维普资讯 http://www.cqvip.com

· 论著 ·

β_3-肾上腺素能受体阻断剂对心力衰竭大鼠心功能及内皮型一氧化氮合酶表达的影响

甘润韬 李为民 王旭 吴双 孔一慧

【摘要】 **目的** 探讨 β_3-肾上腺素能受体(β_3-AR)阻断剂(SR59230A)对异丙肾上腺素(ISO)诱导心力衰竭(心衰)大鼠心功能及左室重构影响的作用机制。**方法** 选择雄性 Wistar 大鼠 85 只,采用随机方法分组。8 只作为对照组,另 77 只应用 ISO 制备心衰模型,共存活 20 只。再按随机数字表法将存活动物分为 ISO 组($n=10$)及 SR59230A 组(SR 组,$n=10$)。ISO 组给予生理盐水 1 ml,每日 2 次腹腔注射;SR 组给予 SR59230A(85 nmol溶于 1 ml 生理盐水),每日 2 次腹腔注射;对照组不予处置。治疗 6 周后 SR 组与 ISO 组各死亡 1 只,对各组存活大鼠进行有创血流动力学、左心室重量/体重(LVW/BW)比值、肺脏重量/体重(PW/BW)比值测定;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的 mRNA 与蛋白表达,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定心肌组织环磷酸鸟苷(cGMP)水平。**结果** 与对照组比较,ISO 组左室收缩末期压力(LVESP)、左室压力最大上升或下降速率(±dp/dtmax)均显著降低(P 均<0.01),而心率(HR)、左室舒张末期压力(LVEDP)均显著增高(P 均<0.01)。与 ISO 组比较,SR 组 LVESP、±dp/dtmax 均明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但与对照组比较差异仍有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。SR 组 HR、LVEDP 较 ISO 组均明显降低($P<0.05$ 和 $P<0.01$),其中 HR 与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而 LVEDP 仍显著高于对照组($P<0.01$)。与 ISO 组比较,SR 组 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达水平及心肌组织 cGMP 水平均显著降低(P 均<0.01)。此外,SR 组较 ISO 组 LVW/BW 比值及 PW/BW 比值均明显降低(P 均<0.05)。**结论** 长期给予 β_3-AR 阻断剂 SR59230A 可以有效阻断心衰动物的 β_3-AR-NOS-cGMP 通路,显著改善心功能,并在一定程度上改善心室重构。

【关键词】 心力衰竭; 肾上腺素能受体阻断剂; 心功能; 心室重构; 大鼠

Effect of β_3-adrenoceptor antagonist on the cardiac function and expression of endothelial nitric oxide synthase in a rat model of heart failure

GAN Run-tao, LI Wei-min, WANG Xu, WU Shuang, KONG Yi-hui. Department of Cardiology, The First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of β_3-adrenoceptor (β_3-AR) antagonist (SR59230A) on the cardiac function and left ventricular remodeling in a rat model of heart failure induced by isoprel (ISO), and to probe into its mechanism. **Methods** Eight rats were randomly selected to serve as controls from 85 male adult Wistar rats. After a heart failure model was reproduced, twenty remain rats were randomly divided into ISO group ($n=10$) and SR59230A group (SR group, $n=10$). ISO group received intraperitoneal injection of 1 ml saline twice a day; SR group received intraperitoneal injection of 85 nmol SR59230A in 1 ml saline twice a day; control group received no treatment. The parameters determined included echocardiogram, the expression of nitric oxide synthase (eNOS) of left ventricle by the technique of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, cyclic guanosine monophosphate (cGMP) level by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the ratio of left ventricular weight and body weight (LVW/BW), and the ratio of lung weight and body weight (PW/BW). **Results** Compared with control group, the left ventricular end systolic pressure (LVESP), the maximun and minimun first derivative of left ventricular pressure (± dp/dtmax) were significantly decreased (all $P<0.01$), while heart rate (HR) and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) were significantly increased (both $P<0.01$) in ISO group. Compared with ISO group, LVESP, ±dp/dtmax were markedly higher ($P<0.05$ or $P<0.01$) respectively, whereas HR and LVEDP were markedly lower ($P<0.05$ and $P<0.01$) in SR group, and there was no difference in HR between SR group and control group ($P>0.05$), while LVEDP was higher in RS group than control group ($P<0.01$). The levels of eNOS mRNA, protein and cGMP were significantly lower in SR group compared with ISO group (all $P<0.01$). In addition, when compared with ISO group, LVW/BW ratio and PW/BW ratio in SR group were also decreased (both $P<0.05$). **Conclusion** β_3-AR antagonist SR59230A can block the β_3-AR-NOS-cGMP pathway and improve cardiac function in heart failure in rat when if is administered for a long term. SR59230A can also improve left ventricular remodeling in a certain degree.

