

盐皮质激素受体在 Dahl 盐敏感大鼠心肌纤维化中的作用

朱傲霜, 张宇燕, 丁志坚, 陈解忠, 刘宇

(南京医科大学附属常州市第二人民医院心内科, 江苏省常州市 213003)

[关键词] 盐皮质激素受体; 依普利酮; 心肌纤维化; Dahl 盐敏感大鼠

[摘要] 目的 探讨心肌组织中盐皮质激素受体(MR)在高血压大鼠心肌纤维化中的作用。方法 通过高盐饮食以及加用选择性盐皮质激素受体拮抗剂依普利酮干预 Dahl 盐敏感大鼠血压, 8 周后通过心脏/体重比值、心肌组织 AZAN 染色以及定量 PCR 检测心肌组织胶原蛋白 mRNA 评估心肌纤维化水平, 蛋白印迹法检测大鼠心肌组织盐皮质激素受体的表达水平以及定量 PCR 检测心肌组织炎症相关因子 PAI-1 和 TGF- β 1 mRNA 的表达水平, 评价盐皮质激素受体和心肌纤维化的关系。结果 和低盐饮食组比较, 高盐饮食诱导 Dahl 盐敏感大鼠血压升高 [168.1 \pm 10.8 mmHg 比 124.3 \pm 10.2 mmHg], 心脏/体重比值明显增加 [(0.341 \pm 0.006) 比 (0.287 \pm 0.004)], 大鼠心肌组织纤维化比例 [(11.78% \pm 0.54%) 比 (3.12% \pm 0.55%)] 和胶原蛋白 IV mRNA [(3.23 \pm 0.21) 比 (1.32 \pm 0.06)] 表达均增加; 大鼠心肌组织盐皮质激素受体的表达水平增加 [(0.38 \pm 0.03) 比 (0.21 \pm 0.07)]; 心肌组织 PAI-1 和 TGF- β 1 mRNA 的表达水平增加 [PAI-1: (0.88 \pm 0.12) 比 (0.55 \pm 0.18); TGF- β 1: (2.25 \pm 0.37) 比 (1.26 \pm 0.41)], 而且同心肌组织纤维化呈正相关。利用选择性盐皮质激素受体拮抗剂依普利酮后大鼠心脏/体重比值、心肌纤维化比例、胶原蛋白 mRNA、盐皮质激素受体、PAI-1 和 TGF- β 1 mRNA 均明显下降。结论 盐皮质激素受体和相应的激素相互作用, 介导心肌炎症, 引起心肌组织纤维化。盐皮质激素受体拮抗剂可以缓解高血压引起的心肌纤维化, 改善心室重构。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Role of Mineralocorticoid Receptor in Myocardial Fibrosis of Dahl Salt-sensitive Hypertensive Rats

ZHU Ao-Shuang, ZHANG Yu-Yan, DING Zhi-Jian, CHEN Jie-Zhong, and LIU Yu

(The Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou No 2 Hospital, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

[KEY WORDS] Mineralocorticoid Receptor; Eplerenone; Myocardial Fibrosis; Dahl Salt-sensitive Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of mineralocorticoid receptor (MR) in myocardial fibrosis of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. **Methods** Dahl salt-sensitive hypertensive rats were treated with high-salt diets or combined with eplerenone (100 mg/kg per day, orally) for 8 weeks. Then measured blood pressure, heart weight/body weight ratios, assessed myocardial fibrosis level by myocardial tissue AZAN staining and quantification of collagen IV mRNA, and also detected the expression of mineralocorticoid receptor protein by Western blot and inflammation related factor in myocardial tissue such as PAI-1 and TGF- β 1 mRNA expression by Real Time PCR, then analysed the relationship of the expression of mineralocorticoid receptor and myocardial fibrosis. **Results** Dahl salt-sensitive rats fed with a high salt diet had increased blood pressure [(168.1 \pm 10.8) mmHg vs (124.3 \pm 10.2) mmHg] and heart weight/body weight ratio [(0.341 \pm 0.006) vs (0.287 \pm 0.004)]. The percentage of myocardial fibrosis (11.78% \pm 0.54% vs 3.12% \pm 0.55%) and collagen IV mRNA (3.23 \pm 0.21 vs 1.32 \pm 0.06) expression were increased in myocardial tissue. The expression of MR protein and PAI-1, TGF- β 1 mRNA were also increased in myocardial tissue, PAI-1 and TGF- β 1 mRNA expression were positively related with myocardial fibrosis. Combined with eplerenone in diet, following parameters including blood pressure, heart weight/body weight ratios, myocardial fibrosis level, MR protein, mRNA of collagen, PAI-1 and TGF- β 1 were

