (ISO) on cardiac hypertrophy in mice. **Methods** Male C57 mice were divided into two groups: normal saline group (NS group) and ISO group. The mice were subcutaneously injected with a dose of 5mg/kg of ISO 2 times a day for two weeks, meanwhile mice in the NS group received the same volume of vehicle. The ejection fractions(EF%) were recorded after mice cardiac ultrasound. The heart weight(HW), lung weight(LW), and body weight(BW) were recorded and then the ratios of HW/BW and LW/BW were calculated. The cross-sectional areas(CSA) of the myocytes was also counted. Atrial natriuretic peptide(ANP) was detected by real time PCR. The signaling pathway involved in the cardiac hypertrophy was also detected by western blot. **Results** ISO induced reduced EF%, induced increased HW/BW, LW/BW, CSA of myocyte and mRNA level of ANP. And expressions of phospho-ERK and phospho-JNK in ISO group were enhanced compared with NS group. **Conclusion** Subcutaneous injections of ISO can effectively induce cardiac hypertrophy in mice model through the activation of MAPK signaling pathway.

Key words Isoprenaline; Animal model; Cardiac hypertrophy

心肌肥厚是指心脏在长期压力负荷、心肌梗死、冠状动脉疾病等因素的刺激下产生的一种泵血功能增强、心室壁张力减弱的适应性改变,是心力衰竭、心律失常及猝死的独立危险因素,是众多心血管疾病的共同病理过程^[1,2]。小鼠心肌肥厚模型的构建主要有手术和药物两种方式,手术方式分为腹主动脉结扎术、升主动脉结扎术和颈总动脉结扎术等,其病死率高且效率低^[3];药物主要为皮下泵注血管紧张素Ⅱ等激动剂,使小鼠全身小动脉收缩而引起血压升高,最终导致心肌肥厚,但血管紧张素Ⅱ等半衰期极短^[4]。与其他交感神经递质相比,

ISO 不仅半衰期相对较长,能更真实的模拟自然病程,而且皮下注射 ISO 方法也更为简单、经济。此外,大鼠皮下注射 ISO 诱导心肌肥厚模型的文献较多,但小鼠的相关文献较少且方法报道不一致^[5]。本研究通过向 C57 品系小鼠皮下注射 ISO 构建心肌肥厚模型,探讨 ISO 在对心肌肥厚模型构建的效果及其激活的相关信号通路,尤其是 MAPK 家族信号通路的作用^[6]。

材料与方法

1. 实验动物及试剂:SPF 级 C57 雄性小鼠(8 周龄,25 ± 2g)的 20 只,购自北京华阜康生物科技有限公司,饲养于武汉大学人民医院实验动物中心 SPF 级动物室。动物实验的操作均参照美国《实验动物管理和使用指南》,且经过武汉大学人民医院动物管理和使用中心的批准。ISO(I5627)购自 Sigma 公司;一抗 P-ERK(4370P)、T-ERK(4695)、P-JNK

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科

通讯作者:唐其柱,教授、博士生导师,电子信箱:qztang@whu.edu.cn

(4668P)、T-JNK(9258)、GAPDH(2118)均购自 CST 公司;二抗:IRDye 800CW 购自 LI-COR Biosciences;PVDF 膜购自 Millipore 公司;ANP 引物购自上海生物工程股份有限公司,上游引物:5'-ACCTGCTAGACCACCTGGAG-3';下游引物:5'-CCTTGCTGTTATCTTCGGTACCGG-3';TRIzol 来自于 Invitrogen 公司;SYBR Green 1 Master Mix 试剂盒购自 Roche 公司。