【**Key words**】 heart failure; adrenoceptor antagonist; cardiac function; remodeling; rat

维普资讯 http://www.cqvip.com

有研究报道心力衰竭(心衰)时 β_1-肾上腺素能受体(β_1-AR)及 β_2-AR 在异常升高的儿茶酚胺作用下出现了显著的减敏与下调[1-2];然而也有研究发现,心肌细胞上的 β_3-AR 在心衰时明显上调,而且由于缺乏 β 受体激酶(βARK)作用的细胞内磷酸化位点,β_3-AR 相对耐受减敏[3-4]。这使得在生理情况下作用并不明显的 β_3-AR 在心衰时起着重要的调节作用。有研究发现,应用选择性 β_3-AR 激动剂 BRL37344 可以明显加重心衰动物的心功能抑制,加重心衰症状[5]。然而,长期应用 β_3-AR 阻断剂是否能够对心衰起到治疗作用,其机制如何,尚未见报道。本课题应用特异性 β_3-AR 阻断剂(SR59230A)长期干预异丙基肾上腺素(ISO)造成的心衰大鼠,通过血流动力学、酶联免疫吸附法(ELISA)分子生物学、等方法,对其疗效作初步评价并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验分组及给药:选取体重为 200～240 g 的雄性 Wistar 大鼠(由哈尔滨医科大学实验动物中心提供)85 只,按随机数字表法分组。8 只作为对照组;另 77 只皮下注射 ISO(Sigma,美国)340 mg/kg,连续 2 d,随后饲养 4 周形成心衰模型,共存活 20 只大鼠。按照随机数字表法将存活动物分为 ISO 组与 SR59230A 组,每组 10 只。ISO 组腹腔注射生理盐水 1 ml,每日 2 次;SR 组给予 SR59230A(Sigma,美国,85 nmol 溶于 1 ml 生理盐水中),每日 2 次腹腔注射;对照组不予处置。治疗 6 周后 SR 组与 ISO 组各死亡 1 只,各组存活大鼠测定各种指标。

1.2 有创血流动力学测定:腹腔注射麻醉大鼠,分离右颈总动脉,结扎远心端,穿刺该段动脉置入充满肝素盐水的微导管,将导管逆行送入左心室。应用 32 道生理记录仪测定心率(HR)、左室舒张末期压力(LVEDP)、左室收缩末期压力(LVESP)、左室压力最大上升速率(+dp/dtmax)、左室压力最大下降速率(−dp/dtmax)。

1.3 脏器重量/体重比值:血流动力学测定后立即开胸,取出心脏、肺脏以磷酸盐缓冲液(PBS)冲去残血,滤纸吸干表面,分离左心室,测定左室重量/体重(LVW/BW)比值及肺脏重量/体重(PW/BW)比值。另外迅速留取左心室前壁组织,置于液氮中冷冻,然后储存于-70 C冰箱备用。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA 表达:采用离心柱式总 RNA 提取试剂盒(上海生工公司),按说明书提取总 RNA。取总 RNA 2 μg进行逆转录,逆转录条件为 37 C、1 h。PCR 引物序列按文献[6-7]方法,由上海英骏生物技术公司合成。eNOS 正向引物:5′-TGC ACC CTT CCG GGG ATT CT-3′;反向引物 5′-GGA TCC CTG GAA AAG GCG GT-3′。PCR 反应条件为 94 C、3 min,94 C、30 s,55 C、30 s,72 C、1 min,30 个循环,72 C、10 min,扩增片段长度 189 bp。β-actin 正向引物:5′-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AA-3′;反向引物:5′-AGC CAT GCC AAA TGT GTC AT-3′,反应条件为 94 C、3 min,94 C、45 s,56 C、45 s,72 C、2 min,35 个循环,72 C、10 min,扩增片段长度 387 bp。取 5 μl 产物,经质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭显色后应用 ChampGel-3000 成像系统(赛智,北京)进行图像分析。eNOS 的 RNA 表达量以其与 β-actin 条带的灰度值比值来表示。

