

5-脂氧合酶抑制剂 Zileuton 缓解压力负荷诱导的心肌重构

邓 伟 陈娇娇 魏 丽 吴青青 唐其柱

摘 要 **目的** 探讨 5-脂氧合酶抑制剂 Zileuton 对压力负荷诱导小鼠心肌重构和心功能的影响。**方法** 部分结扎 C57 小鼠胸主动脉制作小鼠压力负荷诱导的心肌重构模型,并在术后 1 周 Zileuton 灌胃干预,每天 1 次,每次 70mg/kg,观察至术后 7 周,行心脏超声检测后取材,称取小鼠体重、心重和肺重,并留取病理标本,行左心室心肌组织 HE 和天狼星红染色。**结果** Zileuton 抑制了小鼠心肌重构和心功能下降,包括改善了射血分数,抑制了左心室舒张末内径、室间隔厚度、左心室后壁厚度的增加,减轻了心肌细胞肥大和心肌组织胶原沉积。**结论** Zileuton 能够抑制压力负荷诱导的小鼠心肌重构,5-LOX 可能成为治疗心力衰竭的潜在靶点。

关键词 5-脂氧合酶 Zileuton 心肌重构 压力负荷

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.007

Effect of Zileuton on Cardiac Remodeling Induced by Pressure - overload in Mice. Deng Wei, Chen Jiaojiao, Wei Li, et al. Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of Zileuton on cardiac remodeling induced by pressure - overload in mice. **Methods** Male, 8 - 10 - week - old, wild - type C57 mice with or without oral zileuton administration were subjected to aortic banding (AB) or a sham operation. **Results** Our data demonstrated that Zileuton protected against cardiac remodeling and dysfunction induced by AB, as assessed by heart weigh/body weight, lung weight/body weight, echocardiographic parameters, and histological analysis. **Conclusion** These findings suggest a potential therapeutic target of 5 - LOX for cardiac remodeling and heart failure.

Key words 5-lipoxygenase; Zileuton; Cardiac remodeling; Pressure - overload

心肌重构是高血压病、冠心病、瓣膜病等多种心血管疾病发展为心力衰竭的关键病理生理过程。虽然现在对心力衰竭的治疗由改善血流动力学(强心利尿)进展到系统治疗(抑制神经内分泌过度激活,以及心脏再同步化辅助装置等),但心力衰竭的发生率和病死率仍居高不下^[1]。《中国心力衰竭诊断与治疗指南 2014》明确指出,心力衰竭的治疗目标不仅是改善症状,提高生活质量,更重要的是针对心肌重构的机制,防止和延缓心肌重构的发展,从而降低心力衰竭的病死率和住院率。因此,在目前各种治疗策略已达到瓶颈的现状下,探索新的、可能更有效的心肌重构干预靶点,进而遏制心力衰竭的发生、发展,显

得尤为迫切。

炎性因子及免疫信号通路在心肌重构中发挥了重要作用,但白三烯及其相关通路蛋白是否在心肌重构中发挥了作用尚不清楚。5-脂氧合酶(5-Lipoxygenase, 5-LOX)是机体白三烯合成的关键酶,它通过经典的免疫调控效应在肿瘤、感染性疾病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘等多种疾病进展中发挥了重要作用^[2-5]。既往对 5-LOX 在心血管疾病中的作用研究集中在动脉粥样硬化和冠心病,但 5-LOX 对压力负荷诱导心肌重构的影响国内外尚无报道^[6,7]。在本研究中,笔者应用 5-LOX 抑制剂 Zileuton 干预压力负荷诱导的小鼠心肌重构,拟探讨 Zileuton 对心肌重构和心力衰竭的作用。

对象与方法

1. 实验动物及分组: C57BL/6J(C57)品系的野生型小鼠,购于中国医学科学院实验动物研究所,选择体重 24~27g、8~10 周龄的雄性小鼠为实验对象,建立心肌重构小鼠模型,进行观察和研究。小鼠饲养于

