

纤维化的时间,有效保护肾组织,改善肾功能。

复方肾炎片对肾病大鼠血清中 IL-18、TGF-β1、ET-1、TNF-α 的表达具有明显下调作用,且联合糖皮质激素用药更理想,可能是复方肾炎片治疗的作用机制。

参考文献

[1] 李怀平,黄晨,孙世仁,等. 复方肾炎片对慢性肾炎患者血浆内皮素水平的影响[J]. 中国误诊学杂志,2010,10(13):3040-3041.

[2] KIM S D, PARK J M, KIM I S, et al. Association of IL-1beta, IL-1ra, and TNF-alpha gene polymorphisms in childhood nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2004, 19(3):295-259.

[3] TRIPATHI G, JAFAR T, MANDAL K, et al. Does cytokine gene polymorphism affect steroid responses in idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Indian J Med Sci*, 2008, 62(10):383-391.

[4] 符逢春,刘百祥,王萍,等. 肾安冲剂对多柔比星肾病大鼠血清可溶性白细胞介素 2 受体和 TNF-α 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(12):2658-2659.

[5] 栾健,王艳,马瑞霞,等. 复方肾炎片对 STZ 诱导糖尿病

大鼠作用研究[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2010, 11(11):1000-1002.

[6] 赵宗江,刘昆,张新雪,等. 复方鳖甲软肝方对多柔比星肾病大鼠肾组织内皮素-1 蛋白及其 mRNA 表达的影响[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13(5):266-268.

[7] KANAI T, YAMAGATA T, MOMOI M Y. Macrophage inflammatory protein-1beta and interleukin-8 associated with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome[J]. *Pediatr Int*, 2009, 51(4):443-447.

[8] KILIS-PSTRUSINSKA K, MEDYNSKA A, ZAOLINSKA D, et al. Interleukin-18 in urine and serum of children with idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(2):122-126.

[9] 赵建学,郭海燕,陆玮婷,等. 芍药苷对肝纤维化模型大鼠血清 TNF-α、IL-6 与 IL-10 的影响[J]. *医药导报*, 2010, 29(2):168-169.

[10] 马国平,杨京利,田玉科,等. 鞘内注射芬太尼对糖尿病周围神经病变大鼠脊髓 TNF-α 表达的影响[J]. *医药导报*, 2009, 28(8):1003-1005.

DOI 10.3870/yydb.2012.08.008

α-硫辛酸抗心肌肥厚作用

张驰^{1,2}, 夏豪¹

(1. 武汉大学人民医院心内科, 430060; 2. 武汉市东湖医院综合三科, 430071)

摘要 目的 研究 α-硫辛酸(α-LA) 抗异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚的作用。方法 24 只大鼠随机分为模型组、对照组、硫辛酸组, 每组 8 只。模型组和硫辛酸组建立心肌肥厚模型, 硫辛酸组同时给予 α-硫辛酸盐液腹腔注射, 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, qd。测定大鼠全心质量指数(HW/BW)、左心室质量指数(LVW/BW, 即 LVI), 放射免疫分析法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠心肌组织血管紧张素 II(AngII)、AT1R 含量及 AT1mRNA 表达水平, 硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量, 黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果 与对照组比较, 模型组大鼠 HW/BW、LVI 明显升高, 心肌 AngII、AT1R 含量及 AT1mRNA 表达水平增高, 心肌和血清 MDA 含量增高, SOD 含量降低(P<0.01); 与模型组比较, 硫辛酸组各心脏指标均明显减低, 心肌组织 MDA、AngII、AT1R 含量及 AT1mRNA 表达水平降低, SOD 含量增高(P<0.01)。结论 氧化应激参与心肌肥厚的发生发展, α-LA 通过抗氧化作用抑制心肌肥厚的发生发展。

关键词 α-硫辛酸; 异丙肾上腺素; 心肌肥厚

中图分类号 R979.5; R965 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)08-0996-04

Protective Effects of Alpha-Lipoic Acid on Isoproterenol-induced Myocardial Hypertrophy in Rats

