

钠氢交换体 1 在病理性心肌肥厚大鼠心肌组织及血浆中的表达 *

宋俊燕 孔 涛 吴 娜 宁阳根[△]
(中南大学 湘雅医院 心内科 湖南 长沙 410008)

摘要 目的：研究异丙肾上腺素诱导的病理性心肌肥厚大鼠心肌组织及血浆中钠氢交换体 1 (sodium-hydrogen exchanger 1, NHE-1) 的表达,探讨 NHE1 在心肌肥厚发生和发展中的作用。方法：30 只雄性 SD 大鼠随机并平均分为 2 组 病理性心肌肥厚组和对照组,每组 15 只,病理性心肌肥厚组 (以下简称 ISO 组) 予以 ISO (异丙肾上腺素) 连续每日以 20、10 和 5mg / kg 的剂量递减皮下注射,再以 3mg / kg 的剂量维持皮下注射 7d,对照组予相同剂量生理盐水皮下注射。给药结束后进行心脏超声检测左室舒张末径 (LVEDD)、左室收缩末径 (LVESD)、室间隔厚度 (IVST)、短轴缩短率 (FS)、左室射血分数 (LVEF)。分别测定各组大鼠体重 (BW)、心室重量 (VW)、左心室重量 (LVW),计算心室重量指数 VWI (VW / BW)、左心室重量指数 LVWI (LVW / BW)。取血检测血浆中 NHE-1 的浓度,并取心肌组织观察病理形态学特征,用免疫组化法检测心肌组织中 NHE-1 的表达量。结果：与对照组相比,ISO 组大鼠 LVEF、IVST 显著增加 (P<0.05),LVESD 明显降低 (P<0.05),VWI、LVWI 明显增加 (P<0.01),血浆 NHE-1 浓度明显升高 (P<0.01),心肌组织 NHE-1 表达增多 (P<0.01)。结论：NHE-1 可能在病理性心肌肥厚的发生和发展过程中起着重要作用。

关键词 心肌肥厚 异丙肾上腺素 钠氢交换体 1 NHE-1

中图分类号 Q95-3,R54 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 11-2037-04

Expression of Sodium-Hydrogen Exchanger 1 in Cardiac Tissue and Plasma of Rats with Cardiac Hypertrophy*

SONG Jun-yan, KONG Tao, WU Na, NING Yang-gen[△]
(Dept. Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSREACT Objective: To investigate the effects of Sodium-Hydrogen Exchanger 1 (NHE-1) on the initiation and development of cardiovascular diseases and to investigate the role of NHE-1 in cardiac hypertrophy. **Methods:** A total of thirty male Sprague-Dwley (SD) rabbits were randomly and equally divided into 2 groups: Rat myocardial hypertrophy models were established by subcutaneous injection of isoproterenol, while the control group received an equivalent volume of 0.9% saline alone. Left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end systolic diameter (LVESD), interventricular septum (IVST), fractional shortening (FS), and left ventricular ejection fraction (LVEF) were assessed by echocardiogram. The body weight (BW), ventricular weight (VW), left ventricular weight (LVW), ventricular weight index (VWI) and left ventricular weight index (LVWI) were determined. The pathomorphological features of the myocardium were observed by electronmicroscope. Plasma levels of NHE-1 in the myocardial muscle were measured. **Results:** There was no significance difference between the model group and control group in LVEF, IVST, VWI and LVWI (P<0.05). The LVESD decreased (P<0.05) compared with that in control group. The myocardial and plasma levels of NHE-1 in the model group were obviously higher than those of the control group (P<0.01). **Conclusion:** NHE-1 may play an important role in the progress of cardiac hypertrophy.

Key word: Cardiac hypertrophy; Isoproterenol; Sodium-Hydrogen Exchanger 1; NHE-1

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R54 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)11-2037-04

前言

心肌肥厚是心脏为适应血流动力学负荷而发生的增生,与多种心血管疾病发展过程有关。临床研究表明,心肌肥厚不仅是心衰前的一种适应性反应,而且是发生心肌缺血、心律失常和猝死的独立危险因素,其发生机制尚未完全阐明。心肌肥厚使心血管事件的发生率增加 6~8 倍^[1]。因此,预防和治疗心肌肥厚对减少心血管事件具有重要意义。近年有在体实验研究

