

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01022

螺内酯对扩张型心肌病大鼠神经内分泌的影响

白洁^{1,2}, 张国辉^{1*}, 陈蓉¹, 盛佳¹, 汪健飞¹

1. 江苏大学附属第一人民医院心内科, 镇江 212002
2. 第二军医大学长海医院老年病科, 上海 200433

[摘要] **目的:** 研究醛固酮受体拮抗剂螺内酯对扩张型心肌病神经内分泌的影响, 探讨其治疗扩张型心肌病的可能机制。 **方法:** 体质量为(300±50) g 的雄性 SD 大鼠, 腹腔注射多柔比星 2 mg/kg(每周 1 次, 共 8 周)建立扩张型心肌病心衰模型, 随机分为 4 组($n=10$): 模型组、螺内酯干预 I 组、螺内酯干预 II 组、螺内酯干预 III 组, 模型组采用生理盐水 10 ml/(kg·d)灌胃, 螺内酯 I 组、II 组、III 组分别灌胃 10、20、40 mg/(kg·d)螺内酯, 连续给药 8 周, 于给药后第 9 周检测血浆、心肌中血管紧张素 II (Ang II)、醛固酮(ALD)水平, 并检测血浆一氧化氮(NO)、血清 III 型前胶原氨基端肽(P III NP)及血浆心钠素(ANP)水平。 **结果:** 给予螺内酯干预 8 周后 II 组、III 组血浆、心肌中 Ang II 水平下降($P<0.05$)、ALD 水平上升($P<0.05$)、血浆 NO 水平上升($P<0.05$)、P III NP 水平下降($P<0.05$)、ANP 水平下降($P<0.05$)。 **结论:** 予扩张型心肌病心力衰竭大鼠以螺内酯 20 mg/(kg·d)及 40 mg/(kg·d)治疗 8 周可一定程度纠正神经内分泌紊乱。

[关键词] 螺内酯; 扩张型心肌病; 神经内分泌

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-1022-04

Influence of spironolactone on neuroendocrine of SD rats with dilated cardiomyopathy

BAI Jie^{1,2}, ZHANG Guo-hui^{1*}, CHEN Rong¹, SHENG Jia¹, WANG Jian-fei¹

1. Department of Cardiology, The First People's Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China
2. Department of Geriatrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of spironolactone, an aldosterone receptor antagonist (ARA), on neuroendocrine of SD rats with dilated cardiomyopathy, so as to investigate its mechanism in treatment of dilated cardiomyopathy. **Methods:** Male SD rats, weighting (300±50) g, were intraperitoneally injected with adriamycin (2 mg/kg) once a week for 8 weeks to induce dilated cardiomyopathy models. The rat models were randomly divided into 4 groups: control group, low dose spironolactone group (10 mg/[kg·d], *i. g.*), middle dose spironolactone group (20 mg/[kg·d], *i. g.*) and high dose spironolactone group (40 mg/[kg·d], *i. g.*). Rats in the normal control group received normal saline (10 mg/[kg·d], *i. g.*). Spironolactone was given for 8 weeks. Angiotensin II (Ang II) and aldosterone (ALD) levels in the plasma and cardiac muscle homogenate were determined 9 weeks later. The plasma nitrogen monoxide (NO), N-terminal popeptide of collagen type III (P III NP) in serum and atrial natriuretic peptide (ANP) in the plasma were also measured. **Results:** Eight weeks after treatment, the Ang II levels in the plasma of animals in the middle dose group and high dose group were significantly decreased ($P<0.05$), the levels of ALD were elevated ($P<0.05$), those of P III NP and ANP were decreased (all $P<0.05$). **Conclusion:** Spironolactone at 20 mg/(kg·d) or 40 mg/(kg·d) for 8 weeks can correct the disorder in neuroendocrine system to some extents.

