

充血性心力衰竭犬心肌诱生型一氧化氮合酶的表达

陈筱潮¹, 张旭明¹, 伍卫¹, 刘英梅¹, 邓庆丽²

(中山医科大学孙逸仙纪念医院 1. 心内科, 2. 医学研究中心, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】观察诱生型一氧化氮合酶(iNOS)在充血性心力衰竭犬动物模型心肌组织中的表达。【方法】建立快速心脏起搏致心力衰竭的动物模型,用 RT-PCR 方法观察心力衰竭不同阶段心肌组织 iNOS mRNA 的表达。【结果】在快速心脏起搏致心力衰竭动物模型的不同阶段,心肌细胞均有 iNOS mRNA 的表达,表达的水平在起搏的第 1 周末即达到高峰,第 2 周末有所回落并在第 3 周末维持在较稳定的水平,而在第 4 周末则出现了明显的衰退。【结论】心肌组织 iNOS 的生成参与快速心脏起搏致心力衰竭犬模型心力衰竭的形成过程。

关键词: 心力衰竭/充血性; 疾病模型/动物; 心脏; 诱生型一氧化氮合酶

中图分类号: R 541.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0182-04

The Expression of iNOS mRNA of Myocardium in Dogs with Congestive Heart Failure

CHEN Xiao-chao, ZHANG Xu-ming, WU Wei, LIU Ying-mei, DENG Qing-li

(1. Division of Cardiology, 2. Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of iNOS mRNA in myocardium of dogs with congestive heart failure. 【Methods】 A canine heart failure model induced by rapidly pacing of right ventricle was established. The expression iNOS mRNA of myocardium in dogs with different severity of congestive heart failure was measured by means of RT-PCR. 【Results】 There was expression of iNOS mRNA of myocardium during the different stages of rapid pacing. The peak of expression appeared at the end of the first week. It dropped down at the end of the second week and kept at a smooth level at the end of the third week. At the end of the forth week the level of iNOS mRNA reduced significantly. 【Conclusion】 iNos plays a role during the progress of heart failure in the congestive heart failure model induced by rapid right ventricular pacing.

Key words: heart failure/congestive; disease models/animal; heart; inducible nitric oxide synthase

充血性心力衰竭(congestive heart failure, CHF)是多种心血管疾病发展的最终途径,其发病机制十分复杂。近期的一些研究提示心肌组织产生的一氧化氮(NO)以自分泌及旁分泌的形式对心脏起调节作用,并在诸如感染性休克、病毒性心肌炎的研究中发现,由诱生型一氧化氮合成酶(iNOS)介导的

NO 过量生成促进心脏收缩功能的下降^[1]。不少学者对扩张性心肌病的研究揭示 iNOS 参与充血性心力衰竭的过程,而在其他病因心脏病的心力衰竭过程中 iNOS 的作用有不同的报道。本研究通过建立快速心脏起搏致心力衰竭的动物模型,动态观察了心力衰竭不同阶段 iNOS mRNA 的表达。

收稿日期: 2000-01-20

基金项目: 卫生部国际交流中心默沙东科研基金, 中山医科大学青年科研启动基金资助

作者简介: 陈筱潮(1967-),男,浙江上虞人,在职博士生,主治医师

1 材料和方法

1.1 实验动物

35只健康成年杂种犬,性别不限,随机分为5组。分别为对照组(Group 1)、起搏1周组(Group 2)、起搏2周组(Group 3)、起搏3周组(Group 4)和起搏4周组(Group 5),每组7只。

1.2 充血性心力衰竭模型

戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内麻醉,在X线引导下,心内膜起搏电极经颈外静脉插入至右心室心尖部,起搏器(广州市无线电研究所研制)植入颈背部皮下经皮下隧道与起搏电极连接。起搏参数:频率240次/min,输出电压5.0 V,脉宽0.5 ms。对照组行假手术,术后4周行血流动力学检查。起搏1周组快速右心室起搏1周后行血流动力学检查,其余各组起搏持续时间依次为2、3和4周。

1.3 血流动力学测定

麻醉动物后,经颈外静脉插入6F Swan-Ganz导管,测定右心室压力及肺毛细血管楔压,温度稀释法测心输出量。经股动脉插入6F猪尾导管,测定左室舒张末压及左室等容收缩期瞬间压力升高速率($+dp/dt_{max}$)。

1.4 心脏标本处理

在左心室游离壁取1g左右心肌组织,液氮速冻,-80℃保存。其余组织在体积分数为10%的甲醛溶液固定保存。

1.5 RT-PCR

1.5.1 异硫氰酸胍一步法提取心肌组织总RNA^[2]

