

脑钠肽对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的影响及作用机制

刘帅焯¹, 周越³, 何昕¹, 黄艺仪², 陈艺莉¹, 何建桂¹

(1. 中山大学附属第一医院心内科//卫生部辅助循环重点实验室, 2. 中山大学附属第一医院重症医学科, 广东广州 510080; 3. 北京协和医学院//中国医学科学院 国家心血管病中心 阜外医院, 北京 100000)

摘要:【目的】探讨脑钠肽(BNP)对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的影响和作用机制。【方法】用编码人源性脑钠肽(hBNP)基因的腺相关病毒(AAV9)转染 C57/B6J 小鼠促进其体内表达 hBNP, 3 周后行主动脉缩窄术构建压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型。构建模型 4 周后通过超声心动图、心脏及肺脏质量比值来检测心脏功能及结构变化, 并使用 Q-PCR 技术来检测心肌肥厚标志物(ANP)mRNA 水平。通过免疫荧光技术观察心肌组织内毛细血管的变化, Image-J 软件测量毛细血管密度和毛细血管/心肌细胞比值, Q-PCR 和 Western-Blotting 检测心肌组织内血管新生因子(Ang I, VEGFA)mRNA 转录和蛋白表达水平。【结果】AAV9-hBNP 能促进小鼠体内 hBNP 的表达。hBNP 不仅显著改善压力负荷诱导的心力衰竭($P < 0.05$), 且能降低心脏、肺脏质量比值以及肥厚标志物 mRNA 转录水平($P < 0.05$)。hBNP 增加小鼠心力衰竭模型心肌组织内毛细血管以及血管新生因子 mRNA 转录和蛋白表达水平($P < 0.05$)。【结论】BNP 可能通过促进血管新生因子的表达来调控血管新生从而改善压力负荷诱导的心力衰竭。

关键词:脑钠肽;心力衰竭;血管新生;压力负荷;小鼠

中图分类号:Q956 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2018)04-0510-11

Effect of Treatment with BNP on Mice of Heart Failure Induced by Pressure Overload In Vivo

LIU Shuai-ye^{1,3}, ZHOU Yue⁴, HE Xin^{1,3}, HUANG Yi-yi², CHEN Yi-li^{1,3}, HE Jian-gui^{1,3}

(1. Department of Cardiology, 2. Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, 3. Key Laboratory on Assisted Circulation, Ministry of Health, Guangzhou 510080, China; 4. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, Nation Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)
Corresponding to: HE Jian-gui; E-mail: hejiangui@163.com

Abstract: 【Objective】The purpose of this study was to investigate the effect of brain natriuretic peptide (BNP) on mice of heart failure induced by pressure overload in vivo and to clarify the mechanism underlying this effect. 【Methods】C57/B6J mice were transfected with adeno-associated virus (serotype 9, AAV9) encoding the human BNP (hBNP) gene, and the mice of heart failure induced by pressure overload were generated by 3 weeks of aortic banding. After 4 weeks of aortic banding, echocardiography, the ratios of heart weight/body weight (HW/BW) and lung weight/body weight (LW/BW) were used to evaluate the changes of cardiac function and structure, and the mRNA expression level of cardiac hypertrophic marker (ANP) was detected by Q-PCR. The changes of cardiac capillaries were observed by immunofluorescence staining, and the ratio of capillary/myocyte and capillaries density were determined by Image-J software. The mRNA and protein expression of cardiac angiogenesis factors (VEGFA, Ang I) were examined by Q-PCR and Western blotting. 【Result】Our data showed that AAV9-hBNP notably promoted overexpression of hBNP in mice. Treatment with hBNP not only significantly improved heart failure induced by pressure overload ($P < 0.05$), but also decreased the ratios of HW/BW and LW/BW as well as the mRNA expression level of hypertrophic marker ($P < 0.05$).

收稿日期:2018-03-27

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313019, 2017A030313795);广州市科技计划项目(201707010124)

作者简介:刘帅焯, 硕士研究生, 研究方向:心脏内分泌与心力衰竭, E-mail: 243775989@qq.com; 何建桂, 通信作者, E-mail: hejiangui@163.com

Furthermore, Treatment with hBNP increased cardiac angiogenesis and the mRNA and protein expression level of angiogenesis factors in mice of heart failure ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Treatment with BNP can improve pressure overload-induced heart failure by regulating angiogenesis through promoting the expression of angiogenesis factors.

Key words: BNP; heart failure; angiogenesis; pressure overload; mice

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(4):510-520]

心力衰竭(heart failure, HF)是心脏对其容量、压力超负荷以及心肌损伤的一种失代偿终末期反应,主要表现为心室扩大、心功能受损以及心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)等胚胎基因表达^[1]。心力衰竭主要是各种心脏结构或功能性疾病(如高血压,心肌梗死和冠状动脉疾病等)所导致的心室充盈和(或)射血分数受损,也是全世界心血管病死亡最常见的原因之一^[1-2]。心肌肥厚是心力衰竭的发生发展过程中的主要代偿机制之一^[3]。在压力负荷刺激心肌肥厚的早期,心肌组织内血管新生正常或增加,有助于保持心功能和维持代偿性心肌肥厚;随着压力负荷的持续增加,心室重构显著加重,心肌组织内血管新生下降,引起心肌组织慢性缺氧、心肌细胞损伤以及心功能下降,最终促使代偿性心肌肥厚向失代偿性心力衰竭转变^[4-5]。因此,血管新生减少是导致心力衰竭发生发展的重要机制,但目前其准确的分子机制还未完全阐明。脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)是心室肌细胞在生理和病理条件下产生的一种内源性肽,具有利尿、利钠、舒张血管、拮抗交感神经和调节血管新生等生物学效应^[6]。我们以往的研究表明BNP可以抑制心肌肥厚^[6]、心肌梗死后的心室重塑和心功能恶化^[7]。但关于BNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的作用和机制还未见报道。另外,在肿瘤组织等血管过度生长的疾病中,BNP可以抑制内皮细胞生长从而抑制肿瘤的发生发展^[8]。但在一些血管新生不足的情况下,BNP又可以促进组织的血管新生^[2,9]。在心力衰竭中,BNP如何调控血管新生以及BNP是否通过调控血管新生对心力衰竭产生作用也未见报道。本研究旨在构建压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型,用编码人源性脑钠肽(human brain natriuretic peptide, hBNP)基因的腺相关病毒(adeno-associated virus, serotype 9, AAV9)转染小鼠促进其体内表达hBNP,通过检测心功能、结构

以及肥厚标志物来观察hBNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的影响,同时检测心肌组织内血管新生的情况来阐明hBNP对心力衰竭可能的作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

