

左旋精氨酸通过激活 $L\text{-arg-NO}$ 通路对 异丙肾上腺素致大鼠心力衰竭的作用

李伟建¹, 方 达¹, 梁利军¹, 吴玉蕾¹, 潘睿晗¹, 于 越¹, 刘晓凡², 桑黎黎²

摘要 目的 探究左旋精氨酸($L\text{-arg}$)通过激活 $L\text{-arg-NO}$ 通路对异丙肾上腺素(ISO)导致的大鼠心力衰竭的保护作用。方法 雄性SD大鼠随机分为对照组、ISO组、 $L\text{-arg}$ 干预组。腹腔注射ISO复制大鼠心力衰竭模型,灌胃给予 $L\text{-arg}$ 。30 d后监测血流动力学参数:心率(HR)、左室收缩压力(LVSP)、左室舒张末期压力(LVEDP)、左室压力最大上升或下降速率($\pm dp/dt_{\max}$),计算心肺系数,检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、一氧化氮(NO)含量以及一氧化氮合酶(NOS)活性;HE染色观察心肌细胞排列;Masson染色观察心肌胶原纤维并计算心肌胶原纤维容积分数(CVF)。结果 与对照组比较,ISO组大鼠血流动力学参数:HR、LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 降低,LVEDP、 $-dp/dt_{\max}$ 升高,心肺系数增加,血清TNF- α 、SOD升高,NO、NOS降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。 $L\text{-arg}$ 干预组HR、LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 均高于ISO组,LVEDP、 $-dp/dt_{\max}$ 、心肺系数低于ISO组,血清SOD和TNF- α 降低,NO和NOS增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HE染色显示对照组心肌细胞形态正常,间质无扩张充血,心肌细胞排列整齐;ISO组心肌细胞排列紊乱,炎性细胞浸润,而 $L\text{-arg}$ 干预组心肌细胞接近对照组。ISO组Masson染色心肌细胞间可见大量蓝染的胶原纤维,而对照组观察不到蓝染区域, $L\text{-arg}$ 干预组在对照组与ISO组之间;ISO组CVF明显高于 $L\text{-arg}$ 干预组($P < 0.05$)。 $L\text{-arg}$ 干预组高于对照组($P < 0.05$)。结论 $L\text{-arg}$ 可以通过激活 $L\text{-arg-NO}$ 通路,增加机体内NO含量,改善血流,减轻心肌重构,产生对心力衰竭心肌的保护作用。

关键词 左旋精氨酸; $L\text{-arg-NO}$ 通路;异丙肾上腺素;心力衰竭

中图分类号 R 364.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1716-05

心力衰竭是一种临床上常见的严重的心血管疾

2015-08-10 接收

基金项目:江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(编号:201410313056X);徐州医学院院级科研课题(编号:2014KJ11);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:20130313021)

作者单位:徐州医学院¹临床医学系、²机能实验中心 徐州 221002

作者简介:李伟建,男,本科生;

桑黎黎,女,实验师,责任作者,E-mail: sanglili1982@163.

com

病,其主要是由心肌细胞、心内膜或大血管、心包膜异常引起;然而绝大多数情况下,心力衰竭的发生都与心肌细胞功能的损害有关^[1]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是人体多种细胞均可以产生的自由基,在全身各处分布广泛。左旋精氨酸($L\text{-arginine}$, $L\text{-arg}$)作为NO的前体可通过抗氧化自由基、改善心肌能量代谢、增加冠状动脉血流量和抑制中性粒细胞聚集等具有对心血管系统的保护作用^[2]。提供外源性的 $L\text{-arg}$ 可以拮抗脂质过氧化,减轻心脏缺血-再灌注损伤^[3-4];改变心脏移植血管病变,抑制平滑肌细胞增殖,保持内皮功能稳定^[5];降低血脂胆固醇,阻止动脉粥样硬化斑块进展,减少高胆固醇血症和冠心病心绞痛的发生^[6];对血压调节,高血压治疗等方面的效果都较为肯定,在临床上应用广泛^[7-8]。然而目前国内外对于 $L\text{-arg}$ 治疗心力衰竭的研究报道甚少,该实验研究 $L\text{-arg}$ 干预对心力衰竭心肌细胞功能的影响以及一氧化氮合酶(nitric oxide synthases, NOS)活性的变化,探讨 $L\text{-arg}$ 对心力衰竭心肌的作用,从而为 $L\text{-arg}$ 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠,重(220 ± 20)g,由徐州医学院实验动物中心提供。每6只分笼饲养,标准啮齿类动物饲料喂养,自由进食饮水。

