

外源性 Apelin-13 对心力衰竭大鼠血浆血管紧张素和肾上腺髓质素的影响

赵 乾 黄 晏^{2△} 张胜叶¹ 牛 欢

(1 兰州大学第一临床医学院 甘肃 兰州 730000; 2 兰州大学第一医院内科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的: 研究给予外源性 Apelin-13 治疗对血流动力学、血浆血管紧张素 (Angiotensin- Ang) 和肾上腺髓质素 (Adrenomedulin ADM) 水平的影响。方法: 将 50 只大鼠随机分为 3 组 心衰组(n=20)、治疗组(n=20)和正常对照组(n=10) 阿霉素(ADR)腹腔注射建立大鼠心衰模型 治疗组给药外源性 Apelin-13 治疗 检测大鼠血浆 Ang 和 ADM 水平(ELISA 法)以及血流动力学的水平。结果 心衰组和治疗组血浆 Ang 和 ADM 水平比正常对照组增高,但治疗组血浆 Ang 和 ADM 水平比心衰组明显降低,治疗组左心室内压最大升降速度(LV±dp/dtmax)、左室最大收缩压(LVESP)比心衰组增高,左室舒张末期压(LVEDP)比心衰组低(P 均 <0.05)。结论 外源性 apelin-13 抑制体内的 Ang 和 ADM 水平可能对 ADR 诱导的大鼠心衰有保护作用。

关键词 Apelin-13 血管紧张素 肾上腺髓质素

中图分类号 Q95-3 R54 R322.61 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)08-1464-03

Effect of Exogenous Apelin-13 on Expression of Plasma Angiotensin- and Adrenomedulin in Heart Failure Rats

ZHAO Qian¹, HUANG Yan^{2△}, ZHANG Sheng-ye¹, NIU Huan¹

(1 The first medical hospital college of Lanzhou university, Lanzhou, 730000, China;

2 Department of Cardiology the first medical hospital of Lanzhou university, Lanzhou, 730000, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of exogenous apelin-13 on heart failure rats and detected the cardiac function and the levels of the plasma Ang (angiotensin-) and ADM(adrenomedulin). **Methods:** A total of 50 rats were randomly divided into 3 groups including heart failure group (n=20), therapy group (n=20) and normal group (n=10). Rats heart failure models were induced by Adrenomedulin (ADR) injection intraperitoneally. When the models have created, the therapy groups were injected repectively with aplelin-13 for 10 days. Then we detect the cardiac function by ELISA and the levels of the plasma Angiotensin- (Ang) and Adrenomedulin (ADM). **Results:** The plasma Ang and ADM levels of the heart group and the therapy group were significant higher than the normal group, The therapy group's plasma Ang and ADM levels were lower than the heart failure group's. In therapy group, the LV± dp/dtmax and LVESP were higher and LVEDP were lower than those in heart failure group (all P <0.05). **Conclusions:** The exogenous apelin-13 can protect rat heart failure which induced by ADR probably through inhibiting the levels of plasma Ang and ADM.

Key Words: Autonomic system; Adrenergic; Cholinergic; Ganglionated plexi; Paroxysmal atrial fibrillation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R54, R322.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)08-1464-03

前言

Apelin 是 1998 年发现的一种孤儿受体(APJ)的内源配体,是一种经 7 次跨膜的 G 蛋白超家族偶联受体^[1],在全身各处组织均有分布并主要在中枢神经系统和心血管系统中发挥着生理作用^[2-6]。近来研究表明,在经预处理离体的老鼠心脏上应用 Apelin 具有强烈的正性肌力作用^[7]。在慢性心力衰竭的病理生理过程中,Apelin-APJ 信号通路被认为是一种重要的潜在介质,心力衰竭病人比正常人左心室 Apelin 和 APJ 水平明显增高^[8,9]。Goetze 等^[9]发现慢性左心功能不全患者血浆中 Apelin-36 的水平较正常组下降 2.1 倍,而另一项较大样本研究测定了慢性心力衰竭患者的血清 Apelin 浓度,结果发现,不论心力衰竭

的病因和心功能降低程度如何,心力衰竭患者血清 Apelin 水平比正常对照组均显著降低,且 Apelin 浓度与左室射血分数相关^[10]。但是,关于外源性给予 Apelin 对心衰的影响以及 Apelin 进入体内后对体内一些活性因子产生何种影响的研究甚少。本实验通过建立阿霉素(ADR)建立大鼠心力衰竭模型,观察外源性给予 Apelin-13 治疗后血流动力学以及血浆血管紧张素 (Angiotensin- Ang) 和肾上腺髓质素(Adrenomedulin ADM)水平的影响作初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

