

下丘脑室旁核炎性细胞因子在依普利酮改善心力衰竭中的作用

王涛, 刘强, 虞华鹏, 李岱旭, 贾如意

(济南市心血管病研究所 济南市第四人民医院心内科, 山东省济南市 250031)

[关键词] 依普利酮; 下丘脑; 心力衰竭; 炎性细胞因子

[摘要] **目的** 探讨下丘脑室旁核(PVN)炎性细胞因子在依普利酮(EPL)改善心力衰竭中的作用。**方法** Wistar大鼠分为假手术组($n=6$)、模型组($n=10$)、吡咯烷二硫基甲酸盐(PDTC)组($n=10$)、依普利酮组($n=10$)。结扎左冠状动脉前降支诱导急性心肌梗死后心力衰竭,根据分组情况分别给予PDTC[(150 mg/(kg·d))、依普利酮[30 mg/(kg·d)]和清洁蒸馏水灌胃,假手术组只在相同位置穿线而不结扎。6周后进行血流动力学测定,留取下丘脑、血浆标本,检测PVN内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、核因子 κ B/p65(NF- κ B/p65)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)及血管紧张素II(Ang II)的表达,并检测血浆TNF- α 、去甲肾上腺素(NE)、醛固酮(ALD)水平。**结果** 依普利酮和PDTC干预后大鼠心功能较模型组明显改善。模型组血浆ALD、NE、TNF- α 水平显著升高,而依普利酮和PDTC干预后ALD、NE、TNF- α 水平降低($P<0.05$)。模型组PVN内CRH、Ang II表达显著增多,依普利酮和PDTC干预后PVN内CRH、Ang II表达显著减少($P<0.05$),NF- κ B/p65在依普利酮组和PDTC组的表达较模型组显著降低($P<0.05$)。依普利酮、PDTC可降低PVN内CRH阳性神经元表达。**结论** 心力衰竭时大鼠PVN内炎性细胞因子表达增多,依普利酮可以改善心力衰竭大鼠心功能,与抑制PVN内炎性细胞因子过表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Proinflammatory Cytokines in Paraventricular Nucleus Involved in Improvement of Heart Failure by Eplerenone

WANG Tao, LIU Qiang, YU Hua-Peng, LI Dai-Xu, and JIA Ru-Yi

(Jinan Institute of Cardiovascular Disease & Department of Cardiology, Jinan Fourth Hospital, Jinan, Shandong 250031, China)

[KEY WORDS] Eplerenone; Hypothalamus; Heart Failure; Proinflammatory Cytokine

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of eplerenone (EPL) on heart failure and inflammatory cytokines in central nervous system. **Methods** Wistar rats were divided into sham group ($n=6$), PDTC treatment group ($n=10$), EPL treatment group ($n=10$) and model group ($n=10$). Then these rats were administrated with PDTC (150 mg/(kg·d)), EPL (30 mg/(kg·d)) and clean distilled water. After six weeks, hemodynamic data was measured, then hypothalamus and serum samples were collected. Cytokines, nuclear factor kappa B (NF- κ B), corticotropin releasing hormone (CRH), aldosterone (ALD) and norepinephrine (NE) was measured. **Results** Eplerenone and PDTC could improve heart function. In the model group, expression of ALD, NE, TNF- α , CRH, Ang II and NF- κ B/p65 increased. Eplerenone and PDTC decreased the expression of these indexes effectively. Expression of CRH positive neurons in the hypothalamus of rats was significantly increased in the model group, which was decreased in eplerenone and PDTC treated group. **Conclusions** Eplerenone could improve heart function in rats with heart failure, which may be related to the inhibition of expression of inflammatory cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus.

