

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00356

· 论 著 ·

去肾交感神经术对大鼠急性心肌梗死后心室重构的影响

刘夙璇, 王国坤, 丁雪燕, 董斐斐, 安丽娜, 赵仙先, 秦永文*

第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 对急性心肌梗死(myocardial infarction, MI)大鼠进行双侧肾交感神经切除,探讨去肾交感神经术(renal sympathetic denervation, RDN)能否缓解MI后心室重构并进行可能的机制探讨。**方法** 结扎大鼠左冠状动脉前降支构建MI模型,实验分组为:MI组($n=10$)、MI+RDN组(MI建模1周后进行RDN, $n=10$)和假手术组($n=10$)。MI建模4周后对各组大鼠进行超声心动图检查测定心室重构程度和左心功能,对梗死边缘区心肌进行Masson染色观察心肌纤维化程度,免疫组化检测I型胶原、III型胶原和转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)的表达。**结果** 与MI组相比,MI+RDN组的左室射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短率(fractional shortening, FS)升高,左室收缩末期左内径(left ventricular internal dimensions at end systole, LVIDS)和左室舒张末期左内径(left ventricular internal dimensions at end diastole, LVIDD)减少(P 均 <0.05)。心肌Masson染色结果显示,MI+RDN组大鼠梗死边缘区的心肌纤维化程度较MI组减轻。免疫组化检测显示,与MI组相比,MI+RDN组大鼠梗死边缘区的I型胶原、III型胶原和TGF- β_1 表达减少(P 均 <0.05)。**结论** RDN可以改善MI大鼠心室重构,提高左心收缩功能,其机制可能与局部下调心肌TGF- β_1 表达进而减少I型胶原和III型胶原沉积有关。

[关键词] 心肌梗死;心室重构;纤维化;去肾交感神经**[中图分类号]** R 542.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)04-0356-06

Effects of renal sympathetic denervation on cardiac remodeling following myocardial infarction in rats

LIU Su-xuan, WANG Guo-kun, DING Xue-yan, DONG Fei-fei, AN Li-na, ZHAO Xian-xian, QIN Yong-wen*

Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of renal sympathetic denervation (RDN) on cardiac remodeling in myocardial infarction (MI) rats and to investigate the related mechanism. **Methods** MI rats were induced by ligation of the anterior descending coronary artery. A total of 30 Wistar rats were randomly assigned to MI group ($n=10$), MI+RDN group (rats with RDN one week after MI, $n=10$), and Sham group ($n=10$). Four weeks after modeling, the left ventricular cardiac remodeling and function of rats were examined by echocardiography; the cardiac tissues in the infarct border zone were stained with Masson trichrome for fibrotic analysis. Protein expressions of collagen I, collagens III and transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) were evaluated by immunohistochemistry. **Results** Compared with the MI group, the MI+RDN group had significantly increased ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) and significantly decreased left ventricular internal dimensions at end systole and end diastole (all $P<0.05$). The results of Masson staining showed that RDN after MI attenuated the collagen deposition around the border area of the infarct region. RDN treatment also inhibited the protein expression of collagen I, III and TGF- β_1 in the border area of MI rats ($P<0.05$). **Conclusion** RDN treatment can attenuate cardiac remodeling and improve left ventricular function after MI, which might be associated with the inhibition of myocardial TGF- β_1 expression and the subsequent suppression of collagen deposition.

[Key words] myocardial infarction; ventricular remodeling; fibrosis; renal sympathetic denervation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(4):356-361]

[收稿日期] 2013-11-22 **[接受日期]** 2014-01-23**[基金项目]** 第二军医大学长海医院“1255计划”项目(CH125542700)。Supported by “1255 Project” of Changhai Hospital of Second Military Medical University (CH125542700).**[作者简介]** 刘夙璇, 博士生。E-mail: suxuan.liu@gmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161266, E-mail: qin.yongwen@foxmail.com