冰冻组织在液氮中研磨成粉末状,酚/氯仿/异戊醇去除蛋白质,异硫氰酸胍抑制RNA酶并抽提RNA,异丙醇沉淀,体积分数为75%乙醇洗涤后,于100%乙醇中保存于-80℃。

1.5.2 测定RNA的浓度和纯度 离心、干燥RNA沉淀,以DEPC处理水溶解,取5 μ L RNA溶液溶于195 μ L DEPC处理水中,紫外分光光度计上检测吸光度(A),每份标本测3次,取其平均值, A_{260}/A_{280} 比值在1.8~2.0者符合要求,按 $10 A_{260} = 40 \mu\text{g/mL RNA}$,计算RNA浓度。

1.5.3 引物 从GenBank下载犬iNOS cDNA序列(Accession: AF077821),用DNASIS 7.21版本软件分析设计引物,上游引物为5'-AAGATGGTGCAGGA AACAGC-3',位于iNOS cDNA序列的第3491~

3512碱基位置,其中G+C=47%, $T_m = 62.0^\circ\text{C}$;下游引物为5'-GGTGCAATCAGATGAAAGTGCC-3',位于iNOS cDNA序列的第3829~3851碱基位置,其中G+C=49%, $T_m = 66.0^\circ\text{C}$;扩增产物的长度为360 bp,位于iNOS cDNA序列的第3491~3851碱基位置;引物由Gibco公司合成。以 β -actin为内参照,进行mRNA定量, β -actin引物由罗氏公司试剂部生产的TitanTM One Tube RT-PCR试剂盒内附送, β -actin上游引物序列:5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3', β -actin下游引物序列:5'-AGGGTACATGGTGGTCCGCCAGAC-3',扩增产物的长度为587 bp。

1.5.4 RT-PCR条件 采用TitanTM One Tube RT-PCR试剂盒(罗氏公司试剂部)。每个反应加总RNA 1 μ g,iNOS和 β -actin上、下游引物各50 pmol,逆转录酶、Taq酶,RNasin,dNTP及Buffer均按照试剂盒说明加样。45℃逆转录1 h,94℃变性2 min,继以PCR扩增,扩增条件如下:变性94℃,30 s,退火60℃,30 s,延伸68℃,1 min,共35个循环。

1.5.5 iNOS mRNA表达强度的计算 RT-PCR扩增产物以20 g/L琼脂糖电泳,可见特异性的iNOS cDNA和(或) β -actin cDNA的条带,图像分析系统(德国KONTRON ELEKTRONIK IRBS 2.0)测定特异性条带的辉度与面积,以各自的辉度与面积的乘积表示cDNA的量,再以同一RT-PCR反应体系中iNOS cDNA/ β -actin cDNA量的比值表示iNOS mRNA表达的相对强度。

1.6 数据处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用ANOVA统计。

2 结果

2.1 一般情况

快速起搏2周,犬逐渐出现食欲下降、运动减少等症状,起搏后第3周已经出现较为明显的心衰症状,包括呼吸增快、四肢水肿等。病理检查示起搏3周组、起搏4周组犬均不同程度地出现心包、胸腔、腹腔积水。

2.2 血流动力学

快速起搏1周后,除左心室舒张末压上升外,其余血流动力学指标与对照组比较无明显变化;快速起搏2周后,血流动力学上已经出现明显的心功能下降,第3周、第4周有进一步的加重(表1)。

表1 快速起搏不同阶段犬血流动力学参数

Table 1 Haemodynamic parameters at different time of rapid right ventricle pacing

Group (n = 7)	MRVP	mPCWP	CO	LVEDP	+ dp/ dt _{max}
	p / mmHg	p / mmHg	V / (L·min ⁻¹)	p / mmHg	p / (mmHg·s ⁻¹)
1	6.9±1.2	1.5±0.7	4.5±1.2	6.2±1.6	2689±386
2	9.2±1.8	3.0±1.1	3.2±1.0	10.2±1.9 ¹⁾	2018±410
3	13.5±2.0 ¹⁾²⁾	5.2±2.0 ¹⁾²⁾	2.5±1.1 ¹⁾	16.3±2.8 ¹⁾²⁾	1788±335 ¹⁾
4	15.3±3.8 ¹⁾²⁾	8.5±2.5 ¹⁾²⁾³⁾	1.9±0.9 ¹⁾²⁾	19.9±4.3 ¹⁾²⁾³⁾	1554±352 ¹⁾²⁾
5	17.6±4.2 ¹⁾²⁾³⁾	9.1±2.9 ¹⁾²⁾³⁾	1.4±0.9 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	21.4±5.2 ¹⁾²⁾³⁾	1320±401 ¹⁾²⁾³⁾
F	8.6	12.2	5.3	11.2	7.2
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