1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定 eNOS 蛋白表达:心肌组织总蛋白按常规方法提取,蛋白质核算计算器(Amersham,瑞典)测定蛋白质含量。取各组蛋白和标准蛋白,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至硝酸纤维素膜上,丽春红染色后观察转移效果。封闭液 37 C封闭 1 h,加入兔抗 eNOS(Santa Cruz,美国,以 1∶1 000稀释后杂交),然后再用碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(Promeaga,美国,以 1∶5 000 稀释后杂交)。显色后应用 ChampGel-3000 成像系统进行分析,以 β-actin 为内参照,计算 eNOS 与 β-actin蛋白条带的灰度值比值。

1.6 ELISA 测定心肌组织环磷酸鸟苷(cGMP)表达:心肌组织在液氮低温下充分研磨,液氮蒸发后称取 200 mg 组织,加入 10 倍体积的 0.1 mmol/L HCl 匀浆,室温下 600×g 离心 10 min,取上清,按 cGMP 酶联免疫测定试剂盒(Sigma,美国)说明书逐步操作,cGMP 含量最后由全波长酶标仪(Bio-tek,美国)直接读取,结果以 pmol/g 表示。

1.7 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较用方差分析,两组间比较用 q 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

基金项目:黑龙江省卫生厅医学科研课题(2006-041);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11511228);黑龙江省研究生创新科研基金资助项目(200401060)

作者单位:150001 黑龙江,哈尔滨医科大学第一临床医学院心内一科

作者简介:甘润韬(1971-),男(回族),黑龙江省人,博士,副主任医师,主要从事心力衰竭干预研究,发表核心期刊论文 10 余篇,其中 SCI 收录 1 篇(Email:ganrt@126.com)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 3 组大鼠脏器重量/体重比值和有创血流动力学结果比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of ratio of organ weight and body weight and invasive hemodynamics in three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	体重(g)	LVW/BW(mg/g)	PW/BW(mg/g)	HR(次/min)	LVESP(mm Hg)	LVEDP(mm Hg)	+dp/dtmax(mm Hg/s)	-dp/dtmax(mm Hg/s)
对照组	8	243±15	2.48±0.11	6.54±0.34	300±12	130.71±7.63	3.07±0.56	2 530± 98	2 463±90
ISO 组	9	230±12	2.80±0.13#	8.02±0.66#	328±12#	111.14±4.49#	9.93±1.57#	2 257± 93#	2 143±85#
SR 组	9	235±15	2.64±0.15*△	7.39±0.46#△	307±15△	123.71±5.65*☆	6.36±0.93#☆	2 389±106#△	2 263±95#△

注：与对照组比较：*$P<0.05$，#$P<0.01$；与 ISO 组比较：△$P<0.05$，☆$P<0.01$；1 mm Hg=0.133 kPa

2 结 果

2.1 脏器重量/体重比值(表 1)：各组大鼠体重比较差异均无统计学意义(P 均>0.05)；ISO 组和 SR 组 LVW/BW 比值及 PW/BW 比值均较对照组显著增加，但 SR 组较 ISO 组有明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 有创血流动力学测定(表 1)：ISO 组 LVESP、±dp/dtmax 均较对照组显著降低(P 均<0.01)，而 HR、LVEDP 均显著增高(P 均<0.01)。SR 组 LVESP、±dp/dtmax 均较 ISO 组有明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，与对照组比较差异仍有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。SR 组 HR、LVEDP 均较 ISO 组明显降低($P<0.05$ 和 $P<0.01$)，其中 HR 与对照组比较差异无统计学意义，而 LVEDP 仍显著高于对照组($P<0.01$)。

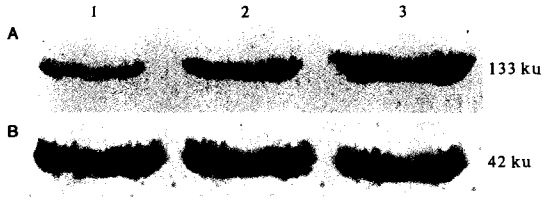
2.3 心肌组织 eNOS 蛋白表达(表 2，图 1)：ISO 组和 SR 组的 eNOS 蛋白表达均明显高于对照组(P 均<0.01)，SR 组 eNOS 蛋白表达低于 ISO 组($P<0.01$)。