1.1.2 实验药品及试剂 $L\text{-arg}$ 购自中国医药集团上海化学试剂公司;异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)购自美国Sigma公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、NO、NOS试剂盒均购自南京建成生物有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)测定试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验仪器 Power Lab 数据采集分析系统(澳大利亚AD Instruments公司);电子天平(上海方瑞仪器有限公司);可见光分光光度计(北京普析通用仪器

有限责任公司); 128ce 酶标仪(澳大利亚 Clinibio 公司); 台式高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与心衰模型制作 24 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、ISO 组、L-arg 干预组, 每组 8 只。① 对照组: 大鼠腹腔注射生理盐水 3 ml/kg, 早晚各 1 次; 第 2 次腹腔注射生理盐水后灌胃 1 ml/(kg·d) 蒸馏水; ② ISO 组: 大鼠腹腔注射 ISO 3 mg/kg 2 次/d^[9], 早晚各 1 次, 第 2 次腹腔注射 ISO 后灌胃 1 ml/(kg·d) 蒸馏水; ③ L-arg 干预组: 大鼠腹腔注射 ISO 3 mg/kg 2 次/d, 早晚各 1 次, 第 2 次腹腔注射 ISO 后灌胃 L-arg 250 mg/(kg·d)^[10]。以上操作每天 1 次, 各组腹腔注射 10 d, 灌胃 30 d 后实验。

1.2.2 左室血流动力学监测 灌胃 30 d 后的次日, 将各组大鼠称重、麻醉、固定、颈部剪毛备皮。取颈正中纵行切开, 经颈总动脉将连有压力换能器的充满肝素的导管插入左心室。压力信号由压力换能器转变为电信号输入 Power Lab 生物信号采集系统, Chart 7.0 软件记录心率(heart rate, HR)、左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LV-EDP)、左室内压上升或下降的最大变化速率(maximal or minimal differentials of left ventricular developed pressure, $\pm dp/dt_{max}$)。各组大鼠监测 30 min, 监测完成后颈总动脉取血 2 ml 4℃ 条件下 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清 -20℃ 保存备用。

1.2.3 心肺系数测定 取血完成后立即开胸, 切除大鼠心脏和肺并在冰生理盐水中漂洗直至生理盐水变得澄清, 滤纸拭干, 用电子天平称重大鼠心脏和肺并记录数值, 计算各组大鼠心肺系数[心重(mg)/体重(g), 肺重(mg)/体重(g)]。

1.2.4 血清 TNF- α 、SOD、NO 和 NOS 的测定 取已保存的上层血清, 按试剂盒说明书分别测定 TNF-

α 、SOD、NO 和 NOS 含量。TNF- α 测定采用 ELISA 法, SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法, NO 测定采用硝酸还原法, NOS 活性测定采用比色法。

1.2.5 HE 染色方法 切取左心室大部分组织, 置于 10% 的甲醛溶液中固定, 脱水, 石蜡包埋, 4 μ m 厚切片。染色时, 提前将片子置于 60℃ 培养箱加热过夜, 后行脱蜡 HE 染色并进行显微镜下观察。

1.2.6 Masson 染色和胶原纤维容积分数(collagen volume fraction, CVF)测定 在 100 倍显微镜下观察心肌组织切片 Masson 染色后, 胶原纤维与细胞核呈现蓝色, 心肌细胞胞质呈现红色。将 Masson 染色在 400 倍镜下随机选择 4 个视野, 血管胶原聚集的区域边界不包括在内, 使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统进行统计, 软件可以直接计算出 CVF。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.01 统计软件分析, 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠体重和血流动力学参数变化 与对照组比较, ISO 组 HR、LVSP、 $+ dp/dt_{max}$ 降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); LVEDP、 $- dp/dt_{max}$ 升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 ISO 组比较, L-arg 干预组 HR、LVSP、 $+ dp/dt_{max}$ 升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而 LVEDP、 $- dp/dt_{max}$ 明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 心肺系数 与对照组比较, ISO 组大鼠心脏和肺系数显著增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 ISO 组比较, L-arg 干预组心脏和肺系数低于 ISO 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 L-arg 干预对血清 SOD、TNF- α 、NO 和 NOS 水平的影响 与对照组比较, ISO 组 SOD 含量和 TNF- α 水平明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 ISO 组比较, L-arg 干预组 SOD 含量和