2. 实验方法:(1)心肌肥厚小鼠模型的构建:将 C57 雄性小鼠随机分为对照组(NS 组)与模型组(ISO 组),每组 10 只,于早晚两次分别皮下注射剂量为 5mg/kg 的生理盐水与 ISO,连续注射 2 周。(2)超声检查:将 NS 组与 ISO 组小鼠用异氟烷麻醉后剃去颈部及前胸壁的毛,暴露前胸壁,涂抹超声耦合剂后进行超声检查,测得射血分数。(3)取材:用颈椎脱臼法处死小鼠,固定四肢,由颈部沿左锁骨中线剪开胸腔,暴露心脏后将心脏完整剪下,挤去心腔内残余的血液,在分析天平上称量心脏重量并记录,随后一部分小鼠心脏切除心房与右心室,将剩下的左心室装入冻存管放液氮中保存,最后放入-80℃冰箱冷藏,另一部分心脏生理盐水冲洗后放入装有甲醛溶液的尿杯保存;暴露肺后将肺完整剪下,擦去表面血液,在分析天平上称量肺重量并记录;剪开小鼠腿部肌肉测量其胫骨长度并作记录。(4)病理切片:取出保存在甲醛溶液中的组织,固定后常规脱水透明,石蜡包埋,修整蜡片,切成厚度为 5μm 的薄片,染色封片后放到显微镜下摄取图像。NS 组与 ISO 组各有 4 张切片,每张片随机拍摄 10 个视野,每个视野随机挑选 5 个细胞,即每组统计 200 个心肌细胞横截面积。(5)心肌蛋白的提取:取-80℃冰箱保存的组织迅速置于干冰上,将样本放入准备好的 EP 管中,放入 6 颗小钢珠,加入裂解液,盖好 EP 管盖。将 EP 管放入研磨仪研磨罐中,随后将研磨罐安装在研磨仪上,30 下/秒研磨 90s。取出 EP 管,倒出钢珠,4℃离心。将收集下来的细胞残液用超声裂解仪裂解,放置 15min 后离心,取上清分装至 EP 管。BCA 法定量蛋白质浓度,分装后-80℃冰箱保存。(6)反转录-聚合酶链反应(RT-PCR):在心肌组织中提取 RNA,计算浓度与纯度,放入-80℃冰箱保存。然后取出 RNA,反转录合成 cDNA 第 1 链,产物用于 PCR。取 PCR 管加入 cDNA、上、下游引物、MIX、灭菌去离子水等,离心混匀后进行 PCR 反应。产物琼脂糖凝胶电泳后用紫外分析仪观察有无特异性扩增带,并拍照记录。(7)Western blot 法检测分析:等体积蛋白质(10μl)经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,加入 7%脱脂牛奶放摇床上室温封闭 1h 后,用含有 Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)洗涤,加入一抗放入 4℃冰箱摇床过夜。取出蛋白膜放入二抗稀释液中避光孵育 1h,孵育结束后用 TBST 洗涤,放入荧光检测仪中检测。

3. 统计学方法:应用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 *t*-检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 药物注射后存活率比较:分别注射 ISO 与 NS