[收稿日期] 2015-07-08

[修回日期] 2015-09-28

[基金项目] 常州市卫生局重大科技项目 (ZD201012)

[作者简介] 朱傲霜, 博士, 副主任医师, 主要从事高血压的发病机制研究, E-mail 为 1579896672@qq.com。通讯作者张宇燕, 硕士, 主任医师, 主要从事冠心病的发病机制研究, E-mail 为 drzhuaoashuang@hotmail.com。丁志坚, 硕士, 主任医师, 主要从事高血压的发病机制研究, E-mail 为 jdgy2002@hotmail.com。

decreased. **Conclusion** Interaction of MR and corresponding hormone, can induce inflammatory reaction in heart and result in myocardial fibrosis. MR antagonists can relieve myocardial fibrosis induced by hypertension, and improve myocardial remodeling.

肾素血管紧张素醛固酮系统的激活在心血管疾病的发生机制中占重要的地位,血管紧张素 II 和醛固酮与盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR) 结合可以直接诱导组织的损伤,从而导致心血管疾病的发生^[1]。多项临床试验证实阻断血管紧张素 II 的作用可以减少高危人群中的心血管事件发生,同时盐皮质激素受体拮抗剂联合血管紧张素转化酶抑制剂可以进一步改善心脏受损,以及减少致死性心血管事件的发生^[2-3]。以前的研究表明盐皮质激素受体不仅在肾脏、血管等部位表达,同时也在心肌组织上也有表达^[4-5],盐皮质激素受体拮抗剂对心脏有明显的保护作用^[6-7],但是它在心肌损伤中的作用机制目前并不很明确。我们通过 Dahl 盐敏感高血压大鼠建立模型,通过用受体拮抗剂阻断盐皮质激素受体的作用,探讨盐皮质激素受体在心肌纤维化中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

PCR 用的试剂包括 Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), RT 试剂盒 (美国 ABI 公司) 和 CYBR Green 荧光试剂盒 (日本 TAKARA 公司)。蛋白印迹用的抗体包括兔抗大鼠 MR 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 小鼠抗大鼠 β -actin 抗体 (美国 SIGMA 公司), HRP 标记抗兔及抗鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch) 和荧光标记盒 (美国 PIERCE 公司)。

1.2 动物实验

约 4~5 周雄性 Dahl 盐敏感大鼠 (Sankyo Laboratory 公司, 日本) 给予普通饲料进行适应性饲养一周后按基线收缩压区组设计法随机分 3 组喂养 8 周: 低盐饲料 (含 0.45% 氯化钠) 组 7 只, 高盐饲料 (含 7% 氯化钠) 组 (不含依普利酮) 8 只, 高盐饲料中含依普利酮 (100 mg/kg) 组 7 只 (依普利酮事先由辉瑞公司按 1.0 mg/g 的浓度合成入饲料, 并用食用色素进行每组饲料标记)^[8], 所有的饲料均购买于 Nippon Charles River。使用 BP-98A 大鼠生理记录仪 (BP-98A; 日本 Softron 公司) 的尾环式感应器测量大鼠血压心率, 获得大鼠基线生理数据, 并在分组喂养 4 周及 8 周时再次检测生理数据。

1.3 标本的留取

大鼠喂养 8 周结束后采用乙醚麻醉下断头采血, 4℃ 下离心 3 000 r/min, 取上清为血浆, -20℃ 冻存后择期检测血清学指标。立即解剖大鼠取得心脏, 称重后剪取自心尖部 5 mm 部分保存于 10% 福尔马林溶液中, 进一步行心肌纤维化病理检查。其余心脏组织立即给予液氮冰冻后保存于 -80℃ 冰箱择期进行分子生物学实验。