下丘脑是一个重要的内脏活动和神经内分泌调节中心,尤其下丘脑室旁核(paraventricular nucle-

us of hypothalamus, PVN)在调节心血管活动和体液平衡中起重要作用。慢性心力衰竭时PVN内神经

[收稿日期] 2014-12-23

[修回日期] 2015-03-18

[作者简介] 王涛,副主任医师,副教授,研究方向为冠心病的介入治疗,E-mail为 wangtao3717@163.com。刘强,硕士,住院医师,研究方向为心律失常与心脏电生理。通讯作者贾如意,博士,主任医师,教授,研究方向为冠心病与心律失常的介入治疗,E-mail为 jrycardiology@163.com。

元代谢活性增加,神经元放电活动增强。研究表明,心衰患者 PVN 内白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 和白细胞介素 18 等炎症细胞因子水平升高^[1-3],在心衰发生发展过程中发挥重要作用。醛固酮(aldosterone, ALD)在心室重构中发挥了重要作用,ALD 受体拮抗剂依普利酮(eplerenone, EPL)可以显著改善心衰患者预后^[4-5]。但关于 PVN 内炎症细胞因子是否参与依普利酮改善心衰的作用尚不明确。本研究试图探讨依普利酮改善心衰的新的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

吡咯烷二硫基甲酸盐(PDTC)、依普利酮(美国 Sigma 公司),即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的链酶亲和素(武汉博士德生物工程有限公司)。生理信号记录仪(MP150,日本 Biopac 公司),正置式荧光显微镜(BX51-TR,日本 Olympus 公司)。

1.2 实验动物

成年雄性 SD 大鼠,体重 200~300 g,由山东中医药大学实验动物中心提供。所有动物研究全部符合国家《实验动物管理条例》。

1.3 模型制备

大鼠麻醉后连接小动物呼吸机、心电图机,分离皮下组织及肌肉,经第 4、5 肋间开胸,用丝线在左心耳下缘 1~2 mm 进针,深度约 1 mm,于肺动脉圆锥处出针,结扎左冠状动脉前降支。以左心室壁颜色发绀及运动减弱,心电图显示明显的 ST 段抬高为结扎成功标志。逐层缝合,增加呼吸机潮气量,使肺充分膨胀。缝合皮肤后向切口处均匀涂抹青霉素钠预防感染。待大鼠恢复自主呼吸后,撤呼吸机。另取 20 只大鼠仅开胸穿线,不结扎,作为假手术组。大鼠给药 4 周后心室导管经颈动脉插入左心室,连接压力传感器,稳定 10 min 后记录左心室内压最大上升或下降速率($\pm dp/dt_{max}$)。

1.4 实验分组

将手术组大鼠随机分为三组,每组 10 只,术后立即给药,持续 4 周。PDTC 组给予核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 拮抗剂 PDTC 灌胃(0.2 g/kg),每日一次;伊普利酮组给予伊普利酮[30 mg/(kg·d)]灌胃,每日一次;模型组以相同体积的蒸馏水灌胃;假手术组以同体积蒸馏水灌胃。

1.5 Western blot 检测 PVN 内 TNF- α 、促肾上腺皮质激素释放激素及血管紧张素 II 蛋白表达

大鼠麻醉后于活体组织剪下头部,留取脑髓质即为下丘脑位置。PBS 冲洗干净后,滤纸吸干液体,提取下丘脑蛋白,BCA 试剂盒进行蛋白定量。10% SDS-PAGE 进行电泳,PVDF 膜印迹。室温封闭 2 h,加入一抗兔抗大鼠多克隆抗体,4℃ 过夜,然后加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h。ECL 化学发光显色,X 光片显影、定影。将胶片进行扫描或拍照,美国 UVP 公司 GDS800 摄取图像,IPP6.0 分析软件对条带进行定量分析。

1.6 ELISA 检测血浆 TNF- α 、去甲肾上腺素、ALD 及下丘脑内 NF- κB /p65 水平

取大鼠血浆及 PVN 组织,按照 ELISA 试剂盒操作步骤进行操作,检测大鼠血浆 NF- κB 、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、ALD 水平。

1.7 免疫组织化学检测

大鼠脑组织经灌注固定后,包埋、切片。实验组加入兔抗大鼠的一抗,4℃ 孵育过夜,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,室温孵育 20 min,再滴加链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC),室温孵育 20 min。切片加入 DAB 反应液,苏木素轻度复染,常规梯度浓度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。显微镜下找到 PVN 所在区域,观察免疫阳性反应情况,其反应 CRH 阳性神经元的表达。用 Image J 图像分析软件,选取免疫组织化学标记的切片,测定切片的积分光密度值(integrated optical density, IOD)。

