

心力衰竭大鼠脑脊液及血清瘦素改变的研究

冷秀玉, 曾武涛, 熊 艳, 陈国伟, 王礼春

(中山大学附属第一医院心内科, 中山大学心血管研究所, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】检测心力衰竭大鼠血清、脑脊液瘦素水平及脑脊液/血清瘦素比值改变, 对心衰大鼠的瘦素水平、瘦素抵抗及瘦素在血-脑脊液处的转运进行初步探讨。【方法】通过缩窄雄性 Wistar 大鼠腹主动脉制成心力衰竭模型。30 只大鼠随机分成空白对照组、假手术对照组和心衰组。预实验应用超声心动图和血流动力学检测证实术后 4 个月大鼠已经出现明显心衰。术后 4 个月采集脑脊液、血清, ELISA 法测定瘦素水平。【结果】心衰组的血清瘦素水平较假手术及空白对照组明显升高[$(8.1 \pm 4.0) \text{ ng/mL}$ vs $(3.7 \pm 1.7) \text{ ng/mL}$, $(3.1 \pm 1.4) \text{ ng/mL}$, $P < 0.01$]。3 组脑脊液瘦素水平无显著差异。心衰组脑脊液/血清瘦素比值较两对照组明显降低 (10 ± 7 vs 18 ± 8 , 22 ± 12 , $P < 0.01$)。两对照组血清瘦素水平及脑脊液/血清瘦素比值无显著差异。对照组脑脊液瘦素与血清瘦素呈正相关($r=0.724$, $P < 0.05$), 心衰组两者相关性消失。【结论】心衰大鼠血清瘦素水平升高, 脑脊液瘦素水平无显著改变, 脑脊液/血清瘦素比值下降, 脑脊液瘦素与血清瘦素相关性减弱。支持瘦素血-脑脊液饱和转运系统的存在, 提示瘦素进入中枢系统的转运障碍是瘦素抵抗的一个重要原因。

关键词: 心力衰竭; 瘦素; 瘦素抵抗; 血-脑脊液转运

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0654-04

Cerebrospinal Fluid and Serum Leptin Levels in Rats with Heart Failure

LENG Xiu-yu, ZENG Wu-tao, XIONG Yan, CHEN Guo-wei, WANG Li-chun

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the leptin level, leptin resistance and leptin transport at blood-cerebral barrier in the rats with heart failure through assaying cerebrospinal fluid (CSF) and serum leptin level and CSF/serum leptin ratio. 【Methods】Thirty male Wistar rats were randomly divided into blank control group (BC), pseudo-operation control group (OC) and heart failure group (HF) after heart failure was induced by constricting abdominal aorta for 16 weeks. Leptin level of serum and CSF were determined by ELISA. 【Results】Serum level of leptin was increased in HF group compared to BC and OC groups [$(8.1 \pm 4.0) \text{ ng/mL}$ vs $(3.7 \pm 1.7) \text{ ng/mL}$, $(3.1 \pm 1.4) \text{ ng/mL}$, $P < 0.01$]. There was no significant difference of CSF leptin level among three groups. CSF/serum ratio was significantly decreased in HF group compared to BC and OC groups (10 ± 7 vs 18 ± 8 , 22 ± 12 , $P < 0.01$). No significant difference of serum leptin level and CSF/serum ratio was found between two control groups. CSF leptin level correlated positively with serum leptin level ($r=0.724$, $P < 0.05$) in BC and OC groups and the relationship disappeared with increased serum leptin level in HF group. 【Conclusions】Serum level was increased in the rats with heart failure while there was no significant change of CSF leptin level. Decreased CSF/serum leptin ratio and weekend correlation between CSF and serum leptin level indicates the existence of saturable leptin blood-CSF transport system and that deteriorating leptin transport from peripheral blood to CSF is one possible reason for leptin resistance.

