

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.005.html>

心肌自噬在肾去神经联合氨氯地平治疗 高血压大鼠心肌肥厚中的作用

黄炯华¹, 宋代富¹, 区德锦², 谢文杰¹, 戴文军¹

摘要 目的 探讨心肌自噬在肾去神经联合氨氯地平治疗大鼠高血压心肌肥厚的作用。方法 以12周雄性自发性高血压大鼠构建高血压心肌肥厚动物模型为研究对象,分为假手术组(A组)、双侧肾动脉去神经+空白药物对照组(B组)、双侧肾动脉去神经+氨氯地平组(C组)。联合治疗后4周,RT-PCR法检测心肌组织肥厚基因的表达,测定左室质量指数(LVMI),行组织病理切片HE染色和Western blot测定自噬活性标志蛋白的表达。结果 心脏组织的病理切片和肥厚基因表达变化显示,与A组比较,B组及C组的心脏体积减小、室壁变薄,肥厚相关基因心房钠泵(ANP)和 β -肌球蛋白重链(β -MHC)表达下降;同时,LVMI显示同样的结果。自噬标志蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3)和多功能泛素化结合折叠蛋白(SQSTM1/p62)的表达结果显示,与A组比较,B组及C组的心肌自噬标志蛋白LC3(LC3 II/I)表达下调,p62表达上调,且C组更明显。结论 心肌自噬活性的改变在肾去神经联合氨氯地平治疗高血压相关性心肌肥厚中起到重要的作用。

关键词 自发性高血压; 肾脏去神经; 氨氯地平; 心肌肥厚; 心肌自噬

中图分类号 R 544.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1509-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.005

高血压是心力衰竭的重要病因之一,其可以激活交感神经分泌肾上腺素能体液因子,触发心肌肥厚的发生、发展。部分动物实验^[1-3]和小样本临床试验^[4-5]证实,经双侧肾动脉去交感神经治疗,可抑制肾交感神经活性降低血压减缓心脏肥厚的进展。前期动物实验^[6-7]显示,双侧肾动脉去神经联合美托洛尔或氯沙坦治疗,能抑制自发性高血压诱导的心肌肥厚。同时,既往血管紧张素II刺激心肌细胞

肥大模型实验^[8]表明,抑制心肌细胞自噬可减轻心肌细胞肥大。然而,心肌自噬在双侧肾去神经联合氨氯地平治疗高血压心肌肥厚中的作用仍不明确。该研究拟通过自发性高血压大鼠心肌肥厚动物模型,探讨心肌自噬在肾去神经联合氨氯地平治疗高血压心肌肥厚中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 SFP级8周龄雄性自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat, SHR)大鼠24只,体重(142.17 $\pm$ 11.35)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,SCXK(京)2016-0001;氨氯地平购自大连美仑生物技术有限公司(MB1725);RNA逆转录及荧光定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;Western blot相关试剂购自上海索莱宝生物科技有限公司;细胞裂解液NP-40及Western发光试剂购自上海碧云天公司;PVDF膜购自瑞士罗氏公司;辣根过氧化物二抗购自武汉博尔德公司;多功能泛素化结合的折叠蛋白(sequestosome1, SQSTM1/p62)和微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;GAPDH抗体购自美国Epitomics公司。

1.2 方法

1.2.1 高血压心肌肥厚动物模型构建及分组 参照先前关于自发性高血压大鼠的实验^[6]结果,12周龄的SHR可出现高血压心肌肥厚改变。本实验以12周龄的SHR作为高血压心肌肥厚的研究对象。依据是否进行双侧肾动脉去神经治疗,随机分为3组:假手术组(A组)、双侧肾动脉去神经+空白药物对照组(B组)、双侧肾动脉去神经+氨氯地平组(C组),共3组,每组8只动物。

1.2.2 动物给药途径和参照的剂量 根据文献^[9]选定剂量,C组每天给予氨氯地平原药(MB1725)10 mg/kg灌胃,A、B组的大鼠分别每天给予等体积生理盐水和等剂量的空白对照药物灌胃,连续4周。

2018-05-10 接收

基金项目: 广东省自然科学基金(编号: 2015A030310068);广州市卫生与计划生育科技项目(编号: 20161A011081)

作者单位: 广州医科大学附属第三医院¹ 心血管内科、² 临床检验中心, 广州 510150

作者简介: 黄炯华,男,博士,主治医师,责任作者, E-mail: mdhjh2014@126.com

1.2.3 左室体重指数(left ventricular mass index, LVMI)的测定 干预治疗4周,大鼠用乌拉坦麻醉处死后,快速获取心脏,称全心重(heart weight, HW),并快速分离左心室并称重(left ventricular weight, LVW),以LVW与HW之比计算LVMI。

