

压力负荷增高心肌多胺及肥大细胞变化研究^{*}

熊晓兰¹ 贾晓丽¹ 肖超¹ 倪情情¹ 张世忠¹

[摘要] 目的:探讨慢性压力负荷增高性心肌肥厚大鼠心肌多胺含量及肥大细胞数目的变化规律。方法:通过缩窄大鼠腹主动脉制作压力负荷增高性心肌肥厚动物模型。分别于术后第1、2、3、4、5、6、7和8周称量大鼠体质量、心脏质量,计算心质量指数;采用高效液相法测定心肌多胺含量;采用甲苯胺蓝染色观察心肌肥大细胞数目。结果:与假手术组大鼠比较,手术组大鼠术后各周心指数明显增加($P<0.05$),左室心肌的多胺含量明显增高($P<0.05$),肥大细胞数量亦明显增多($P<0.05$)。结论:慢性心脏压力负荷增高导致心肌肥厚的过程伴有多胺含量增高及肥大细胞数目增多。

[关键词] 慢性压力负荷过载;心肌重构;多胺;肥大细胞

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2018.04.018

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

Changes of myocardial polyamine content and mast cell after chronic pressure overload

XIONG Xiaolan JIA Xiaoli XIAO Chao NI Qingqing ZHANG Shizhong

(Medical Collgeg of China Three Gorges University, Yichang, 443002, China)

Corresponding author: ZHANG Shizhong, E-mail: zhangsz@ctgu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate changes of myocardial polyamine content and mast cells count in cardiac hypertrophy induced by chronic pressure overload. **Method:** Rats of cardiac hypertrophy were induced by partial ligation of abdominal aorta. Body weight and heart weight were weighed at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8th week after the operation. Heart weight index was calculated. Myocardial polyamine content was measured by high performance liquid method. The cardiac mast cells count was determined by Toluidine blue staining method. **Result:** Compared with rats in sham group, the heart weight index, the content of polyamine in myocardium and the count of cardiac mast cells all increased significantly every week after the operation in operation group (all $P<0.05$). **Conclusion:** The cardiac chronic hypertrophy accompanies with increase of both cardiac polyamine content and mast cells count.

Key words chronic pressure overload; myocardium remodeling; polyamine; mast cells

长期慢性压力负荷增高可致代偿性心肌肥大,并最终导致心力衰竭,形成心脏疾病的终末阶段^[1]。压力负荷增高致心肌肥厚性重构的机制复杂,至今尚不完全清楚。肥大细胞在心肌重构中的可能作用得到越来越多的重视。有研究认为,肥大细胞在压力负荷增高的情况下募集、激活并脱颗粒释放许多对心脏有害的递质,如组胺、糜酶、转化生长因子 β (TGF- β)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等,从而参与各种心脏疾病^[2-3]。但最近研究发现,肥大细胞激活释放物质中除上述已知的物质成分外,还有多胺成分——腐胺(putrescine, PUT)、精胺(spermine, SPM)和精脒(spermidine, SPD)^[4]。这是多胺首次被发现存在于肥大细胞脱颗粒的释放物中。但是多胺在压力负荷增高心肌重构中是否发生改变,尚鲜见研究报道。本研究在腹主动脉狭

窄所致慢性压力负荷增高心肌重构大鼠模型中,观察心肌多胺含量与肥大细胞数量的改变及其规律。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

SPF级雄性SD大鼠,160~170 g,购自三峡大学医学院实验动物中心,许可证号为SCXK(鄂)2011-0012。水合氯醛购自上海润杰化学试剂有限公司;SPD、SPM、PUT、一六己二胺均购自Sigma公司(USA)。国产色谱级乙腈购自南京建成生物公司。色谱分析用乙腈为色谱纯,苯甲酰氯、乙醚及其他试剂均为国产分析纯。UV-2100型紫外可见分光光度计(尤尼科仪器公司);Suprafuge 22低温高速冷冻离心机(Eraeus instruments公司);Waters 2690型高效液相色谱仪,996型二极管阵列检测器,Millennium 32色谱工作站(美国Waters公司);XW-80A旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);甲苯胺蓝染液购自武汉谷歌生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 慢性压力超负荷大鼠模型建立 采用腹主动脉缩窄法制备慢性压力超负荷大鼠模型(手术