1.4 大鼠的心肌纤维化检测

心尖部组织用石蜡包埋后切成 3 μ m 厚度的切片, 脱水后进行 AZAN 染色, 每组在心尖部及左心室游离壁随机选择 30 个区域, 使用 WINROOF 图像处理软件进行心肌纤维化的计算^[9]。

1.5 实时荧光定量 PCR

按照试剂公司提供的方法用 Trizol (美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA。实时荧光定量 PCR 是应用 CYBR Green 试剂盒 (TAKARA 公司, 日本) 和 ABI PRISM 7000 荧光定量 PCR 仪 (ABI-7000, 美国 ABI 公司) 分析 MR、Collagen IV、TGF- β 1、PAI-1、18S mRNA 水平, 每个样本的基因水平以对照组样本 Ct 为基准, 运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对定量值。目标基因的表达量用每个基因的原始数据和管家基因 18S 归一化处理后表示。检测基因引物如下:

Collagen IV 序列: 正向引物 5'-GAGGGTGCTG-GACAAGCTCTT-3', 反向引物 5'-TAAATGGACTG-GCTCGGAATTC-3'。TGF- β 1 序列: 正向引物 5'-TACTACGCCAAAGAAGTCACCC-3', 反向引物 5'-CCCGAATGTCTGACGTATTGAA-3'。PAI-1 序列: 正向引物 5'-TGGAGAGGCACACCAAAGGTAT-3', 反向引物 5'-CCTCTAAGAAGGGGGTCTTCCA-3'。18S 序列: 正向引物 5'-ACGGAAGGGCACCACCAGGA-3', 反向引物 5'-CACCACCACCCACGGAATCG-3'。

1.6 免疫印迹法检测大鼠 MR 蛋白表达

液氮研磨 50 mg 心肌组织后用 RIPA 裂解液, 裂解离心, 取得蛋白样本, 并用紫外线分光光度计测定蛋白浓度。分离的蛋白同量的蛋白样本行 SDS-PAGE 电泳, 转印到 PVDF 膜上, 予 MR 一抗及 HRP 标记二抗孵育, 显影并压片曝光。免疫印迹信号表达水平用图像分析系统测定蛋白质条带相对 β 肌动蛋白 (β -actin) 作为对照校正。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数间的比较应用 t 检验,多个均数间的比较用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。PAI-1、TGF- β 1 和心肌纤维化程度进行非线性相关分析(Pearson 相关性检验)。

2 结果

2.1 高盐饮食对 Dahl 盐敏感大鼠心肌组织盐皮质激素受体表达的影响

Dahl 盐敏感大鼠经过 8 周的不同饮食,高盐组大鼠的血压较低盐饮食组明显升高($P < 0.01$),高盐饮食组大鼠的心脏/体重比值较低盐组明显增加($P < 0.01$;表 1)。高盐组大鼠心肌组织盐皮质激素受体蛋白表达水平较低盐组明显升高(0.38 ± 0.03 比 0.21 ± 0.07 , $P < 0.01$;图 1)。

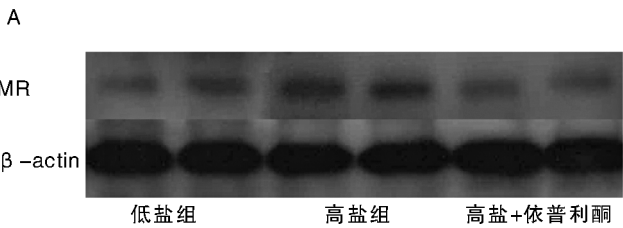


图 1. 依普利酮明显抑制高盐引起的 Dahl 盐敏感大鼠盐皮质激素受体

表 1. 依普利酮改善高盐引起的 Dahl 盐敏感大鼠血压 (mmHg) 和心脏/体重比值

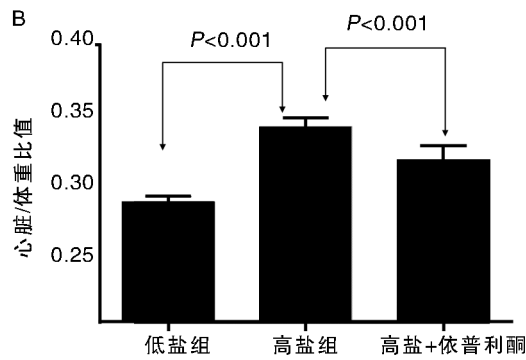
Table 1. Eplerenone improving the blood pressure (mmHg) and heart/body weight ratio of Dahl salt-sensitive hypertensive rats induced by high salt diet

