

DOI:10. 3724/SP. J. 1008. 2008. 00177

· 论 著 ·

L-精氨酸-一氧化氮途径对病理性心肌肥厚形成的抑制作用及相关机制

杨 涛¹, 张 伟², 张 雷^{1*}

1. 河北医科大学组织学与胚胎学教研室, 石家庄 050017
2. 河北医科大学基础课部药理教研室, 石家庄 050091

[摘要] **目的:** 从在体和离体水平分别探讨 L-精氨酸对病理性心肌肥厚的影响及相关机制。**方法:** (1) 在体水平: 将大鼠分为假手术组、手术组、L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 组和 L-硝基精氨酸甲酯 (N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 组 (L-Arg+L-NAME 组), 利用腹主动脉缩窄制作大鼠模型。检测心肌内蛋白合成总量与心率、血压; 比色法检测心肌内一氧化氮 (NO) 含量、放射免疫法检测心肌 AT II 含量, RT-PCR 检测心肌内血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) mRNA 的表达水平。(2) 离体水平: 将原代培养的心肌细胞分为对照组、血管紧张素 II (Angiotensin II, AT II) 处理组、L-Arg 处理组 (AT II + L-Arg) 及 L-NAME 处理组 (AT II + L-Arg + L-NAME)。RT-PCR 检测原代培养心肌细胞诱导型一氧化氮合酶 (inducible NO synthase, iNOS)、AT II 的 1 型受体 (AT II receptor type 1, ATR1) 和 2 型受体 (AT II receptor type 2, ATR2) mRNA 的表达水平; Western 印迹法检测原代培养心肌细胞 iNOS 蛋白表达水平。**结果:** (1) L-Arg 提高了腹主动脉缩窄大鼠心肌内 NO 含量, 降低了心肌 AT II 含量、心肌蛋白合成总量、左心室质量/体质量比值以及 ACE mRNA 的表达量; L-NAME 可消除 L-Arg 的上述作用; (2) 在离体条件下, 与 AT II 组相比, L-Arg 处理组心肌细胞 NO 含量、iNOS mRNA 及蛋白水平的表达量均有提高, ATR1 mRNA 表达水平下降; L-NAME 处理组与 AT II 处理组就上述指标相比无显著性差异; 各组细胞 ATR2 mRNA 表达水平无明显差异; (3) 多元逐步回归分析显示心肌内蛋白合成总量与血压水平、心率之间均不存在回归关系, 而心肌 NO 和 AT II 含量则可作为心肌内蛋白合成总量的预测因子; (4) 心肌内 AT II 含量、ACE mRNA 表达量及心肌细胞 ATR1 mRNA 表达量均与 NO 含量之间存在线形负相关关系。**结论:** (1) 心肌肥厚的形成与心肌内 NO、AT II 含量密切相关; (2) L-Arg 通过增强心肌 iNOS 表达, 致 NO 生成增加。NO 可减少心肌内 AT II 生成, 并通过调控心肌 ACE 及 ATR1 表达来抑制病理性心肌肥厚的形成; (3) ATR2 并未参与上述过程。

[关键词] L-精氨酸; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 血管紧张素 II; 心肌肥厚

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0177-07

Inhibitory effects of L-arginine-nitric oxide pathway on formation of pathological cardiac hypertrophy and the related mechanisms

YANG Tao¹, ZHANG Wei², ZHANG Lei^{1*}

1. Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China
2. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the *in vivo* and *in vitro* effects of L-arginine (L-Arg) on cardiac hypertrophy and the related mechanisms. **Methods:** (1) *In vivo* study, rats were divided into sham-operation group, operation group, L-arginine (L-Arg) group, and N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) group. Coarctation of abdominal aortic artery was performed in rats of the operation group, L-Arg group and L-NAME group. The total protein level in the heart, the heart rate and blood pressure were all determined; cardiac nitric oxide (NO) content was detected by colorimetric method; cardiac AT II content was determined by radioimmunoassay; and the expression of angiotensin converting enzyme (ACE) mRNA was determined by RT-PCR. (2) *In vitro* study, primarily cultured cardiomyocytes were divided into control group, Angiotensin II (AT II)-treated group, L-Arg treated group, and L-NAME treated group. RT-PCR was used to examine the mRNA expression of inducible NO synthase (iNOS), AT II receptor type 1 (ATR1) and ATR2; Western blotting as employed to examine the iNOS protein expression. **Results:** (1) L-Arg increased the content of NO in animals of the operation group, decreased the content of AT II, total protein synthesis, ratio of left ventricle mass/body mass, and expression of ACE mRNA; and L-NAME could block the

[收稿日期] 2007-10-17 **[接受日期]** 2007-11-06

[作者简介] 杨 涛, 博士生.