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81470516、81530012)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科(邓伟、吴青青、唐其柱);430060 武汉大学心血管病研究所(邓伟、陈娇娇、魏丽、吴青青、唐其柱);430060 心血管病湖北省重点实验室(邓伟、陈娇娇、魏丽、吴青青、唐其柱);430060 武汉大学人民医院儿科(陈娇娇、魏丽)

通讯作者:邓伟,医学博士,副教授,副主任医师,电子邮箱:vivi-deng1982@whu.edu.cn

独立送回风净化笼具(IVC)内,自由进食进水,饮用水经高压处理,饲料经 ^{60}Co 照射灭菌。系统环境为SPF级,温度维持在 $22\sim 24^{\circ}\text{C}$,湿度为 $50\%\sim 60\%$,12h明暗交替。实验分4组:假手术组(Sham组)包括对照组(Sham-Veh组)和Zileuton干预组(Sham-Zil组),心肌重构模型组(AB组)也包括对照组(AB-Veh组)和Zileuton干预组(AB-Zil组),每组20只小鼠。

2. 心肌重构动物模型制作及干预方法:制作压力负荷性左室心肌重构小鼠模型(AB模型组):经戊巴比妥钠麻醉小鼠,沿第2~3肋间水平切开皮肤,依次分离肌肉及软组织,游离胸主动脉,将7-0手术缝线穿过主动脉,将去尖的27号针头连同主动脉一起结扎,然后立即抽出针头,造成主动脉70%狭窄后,逐层缝合切口。假手术组只在分离主动脉后穿过一条短丝线,不作结扎,其他手术步骤同模型组。

Zileuton购自南京康满林生物科技有限公司,纯度98%,每次使用前用0.5%羧甲基纤维素溶液制成新鲜悬液。药物干预组Zileuton 70mg/kg灌胃,每天1次,术后1周开始,持续至术后7周取材,对照组同时给予等容量溶媒灌胃。

3. 心脏超声检测:术后8周做心脏超声检测。异氟烷吸入性麻醉小鼠,将小鼠左胸前区剃毛,涂抹耦合剂,取左侧卧位或仰卧位对小鼠行超声检查。采用高频超声诊断仪(My lab 30,意大利 Esaote 公司),频率为15MHz,选取标准左心室乳头肌短轴切面,测量

小鼠心率(HR)、舒张末期左室内径(LVEDD)、左心室后壁厚度(LVPWD)、室间隔厚度(IVSD)、射血分数(EF)。每组小鼠采集10只小鼠的数据。

4. 组织病理学检测:术后8周取材。取出心脏和肺脏,用滤纸吸干血液后分别称重,计算心脏重量与体重的比值(HW/BW),肺脏重量与体重的比值(LW/BW)。每组各取8个心脏加入10倍量4%多聚甲醛固定后24h后,将小鼠心脏放于翻拍板上用照相机(尼康D700)拍大体心脏。将拍完后的心脏脱水、石蜡包埋、切片。其中部分组织切片($n=8$)留作心肌胶原天狼星红染色;另一部分组织切片进行常规HE染色($n=8$)。

5. 统计学方法:采用SPSS 14.0统计学软件对数据进行统计分析,所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组之间的比较用两独立样本 t 检验;多组之间的比较用多因素方差分析以及 $post\ hoc\ Tukey$ 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Zileuton抑制了压力负荷诱导的小鼠心肌重构和心功能下降:超声结果显示,Zileuton干预使AB-Zil组小鼠射血分数(EF)下降程度较AB-Veh组明显缓解,并抑制了舒张末期室间隔厚度(IVSd)和左心室后壁厚度(LVPWd)的增加,同时使左心室舒张末内径(LVDd)缩小,改善了由压力负荷诱导的心肌重构和心功能下降(图1,图2),差异有统计学意义($P<0.05$)。