随着生活水平的提高,急性心肌梗死(myocardial infarction, MI)的发病率逐年提高,已经成为威胁人类健康的重要疾病之一。心室重构是由于缺血坏死的心肌引起交感神经兴奋和肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)激活,造成梗死区心肌逐渐变薄、扩张,梗死边缘区心肌不断肥厚、伸展^[1-2]。心室重构与心力衰竭、恶性心律失常等并发症密切相关,严重影响MI患者的预后。2010年Esler等^[3]发现,经导管射频消融去肾交感神经术(renal sympathetic denervation, RDN)可以显著降低去甲肾上腺素流溢率,有效抑制交感神经兴奋和RAAS激活,对于顽固性高血压可获得显著而持久的降压疗效。2012年Brandt等^[4]发现对肾交感神经进行射频消融还能抑制高血压患者的左室肥厚、提高左室舒张功能,显著改善高血压患者的预后。经导管射频消融RDN作为一种新兴的介入治疗手段,除了显著地降压疗效外,是否可以通过抑制交感神经兴奋和RAAS激活发挥对MI后心室重构的治疗作用,目前鲜有报道。本课题通过结扎大鼠左冠状动脉前降支构建MI模型,研究双侧肾交感神经切除是否可以改善MI后心室重构、提高心脏功能,并通过梗死边缘区I型胶原、III型胶原和转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)的检测进行可能的机制探讨。

1 材料和方法

1.1 实验分组 健康清洁级雄性Wistar大鼠30只,体质量180~220 g,由第二军医大学动物实验中心提供。饲养温度22~25℃,相对湿度55%~60%,光照时间12 h/d。动物随机分成3组,分组如下:MI组($n=10$)、MI+RDN组(MI建模1周后进行RDN, $n=10$)和假手术组($n=10$),开胸后不结扎冠状动脉,开腹后保留肾交感神经。

1.2 大鼠MI模型制备及处理 大鼠适应环境1周,采用左冠状动脉前降支结扎法制备MI模型。术前禁食12 h,以乙醚吸入麻醉。左侧3~4肋间开胸暴露心脏,将心脏迅速挤出胸壁外,0号丝线结扎左冠状动脉前降支(左心耳和肺动脉圆锥交界稍下

方)。肉眼可见左室前壁颜色变白,闭合胸腔,开胸时间不超过30 s。标准肢体II导联心电图ST段抬高,即为结扎成功。假手术组只穿线不结扎前降支。

大鼠MI建模1周后进行双侧肾交感神经切除。术前禁食12 h,腹腔注射10%水合氯醛(3~5 mL/kg)进行麻醉。行腹正中切口,暴露肾脏及肾动、静脉,在解剖显微镜下($\times 25$)将可见的肾神经、脂肪和结缔组织剥离、切断,并在肾血管涂以10%苯酚(溶于95%乙醇)化学消融残留神经。术中采用电刺激神经验证RDN的完整性,用Grass S48刺激仪(15 V, 0.2 ms, 10 Hz)刺激肾动脉10~30 s,正常大鼠电刺激后血压增加5~10 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),心率增加8~15次/min,肾脏由红色变为苍白。RDN手术成功的大鼠进行电刺激,血压、心率和肾脏颜色均不会发生改变。假手术组开腹后仅用生理盐水涂抹肾动、静脉周围,保留肾交感神经。

1.3 超声心动图检查 MI建模4周后对各组大鼠进行超声心动图检查。采用加拿大Visual Sonics公司的多普勒超声诊断仪,选用RMV-716探头,探头频率为17.5 MHz。术前禁食12 h,腹腔内注射氯胺酮(2 mL/kg)麻醉大鼠,测量大鼠左室收缩末期内径(left ventricular internal dimensions at end systole, LVIDS)、左室舒张末期内径(left ventricular internal dimensions at end diastole, LVIDD)、左室射血分数(ejection fraction, EF)和左室短轴缩短率(fractional shortening, FS),取3个心动周期记录数据的平均值。

1.4 大鼠心肌组织Masson染色 大鼠心腔内注射10%氯化钾溶液1 mL,使心脏停跳在舒张期。迅速取出心脏,计算梗死面积:梗死面积(%) = 梗死区弧长/[$(\text{心外膜周长} + \text{心内膜周长})/2$] $\times 100\%$ 。沿垂直于心脏长轴的方向剪开左室,取左室中部冠状切面心肌,用4%多聚甲醛溶液固定。经石蜡包埋制成石蜡切片,取部分心肌进行Masson染色评估梗死边缘区纤维化程度。切片脱蜡至水,蒸馏水洗3次,浸入苏木精染核。PBS洗3次,入丽春红酸性复红溶液染色5 min,以1%磷钼酸液分色5 min沥干。亮绿溶液染色5 min,醋酸溶液浸洗,树胶封片。每张