Key words: heart failure; leptin; leptin resistance; blood-CSF transport

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):654-657]

瘦素(leptin)是调节机体能量和体质量的重要物质, 研究证实瘦素与心血管疾病有密切关系^[1]。

收稿日期: 2007-06-10

基金项目: 广东省自然科学基金(2005B10401020), 广东省自然科学基金博士科研启动基金(04300348)

作者简介: 冷秀玉(1972-), 女, 河南息县人, 博士, 讲师; 曾武涛, 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: zwtlyx@tom.com

近期,在肥胖个体中发现的瘦素抵抗开始成为研究热点,尤其是瘦素在血-脑屏障的运输环节^[2]。我们之前的临床研究发现慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)患者血清瘦素水平升高,可能存在瘦素抵抗^[3],但心衰患者临床研究尚未就瘦素变化得出定论^[4]。原因之一是瘦素水平影响因素多,在临床研究中较难控制。动物模型则可尽量避免瘦素影响因素,但目前为止,心力衰竭动物的瘦素系统变化尚未见报道。本部分通过缩窄腹主动脉的方法建立大鼠心衰模型,通过检测心力衰竭大鼠血清、脑脊液瘦素水平及脑脊液/血清瘦素浓度比值,对心衰大鼠的瘦素水平、瘦素抵抗及瘦素在血-脑屏障处的运输进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 心衰模型的建立和实验分组

清洁级的雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量 200~250 g,由中山大学动物实验中心提供。随机分成空白对照组(blank control, BC 组, 8 只)、假手术对照组(operation control, OC 组, 8 只),和心衰组(chronic heart failure, CHF 组, 14 只)。心衰组大鼠以 10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉,分离出腹主动脉,在肾动脉上方将腹主动脉与钝头 9 号探针(外径 0.8 mm)一起结扎,造成狭窄。假手术组经同样步骤,但不缩窄动脉。术后 8 周末开始应用超声,每 4 周进行一次心功能测定,至术后 16 周末发现大鼠出现明显心衰,取部分大鼠作血流动力学测定进一步确定^[5]。

1.2 脑脊液采集

将大鼠称重后麻醉,将头部固定于定向仪上,暴露出枕骨大孔。由枕骨大孔进针直接抽取脑脊液(80~120 μ L),置低温冰箱保存,待测瘦素。抽取完毕后注入等量的消毒生理盐水,以保持原来脑脊髓腔的压力^[6]。

1.3 血流动力学检测

经右颈总动脉插管(传感器)入左室,应用 Bidlab 生物信号采集与处理系统(四川成都泰盟电子有限公司)记录左室内压变化,稳定 10 min 后,测定左室收缩末期压力(left ventricular end systolic pressure, LVESP)、左室舒张末期压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左室内压力最大下降/上升速率($\pm dp/dt$),各数值均为连续

10 个心搏的平均值。

1.4 血液采集

测定血流动力学指标后,通过动脉插管直接采血 1~2 mL,置于非抗凝干燥管内,静置 30 min,离心后取血清测定瘦素。

1.5 瘦素测定

瘦素测定采用 DSL-10-24100 鼠瘦素 ELISA Kit (Murine leptin, 天津天硕生物制品有限公司)。可测最低浓度为 0.04 ng/mL,批内变异系数 5.4%~6.9%,批间变异系数 3.8%~7.3%。

1.6 统计学处理

计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组资料采用 ANOVA 分析,两组间差异采用多重比较方法(方差齐性采用 LSD 法,方差非齐性采用 Tampane's T2 法)。非正态分布资料采用秩和检验,指标间关系分析用相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,所有统计数据均用 SPSS 10.0 数据处理软件包进行处理。

2 结果

2.1 实验大鼠的一般资料和血流动力学参数

实验结束时,空白对照组无死亡,心衰组死亡 4 只大鼠,假手术对照组 2 例死亡。心衰组大鼠全部出现活动减少、明显腹水。3 组在体质量和心率先上无明显差异。但心衰组与后两组相比左室质量指数(left ventricle mass index, LVMI)和血流动力学指标存在显著不同。心衰组的 LVMI 较两对照组(假手术对照组和空白对照组)明显升高。心衰组的 $+dp/dt$ 、 $-dp/dt$ 均较对照组显著降低。同时,心衰组的 LVEDP 明显升高,证明已存在明显心衰(表 1)。