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0311-86265608, E-mail: zhanglei@hebm. edu. cn

above effect of L-Arg. (2) Compared with AT II group, AT II + L-Arg higher content of NO, higher expression of iNOS mRNA and protein, and lower ATR1 mRNA level; the above indices were similar between AT II + L-Arg + L-NAME group and AT II group. The expression of ATR2 mRNA was not significantly different between all the groups. (3) Multiple stepwise regression analysis revealed no relationship of regression between total protein level with blood pressure level or the heart rate. Cardiac NO and AT II contents could serve as predictors for total protein level in the heart. (4) Cardiac NO content was negatively correlated with the cardiac AT II content and ACE and ATR1 expression level. **Conclusion:** (1) The development of cardiac hypertrophy is closely related to cardiac NO and AT II levels. (2) L-Arg can increase cardiac NO content through enhancing myocardial iNOS expression; NO can reduce AT II production in myocardiocytes and can inhibit the formation of cardiac hypertrophy by reducing the expression of ACE and ATR1. (3) ATR2 does not participate in the above process.

[KEY WORDS] L-arginine; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; angiotensin II; cardiac hypertrophy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2):177-183]

病理性心肌肥厚是高血压最常见的并发症,既往认为是高血压时心脏射血后负荷增加引起心肌组织代偿性生长的结果。近来认为,在心脏中尚存在相对独立的肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS), 局部 RAS 活化后, 心肌组织内血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 表达量增加, 随后所产生的血管紧张素 II (angiotensin II, AT II) 能够与心肌组织内相应的 AT II 受体 (angiotensin II receptor, ATR) 相结合, 从而发挥出生长因子样作用^[1]。当心脏受到病理性刺激时, 通过 ACE、AT II 及 ATR 表达量的相继改变, 级联激活后续的多种信号转导激酶, 最终促进 DNA 转录而使心肌肥厚形成。

L-精氨酸 (L-Arg) 是体内合成一氧化氮 (NO) 的前体, 即 L-Arg 在一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的催化下, 生成 NO 与 L-瓜氨酸, 而 NO 在缺血性心脏病中发挥着重要的作用。在心肌组织中存在诱导型一氧化氮合酶 (inducible NOS, iNOS), L-Arg 通过 iNOS 所生成的 NO 对心肌肥厚具有抑制作用。本实验分别从在体与离体水平研究心肌肥厚形成过程中及该过程受到 L-Arg 影响时心肌 NO、AT II 含量的变化以及 iNOS、ACE、ATR 表达, 来探讨 NO、AT II、ACE 和 ATR 在病理性心肌肥厚形成过程中的作用及 L-Arg 对心肌肥厚作用的分子机制, 从而为临床上对病理性心肌肥厚的治疗提供新的思路和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 14~16 周龄雄性近交系 SD 大鼠, 体重 180~220 g, 由河北医科大学实验动物中心提供。L-Arg、AT II、L-硝基精氨酸甲酯 (N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 均购自 Sigma 公司; 用于检测 iNOS、ACE、ATR1、ATR2 mRNA 表达的引物由 Invitrogen 公司合成; 反转录试剂盒、PCR 试

剂盒以及 iNOS 蛋白表达水平检测 (Western 印迹) 用抗体及耗材亦购自 Invitrogen 公司; 用于检测心肌组织及细胞培养液 NO 含量的亚硝酸盐/硝酸盐比色法检测试剂盒由 Boehringer Mannheim 公司提供; 放射免疫法测定心肌 AT II 含量的检测试剂盒购自北京北方免疫试剂研究所。

1.2 在体水平实验

1.2.1 模型与分组 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 在无菌条件下, 在右肾动脉上方分离一小段腹主动脉, 用 4 号手术缝线, 将一外径 0.8 mm 的钢针与腹主动脉一起结扎, 再迅速抽出钢针, 造成腹主动脉缩窄。选取术后存活的大鼠, 随机分为 3 组, 每组 8 只。(1) 手术组: 不用药; (2) L-Arg 组: 将 L-Arg 溶解在饮水中, 术毕即开始对大鼠进行灌饲, 使大鼠每日摄取 L-Arg 600 mg/kg; (3) L-NAME 组: 将 L-Arg 及 NOS 抑制剂 L-NAME 均溶解在饮水中, 术毕即开始对大鼠进行灌饲, 使大鼠每日摄取 L-Arg 600 mg/kg, L-NAME 50 mg/kg。另取 8 只大鼠作为对照 (假手术组), 只分离出腹主动脉而不做缩窄处理。

1.2.2 平均动脉压 (MABP) 及心率 (HR) 的测定 术后 6 周, 腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 将大鼠麻醉后, 右颈总动脉插管, 连接压力换能器, 用 RM6240B 多道生理信号采集处理系统采集 MABP (正常大鼠 MABP 90~100 mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa; MABP $\geq$ 120 mmHg 定为高血压) 及 HR 数据。