1) Compared to group 1, $P < 0.05$; 2) Compared to group 2, $P < 0.05$; 3) Compared to group 3; $P < 0.05$ 4) Compared to group 4, $P < 0.05$

2.3 心肌组织 iNOS mRNA 的表达

对照组未检测到心肌组织 iNOS mRNA 的表达,快速起搏各阶段心肌均有 iNOS mRNA 表达,各组间存在显著的差异($F = 31.7, P < 0.01$)。起搏1周组 iNOS mRNA 的丰度显著高于起搏2周组(0.61 ± 0.29 vs $0.23 \pm 0.19, P < 0.05$)、起搏3周组(0.61 ± 0.29 vs $0.21 \pm 0.14, P < 0.05$)和起搏4周组(0.61 ± 0.29 vs $0.10 \pm 0.07, P < 0.01$);起搏2周组与起搏3周组之间无明显差异(0.23 ± 0.19 vs $0.21 \pm 0.14, P > 0.05$);与起搏3周组比较,起搏4周组 iNOS mRNA 量明显下降(0.10 ± 0.07 vs $0.21 \pm 0.14, P < 0.01$) (图1)。

3 讨论

一氧化氮(NO)是一种重要的信使分子,它以多样的生理、病理作用和广泛的组织分布引起极大的关注,Science 杂志于1992年将其评为“当年的分子(Molecule of the year)”以突出其生物重要性^[3]。L-精氨酸是其前体物,在一氧化氮合成酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)的作用下生成NO,半衰期极短,仅10~30s,因此其生理作用发挥和维持是与NOS的活性密不可分的。NOS分为3个亚型,即神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS),iNOS并不存在于正常组织之中,只有在某些特殊的因素诱导下才表达。

Balligand 等^[4]给培养的大鼠心室肌细胞予以LPS刺激,证实心肌细胞能诱导 iNOS。De Belder 等^[5]于1993年报道因扩张性心肌病(idiopathic dilated cardiomyopathy, IDC)而致的充血性心力衰竭患者右心组织 iNOS 活性明显增高,由此而引发了一

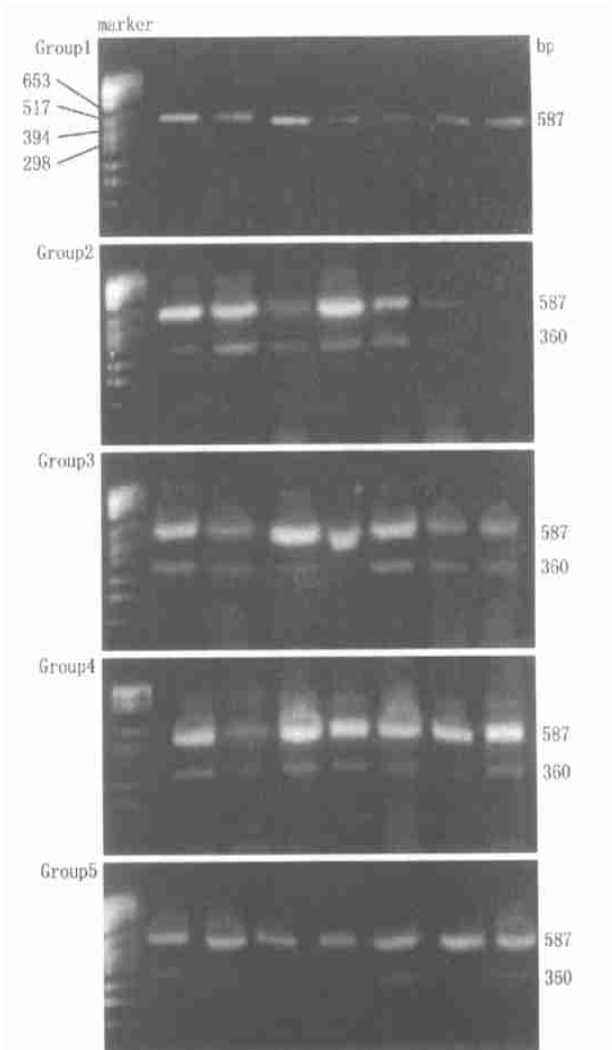


图1 心肌组织总 RNA RT-PCR 产物

Fig. 1 The product of RT-PCR of myocardial total RNA (20 g/L agarose gel electrophoresis)