表 1 心衰大鼠与对照组大鼠血流动力学参数

Table 1 Hemodynamic parameters in CHF group and two control groups

	CHF(n=10)	OC(n=6)	BC(n=8)	F	P
Wt(g)	568 \pm 38	589 \pm 37	589 \pm 36	0.92	0.415
SBP(mmHg)	121 \pm 7	119 \pm 6	116 \pm 7	1.36	0.279
DBP(mmHg)	68 \pm 11	77 \pm 9	72 \pm 8	1.65	0.215
LVMI	2.53 \pm 0.35 ¹⁾²⁾	1.96 \pm 0.17	2.14 \pm 0.37	6.41	0.000
+dp/dt	6.0 \pm 0.4 ¹⁾²⁾	9.9 \pm 0.6	9.7 \pm 0.8	114.88	0.000
-dp/dt	-3.7 \pm 0.5 ¹⁾²⁾	-5.9 \pm 0.7	-5.6 \pm 0.8	25.92	0.000
LVEDP	2.5 \pm 1.7 ¹⁾²⁾	-6.8 \pm 1.5	-6.4 \pm 0.9	117.77	0.000

1) Compared to OC group, $P < 0.01$, 2) Compared to BC group, $P < 0.01$

2.2 瘦素水平

心衰组的血清瘦素水平较假手术及空白对照组明显升高(F=7.88, P< 0.05), 脑脊液瘦素水平无显著差异(F=0.09, P>0.05)。假手术对照组与空白对照组相比, 血清和脑脊液瘦素水平均没有显著差异(表 2)。

2.3 脑脊液/血清瘦素比值

心衰组脑脊液/血清瘦素比值较两个对照组明显降低(T=4.49, P< 0.01), 假手术对照组与空白对照组相比没有显著差异(表 2)。

表 2 心衰大鼠与对照组大鼠体液瘦素水平

Table 2 Body fluid leptin levels in CHF group and two control groups (x̄±s)

	Lepin (serum,ng/mL)	Lepin (CSF,pg/mL)	CSF/serum (pg/ng)
CHF(n=10)	8.1 ±4.0 ¹⁾²⁾	840 ±670	10 ±7 ¹⁾²⁾
OC(n=6)	3.7 ±1.7	760 ±680	710 ±530
BC(n=8)	3.1 ±1.4	710 ±530	22 ±12

1): Compared to OC group, P< 0.05; 2): Compared to BC group, P< 0.05. Tambane's method (Post Hoc multiple comparison when equal variances not assumed) was used for Lepin (serum, ng/mL). Rank test was used for Lepin (CSF, pg/mL),CSF/serum(pg/ng) which are not normal distribution

2.4 血清与脑脊液瘦素水平之间的相关性

相关分析显示对照组(手术对照及空白对照)血清瘦素水平与脑脊液水平呈正相关(r=0.724, P=0.03)。心衰组两者之间的相关性明显减

弱(r=0.553, P=0.097)。两者相关性散点图及趋势线可看出, 两项指标之间的相关性随着血清瘦素水平升高而趋于减弱, 脑脊液瘦素在高血清瘦素水平时趋于稳定, 不再继续升高(图 2)。

3 讨论

多项研究表明神经内分泌系统的激活是 CHF 的一个重要生物学特征^[7]。CHF 患者常伴有能量代谢紊乱, 并与血流动力学参数相关^[8]。瘦素由肥胖基因编码, 通过影响食欲和能量代谢来调节体质量及某些神经内分泌功能, 据此推测瘦素可能参与了心力衰竭的发生和发展^[4]。