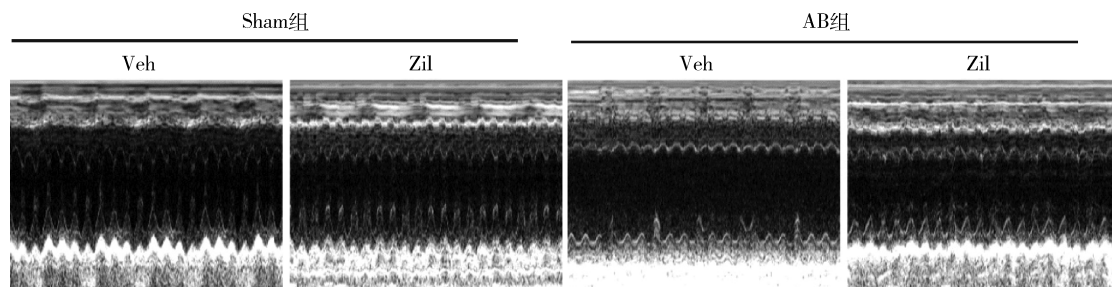


图1 各组小鼠心脏超声影像比较

2. Zileuton改善了压力负荷诱导的小鼠心肌细胞肥大和心肌纤维化:取材结果显示,Zileuton干预的心肌重构模型组(AB-Zil组)小鼠心重、肺重、心重/体重比,肺重/体重比均较对照组(AB-Veh组)小鼠减轻,差异有统计学意义($P<0.05$)。同时各组小鼠体重没有明显差异(图3)。病理学检测显示,Zileuton明显缓解了压力负荷诱导的心肌重构,包括心肌细胞肥大和心肌纤维化(图4)。

讨 论

在本项研究中,笔者发现,5-LOX特异性抑制剂Zileuton能够抑制压力负荷诱导的小鼠心肌重构和心功能下降,包括改善射血分数,使舒张末期左心室扩大程度减少,缓解了舒张末期室间隔和左心室后壁的增厚。Zileuton对心肌重构的抑制作用通过取材结果得到进一步证实,Zileuton干预组小鼠心重、肺重、心重/体重比、肺重/体重比均较对照组小