^{*} 基金项目:国家自然科学基金(No:30872716);湖北省自然科学基金(No:2015CFB288);湖北省卫生厅科研项目(No:WJ2015MB171);三峡大学科研创新基金(No:SDYC2016086)

¹ 三峡大学医学院(湖北宜昌,443002)
通信作者:张世忠, E-mail: zhangsz@ctgu.edu.cn

组)^[5]。步骤如下:雄性SD大鼠适应性饲养3~5 d,术前禁食12 h,自由饮水。称重后给予10%水合氯醛(0.35 ml/100 g)行腹腔内注射麻醉。待大鼠角膜反射消失、肌力下降后,固定于小型动物手术台,行腹中线纵切口,逐步分层打开腹腔。玻璃分针分离脏器,充分暴露双肾上方腹主动脉段,并小心剥离腹主动脉,用直径0.7 mm的银夹钳夹腹主动脉,将脏器复位,并逐层缝合腹肌和皮肤,碘伏消毒。假手术组只开腹分离腹主动脉,不放置银夹。

1.2.2 大鼠心质量指数测定 分别于手术后第1、2、3、4、5、6、7和8周取材。取材前称量大鼠体质量(body weight, BW),记录数据后,麻醉大鼠,取出心脏,于4℃的0.9%氯化钠溶液中洗尽血液,滤纸吸干水分,并除去心脏周围组织和大血管,称取心脏质量(heart weight, HW),计算心脏质量指数(heart weight index, HWI=HW/BW)。最后将大鼠心脏置于4%中性甲醛缓冲溶液中固定。

1.2.3 高效液相法测定大鼠心肌多胺含量 大鼠称重后,10%水合氯醛麻醉(0.35 ml/100 g),取出心脏,用4℃的0.9%氯化钠溶液冲尽残血。各组均取左心室150 mg,加入冷的0.3 mmol/L高氯酸,冰水浴中匀浆,3 500×g、4℃离心10 min,取上清液做样本。取1 000 μl上清液样品,加入1 mmol/L内标(1,6-己二胺)20 μl混匀,加入2 mol/L氢氧化钠溶液2 ml,苯甲酰氯10 μl,漩涡振荡,40℃水浴20 min后,加饱和氯化钠2 ml,漩涡振荡

2 min,加入乙醚2 ml,漩涡振荡2 min,离心1 min,取乙醚层,如此反复连续萃取3次,合并乙醚提取液,通风橱中加热挥干,残余物溶于1 000 μl甲醇中,微孔滤膜过滤,取10 μl上高效液相。流动相乙腈与水(V:V,40:60),紫外检测波长为254 nm。称取SPM、SPD及PUT标准品,高氯酸处理后,将标准品溶液进行苯甲酰化,以标准品峰面积与内标峰面积的比为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,浓度与峰面积比呈线性关系,建立直线回归方程,计算多胺含量。

1.2.4 大鼠心脏肥大细胞染色及计数 取甲醛固定后组织脱水包埋,进行切片染色。染色步骤如下:石蜡切片脱蜡至水,浸入甲苯胺蓝染色液10 min,切片水洗,洗去多余染料,0.2%冰醋酸分化1 min,切片水洗,然后置入50℃烘箱烘干30 min以上。二甲苯透明5 min,中性树胶封片。染色后,在显微镜下连续观察5个视野(×40),取平均值比较肥大细胞数目变化规律。

1.3 统计学处理
实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较用两独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HWI的变化

与假手术组相比,手术组术后1~8周的HWI均明显增高(均 $P<0.05$),见表1。

表1 手术组及对照组HWI变化规律
Table 1 HWI in each groups

组别	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周	第8周
假手术组(7只)	2.66±0.15	2.79±0.18	2.83±0.27	2.99±0.21	2.84±0.20	2.94±0.23	3.06±0.36	3.03±0.35
手术组(7只)	3.39±0.22 ¹⁾	3.43±0.36 ¹⁾	3.43±0.21 ¹⁾	3.52±0.17 ¹⁾	3.62±0.18 ¹⁾	3.67±0.23 ¹⁾	3.62±0.31 ¹⁾	3.71±0.40 ¹⁾