表 2 3 组大鼠心肌组织 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达及 cGMP 含量($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Expression level of eNOS mRNA and protein and cGMP content in rat hearts in three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	eNOS mRNA	eNOS 蛋白	cGMP(pmol/g)
对照组	8	0.39±0.08	0.33±0.10	8.9±2.9
ISO 组	9	0.93±0.09#	1.14±0.08#	19.5±4.1#
SR 组	9	0.46±0.06☆	0.65±0.14#☆	13.3±4.0*☆

注：与对照组比较：$P<0.05$，#$P<0.01$；与 ISO 组比较：☆$P<0.01$

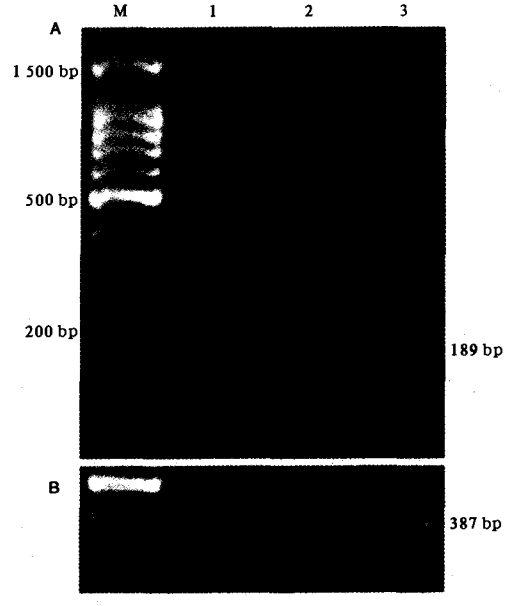


A：eNOS；B：β-actin；1：对照组；2：SR 组；3：ISO 组

图 1 Western blotting 测定 eNOS 蛋白表达

Figure 1 Western blotting results of eNOS protein expression in rat hearts

2.4 心肌组织 eNOS mRNA 表达(表 2，图 2)：ISO 组 eNOS mRNA 明显高于对照组，而 SR 组则明显降低(P 均<0.01)，SR 组与 ISO 组比较差异也有统计学意义($P<0.01$)。



A：eNOS mRNA；B：β-actin mRNA；M：Marker；1：对照组；2：SR 组；3：ISO 组

图 2 RT-PCR 测定 eNOS mRNA 表达

Figure 2 RT-PCR results of eNOS mRNA expression in rat hearts

2.5 cGMP 含量(表 2)：ELISA 检测结果显示，ISO 组和 SR 组的 cGMP 含量均较对照组明显增高(P 均<0.01)，而 SR 组则较 ISO 组明显下降($P<0.01$)。

3 讨 论

研究表明，超过 85 mg/kg 的 ISO 即可造成弥漫性心肌损害，最终引起动物出现扩张性心肌病心衰。我们应用 340 mg/kg 的 ISO 进行干预，24 h 内死亡率达 68%，与文献[8]报道结果接近，结合有创血流动力学检查可知心衰动物模型制备成功。

本研究发现，治疗 6 周后 SR 组 ±dp/dtmax、LVESP 较 ISO 组明显提高，而 HR、LVEDP 显著下降，提示 β_3-AR 可使慢性阻断心衰大鼠心功能得到改善，心脏射血能力增强，左心室残余血量减少，

维普资讯 http://www.cqvip.com

进而反射性地减慢心率，此结果与 Morimoto 等[9]的研究相似，也说明在心衰时 β_3 - AR 的过度激活在多个种属都是存在的。此外，SR 组大鼠 PW/BW 比值较 ISO 组显著减低，很可能与 SR 组 LVEDP 降低使肺淤血减轻有关，同样提示 β_3 - AR 阻断剂能够改善心衰大鼠的心功能。