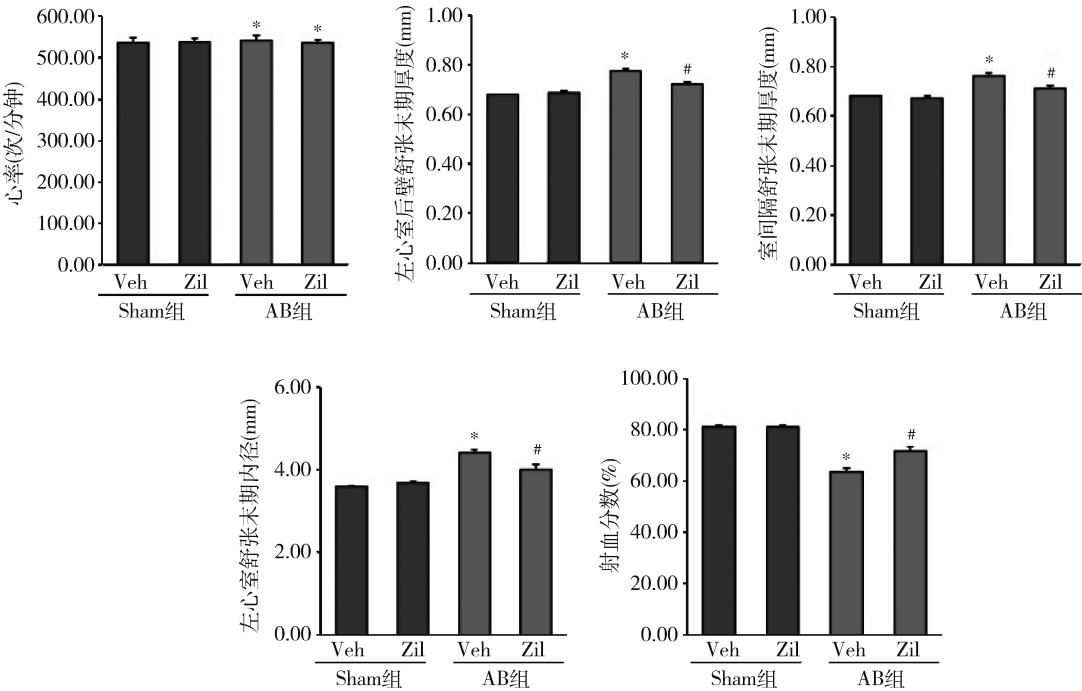


图2 Zileuton 干预对压力负荷诱导小鼠左心室结构和心功能改变的影响
与 Sham - Veh 组小鼠比较, * $P < 0.05$; 与 AB - Veh 组小鼠比较, # $P < 0.05$; $n = 10$

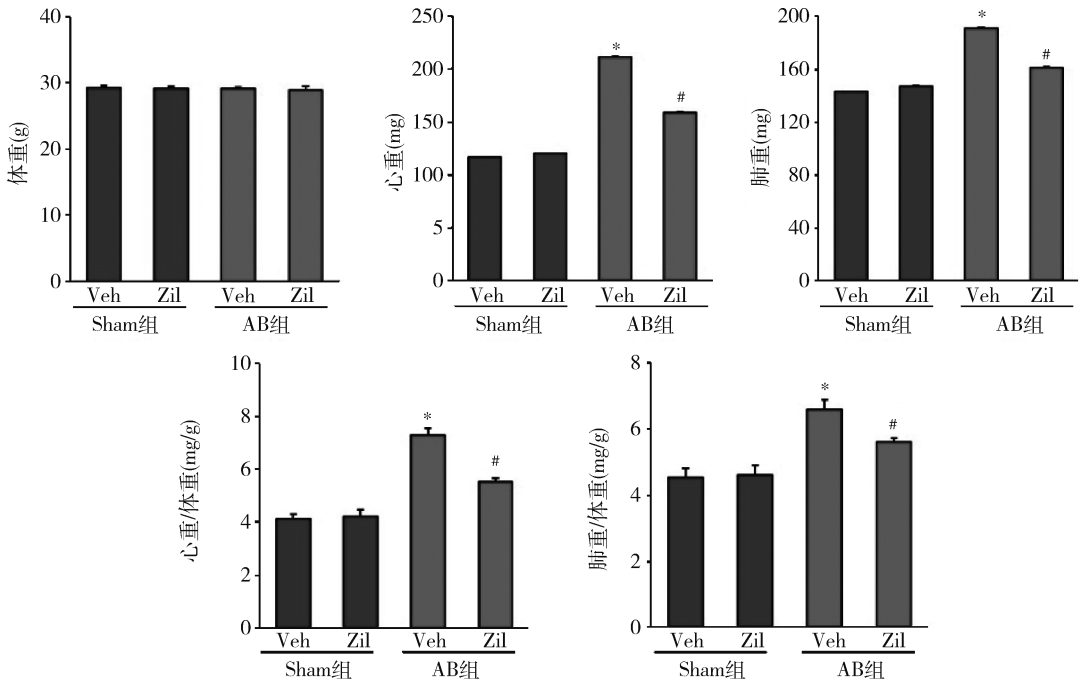


图3 Zileuton 干预对压力负荷诱导小鼠心重和肺重变化的影响
与 Sham - Veh 组小鼠比较, * $P < 0.05$; 与 AB - Veh 组小鼠比较, # $P < 0.05$; $n = 15$

鼠减轻。心肌 HE 染色和天狼星红染色也显示 Zileuton 使单个心肌细胞横截面积和心肌组织胶原沉积的增加均被抑制。

5 - LOX 属于氧化还原酶,是一种含非血红素铁

的蛋白质,其经典作用是白三烯(leukotrienes, LTs)合成的限速酶^[4]。细胞膜磷脂在磷脂酶的作用下生成花生四烯酸(arachidonic acid, AA),5 - LOX 催化花生四烯酸氧化生成不稳定的中间产物 5 - 羟基二十