与假手术组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

2.2 多胺含量的变化

与假手术组比较,第1、2、3、4、5、6、7和8周手术组大鼠心肌组织中的PUT含量明显升高(均 $P<0.05$);手术组SPD中的含量在术后第4周明显升高($P<0.05$),然后第5、6、7周呈下降趋势,及第8周又明显高出假手术组($P<0.05$);手术组SPM含量在第4周明显升高($P<0.05$),第5周略有下降,第6、7、8周又明显高于假手术组($P<0.05$)。见图1~3。

2.3 肥大细胞数目的变化

与假手术组相比,手术组大鼠术后每周心脏肥大细胞均明显增多(均 $P<0.05$),见图4。且假手

术组第1~8周肥大细胞相对较平稳,而手术组在第1~4周呈逐渐上升趋势,见图5。

3 讨论

本实验通过动态连续观察发现,伴随心脏慢性压力负荷增高的过程,心肌多胺含量和肥大细胞数量呈现上升趋势。

多胺(PUT、SPM、SPD)带高密度正电荷,可以与带有负电荷的DNA、RNA和蛋白质等生物大分子结合,从而发挥相应作用。正常情况下,多胺代谢在生物体内包含一套完整的调节机制。多胺的含量稳态维持对细胞许多生理功能的正常运行具有重要作用。但在多种病理条件下如肿瘤、脑缺

