

· 基础研究 ·

重组人松弛素对舒张性心力衰竭模型兔 心肌组织蛋白激酶 G 活性的调控

朱鸣, 龙娇蓉, 陈振云, 张红

摘要:目的 探讨重组人松弛素(RLX)对舒张性心力衰竭(DHF)模型兔心肌组织蛋白激酶 G(PKG)活性的调控作用。方法 采用腹主动脉缩窄术建立 DHF 模型兔,新西兰家兔 28 只随机分为假手术组 6 只、DHF 组 6 只、RLX 小剂量组 8 只[30 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]、RLX 大剂量组 8 只[98 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$]、给药 2 周。术后第 10 周,取血清标本,分别采用 ELISA 法检测钠尿肽、RLX,制备 10% 心肌匀浆液样本 ELISA 法测 3-硝基酪氨酸(3-NT)、NO、环磷酸鸟苷(cGMP)、PKG。结果 与假手术组比较,DHF 组、RLX 小剂量组、RLX 大剂量组血清钠尿肽、心肌匀浆 3-NT 水平明显升高,NO、cGMP、PKG 活性明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 DHF 组比较,RLX 大剂量组心肌匀浆中 NO、cGMP、PKG 活性明显升高[(18.70 \pm 0.27) $\mu\text{mol}/\text{L}$ vs (16.38 \pm 0.16) $\mu\text{mol}/\text{L}$, (10.63 \pm 0.34) nmol/L vs (9.15 \pm 0.27) nmol/L, (528.58 \pm 3.66) U/L vs (493.26 \pm 5.68) U/L, $P < 0.05$], 3-NT 水平明显降低[(239.98 \pm 2.75) $\mu\text{mol}/\text{L}$ vs (261.79 \pm 4.48) $\mu\text{mol}/\text{L}$, $P < 0.05$]。结论 大剂量 RLX 减轻家兔左心室舒张功能可能是通过 NO-cGMP-PKG 通路减轻 DHF 模型兔氧化应激反应,提升 NO 生物学利用度、PKG 活性,从而拮抗心肌纤维化,进而减轻左心室的舒张功能障碍。

关键词: 松弛素;心力衰竭;蛋白激酶 G;氧化性应激

Effect of recombinant human relaxin on regulating protein kinase G in myocardial tissue taken from a rabbit diastolic heart failure model

Zhu Ming, Long Jiaorong, Chen Zhenyun, Zhang Hong

(Department of Cardiology, Chinese PLA 113 Hospital, Anhui Medical University Chinese PLA 113 Clinical School, Ningbo 315040, Zhejiang Province, China)

Abstract: Objective To study the effect of recombinant human relaxin (RLX) on regulating the protein kinase G (PKG) in myocardial tissue taken from a rabbit diastolic heart failure (DHF) model. **Methods** A DHF model of rabbits was established by constricting their abdominal aorta. Twenty-eight New Zealand rabbits were randomly divided into sham operation group ($n = 6$), DHF group ($n = 6$), 30 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{d}$ RLX group ($n = 8$), 98 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{d}$ RLX group ($n = 8$). The animals were treated with RLX for 2 weeks. Serum samples were taken at week 10 after operation for measuring the serum levels of BNP, RLX, 3-NT, NO, cGMP and PKG by ELISA. **Results** The serum levels of BNP and 3-NT were significantly higher while those of NO, cGMP and PKG were significantly lower in DHF group, 30 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{d}$ RLX group and 98 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{d}$ RLX group than in sham operation group ($P < 0.05$). The serum levels of NO, cGMP and PKG were significantly higher while those of 3-NT were significantly lower in 98 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{d}$ RLX group than in DHF group ($P < 0.05$). **Conclusion** Large RLX dose alleviates the left ventricular diastolic function and oxidative stress, increases the bioavailability of NO and the activity of PKG through the signal pathway of NO, cGMP, PKG, and can thus prevent myocardial fibrosis and improve the left ventricular diastolic function in DHF rabbits.