SPF级C57/B6J小鼠购于中山大学实验动物中心,6~7周龄,19~20 g,雄性。许可证号:SCXK(粤)2011-0029。SPF级C57/B6J小鼠饲养于中山大学北校区实验动物中心。许可证号:SYXK(粤)2012-0081。实验动物使用方案经过中山大学医学伦理委员审核通过(IACUC-DB-16-0915)。

1.2 主要试剂

AAV9-GFP和AAV9-hBNP(上海恒圆生物科技有限公司);RNA提取试剂盒:Trizol reagent(Sigma);cDNA逆转录试剂盒 Revert Aid(Fermentas);5×SYBG(Roche);普通PCR试剂盒 Dream Tap Green PCR Master Mix(Fermentas);蛋白提取试剂:Rapi(Cell Signaling Technology);蛋白BCA定量试剂盒(Thermo Scientific);hBNP抗体(Abcam);小鼠GAPDH抗体(Cell Signaling Technology);小鼠Ang I抗体(Abcam);HPR标记的二抗(Proteintech);小鼠CD31抗体(Abcam);Cy3标记的荧光二抗(Cell Signaling Technology);其他生化试剂均为进口分装或者国产分析纯。

1.3 主要仪器

PCR仪(MT-Reserch);Q-PCR仪(Rohe480);超微量紫外分光光度计 NanoDrop2000(Thermo Scientific);荧光显微镜(Lexic, DMI8);图像处理分析系统(Image-J);酶标仪(Thermo Scientific);蛋白电泳及转印系统:Mini-PROTEAN(Bio-Rad);荧光,化学发光成像分析系统(ImageQuant

Las4000mini);小动物呼吸机(Kent);超声心动图机(VisualSonics Vevo2100)。

1.4 实验方法

1.4.1 腺相关病毒转染 C57/B6J 小鼠 将 SPF 级 C57/B6J 小鼠随机分成 3 组:生理盐水(control)组,携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的 AAV9(AAV9-GFP)对照组,携带 GFP 和 hBNP 基因的 AAV9(AAV9-hBNP)处理组。按照文献的方法,根据实验目的将 AAV9-GFP 对照病毒液和 AAV9-hBNP 病毒液分别用生理盐水稀释成 1.0×10^{12} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度后,再根据实验分组将生理盐水或 AAV9-GFP 和 AAV9-hBNP 分别尾静脉注射小鼠,注射体积为 150 μL 。

1.4.2 建立压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型 将 AAV9-GFP 和 AAV9-hBNP 分别转染小鼠 3 周后,每组均随机分成假手术组以及手术组。采用主动脉缩窄(aortic banding, AB)术构建压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型。手术组术前禁食物,自由饮用,1.5%戊巴比妥钠 75 mg/kg 腹腔注射麻醉,皮肤用碘酊消毒。将小鼠左侧卧位于手术台固定,于左侧第二,三肋间行垂直切口,切口约 1.5~2.0 cm,钝性分离胸主动脉,于胸主动脉弓部下方 0.5 cm 处将胸主动脉挑起,平行放置 26 号注射器钝性针头,结扎,抽出针头,使胸主动脉部分缩窄,确认无出血后,关闭胸腔。假手术组于胸主动脉弓部下方 0.5 cm 处挑起胸主动脉后,只穿线不结扎,余同手术组。术后禁食 6 h,自由饮水,逐渐恢复正常饮食。

1.4.3 超声心动图分析 术后第 4 周,采用吸入性麻醉剂异氟烷轻度麻醉小鼠,在小鼠自主呼吸的情况下应用 30 MHz 的超声探头进行超声心动图检测。在二维模式下找到心室乳头肌水平,转换至 M 模式,测量缩短分数(FS%)、射血分数(EF%)、左心室舒张末期内径(LVEDd)、左心室收缩末期内径(LVED)和左室舒张末期后壁厚度(LVPWd)。

1.4.4 心脏、肺脏质量比值 术后第 4 周,颈椎脱臼处死小鼠后取出心脏和肺脏,剪去心脏根部大血管后,用无菌纱布将心脏中残余的血液清洁干净,称量心脏和肺脏质量,测量左侧后肢胫骨长度,计算心脏质量/术前体质量的比值(HW/BW, mg/g)、心脏质量/胫骨长度的比值(HW/TL, mg/mm)、肺脏质量/术前体质量的比值(HW/BW, mg/

g)、肺脏质量/胫骨长度的比值(HW/TL, mg/mm)作为评价心肺功能的参数。

1.4.5 Q-PCR 检测心肌内 hBNP、心肌肥厚标志物和血管新生因子的 mRNA 水平 Trizo 法提取心脏总 RNA,经超微量紫外分光光度计测定核酸浓度及纯度。按照说明书利用随机引物进行 cDNA 合成,取一定量的 cDNA 和特异性的引物使用 Q-PCR 仪(Roche)进行目的基因扩增。引物序列如下。human BNP: Forward 5'-AAGATGGTGCAAGGGTCTGG-3', Reverse 5'-GGCCACTGGAGGAGCTGA-3'; mouse BNP: Forward 5'-GCTGTAACGCACTGAAGTTGT-3', Reverse 5'-ATCACTTCAAAGGTGTCCAG-3'; mouse ANP: Forward 5'-GTGTCACCCACAACGTGC-3', Reverse 5'-AGGGCCACATAGCACAGC-3'; vascular endothelial growth factor A (VEGFA): Forward 5'-TATTCAGCGGACTCACCAGC-3', Reverse 5'-AACCAACCTCCTCAAACCGT-3'; angiogenin I (Ang I): Forward 5'-GGTGTITTTGCTAAAGGGAGGA-3', Reverse 5'-GCTTCCATCTTCCCCTGTT-3'; GAPDH: Forward 5'-GTTGTCTCCTGCGACTTCAAC-3', Reverse 5'-GCTGTAGCCGTATTCATTGTCA-3'。扩增条件:首次循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,其后 45 个循环:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s。结果以 GAPDH 为内参,基因表达倍数的改变表示。

1.4.6 Western blotting 检测 hBNP 和血管新生因子的蛋白表达 术后第 4 周,取小鼠心脏组织研磨并提取蛋白,提取出的蛋白液利用 BCA 试剂盒测定其浓度。取 20~30 μg 蛋白,在 6%~12%的 SDS-PAGE 进行凝胶电泳,然后以恒流 250 mA, 150 min 转印至 PVDF 膜,再使用 5%BSA 室温下封闭 1 h,结合按目标的分子质量大小将封闭好的 PVDF 膜切开,孵育以相应的抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(GAPDH 1:1 000; human BNP 1:1 000; VEGFA 1:1 000; Ang I 1:1 000)孵育过夜后以 0.1%TBST 洗膜,而后加入相应 HRP 标记二抗于室温孵育 1 h,再次使用 TBST 洗膜,使用 ECL 试剂发光并使用 x 线胶片记录。结果以 GAPDH 为内参,使用 Quantity One 软件分析。