1.2.4 心肌HE染色 干预治疗4周,获取大鼠的心脏,用10%福尔马林固定,石蜡包埋,心脏横切切片,HE染色。组织切片显微镜观察并拍照。

1.2.5 肥厚基因的表达的检测 取100 mg左心室组织剪碎,用TRIzol试剂匀浆,抽提组织总RNA。用RT-PCR试剂盒检测 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)和心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)的表达量。RT-PCR引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
18s	F: ACCGCAGCTAGGAATAATGGA
	R: GCCTCAGTTCCGAAAACCA
ANP	F: GGGGGTAGGATTGACAGGAT
	R: CTCAGGAGGGTATTACCA
β -MHC	F: CCTCGCAATATCAAGGGAAA
	R: TACAGGTGCATCAGCTCCAG

1.2.6 自噬标志蛋白定量测定 心肌组织收集后采用NP-40裂解液进行抽提,蛋白浓度通过BCA法测定。约取样品40 μ g蛋白进行电泳分离和转膜。将承载有目的蛋白膜用5%脱脂奶粉进行封闭1 h,然后加入单克隆抗体p62、LC3和GAPDH于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。孵育过夜的蛋白膜用PBS-T液洗涤后,加入免疫二抗进行孵育免疫共沉淀反应。免疫复合物通过曝光液进行曝光获取底片。蛋白相对表达量用内对照蛋白GAPDH标准化后计算获取。

1.3 统计学处理 采用SPSS 18.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间多重比较采用LSD- t 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏形态及局部病理结构变化 获取心脏标本,观察形态变化;并行横切面HE染色,观察大鼠心肌组织局部的病理变化。结果表明,心脏形态比较可见B组、C组较A组小,以C组更明显。HE染色:A组室壁较厚,心腔变小,向心性肥厚,B组、C组心室壁厚度明显减小,见图1。

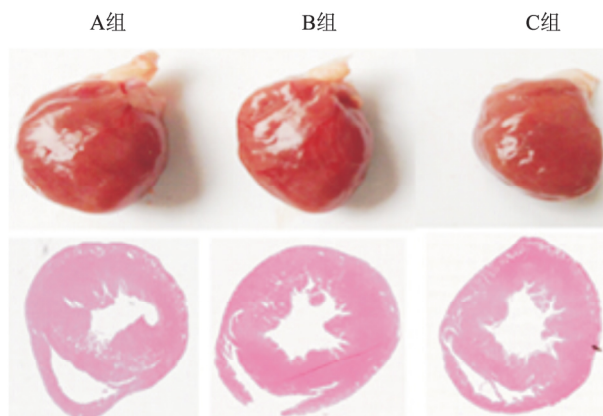


图1 各组大鼠心脏形态及横切面HE病理切片的变化 SP $\times 20$

2.2 各组大鼠LVMI的变化 通过计算各组大鼠LVMI并进行比较。结果显示,A组、B组和C组LVMI分别为 $(4.43 \pm 0.83) \times 10^{-3}$ 、 $(3.21 \pm 0.61) \times 10^{-3}$ 及 $(2.22 \pm 0.65) \times 10^{-3}$,组间比较差异有统计学意义($F = 85.39$, $P < 0.01$)。其中与A组比较,B、C组的LVMI减低;与B组比较,C组降低更明显,差异均有统计学意义。见图2。

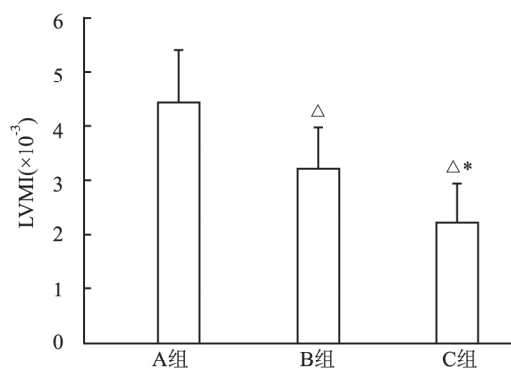


图2 各组大鼠LVMI的变化

与A组比较: $\Delta P < 0.05$; 与B组比较: $* P < 0.05$

2.3 各组大鼠心肌肥厚基因表达的变化 RT-PCR测定结果显示,A组、B组和C组ANP的相对表达量分别为 (1.03 ± 0.13) 、 (0.6 ± 0.06) 及 (0.41 ± 0.07) ,组间比较差异有统计学意义($F = 89.39$, $P < 0.01$); β -MHC的相对表达量分别为 (0.99 ± 0.12) 、 (0.59 ± 0.06) 及 (0.32 ± 0.05) ,组间比较差异有统计学意义($F = 134.22$, $P < 0.01$)。其中与A组比较,B组和C组的ANP和 β -MHC下调;与B组比较,C组下调更明显,差异均有统计学意义。见图3。