ZHANG Chi^{1,2}, XIA Hao² (1. Department of Cardiology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. Donghu Hospital of Wuhan City, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT Objective To investigate the protective effects of alpha-lipoic acid on isoproterenol (Iso)-induced myocardial hypertrophy in rats. **Methods** Twenty-four rats were randomly and evenly divided into 3 groups: control group, model group and alpha-lipoic acid (LA) group. Myocardial hypertrophy model of rats were induced by injection of Iso (1 mg · kg⁻¹, ip) once daily for 15 days. The control group was treated with the same volume of normal saline injection. The LA group according to the above method was injected with the alpha lipoic acid in the abdominal cavity at 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ once daily for 15 days. The heart-weight (HW), left ventricular weight (LVW), the ratios of HW/BW and LVW/BW (LVI) were

measured. The content of angiotensin (AngII) and the expression of angiotensin type one receptor (AT1R) in the left ventricle were determined by radioimmunoassay and immunochemistry, respectively. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of AT1 receptor mRNA of the left ventricular myocardial tissue. Thiobarbituric acid method and xanthineoxidase method were used to determine the contents and activities of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in the myocardial tissue, respectively. **Results** The HW/BW, LVI and the content of AngII and the expression of AT1R mRNA in the left ventricle significantly increased in the model group as compared with the control group. The content of MDA in the left ventricle and blood was increased but SOD decreased ($P < 0.01$). The cardiac indices were decreased significantly, the content of MDA and Ang II, the expression of AT1R and AT1 mRNA decreased in the LA group as compared with the model group, but the content of SOD was increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Oxidative stress is involved in the development of myocardial hypertrophy. α -LA is shown to prevent remodeling of Iso-induced myocardial hypertrophy in rats through antioxidation.

KEY WORDS Alpha-lipoic acid; Isoproterenol; Myocardial hypertrophy

心肌肥厚是以心肌细胞体积增大和蛋白质含量增多为主要特征的生长异常,是对各种心血管刺激因子如血流动力学负荷、生长因子以及激素等的适应性反应。心肌肥厚的发生机制较复杂,是细胞内外因素交互作用的结果^[1]。研究表明,氧化应激是导致心血管系统结构、功能异常的重要原因之一^[2]。近年来,氧化应激与心肌肥厚的关系受到越来越多的关注,大量资料证实氧化应激与心肌肥厚的形成密切相关。 α -硫辛酸(α lipoic acid, α -LA)属于B族维生素,在已知天然抗氧化剂中效果最强^[3]。笔者采用异丙肾上腺素建立大鼠心肌肥厚模型,探讨 α -LA抗心肌肥厚的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂 异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso, Sigma公司产品,批号:066k148), α -LA(上海现代哈森药业有限公司,批号:06011921),丙二醛(malondialdehyde, MDA,批号:2011082)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD,批号:20110905)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所产品),血管紧张素II(Ang II)试剂盒(购自北京中山生物技术公司)。

1.2 仪器 722N可见分光光度计(上海仪器厂),KDC22046高速冷冻离心机(合肥科大创新股份有限公司中佳分公司),TG328B型光学分析天平(湘仪天平仪器厂),DK-8A电热恒温水槽(上海比朗仪器有限公司),超低温冰箱(北京天地精仪科技有限公司),紫外投射仪(郑州卓鑫仪器设备有限公司),DYY-III型稳压稳流电泳仪(上海雷韵试验仪器制造有限公司),SN2682型放射免疫计数器(上海核辐射光电仪器有限公司)。

收稿日期 2012-02-16 修回日期 2012-03-15

作者简介 张驰(1982-),男,湖北武汉人,主治医师,在读硕士,主要从事心血管疾病的研究。电话:027-87511115, E-mail:458896810@qq.com。

通讯作者 夏豪,男,教授,硕士生导师,主要从事冠心病的介入诊断与治疗。E-mail:xiahao1966@163.com。

AT1cDNA引物(上海生工生物技术公司), β -actincDNA引物(北京鼎国生物技术发展有限公司),随机引物(Promega产品)。

1.3 动物 雄性SD大鼠,体质量180~220g,武汉大学人民医院实验动物中心提供,实验动物许可证号:SYXK(鄂)2004-0027。

1.4 动物分组及处理 将24只大鼠按体质量随机分成对照组、模型组、硫辛酸组,每组8只。模型组和硫辛酸组背部皮下注射Iso,1 mg·kg⁻¹,qd,连续15d,自由进食,饮水,建立大鼠心肌肥厚模型。对照组同部位注射同体积0.9%氯化钠溶液。硫辛酸组同时腹腔注射 α -LA,100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,qd,连续给药15d。