Key words: relaxin; heart failure; protein kinase G; oxidative stress

DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2018.06.020

基金项目: 全军医药卫生科研基金(ZD07)

作者单位: 315040 宁波, 安徽医科大学解放军第一一三临床学院 解放军第一一三医院心内科(朱鸣现为安徽医科大学在读硕士研究生)

通信作者: 张红, Email: chengcheng0927@yeah.net

舒张性心力衰竭(DHF)是指一组以具有心力衰竭症状和体征、左心室射血分数正常,而舒张功能异常为特征的综合征^[1]。临床流行病学研究发现,随着社会老龄化的加剧,DHF 占有心力衰竭总数的 50%^[1-2]。且目前 DHF 药物治疗效果欠佳,因此 DHF 已经成为一个世界性的健康难题,越来越受到国内外专家的重视。迄今为止,DHF 的发病机制尚未明确。DHF 最特征性的病理变化是心肌硬度增加和间质纤维化形成,从而导致左心室舒张功能下降^[2]。近期有学者认为,DHF 发生的根本机制是冠状动脉微血管内皮炎症,过度肥胖、糖尿病、慢性阻塞性肺病、盐敏感性高血压等代谢危险因素,会使机体处于一种促炎症状态,导致冠状动脉微血管内皮炎症,产生活性氧,从而降低相邻心肌细胞的 NO 生物学利用度,降低环磷酸鸟苷(cGMP)和蛋白激酶 G(PKG)活性,PKG 活性导致心肌肥大及心肌被动性张力增加^[3-4]。我们既往研究发现,重组人松弛素(RLX)能够有效改善 DHF 模型兔的心脏舒张功能,但其作用机制尚不明确^[5]。为此,本课题通过观察 RLX 是否能够调控 DHF 模型兔心肌组织 PKG 活性,从而揭示 RLX 改善 DHF 舒张功能的生理生理机制。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与药品 手动组织研磨玻璃匀浆器(上海酶联生物科技有限公司),离心机(北京白洋医疗器械有限公司),家兔心肌纤维 Masson 染色试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),重组人 RLX (ProSpec-Tany Techno Gene Ltd. 公司),乌拉坦(上海伊卡生物技术有限公司,批号:20130609),青霉素(山东鲁抗医药股份有限公司,批号:015380),3-硝基酪氨酸(3-NT)、RLX、NO、cGMP、PKG 检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组 选取健康成年新西兰家兔 28 只,体质量(2.05±0.19)kg,雌雄不限,购于宁波大学动物实验中心[许可证号:SCXK(浙)20120005]。随机分为假手术组 6 只,DHF 组 6 只、RLX 小剂量组 8 只,RLX 大剂量组 8 只。

1.2.2 建立 DHF 模型及给药 参见文献^[5]建立 DHF 模型。手术严格无菌操作,每只家兔术后给予 30 万 U/(kg·d)青霉素肌肉注射 3 d,预防感染,术后精心饲养。术后第 8 周开始,使用微升注射器,经家兔耳缘静脉注射 RLX,RLX 小剂量组为 30 μg/(kg·d),ROX 大剂量组为 98 μg/(kg·d),给药时

间 2 周。剂量标准参见文献^[6],三期临床试验表明,急性心力衰竭患者 RLX 最佳剂量为 30 μg/(kg·d),再根据徐淑云教授主编的《药理实验方法学》换算出家兔等效给药剂量为 98 μg/(kg·d)。DHF 组和假手术组不做任何处理,标准饲料饲养以做空白对照。

1.2.3 血清钠尿肽和 RLX 测定及心肌匀浆指标测定 术后 10 周给药结束,对各组家兔经耳缘静脉抽血、离心后取上清液-20℃备检,采用 ELISA 法检测各组家兔钠尿肽、RLX;采用空气栓塞法处死各组加兔,迅速开胸取出心脏,快速置于装有预冷的生理盐水杯内充分洗净血液,滤纸吸干称重,去除心包、心房、右心室及脂肪组织等,切取部分左心室后壁称重,其余部分留作病理染色切片,按 1:9 的体质量体积比加入预冷的 PBS 缓冲液(pH 7.4),在冰浴中充分研磨制成 10%匀浆液,3000 r/min 离心 20 min,取 0.4 ml 上清液-20℃备检。待标本收集完毕后,采用 ELISA 法检测各组家兔 10%心肌匀浆上清液 3-NT、NO、cGMP、PKG 活性。检测方法严格按照试剂说明书。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 假手术组与 DHF 组血清 RLX 水平比较 与假手术组比较,DHF 组血清 RLX 水平明显升高,差异有统计学意义[(466.32±6.52)pg/ml vs (222.4±5.29)pg/ml, $P < 0.05$]。