[KEY WORDS] spironolactone; cardiomyopathy; neuroendocrine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):1022-1025]

扩张型心肌病是严重危害人们身体健康的常见疾病^[1]。随着神经内分泌激活不利于扩张型心肌病心衰的概念逐步被认可, 越来越多的药物对扩张型心肌病心衰治疗机制的研究集中于神经内分泌方面^[2], 并已成为目前扩张型心肌病心衰研究热点^[3]。

本研究拟通过观察血管紧张素 II (Ang II)、醛固酮 (ALD)、一氧化氮 (NO)、III 型前胶原氨基端肽 (P III NP)、心钠肽 (ANP) 等神经内分泌因子的浓度的变化以及心肌匀浆中 Ang II、ALD 含量的变化, 从神经内分泌方面探讨醛固酮受体拮抗剂螺内酯对

[收稿日期] 2009-06-14 **[接受日期]** 2009-08-05

[作者简介] 白洁, 硕士, 住院医师. E-mail: baijie0326@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0511-88915028, E-mail: 13338812776@189.cn

扩张型心肌病心衰大鼠的作用,从而研究该药对扩张型心肌病心衰可能的作用机制,为临床用药提供一定依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选取10周龄、雄性SD大鼠60只,体质量为(300±50)g(由江苏大学实验动物中心提供),腹腔注射多柔比星(浙江省海正药业股份有限公司提供)2 mg/kg,每周1次,共8周建立扩张型心肌病并心力衰竭模型^[4],存活47只,经动态彩超证实建模成功43只,从中选取40只为实验对象。对照组选取正常雄性SD大鼠10只。

1.2 分组 将40只扩张型心肌病心衰大鼠随机分为4组:模型组、螺内酯干预I组、螺内酯干预II组、螺内酯干预III组,每周测大鼠体质量,并按其体质量给予模型组灌胃生理盐水[10 ml/(kg·d)],分别给予I组、II组、III组灌胃混合于生理盐水的螺内酯10、20、40 mg/(kg·d)^[5],各组给药体积一致(10 ml/kg),连续给药8周。于给药后第9周取血放免法检测血浆及心肌中Ang II、ALD、NO、ANP浓度及血清PⅢNP浓度。正常对照组同法给予等量生理盐水。

1.3 Ang II的检测 清晨取大鼠血液7.5 ml,分成5份。取1.5 ml血迅速注入放在冰水浴冷却的含酶抑制剂抗凝试管中,摇匀,4℃ 55×g离心5 min,分离取血浆,放免法测定Ang II浓度。取血完毕后,10% KCl静脉注射处死大鼠后,保留左心室心肌2份(每份约200 mg),取一份置于已加入2 ml酶抑制剂的抗凝试管中,冰浴匀浆,4℃ 4 750×g离心10 min,留取上清液,操作在15 min内完成,放免法测定并计算每克心肌组织中Ang II含量。

1.4 ALD的检测 取1.5 ml血置于抗凝管中,摇匀,立即放回冰水浴中冷却,4℃冷冻离心机55×g离心15 min,分离取血浆,-20℃保存备用。放免法测定ALD浓度。取左心室心肌200 mg,置于已加入2 ml生理盐水的抗凝试管中,迅速冰浴匀浆,4℃ 4 750×g离心10 min,留取上清,采用放免法测定并计算每克心肌组织中ALD含量。

1.5 PⅢNP的检测 取1.5 ml血,室温放置8 h,4℃ 300×g离心5 min,分离血清,放免法测定PⅢNP含量。

1.6 NO的检测 在抗凝管中按1:10加入抗凝剂,取全血1.5 ml,300×g离心10 min,分离取血

浆,采用硝酸还原酶法测定NO含量。

1.7 ANP的检测 取1.5 ml血注入已含有30 g IEDTA及151 μl抑肽酶的试管中,摇匀,4℃ 300×g离心5 min,分离取血浆,按放免试剂盒步骤操作,测定ANP含量。

1.8 统计学处理 实验数据中计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组均数比较用完全随机设计的方差分析,两两比较用 q 检验,显著性检验水准 $\alpha=0.05$ 。全部资料用SPSS 13.0统计软件进行统计处理。