1.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学改变

模型组大鼠左心室舒张期末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)明显高于假手术组,左心室内压最大上升或下降速率($\pm dp/dt_{max}$)明显低于假手术组($P < 0.05$)。依普利酮和 PDTC 干预的大鼠心功能较模型组明显改善。模型组大鼠心率显著高于假手术组,但依普利酮和 PDTC 干预的大鼠心率显著低于模型组($P < 0.05$;表 1)。

2.2 血浆 TNF- α 、NE 和 ALD 水平

模型组血浆 TNF- α 、NE 和 ALD 水平显著高于假手术组($P < 0.05$),伊普利酮和 PDTC 干预后血浆 ALD、NE 水平低于模型组,但高于假手术组($P <$

0.05;表 2)。

表 1. 大鼠血流动力学($\bar{x} \pm s$)

分 组	LVEDP (mmHg)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)	心率 (次/分)
假手术组	3.2 ± 1.5	6723 ± 354	5897 ± 371	356 ± 56
模型组	13.1 ± 3.4 ^a	3754 ± 213 ^a	3149 ± 208 ^a	467 ± 74 ^a
伊普利酮组	6.4 ± 2.8 ^b	4692 ± 296 ^b	4241 ± 309 ^b	403 ± 63 ^b
PDTC 组	7.3 ± 3.7 ^b	4785 ± 332 ^b	4248 ± 323 ^b	394 ± 59 ^b

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

表 2. 血浆 TNF-α、NE 和 ALD 水平($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TNF-α (ng/L)	NE (ng/L)	ALD (ng/L)
假手术组	6	7.9 ± 4.5	131.1 ± 36.3	0.14 ± 0.07
模型组	10	24.6 ± 8.2 ^a	236.8 ± 47.2 ^a	0.37 ± 0.09 ^a
伊普利酮组	10	11.3 ± 3.4 ^{ab}	148.5 ± 29.4 ^{ab}	0.21 ± 0.1 ^{ab}
PDTC 组	10	12.2 ± 4.8 ^{ab}	151.7 ± 40.8 ^{ab}	0.24 ± 0.11 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

2.3 PVN 内 TNF-α、NF-κB/p65、促肾上腺皮质激素释放激素、血管紧张素 II 的表达

与假手术组相比,模型组 PVN 内 TNF-α、促肾上腺皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone,CRH)、血管紧张素 II (angiotensin II,Ang II) 表达明显增多;伊普利酮和 PDTC 干预后这些指标表达显著减少($P < 0.05$;图 1)。NF-κB/p65 在伊普利酮组和 PDTC 组的表达较模型组相比显著降低($P < 0.05$),但与假手术组相比无显著差异(图 2)。

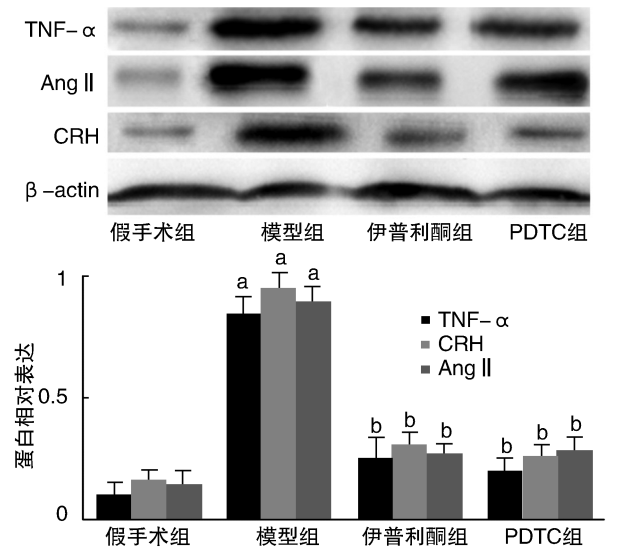


图 1. 大鼠 PVN 内 TNF-α、Ang II 及 CRH 的表达 a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