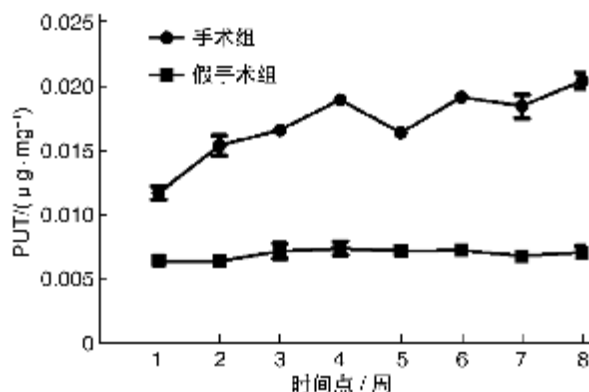


图1 大鼠术后各周心肌 PUT 含量变化

Figure 1 Changes of PUT content in myocardium after operation

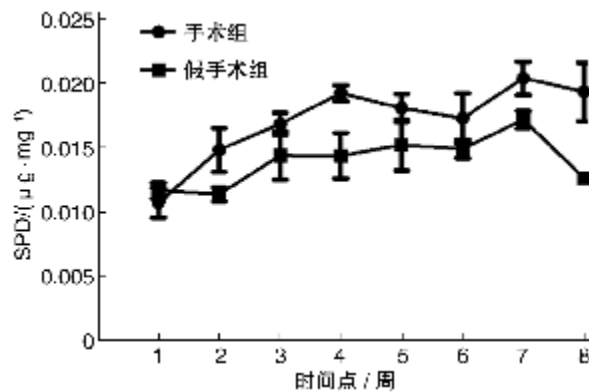


图2 大鼠术后各周心肌 SPD 含量变化

Figure 2 Changes of SPD content in myocardium after operation

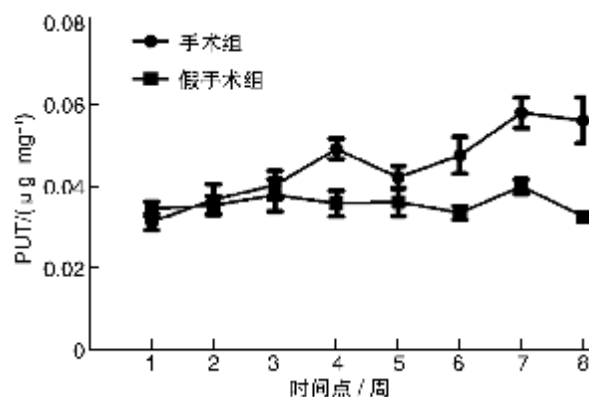


图3 大鼠术后各周心肌 SPM 含量变化

Figure 3 Changes of SPM content in myocardium after operation

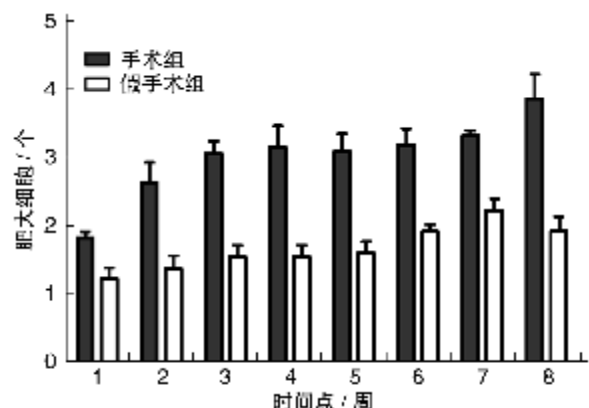
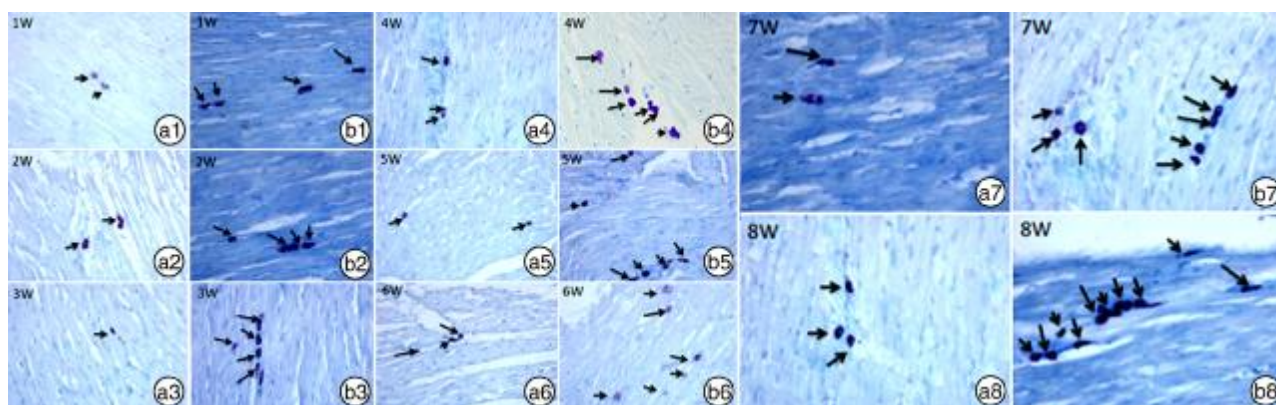


图4 各组大鼠术后各周心脏肥大细胞数量变化

Figure 4 Changes of mast cells count in myocardium after operation



a1~a8:假手术组第1~8周;b1~b8:手术组第1~8周。箭头示肥大细胞。

图5 术后各周心肌肥大细胞数量改变代表图片(×40)

Figure 5 Changes of mast cells count in myocardium operation(×40)

血、脑外伤、癫痫、心脏缺血以及心肌肥大等,这一平衡被打破,多胺含量发生变化,给生物体的生存造成重大影响^[6-8]。目前研究发现,消耗多胺可以抑制心脏肥大和凋亡,且这一过程与内质网应激相关^[9]。多胺还是促进异丙肾上腺素介导的大鼠心

肌损伤的内因子之一^[10]。而在缺血预适应心肌保护研究中发现,预适应引起的心肌多胺浓度的适度增加对心肌有益,耗竭细胞内多胺池可造成心肌损伤^[11]。但是在心肌压力负荷增高所致心肌重构情况下,心脏中多胺含量变化及其规律尚不清楚。

本研究发现,在慢性压力负荷增高的情况下,随病理过程进展,心肌多胺含量逐渐增高,虽然在术后第5、6周,手术组SPD和SPM含量增加趋于平稳,但仍然高于假手术组,且随后走向仍然呈上升趋势,尤其是PUT含量在两组间的变化趋势表现更为明显。这表明在压力负荷增高情况下,大鼠心肌中的多胺含量明显升高,且升高趋势随着大鼠心脏肥大病程加重而更加明显。