2.2 4 组血清钠尿肽水平比较 与假手术组比较,DHF 组、RLX 小剂量组、RLX 大剂量组血清钠尿肽水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 DHF 组比较,RLX 大剂量组血清钠尿肽水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),RLX 小剂量组血清钠尿肽水平有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

2.3 4 组心肌匀浆指标比较 与假手术组比较,DHF 组、RLX 小剂量组、RLX 大剂量组心肌匀浆 3-NT 水平明显升高,NO、cGMP、PKG 活性明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 DHF 组比较,RLX 大剂量组心肌匀浆中 NO、cGMP、PKG 活性明显升高,3-NT 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),RLX 小剂量组 NO、cGMP、PKG 活性轻微升高,3-NT 有下降趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 4 组血清钠尿肽和心肌匀浆指标比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 兔(只) | 血清钠尿肽(ng/L) | NO($\mu\text{mol/L}$) | 3-NT($\mu\text{mol/L}$) | cGMP(nmol/L) | PKG(U/L) |
|----------|------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 假手术组 | 6 | 38.67 \pm 0.52 | 19.95 \pm 0.37 | 232.87 \pm 5.33 | 11.81 \pm 0.29 | 572.18 \pm 5.14 |
| DHF 组 | 6 | 71.71 \pm 0.89 ^a | 16.38 \pm 0.16 ^a | 261.79 \pm 4.48 ^a | 9.15 \pm 0.27 ^a | 493.26 \pm 5.68 ^a |
| RLX 小剂量组 | 8 | 70.93 \pm 0.94 ^a | 16.54 \pm 0.39 ^a | 258.07 \pm 2.28 ^a | 9.39 \pm 0.18 ^a | 497.02 \pm 3.82 ^a |
| RLX 大剂量组 | 8 | 51.33 \pm 0.39 ^{ab} | 18.70 \pm 0.27 ^{ab} | 239.98 \pm 2.75 ^{ab} | 10.63 \pm 0.34 ^{ab} | 528.58 \pm 3.66 ^{ab} |

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与 DHF 组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

DHF 作为以心室肌顺应降低和僵硬升高为特点的临床综合征,发病机制十分复杂,涉及多个发病因素、多个生理系统,迄今为止,对于 DHF 的病理、生理机制尚未完全阐明^[1-2,7]。且目前尚无循证医学证据支持的 DHF 特效治疗药物^[8]。近期研究发现,NO-cGMP-PKG 信号通路在 DHF 的发生、发展中起着巨大的作用:包括(1)心肌组织肌联蛋白有 N2B 及 N2BA 2 个亚型,N2B 较短、较硬,而 N2BA 更长、顺应性更佳,而 DHF 患者 N2BA/N2B 比率明显低,且以左心室向心性重构为主。2 种肌联蛋白除了亚型的转变,也受 PKG 磷酸化等翻译、修饰的调控,从而降低心肌被动张力。(2)N2B 中存在氧化应激的半胱氨酸残基靶点,因此 DHF 中氧化应激的增加可以直接通过靶点作用于心肌,也可以通过 NO-cGMP-PKG 信号途径间接影响心肌被动张力。(3)NO-cGMP-PKG 信号通路亦可以通过 PKG 磷酸化调节心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶活性,加强肌浆网对 Ca^{2+} 的重吸收,调节心脏的主动舒张功能^[2,7-10]。(4)过度肥胖、糖尿病、慢性阻塞性肺病、盐敏感性高血压使机体处于一种促炎症状态,导致冠状动脉微血管内皮炎症,产生活性氧,从而降低相邻心肌细胞的 NO 生物利用度、cGMP 和 PKG 活性。降低的 PKG 活性导致心肌细胞肥大及心肌被动张力增加,从而使心肌舒张功能障碍^[4,8,11-13]。既往研究证实,DHF 患者 cGMP 及 PKG 活性较收缩性心力衰竭患者都是偏低的,而低 PKG 活性又会引起心肌直径增大。低 PKG 活性下游作用于心肌细胞硬度和肥大,而上游受 cGMP、NO 的生物利用度、氮化氧化应激所调节,并且与 DHF 的心肌肥厚、心肌舒张功能障碍、心肌僵化等作用密切相关^[3,7]。因此 NO-cGMP-PKG 信号通路在 DHF 进展中发挥着巨大作用,对 PKG 活性的调控有望成为 DHF 治疗的新策略。