Figure 1. Expression of TNF-α, Ang II and CRH in PVN in rats

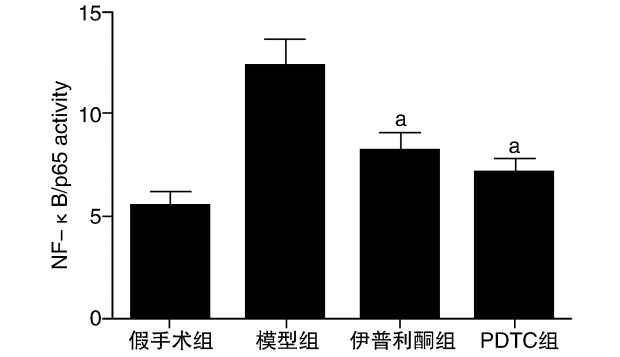


图 2. 大鼠 PVN 内 NF-κB/p65 的表达 a 为 $P < 0.05$,与模型组比较。

Figure 2. Expression of NF-κB/p65 in PVN in rats

2.4 PVN 内 CRH 阳性神经元的表达

模型组 CRH 阳性神经元呈强阳性表达,棕黄色颗粒散在性分布于室旁核神经元及神经胶质细胞胞浆内。假手术组大鼠 PVN 内表达的阳性细胞数极少,伊普利酮和 PDTC 可降低 PVN 内 CRH 阳性神经元表达,棕黄色颗粒较少(图 3)。

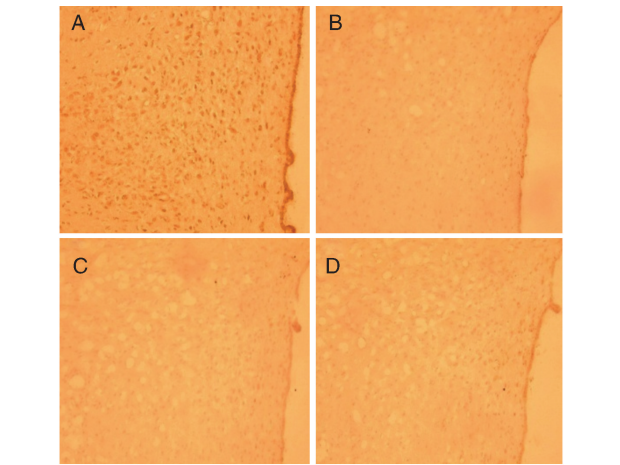


图 3. 大鼠 PVN 内 CRH 阳性神经元的表达($\times 100$) A 为模型组,B 为假手术组,C 为伊普利酮组,D 为 PDTC 组。

Figure 3. CRH positive neurons in PVN in each group($\times 100$)

3 讨论

心衰发生发展的过程中伴随着交感神经活动过度增强,交感神经活性可以加快心衰的进一步恶化^[6]。相应的,通过某些措施使心衰过程中交感神经的兴奋性下降成为当前临床治疗研究中的热点,但未能从根源上解除心衰时交感神经过度激活的状态。中枢神经体液机制的改变会使心衰时本就存在的水钠潴留进一步加剧,导致心功能下降和心衰不断恶化^[7]。而下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamus-pitui-

tary-adrenal cortex axis, HPA) 是联系中枢交感神经系统和外周交感神经系统活性的主要通路, 参与了交感神经活性的调节^[8]。本研究中, PVN 内 CRH 水平升高, 而 PDTC 和依普利酮干预的大鼠 PVN 内 CRH 水平明显降低, 提示心衰时外周交感神经的激活可能是由于 PVN 中炎性细胞因子水平增高引起。PVN 内 CRH 分泌增多, 激活 HPA 轴, 从而进一步通过外周交感神经系统, 并在肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 的参与下, 加速心衰的进展。另有研究证实, 炎性细胞因子有启动 HPA 轴的效应^[9-10]。

NF- κ B 能在转录水平激活各种炎性细胞因子, 而细胞因子如 TNF- α 又可进一步激活 NF- κ B, 因此 TNF- α 出现在细胞因子级联放大反应的上游^[11]。炎性细胞因子不但是 NF- κ B 的激活物, 而且是 NF- κ B 调节的转录产物。NF- κ B 与炎性细胞因子之间存在着广泛而且复杂的联系^[12-13], 在慢性心力衰竭过程中 NF- κ B 通路与炎性细胞因子的始动因素与相互促进机制目前仍无明确结论。本研究给予大鼠 NF- κ B 抑制剂 PDTC 干预, PDTC 干预的心衰大鼠 PVN 内 TNF- α 、CRH、Ang II 含量下降。结果进一步证实了 PDTC 确实可以通过抑制 NF- κ B 通路而减少心衰中炎性细胞因子的作用。而降低中枢内炎性细胞因子水平, 可进一步减弱对 HPA 轴的兴奋作用, 进而减弱外周交感神经兴奋性。