表明,NHE1 抑制剂可以缓解、消除甚至逆转心肌肥大和心肌纤维化反应^[2-5],提示 NHE-1 可能是致心肌肥大和纤维化刺激因子的重要下游分子。本实验利用 ISO 诱导心肌肥厚模型,观察心肌肥厚大鼠心肌组织 NHE-1 的表达及血浆中 NHE-1 的浓度,探讨 NHE-1 在心肌肥厚发生和发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及建立模型方案

* 基金项目 湖南省自然科学基金 (07JJ3083)

作者简介 宋俊燕, (1982), 女, 硕士研究生, 住院医师, 心脏病方向, E-mail: songjunyan@foxmail.com

[△]通讯作者 宁阳根, E-mail: xynyg@163.com

(收稿日期 2011-01-03 接受日期 2011-01-26)

30 只健康雄性 SD 大鼠 (购自中南大学动物部), 体重 280-320 g, 饲养环境 (22± 2) °C, 常规饲料喂养, 自由饮水。将大鼠随机平均分为两组, 每组 15 只。ISO 组予以 ISO 连续每日以 20、10 和 5 mg / kg 的剂量递减皮下注射, 再以 3 mg / kg 的剂量维持皮下注射 7 d, 对照组予以相同剂量生理盐水腹腔注射。

1.2 实验仪器及试剂

HPIAS-100 计算机图像分析系统 (美国) Jpendorf 台式高速冷冻离心机 (美国); 分光光度计 (美国) BeckmanCoulter DTX 880 酶标仪 (美国); 大鼠钠氢交换体 1 免疫组化试剂盒 (武汉博士德公司), 浓缩型 SABC 试剂盒 (武汉博士德公司), DAB 显色剂, PBS 液, 无水酒精, 二甲苯等。大鼠钠氢交换体 1 酶联免疫试剂盒 (美国 RD 公司), 异丙肾上腺素 (上海禾丰制药有限公司)。

1.3 超声心动图检查

末次给药后 24 小时, 分别于两组存活大鼠中随机抽取 8 只行彩超检查。将大鼠以戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉后, 应用彩色超声监测仪 (型号 HP sonos 5500, 探头频率 7.5 MHz, 产地 美国) 测量左室舒张末内径 (LVEDD)、左室收缩末内径 (LVESD)、室间隔厚度 (IVST)、缩短分数 (FS)、左室射血分数 (LVEF)。测定值为 5 个心动周期的均值。

1.4 血浆收集

声心动图检测 48 h 后, 内眦静脉取血, 静置 2 小时后将血样低温离心, 分离血浆, 密封, -70 °C 冷存待检。

1.5 心脏重量参数测定

采血后称重, 随后以 10 %水合氯醛 (0.3 ml/kg) 麻醉, 开胸取出心脏, 肉眼观察后, 剪去周围大血管、心外膜脂肪组织, 在冰生理盐水中洗净血液, 滤纸吸干, 沿房室交界处去除左右心房, 用电子天平 (精确度 0.0001 g) 称取心室重量 (ventricular weight, VW), 再剪去右心室游离壁, 保留左心室及室间隔, 称

取左心室重量 (left ventricular weight, LVW)。分别计算 心室重量指数 VWI (VW / BW)、左心室重量指数 LVWI (LVW / BW)。

1.6 心肌组织标本制备及形态学观察

两组动物均于处死称重后取材, 左室心肌以 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 以上, 常规石蜡包埋, 均匀间断切片 5-10 张, 片厚 4 μm, 行 HE 染色, 光镜下观察心肌组织的形态学变化。

1.7 心肌组织 NHE-1 含量的测定

免疫组化方法测定试剂盒由武汉博士德提供: 取上述病理切片, 在标本上滴加一抗, 4 °C 湿盒中过夜, PBS 冲洗标本后滴加生物素标记的第二抗体, 室温下孵育 15 分钟后 PBS 冲洗, 滴加即用型链霉亲和素辣根过氧化物酶 (SP), 室温下孵育后 15 分钟后 PBS 冲洗, DAB 显色, 苏木素复染, 梯度酒精脱水、二甲苯透明后用中性树胶封片, 置镜下观察和拍摄。棕褐色阳性颗粒主要表达于细胞膜下, 采用计算机图像分析系统进行半定量分析, 摄取 400 × 图像输入分析系统内, 测定各组图像的平均灰度值, 每张切片于阳性区选择 5 个无重叠视野, 以灰度值大小作为待测蛋白的阳性表达指数。