RLX 作为一种妊娠激素,同时也是心血管保护因子。既往研究证明,其有正性肌力、扩血管、改善呼吸困难等作用,主要局限于急性心力衰竭的治疗,

而对于 DHF 治疗方面的研究十分匮乏^[8,14]。近期大量实验资料证明,RLX 可能是机体内源性抗纤维化因子,其机制可能为:(1)与其同源受体 RXFP1 结合,通过神经型一氧化氮合酶(NOS)-NO-cGMP 信号通路抑制 Smad2(转化生长因子 β_1 活性和信号的调节蛋白),从而抑制转化生长因子 β_1 诱导的纤维母细胞分化和胶原生成^[15]。(2)随着转化生长因子 β_1 的抑制,减轻了转化生长因子 β_1 对诱导型 NOS 表达的抑制,导致大量 NO 合成,从而有助于基质金属蛋白酶的合成表达和活性,并且促进胶原降解^[16-17]。(3)RLX 可以通过 NO 信号途径,帮助恢复 NO 活性,NO 和 cGMP 是参与 RLX 调控细胞外基质的关键介质,而且 NO、cGMP 又可以调控下游 PKG 活性,从而拮抗心肌的纤维化,减轻心肌的被动张力^[18-20]。由此我们推论,RLX 可能是通过 NO-cGMP-PKG 信号通路减轻 DHF 患者的细胞外基质重构、逆转心肌纤维化、降低心肌被动张力,减轻僵化,从而减轻左心室的舒张功能障碍。

本研究发现,首先,DHF 模型兔钠尿肽明显升高,作为心力衰竭的血清学指标,该水平升高进一步证明 DHF 心功能受损,组织水平上验证我们建模成功。其二,DHF 组 RLX、3-NT 水平较假手术组明显升高,而 NO、cGMP、PKG 活性明显降低,这与 DHF 相关病理生理机制研究保持一致,DHF 进展中氧化、硝化应激加剧使 RLX 水平代偿性升高、NO 生物学利用度下降以及 cGMP-PKG 信号通路减弱,PKG 活性进一步下降^[2-3]。降低的 PKG 活性导致心肌肥大及心肌被动张力增加。其三,RLX 大剂量组 NO、cGMP、PKG 活性较 DHF 组明显升高,钠尿肽、3-NT 较 DHF 组明显降低,由此可说明大剂量 RLX 可明显减轻 DHF 的氧化、硝化应激反应,提升 NO 生物学利用度,加强 cGMP-PKG 信号通路,恢复 PKG 活性,减轻心肌被动压力,拮抗心肌纤维化,提高心肌舒张功能,改善心功能不全。而 RLX 小剂量组 NO、cGMP、PKG 活性较 DHF 组有上升趋势,钠尿肽、3-NT 水平较 DHF 组有下降趋势,但差异均未达统计学意义。这可能与给药时间短,而其通过 NO-cGMP-PKG 信号通路调节 PKG

活性进一步拮抗心肌纤维化与这一病理生理变化需要时间较长有关。我们将 RLX 用于 DHF 研究,证实 DHF 模型兔经大剂量 RLX 治疗以后,可以通过 NO-cGMP-PKG 信号通路减轻硝化、氧化应激,提升 NO 生物学利用度、cGMP、PKG 活性,从而减轻细胞外基质重构、降低心肌的被动张力,减轻僵化,逆转心肌纤维化,进而减轻左心室的舒张功能障碍,这为进一步明确 RLX 拮抗心肌纤维化机制提供了重要的动物实验依据。且在实验过程中确定 RLX 的安全剂量,为临床用药提供前瞻性的研究数据。今后我们还需明确 NO 供体等药物对于 DHF 患者心肌重构相关离子通路及分子信号通路的影响,为 DHF 治疗提供更多的理论及实验依据。

本实验尚存在不足之处:(1)实验动物数量偏少,可能导致一些数据波动、误差可能。(2)选取的家兔雌雄不限,雌雄家兔的基础 RLX 水平不同,可能会影响实验的结果。在后续实验中,我们将对此补充改进,以获得更有意义的结论。