1.5 心脏质量参数测定 实验第16天,大鼠称体质量,水合氯醛麻醉,去眼球采血,断颈处死,取出心脏,将血离心后分装冻存;去除大血管、心外膜脂肪组织,0.9%氯化钠溶液清洗,吸干后称全心质量(heart weight, HW),沿冠状沟将左右心房剪下,沿室间沟将右心室游离壁去除,称左心室(包括室间隔)质量(left ventricular weight, LVW)。以HW、LVW、HW/BW、LVW/BW作为判断心肌肥厚的指标。

1.6 左心室AngII含量测定 取左室心肌组织100mg,加0.9%氯化钠溶液,冰浴中制成35%匀浆,4℃,3500 r·min⁻¹离心10min,放射免疫分析法测定上清液AngII含量。

1.7 心肌组织AT1R免疫组织化学测定 石蜡切片脱蜡至水,细胞免疫组织化学分析系统软件分析图像,计算AT1R表达的吸光度(A)值,以A值反映AT1R表达强弱。

1.8 心肌组织AT1mRNA表达

1.8.1 细胞总RNA的提取 取左心室,游离壁组织,采用异硫氰酸胍-酚-三氯甲烷一步法提取心肌组织总RNA。按10 mL·g⁻¹加入异硫氰酸胍裂解液(4 mol·L⁻¹异硫氰酸胍,25 mol·L⁻¹柠檬酸钠,0.5%十二烷基肌氨酸钠,0.1 mol·L⁻¹ β -ME)冰浴中匀浆。

加入 1/10 体积 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaAC}$ (pH4.0) 等体积饱和酚, 1/5 体积三氯甲烷, 用力混匀, 冰浴 15 min。4 °C, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min ($r=13.9 \text{ cm}$), 分离上层水相, 加入等体积异丙醇, 混匀, -20 °C 放置 1 h, 4 °C, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min ($r=13.9 \text{ cm}$), 去上清液, 加 2 倍体积 70% 乙醇洗涤沉淀, 4 °C, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min ($r=13.9 \text{ cm}$), 去上清液, 风干, 溶于 depc-水 10 μL 中, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8.2 反转录 取 RNA 溶液 6 μL , 加入 5×PCR 缓冲液 4 μL , dNTP1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Rnasin20 U, AMV 逆转录 5 U, 随机引物 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 三蒸水数微升, 使总体积为 20 μL 。恒温水槽中 42 °C, 40 min, 恒温器 95 °C 5 min, 冰上骤冷, 置 4 °C 或 -20 °C 备用。

1.8.3 PCR 反转录产物 2 μL , 10×PCR 缓冲液 2.5 μL , AT1cDNA 上下游引物(上游序列 5'-GCC CTT AAC TCT TCT GCT GA-3', 下游序列 5'-TCG ATG CTG AGA CAC GTG AG-3', 扩增片段 365 bp) 各 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, β -actincDNA 上下游引物序列(上游序列 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CA-3', 下游序列 5'-CTT CCT TAA TGT CAC CAC CAT TTC -3', 扩增片段 540 bp) 各 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTP1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, TaqDNA 聚合酶 0.5 U, 双蒸水数微升, 使总反应体积为 25 μL ,

加石蜡油 20 μL , 置 PCR 仪。95 °C 2 min, 94 °C 40 s, 56 °C 50 s, 72 °C 60 s, 重复上述 3 个步骤共 35 个循环后 72 °C 6 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外光下观察摄影, 用北航 CMIAS99 系统对电泳条带进行扫描。以每例组织电泳带面积灰度值与 β -actin 电泳带灰度面积值之比作为该例标本目的基因表达的相对值。

1.9 心肌组织 MDA、SOD 测定 取心肌组织匀浆, 硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量, 嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性(均按测定试剂盒说明书操作)。