1.2.3 左心室质量指数 (left ventricular mass index, LVMI) 的测定 即左心室质量/体质量比值 (mg/g)。麻醉后取大鼠心脏, 切除右心室、双心房及出入心的大血管根部, 分离出左心室 (包括室间隔), 用生理盐水冲洗后, 滤纸吸干左心室附带的液体, 于电子称量记数天平上称量后计算 LVMI。

1.2.4 左室心肌总蛋白含量 (total protein content,

TPC)的测定^[2] 在心尖与冠状沟之间的中点处(即左室前乳头肌在左室前壁的投影点),于左室前壁取约0.2 g心肌组织,准确称量后用1 ml玻璃匀浆器进行匀浆化处理。以牛血清白蛋白溶液制作标准曲线及回归方程,利用Bradford法作总蛋白含量测定。

1.2.5 心肌ATⅡ含量测定 在心尖处取约0.1 g心肌组织,准确称量后加入5倍体积0.5 mol/L乙酸,于100℃水浴环境中煮沸10 min,冷却后匀浆化处理,于4℃以950×g离心20 min,取上清液。参照检测试剂盒说明书,采用放射免疫法测量ATⅡ含量。

1.2.6 心肌NO含量测定 将心肌组织于冰浴环境中剪碎,加入已预冷的0.3 mol/L高氯酸后进行匀浆化处理。收集匀浆液,于4℃环境中以15 000×g离心10 min,取上清液。参照比色法检测试剂盒说明书,测定每毫克蛋白中亚硝酸盐/硝酸盐(NO₂⁻/NO₃⁻)含量(nmol/mg),来间接反映NO的生成量。

1.2.7 检测心肌组织中ACE mRNA的表达 采用一步法检测试剂盒,利用RT-PCR测定心肌中ACE mRNA的表达量。心肌总RNA的提取依照文献^[3]所述进行,反转录合成cDNA参照试剂盒说明进行。PCR基本反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,30个循环;72℃ 7 min。针对不同基因进行PCR反应,其反应条件依照相关文献所述而略有变动。引物序列(5'→3')如下:ACE上游GTC AGC TTC ATC ATC CAG TT,下游AGG AAG AGC AGC AGC CAC TG,扩增片段长度403 bp;GAPDH上游TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA,下游AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT,扩增片段长度309 bp。取PCR产物,在1.5%琼脂糖凝胶(含溴乙锭)上电泳,产物条带经光密度检测仪(Quantity One, Bio-Rad)分析,以目的基因与GAPDH光密度值的比值衡量目的基因mRNA的相对表达量。

1.3 离体实验

1.3.1 离体心肌细胞的培养 采用出生后1~3 d的健康SD大鼠,在无菌条件下取出心脏,置于D-Hanks液中,除去心房、右心室、出入心的血管及心内、外膜后,将左心室剪成1 mm³碎块,弃去D-Hanks液,加入0.1%胰酶10 ml,在37℃水浴中磁力搅拌消化5 min后,吸出上层细胞悬液,加入等体积含20%胎牛血清的M199培养液以终止消化,然后以450×g离心5 min,弃上清,收集细胞。相似地,再向上述心肌组织中加入胰酶消化5 min,重复上述步骤以收集细胞。反复消化8次后,将收集到

的全部细胞用含15%血清的M199培养液重悬,置于含5% CO₂的培养箱中。利用心肌细胞与非心肌细胞短时间内贴壁能力不同的特点,采用差速贴壁法纯化心肌细胞(将迅速贴壁的非心肌细胞除去)。然后以1×10⁵/ml的密度接种心肌细胞于24孔培养板(每孔1 ml)。在培养液中加入5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU) 0.05 mmol/L培养48 h后,更换为无血清培养液培养24 h后开始药物实验。

1.3.2 药物实验分组 (1)对照组:培养心肌细胞,无处理因素;(2)ATⅡ处理组:培养液中加入ATⅡ(终浓度0.1 μmol/L);(3)L-Arg处理组:培养液中同时加入ATⅡ(终浓度0.1 μmol/L)和L-Arg(终浓度100 μmol/L);(4)L-NAME处理组:培养液中同时加入ATⅡ(终浓度0.1 μmol/L)、L-Arg(终浓度100 μmol/L)和L-NAME(终浓度15 μmol/L)。各组所施加的处理因素每隔12 h分别追加1次,每24 h更换培养液1次,各组受处理因素影响合计48 h。

1.3.3 心肌细胞培养液NO浓度的检测 末次追加处理因素后12 h,取培养液0.5 ml,按1.2.6项下方法操作,用NO₂⁻/NO₃⁻含量来间接反映NO的生成量。