1.8 血浆 NHE-1 浓度的测定

酶联免疫法检测血浆钠氢交换体 1 (NHE-1) 浓度。操作严格按照试剂盒说明书进行。试剂盒由美国 RD 公司提供。

1.9 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 心脏超声测定结果

见表 1。ISO 组与对照组相比, LVEF、IVST 显著增加, LVESD 明显降低 ($P<0.05$) LVEDD、FS 增加, 但无统计学差异 ($P>0.05$)。

表 1 心脏彩超检查结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 1 Result of UCG ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	Sample Size	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	IVST (mm)	FS (%)	LVEF (%)
Normal Control	8	6.61± 0.30	5.50± 0.43	1.53± 0.08	35.88± 8.64	69.88± 9.39
ISO	8	6.84± 0.41	5.09± 0.18	1.70± 0.06	41.00± 6.07	80.50± 5.15

2.2 脏器指数测量结果

见表 2。ISO 组与对照组相比, 造模后 BW 无统计学差异

($P>0.05$), VW、LVW 显著增加 ($P<0.01$), VWI、LVWI 显著增加 ($P<0.01$)。

表 2 心脏指数测定 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 Cardiac index ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Group	Sample Size	Before Operation BW(g)	After Operation BW(g)	VW (mg)	LVW (mg)	VWI (mg/g)	LVWI (mg/g)
Normal Control	8	297.29± 13.47	343.97± 13.31	984.04± 67.09	818.54± 48.64	2.86± 0.16	2.38± 0.14
ISO	8	301.30± 8.73	356.50± 15.47	1427.25± 60.89	1075.78± 38.07	4.01± 0.11	3.02± 0.04

2.3 两组血浆中 NHE-1 含量比较

两组血浆中 NHE-1 含量情况见表 3。ISO 组血浆中 NHE-1

浓度较对照组明显增大 ($P<0.01$)。

表 3 两组血浆中 NHE-1 浓度($\bar{x}\pm s$, n = 8)

Table 3 The concentration of NHE-1 in blood($\bar{x}\pm s$, n = 8)

Group	Sample Size	Concentration of NHE-1 (pmol/L)
Normal Control	8	1305.237± 126.221
ISO	8	1607.745± 168.179