1.4.7 免疫荧光法观察心肌组织内毛细血管 术后第 4 周,用 10%KCl 溶液将心脏收集并固定于 40 g/L 的多聚甲醛溶液中。将左心室组织的横切片包埋于 OCT 中,在心脏中央的乳头肌水平切下

6 μm 厚的冰冻切片并固定于玻片上。PBS清洗3次后使用0.1%的Triton X-100处理10 min。PBS清洗3次后以10% BSA封闭1 h 30 min后使用小鼠的CD31特异性一抗(1:50) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。孵育过夜后使用PBS清洗3次加入Cy3标记的荧光二抗(1:100)室温避光孵育1 h 30 min后,再次使用PBS清洗3次,接着使用DAPI染细胞核(1:1 000) 10 min,最后PBS清洗3次后取出玻片,在荧光显微镜(Lacix; DMi8) 20 \times 20倍下拍摄图像以观察毛细血管。为了确定毛细血管/心肌细胞比值(capillary/myocyte)和毛细血管密度(capillaries/ mm^2),我们随机选取了12个视野,并采用图像分析软件Image-J进行计算。

1.5 统计学处理

全部实验均独立重复至少3次,实验数据使用SPSS 13.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差表示($\bar{x} \pm s$),两组间均数差异性检验采用 t -test,多组间均数差异性检验采用单因素方差分析(one-way ANOVA),再采用Post Hoc多重检验方法进行两两检验,定义 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hBNP在C57/B6J小鼠体内的表达

为明确AAV9病毒载体是否成功转染C57/B6J小鼠,我们选用生理盐水(control)和携带GFP基因的AAV9-GFP对照病毒液分别转染小鼠,3周后取心脏组织制作冰冻切片。与control组相比,AAV9-GFP组小鼠的心肌组织于荧光显微镜下可见心肌细胞呈自发绿色荧光,说明AAV9载体成功转染心肌组织(图1A)。

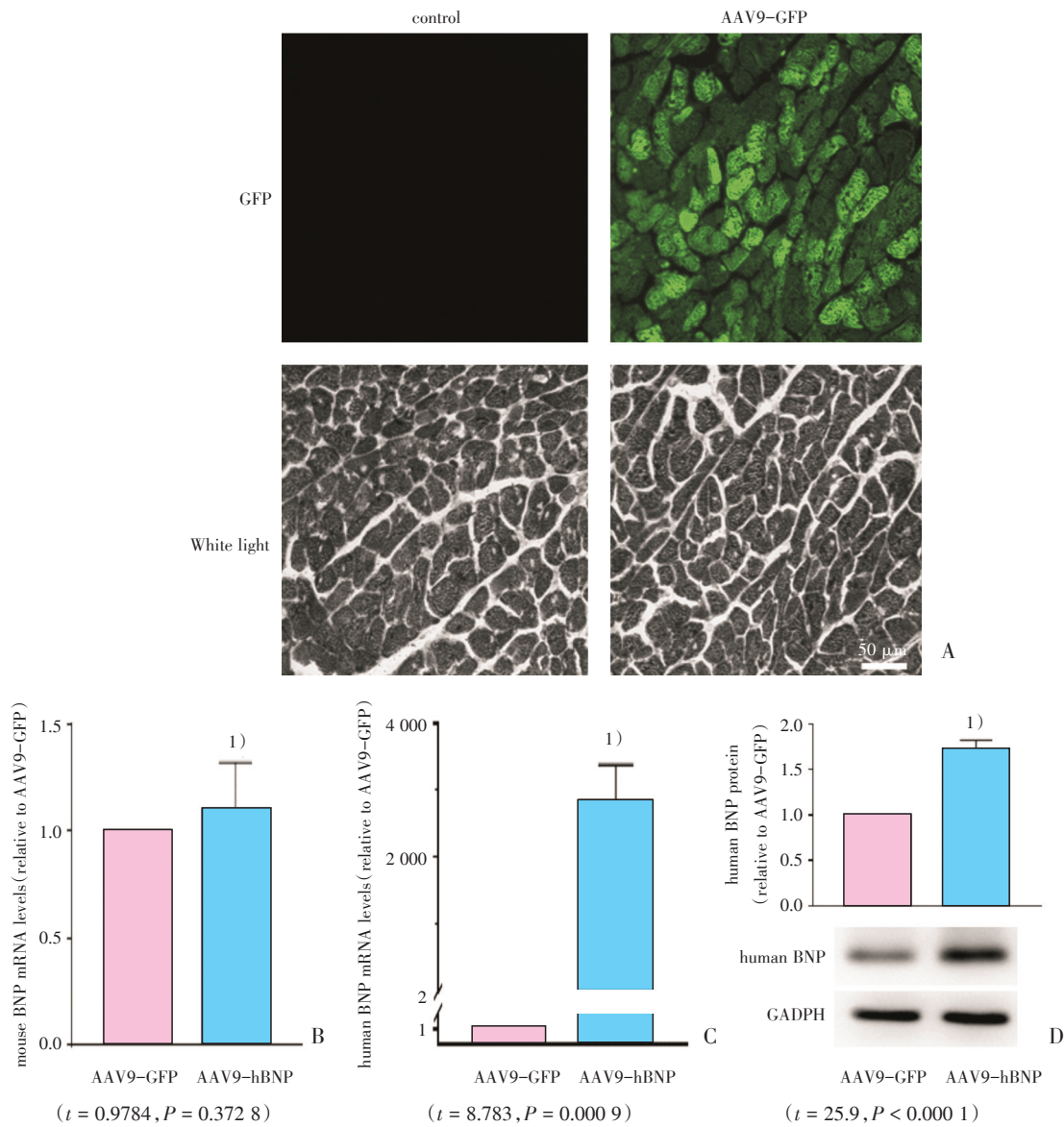
在心力衰竭发生发展的过程中,鼠源性mouse BNP(mBNP)基因转录被激活,作为心力衰竭标志物之一鼠源性mBNP蛋白会增加^[10],所以我们通过AAV9转染系统编码人源性hBNP基因以区分鼠源性mBNP。为了解hBNP在小鼠体内mRNA转录和蛋白表达,在AAV9-GFP对照病毒液和AAV9-hBNP病毒液分别转染小鼠3周后,我们检测了2组小鼠心肌组织内鼠源性mBNP和人源性hBNP的mRNA转录与蛋白表达的水平。首先,我们观察到AAV9-GFP对照组与AAV9-hBNP处理组鼠源性mBNP的mRNA转录水平未见明显