分组	血压			心脏/体重比
	0 周	4 周	8 周	8 周
低盐组	103.6 \pm 3.7	109.4 \pm 3.6	124.3 \pm 4.1	0.287 \pm 0.002
高盐组	102.5 \pm 3.6	128.1 \pm 2.7 ^a	168.1 \pm 3.8 ^a	0.341 \pm 0.003 ^a
高盐+依普利酮组	104.1 \pm 2.8	112.6 \pm 2.4 ^{ab}	117.7 \pm 4.1 ^{ab}	0.317 \pm 0.004 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与低盐组比较; b 为 $P < 0.01$, 与高盐组比较。

2.2 高盐饮食大鼠的心肌纤维化

石蜡包埋大鼠的心肌组织,用 AZNA 染色,高盐组的大鼠的血管以及间质组织的纤维化面积较低盐组明显增加(图 2A),其心肌组织的纤维化率约为低盐饮食组的 3.8 倍;高盐组心肌组织的胶原蛋白 IV mRNA 水平较低盐组明显升高($P < 0.01$;图 2B)。



A 为不同组间 Dahl 盐敏感大鼠盐皮质激素受体的免疫印迹代表性图片,B 为用 β -actin 校正后不同组间 Dahl 盐敏感大鼠盐皮质激素受体的表达水平。

Figure 1. Eplerenone inhibited the expression of mineralocorticoid receptor in Dahl salt-sensitive hypertensive rats induced by high salt diets

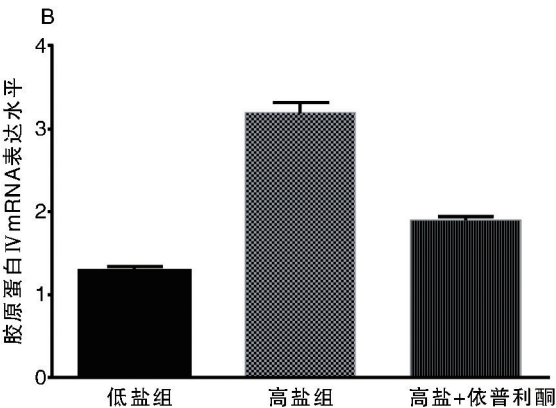
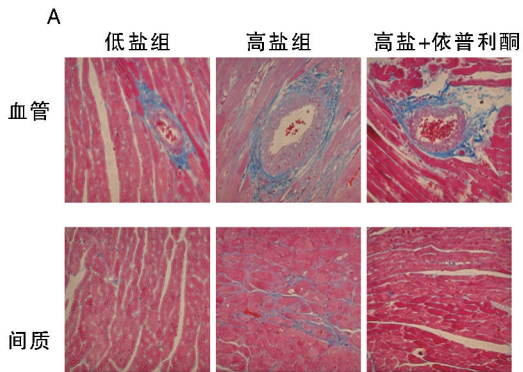


图 2. 依普利酮明显改善高盐引起的 Dahl 盐敏感大鼠心肌纤维化

A 为大鼠不同心肌部位 AZAN 染色代表性图片,B 为实时荧光定量 PCR 检测不同组间大鼠心肌组织胶原蛋白 IV mRNA 表达水平。

Figure 2. Eplerenone improving myocardial fibrosis of Dahl salt-sensitive hypertensive rats induced by high salt diet

2.3 心肌组织纤维化和 PAI-1 和 TGF-β1 的基因表达水平

实时荧光定量 PCR 检测大鼠心肌组织 PAI-1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达水平,高盐组大鼠心肌组

织的 PAI-1 和 TGF-β1 基因表达较盐组明显增加 ($P<0.01$;图 3)。同时我们发现大鼠心肌组织的纤维化程度和心肌 PAI-1($r=0.481, P<0.01$)和 TGF-β1($r=0.853, P<0.01$)呈正相关。