阿霉素(浙江海正药业股份有限公司,批号:091203); Apelin-13 多肽(上海吉尔生化有限公司,批号:PD91117-9988340); Ang、ADM ELISA 检测试剂盒(购自 R&D 公司);多道生理仪 BL420F(成都泰盟有限公司);酶联免疫反应仪器(WallAC VICTOR2 1420 多功能时间分辨免疫荧光分析系统)。

1.2 动物模型的建立及实验分组

作者简介 赵乾(1982-)男,硕士研究生,主要研究方向:心律失常。电话:13893305056 E-mail:doctorzhaoqian@126.com

△通讯作者 黄晏, E-mail: huangyanden@yahoo.com.cn

(收稿日期:2010-12-27 接受日期:2011-01-23)

50 只雄性 SD 大鼠由甘肃省中医学院动物实验中心提供 , 体重 187-231 g ,查随机数字表 ,随机分成 3 组 :心衰组(n=20)按照文献造模方法^[11] ,于 2、4 d ADR 1 mg/kg ip ,6、8 d ADR 2 mg/kg ip , 10、12 d ADR 3 mg/kg ip ,14、16 d ADR 4 mg/kg ip ; 治疗组(n=20) 心衰造模方法同上 ,造模结束后 ,在造模组随机选出两只作血流动力学检查 ,如 LVEDP 大于 15 mmHg ,则证明造模成功^[12] ,然后开始注射 Apelin-13 ,剂量为 3μg· kg⁻¹· d⁻¹ ,连续 10 天。正常对照组(n=10) 相同部位腹腔注射等容量的生理盐水代替 ADR。

1.3 一般情况观察

每天早、中、晚观察大鼠的精神状态、活动情况、皮毛变化、饮食情况。用天平分别称量末次给药 24 h 后取材时体重。

1.4 血流动力学测定

用戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔内注射麻醉大鼠 ,分离右颈总动脉 ,切开插入直径 1mm 且有 1% 肝素的心导管 ,接 BL-420F 生物机能分析系统 ,同时观察显示器上出现血压波后再继续插入 ,当导管进入约 4-4.5 cm 时 ,如观察到显示器图形上血压波突然出现波形变化(压力值升高) ,表示已进入左室 ,记录左室最大收缩压(LVESP)、左室舒张末期压(LVEDP)及左室内压最大升降速度(LV±dp/dtmax)。操作完毕后经颈动脉采血备查。

1.5 血浆 Ang 和 ADM 水平的测定

取动脉血 2 ml 注入 EDTA 抗凝管中 ,2500 r/min 离心 10 min 离心后取上清液 -20℃保存待测。按照大鼠 Ang ELISA 检测试剂盒操作说明书步骤进行。步骤如下 :分别设空白孔、标准孔、待测样品孔 ,在酶标包被上标准孔中加入稀释好的样品 50μl ,待测样品孔中先加样品稀释液 40μl ,然后再加待测样

品 10μl ,轻轻摇晃均匀 ,37℃反应 30 min ,洗板 5 次 ,加入酶标试剂 50μl ,37℃反应 30 min ;洗板 5 次 ,每孔先加入显色剂 A 50μl ,再加入显色剂 B 50μl ,轻轻摇晃均匀 ,37℃避光显色 10 min ,取出酶标板 ,每孔加终止液 50μl ,终止反应(此时黄色立转黄色) ,以空白孔调零 ,在 450 nm 波长下测定各孔的 OD 值(15 min 以内) ;根据标准品的浓度及对应的 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程 ,在根据样品的 OD 值在回归方程上计算出对应样品的浓度。大鼠 ADM ELISA 检测步骤同上。

1.6 心脏病理学检查

处死大鼠后 ,打开胸腔 ,取出心脏 ,用生理盐水反复冲洗心腔内血液 ,用天平称出心脏重量 ,取部分左心室肌组织 ,以 10 %福尔马林固定 ,常规石蜡切片 ,HE 染色 ,光镜观察及拍片。

1.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 SPSS 18.0 软件的 One-Way ANOVA 的 LSD 分析方法处理 ,P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况、血流动力水平及血清 Ang 和 ADM 水平