变化说明通过AAV9转染入体内的人源性hBNP不影响鼠源性mBNP的表达(图1B)。接着,我们观察到在AAV9-GFP对照组中hBNP的mRNA转录和蛋白几乎不表达(图1C、D, $P < 0.05$),而Q-PCR检测AAV9-hBNP处理组中hBNP的mRNA转录水平增加超过3000倍(图1C, $P < 0.05$),Western Blotting检测该组中hBNP蛋白表达水平增加超过1.7倍(图1D, $P < 0.05$)。以上hBNP的mRNA转录及蛋白表达水平的改变提示我们通过AAV9-hBNP转染的方法在小鼠体内成功地实现了hBNP的表达。

2.2 BNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的影响

2.2.1 心脏超声的改变 为了解BNP对小鼠心力衰竭模型的心功能不全和心室扩张的作用,在假手术(sham)或主动脉缩窄(AB)术后第4周,我们分析不同术式后AAV9-GFP对照组与AAV9-hBNP处理组的超声心动图参数。与sham对照组相比,AB对照组的缩短分数(FS%)和射血分数(EF%)明显降低(图2A-C, $P < 0.05$),左心室舒张末期内径(LVEDd)、左心室收缩末期内径(LVEDs)和左室舒张末期后壁厚度(LVPWd)明显增加(图2D-F, $P < 0.05$)。与AB对照组相比,AB术后的AAV9-hBNP处理明显增加缩短分数(FS%)和射血分数(EF%),提示小鼠心力衰竭模型的心功能有所改善(图2B、C, $P < 0.05$); AB术后的AAV9-hBNP处理组的左心室舒张末期内径(LVEDd)、左心室收缩末期内径(LVEDs)和左室舒张末期后壁厚度(LVPWd)也减少(图2D-F, $P < 0.05$),这提示小鼠心力衰竭模型的心室扩张得到改善。

2.2.2 心脏、肺脏质量比值以及心肌肥厚标志物的改变 为评价BNP对小鼠心力衰竭模型的心室重构以及肺水肿的影响,在sham或AB术后第4周,我们分析不同术式后AAV9-GFP对照组与AAV9-hBNP处理组的心脏、肺脏质量比值以及心肌肥厚标志物(ANP)的改变。与sham对照组相比,AB对照组的心脏质量/术前体质量(HW/BW)、心脏质量/胫骨长度(HW/TL)、肺脏质量/术前体质量(LW/BW)、肺脏质量/胫骨长度(LW/TL)和ANP的mRNA转录水平显著增加(图3A-E, $P < 0.05$)。与AB对照组相比,AB术后的AAV9-hBNP处理降低HW/BW、HW/TL和ANP的mRNA



A: A representative alteration of green fluorescent protein (GFP) expressed by AAV9-GFP in hearts of C57/B6J mice at 3 weeks after transfection. Scale bar = 50 μm . B, C: Q-PCR analysis of the mRNA expression levels of mouse BNP and human BNP in C57/B6J mice transfected with AAV9-GFP or AAV9-hBNP at 3 weeks, respectively. D: Representative Western blot and a semi-quantification of human BNP and GAPDH levels in hearts of C57/B6J mice transfected with AAV9-GFP or AAV9-hBNP at 3 weeks. GAPDH was used as an internal control. 1) $P < 0.05$ vs AAV9-GFP group. $n = 8$.