表 1 各组大鼠血流动力学参数的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组($n=8$)	ISO 组($n=8$)	L-arg 干预组($n=8$)	F 值	P 值
第 1 天体重(g)	208 \pm 12	210 \pm 10	206 \pm 14	-	-
第 30 天体重(g)	280 \pm 16	253 \pm 18	272 \pm 15	-	-
HR(次/min)	390 \pm 8.97	321 \pm 11.30**	382 \pm 9.56##	14.32	0.000 1
LVSP(kPa)	13.63 \pm 0.61	9.87 \pm 0.77**	12.84 \pm 0.44#	10.65	0.000 6
LVEDP(kPa)	0.43 \pm 0.10	1.26 \pm 0.14**	0.71 \pm 0.15#	10.62	0.000 6
$+ dp/dt_{max}$ (kPa/s)	337.33 \pm 13.07	300.93 \pm 12.40	318.67 \pm 14.13#	13.27	0.000 1
$- dp/dt_{max}$ (kPa/s)	328.40 \pm 12.00	285.73 \pm 11.33**	313.73 \pm 12.67##	23.11	0.000 1

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 ISO 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

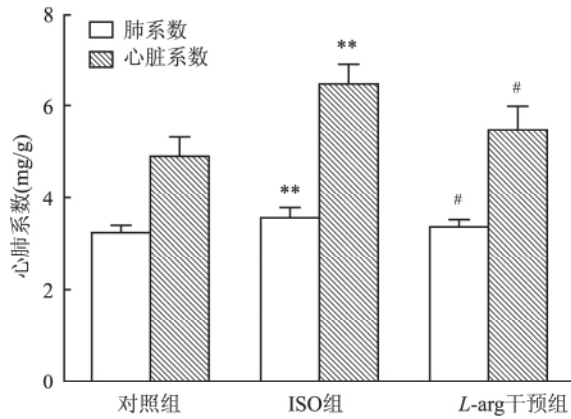


图1 L-arg 对各组大鼠心脏和肺系数的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 ISO 组比较: # $P < 0.05$

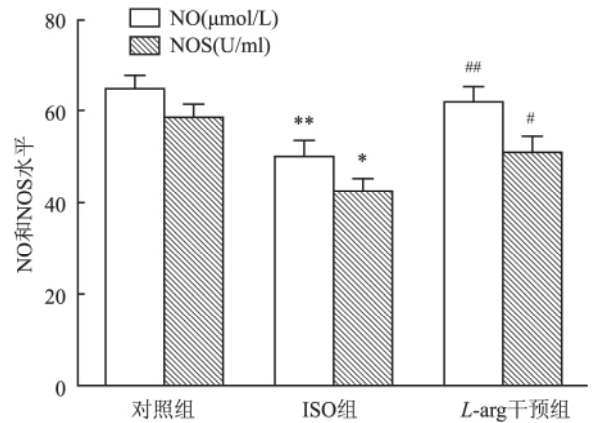


图4 L-arg 对血清 NO 含量和 NOS 活性的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ISO 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

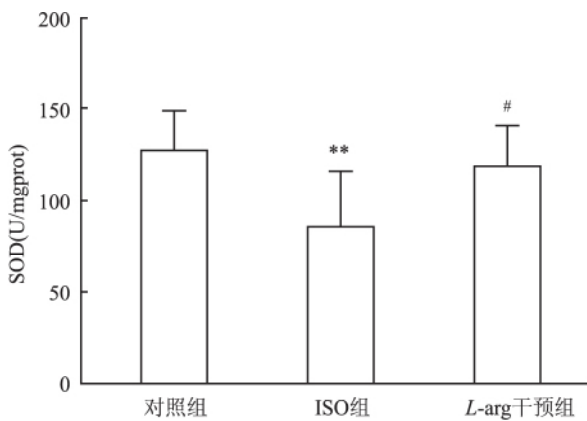


图2 L-arg 对血清 SOD 的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 ISO 组比较: # $P < 0.05$

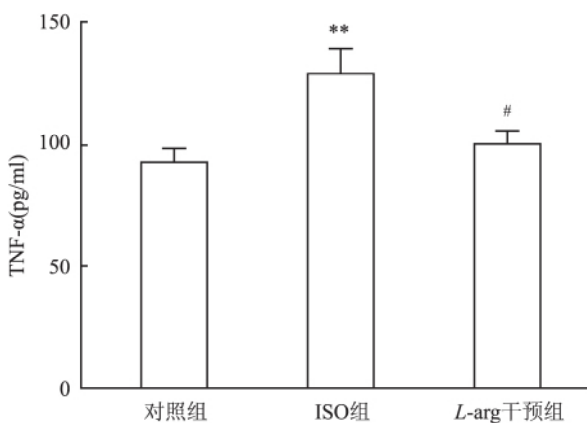


图3 L-arg 对 TNF-α 的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 ISO 组比较: # $P < 0.05$