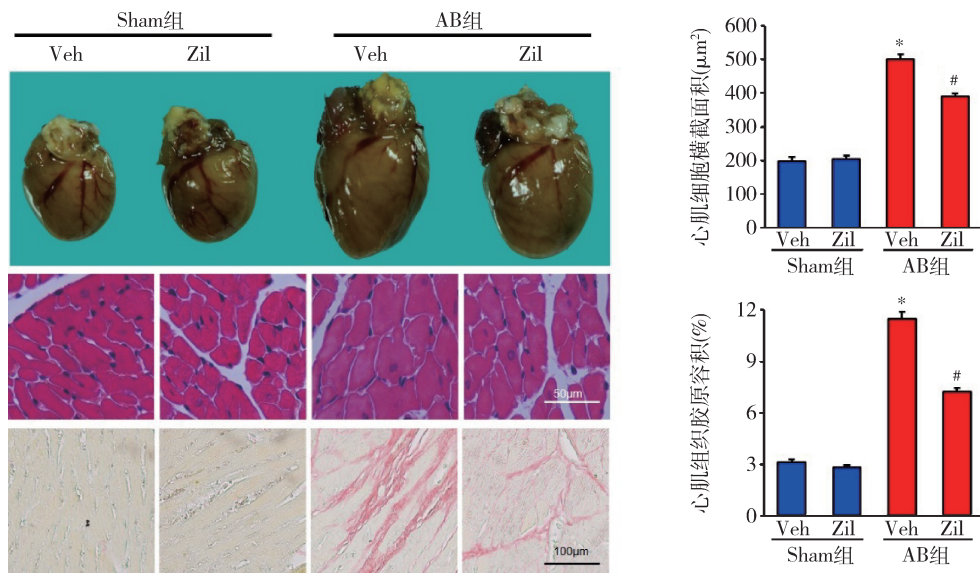


图4 病理学大体观察以及左心室 HE 染色 (×400) 和天狼星红染色 (×200) 结果

与 Sham - Veh 组小鼠比较, * $P < 0.05$; 与 AB - Veh 组小鼠比较, # $P < 0.05$; $n = 8$

碳四烯酸 (5 - hydroxyeicosate - traenoic acid, 5 - HETE); 随后, 5 - HETE 继续在 5 - LOX 催化下, 生成 LTA₄; 不稳定的 LTA₄ 在 LTA₄ 水解酶作用下形成 LTB₄ (leukotriene B₄, LTB₄), 在 LTC₄ 合成酶作用下形成白三烯 C₄ (leukotriene C₄, LTC₄), LTC₄ 被主动转运出细胞后, 在 α - 谷氨酰转肽酶的作用下转化为白三烯 D₄ (leukotriene D₄, LTD₄), LTD₄ 再进一步代谢为白三烯 E₄ (leukotriene E₄, LTE₄)^[8]。LTB₄、LTC₄、LTD₄、LTE₄ 均为白三烯家族成员, 作为趋化因子参与免疫应答。

此外, 5 - LOX 能够促进活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成, 激活相关信号通路, 加重组织氧化应激损伤, 加速疾病发展^[9-11]。高浓度的高金雀花碱能够激活原代肌细胞的 5 - LOX, 使胞内 ROS 产生增加, 同时 NADPH 氧化酶表达上调, Zileuton 能够增加胞内 N - 乙酰半胱氨酸的生成而减少高金雀花碱诱导的 ROS 增加, 缓解原代肌细胞损伤^[12]。同时, 5 - LOX 参与了多种疾病的组织纤维化^[13, 14]。芳香烃受体的配体 TCDD 通过激活 5 - LOX 增加了人原代肺纤维母细胞系 HFL - 1 和 CCL - 202 细胞的迁移和分化, 同时成纤维细胞分化标志物 α - SMA 表达增加, 而选择性 5 - LOX 抑制剂和芳香烃受体特异性拮抗剂 CH223191 均能够减少 HFL - 1 和 CCL - 202 细胞的迁移和增殖以及 α - SMA 表达, 从而缓解肺纤维化^[15]。