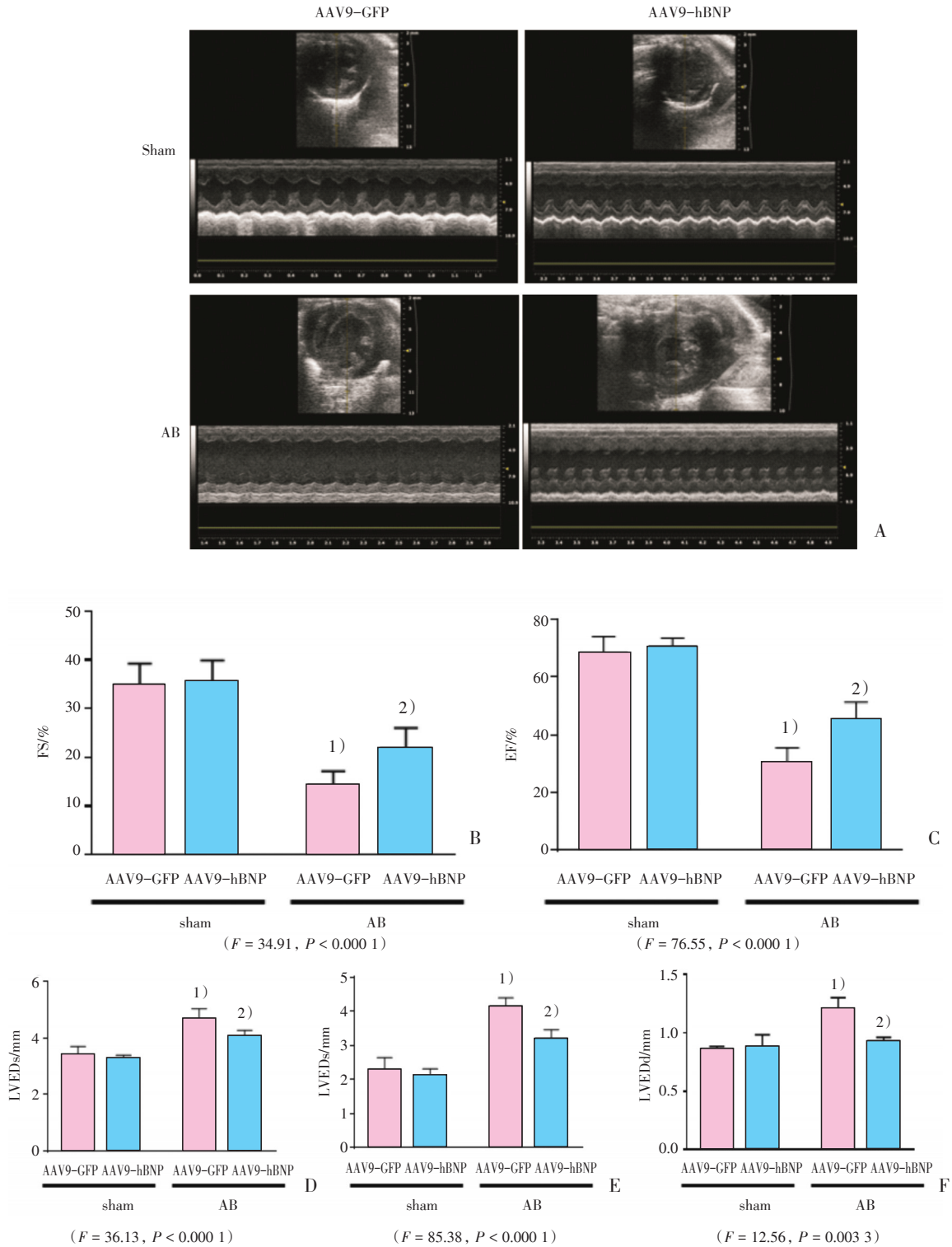
图1 hBNP在AAV9-hBNP转染C57/B6J小鼠心肌组织内的表达

Fig.1 Expression of hBNP in hearts of C57/B6J mice transfected with AAV9-hBNP

转录水平等指标说明小鼠心力衰竭模型的心室重构得到改善(图3A-B、E, $P < 0.05$)。同时,与AB对照组相比,可以观察到AB术后的AAV9-hBNP处理组的LW/BW和LW/TL也明显下降(图3C、D, $P < 0.05$),说明心力衰竭所致的肺水肿也得到了缓解。

2.3 BNP对小鼠心力衰竭模型心肌组织内血管新生的作用

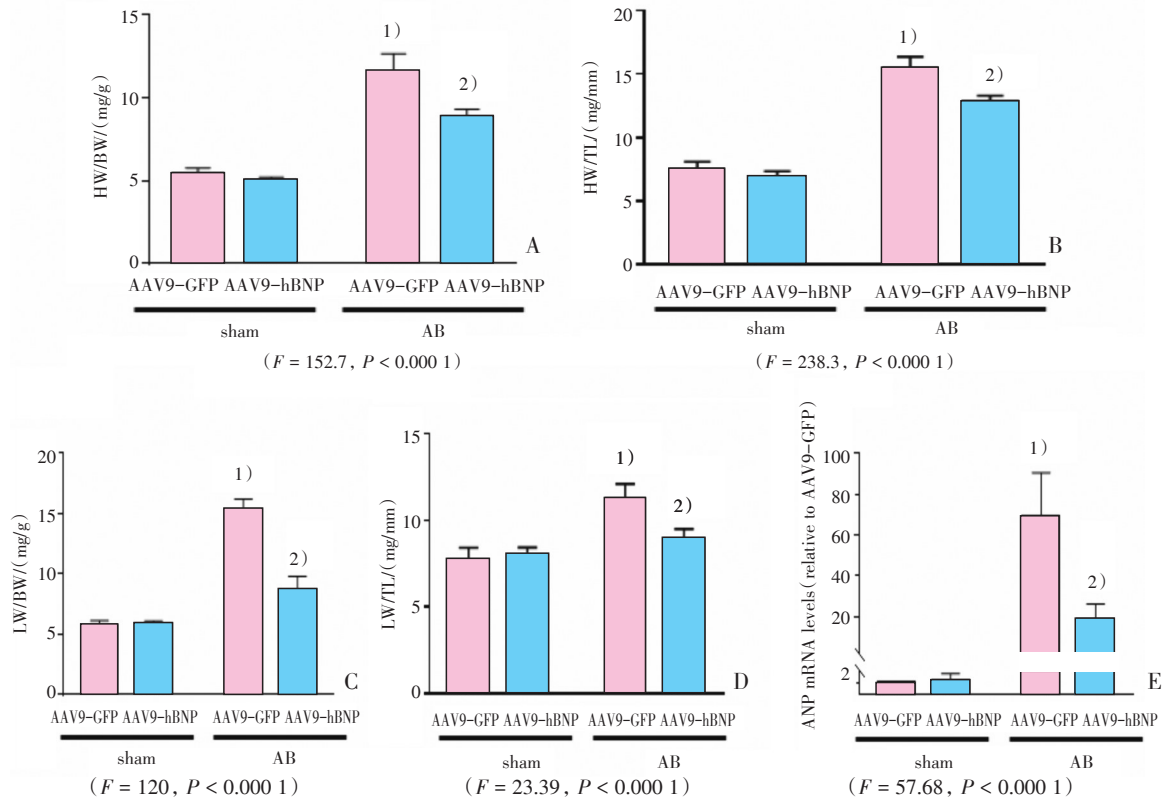
2.3.1 毛细血管的改变 为了探索BNP改善心力衰竭的机制是否与心肌内血管新生有关,在sham或AB术后第4周,我们检测不同术式后AAV9-GFP对照组与AAV9-hBNP处理组的心肌组织内



A: Echocardiographic assessments in hearts of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery. B-F: The fractional shortening (FS)%, ejection fraction (EF)%, left ventricular end-diastolic diameter (LVEDd), left ventricular end-systolic diameter (LVEDs) and left ventricular end-diastolic posterior wall thickness (LVE/Dd) of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery, respectively. 1) $P < 0.05$ vs sham + AAV9-GFP group; 2) $P < 0.05$ vs AB + AAV9-GFP group. $n = 5 \sim 7$.

图2 hBNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型的心功能和心室结构的作用

Fig.2 Effect of hBNP treatment on cardiac function and ventricular structure in mice of pressure overload-induced heart failure



A-D: The ratios of heart weight/body weight (HW/BW), heart weight/tibia length (HW/TL), lung weight/body weight (LW/BW), lung weight/tibia length (LW/TL) of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery, respectively. E: Q-PCR analysis of the mRNA expression level of cardiac hypertrophic maker mouse ANP in hearts of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery. 1) $P < 0.05$ vs sham + AAV9-GFP group; 2) $P < 0.05$ vs AB + AAV9-GFP group. $n = 5 \sim 7$.