Masson 切片在显微镜下观察染色情况并取 100 倍视野摄片,心肌细胞呈红色、胶原纤维呈蓝绿色。

1.5 免疫组化染色检测大鼠心肌 I 型胶原、III 型胶原和 TGF-β₁ 表达 将剩余石蜡切片脱蜡、水化、煮沸法修复。切片放入 3% 过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶。取出切片,PBS 洗 3 次后滴加封闭液(5% BSA),室温 10 min 后弃之。滴加适当稀释的一抗(鼠抗 I 型胶原一抗、鼠抗 III 型胶原一抗和鼠抗 TGF-β₁ 一抗,效价 1 : 100)。PBS 洗 3 次后滴加聚合 HRP 标记抗鼠 IgG,37℃ 孵育 30 min。PBS 洗 3 次后加 DAB 显色,自来水冲洗后苏木精复染,盐酸乙醇分化、脱水、封片。显微镜下观察以棕黄色颗粒为阳性信号,每张切片在梗死边缘区随机取 4~5 个 200 倍视野进行摄片,应用 Image Pro Plus 6.0 软件进行累积光密度(integrated optical density, IOD)定量分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数的比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 RDN 对 MI 大鼠心室重构和心功能的影响 MI 组大鼠存活 8 只,死亡 2 只,死亡率为 20%;MI+RDN 组大鼠存活 7 只,死亡 3 只,死亡率为 30%;假手术组 10 只大鼠全部存活。MI 组大鼠梗死面积与 MI+RDN 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。MI 建模 4 周后,与假手术组相比,MI 组 EF、FS 下降,LVIDS 和 LVIDD 增加(P 均 < 0.05);与 MI 组相比,MI+RDN 组 EF、FS 升高,LVIDS 和 LVIDD 减少(P 均 < 0.05)。结果见表 1。

表 1 建模 4 周后各组大鼠心功能的变化

Tab 1 Cardiac function of rats in different groups 4 weeks after modeling

Group	<i>n</i>	Infarct size (%)	EF (%)	FS (%)	LVIDS <i>d</i> /mm	LVIDD <i>d</i> /mm
Sham	10	0	73.17 ± 6.18	41.17 ± 3.54	3.10 ± 0.72	5.62 ± 0.82
MI	8	39.09 ± 5.39	20.50 ± 5.58*	9.50 ± 3.08*	8.22 ± 0.60*	8.98 ± 0.50*
MI+RDN	7	37.00 ± 4.83	42.83 ± 3.66* [△]	21.67 ± 2.16* [△]	5.92 ± 0.91* [△]	7.03 ± 0.71* [△]

MI: Myocardial infarction; RDN: Renal sympathetic denervation; EF: Ejection fraction; FS: Fractional shortening; LVIDS: Left ventricular internal dimensions at end systole; LVIDD: Left ventricular internal dimensions at end diastole. * $P < 0.05$ vs sham group; [△] $P < 0.05$ vs MI group

2.2 RDN 对 MI 大鼠心肌纤维化的影响 光镜下 Masson 染色显示,心肌细胞呈红色,胶原纤维为蓝绿色。与假手术组相比,MI 组大鼠梗死边缘区心肌细胞排列紊乱,间质内蓝色胶原纤维增多、分割心肌束,部分胶原纤维融合,心肌纤维化程度增加。与 MI 组相比,MI+RDN 组蓝色胶原纤维减少、心肌纤维化程度减轻。见图 1。

2.3 RDN 对 MI 大鼠心肌组织 I 型胶原、III 型胶原和 TGF-β₁ 表达的影响 免疫组化染色结果显示,I 型胶原、III 型胶原和 TGF-β₁ 呈棕黄色颗粒。IOD 定量分析显示,与假手术组相比,MI 组大鼠梗死边缘区 I 型胶原、III 型胶原表达增加($P < 0.05$);与

MI 组相比,MI+RDN 组 I 型胶原、III 型胶原表达减少($P < 0.05$)。MI 组大鼠梗死边缘区 TGF-β₁ 表达高于假手术组($P < 0.05$);与 MI 组相比,MI+RDN 组 TGF-β₁ 表达减少($P < 0.05$)。见图 2。

3 讨论

及时、有效地开通靶血管能够挽救濒死心肌,但是单一的血运重建对于缓解 MI 后心室重构难以获得理想的效果。目前心室重构的治疗以药物为主,包括血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)和 β 受体阻滞剂等。协同使用 ACEI 和 β 受体阻滞剂,可以有效降低交