心衰组大鼠 10-12 d 起即出现中毒体征 ,其中 6 只于给药造模后 14-18d 死亡 ,治疗组有 2 中于造模后 14 d 死亡 ,有 3 只于给予 Apelin-13 治疗后 1 d 死亡 ,其余老鼠于 17-20 d 表现出明显的心衰体征 :表现体重下降 ,喜欢聚团 ,精神状态差 ,活动能力下降 ,进食减少 ,皮毛松软 ,并可见脱毛 ,嘴唇及四肢发绀 ,眼睑分泌物增多等现象。处死大鼠后打开胸腔 ,正常组心脏未发现有异常表现。心衰组和 Apelin-13 治疗组大部分有不等量的胸水 ,心脏明显变大。各组大鼠体重及心体指数见表 1。

表 1 各组大鼠的体重、心体指数、及 Ang 和 ADM 水平
Table 1 The weight and the heart body index, levels of the plasma Ang and ADM in each group

Groups	Weight(g)	Heart body index(g/kg)	Ang (pg/ml)	ADM(pg/ml)
Normal group	343.86±12.93	2.57±0.11	415.42±45.95	33.44±3.86
Heart failure group	181.24±7.66*●	4.09±0.20*●	537.90±52.07*●	44.97±5.46*●
Therapy group	202.41±9.22*	3.55±0.09*	480.68±29.30*	38.13±2.55*

Note: *P<0.05 Compared with the normal group, ● P<0.05 the heart failure group compare with the therapy group, the differences were statistically significant.

2.2 各组大鼠血清 Ang 和 ADM 水平及血流动力检测

与正常对照组相比 ,心衰组和治疗组血浆 Ang 及 ADM 水平均升高 ,但治疗组较心衰组血浆 Ang 及 ADM 水平明显降低 (表 1) ;与正常对照组相比 ,心衰组和治疗组 LVESP、

LV+dp/dt_{max}、LV-dp/dt_{max} 均降低 ,而 LVEDP 明显增高 ;与心衰组相比较 ,治疗组 LV+dp/dt_{max}、LV-dp/dt_{max}、LVESP 均增高 ,而 LVEDP 降低 ,表明治疗组心功能改善 (表 2) P 均 <0.05 ,差异均有统计学意义。

表 2 各组大鼠血流动力学检测
Table 2 Basic conditions of pulmonary ventilation function ($\bar{x} \pm s$)

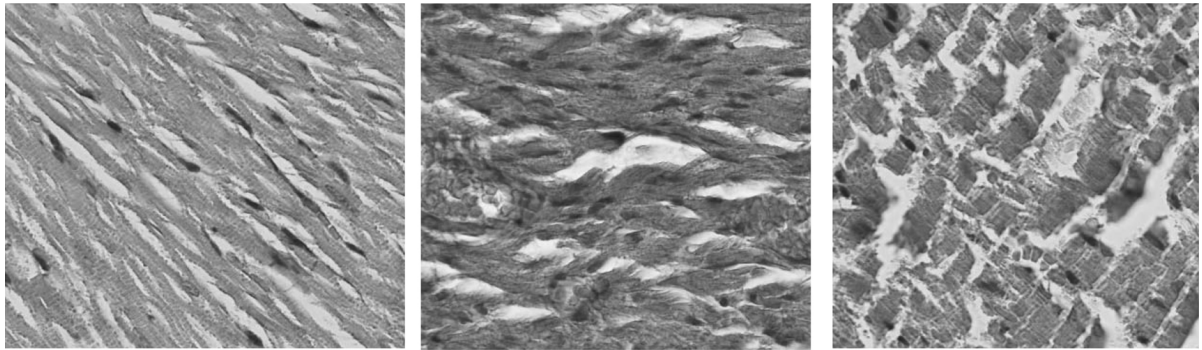
Groups	LVESP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	LV+dp/dtmax(mmHg/s)	LV-dp/dtmax (mmHg/s)
Normal group	111.66±7.62	7.63±2.37	2982.85±170.67	2733.50±162.71
Heart failure group	82.78±4.56*●	19.58±3.24*●	1767.67±200.74*●	1711.78±108.50*●
Therapy group	90.94±5.02*	15.69±2.11*	1958.77±109.61*	1879.96±118.60*

Note: *P<0.05 Compared with the normal group, ● P<0.05 the heart failure group compare with the therapy group, the differences were statistically significant.