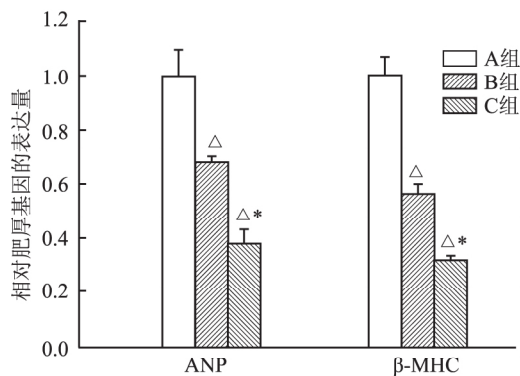


图3 心肌组织肥厚基因(ANP和β-MHC)表达的变化
与A组比较: $\Delta P < 0.05$; 与B组比较: $* P < 0.05$

2.4 心肌自噬活性标志蛋白的表达变化 Western blot 检测结果显示, A组 LC3-II 的表达增加, B组和C组表达减少, 组间比较差异有统计学意义 ($F = 3.20$, $P < 0.05$); 而B组和C组的 p62 表达增加, 以C组明显, 组间比较差异有统计学意义 ($F = 28.12$, $P < 0.05$)。见图4。

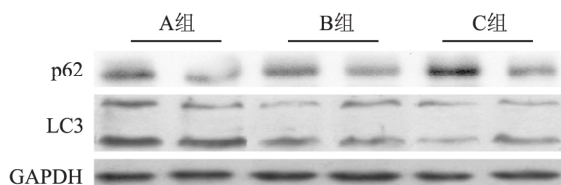


图4 心肌组织自噬活性标志蛋白(LC3和p62)表达的变化

3 讨论

本研究结果显示心肌自噬活性改变在双肾动脉去神经治疗高血压心肌肥厚起到重要作用, 其中以联用氨氯地平治疗时其效果更明显。既往实验^[6]表明, 12周龄 SHR 呈现心肌肥厚改变。为此, 本研究以12周龄 SHR 为心肌肥厚的研究对象, 探讨心肌自噬在肾去神经及联合氨氯地平治疗高血压大鼠心肌肥厚中的作用。

压力负荷是致心肌肥厚的重要诱因, 心肌肥厚的病理表现为心室壁变厚、心肌重量增加、心肌细胞肥大、心肌纤维化、肥厚基因表达增加。心肌肥厚的持续加剧, 会导致患者不良预后, 如心源性猝死和心力衰竭^[10]。为此, 左室肥厚作为心力衰竭的独立预测因素^[11]。目前, 本研究12周龄 SHR 的心肌增厚, 肥厚基因表达增加, 心肌病理切片显示肥厚改

变, 这与既往压力负荷诱导心肌肥厚的结果一致。同时, 本研究结果显示通过对高血压心肌肥厚的大鼠施行双侧肾动脉去神经治疗或联合苯磺酸氨氯地平治疗均能改善心肌肥厚的相关指标, 其中以后者更显著。

生理水平的自噬反应是机体维持内环境稳定所必需的过程。然而, 自噬过度或不足均会导致疾病的发生和发展。既往研究^[12]表明, 压力负荷诱导的心肌肥厚, 存在自噬的过度激活; 自噬的过度激活是压力负荷心肌肥厚的主要参与者^[13]。先前的研究^[14]证实, LC3(LC3 II / I) 和 p62 是联合评价体内自噬活性的标志蛋白, 当体内自噬活性增加时, LC3 II / I 的表达上调, 而 p62 表达下调; 当体内自噬活性受抑制时, 其表达侧相反。目前本研究 SHR 诱导的大鼠心肌肥厚的实验中, LC3 II / I 的表达上调, 而 p62 表达下调; 经肾去神经治疗后, 其两者的表达相反, 其中以联合氨氯地平治疗组更明显。这些结果表明, 心肌自噬活性的改变在双侧肾动脉去神经或联合氨氯地平抑制心肌肥厚中起到重要作用。