感神经兴奋并抑制 RAAS 过度激活, 对于改善 MI 后心室重构具有显著效果。然而药物治疗存在一定的局限性, 部分患者服用 ACEI 后出现急性肾功能

衰竭、血管神经性水肿等严重不良反应; 部分患者存在长期服药依从性差的问题, 且多种药物的联合使用增加了家庭和社会的经济负担。

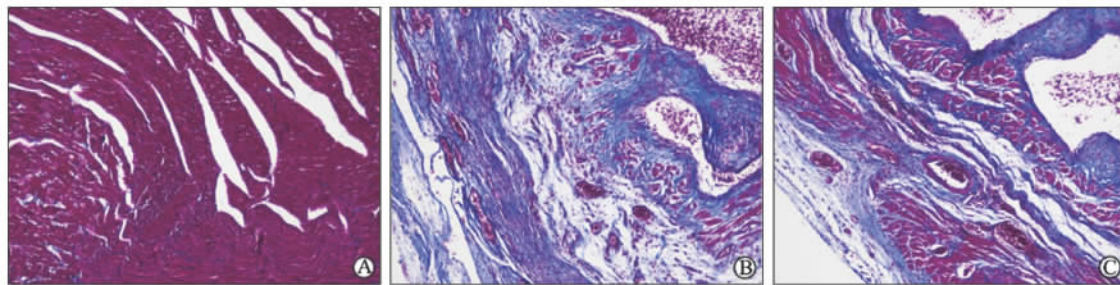


图 1 各组大鼠心肌组织 Masson 染色

Fig 1 Masson trichrome staining of rat cardiac sections in different groups

A: Sham group; B: MI group; C: MI+RDN group. MI: Myocardial infarction; RDN: Renal sympathetic denervation. Original magnification: $\times 100$

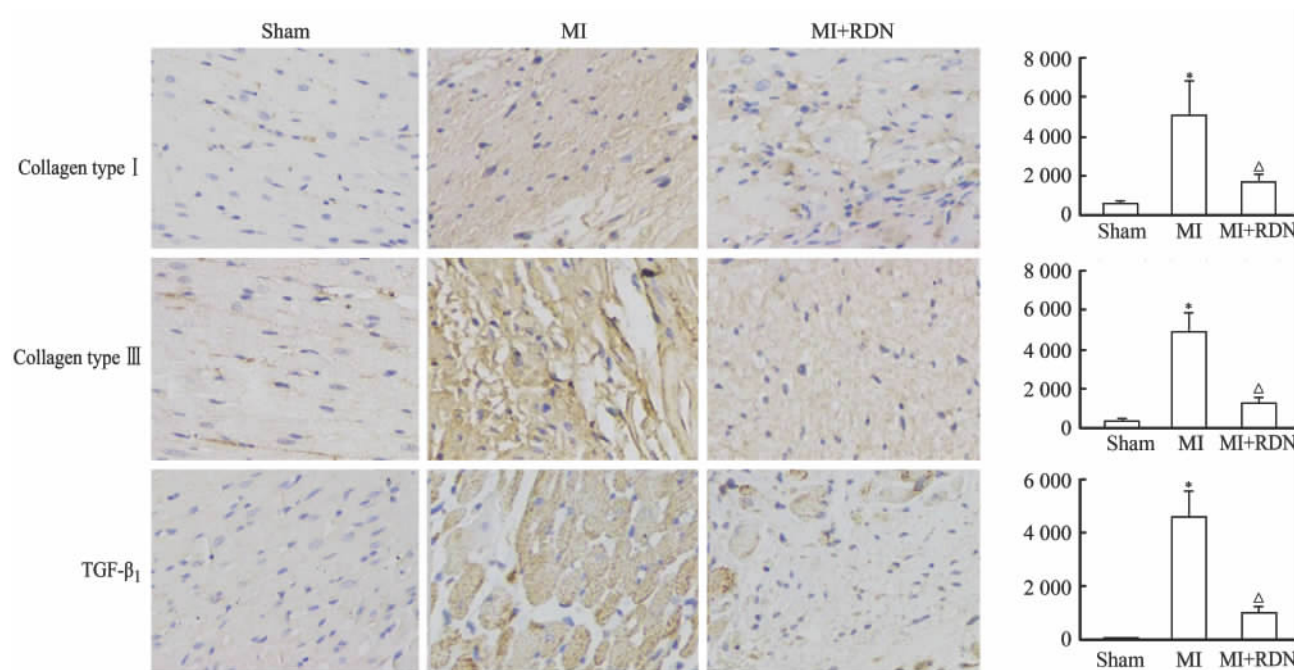


图 2 RDN 对心梗大鼠心肌 I 型胶原、III 型胶原和 TGF-β₁ 表达的影响

Fig 2 Effect of RDN on expressions of myocardial collagen type I, type III and TGF-β₁ in MI rats