1.3.4 RT-PCR检测心肌细胞iNOS、ATR1、ATR2 mRNA的表达 弃去培养液,心肌细胞经胰酶消化、离心、清洗、重悬,以锥虫蓝拒染实验检测各组细胞存活率。然后收集各组细胞(每个样本6孔,每组8个样本)待测。离心后获得细胞沉淀,提取后者总RNA,RT-PCR反应条件及定量方法参见步骤1.2.7。引物序列(5'→3')如下:iNOS上游AGC TCC CCA TTC TGA AGC CC,下游TGG AGC ACG CTG AAC ACC TC,扩增片段长度523 bp;ATR1上游CTC AAG CCT GTC TAC GAA AAT GAG,下游TAG ATC CTG AGG CAG GGT GAA T,扩增片段长度204 bp;ATR2上游ACC TTT TGA ACA TGG TGC TTT G,下游GTT TCT CTG GGT CTG TTT GCT C,扩增片段长度218 bp;GAPDH上游TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA,下游AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT,扩增片段长度309 bp。阴性对照以PBS代替cDNA进行后续的PCR反应。

1.3.5 Western印迹法检测心肌细胞iNOS蛋白表达 收集各组细胞,离心、弃上清,将各组细胞沉淀提取蛋白质并进行定量后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),上样量为25 μl。电印迹转移法将凝胶内的蛋白转至硝酸纤维素膜

上,用含 1%小牛血清白蛋白的 TBST 溶液室温封闭 1.5 h,然后与一抗(兔抗大鼠抗体,稀释度 1:5 000)于 4℃孵育过夜,经 TBST 溶液洗脱 3 次后,再与二抗(羊抗兔 IgG 抗体,稀释度 1:3 000)室温孵育 1 h,又经 TBST 溶液洗脱 3 次后,与 ECL 试剂反应 1 min.X 线胶片压片曝光 30 s,然后测定阳性条带的光密度。以 β -actin 作为内参照物,计算 iNOS 条带光密度值与 β -actin 条带光密度值的比值,作为衡量该组样品 iNOS 蛋白水平的相对表达量。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析及 Student Newman Keul 检验;两组间比较采用 *t* 检验;分析多因素与心肌肥厚的关系采用多元逐步回归分析;分析两因素间关系采用 Pearson 相关分析。数据统计处理采用 SPSS 13.0 软件,以 $P<0.05$ 作为差异显著性的标准。

2 结 果

2.1 在体实验

2.1.1 L-Arg 对腹主动脉缩窄大鼠生理生化指标的影响 腹主动脉缩窄术后 6 周,大鼠 MABP、LV-MI、左室心肌总蛋白含量及心肌 AT II 含量与假手术组大鼠相比均有显著升高,说明利用腹主动脉缩窄术式能够有效制备出带有高血压及心肌肥厚的动物模型,同时证实了左室心肌总蛋白含量及 LVMI 均可作为反映病理性心肌肥厚形成与否的指标。在该大鼠模型中,心肌中 NO 含量显著降低;给予 L-Arg 6 周后,腹主动脉缩窄大鼠心肌 NO 含量明显升高,同时,心肌 AT II 含量、左室心肌总蛋白含量及 LVMI 与手术组大鼠相比均有显著降低。L-Arg 的上述作用能够有效地被 NOS 抑制剂 L-NAME 抵消,说明 L-Arg 通过 NOS 所生成的 NO 对心肌肥厚的发生与发展有显著的抑制作用。在本实验中亦观察到,各组大鼠心率无明显差异。此外,L-Arg 在发挥抑制心肌肥厚作用的同时,并未影响腹主动脉缩窄大鼠的 MABP,证实了病理性心肌肥厚的发生发展过程存在着除血压以外的因素。详见表 1。

表 1 各组大鼠生理生化指标

Tab 1 Physiological and biochemical parameters of rats in different groups

(*n*=8, $\bar{x}\pm s$)

Parameter	Sham-operation group	Operation group	L-Arg group	L-NAME group
HR <i>f</i> /min ⁻¹	357.75±14.38	366.50±22.87	349.88±17.20	360.50±12.51
LVMI (mg·g ⁻¹)	2.24±0.14	3.41±0.31*	2.93±0.25△	3.31±0.23▲
MABP <i>p</i> /mmHg	98.15±10.39	145.34±21.17*	132.09±14.52*	140.28±16.94*
TPC (mg·g ⁻¹)	167.92±13.38	225.19±21.13*	198.54±17.25△	232.89±22.63▲
Ang II (ng·g ⁻¹)	7.01±1.10	16.45±3.27*	11.81±2.25△	15.18±2.49▲
NO (nmol·mg ⁻¹)	80.14±7.30	52.50±6.66*	67.39±8.18△	47.09±6.87▲
ACE mRNA	0.16±0.05	0.50±0.08*	0.24±0.06△	0.53±0.11▲

* $P<0.05$ vs sham-operation group; △ $P<0.05$ vs operation group; ▲ $P<0.05$ vs L-Arg group; 1 mmHg=0.133 kPa