些关于 iNOS 在充血性心力衰竭发病机制中作用的研究。综合晚近的一些研究显示^[1,5~10], ①在 IDC 患者中, 尽管有个别的研究持不同的观点, 多数作者证实其心肌组织有 iNOS 的生成; ②在其他病因的心力衰竭患者中, 有关 iNOS 是否参与心力衰竭的形成有较多争议; ③支持 iNOS 参与心力衰竭的学者普遍认为 iNOS 介导的 NO 过量形成所致的负性肌力作用及细胞毒性作用是促进心力衰竭发展的关键。

本研究采用快速心脏起搏致心力衰竭的动物模型。该模型为全心功能不全模型, 在血流动力学、神经体液及病理改变上十分类似于非缺血性扩张性心肌病^[11]。我们根据起搏持续时间的不同复制出不同程度的心力衰竭模型。

本研究显示, 在起搏的第1周末 iNOS mRNA 水平即达到了高峰, 而此时在血流动力学上动物尚未有显著的心力衰竭证据, 临床上也缺乏心力衰竭的相应症状, 提示 iNOS mRNA 的表达是参与心力衰竭形成的机制之一, 而非心力衰竭相关的表现。在后继的不同阶段, 心肌细胞均有 iNOS mRNA 的表达, 并第2、3周维持在相对稳定的水平, 而在动物呈现心力衰竭失代偿症状时出现了明显的衰退。这一 iNOS mRNA 表达水平与心力衰竭发展进程关系的特点提示, iNOS 可能参与心力衰竭致病机制的早期环节。目前尚无更详尽的有关 iNOS 在心力衰竭的发病机制中确切作用的研究报告, 但这种 iNOS mRNA 表达水平随时间和/或心功能不全的程度而演变的趋势在其他的观察中有类似的报道, 如 Haywood 等^[10]发现心肌细胞 iNOS 基因表达水平以在 NYHA 心功能2级的患者群中最为明显, 3级和4级的患者群次之。在移植心脏中, 心肌细胞 iNOS 表达呈时间依赖性, 移植后180d时达到其峰值^[12]。

参考文献:

[1] Satoh M, Hiramori K, Tamura G, *et al*. Apoptosis in the process from viral myocarditis to dilated cardiomyopathy[J]. *Nippon Rinsho*, 1996, 54(7): 1982.

- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 真核细胞 mRNA 的提取、纯化和分析[M]. 见 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T 著, 金雁冬, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第2版). 北京: 科学出版社, 1996. 343.
- [3] Vallance P, Moncada S. Nitric oxide: from mediator to medicine[J]. *J Roy Coll Phys*, 1994, 28(1): 209.
- [4] Balligand J L, Ungureanu-Longros D, Simmons W, *et al*. Cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in cardiac myocytes[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(11): 27580.
- [5] de Belder A J, Radomski M W, Why H J, *et al*. Nitric oxide synthase activities in human myocardium[J]. *Lancet*, 1993, 341(1): 84.
- [6] de Belder A J, Radomski M W, Why H J, *et al*. Myocardial calcium-independent nitric oxide synthase activity is present in dilated cardiomyopathy, myocarditis and postpartum cardiomyopathy but not in ischaemic or valvar heart disease[J]. *Br Heart J*, 1995, 74(4): 426.
- [7] Vejlstup N G, Bouloumie A, Boesgaard S, *et al*. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(6): 1215.
- [8] Thoenes M, Forstemann U, Tracey W R, *et al*. Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, 28(1): 165.
- [9] Barbaro G, Di Lorenzo G, Soldini M, *et al*. Intensity of myocardial expression of inducible nitric oxide synthase influences the clinical course of human immunodeficiency virus-associated cardiomyopathy. Gruppo Italiano per lo Studio Cardiologico dei pazienti affetti da AIDS (GISCA)[J]. *Circulation*, 1999, 100(9): 933.
- [10] Haywood G A, Tsao P S, Leyen H E, *et al*. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure[J]. *Circulation*, 1996, 93(6): 1087.
- [11] 周淑娴, 张旭明, 伍卫, 等. 快速右心室起搏致犬心力衰竭模型的研制[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1): 27.
- [12] Lewis N B, Tsao P S, Richenbacher P R, *et al*. Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle[J]. *Circulation*, 1996, 93(3): 720.

(编辑 黄小延)