Zileuton 是通过抑制白三烯生成, 抑制炎症及免

疫信号通路, 或者是通过改善心肌重构过程中过度激活的氧化应激, 从而抑制心肌重构和改善心功能, 目前并不清楚, 需要进一步探索。但从已得到的表型数据显示, 5 - LOX 有可能成为抑制心肌重构、防治心力衰竭的新靶点。

参考文献

- Metra M, Teerlink JR. Heart failure [J]. Lancet, 2017, 390 (10106): 1981 - 1995
- Das S, Miller M, Beppu AK, et al. GSDMB induces an asthma phenotype characterized by increased airway responsiveness and remodeling without lung inflammation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(46): 13132 - 13137
- Moore GY, Pidgeon GP. Cross - Talk between cancer cells and the tumour microenvironment: the role of the 5 - lipoxygenase pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): E236
- Werz O, Gerstmeier J, Garscha U. Novel leukotriene biosynthesis inhibitors (2012 - 2016) as anti - inflammatory agents [J]. Expert Opin Ther Pat, 2017, 27(5): 607 - 620
- Chu J, Praticò D. The 5 - Lipoxygenase as modulator of Alzheimer's γ - secretase and therapeutic target [J]. Brain Res Bull, 2016, 126 (Pt 2): 207 - 212
- Matsumoto S, Ibrahim R, Grégoire JC, et al. Effect of treatment with 5 - lipoxygenase inhibitor VIA - 2291 (atreleuton) on coronary plaque progression: a serial CT angiography study [J]. Clin Cardiol, 2017, 40(4): 210 - 215
- Tsai MY, Cao J, Steffen BT, et al. 5 - Lipoxygenase gene variants are not associated with atherosclerosis or incident coronary heart disease in the multi - ethnic study of atherosclerosis cohort [J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(3): e002814
- Gelfand EW. Importance of the leukotriene B₄ - BLT1 and LTB₄ -

- BLT2 pathways in asthma [J]. *Semin Immunol*,2017,33: 44 – 51
- 9 Pu S, Ren L, Liu Q, *et al.* Loss of 5 – lipoxygenase activity protects mice against paracetamol – induced liver toxicity [J]. *Br J Pharmacol*,2016,173(1): 66 – 76
 - 10 Brogliato AR, Moor AN, Kesl SL, *et al.* Critical role of 5 – lipoxygenase and heme oxygenase – 1 in wound healing [J]. *J Invest Dermatol*,2014,134(5): 1436 – 1445
 - 11 Porter KM, Kang BY, Adesina SE, *et al.* Chronic hypoxia promotes pulmonary artery endothelial cell proliferation through H2O2 – induced 5 – lipoxygenase [J]. *PLoS One*,2014,9(6): e98532
 - 12 Chen W, Lin YC, Ma XY, *et al.* High concentrations of genistein exhibit pro – oxidant effects in primary muscle cells through mechanisms involving 5 – lipoxygenase – mediated production of reactive oxygen species [J]. *Food Chem Toxicol*,2014,67: 72 – 79
 - 13 Blömer N, Pachel C, Hofmann U, *et al.* 5 – Lipoxygenase facilitates healing after myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*,2013,108(4): 367
 - 14 Xiao R, Yoshida N, Higashi Y, *et al.* Retinoic acids exhibit anti – fibrotic activity through the inhibition of 5 – lipoxygenase expression in scleroderma fibroblasts[J]. *J Dermatol*,2011,38(4): 345 – 353
 - 15 Su HH, Lin HT, Suen JL, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor – ligand axis mediates pulmonary fibroblast migration and differentiation through increased arachidonic acid metabolism[J]. *Toxicology*,2016,370: 116 – 126
- (收稿日期:2018 – 05 – 29)
(修回日期:2018 – 05 – 31)