2.1.2 心肌肥厚形成与多因素的关系 以左室心肌总蛋白含量反映心肌肥厚的发展程度,作为因变量(*y*);以 HR、MABP、心肌 AT II 含量及 NO 含量等 4 因素作为自变量,用逐步法探讨自变量与因变量之间的回归关系(概率准入标准 $P\leq 0.050$,排除标准 $P\geq 0.100$)。分析结果显示仅有心肌 AT II 含量(x_1)和心肌 NO 含量(x_2)作为准入变量($P=0.045$ 和 $P=0.004$)进入回归方程,回归方程为 $y=241.048-1.074x_2+2.492x_1$ 。心肌 NO 含量与心肌 AT II 含量两因素能够解释左室心肌总蛋白含量变异性的 62.7%,HR ($P=0.918$)、MABP ($P=0.792$)均未进入回归方程。此外,Pearson 相关分析显示心肌 NO 含量与心肌 AT II 含量两因素之间存在显著的负相关关系($r=-0.723,P<0.001$)。

2.1.3 L-Arg 对腹主动脉缩窄大鼠心肌 ACE mRNA 表达的影响 腹主动脉缩窄术后 6 周,与假手术组相比,术后大鼠心肌 ACE mRNA 的表达显著上调(表 1,图 1)。Pearson 相关分析显示 ACE mRNA 的相对表达量与 LVMI 之间存在显著的正相关关系($r=0.828,P<0.001$)。L-Arg 组大鼠 ACE mRNA 的表达水平明显低于手术组,说明 L-Arg 能够明显抑制 ACE mRNA 表达的上调;L-Arg 对 ACE mRNA 表达的抑制作用能够被添加的 L-NAME 取消,说明 L-Arg 通过 NOS 途径所生成的 NO 对 ACE mRNA 的表达有明显的抑制作用。此外,Pearson 相关分析亦证实心肌 NO 含量与心肌 ACE mRNA 的相对表达量之间存在明显的负相关关系($r=-0.780,P<0.001$)。

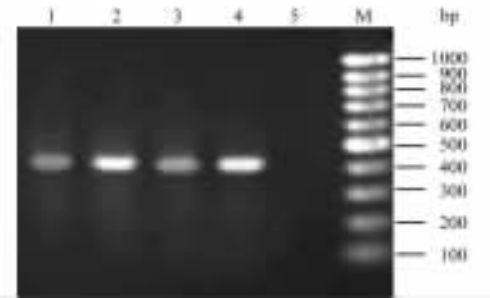


图 1 各组大鼠心肌 ACE mRNA 的表达
Fig 1 Myocardial ACE mRNA expression
in different groups (RT-PCR)

1: Sham-operation group; 2: Operation group; 3: L-Arg Group; 4: L-NAME group; 5: Negative control;M: 100 bp DNA marker

2.2 离体实验

2.2.1 L-Arg 能够抑制 ATⅡ 对心肌细胞 iNOS 表达及 NO 合成的负调节作用 离体培养的心肌细胞在经过不同的处理因素作用后,各组细胞存活率无显著差异。与对照组相比,经 ATⅡ 作用 48 h 后,ATⅡ 处理组心肌细胞 iNOS mRNA 表达水平及蛋白表达水平均显著下调,心肌细胞培养液 NO 浓度明显降低;若同时给予 L-Arg,后者可抑制 ATⅡ 的上述作用,增强心肌细胞 iNOS mRNA 表达及蛋白表达,并相应提高培养液 NO 浓度;在 L-NAME 处理组,观察到 L-Arg 对 ATⅡ 的上述抑制作用能被同时添加的 NOS 抑制剂 L-NAME 取消,iNOS mRNA 表达水平、蛋白表达水平及培养液 NO 浓度

与 L-Arg 组相比显著下降,与 ATⅡ 处理组相比无显著性差异。详见图 2、表 2。此外,相关分析进一步证实,培养液 NO 浓度与心肌细胞 iNOS mRNA 表达水平 ($r=0.712;P<0.001$)、iNOS 蛋白表达水平 ($r=0.722;P<0.001$) 分别具有显著的线性相关关系。

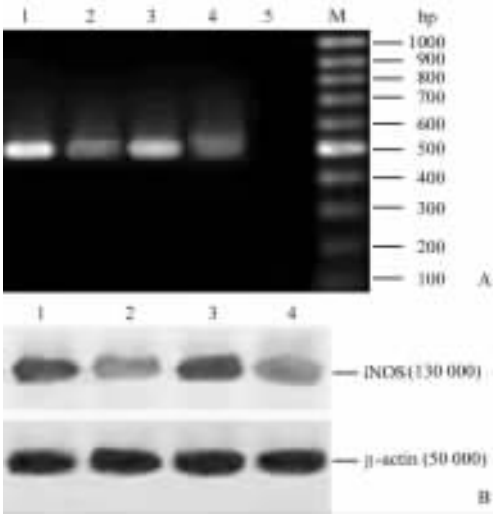


图 2 各组心肌细胞中 iNOS mRNA (A) 和 iNOS 蛋白 (B) 的表达
Fig 2 iNOS mRNA (A,RT-PCR) and iNOS protein (B, Western blot) expression in cultured cardiomyocytes in each group