为了进一步阐明心脏收缩功能改善的机制，我们应用 RT - PCR、Western blotting 及 ELISA 等手段分别测定了各组心肌的 eNOS mRNA 和蛋白表达水平以及心肌 cGMP 含量。结果显示，无论是 mRNA 水平还是蛋白水平，SR 组 eNOS 表达较 ISO 组均有显著下降，同时心肌 cGMP 含量也有明显降低。有研究发现，无论是人类还是动物，心室 β_3 - AR的信号转导途径都与脂肪等组织中有所不同[10-11]，β_3 - AR 不与兴奋性 G 蛋白(Gs)相耦联，而是与抑制性 G 蛋白(Gi)耦联，激活 NOS，产生 NO，进而活化鸟苷酸环化酶(GC)，使 cGMP 产生增加，而在心室肌主要表达 eNOS，几乎不表达 NOS 的其他亚型，因此，β_3 - AR - Gi/o - NOS - GC - cGMP 是 β_3 - AR 产生负性肌力的主要途径。SR 组 eNOS 表达水平及 cGMP 含量明显降低，说明该转导途径受到有效的阻断。因此，这很可能就是长期应用 SR59230A 能够改善心功能的机制。本研究还发现，SR 组 LVW/BW 比值较 ISO 组明显降低，提示慢性阻断心衰动物的 β_3 - AR 可以在一定程度上改善心室重构。其原因可能是多方面的，首先 β_3 - AR 阻断后心功能得到一定程度的改善，使 LVEDP 降低，室壁张力下降，可能减轻心室重构；其次心功能改善后，神经内分泌激活状态也可能有所改善，使心室重构减轻；另外，以往的研究发现，β_3 - AR 激活可加重衰竭心肌细胞的凋亡，因此，阻断 β_3 - AR 可能起到抑制凋亡的作用而改善心室重构[12]。总之，目前的 β_3 - AR阻断对于心室重构的影响机制尚不明确，有待于进一步深入研究。应当指出，虽然 SR 组心功能较 ISO 组明显改善，但是除 HR 外其他血流动力学指标与对照组比较差异均有统计学意义，说明 SR59230A 治疗作用是部分的、不完全的。考虑其主要是由于心衰时存在着多种异常激活的神经内分泌信号，并且它们之间存在着复杂的交互作用，因此干预一个靶点或一个信号途径是难以使心衰完全逆转的。此外，ISO 造成了大鼠不可逆性的心肌坏死以及治疗时间相对较短，可能也是重要的原因。

综上，本研究发现，β_3 - AR 阻断剂 SR59230A 可显著阻断心衰大鼠的 β_3 - AR - NOS - cGMP 通路，改善心功能，并在一定程度上改善心室重构，提示阻断 β_3 - AR 有可能成为心衰治疗的新策略。

参考文献：

1 Bristow M R, Ginsburg R, Minobe W, et al. Decreased catecholamine sensitivity and β - adrenergic - receptor density in failing human hearts[J]. N Engl J Med, 1982, 307(4): 205 - 211.

2 Brodde O E. β - adrenoceptors in cardiac disease[J]. Pharmacol Ther, 1993, 60(3): 405 - 430.

3 Cheng H J, Zhang Z S, Onishi K, et al. Upregulation of functional β_3 - adrenergic receptor in the failing canine myocardium[J]. Circ Res, 2001, 89(7): 599 - 606.

4 Langin D, Tavernier G, Lafontan M. Regulation of beta3 - adrenoceptor expression in white fat cells[J]. Fundam Clin Pharmacol, 1995, 9(2): 97 - 106.

5 Kitamura T, Onishi K, Dohi K, et al. The negative inotropic effect of beta3 - adrenoceptor stimulation in the beating guinea pig heart[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 35(5): 786 - 790.

6 Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, et al. Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non - infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat[J]. Int J Cardiol, 2000, 76(2 - 3): 135 - 145.

7 Dincer U D, Bidasee K R, Güner S, et al. The effect of diabetes on expression of β_1 -, β_2 -, and β_3 - adrenoreceptors in rat hearts[J]. Diabetes, 2001, 50(2): 455 - 461.

8 Teerlink J R, Pfeffer J M, Pfeffer M A. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol - induced myocardial necrosis in rats[J]. Circ Res, 1994, 75(1): 105 - 113.

9 Morimoto A, Hasegawa H, Cheng H J, et al. Endogenous β_3 - adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(6): H2425 - H2433.

10 Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, et al. The negative inotropic effect of β_3 - adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle[J]. J Clin Invest, 1998, 102(7): 1377 - 1384.

11 Varghese P, Harrison R W, Lofthouse R A, et al. β_3 - adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide - dependent inhibition of myocardial contractility[J]. J Clin Invest, 2000, 106(5): 697 - 703.

12 孔一慧，李为民，田颖. β_3 受体激动剂对心力衰竭大鼠 β_3 -肾上腺素能受体基因表达及其对细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学，2004，16(3)：142 - 147.

(收稿日期：2007 - 07 - 08)

(本文编辑：李银平)

· 广告目次 ·

①深圳迈瑞：监护仪 …… (封二)

②廊坊爱尔：炭肾 …… (插页)

③锐普生物：TnI 试剂盒 …… (插页)

④天津生化制药：琥珀氢可 …… (封三)

⑤广东天普药业：天普洛安 …… (封底)