盐皮质激素受体拮抗剂(mineralocorticoid receptor antagonist, MRA) 是重要的 RAAS 阻断剂, 2012 年欧洲心脏病学会心力衰竭诊断与治疗指南中明确指出, 对于应用了血管紧张素转化酶抑制剂和 β 受体阻断剂的基础上加用 ALD 受体拮抗剂可以改善预后。依普利酮是一种新型 MRA, 2013 年美国心脏病学年会(ACC2013) 发布的 REMINDER 研究也指出, 急性心肌梗死后即使没有发生心衰, 尽早应用依普利酮改善临床转归。依普利酮改善心衰的具体机制尚不清楚, 研究发现其可以通过抑制心肌间质纤维化改善心肌重构^[14-15]。本研究首次发现, 依普利酮可以抑制 PVN 内炎性细胞因子表达, 这可能是依普利酮改善心室重构的一种机制。

本研究通过使用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 和盐皮质激素受体拮抗剂依普利酮对心衰大鼠进行干预, 结合本领域已有研究成果, 进一步证实了心衰过程中 PVN 内确有炎性细胞因子参与。本研究中提出了一种新的依普利酮改善心室重构的机制, 同时研究还提示 PDTC 有望将来在心力衰竭的临床治疗中发挥重要作用。

[参考文献]

[1] Liu Q, Wang T, Yu H, et al. Interaction between interleukin-1 beta and angiotensin II receptor 1 in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to progression of heart failure[J]. J Interferon Cytokine Res, 2014, 34 (11): 870-875.

[2] Schulz R, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction[J]? Circulation, 2009, 119 (10): 1 355-357.

[3] Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, et al. Bidirectional role of tumor necrosis factor-alpha in coronary microembolization: progressive contractile dysfunction versus delayed protection against infarction[J]. Circ Res, 2007, 100 (1): 140-146.

[4] van den Berg TN, Deinum J, Bilos A, et al. The effect of eplerenone on adenosine formation in humans in vivo: a double-blinded randomised controlled study [J]. PLoS One, 2014, 9 (10): e111248.

[5] Zannad F, McMurray JJ, Krum H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms[J]. N Engl J Med, 2011, 364 (1): 11-21.

[6] 珠勒皮亚·司马义, 娜儿娜·吾格提, 布海力且木·买买提. 大鼠心肌梗死后左心室重构、电重构和交感神经重构的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (5): 404-408.

[7] Sharma NM, Llewellyn TL, Zheng H, et al. Angiotensin II-mediated posttranslational modification of nNOS in the PVN of rats with CHF: role for PIN[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 305 (6): H 843-855.

[8] Pyner S. The paraventricular nucleus and heart failure[J]. Exp Physiol, 2014, 99 (2): 332-339.

[9] Dunn AJ. Cytokine activation of the HPA axis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 917: 608-617.

[10] Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action[J]. Physiol Rev, 1999, 79 (1): 1-71.

[11] Charmandari E. Primary generalized glucocorticoid resistance and hypersensitivity: the end-organ involvement in the stress response [J]. Sci Signal, 2012, 5 (244): pt5.

[12] Wu CT, Wang ZH, Li ZQ, et al. Effect of spironolactone on cardiac remodeling after acute myocardial infarction[J]. World J Emerg Med, 2013, 4 (1): 48-53.

[13] Kawamura N, Kubota T, Kawano S, et al. Blockade of NF- κ B improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF- α -induced cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Res, 2005, 66 (3): 520-529.

[14] Franco V, Chen YF, Feng JA, et al. Eplerenone prevents adverse cardiac remodelling induced by pressure overload in atrial natriuretic peptide-null mice[J]. Lin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33 (9): 773-779.

[15] Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120 (9): 3 350-364.

(此文编辑 文玉珊)