2.2 各组大鼠心脏病理学检查

正常组心肌细胞形态、胞质、间质及横/纵纹均正常,肌纤维排列整齐,胞质丰富均匀。而心衰组心肌排列紊乱,细胞水

肿,横/纵纹不清。坏死心肌周围有不同程度的炎症细胞浸润和间质水肿,甚至出血,但治疗组炎症和出血坏死程度比心衰组轻微,横/纵纹可见。见图1。



正常组(normal group)

心衰组(heart failure group)

治疗组(therapy group)

图1 各组大鼠心脏病理切片检查(HE染色×400)

Fig.1 The heart pathology of each groups(HE staining, 40×10)

3 讨论

Apelin 是 1998 发现的一种孤儿受体(APJ)的内源性配体^[1]。在动物实验中发现,Apelin 在中枢系统中起着控制着呼吸、调节动脉血压和水摄入的作用^[2,5]。研究还发现,由于 APJ 的基因位于染色体 11 长臂的 q12 上,与血管紧张素受体(AT1)疏水跨膜区域有 40%~50% 的相同,APJ 和 AT1 有相似的组织分布,APJ 可能还在心血管内环境稳态中扮演着重要角色^[2]。Apelin 和 APJ 在心脏上均有表达^[2-5],人冠状动脉内皮细胞和冠状动脉平滑肌细胞表达 Apelin,在贲门上部动脉的血管平滑肌细胞有低密度的 APJ 表达^[3,8]。Apelin 和 APJ 在心肌组织上表达很少,但仍能检测出^[7,8]。Apelin 在其他内脏的小动脉内皮细胞也有表达,并能通过 NO 依赖性机制降低血压^[2]。Apelin 有正性肌力作用,在给经预处理的老鼠离体心脏注射 Apelin-16 发现,2min 后心脏收缩力开始增强,24min 后正性肌力达到高峰^[7]。

临床研究发现在充血性心力衰竭患者 ADM 和 Ang 血浆水平较正常人明显升高^[9]。ADM 和 Ang 是心力衰竭患者血液中比较重要的 2 种血管活性物质。ADM 能增强心肌收缩力、舒张血管、降压、利尿、利钠、抑制心肌及血管重塑,对心功能有保护作用,此作用与 Ang 的作用相拮抗^[13]。但研究发现,心衰患者血浆 ADM 水平随心衰程度的加重而升高,治疗后 ADM 水平下降,认为心衰时 ADM 的升高是一种代偿反应^[14,15]。本实验结果表明在 ADR 诱导的大鼠心力衰竭模型中,在给予外源性 Apelin-13 腹腔内注射后,治疗组血流动力学水平的改善可能是通过降低血浆 Ang 水平实现。由此可推断 Apelin-13 在心衰大鼠中起着 ACEI 相类似的作用,可能与 Ang 的作用相拮抗,具有扩张血管、降低心脏负荷、增加心脏的顺应性和收缩力而起着抗心衰的作用,因 Ang 能刺激 ADM 释放增加^[13],治疗后血浆 ADM 水平的降低可能是 Ang 的降低所导致。实验中我们还发现,Apelin-13 治疗组心体指数较心衰组小,病理切片也提示心肌损伤程度也较轻,提示 Apelin-13 可能具有抑制细胞凋亡、保护心肌细、逆转心肌重塑的作用。

一系列实验表明,Apelin 肯定能对心力衰竭产生有益的作用^[2,7],这在我们的实验也得到证实。另外应用 Apelin 治疗心衰的剂量、疗程及给药途径,长期应用 Apelin 治疗心衰对机体其他方面的影响,另外 Apelin-13 可能具有的抑制细胞凋亡、逆转心肌重塑的作用机制在我们的实验中没有涉及,均有待进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Tatemoto K, M Hosoya, Y Habata, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251(2): 471-476
- [2] Medhurst AD, CA Jennings, MJ Robbins, et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin[J]. J Neurochem, 2003, 84(5): 1162-1172
- [3] Hosoya M, Y Kawamata, S Fukusumi, et al. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (28): 21061-21067
- [4] Katugampola SD, JJ Maguire, SR Matthewson, et al. Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man [J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(6): 1255-1260
- [5] Kawamata Y, Y Habata, S Fukusumi, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1538(2-3): 162-171
- [6] Katugampola SD, JJ Maguire, RE Kuc, et al. Discovery of recently adopted orphan receptors for apelin, urotensin II, and ghrelin identified using novel radioligands and functional role in the human cardiovascular system[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2002, 80(5): 369-374
- [7] Szokodi I, P Tavi, G Foldes, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility[J]. Circ Res, 2002, 91(5): 434-440
- [8] Chen MM, EA Ashley, DX Deng, et al. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction[J]. Circulation, 2003, 108(12): 1432-1439

(下转第 1453 页)

支原体感染在细胞培养过程中是一种常见的污染类型,人胚胎干细胞培养过程中除环境因素之外^[5],一些特定的培养物如胎牛血清、feeder 细胞都有可能带来支原体感染的风险。