2 结果

2.1 肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)因子浓度变化 螺内酯治疗8周后,与正常对照组相比,用药各组RAAS被激活,血液与心肌中的Ang II与ALD水平均显著增高($P<0.05$);螺内酯干预I组与模型组比较Ang II与ALD未见明显改变;螺内酯干预II、III组与模型组比较Ang II降低($P<0.05$),ALD增高($P<0.05$);螺内酯干预II、III组两者相比未见统计学差异(表1)。

2.2 PⅢNP变化 螺内酯治疗8周后,与正常对照组相比,模型组、螺内酯干预I组、螺内酯干预II组和螺内酯干预III组的PⅢNP均显著增加($P<0.05$);螺内酯干预I组与模型组比较,PⅢNP未见明显改变($P>0.05$);螺内酯干预II、III组与模型组比较PⅢNP降低($P<0.05$),但与正常大鼠相比仍有统计学差异($P<0.05$);螺内酯干预II、III组两者相比未见统计学差异(表1)。

2.3 NO变化 螺内酯治疗8周后,与正常对照组相比,模型组、螺内酯干预I组、螺内酯干预II组和螺内酯干预III组的NO含量均显著减少($P<0.05$);螺内酯干预I组与模型组比较NO未见明显改变($P>0.05$);螺内酯干预II、III组与模型组比较NO增高($P<0.05$),但与正常大鼠相比仍有统计学差异($P<0.05$);螺内酯干预II、III组两者相比未见统计学差异(表1)。

2.4 ANP变化 螺内酯治疗8周后,与正常对照组相比,模型组、螺内酯干预I组、螺内酯干预II组和螺内酯干预III组的ANP含量均显著增加($P<0.05$);螺内酯干预I组与模型组比较ANP未见明显改变($P>0.05$);螺内酯干预II、III组与模型组比较ANP降低($P<0.05$),但与正常大鼠相比仍有统计学差异($P<0.05$);螺内酯干预II、III组两者相比未见统计学差异(表1)。

表 1 各组 RAAS 系统因子及 PⅢNP、NO、ANP 浓度变化

Tab 1 Concentrations of Ang Ⅱ, ALD, PⅢNP, NO and ANP in plasma and cardiac muscle samples

(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Group	Ang Ⅱ		ALD		PⅢNP $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	NO $c_B / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	ANP $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$
	Plasma $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$	Cardiac muscle $w_B / (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$	Plasma $\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$	Cardiac muscle $w_B / (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$			
Normal control	500.98± 100.53	4.81± 1.01	200.98± 100.53	110.05± 46.62	48.55± 11.48	27.43± 5.12	417.00± 42.44
Model	1 104.34± 147.31*	9.24± 1.47*	680.34± 147.31*	330.34± 101.68*	234.17± 26.60*	6.82± 0.48*	711.67± 70.55*
Low dose spironolactone	1 100.43± 108.37*	9.01± 1.28*	683.01± 63.77*	341.58± 38.91*	226.08± 22.10*	8.84± 2.96*	628.86± 73.19*
Middle dose spironolactone	818.59± 140.32*△	7.50± 1.46*△	770.49± 33.40*△	428.30± 100.45*△	131.95± 9.20*△	17.55± 1.66*△	570.00± 70.53*△
High dose spironolactone	800.06± 81.40*△	7.40± 0.61*△	780.06± 50.93*△	433.81± 53.35*△	127.19± 7.70*△	17.83± 2.35*△	567.50± 76.86*△

Ang Ⅱ: Angiotensin Ⅱ; ALD: Aldosterone; PⅢNP: N-terminal poeptide of collagen type Ⅲ; NO: Nitrogen monoxide; ANP: Atrial natriuretic peptide. * P<0.05 vs normal control group; △P<0.05 vs model group