参考文献

- [1] Campbell KS, Sorrell VL. Cell- and molecular-level mechanisms contributing to diastolic dysfunction in HFpEF[J]. *J Appl Physiol*, 2015, 119(10): 1228-1232. DOI: 10.1152/jappphysiol.01168.2014.
- [2] van Heerebeek L, Franssen CP, Hamdani N, et al. Molecular and cellular basis for diastolic dysfunction[J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2012, 9(4): 293-302. DOI: 10.1007/s11897-012-0109-5.
- [3] van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Circulation*, 2012, 126(7): 830-839. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.076075.
- [4] Paulus WJ, Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(4): 263-271. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.02.092.
- [5] 龙娇蓉, 朱鸣, 陈振云, 等. 重组人松弛素对舒张功能不全模型兔心脏舒张功能的影响研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2017, 19(4): 407-411. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2017.04.019.
- [6] Teerlink JR, Metra M, Felker GM, et al. Relaxin for the treatment of patients with acute heart failure (Pre-RELAX-AHF): a multicentre, randomised, placebo-controlled, parallel-group, dose-finding phase IIb study[J]. *Lancet*, 2009, 373(9673): 1429-1439. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60622-X.
- [7] Kovács Á, Alogna A, Post H, et al. Is enhancing cGMP-PKG signalling a promising therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction[J]? *Neth Heart J*, 2016, 24(4): 268-274. DOI: 10.1007/s12471-016-0814-x.
- [8] Zouein FA, de Castro Brás LE, da Costa DV, et al. Heart failure with preserved ejection fraction: emerging drug strategies[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013, 62(1): 13-21. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31829a4e61.
- [9] Shuai XX, Meng YD, Lu YX, et al. Relaxin-2 improves diastolic function of pressure-overloaded rats via phospholamban by activating Akt[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 218: 305-311. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.05.011.
- [10] Maack C, Böhm M. Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(1): 83-86. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.01.032.
- [11] Franssen C, Chen S, Unger A, et al. Myocardial microvascular inflammatory endothelial activation in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *JACC Heart Fail*, 2016, 4(4): 312-324. DOI: 10.1016/j.jchf.2015.10.007.
- [12] Zakeri R, Cowie MR. Heart failure with preserved ejection fraction: controversies, challenges and future directions[J]. *Heart*, 2018, 104(5): 377-384. DOI: 10.1136/heartjnl-2016-310790.
- [13] Altara R, Giordano M, Nordén ES, et al. Targeting obesity and diabetes to treat heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8: 160. DOI: 10.3389/fendo.2017.00160.
- [14] Raleigh JM, Toldo S, Das A, et al. Relaxin' the heart: a novel therapeutic modality[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2016, 21(4): 353-362. DOI: 10.1177/1074248415617851.
- [15] Wang C, Kemp-Harper BK, Kocan M, et al. The anti-fibrotic actions of relaxin are mediated through a NO-sGC-cGMP-dependent pathway in renal myofibroblasts in vitro and enhanced by the NO donor, diethylamine NONOate[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 91. DOI: 10.3389/fphar.2016.00091.
- [16] Rainer PP, Kass DA. Old dog, new tricks: novel cardiac targets and stress regulation by protein kinase G[J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 111(2): 154-162. DOI: 10.1093/cvr/cvw107.
- [17] Sasser JM, Cunningham MW Jr, Baylis C. Serelaxin reduces oxidative stress and asymmetric dimethylarginine in angiotensin II-induced hypertension[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 307(12): F1355-F1362. DOI: 10.1152/ajprenal.00407.2014.
- [18] Chow BS, Chew EG, Zhao C, et al. Relaxin signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-dependent pathway to up-regulate matrix metalloproteinases: the additional involvement of iNOS[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42714. DOI: 10.1371/journal.pone.0042714.
- [19] Huang X, Gai Y, Yang N, et al. Relaxin regulates myofibroblast contractility and protects against lung fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(6): 2751-2765. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.08.018.
- [20] Leo CH, Jelinic M, Ng HH, et al. Vascular actions of relaxin: nitric oxide and beyond[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(10): 1002-1014. DOI: 10.1111/bph.13614.

(收稿日期: 2018-01-19)

(本文编辑: 马卫东)