支原体感染后的细胞往往生长状态不佳,死细胞增多,甚至遗传稳定性也受到影响^[6]。因此,对细胞培养过程中支原体感染的检测和控制就显得尤为重要。支原体检测的方法很多,培养法、DNA 荧光染色法、PCR 法^[7]、单克隆抗体免疫荧光法^[8]、生化发光法、DNA 探针杂交法近年来均有文献报道,在人胚胎干细胞培养过程中使用的方法多为 DNA 荧光染色法,生化发光法和 PCR 法。本文中使用的 Hoechst33258 染色为 DNA 荧光染色法,该法操作简单,成本低廉,经过简介感染的方式能够很好地检测人胚胎干细胞的支原体感染。生化发光法和 PCR 法较 DNA 荧光染色法敏感,但是成本相对较高且易造成假阳性,需要有经验的实验室经过优化后采用。本文中也采用免疫荧光法,利用 RNAPolymerase 作为指标检测支原体感染,可以作为一种新参考。

对于支原体感染细胞的治疗,方法并不如临床治疗支原体丰富^[9,10]。支原体感染后的胚胎干细胞经过抗支原体药物处理后能够在短时间内控制支原体的生长,但无法完全治愈。因此,此法只适合短期内挽救细胞实验,不适合处理仍需继续培养的人胚胎干细胞。由于同实验室内培养的细胞株之间容易交叉感染,在没有找到更好的治疗支原体感染方法前,感染细胞建议妥善管理或丢弃。

参考文献 (References)

[1] Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research

[J]. BMC Med, 2009 Jun 11;7:29

- [2] Crook, J. M., T. T. Peura, et al. The generation of six clinical-grade human embryonic stem cell lines[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 490-4
- [3] O'Rourke, P. P., M. Abelman, et al. Centralized banks for human embryonic stem cells: a worthwhile challenge [J]. Cell Stem Cell, 2008,2(4): 307-12
- [4] Carol B. Ware, Angelique M.et.al. A Comparison of NIH-Approved Human ES Cell Line[J].s. Stem Cells, 2005:0452
- [5] Cobo, F., G. N. Stacey, et al. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation." [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005,68(4): 456-66
- [6] Paton, G. R., J. P. Jacobs, et al Chromosome changes in human diploid-cell cultures infected with Mycoplasma [J]. Nature,1965, 207 (992): 43-5
- [7] Molla Kazemiha, V., M. A. Shokrgozar, et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience[J]. Cytotechnology, 2009,61(3): 117-24
- [8] Payment, P., M. Corbeil, et al. Detection of Mycoplasma hominis and Mycoplasma orale in cell cultures by immunofluorescence [J]. Can J Microbiol,1978,24(6): 689-92
- [9] Paessler, M., A. Levinson, et al. Disseminated Mycoplasma orale infection in a patient with common variable immunodeficiency syndrome[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 200244(2): 201-4
- [10] Wei, W. Continuous versus intermittent azithromycin administration for treatment of Mycoplasma pneumonia-induced pneumonia: effects and drug resistance in rats [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2008,30(8): 1918-9, 1922

(上接第 1466 页)

- [9] Goetze JP, JF Rehfeld, J Carlsen, et al. Apelin: a new plasma marker of cardiopulmonary disease[J]. Regul Pept, 2006, 133(1-3): 134-138
- [10] Chong KS, RS Gardner, JJ Morton, et al. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2006, 8(4): 355-360
- [11] 李梅秀, 田国忠, 欧叶涛, 等.大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定[J]. 解剖学研究, 2005(03): 176-178.
- Li Meixiu, Tian Guozhong, Ou Yetao, et al. The establishment of a chronic heart failure model by adrinmycin and the judgement of the indexes[J]. Anat Res, 2005(03):176-178 (In Chinese)
- [12] Tonnessen T, G Christensen, E Oie, et al. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats

[J]. Cardiovasc Res,1997, 33(3):601-610

- [13] 朱秒章, 袁文俊, 傅博威, 等.心血管生理学和临床[M].第 1 版.(北京)高等教育出版社, 2004: 224-227
- Zhu Miaozhang, Yuan Wenjun, Fu Bowei, et al. Physiology and clinical of cardiovascular [M]. The first edition. (Bei Jing) Higher Education Press, 2004:224-227 (In Chinese)
- [14] Jougasaki M, CM Wei, LJ McKinley, et al. Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure[J]. Circulation, 1995, 92(3): 286-289
- [15] Nishikimi, T, Y Saito, K Kitamura, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 1995, 26(6): 1424-1431