3 讨 论

神经体液的激活是心血管疾病一个重要的危险因素^[2-3]。早期神经内分泌的激活可增加心肌收缩力而使心排量增加,维持动脉血压和保证重要脏器的血流,对循环起短时的支持效应,且此激活早于症状的出现,但过度激活转而对心血管系统有害;不仅使外周血管阻力增加,水、钠潴留加重心脏的前后负荷进一步抑制左室功能,还直接损害心肌,加剧心衰的恶化^[6]。

扩张型心肌病并心力衰竭的患者伴肾上腺素能神经系统及 RAAS 过度激活,去甲肾上腺素、肾素、血管紧张素和 ALD 等水平持续升高,这些神经体液的激活与疾病的严重程度密切相关。目前心衰治疗模式已由强心利尿、改善血流动力学逐渐转变为通过干预神经体液机制改善患者预后,提高生存率及生活质量模式^[3]。已有研究证实:ALD 与其受体的结合可导致心血管系统的损害,还可引起心肌及血管的纤维化、内皮功能异常、血栓形成及压力感受器功能障碍等等^[7]。本研究通过测定各神经内分泌因子数值变化以观察 ALD 受体拮抗剂螺内酯对扩张型心肌病心衰神经内分泌方面的作用。在本研究中扩张型心肌病心衰大鼠循环及局部 RAAS 均被激活,观察到除了循环 RAAS 活性上升外,心脏局部 RAAS 活性上升也存在有自己的肾素-血管紧张素系统,Ang Ⅱ 与 ALD 通过内分泌、自分泌、旁分泌等发挥其多重性生物功能^[8]。目前的研究已证实心脏中 ALD 来自 2 条途径:一是心脏从血浆中摄取的

ALD,另一个通过独立于肾上腺皮质之外的心血管系统的 ALD 形成系统合成的 ALD。本研究中螺内酯干预 Ⅱ、Ⅲ组 ALD 较对照组明显上升,说明螺内酯竞争性与 ALD 受体结合,减少 ALD 与其受体结合,使游离 ALD 增多,减少了 ALD 对心血管系统的有害作用。螺内酯干预 Ⅱ、Ⅲ组 Ang Ⅱ 较对照组明显下降,说明螺内酯可通过心肌局部 ALD 积聚的负反馈作用减少 Ang Ⅱ 的合成,提示其不仅在受体水平阻断了 ALD 的作用,而且通过减少局部 Ang Ⅱ 的含量,对左室重构产生影响。

导致扩张型心肌病心衰发生发展的基本机制是心肌重塑。心肌重塑的结构基础是心肌细胞和细胞外基质的变化,心肌细胞外基质变化主要是胶原沉积和纤维化。最近 Joseph 等^[9]报道血清 PⅢNP 能较好反映心肌Ⅲ型胶原的合成,是心肌胶原合成的标志物,与心肌纤维化密切相关。PⅢNP 检测是纤维化诊断中的敏感指标,其升高反映心肌纤维增生活跃,并可预测胶原沉积的变化,可作为抗纤维化药物疗效的考核指标之一。本研究发现扩张型心肌病心衰大鼠血清 PⅢNP 明显增高,提示扩张型心肌病心衰时Ⅲ型胶原显著增生。PⅢNP 在Ⅲ型胶原合成中释放入血循环,扩张型心肌病心衰大鼠体内胶原合成增加,动态平衡失调,存在不同程度的心肌纤维化,心肌间质纤维化是心力衰竭进展的有害因素之一。螺内酯干预 Ⅱ、Ⅲ组 PⅢNP 较对照组下降,可能这是 ALD 受体拮抗剂阻断心肌胶原沉积的途径之一。

NO 是一种极强的舒张血管的物质,心血管系

统中的NO除引起冠状血管舒张,调节冠脉供血,维持血管张力恒定及血压的稳定等一系列效用外,可通过自分泌和(或)旁分泌的途径抑制心肌成纤维细胞(CFs)增生和胶原合成,改善心肌纤维化。近年来,研究表明NO还可作为细胞生长的调节剂参与心血管重塑的调控,其主要调控机制与NO抑制内源性细胞增殖刺激因子[如Ang II、转化生长因子(TGF)、ALD等]的生成有关^[10]。本研究显示,扩张型心肌病心衰大鼠NO水平较正常大鼠明显降低,使用一定剂量的ALD受体拮抗剂螺内酯后NO水平升高。我们由此考虑ALD受体拮抗剂螺内酯可在一定程度上增加NO合成,为冠脉供血的调节及心肌纤维化的防治提供了新的思路。