TNF-α 水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2、3。与对照组比较, ISO 组 NO 含量和 NOS 活性明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 ISO 组比较, L-arg 干预组 NO 含量和 NOS 活性均增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.4 心脏 HE 染色观察 对照组大鼠心肌细胞形态学正常, 胞质染色均匀, 间质无扩张充血, 心肌纤维整齐排列, 心肌横纹排列清晰, 无显著异常。ISO 组大鼠心肌细胞具有不同程度的病理变化, 主要表现为细胞肥大、坏死、凋亡, 炎性细胞浸润, 心肌细胞断裂、扭曲, 心肌横纹模糊。L-arg 干预组心肌细胞排列整齐无病理变化, 与对照组基本相似。见图 5。

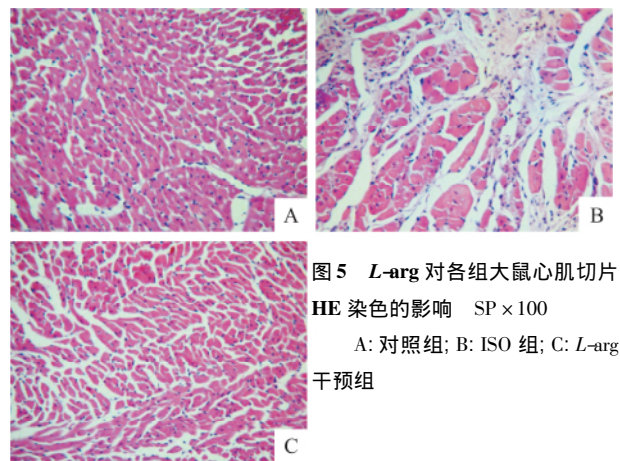


图5 L-arg 对各组大鼠心肌切片 HE 染色的影响 SP × 100
A: 对照组; B: ISO 组; C: L-arg 干预组

2.5 Masson 染色和心肌 CVF ISO 组 Masson 染色心肌细胞间可见大量蓝染的胶原纤维, 而对照组观察不到蓝染区域, L-arg 干预组在对照组与 ISO 组之间。与对照组比较, ISO 组 CVF 明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, L-arg 干预组心肌 CVF 明显降低 ($P < 0.05$)。3 组间比较差异有统计学意义 ($F = 4.05, P < 0.05$)。见图 6、7。

3 讨论

心力衰竭是许多心血管疾病, 如冠心病、高血

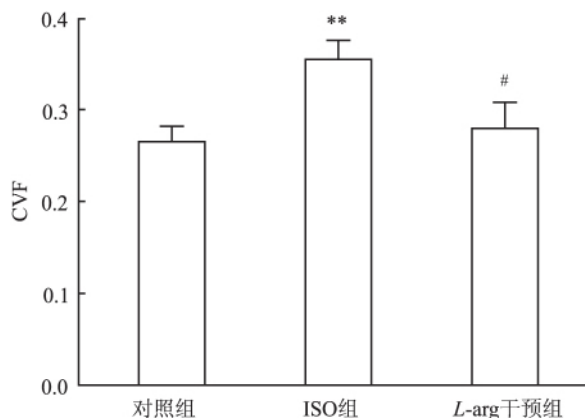


图6 L-arg对心肌CVF的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与ISO组比较: # $P < 0.05$