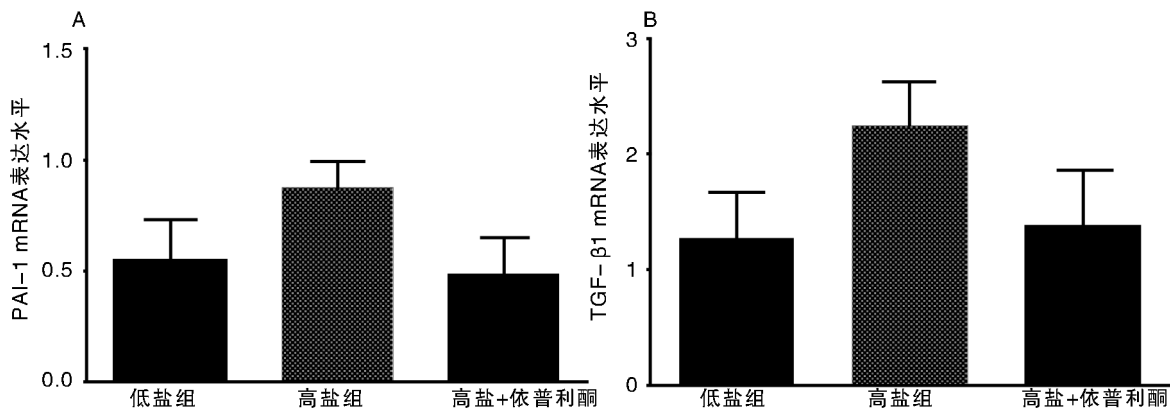


图 3. 依普利酮明显抑制高盐诱导的 Dahl 盐敏感大鼠心肌组织 PAI-1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达 A 为不同组间大鼠心肌组织 PAI-1 的 mRNA 表达水平,B 为不同组间大鼠心肌组织 TGF-β1 的 mRNA 表达水平。

Figure 3. Eplerenone inhibited the mRNA expression of PAI-1 and TGF-β1 in Dahl salt-sensitive hypertensive rats induced by high salt diet

3 讨论

盐皮质激素受体是醛固酮的细胞内受体,它的激活参与心血管疾病发生和发展^[10]。盐皮质激素受体不仅可以被醛固酮直接激活而且还可以被血管紧张素 II 激活引起心肌组织损伤和心肌肥厚^[1]。本研究中使用 Dahl 盐敏感的大鼠,利用高盐饮食诱导大鼠的血压明显增高(表 1),我们发现高盐组大鼠的心脏和体重比值明显升高,说明高盐饮食通过诱导大鼠高血压从而导致了大鼠的心肌肥厚。我们用 WB 方法证实大鼠的心肌组织表达一定水平的盐皮质激素受体,这同以前的研究一致^[4-5]。高盐组大鼠心肌组织的盐皮质激素受体的表达明显升高,而且心肌组织表达的胶原蛋白 mRNA 增加,这同盐皮质激素受体激活刺激心肌细胞胶原基因表达的研究结果一致^[11]。我们进一步通过 AZAN 染色证实大鼠心肌的纤维化比例,更直观的表明心肌纤维化的程度。以前的研究表明肾素血管紧张素醛固酮系统激活肾脏、血管等盐皮质激素受体,引起局部的炎症^[12]。因此,大鼠心肌的纤维化可能和激活盐皮质激素受体激活继发炎症有关。我们进一步检测心肌组织的 PAI-1 和 TGF-β1 的基因表达水平,我们发现盐皮质激素受体增加的心肌组织中 PAI-1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达明显升高,这同肾小球系膜细胞的盐皮质激素受体激活增加了 TGF-β1

合成结果一致^[13]。这说明大鼠心肌纤维化与盐皮质激素受体激活引起的炎症有关。当然,我们利用高盐饮食诱导盐皮质激素受体表达的其他作用也可能参与了心肌的纤维化。

以前的研究表明拮抗盐皮质激素受体可以减轻慢性高血压负荷鼠的心力衰竭程度以及降低氧化应急、炎症反应,减少组织器官的损伤^[14-15]。临床实验也证实盐皮质激素受体拮抗剂可以减少高危患者的不良心血管事件的发生率,改善心功能^[2,16-17]。我们利用盐皮质激素受体拮抗剂依普利酮对 Dahl 盐敏感大鼠进行干预,发现依普利酮有效降低高盐饮食引起的高血压,同时降低了大鼠心脏和体重的比值,说明依普利酮改善心肌肥厚。依普利酮明显降低了心肌组织的盐皮质激素受体的蛋白表达,改善心肌组织纤维化程度,降低了心肌组织的 PAI-1 和 TGF-β1 的 mRNA 表达,证实了拮抗盐皮质激素受体作用可以有效改善心肌炎性反应,改善了心肌纤维化,这均支持盐皮质激素受体拮抗剂改善心肌损伤的临床研究^[6-7]。