1.10 统计学方法 实验数据由 SPSS 17.0 统计软件处理, 结果以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -LA 对大鼠心脏质量参数的影响 见表 1。模型组大鼠 HW/BW、LVW 值较对照组明显增加 ($P < 0.01$), α -LA 组 HW/BW、LVW 值较模型组显著降低 ($P < 0.01$)。

2.2 α -LA 对左室心肌 Ang II 含量和 AT1R 表达的影响 见表 2。与对照组比较, 模型组大鼠左室心肌 Ang II 含量和 AT1R 表达明显升高; 与模型组比较, α -LA 组大鼠左室心肌组织 Ang II 含量和 AT1R 表达均显著降低。

表 1 3 组大鼠心脏质量参数测定结果

Tab.1 The effect of alpha-lipoic acid on heart weight parameter in the three groups of rats with myocardial hypertrophy

组别	大鼠/只	体质量/g	$\bar{x} \pm s, n=8$				
			HW	LVW	HW/BW	LVW/BW	LVW/HW
			mg				
			$(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$				
α -LA 组	8	218.50±14.42	748.65±61.45 ^{*1*2}	492.28±32.54 ^{*1*3}	3.35±0.19 ^{*1*2}	2.18±0.12 ^{*1*3}	0.66±0.030 ^{*1}
模型组	8	220.50±16.37	814.38±94.16 ^{*3}	559.78±56.19 ^{*3}	3.64±0.23 ^{*3}	2.56±0.19 ^{*3}	0.69±0.054 ^{*3}
对照组	8	220.17±22.76	630.58±46.27	406.07±30.14	2.93±0.21	1.85±0.16	0.63±0.018

与模型组比较, ^{*1} $P < 0.01$; 与对照组比较, ^{*2} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$

Compared with model group, ^{*1} $P < 0.01$; Compard with control group, ^{*2} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$

表 2 α -LA 对 Iso 致大鼠心肌肥厚左心室 Ang II 含量和 AT1R 表达的影响

Tab.2 The effect of alpha-lipoic acid on content of Ang II and expression of AT1R in left ventricle in myocardial hypertrophy rats induced by Iso

组别	大鼠/只	Ang II/ ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	AT1R	$\bar{x} \pm s$			
				MDA/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)		SOD/($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	
				心肌	血清	心肌	血清
α -LA 组	8	685.15±234.28 ^{*1*2}	17.79±4.30 ^{*1*2}	36.8±3.9 ^{*1*2}	7.6±0.8 ^{*1*2}	2.95±0.24 ^{*1*2}	67.8±7.6 ^{*1*2}
模型组	8	954.12±213.47 ^{*3}	23.84±6.39 ^{*3}	49.4±4.2 ^{*3}	9.4±0.9 ^{*3}	1.76±0.72 ^{*3}	59.6±6.4 ^{*3}
对照组	8	482.05±185.04	13.45±3.62	28.6±3.4	6.2±0.6	4.34±0.46	78.6±10.3

与模型组比较, ^{*1} $P < 0.01$; 与对照组比较, ^{*2} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$

Compared with model group, ^{*1} $P < 0.01$; Compared with control group, ^{*2} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$

2.3 心肌 AT1mRNA 表达 对照组、模型组和 α -LA 组大鼠左室心肌组织 AT1mRNA 表达(单位面积 A 值, AT1mRNA 表达/ β -actinmRNA) 分别为 (0.486 ± 0.043) , (0.748 ± 0.034) 和 (0.532 ± 0.056) , α -LA 组较模型组显著下降($P < 0.01$)。

2.4 α -LA 对大鼠心肌组织和血清 MDA 含量及 SOD 活性的影响 见表 2。与对照组比较,模型组大鼠左室心肌及血清 MDA 含量明显升高, SOD 含量明显降低($P < 0.01$);与模型组比较, α -LA 组左室心肌组织及血清 MDA 含量明显降低, SOD 含量明显升高($P < 0.01$)。

3 讨论

心肌肥厚是心脏维持适当收缩功能对各种病理状态的代偿反应,表现为心肌细胞肥大,胶原增生,质量异常增加,心肌重构等。长期心肌肥厚可导致冠心病、心律失常、心力衰竭,是心功能恶化及心源性死亡的独立危险因素^[4]。笔者在本实验采用 Iso 致大鼠心肌肥厚模型,大鼠 HW、LVW 及心脏指数、左室指数均明显增高,心脏功能减退,与文献报道一致^[5-6]。