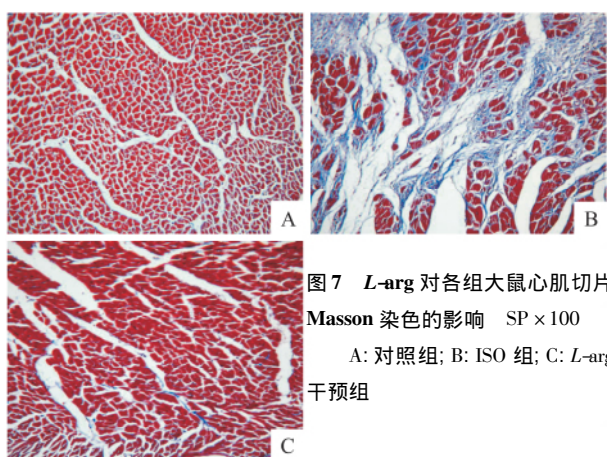


图7 L-arg对各组大鼠心肌切片Masson染色的影响 SP $\times 100$
A: 对照组; B: ISO组; C: L-arg干预组

压、心脏病、严重心律失常等的终末阶段和最主要的死因,是一种严重的临床症状综合征^[11],其中心肌损伤和重构是导致心力衰竭的最主要原因。因此,探讨心肌损害的发病机制,寻找有效的防治措施,具有重要的临床意义。本实验通过腹腔注射ISO制作心力衰竭模型,心肺系数明显增加,有创血流动力学异常,HE染色切片观察心肌细胞排列紊乱,炎性细胞浸润,Masson染色观察间质胶原纤维增加,说明心衰时心肌细胞发生了重构,这些均表明心力衰竭模型复制成功。TNF- α 来自于巨噬细胞,当发生心力衰竭心肌损伤时巨噬细胞释放TNF- α 参与炎症反应,因此,测定血清TNF- α 含量可以反映心肌损伤程度^[12]。SOD的心肌毒性,主要是和氧自由基损伤、细胞凋亡、钙超载等因素相关^[13]。实验结果表明,ISO诱发心脏衰竭的同时,增强血清SOD活性,增加TNF- α 的含量,这表明ISO诱导心肌损伤的同时,造成强烈的心肌组织脂质过氧化作用,产生大量的自由基,损伤心肌组织。心力衰竭的形态学特点是心肌排列紊乱,大量炎性渗出和纤维增生,HE染

色下,与对照组比较,ISO组心肌细胞排列紊乱,大量的心肌纤维增生并伴有炎性细胞渗出。Masson染色提示ISO组在排列紊乱的心肌细胞间有大量蓝染胶原纤维增生,CVF亦提示模型组有较高心肌纤维增生。

近年来,随着L-arg对心脏疾病的作用研究开展增多,有助于更进一步了解心肌疾病的发生机制,寻找新的治疗方法。L-arg-NO通路,即L-arg在NOS的催化作用下生成L-瓜氨酸和NO。本实验结果显示,L-arg干预后明显降低心肺参数,改善血流动力学参数,同时减轻心肌排列紊乱程度和胶原纤维增生,表明其对心力衰竭心肌有明显的改善作用。心力衰竭时血清中的NO含量和NOS活性均降低,L-arg干预后,提高NO含量,增强NOS的活性。在正常生理情况下,心肌细胞表达的NOS以精氨酸为底物生成NO,NO扩散进入机体细胞后,在细胞中影响有关基因转录翻译水平以及线粒体的氧化磷酸化功能,进而减轻心肌损害,产生保护心肌的作用^[14]。与对照组比较,ISO增强SOD活性和TNF- α 含量,增加心肌排列紊乱程度和胶原纤维含量,而L-arg显著减轻上述改变。推测L-arg通过促进NO的产生,中和氧自由基,降低过氧亚硝酸阴离子生成,增强膜稳定和心肌收缩力,减轻心肌重构等方面保护心力衰竭心肌细胞。

综上所述,提供外源性L-arg增强NOS活性,可以通过激活L-arg-NO通路,提高体内NO浓度,减轻心肌损害和重构,从而改善心力衰竭造成的心肌损害,具有广阔的临床应用前景。

参考文献

- [1] 汪兵,吴继雄,王晓晨,等.慢性心力衰竭患者血清心肌肌钙蛋白I与心脏结构功能的关系及其对预后的影响[J].安徽医科大学学报,2013,48(6):652-5.
- [2] Mohamed Abd-H, Lasheen N N. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusion in adult rats [J]. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2014, 6(3): 153-65.
- [3] Tratsiakovich Y, Gonon A T, Kiss A, et al. Myocardial protection by co-administration of L-arginine and tetrahydrobiopterin during ischemia and reperfusion [J]. Int J Cardiol, 2013, 169(1): 83-8.
- [4] Senbel A M, Omar A G, Abdel-Moneim L M, et al. Evaluation of L-arginine on kidney function and vascular reactivity following ischemic injury in rats: protective effects and potential interactions [J]. Pharmacol Rep 2014, 66(6): 976-83.