1: Control group; 2: ATⅡ treated group; 3: L-Arg treated Group; 4: L-NAME treated group; 5: Negative control; M: 100 bp DNA marker

表 2 各组心肌细胞存活率、NO 含量及 iNOS、ATR1 和 ATR2 表达
Tab 2 Myocardiocyte viability, NO concentration, iNOS expression, ATR1 and ATR2 in different groups

(n=8, $\bar{x}\pm s$)				
Index	Control group	ATⅡ treated group	L-Arg treated group	L-NAME treated group
Viability (%)	91.86±5.01	94.07±7.19	92.36±6.73	89.41±7.35
NO _{CB} /μmol·L ⁻¹	55.61±5.07	34.84±4.15*	46.33±3.91 [△]	31.66±4.49 [▲]
iNOS mRNA	0.93±0.13	0.53±0.09*	0.79±0.12 [△]	0.56±0.14 [▲]
iNOS Protein	0.91±0.12	0.45±0.07*	0.71±0.10 [△]	0.55±0.12 [▲]
ATR1 mRNA	0.41±0.08	0.69±0.06*	0.49±0.09 [△]	0.67±0.06 [▲]
ATR2 mRNA	0.61±0.09	0.55±0.08	0.58±0.10	0.51±0.12

* P<0.05 vs control group; [△] P<0.05 vs ATⅡ treated group; [▲] P<0.05 vs L-Arg treated group

2.2.2 L-Arg 对受到 ATⅡ 作用的心肌细胞 ATR1 及 ATR2 mRNA 表达的影响 施加处理因素后 48 h,与对照组相比,ATⅡ 处理组心肌细胞 ATR1 mRNA 的表达明显增强;L-Arg 处理组心肌细胞 ATR1 mRNA 的表达水平较 ATⅡ 处理组明显下调;与 L-Arg 处理组相比,L-NAME 组心肌细胞 ATR1 mRNA 的表达水平又显著上调。对于 ATR2 mRNA

的表达水平,各组心肌细胞之间无明显变化(表 2,图 3)。相关分析显示,培养液 NO 浓度与心肌细胞 ATR1 mRNA 表达水平之间具有显著的线性负相关关系 ($r=-0.796;P<0.001$);而培养液 NO 浓度与心肌细胞 ATR2 mRNA 表达水平之间不具有线性相关关系 ($P=0.076$)。

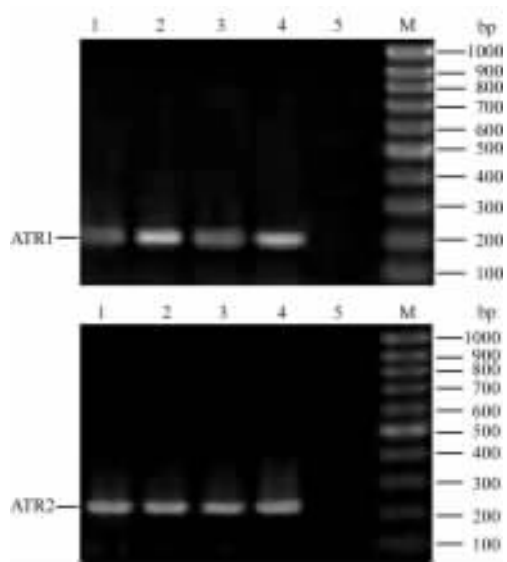


图 3 各组心肌细胞 ATR1 和 ATR2 mRNA 的表达
Fig 3 Expression of ATR1 and ATR2 mRNA
in cultured cardiomyocytes (RT-PCR)

1: Control group; 2: AT II treated group; 3: L-Arg treated Group;
4: L-NAME treated group; 5: Negative control; M: 100 bp DNA
marker

3 讨 论

3.1 心肌肥厚形成的机制 有研究证实^[4], ATR1 的特异性拮抗剂依贝沙坦 (irbesartan) 可抑制腹主动脉缩窄后心脏中肾素 (renin)、AT II 和 ACE 等含量的升高, 并有预防或减轻心肌肥厚的作用, 同时, 该药却升高血液循环中肾素、AT II 及 ACE 的浓度, 提示血液循环中的 RAS 与心脏局部的 RAS 是两个既相互联系又相互独立的系统, 心脏局部 RAS 与心肌肥厚有更为密切的关系。在本实验中, 缩窄大鼠腹主动脉后, 左室心肌 AT II 及 NO 含量、左室心肌总蛋白合成量及循环系统 MABP 均发生了显著变化, 但多元逐步回归分析显示仅左室心肌 AT II 及 NO 含量与左室心肌总蛋白合成量之间存在回归关系, 心肌 AT II 含量与心肌 NO 含量两因素能够解释左室心肌总蛋白含量变异性的 62.7%; 而大鼠心率及血压水平与左室心肌总蛋白含量之间不存在回归关系。该实验结果进一步证实心脏局部的体液因子较压力负荷更直接地介入了心肌肥厚的发生发展过程, 心肌内 AT II 与 NO 是影响心肌肥厚形成的两个重要因子。