MI: Myocardial infarction; RDN: Renal sympathetic denervation; TGF-β₁: Transforming growth factor β₁. Original magnification: $\times 200$ (immunohistochemical staining). * $P < 0.05$ vs sham group; [△] $P < 0.05$ vs MI group. $n = 10$ for sham group; $n = 8$ for MI group; $n = 7$ for MI+RDN group. $\bar{x} \pm s$

经导管射频消融 RDN 通过抑制交感神经兴奋和 RAAS 过度激活, 使得顽固性高血压患者可获得显著而持久的降压疗效^[3]。我们希望扩大这一手术的获益人群, 从而研究 RDN 对 MI 后心室重构是否也能起到改善效果并进行可能的机制探讨。2012 年 Hu 等^[5]发现 RDN 通过增加 MI 大鼠的尿量排出, 可以减少左室舒张末期和收缩末期容积, 提高左

室收缩功能。我们采用结扎大鼠前降支的方法构建 MI 模型, MI 建模 4 周后超声心动图结果显示, 与假手术大鼠相比, MI 大鼠左室收缩功能明显下降, LVIDS 和 LVIDD 显著增加。我们对建模 1 周的 MI 大鼠进行双侧肾交感神经切除, 3 周后发现 RDN 可以显著提高 MI 大鼠的左室 EF 和 FS, 减少 LVIDS 和 LVIDD。我们的研究显示, 对 MI 大鼠进

行双侧肾交感神经切除可以显著改善 MI 后心室重构并提高左心收缩功能。

研究显示,ACEI 和 β 受体阻滞剂等药物除了抑制交感神经兴奋和 RAAS 过度激活,还能通过抑制梗死边缘区的心肌纤维化进程改善 MI 后心室重构^[6]。据此,我们推测 RDN 也可能通过作用于梗死边缘区的胶原蛋白和促纤维因子发挥抑制心肌纤维化的作用。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是由胶原蛋白和纤维连接蛋白等组成的复杂网状空间结构,在维持心脏的正常组织结构中发挥重要作用^[7]。胶原蛋白是心肌缺血发生发展过程中梗死区和梗死边缘区进行修复的主要基质,是影响间质纤维化和心室重构进程的重要因素^[8]。本研究中,我们对大鼠的梗死边缘区进行 Masson 染色发现,与假手术大鼠相比,MI 大鼠有显著的蓝色胶原沉积,而对 MI 大鼠进行 RDN 后,梗死边缘区的胶原沉积明显改善。研究显示,I 型胶原和 III 型胶原是参与 MI 修复的主要胶原蛋白^[9]。I 型胶原占整个心肌胶原成分的 80%~85%,以粗纤维方式存在,抗拉强度高而利于保持心室壁的力量;III 型胶原占 10%~15%,以细纤维方式存在,具有伸展性和回弹性,与室壁弹性有关^[10]。我们对 MI 大鼠的梗死边缘区进行免疫组化染色发现,与假手术大鼠相比,MI 大鼠有显著的 I 型胶原和 III 型胶原沉积。对 MI 大鼠进行双侧肾交感神经切除后,梗死边缘区的 I 型胶原和 III 型胶原表达显著下降。据此,我们推测 RDN 对梗死边缘区胶原蛋白沉积的影响可能是改善 MI 后心室重构的重要机制之一。

心肌缺血除了激活全身交感神经和循环 RAAS,也会影响到局部心肌的 RAAS^[11]。MI 后机体交感神经兴奋、肾素分泌增加,激活循环 RAAS,继而增加室壁应力导致心肌局部 RAAS 激活;MI 后左室收缩功能下降、心室腔残留血液增多使室壁张力增加,也会激活心脏 RAAS。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)是 RAAS 的主要效应物质,是 MI 后胶原沉积和心室重构的重要启动因素^[12]。Danser 等^[13]发现心衰患者心脏局部转化 Ang II 生成的肾素来源于循环血。因此,心肌局部 RAAS 激活可能依赖于循环中的 RAAS 水平。