2.4 两组形态学改变比较

见图 1,2。对照组镜下见室壁不同切面的心肌细胞胞核清

楚,未见变性、坏死、炎细胞浸润等病理变化;ISO 组镜下见室壁心肌纤维数量增多,心肌细胞显著肥大,核大而深染。

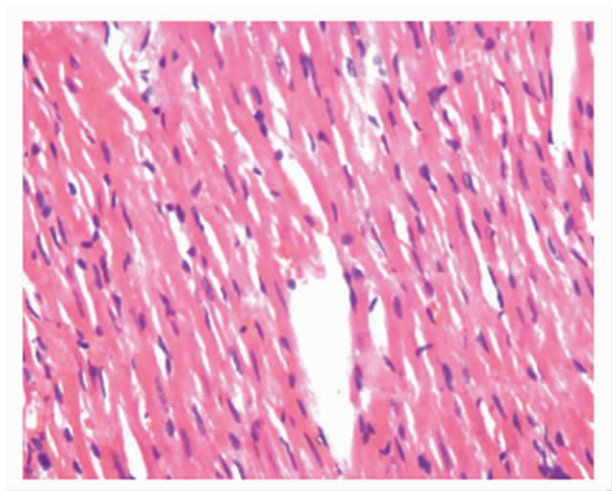


图 1 对照组心肌 HE 染色

Fig.1 Myocardial HE dyeing of normal control group

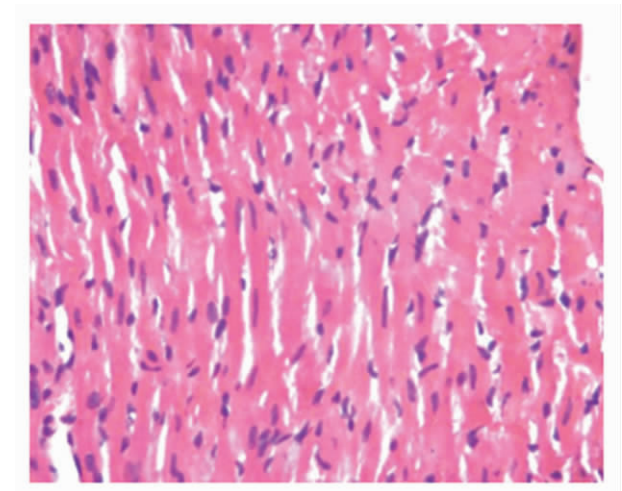


图 2 ISO 组心肌 HE 染色

Fig.2 Myocardial HE dyeing of ISO group

2.5 两组心肌组织中 NHE1 含量比较

见图 3、4,表 4。ISO 组棕黄色颗粒明显较对照组多,表明

ISO 组心肌中 NHE-1 蛋白表达较对照组明显增 (P<0.01)。

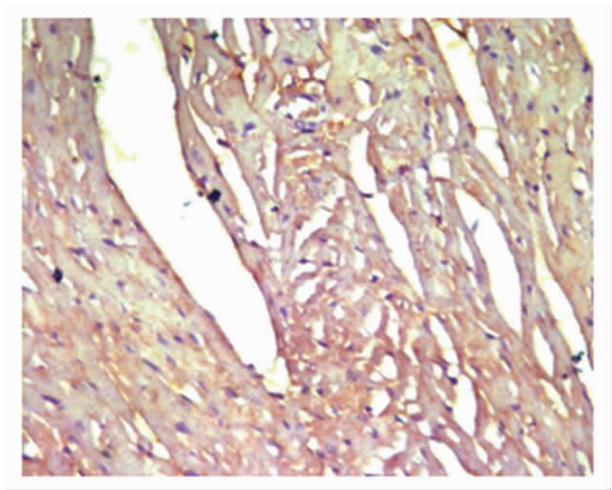


图 3 对照组心肌 NHE-1 表达

Fig.3 The expression of myocardialNHE-1 in normal control group

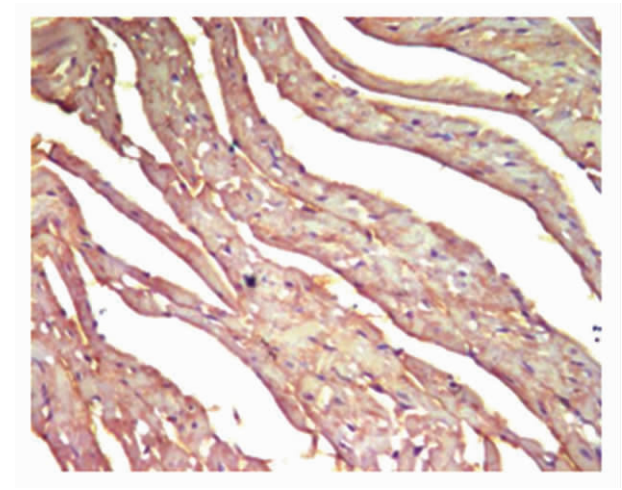


图 4 ISO 组心肌 NHE-1 表达

Fig.4 The expression of myocardialNHE-1 in ISO group

表 4 两组心肌 NHE-1 蛋白表达水平 ($\bar{x}\pm s$, n = 8)

Table 4 The concentration of NHE-1 in myocardium ($\bar{x}\pm s$, n = 8)

Group	Sample Size	Concentration of NHE-1 (OD)
Normal Control	8	155.05± 6.51
ISO	8	170.05± 12.87

3 讨论

慢性心力衰竭是大多数心血管疾病的最终归宿,也是最主要的死亡原因。而心肌肥厚在慢性心衰的发生发展过程中起重要作用,是其重要的代偿机制,也是关键环节。到目前为止,共发现 NHE 有 9 种亚型^[6],几乎所有类型的真核细胞中都有 NHE,而哺乳动物心肌细胞主要表达 NHE-1,其通过 1:1 比例等分子交换细胞外钠离子和细胞内氢离子,从而排出胞内氢离子^[7],借以调节细胞内的 PH 值及细胞容积,并调节 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换体的活动^[1]。NHE-1 的另一个重要功能是参与细胞生长和细胞运动的过程,故 NHE-1 可能在细胞增殖过程中起一定作用。本实验正是从以上出发研究 NHE-1 在病理性心肌肥厚中的作用。