我们利用 Dahl 盐敏感大鼠,通过高盐饮食和盐皮质激素受体拮抗剂调节大鼠心肌盐皮质激素受体激活水平,说明心肌组织盐皮质激素受体激活,介导了心肌炎症,从而引起心肌组织纤维化和心肌肥厚。心肌的盐皮质激素受体介导了心肌组织的纤维化,因此通过使用盐皮质激素受体拮抗剂,可

以有效的保护心脏,尤其对心肌肥厚的患者尤为重要,这为临床应用盐皮质激素受体拮抗剂治疗心血管疾病提供更多的理论依据。

(致谢:感谢日本金泽大学医学部研究科武田仁勇教授的指导和帮助)

[参考文献]

- [1] Luther JM, Luo P, Wang Z, et al. Aldosterone deficiency and mineralocorticoid receptor antagonism prevent angiotensin II-induced cardiac, renal, and vascular injury [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(6): 643-651.
- [2] Rossignol P, Dobre D, McMurray JJ, et al. Incidence, determinants, and prognostic significance of hyperkalemia and worsening renal function in patients with heart failure receiving the mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone or placebo in addition to optimal medical therapy: results from the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF) [J]. *Circ Heart Fail*, 2014, 7(1): 51-58.
- [3] Mehdi UF, Adama-Huet B, Raskin P, et al. Addition of angiotensin receptor blockade or mineralocorticoid antagonism to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(12): 2 641-650.
- [4] 范煜东,刘 铭,王恒大. 醛固酮合成酶和盐皮质激素受体基因在充血性心力衰竭心肌的表达[J]. *中国心血管杂志*, 2004, 9(3): 186-190.
- [5] Iqbal J, Andrew R, Cruden NL, et al. Displacement of cortisol from human heart by acute administration of a mineralocorticoid receptor antagonist [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(3): 915-922.
- [6] van den Berg TN, Rongen GA, Frohlich GM, et al. The cardioprotective effects of mineralocorticoid receptor antagonists [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(1): 72-87.
- [7] Kolkhof P, Delbeck M, Kretschmer A, et al. Finerenone, a novel selective non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 64(1): 69-78.
- [8] Takeda Y, Zhu A, Yoneda T, et al. Effects of aldosterone and angiotensin II receptor blockade on cardiac angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme 2 expression in Dahl salt-sensitive hypertensive rats [J]. *Am J Hypertens*, 2007, 20(10): 1 119-124.
- [9] Kato MF, Shibata R, Obata K, et al. Pioglitazone attenuates cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension: role of activation of AMP-activated protein kinase and inhibition of Akt [J]. *J Hypertens*, 2008, 26(8): 1 669-676.
- [10] Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, et al. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo [J]. *Hypertension*, 2013, 61(2): 361-367.
- [11] Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation [J]. *Hypertension*, 2008, 17: 174-180.
- [12] Zhu A, Yoneda T, Demura M, et al. Effect of mineralocorticoid receptor blockade on the renal renin-angiotensin system in Dahl salt-sensitive hypertensive rats [J]. *J Hypertens*, 2009, 27(4): 800-805.
- [13] Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms [J]. *Kidney Int*, 2006, 69: 105-113.
- [14] 王 川,张少玲,严 励,等. 单纯过量醛固酮在正盐饮食下导致SD大鼠心肌受损[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2010, 31(3): 321-326.
- [15] Nagata K, Obata K, Xu J, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2006, 47(4): 656-664.
- [16] Funder JW. Mineralocorticoid receptor antagonists: emerging roles in cardiovascular medicine [J]. *Integr Blood Press Control*, 2013, 6: 129-138.
- [17] Du J, Fan YY, Hitomi H, et al. Mineralocorticoid receptor blockade and calcium channel blockade have different renoprotective effects on glomerular and interstitial injury in rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(3): 802-808.

(此文编辑 李小玲)