TGF- β_1 是一种重要的致心肌纤维化因子,心肌缺血后高表达可以触发细胞间质的胶原沉积和肌成纤维细胞对梗死区域的修复^[14]。Ang II 1 型受体(angiotensin II type I receptor, AT1R)介导了 Ang II 的大部分病理生理作用,Ang II 与其结合后可以上调 TGF- β_1 的表达和活性^[15]。Ju 等^[16]对 MI 大鼠进行 AT1R 阻断治疗后,梗死边缘区的 TGF- β_1 和 I 型胶原表达显著下降。我们通过免疫组化染色证实了 MI 大鼠梗死边缘区胶原蛋白和 TGF- β_1 表达显著增加,而进行 RDN 的 MI 大鼠 TGF- β_1 表达明显降低,且与 I 型胶原和 III 型胶原的下调表达一致。因此,我们推测 RDN 可能通过抑制交感神经兴奋和循环中 RAAS 激活,发挥对心肌局部 Ang II 的抑制作用并下调 TGF- β_1 表达,进而抑制梗死边缘区的胶原沉积,最终改善 MI 后心室重构并提高心脏功能。

本研究通过建立左冠状动脉前降支结扎的 MI 大鼠模型,观察了双侧肾交感神经切除对 MI 后心室重构和心脏功能的影响。我们发现对 MI 大鼠进行 RDN 治疗可以显著减轻心室重构并提高左心收缩功能,其作用机制除了直接抑制交感神经兴奋和循环 RAAS 激活外,可能与局部下调心肌 TGF- β_1 表达进而减少 I 型胶原和 III 型胶原沉积相关。在接下来的研究中,我们将对 RDN 治疗的 MI 大鼠进行循环和心肌中 Ang II、去甲肾上腺素的浓度监测,进一步深入地探讨 RDN 改善 MI 后心室重构的作用机制。在动物实验的基础上,我们希望能扩大经导管射频消融 RDN 的适应证,在未来能够通过微创手术改善心室重构并提高 MI 患者的预后。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Rouleau J L, de Champlain J, Klein M, Bichet D, Moyé L, Packer M, et al. Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction[J]. J Am Coll Cardiol, 1993, 22: 390-398.
- [2] Unger T. Neurohormonal modulation in cardiovascular disease[J]. Am Heart J, 2000, 139(1 Pt 2): S2-S8.
- [3] Symplicity HTN-2 Investigators; Esler M D, Krum H,

- Sobotka P A, Schlaich M P, Schmieder R E, Böhm M. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2010, 376:1903-1909.
- [4] Brandt M C, Mahfoud F, Reda S, Schirmer S H, Erdmann E, Böhm M, et al. Renal sympathetic denervation reduces left ventricular hypertrophy and improves cardiac function in patients with resistant hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59:901-909.
- [5] Hu J, Ji M, Niu C, Aini A, Zhou Q, Zhang L, et al. Effects of renal sympathetic denervation on post-myocardial infarction cardiac remodeling in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e45986.
- [6] Zhang Y, Elsik M, Edgley A J, Cox A J, Kompa A R, Wang B, et al. A new anti-fibrotic drug attenuates cardiac remodeling and systolic dysfunction following experimental myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168:1174-1185.
- [7] Kong P, Christia P, Frangogiannis N G. The pathogenesis of cardiac fibrosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71: 549-574.
- [8] Chen W, Frangogiannis N G. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833:945-953.
- [9] Weber K T, Sun Y, Bhattacharya S K, Ahokas R A, Gerling I C. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2013, 10:15-26.
- [10] Chapman D, Weber K T, Eghbali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure-overloaded rat myocardium[J]. *Circ Res*, 1990, 67:787-794.
- [11] Hirsch A T, Talsness C E, Schunkert H, Paul M, Dzau V J. Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure[J]. *Circ Res*, 1991, 69:475-482.
- [12] Sun Y, Weber K T. Infarct scar: a dynamic tissue[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46:250-256.
- [13] Danser A H, van Kesteren C A, Bax W A, Tavenier M, Derckx F H, Saxena P R, et al. Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding[J]. *Circulation*, 1997, 96:220-226.
- [14] Sutton M G, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy [J]. *Circulation*, 2000, 101:2981-2988.
- [15] Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63: 423-432.
- [16] Ju H, Zhao S, Jassal D S, Dixon I M. Effect of AT1 receptor blockade on cardiac collagen remodeling after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 35:223-232.

[本文编辑] 商素芳