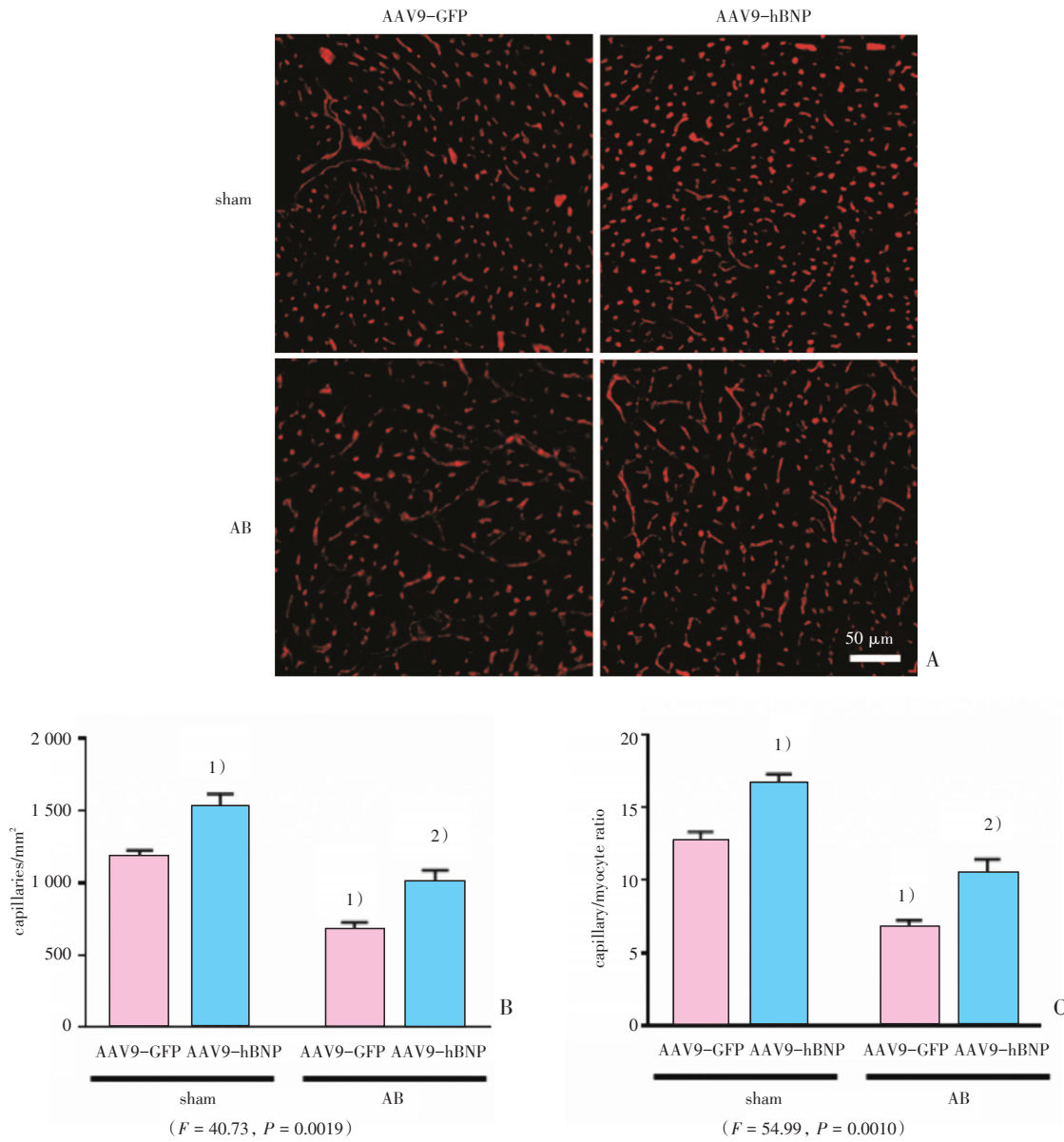
图3 hBNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型的心室重构和心肌肥厚的作用

Fig.3 Effect of hBNP treatment on ventricular remodeling and hypertrophy in mice of pressure overload-induced heart failure

毛细血管密度 (capillaries/mm²) 和毛细血管/心肌细胞比值 (capillary/myocyte)。首先, 我们评价心肌组织内血管新生与心力衰竭的关系。与 sham 对照组相比, AB 对照组的心肌组织内毛细血管密度与毛细血管/心肌细胞比值明显降低 (图 4A-C, $P < 0.05$)。接着, 我们了解 hBNP 对小鼠心力衰竭模型心肌组织内血管新生的作用。与 AB 对照组相比, AB 术后 hBNP 处理组的心肌组织内毛细血管密度和毛细血管/心肌细胞比值明显上调 (图 4A-C, $P < 0.05$)。我们的实验结果表明心肌组织内血管新生的改变与心功能不全及心室重构的改善呈现出一致性, 这提示 hBNP 改善心力衰竭的机制与血管新生的上调有关。另外, 我们还发现与 sham 对照组相比, sham 术后 hBNP 处理组的心肌组织内毛细血管密度与毛细血管/肌细胞比值也明显上调 (图 4A-C, $P < 0.05$), 这表明无论在正

常小鼠还是心力衰竭的小鼠中, hBNP 都能促进心肌组织内的血管新生。

2.3.2 血管新生因子的改变 为了进一步确认 BNP 与血管新生的关系, 在 sham 或 AB 术后第 4 周, 我们检测不同术式后 AAV9-GFP 对照组与 AAV9-hBNP 处理组的心肌组织内血管新生因子 (Ang I, VEGFA) 的表达水平。与 sham 对照组对比, AB 对照组心肌组织内 Ang I 和 VEGFA 的 mRNA 转录与蛋白表达水平明显下调 (图 5A-D, $P < 0.05$)。与 AB 对照组相比, AB 术后 hBNP 处理组心肌组织内 VEGFA 和 Ang I 的 mRNA 转录以及蛋白表达水平明显上调 (图 5A-D, $P < 0.05$), 进一步提示 hBNP 可能通过促进血管新生因子的表达来调控血管新生, 从而改善小鼠心力衰竭。同样, 我们观察到与 sham 对照组相比, sham 术后 hBNP 处理组的心肌组织内 VEGFA, Ang I 的表达均也



A: Representative images of CD31-stained capillaries in cardiac sections of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery. Scale bar = 50 μ m. B, C: Quantitative analysis of the ratio of capillary density (capillaries/mm²) and capillary/myocyte in the hearts of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery, respectively. 1) $P < 0.05$ vs sham + AAV9-GFP group; 2) $P < 0.05$ vs AB + AAV9-GFP group. $n = 5 \sim 7$.