扩张型心肌病心衰发生时,心房-心室分泌ANP是一种代偿反应,因其能促进利尿和血管扩张,降低心脏前、后负荷,改善心功能,并可对抗RAAS的作用,推迟病程进展。本研究显示,在扩张型心肌病心衰大鼠中ANP明显增高,与目前的临床研究一致。心功能不全时,ANP的合成增加,ANP的释放亦增加,其释放的ANP多以分子形式存在,一些ANP分子的前体释放入血,这很可能是心功能不全的一种代偿反应。据报道ANP的心血管作用与RAAS相拮抗,心力衰竭患者血浆ANP升高与心房压力及心脏血液动力学改变等有关^[11]。本研究显示,螺内酯干预Ⅱ、Ⅲ组ANP有所下降,分析可能原因如下:(1)ANP较其他血流动力学指标更早反映机体代偿的病理生理改变和恢复循环稳定的能力;(2)ANP与机械收缩功能不良和心电不稳定这2个诱发心衰死亡的主要因素有关,被认为是预测心衰患者猝死的独立指标。螺内酯可直接作用于心脏,增加不应期,减弱跨膜钾离子转运,还可抗心肌纤维化,抑制ALD所导致的间质与血管周围的纤维化,增加心电稳定性,从而导致ANP下降。

目前越来越多的药物对心衰治疗机制的研究集中于神经内分泌系统方面,本研究结果显示中高剂

量ALD受体拮抗剂螺内酯对扩张型心肌病心衰大鼠的神经内分泌异常激活有一定的纠正,但两者比较未见统计学差异,可能因为两者均为治疗剂量范围。

[参考文献]

- [1] Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies [J]. *Circulation*, 1996, 93: 841-842.
- [2] Jneid H, Moukarbel G V, Dawson B, Hajjar R J, Francis G S. Combining neuroendocrine inhibitors in heart failure: reflections on safety and efficacy [J]. *Am J Med*, 2007, 120: 1090, e1-e8.
- [3] Struthers A D. Angiotensin blockade or aldosterone blockade as the third neuroendocrine-blocking drug in mild but symptomatic heart failure patients [J]. *Heart*, 2006, 92: 1728-1731.
- [4] 白洁, 陈蓉, 盛佳, 汪健飞, 张国辉. SD大鼠扩张型心肌病模型的建立 [J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2006, 3: 210-213.
- [5] Tsukashita M, Marui A, Nishina T, Yoshikawa E, Kanemitsu H, Wang J, et al. Spironolactone alleviates late cardiac remodeling after left ventricular restoration surgery [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 136: 58-64.
- [5] Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure [J]. *Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2004, 5 Suppl 1: S7-S10.
- [7] Pitt B. Aldosterone blockade in patients with chronic heart failure [J]. *Cardiol Clin*, 2008, 26: 15-21.
- [8] Sciarretta S, Paneni F, Palano F, Chin D, Tocci G, Rubattu S, et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and inflammatory processes in the development and progression of diastolic dysfunction [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116: 467-477.
- [9] Joseph J, Pencina M J, Wang T J, Hayes L, Tofler G H, Jacques P, et al. Cross-sectional relations of multiple biomarkers representing distinct biological pathways to plasma markers of collagen metabolism in the community [J]. *J Hypertens*, 2009, 27: 1317-1324.
- [10] Bauersachs J, Widder J D. Endothelial dysfunction in heart failure [J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60: 119-126.
- [11] Lee C Y, Burnett J C Jr. Natriuretic peptides and therapeutic applications [J]. *Heart Fail Rev*, 2007, 12: 131-142.

[本文编辑] 孙岩