- [5] Martens C R , Kuczmariski J M , Kim J , et al. Voluntary wheel running augments aortic *L*-arginine transport and endothelial function in rats with chronic kidney disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* , 2014 , 307(4) : F418 - 26.
- [6] Hayashi T. The role of *L*-arginine and *L*-citrulline on atherosclerosis [J]. *Seikagaku* , 2014 , 86(3) : 352 - 9.
- [7] Dong J Y , Qin L Q , Zhang Z , et al. Effect of oral *L*-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized , double-blind , placebo-controlled trials [J]. *Am Heart J* , 2011 , 162(6) : 959 - 65.
- [8] Sandbakk S B , Sandbakk Ø , Peacock O , et al. Effects of acute supplementation of *L*-arginine and nitrate on endurance and sprint performance in elite athletes [J]. *Nitric Oxide* , 2015 48: 10 - 5.
- [9] 杨玲玲 , 张钰哲 , 吴建新. 异丙肾上腺素复制大鼠心衰模型及对心功能影响初探 [J]. *医学理论与实践* , 2012 25(10) : 1141 - 2.
- [10] 岳冠华 , 闰 健 , 李承道. 补充 NO 前体左旋精氨酸对一次性力竭运动大鼠心肌的影响 [J]. *西安体育学院学报* , 2008 , 25(1) : 81 - 5.
- [11] 程 寅 , 冯媛媛. 老年维吾尔族慢性心力衰竭患者 N 末端脑钠肽前体变化 [J]. *安徽医科大学学报* , 2012 47(7) : 828 - 31.
- [12] Torre-Amione A G , Vooletich M T , Farmer J A. Role of tumor necrosis factor- α in the progression of heart failure: therapeutic implications [J]. *Drugs* , 2000 , 59(4) : 745 - 51.
- [13] Meldrum D R. Tumor necrosis factor in the heart [J]. *Am J Physiol* , 1998 , 274(3 Pt 2) : R577 - 95.
- [14] Williams D , Venardos K M , Byrne M , et al. Abnormal mitochondrial *L*-arginine transport contributes to the pathogenesis of heart failure and reoxygenation injury [J]. *PLoS One* , 2014 , 9(8) : e104643.

The effects of *L*-arginine on heart failure rats induced by isoprenaline through activating *L*-arg-NO pathway

Li Weijian , Fang Da , Liang Lijun , et al

(*Clinical Medicine , Xuzhou Medical College Xuzhou 221002*)

Abstract Objective To explore the effects of *L*-arginine(*L*-arg) by activating *L*-arg-NO pathway on heart failure rats induced by isoprenaline (ISO) . **Methods** Male SD rats were randomly divided into three groups: control group , ISO group , *L*-arg group. Heart failure model was made by injecting ISO and *L*-arg was given by gavage. After thirty days , each group was monitored with hemodynamic parameters by carotid artery intubation: heart rate (HR) , left ventricular systolic pressure (LVSP) , left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) , maximal or minimal differentials of left ventricular developed pressure($\pm dp/dt_{max}$) . Heart and lung indices were calculated. Superoxide dismutase (SOD) , tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide (NO) concentration and nitric oxide syntheses (NOS) activity in plasma of each group were determined. Myocardial tissue changes were analyzed by HE staining. Myocardial fibers changes and collagen volume fraction (CVF) were analyzed by Masson trichrome staining. **Results** HR , LVSP and $+ dp/dt_{max}$ in *L*-arg group were higher than those in ISO group; LVEDP and $- dp/dt_{max}$ in *L*-arg group were lower than that in ISO group($P < 0.05$) . *L*-arg decreased the heart and lung indices ($P < 0.05$) . Meanwhile , the TNF- α and SOD level of *L*-arg group were decreased than those of ISO group ($P < 0.05$) . At the same time , the NO concentration and NOS activity of *L*-arg increased than those of ISO group ($P < 0.05$) . The myocardial arranged disorder , lots of inflammatory cells and interstitial collagen due to isoprenaline injection , *L*-arg supplements improved the heart function induced by ISO. There were a large number of blue-stained collagen fibers among derangement of myocardial cells in ISO group. But there was rarely the blue-stained region in the control group and *L*-arg group. CVF in ISO group was higher than *L*-arg group($P < 0.05$) , CVF in *L*-arg group was higher than the control group($P < 0.05$) . **Conclusion** Exogenous *L*-arg can protect heart failure myocardium through activating *L*-arg-NO pathway to activate NOS , increase NO concentration , reduce myocardial remodeling and improve cardiac function.

Key words *L*-arg; *L*-arg-NO pathway; isoprenaline; heart failure