长期去氧皮质酮和高盐饲养诱导单侧肾切除大鼠形成的心肌肥大模型中,其心肌组织 NHE-1 的蛋白表达显著升高^[2]。在对 β_1 肾上腺素受体的慢性刺激导致心肌肥大和心衰的 β_1 肾上腺素受体转基因小鼠,体内 NHE-1 mRNA 和蛋白表达明显上升,提示 NHE-1 的活化是肾上腺素能刺激导致心肌肥大和心肌纤维化的必要途径^[5]。

本研究用免疫组织化学法和酶联免疫法测定了 NHE-1 蛋白在心肌组织的表达及血浆中的浓度,发现在 ISO 所致病理性心肌肥大大鼠模型中 NHE-1 在肥大心肌组织中表达增强,且在血浆中浓度增加。提示 NHE-1 的增加参与了心肌肥厚的发生和发展,但其确切机制仍然不甚明了。但似乎与其参与细胞内 pH 调节的功能无关,因为细胞内其他 pH 调节机制仍然会保持细胞内 pH 的稳定。有动物实验提示,NHE-1 介导的 Na^+ 内流是 α_1 肾上腺素受体激动剂和 ET-1 等促肥大因子导致细胞肥大的主要始动因素^[8]。NHE-1 蛋白的激活和基因高表达能导致细胞内 Ca^{2+} 超载, Ca^{2+} 被认为是细胞生长过程中的第二信使,细胞内 Ca^{2+} 超载可激活神经钙蛋白,促进心肌细胞增生、肥大^[9]。NHE-1 还参与 PKC、Raf-1、MAPK 等多种能够引起细胞生长的激酶的激活^[10],但不能排除 NHE-1 直接影响心肌肥厚过程的作用。

参考文献(References)

[1] Bruckner BA, Razeghi P, Stetson S, et al. Degree of cardiac fibrosis

and hypertrophy at time of implanatation predicts myocardial improvement during left ventricular assist device support [J]. J Heart Lung Transplant, 2004, 23 (1) :36 - 42

[2] Fujisawa G, Okada K, Muto S, et al. Na^+ / H^+ exchange isoform 1 is involved in mineralocorticoid / salt-induced cardiac injury [J]. Hypertension, 2003,41(3):493-498

[3] Cingolani HE, Rebolledo OR, Portiansky EL, et al. Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na^+ / H^+ exchange inhibition [J]. Hypertension, 2003,41(2):373-377

[4] Ennis IL, Escudero EM, Console GM, et al. Regression of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by Na^+/H^+ exchanger inhibition [J]. Hypertension, 2003,41(6):1324-1329

[5] Engelhardt S, Hein L, Keller U, et al. Inhibition of Na^+ / H^+ exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice [J]. Circ Res, 2002,90(7):814-819

[6] 宋俊燕,李沙,宁阳根.钠氢交换体 1 在慢性心衰大鼠心肌组织及血浆中的表达[J]. 现代生物医学进展,2010,(20):3816-3819

Song Jun-yan, Li Sha, Ning Yang-gen. The Expression of Sodium-Hydrogen Exchanger 1 in Heart Failure [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,(20):3816-3819

[7] Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, et al. The myocardial Na^+/H^+ exchange: structure, regulation and its role in heart disease [J]. Circ Res, 1999,85(9):777-786

[8] Hayasaki KY, Kitano Y, Lwasaki T, et al. Na^+ influx via Na^+ / H^+ exchange activates protein kinase C isozymes delta and epsilon in cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31 (8):1559-1572

[9] 石家冲,魏玲.钠氢交换体 1 与心血管疾病关系研究进展 [J].医学综述, 2008,14(24):3710-3712

Shi Jia-chong, Wei Ling. Sodium Hydroxide Exchanger-1 Associated with Cardiovascular Disease [J]. Medical Recapitulate, 2008,14(24): 3710-3712

[10] 金振晓,辛梅,陈涛.NHE1 在心肌肥大,心肌纤维化和心衰中的作用 [J].国际病理科学与临床杂志, 2005,25(6):536-538

Jin Zhen-xiao, Xin Mei, Chen Tao. The role of NHE-1 in cardiac hypertrophy, myocardial fibrosis and heart failure [J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2005, 25(6):536-538