3.2 L-Arg-NO 途径对心肌肥厚的抑制作用 近年来, 有关 NO 对心肌疾病的作用以及 L-Arg 与 NOS 的关系的研究^[5-6]开展较多, 有助于进一步解释心肌疾病的机制, 寻找新的治疗靶点。L-Arg 是一种碱性氨基酸, 可在体内多种细胞所表达的 NOS

催化下, 生成 NO 及 L-瓜氨酸, 该过程即 L-Arg-NO 途径^[7]。鉴于 NO 弥散能力受到诸多化学性作用的限制 (如 NO 可以与超氧阴离子快速作用, 还可以与血红蛋白和其他血红素蛋白的铁中心结合以及蛋白质的巯基结合等^[8]), 目前认为 L-Arg-NO 途径所产生的 NO 主要通过自分泌和 (或) 旁分泌的方式作用于邻近的相关细胞, 从而发挥其生理效应。体内 NOS 分三种亚型^[9]: 神经元型 (neuronal NOS, nNOS)、内皮型 (epithelial NOS, eNOS) 及诱导型 (inducible NOS, iNOS)。血管内皮细胞中存在 eNOS 和 iNOS, 而神经系统的多种细胞主要表达 nNOS^[10]。心脏内细胞成分复杂, 含有丰富的微血管及多种间质细胞, 在体心肌组织于生理状态下即表达 eNOS 及 iNOS, 且 eNOS 及 iNOS 在心脏中的表达模式具有同步化的特点。基于此, 本研究以 iNOS 的表达变化为着眼点, 探讨不同处理因素对 iNOS 表达水平及 NO 生成量的影响。

在本实验中, 我们观察到离体培养的心肌细胞可表达 iNOS, iNOS 的表达水平与培养液 NO 浓度存在显著的正相关关系。iNOS mRNA 表达水平及蛋白表达水平均可受到 AT II 的抑制, 随后通过 L-Arg-NO 途径所产生的 NO 也相应减少, 培养液 NO 浓度降低。AT II 的这一效应与我们通过在体实验所获得的结果相符合。在腹主动脉缩窄大鼠, 心肌 AT II 含量显著升高的同时 NO 含量明显降低, 心肌 AT II 含量与心肌 NO 含量之间存在显著的负相关关系。对于离体培养的心肌细胞, L-Arg 能够缓解 AT II 对 iNOS 表达的抑制作用, 上调受 AT II 影响的心肌细胞对 iNOS 的表达水平, 从而进一步升高了培养液中 NO 浓度。L-Arg 的这一效应能够被 NOS 抑制剂 L-NAME 取消, 证实了 L-Arg-NO 途径对于心肌细胞 NO 合成的重要性及特异性。在腹主动脉缩窄大鼠, 给予 L-Arg 能够增加心肌 NO 含量, 这一结果与离体实验相一致, 提示 L-Arg 能够提升 iNOS 在腹主动脉缩窄大鼠心肌的表达水平, 继而增加 NO 合成量。同时, 我们观察到, 给予 L-Arg 后, 腹主动脉缩窄大鼠心肌 AT II 含量下降, LVMI、左心室组织总蛋白含量降低, 说明 L-Arg 减轻了大鼠的心肌肥厚, 这一效应亦可被 NOS 抑制剂 L-NAME 取消, 证实 L-Arg 减轻腹主动脉缩窄大鼠心肌肥厚的作用是通过 L-Arg-NO 途径实现的。至于大鼠心肌 NO 含量升高的同时 AT II 含量下降的机制, 目前认为这与 NO 的生理效应有关。L-Arg 上调心脏局部微环境中 iNOS 的表达水平后, NO 生成增加, 随后 NO 以自分泌和 (或) 旁分泌的方式作用

于心肌细胞及间质细胞。NO 能够以完整的分子形式弥散进入细胞核,继而影响原癌基因 *c-fos*、*c-jun*、*c-myc* 等编码核内转录因子^[11],导致细胞对血管紧张素原 (angiotensinogen)、AT II 受体等生长因子受体超家族成员的表达水平下降^[12]。本实验观察到,除了上述因素外,通过 L-Arg-NO 途径生成的 NO 亦可下调腹主动脉缩窄大鼠心脏内 ACE mRNA 的表达水平,这可能与 NO 直接弥散入核影响相关基因转录有关^[13]。这样,从 angiotensinogen 到 AT II 转变过程的多个环节均受到了 NO 的抑制,可以解释当给予 L-Arg 后腹主动脉缩窄大鼠心脏内 NO 含量升高而 AT II 含量下降的现象。