我们之前的临床研究亦发现心衰患者血清瘦素水平升高^[3], 但也有研究者有不同的发现^[4]。多数学者认为, 临床研究存在差异的一个主要原因是入选的 CHF 患者亚组不同, 而且即使是同一研究, 试验组和对照组之间的可比性也存在着这样和那样的缺陷。具体有 影响瘦素的一般因素, 如年龄、性别、种族、体质量、血压等。心衰患者心功能分级、病程不同, 不同时期、心功能分级以及有无恶液质的心衰患者的瘦素水平有可能不同;

治疗不同, 各研究中心衰患者均未中断服用治疗药物, 而心衰治疗药物对瘦素水平有可能产生影响; 心衰病因构成不同, 虽多为扩心病和冠心病, 但构成比不同。而不同病因所导致的心衰瘦素水平有可能有差异^[9]。这些因素部分可通过完善试验设计加以纠正, 但部分如第 点鉴于伦理学考虑在临床中难以改善。而动物实验中, 这些影响因素得到了较大限度的改善。

本研究采用较为成熟的压力高负荷诱导的心衰模型。采用外径约 0.8 mm 的探针作为缩窄标准, 效果理想, 在 16 周对大鼠的血流动力学检测显示, 大鼠已发生明显心衰, 与文献报道一致^[5]。本研究中心衰大鼠与对照组体质量无显著差异, 证明尚未出现明显的能量负平衡。心衰组血压与对照组相比也没有明显升高, 避免了血压对瘦素的影响。本部分研究首次提供了心衰大鼠血清瘦素水平较对照组升高的实验数据, 支持我们之前在心衰患者中观察到的高瘦素血症^[3]。

瘦素的生理作用可分为中枢作用和外周作用。早期瘦素相关研究多集中在瘦素的外周作用, 肥胖个体中瘦素抵抗的出现使研究者开始注意到

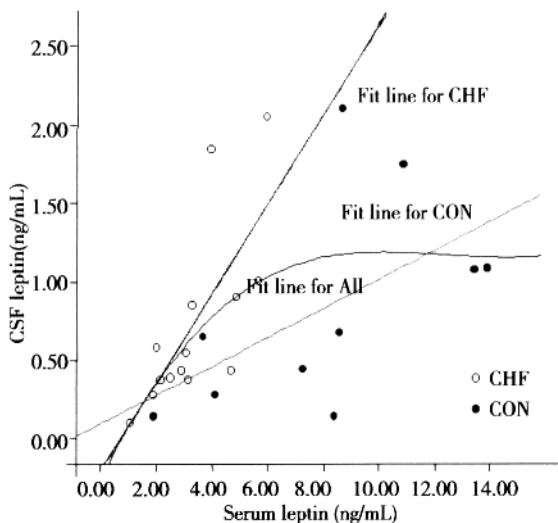


图 2 血清瘦素与脑脊液瘦素之间相关性散点图

Fig.2 Scatterplot of the relationship between serum leptin and CSF leptin

瘦素的中枢作用^[2]。瘦素发挥中枢作用的一个前提是穿过血-脑脊液屏障,与特异的瘦素受体结合,启动受体后信号转导途径,发挥生物效应。因此,瘦素在血-脑脊液屏障的运输机制逐渐受到重视。

1996年 Banks等^[10]通过外周静脉注射¹²⁵I标记的瘦素测定瘦素在血-脑脊液屏障处的转运过程。他们的结果显示¹²⁵I-leptin该处的转运常数为 $5.87 \times 10^{-4} \text{ mL/g/min}$,比标记的白蛋白的转运速率高20倍。非标记的瘦素可以剂量依赖性方式抑制¹²⁵I-leptin的转运。而同样具有饱和转运系统的酪氨酸和胰岛素则不能抑制¹²⁵I-leptin的转运。提示¹²⁵I-leptin具有特异的饱和转运系统。同时,该转运系统在中枢以外并不存在。Wong等^[11]对9例受试者进行了血浆和脑脊液瘦素浓度24h监测。发现,血中瘦素水平有明显的昼夜节律,每日波动幅度约为50倍。而脑脊液中瘦素浓度没有明显昼夜节律,全日波动幅度仅为2倍。提示血-脑脊液瘦素系统是一个高度易饱和系统。Furuhata等^[6]研究显示转基因肥胖小鼠的血清瘦素水平明显升高,但脑脊液的瘦素水平则无显著变化。提示瘦素进入中枢系统的转运障碍是瘦素抵抗的一个重要原因。本研究结果显示,虽然CHF大鼠的血清瘦素水平较对照组明显升高,脑脊液的瘦素水平却没有明显差异。尽管脑脊液瘦素水平与血清瘦素在较低血清瘦素水平的对照组中呈正相关,但超过一定的阈值后,随着血清瘦素水平升高,这种相关性在心衰组中明显减弱,脑脊液瘦素水平基本维持在一定的稳态浓度,支持瘦素血-脑脊液饱和转运系统的存在。