2 周后,两组小鼠的存活率均为 100%。

2. 超声结果比较:注射 2 周后,ISO 组小鼠的 EF% 与 NS 组相比有明显下降,可认为造成了小鼠心脏病理性的改变,差异有统计学意义(图 1)。

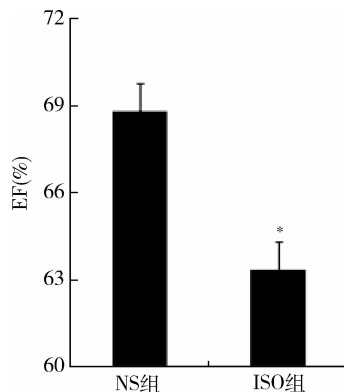


图 1 NS 组小鼠与 ISO 组小鼠射血分数
与 NS 组相比, * *P* < 0.05

3. 两组组织重量的比较:取材称重后,ISO 组小鼠的 HW、HW/BW、LW、LW/BW 比与 NS 组相比均增高,差异有统计学意义(图 2、图 3)。

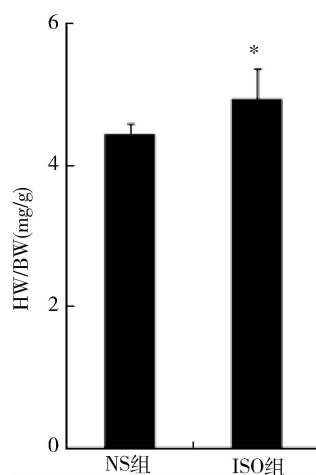


图 2 NS 组小鼠与 ISO 组小鼠心重/体重比(HW/BW)
与 NS 组相比, * *P* < 0.05

4. 两组心肌细胞横截面积的比较:ISO 组小鼠心肌细胞横截面积较 NS 组有显著提高,差异有统计学意义(图 4)。

5. 两组中心钠肽(ANP)的比较:ISO 组小鼠 ANP 较 NS 组有显著提高,差异有统计学意义(图 5)。

6. Western blot 法相关蛋白表达结果:与 NS 组相比,ISO 组 P-ERK、P-JNK 等 MAPK 家族信号通路标志物表达均增强(图 6)。

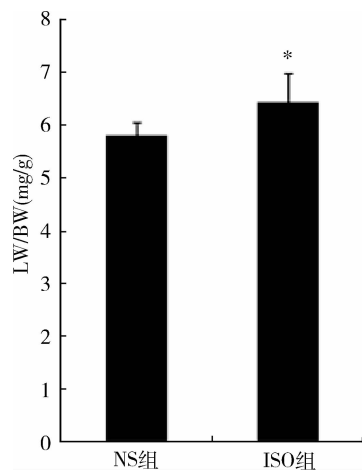


图3 NS组小鼠与ISO组小鼠肺重/体重比(LW/BW)
与NS组相比, * $P < 0.05$

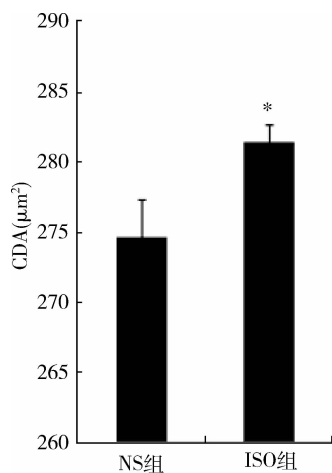


图4 NS组与ISO组小鼠心肌细胞横截面积(CDA)
与NS组相比, * $P < 0.05$

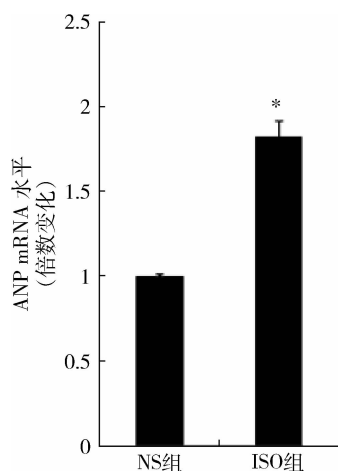


图5 NS组与ISO组小鼠心肌细胞ANP表达
与NS组相比, * $P < 0.05$

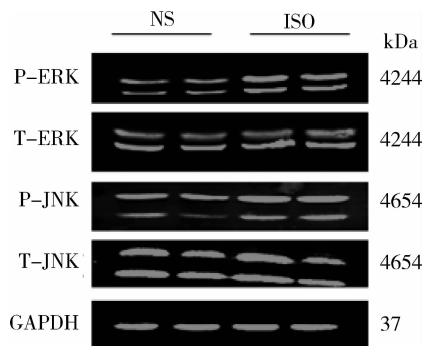


图6 MAPK信号通路相关蛋白表达

讨 论

本实验采用皮下注射ISO制备小鼠心肌肥厚模型,发现注射ISO 2周后,小鼠心重/体重比、肺重/体重比明显增加;心肌细胞横截面积增大;心肌肥厚相关蛋白及标志物P-ERK、P-JNK、ANP等表达升高,这些结果均证明了ISO可以诱导小鼠心肌肥厚,而ISO组小鼠射血分数与NS组相比有了明显的降低,说明小鼠心脏有了病理性的变化,成功构建了心肌肥厚疾病的动物模型。

众所周知,心肌肥厚是指心肌对容量负荷或压力负荷的增大而产生的一种适应性的改变。但伴随着心肌细胞的不断肥大以及心肌细胞内蛋白质的不断沉积,这种生理性的适应会发展为病理性的改变^[7],成为众多心血管疾病发生、发展过程中的共同病理过程与疾病恶化的重要因素,最终导致心力衰竭,引起患者的死亡^[8]。

临床研究表明,交感神经系统过度兴奋主要通过增加压力负荷诱导心肌肥厚的发生、发展过程^[9]。而在心肌肥厚动物模型构建中也证明了这一点,兴奋小鼠交感神经系统也成为构建心肌肥厚模型的主要方法^[10]。ISO作为一种 β 受体激动剂,可激活小鼠交感神经系统,进而构建心肌肥厚的动物模型。心肌肥厚的发生、发展与细胞信号通路的激活密切相关,MAPK家族信号转导通路、AMPK信号转导通路、Wnt信号转导通路、Jak-STAT信号转导通路等相互作用,从而导致心肌肥厚^[11]。而作为相关信号通路基础的MAPK家族信号通路可被由血流动力学改变引起的心室壁机械压力的增强所激活^[12]。越来越多的研究也证明,MAPK家族信号通路在心肌细胞的增殖、分化、凋亡过程中起到重要作用,在心肌肥代偿性肥厚到病理性肥厚的转换中起到了重要作用^[13-15]。Western blot法结果显示P-ERK、P-JNK等标志蛋