3.3 L-Arg-NO 途径抑制心肌肥厚的机制 AT II 需要与 ATR 结合才能发挥生理及病理效应。ATR 属于受原癌基因调控的生长因子受体超家族成员,ATR 包括两种亚型,ATR1 和 ATR2。目前已知的由 AT II 产生的生理及病理效应,几乎均有 ATR1 参与^[1];而对于 ATR2 的确切作用,目前尚存在争议。本实验显示,在离体培养的心肌细胞,AT II 能够上调 ATR1 mRNA 的表达水平,这一效应可能与 AT II 对 ATR1 的正反馈调节作用有关。AT II 与 ATR1 结合后,通过受体内化过程形成内涵体,内涵体再转位入核,直接与基因组的调控序列相结合,在转录水平促进 *c-fos*、*c-jun*、*c-myc* 等原癌基因表达,继而导致 ATR1 的表达水平上调^[12]。我们观察到,L-Arg 能够下调受 AT II 影响的心肌细胞对 ATR1 的表达水平,这一效应可被 NOS 抑制剂 L-NAME 取消;此外,培养液 NO 浓度与心肌细胞 ATR1 的表达水平之间具有显著的线性负相关关系,这些事实均提示,通过 L-Arg-NO 途径生成的 NO 对心肌细胞 ATR1 的表达具有抑制作用。我们推测该抑制效应可能与 NO 直接弥散进入细胞核后,与基因组的调控序列相互作用,进而影响原癌基因表达 ATR1 有关^[12]。在本实验中,未观察到心肌细胞 ATR2 mRNA 的表达水平受到 AT II 和 L-Arg 的显著影响;并且,心肌细胞 NO 合成量与 ATR2 表达水平之间不存在线性相关关系,这些实验证据提示 ATR2 并未参与由 AT II 和 L-Arg 分别介导的心肌细胞肥大和消退过程。

综上所述,在腹主动脉缩窄大鼠,心肌肥厚的形成与心肌内 NO、AT II 含量密切相关;L-Arg 通过增强心肌 iNOS 表达,致 NO 生成增加。通过 L-Arg-NO 途径合成的 NO 可减少心肌内 AT II 生成量,并通过下调心肌 ACE 及 ATR1 的表达水平来抑制病

理性心肌肥厚的形成。

[参 考 文 献]

[1] Shanmugam S,Corvol P,Gasc J M. Ontogeny of the two angiotensin II type 1 receptor subtypes in rats[J]. *Am J Physiol*, 1994,267:E828-E836.

[2] Shmist Y A,Goncharov I,Eichler M,Shneyvays V,Isaac A,Vogel Z, et al. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia *via* CB2 receptor activation and nitric oxide production[J]. 2006,283:75-83.

[3] Qi Y F,Bu D F,Niu D D,Shi Y R,Wang S H,Pang Y Z, et al. Effects of different peptide fragments derived from proadrenomedullin on gene expression of adrenomedullin gene[J]. *Peptides*,2002,23:1141-1147.

[4] 胡文养,陈达光,苏津自. 卡托普利治疗自发性高血压大鼠对循环和局部肾素-血管紧张素系统的长期影响[J]. *高血压杂志*, 1998,6:83-88.

[5] Jia Y X,Pan C S,Yang J H,Liu X H,Yuan W J,Zhao J, et al. Altered L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the vascular adventitia of rats with sepsis[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2006,33:1202-1208.

[6] Kim Y H,Kim J,Park H,Kim H P. Anti-inflammatory activity of the synthetic chalcone derivatives:inhibition of inducible nitric oxide synthase-catalyzed nitric oxide production from lipopolysaccharide-treated RAW 264. 7 cells [J]. *Biol Pharm Bull*,2007,30:1450-1455.

[7] Moncada S,Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway[J]. *N Engl J Med*,1993,329:2002-2012.

[8] Stamler J S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide[J]. *Cell*,1994,78:931-936.

[9] Kone B C,Kuncewicz T,Zhang W,Yu Z Y. Protein interactions with nitric oxide synthases:Controlling the right time,the right place,and the right amount of nitric oxide[J]. *Am J Physiol, Renal Physiol*,2003,285:F178-F190.

[10] Zheng H,Li Y F,Cornish K G,Zucker I H,Patel K P. Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2005,288:H2332-H2341.

[11] Ganzinelli S,Joensen L,Borda E,Bernabeo G,Sterin-Borda L. Mechanisms involved in the regulation of mRNA for M2 muscarinic acetylcholine receptors and endothelial and neuronal NO synthases in rat atria[J]. *Br J Pharmacol*,2007,151:175-185.

[12] Belsham D D,Wetsel W C,Mellon P L. NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression. *EMBO J*,1996,15:538-547.

[13] Eigenthaler M,Lohmann S M,Walter U,Pilz R B. Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev [J]. Physiol Biochem Pharmacol*,1998,135:174-209.

[本文编辑] 孙 岩