图4 hBNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型心肌组织内毛细血管的作用

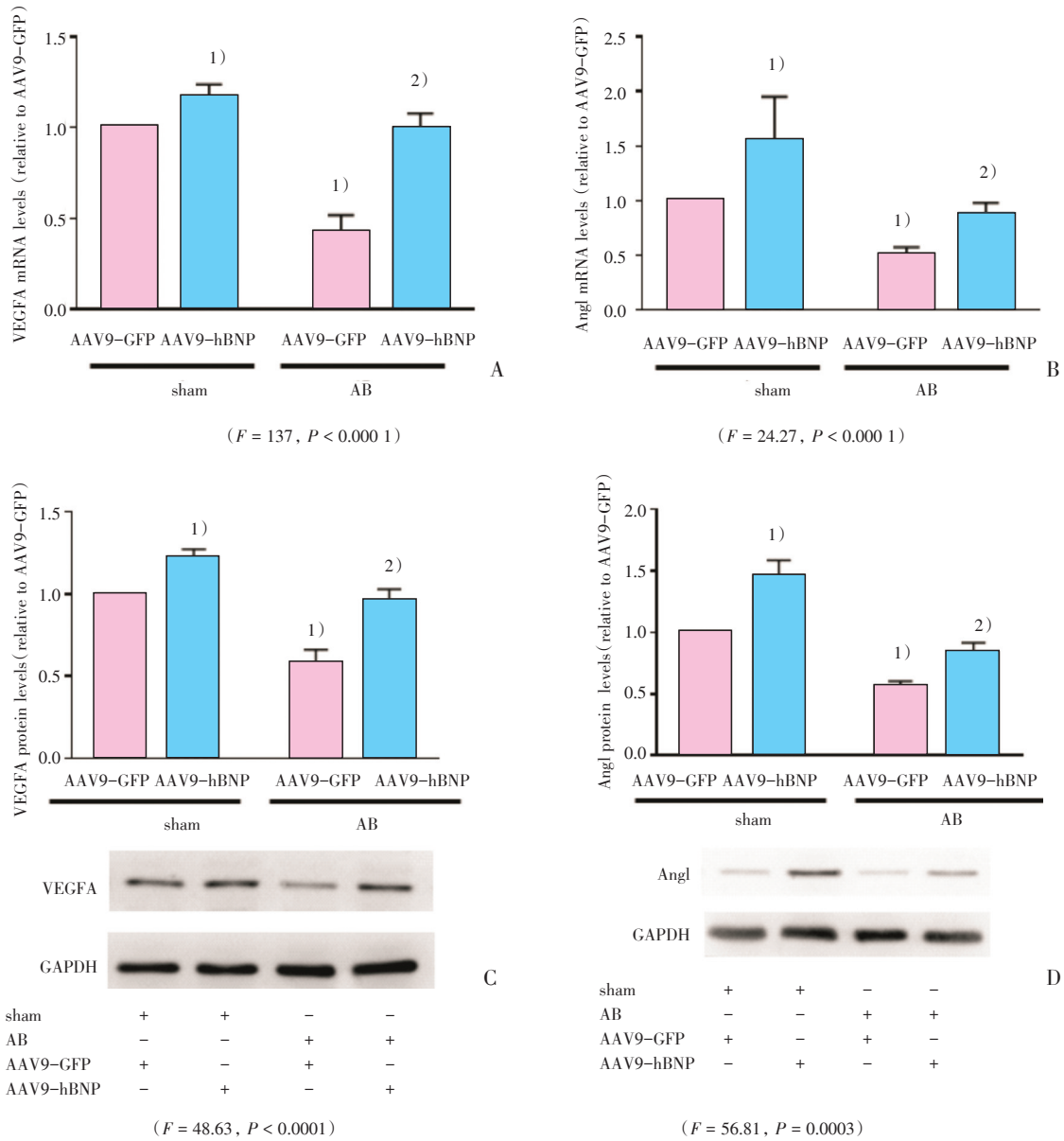
Fig.4 Effect of hBNP treatment on cardiac capillaries in mice of pressure overload-induced heart failure

上调(图5A-D, $P < 0.05$),这与心肌组织内毛细血管密度和毛细血管/心肌细胞比值的变化一致。

3 讨论

虽然大量的基础研究表明,BNP具有抑制心肌肥厚^[6]、心肌纤维化^[12]和改善心室重构^[7]等多

种心血管保护作用及调节血管新生作用^[9],但是目前关于BNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的作用及机制还未见报道。另外,血管新生减少是心力衰竭发生发展的重要机制,以及既往有研究发现促进血管新生能改善压力过负荷诱导的左室功能减退^[13]。目前BNP是否通过调控血管新生而对心力衰竭产生作用也尚未见文献报道。因



A, B: Q-PCR analysis of the mRNA expression levels of angiogenic factors Ang I and VEGFA in hearts of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery, respectively. B, C: Representative Western blots and semi-quantification of Ang I, VEGFA and GAPDH levels in hearts of AAV9-GFP group or AAV9-hBNP group at 4 weeks after sham or AB surgery, respectively. GAPDH was used as an internal control. 1) $P < 0.05$ vs sham + AAV9-GFP group; 2) $P < 0.05$ vs AB + AAV9-GFP group. $n = 5 \sim 10$.

图5 hBNP对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型心肌组织内血管新生因子的作用

Fig.5 Effect of hBNP treatment on cardiac angiogenic factors in mice of pressure overload-induced heart failure

此,本研究利用 AAV9-hBNP 转染小鼠促进其体内持久且恒定地表达 hBNP,在通过主动脉缩窄术构建压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型的基础上,来阐明 BNP 对压力负荷诱导的小鼠心力衰竭的影响和作用机制。

我们的研究发现通过 AAV9-hBNP 转染 C57/B6J 小鼠后成功促进体内 hBNP 的表达,并且

hBNP 能明显改善小鼠心力衰竭模型的心功能不全和心室重构^[7]。更重要的是,我们发现 hBNP 可能通过促进血管新生因子的表达来调控血管新生从而改善心力衰竭。本实验仅在压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型上完成,未在细胞水平上证实,这是本实验最大的局限性,需要后续进一步在细胞水平上验证。

在我们的实验中显示hBNP可以显著增加小鼠心力衰竭模型的缩短分数(FS%)和射血分数(EF%),降低左心室舒张末期内径(LVEDd)、左心室收缩末期内径(LVED)和左室舒张末期后壁厚度(LVPWd),这说明hBNP明显改善压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型的心功能不全和心室扩张。另外,我们的实验中显示hBNP可以逆转小鼠心力衰竭模型的心脏质量/术前体质量(HW/BW)、心脏质量/胫骨长度(HW/TL)、肺脏质量/术前体质量(LW/BW)、肺脏质量/胫骨长度(LW/TL)以及肥厚标志物ANP的mRNA转录水平的变化,进一步说明hBNP改善压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型的心室重构和肺水肿。这与我们以往研究结果类似,我们既往研究表明BNP可以抑制心肌梗死后心功能的恶化和心室重塑^[7]。因此,我们的实验结果表明BNP可以改善压力负荷诱导的小鼠心力衰竭。