有研究证实 α -LA 可能具有预防动脉粥样硬化作用,其机制可能与清除超氧阴离子,降低氧化应激对血管内皮细胞的氧化损伤有关^[7]。另外有研究显示,早期注射 α -LA 对于缓解心脏内毒素脂多糖诱导的大鼠氧化应激,以及改善 GSH 氧化还原系统有效^[8]。本实验研究发现,模型组大鼠全心指数、左室指数等指标明显升高,应用 α -LA 后心脏各指标明显下降,证实 α -LA 可以减轻心肌肥厚。

有文献报道,AngII 可作为一种内在的氧化剂,促使氧化应激发生,在高血压、糖尿病等疾病的脏损害中发挥重要作用^[9]。有研究发现氧化应激也可通过激活转录因子家族介导心肌肥厚,参与心肌肥厚的发生发展过程^[10]。另有研究表明,氧自由基可通过氧化型低密度脂蛋白(Ox-LDL)刺激 AT1R 及其 mRNA 表达,也可通过刺激内皮素释放,使 AngII 合成增加,从而促进血管平滑肌细胞(VSMC)增殖和心肌肥厚^[11]。而且,心肌肥厚时体内 SOD、GSH-Px 等抗氧化系统清除氧自由基能力减弱,导致氧自由基堆积,从而通过脂质过氧化等反应加重心肌肥厚,形成恶性循环。本实验发现,心肌肥厚组心肌 MDA、AngII 含量、AT1R 及 AT1mRNA 表达较对照组均明显升高, SOD 活性降低,这证实氧化应激参与心肌肥厚的发生发展过程。应用 α -LA 以上各指标明显降低,而 SOD 活性明显增高。这与实验证实硫辛酸可降低由 AngII 诱导的氧化应激引起的血压升高和激肽

B1 受体的表达增加结果一致^[12]。 α -LA 具抗心肌肥厚损伤作用,可能与其清除自由基、增加心肌的抗氧化能力有关。本实验观察到 α -LA 通过抗氧化作用降低 Ang II 含量,从而使 AT1R 及 AT1mRNA 的表达下调,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 阮长武,戴闰柱,冯宗忱,等. 一氧化氮对内皮素促心肌细胞肥大肌球蛋白基因表达的影响[J]. 临床心血管病杂志,2000,16(1):35-37.
- [2] TANIYAMA Y, GRIENGLING K K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms [J]. Hypertension,2003,42(6):1075-1081.
- [3] 黄涛,黄开勋. α -硫辛酸的生物医学功能[J]. 生命的化学,2004,24(1):58-59.
- [4] LIPS D J, DEWINDT L J, VANKRAAIJ D J, et al. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy[J]. Eur Heart J,2003,24(10):883-896.
- [5] GALLEGO M, ESPINOSA L, VEGAS L, et al. Spironolactone and captopril attenuates isoproterenol-induced cardiac remodelling in rats[J]. Pharmacol Res,2001,44(4):311-315.
- [6] LEENEN F H, WHITE R, YUAN B. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001,281(6):H2410-H2416.
- [7] 王世祥,吴宏超,季爱民,等. α -硫辛酸对兔血管内皮细胞的保护作用[J]. 实用医学杂志,2009,25(10):1559-1561.
- [8] GORACA A, PIECHOTA H, HUK-KOLEGA H. Effect of alpha-lipoic acid on LPS-induced oxidative stress in the heart[J]. Physiol Pharmacol,2009,60(1):61-68.
- [9] ANDO K. Oxidative stress [J]. Nippon R Insho,2003,61(7):1130-1137.
- [10] DOUGLAS B S, DEBORAH A S, LEI X, et al. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure[J]. J Mol Cell Cardiol,2002,34(4):379-388.
- [11] LI D, SALDEEN T, ROMEO F, et al. Oxidized LDL up regulates angiotensin II type I receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF- κ B [J]. Circulation,2000,102(16):1970-1976.
- [12] PETCU M, ONGALI B, EJMIDAOUI A, et al. Effects of alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats [J]. Peptides,2005,26(8):1331-1338.