近年来,肥大细胞在心肌重构中的作用也受到密切关注。肥大细胞可以刺激胶原蛋白合成导致纤维化,也可以诱导基质金属酶活化使胶原降解并最终导致心室扩张。在高血压、心脏移植排斥反应、心脏缺血再灌注、心肌炎症以及冠状动脉血栓形成等期间均出现心脏组织肥大细胞密度增高现象^[12-14]。但在心肌慢性压力负荷增高情况下,心脏肥大细胞数目的变化规律少见相关文献报道。

本实验研究发现,手术组大鼠各周肥大细胞数目与假手术组相比显著增加,并随着心脏肥大病理进展而逐渐增多,提示肥大细胞与压力负荷增高所致心室肥厚关系密切。

本研究没有观察心肌慢性压力负荷增高过程中心肌肥大细胞数量增加和多胺含量增加之间的关系,但是有研究表明,肥大细胞的脱颗粒可以释放多种生物活性递质,如组胺、糜酶、TGF- β 及TNF- α ^[2-3]。且最近研究表明,在肥大细胞激活释放物质中包含有多胺成分^[4]。基于本研究观察到在压力负荷增高情况下,肥大细胞和多胺含量均增加的实验结果,推测心肌压力负荷增高有可能导致肥大细胞在心肌组织聚集并释放多胺,通过后者在心肌重构中发挥重要作用。当然,也不能排除在压力负荷增高过程中心肌多胺代谢系统本身也可能发生改变,从而进一步影响多胺含量的可能。因此,在接下来的实验中,需进一步明确压力负荷增高时心肌多胺含量改变与肥大细胞的确切关系,并研究其发挥作用的可能机制。

参考文献

- [1] 刘永政,张双,王楠,等.运动康复治疗对合并肾功能不全的慢性心力衰竭患者心功能及生活质量的影响[J].临床心血管病杂志,2017,33(1):54-57.
- [2] Moon TC, Befus AD, Kulka M. Mast cell mediators;

their differential release and the secretory pathways involved[J]. Front Immunol, 2014, 5:569.

- [3] Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, et al. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation[J]. Immunol Rev, 2007, 217:65-78.
- [4] Garcia-Faroldi G, Rodriguez CE, Urdiales JL, et al. Polyamines are present in mast cell secretory granules and are important for granule homeostasis[J]. PLoS One, 2010, 5(11):e15071.
- [5] 石海莲,张蓓蓓,刘燕,等.左前肢血压法动态观察腹主动脉缩窄大鼠的血压变化[J].中国药理学通报,2008,24(6):830-833.
- [6] 任婷,成细华,陈聪,等.多胺代谢与缺血性心血管疾病研究进展[J].湖南中医药大学学报,2017,37(6):690-692.
- [7] 林岩,徐长庆,赵雅君,等.多胺在异丙肾上腺素所致大鼠心肌肥厚中的作用及意义[J].中国病理生理杂志,2009,25(3):417-421.
- [8] 刘宏伟,姜冰,万新,等.大鼠局灶性脑缺血再灌注后PAO活性和多胺含量变化及意义[J].中南大学学报(医学版),2005,30(4):452-455.
- [9] Lin Y, Zhang X, Wang L, et al. Polyamine depletion attenuates isoproterenol-induced hypertrophy and endoplasmic reticulum stress in cardiomyocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(5):1455-1465.
- [10] Tipnis UR, He GY, Li S, et al. Attenuation of isoproterenol-mediated myocardial injury in rat by an inhibitor of polyamine synthesis[J]. Cardiovasc Pathol, 2000, 9(5):273-280.
- [11] 赵雅君,张伟华,王艳丽,等.鸟氨酸脱羧酶/多胺系统在大鼠缺血预适应心肌保护中的作用[J].中国病理生理杂志,2009,25(12):2295-2301.
- [12] 李辉,黄林枫,文纯,等.心脏肥大细胞及Toll样受体4在小鼠病毒性心肌炎中的作用[J].中国当代儿科杂志,2013,15(10):896-902.
- [13] Shi GP, Bot I, Kovanen PT. Mast cells in human and experimental cardiometabolic diseases[J]. Nat Rev Cardiol, 2015, 12(11):643-658.
- [14] 张光明,崔炜. Kounis综合征[J].临床心血管病杂志,2017,33(11):1040-1044.

(收稿日期:2017-09-18; 修回日期:2017-12-22)