白表达增强,说明 ISO 通过激活 MAPK 家族信号通路可导致心肌肥厚。

综上所述,通过皮下注射 ISO 2 周即可成功模拟慢性压力负荷心肌肥厚的动物模型,与手术构建心肌肥厚模型相比,本研究方法不需要开腹、开胸,对小鼠的损害小,动物模型成活率高;与皮下泵注血管紧张素 II 等神经递质构建心肌肥厚模型相比,方法能更真实的模拟自然病程,更加易于操作,同时也更为经济,可以大量复制心肌肥厚模型。因此,皮下注射 ISO 能更简单、经济、可靠的获得小鼠心肌肥厚模型,为心肌肥厚相关机制的进一步的研究打下坚实的基础,为临床上治疗心肌肥厚提供提供新的靶点。

参考文献

- Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(8): 589 - 600
- Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity [J]. N Engl J Med, 2008, 358(13): 1370 - 1380
- 李晓梅, 马依彤, 张健发, 等. 小鼠主动脉弓缩窄模型的建立及评价[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(11): 24 - 29
- Iwai - kanai E, Hasegawa K, Araki M. Alpha - and beta - adrenergic pathways differentially regulate cell type - specific apoptosis in rat cardiac myocytes[J]. Circulation, 1999, 100(3): 305 - 311
- 李明, 张军, 陈燕, 等. 丹参抑制异丙肾上腺素引起的小鼠心肌肥厚和纤维化及其作用机制[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(6): 565 - 568
- 方健, 刘培庆. MAPK 信号通路在心肌梗大中的作用[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(3S): 238 - 240
- Zaidi A, Sharma S. Exercise and heart disease: from athletes and arrhythmias to hypertrophic cardiomyopathy and congenital heart disease [J]. Future Cardiol, 2013, 9(1): 119 - 136
- Opie LH, Commerford PJ, Cresh BJ, et al. Controversies in ventricular remodeling[J]. Lancet, 2006, 367(9507): 356 - 367
- Zheng M, Han DQ, Xiao RP. Distinct β - adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance [J]. Sheng Li Xue Bao, 2004, 56(1): 1 - 15
- Chowdhury D, Tangutur AD, Khatua TN, et al. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats[J]. J Transl Med, 2013, 11: 130 - 142
- 刘丽娜. 心肌肥厚相关信号通路的研究进展[J]. 重庆医学, 2010, 39(20): 2805 - 2808
- Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, et al. Integrin signalling: the tug - of - war in heart hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(3): 422 - 433
- Harrison JC, Zyla TR, Bardes ES, et al. Stress - specific activation mechanisms for the cell integrity MAPK pathway[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(4): 2616 - 2622
- Ravingerová T, Barancík M, Strnisková M. Mitogen - activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 247(1 - 2): 127 - 138
- 戴文建, 王以光. 心肌肥厚分子机制研究进展[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(1): 47 - 50 (收稿日期: 2014 - 12 - 20)
(修回日期: 2015 - 01 - 07)

糖化血红蛋白对糖尿病患者血管内皮和左心结构与功能的影响

段 瑶 沈 冲 吴永全 梁金锐

摘 要 目的 探讨不同水平的糖化血红蛋白(HbA1c)对 2 型糖尿病(T2DM)患者血管内皮和左心结构及功能的影响程度。**方法** 入选 115 例 2 型糖尿病患者,根据测得糖化血红蛋白水平分为 HbA1c < 7% 组 42 例, HbA1c 7% ~ 9% 组 42 例, HbA1c > 9% 组 31 例。同时入选 82 例健康志愿者作为正常对照组。应用外周动脉张力测定(PAT)技术检测所有入选者血管内皮细胞功能、计算反应性充血指数(RHI)。所有入选者均行超声心动图检查。**结果** ①与正常对照组相比, HbA1c 7% ~ 9% 组和 HbA1c > 9% 组患者的 RHI 值存在明显减低($P < 0.05$),且 HbA1c > 9% 组患者 RHI 最低($P < 0.05$);②与 HbA1c < 7% 组相比, HbA1c 7% ~ 9% 组和 HbA1c > 9% 组患者舒张末期左心室后壁厚度(LVPW)、室间隔厚度(IVS)、左心室舒张晚期峰值速度(A)明显增加($P < 0.05$),左心室舒张早期峰值流速(E)、E/A 值明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 糖化血红蛋白 > 7% 时, 2 型糖尿病患者的内皮功能、左心结构及功能均会出现异常,其异常程度随着糖化血红蛋白的升高而加重。

基金项目:首都市民健康基金资助项目(Z13110200400000)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院心血管中心(段瑶、吴永全、梁金锐);102400 北京市房山区良乡医院内科(沈冲)

通讯作者:吴永全,电子邮箱:wuyongquan67@126.com