在我们的实验中显示在压力负荷诱导的小鼠心力衰竭模型中,心肌组织内血管新生明显下降。这与以往的研究类似,Tsagalou等^[14]在临床研究中发现心力衰竭患者心肌组织内血管新生明显低于健康个体。我们实验显示小鼠心力衰竭模型心肌内毛细血管密度的降低程度大于毛细血管/心肌细胞比值,我们考虑这是因为当心室内毛细血管总数目减少的同时,根据以往的研究^[15]得知压力负荷也会增加心肌细胞横截面积从而增大心室的总面积,这使得毛细血管密度的降低程度更明显。另外,我们的实验通过AAV9-hBNP转染后,显示hBNP明显促进小鼠心力衰竭模型心肌组织内血管新生。这与以往的研究类似,Yamahara等^[9]研究BNP转基因小鼠后肢局部缺血时,发现BNP可以有效地加速新生血管的形成,从而修复血管的生成。但Moilanen等^[2]在研究通过腺病毒转染hBNP作用于心肌梗死模型后,发现心肌内毛细血管密度和毛细血管面积没有明显差异。这其中差异可能主要源于使用hBNP治疗的持续时间不同。在Moilane等研究的心肌梗死模型中,心脏组织在hBNP作用1周或2周时被收集;而在我们的研究中,先使用AAV9-hBNP转染小鼠3周,再行主动脉缩窄术构建心衰模型,造模4周后才收集心脏组织。所以,hBNP对Moilanen等研究的心梗模型心肌内血管新生未产生明显影响可能是

BNP持续治疗时间的不足造成。

在我们的研究中,hBNP促进小鼠心衰模型心肌组织内血管新生,伴随着心室重塑和心功能不全的改善。在小鼠心衰模型中,BNP对心肌内血管新生的调控作用与心功能不全及心室重构的变化呈现一致性,因此我们考虑BNP改善心衰的机制可能与血管新生有关。

血管内皮生长因子(VEGFA)是一种内皮细胞有丝分裂原,在血管新生和血管生长中都起着重要作用^[16]。在Izumiyama等^[1]研究中阻断压力负荷诱导的小鼠心肌肥厚模型VEGFA的表达后,降低了心肌内毛细血管密度,同时加速了收缩功能障碍、心室扩大和心肌重塑。同样,既往还有研究表明血管新生相关转录因子基因敲除的小鼠在肥厚刺激下更容易出现心力衰竭,而且这种失代偿可以被血管新生因子VEGFA部分逆转^[17]。与以往的研究相似,我们的研究发现hBNP在改善心力衰竭的同时,可以上调小鼠心衰模型心肌内VEGFA的表达。这进一步提示BNP可能通过促进血管新生发挥改善心力衰竭的作用。

血管生成素I(Ang I)是促血管成熟的内皮细胞特异性调节因子,不仅对心血管的发育至关重要,而且在治疗心脏病的过程中发挥着日益重要的作用^[18-19]。在Dallabrida等^[18]的研究中显示在盐酸苯肾上腺素(PE)诱导的小鼠心肌肥厚模型中,上调Ang I的表达促进血管新生能发挥心脏保护作用。与前人的研究类似,我们的研究发现hBNP也能明显上调小鼠心力衰竭模型心肌内Ang I的表达。另外,我们的研究显示hBNP还能提高普通小鼠心肌内VEGFA和Ang I的表达,这与我们在hBNP处理普通小鼠后观察到其心肌内毛细血管密度、毛细血管/心肌细胞比值的变化一致,进一步表明BNP可能通过促进血管新生因子的表达来调控血管新生,从而改善小鼠心力衰竭。

综上所述,我们的研究发现BNP可能通过促进血管新生因子的表达调控心肌内血管新生,从而改善心力衰竭。在临床上,BNP目前可用来治疗急性心力衰竭的症状^[20]。我们的研究结果阐明了BNP对心肌组织内血管新生的调控以及其在改善心衰中所起的作用。这为BNP未来作为临床上治疗慢性心力衰竭的药物提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] Izumiya Y, Shiojima I, Sato K, et al. Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload [J]. *Hypertension*, 2006, 47(5): 887-893.
- [2] Moilanen AM, Rysa J, Mustonen E, et al. Intramyocardial BNP gene delivery improves cardiac function through distinct context-dependent mechanisms [J]. *Circ Heart Fail*, 2011, 4(4): 483-495.
- [3] 周越, 何昕, 黄艺仪, 等. Exendin-4对苯肾上腺素诱导的心肌肥厚的影响及作用机制[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(1): 40-47.
Zhou Y, He X, Huang YY, et al. Effect of treatment with Exendin-4 on cardiac hypertrophy induced by phenylephrine [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2016, 37(1): 40-47.
- [4] Sano M, Minamino T, Toko H, et al. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload [J]. *Nature*, 2007, 446(7134): 444-448.
- [5] Walsh K, Shiojima I. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3176-3179.
- [6] He J, Chen Y, Chen B, et al. B-type natriuretic peptide attenuates cardiac hypertrophy via the transforming growth factor- β 1/smad7 pathway in vivo and in vitro [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(3): 283-289.
- [7] He J, Chen Y, Huang Y, et al. Effect of long-term B-type natriuretic peptide treatment on left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in rats [J]. *European J Pharmacol*, 2009, 602(1): 132-137.
- [8] Kong X, Wang X, Xu W, et al. Natriuretic peptide receptor a as a novel anticancer target [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1): 249-256.
- [9] Yamahara K, Itoh H, Chun TH, et al. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration [J]. *PNAS*, 2003, 100(6): 3404-3409.
- [10] Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo [J]. *Circ Res*, 2006, 99(4): e3-9.
- [11] Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(8): 2108-2118.
- [12] Calvieri C, Rubattu S, Volpe M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides [J]. *J Mole Med*, 2012, 90(1): 5-13.
- [13] Mitsos S, Katsanos K, Koletsis E, et al. Therapeutic angiogenesis for myocardial ischemia revisited: basic biological concepts and focus on latest clinical trials [J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(1): 1-22.
- [14] Tsagalou EP, Anastasiou-Nana M, Agapitos E, et al. Depressed coronary flow reserve is associated with decreased myocardial capillary density in patients with heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(17): 1391-1398.
- [15] Xue R, Jiang J, Dong B, et al. DJ-1 activates autophagy in the repression of cardiac hypertrophy [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2017, 633(9): 124-132.
- [16] Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor [J]. *J Mol Med*, 1999, 77(8): 527-543.
- [17] Rysa J, Tenhunen O, Serpi R, et al. GATA-4 is an angiogenic survival factor of the infarcted heart [J]. *Circ Heart Fail*, 2010, 3(3): 440-450.
- [18] Dallabrida SM, Ismail NS, Pravda EA, et al. Integrin binding angiopoietin-1 monomers reduce cardiac hypertrophy [J]. *FASEB*, 2008, 22(8): 3010-3023.
- [19] Souders CA, Borg TK, Banerjee I, et al. Pressure overload induces early morphological changes in the heart [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(4): 1226-1235.
- [20] O'Connor CM, Starling RC, Hernandez AF, et al. Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure [J]. *NEJM*, 2011, 365(1): 32-43.

(编辑 孙慧兰)