综上所述, 笔者猜测肾去神经联合氨氯地平抑制高血压性心肌肥厚, 其作用可能与心肌自噬活性改变相关。

参考文献

- [1] Watanabe H, Iwanaga Y, Miyaji Y, et al. Renal denervation mitigates cardiac remodeling and renal damage in Dahl rats: a comparison with β -receptor blockade[J]. Hypertens Res, 2016, 39(4): 217-26.
- [2] Zheng H, Liu X, Sharma N M, et al. Renal denervation improves cardiac function in rats with chronic heart failure: effects on expression of β -adrenoceptors[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 311(2): H337-46.
- [3] Patel K P, Xu B, Liu X, et al. Renal denervation improves exaggerated sympathoexcitation in rats with heart failure: a role for neuronal nitric oxide synthase in the paraventricular nucleus[J]. Hypertension, 2016, 68(1): 175-84.
- [4] Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study[J]. Lancet, 2009, 373(9671): 1275-81.
- [5] Dai Q, Lu J, Wang B, et al. Effect of percutaneous renal sympathetic nerve radiofrequency ablation in patients with severe heart failure[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(6): 9779-85.
- [6] 区德锦, 林育辉, 戴文军, 等. 肾脏去神经联用氯沙坦对高血

- 压心脏肥厚的作用及机制[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(18): 2978–83.
- [7] 黄炯华, 戴文军, 林育辉, 等. 肾脏去神经联合美托洛尔对自发性高血压大鼠的血压和心脏肥厚的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2016, 32(11): 1159–63.
- [8] Huang J, Pan W, Ou D, et al. LC3B, a protein that serves as an autophagic marker, modulates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66(6): 576–83.
- [9] Maida K D, Vieira S, Gastaldi A C, et al. Amlodipine and enalapril promote distinct effects on cardiovascular autonomic control in spontaneously hypertensive rats: the role of aerobic physical training[J]. *J Hypertens*, 2016, 34(12): 2383–92.
- [10] Schelbert E B, Wong T C, Gheorghiadu M. Think small and examine the constituents of left ventricular hypertrophy and heart failure: cardiomyocytes versus fibroblasts, collagen, and capillaries in the interstitium[J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(9): e002491.
- [11] Tsao C W, Gona P N, Salton C J, et al. Left ventricular structure and risk of cardiovascular events: a framingham heart study cardiac magnetic resonance study[J]. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(9): e002188.
- [12] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 619–24.
- [13] Rifki O F, Bodemann B O, Battiprolu P K, et al. RalGDS-dependent cardiomyocyte autophagy is required for load-induced ventricular hypertrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 59(6): 128–38.
- [14] Esteban-Martinez L, Boya P. Autophagic flux determination *in vivo* and *ex vivo*[J]. *Methods*, 2015, 75(3): 79–86.

The role of cardiac autophagy on renal denervation combined with amlodipine treating myocardial hypertrophy

Huang Jionghua¹, Song Daifu¹, Ou Dejin², et al

(¹Dept of Cardiology, ²Dept of Laboratory Medicine, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150)

Abstract Objective To explore the effects of cardiac autophagy on renal denervation combined with amlodipine treating hypertension-related myocardial hypertrophy in spontaneous hypertension rats (SHR). **Methods** The models of hypertension-related myocardial hypertrophy were constructed by twelve-week male SHRs, and divided into three groups: the sham-operated group (A group), bilateral renal artery denervation combined with blank drug treatment (B group) and bilateral renal artery denervation combined with amlodipine treatment (C group). After 4 weeks postsurgery combined with drugs treatment, the expression of hypertrophy-related gene was detected by RT-PCR, left ventricular mass index was calculated, histological sections were stained with HE and the expression of autophagic activity mark proteins were detected by Western blot. **Results** At the end of 4 weeks after postsurgery, compared with A group, the result of histological sections and hypertrophy-related gene expression (β -MHC and ANP) reduced in B group and C group. Moreover, the data of left ventricular mass index showed similar results. The autophagy-related protein data showed that compared with A group, LC3 II / I was significantly decreased, but the p62 was significantly increased in B group and C group, and the data in C group was particularly obvious. **Conclusion** Renal denervation combined with amlodipine can inhibit hypertension-related myocardial hypertrophy, and its mechanism may be related with altering autophagic activity.

Key words spontaneous hypertension; renal denervation; amlodipine; myocardial hypertrophy; myocardial autophagy