MDR1 基因多态性与胃癌顺铂化疗疗效的相关性

韩忠诚 苏 莹 陆佳伟 冯燕艳 柳 江

摘 要 **目的** 研究多药耐药基因 MDR1 C3435T 基因多态性与胃癌患者对顺铂化疗疗效的关系。**方法** 选取 102 例经病理学确诊的胃癌患者进行顺铂方案的化疗,通过采集患者外周静脉血提取基因组 DNA 并测序分析,检测 MDR1 C3435T 基因多态性并分析基因多态性与患者化疗疗效及生存预后的关系。**结果** 102 例胃癌患者中,MDR1 C3435T C/C 基因型患者 40 例(39.2%),C/T 基因型患者 29 例(28.4%),T/T 基因型患者 33 例(32.4%),其中,C/C 基因型患者的完全缓解率 CR 为 3.9%,部分缓解率 PR 为 23.6%,有效治疗率 CR + PR 为 27.6%,明显高于 C/T(CR = 1%, PR = 2%, CR + PR = 3%)和 T/T(CR = 0, PR = 9.8%, CR + PR = 9.8%)基因型患者。与 MDR1 C3435T C/T 和 T/T 基因型患者相比,C/C 基因型患者的无进展生存时间(PFS)和总生存时间(OS)更长(PFS: $P = 0.046$; OS: $P = 0.011$)。Log – rank 和 COX 多因素回归模型证实 MDR1 C3435T 基因多态性是影响顺铂化疗的胃癌患者生存的独立预后因素(PFS: HR = 3.488, $P = 0.005$; OS: HR = 2.418, $P = 0.035$)。**结论** MDR1 基因 C3435T 位点多态性与胃癌患者对顺铂化疗疗效和生存预后相关。

关键词 MDR1 胃癌 基因多态性 顺铂

中图分类号 R735.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.008

Relationship between MDR1 Gene Polymorphism and Chemotherapy Efficacy of Gastric Cancer with Cisplatin. Han Zhongcheng, Su Ying, Lu Jiawei, *et al.* Oncology Department, The Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Xinjiang 830000, China

Abstract Objective To study the relationship between the polymorphism of MDR1 C3435T gene and the efficacy of cisplatin chemotherapy in patients with gastric cancer. **Methods** Totally 102 patients with gastric cancer confirmed by pathology were treated with cisplatin chemotherapy. The genomic DNA was extracted from peripheral blood of patients and sequenced. The polymorphism of MDR1 C3435T gene was detected and the relationship between gene polymorphism and chemotherapy efficacy and survival prognosis was analyzed. **Results** Among the 102 gastric cancer patients with MDR1 C3435T, 40 cases (39.2%) were C/C genotypes, 29 cases (28.4%) were C/T genotype, 33 cases (32.4%) were T/T genotype. The complete remission rate(CR), partial remission rate(PR), and CR + PR of C/C genotypes were 3.9%, 23.6% and 27.6%, which were higher C/T genotypes(CR = 1%, PR = 2%, CR + PR = 3%) and T/T genotypes(CR = 0, PR = 9.8%, CR + PR = 9.8%). Compared with the MDR1 C3435T C/T and T/T genotype, the progression free survival time (PFS) and the total survival time (OS) of the C/C genotype patients were longer (PFS: $P = 0.046$; OS: $P = 0.011$). Log – rank and COX multivariate regression models confirm that MDR1 C3435T gene polymorphism is an independent prognostic

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81660514)

作者单位:830000 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院肿瘤科(韩忠诚、苏莹、柳江),皮肤科(冯燕艳);215006 苏州大学附属第二医院肿瘤放射治疗科(陆佳伟)

通讯作者:柳江,主任医师,电子信箱:dempseywell@163.com