Caro等^[12]对有明显瘦素抵抗的肥胖个体进行了脑脊液瘦素测定,发现肥胖者血清瘦素较对照组明显升高,但脑脊液瘦素水平没有显著改变。提出CSF/血清比值降低可能是肥胖患者瘦素抵抗的机制之一。本研究中CHF组CSF/血清瘦素比值较对照组明显降低,提示CHF中也存在一定程度的瘦素抵抗。

脑脊液瘦素浓度水平仅是瘦素发挥中枢作用必须经过的第一步。之后,还有数个环节影响瘦素生理作用的发挥,如脑部不同功能区对瘦素的特异性结合能力。在Banks等^[10]放射性标记瘦素实验中,发现脑部不同部位的放射性有显著差异,提示即使在相同的脑脊液瘦素浓度基础上,不同组织的亲和性也是决定瘦素摄取的因素。此外,胞膜表

达的不同受体亚型、受体后信号转导水平等也是瘦素作用的影响因子。因此,CHF瘦素系统改变及其机制尚需更深入的研究。

参考文献:

- [1] LUO J D, ZHANG G S, CHEN M S. Leptin and cardiovascular diseases [M]. Drug News Perspect, 2005, 18(7):427-431.
- [2] ENRIORI P J, EVANS A E, SINNAYAH P, et al. Leptin resistance and obesity [J]. Obesity(silver spring), 2006,14(S5):254S-258S.
- [3] 冷秀玉,曾武涛,陈国伟,等.慢性心力衰竭血清瘦素及其与胰岛素抵抗的关系 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004(5):253-255.
- [4] SCHULZE P C, KRATZSCH J. Leptin as a new diagnostic tool in chronic heart failure [J]. Clin Chim Acta, 2005,362(1-2):1-11.
- [5] MERCADIER J J, LOMPR M, WISNEUSKY C, et al. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy [J]. Circ Res, 1981,49(2):525-532.
- [6] FURUHATA Y, KAGAYA R, HIRABAYASHI K, et al. Development of obesity in transgenic rats with low circulating growth hormone levels: involvement of leptin resistance [J]. Eur J Endo, 2003(143):535-541.
- [7] BRAUNWOLD E, BIVSTOW M R. Congestive heart failure fifty years of progress [J]. Circulation, 2002,102(20):IV14-IV23.
- [8] CARR J G, STEVENSON L W, WALDEN J A, et al. Prevalence and hemodynamic correlates of malnutrition in severe congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Am J Cardiol, 1989, 63(11):709-713.
- [9] 冷秀玉,曾武涛,陈国伟,等.慢性心力衰竭的血清瘦素研究 [J]. 新医学, 2004, 35(2):79-81.
- [10] BANKS W A, HUANG A J, JASPAN J B, et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin [J]. Peptides, 1996, 17(2):305-311.
- [11] WONG M L, LICINIO J, YILDIZ B O, et al. Simultaneous and continuous 24-hour plasma concentrations in central and peripheral compartments [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004,89(1):258-265.
- [12] CARO J F, KOLACZYNSKI J W, NYCE M R, et al. Decreased cerebrospinal-fluid serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance [J]. Lancet, 1996, 348(9021):159-161.