

• 论 著 •

阿霉素诱导大鼠心力衰竭模型中血浆 NGF 表达的初步研究*

梁 政¹, 王怀龙¹, 李 晓¹, 李 波¹, 岑永艺², 刘珍君¹, 黄石安¹, 陈建英¹, 陈 灿¹, 陈文江¹

(1. 广东医科大学附属第一医院心血管内科, 广东湛江 524001; 2. 中国海洋石油南海西部医院, 广东湛江 524000)

摘 要:目的 探讨阿霉素诱导的大鼠心力衰竭模型中血浆神经生长因子(NGF)的表达情况。方法 25 只 Wistar 大鼠随机分为心力衰竭组(CHF 组, $n=15$, 阿霉素 4 mg/kg, 腹腔注射, 6 周)和正常对照组(NC 组, $n=10$), 待造模成功后继续观察 6 周, 在 6 周和 12 周测定心功能; 每 2 周测定体质量和通过尾静脉采血测定大鼠血浆 NGF 表达。结果 6 周后, CHF 组大鼠体质量较 NC 组明显减轻, 差异有统计学意义($P<0.05$), LVEDV 和 LVESV 明显升高, LVEF 明显下降, NGF 表达量也较对照组明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$); NGF 表达量随着病程时间延长而逐渐降低($P<0.05$)。结论 Wistar 大鼠腹腔注射阿霉素可以成功诱导 HF, 而且 NGF 可能与 HF 密切相关。

关键词:心力衰竭; 神经生长因子; 阿霉素; Wistar 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.15.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)15-2086-03

Preliminary study on plasma NGF expression in adriamycin induced rat heart failure model*

LIANG Zheng¹, WANG Huailong¹, LI Xiao¹, LI Bo¹, CEN Yongyi², LIU Zhenjun¹, HUANG Shian¹,
CHEN Jianying¹, CHEN Can¹, CHEN Wenjiang¹

(1. Department of Cardiovascular Internal Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China; 2. Nanhai West Hospital of China Offshore Oil, Zhanjiang, Guangdong 524000, China)

Abstract: Objective To investigate plasma NGF expression in adriamycin induced rat heart failure (HF) model. **Methods** Twenty-five Wistar rats were randomly divided into the CHF group ($n=15$, adriamycin 4 mg/kg, by intraperitoneal injection, for 6 weeks) and normal control group (NC group, $n=10$), after successful model construction, the 6-week observation was continuously conducted. The body mass and plasma NGF expression were detected once per 2 weeks. **Results** After 6 weeks later, the body mass in the CHF group was significantly reduced, the difference was statistically significant ($P<0.05$), LVEDV and LVESV were significantly increased, while LVEF was declined obviously ($P<0.05$), the NGF expression amount was significantly decreased compared with the control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$); the NGF expression amount was gradually reduced with the time extension of disease course ($P<0.05$). **Conclusion** Intraperitoneal injection of adriamycin can successfully induce heart failure model in Wistar rats, moreover NGF may be closely associated with HF.

Key words: heart failure; nerve growth factor; adriamycin; Wistar rats

心力衰竭(HF)是一组常见临床综合征,其患病率为0.9% (男性0.7%,女性1.0%),而且住院患者30 d病死率为5.4%,我国目前HF患者有大约450万^[1],由此可见其危害性。HF发病机制仍未完全清楚,目前研究主要认为与心脏重构有关^[2],而近年来研究显示交感神经重构与HF发生密切相关,具体机制主要涉及交感神经激活、神经萌芽和一些神经生长相关因子^[3-5]。神经生长因子(NGF)是心血管系统和神经系统非常重要的生物活性因子之一,对维持人体正常神经细胞营养起重要作用,而且可维持交感神经活性、促进神经细胞的分化等功能^[5-8]。近年来有研究显示NGF与HF关系密切^[9-10]。因此,本研究拟采用Wistar大鼠腹腔注射阿霉素制备HF模型,从而探讨NGF与HF的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型与标本采集 25只成年雄性清洁级Wistar大鼠,体质量为(200±20)g,由广东省实验动物中心提供,随机分为心力衰竭组(CHF组, $n=15$)和正常对照组(NC组, $n=10$)。CHF组给予阿霉素4 mg/kg,腹腔注射,每周1次,共6周,累积总量24 mg/kg,而NC组应用生理盐水以CHF组相同的方法、剂量和时间进行注射。确定造模成功后,继续喂养6周,以观察自然病程和其他指标变化情况。实验期间每2周通过尾

静脉采血以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管收集两组大鼠0.5 mL静脉血和测定体质量,同时观察大鼠一般情况,并在6周和12周进行超声测定存活大鼠的心功能。

1.2 方法

1.2.1 HE染色 于实验周期结束时,留取大鼠心脏组织,进行苏木素-伊红(HE)染色,HE试剂盒(C0105)由碧云天生物科技有限公司提供,详细操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 心脏超声测定 常规麻醉各组大鼠,固定四肢并采用仰卧位,以彩色超声诊断仪(SONOS 5500, Hewlett Packard)和HP小动物超声探头(15 MHz)在大鼠胸骨旁以二维超声进行心脏形态和功能检测,测量指标主要有左室舒张末期内径(LVEDV)、左室收缩末期内径(LVESV)、左室射血分数(LVEF), $LVEF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100\%$ 。

1.2.3 ELISA 将所获取的各组大鼠全血进行离心(3 000 r/min, 24 °C, 10 min)分离血浆,取各组大鼠的血浆,按照ELISA试剂盒说明书(ELISA试剂盒由深圳柏万森生物有限公司提供)对血浆NGF进行检测,观察其变化情况,具体步骤按照试剂盒说明书进行,最后用酶标仪(EPOCH, 美国)在450 nm波长下测定吸光度(OD值),并通过制备的标准曲线计算大鼠血浆中NGF的浓度。

* 基金项目:广东省湛江市科技计划资助项目(2014B01082)。

作者简介:梁政,男,副主任医师,主要研究心力衰竭发病机制及其防治。

1.3 统计学处理 本文采用 Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc, CA, USA) 对数据进行分析, 所有计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验进行两组间指标比较; 计数资料采用 χ^2 检验或者 Fisher 检验进行组间分析; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

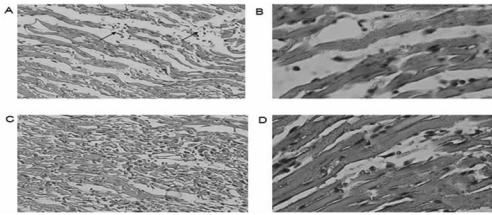
2 结 果

2.1 大鼠基本情况 CHF 组在实验观察期间, 尤其是阿霉素腹腔注射 4 周以后, 大鼠出现食欲下降、活动减少、体质量减轻和死亡, 体质量变化情况见表 1。CHF 组在造模期间死亡 4 只, 在随后的观察期间死亡 5 只, 经解剖, 基本都可见心脏变大、肝脏肿大等现象; 而 NC 组未见老鼠有明显异常和死亡。

表 1 两组大鼠造模前后体质量变化情况

组别	0 周		6 周		12 周	
	<i>n</i>	体质量($\bar{x} \pm s, g$)	<i>n</i>	体质量($\bar{x} \pm s, g$)	<i>n</i>	体质量($\bar{x} \pm s, g$)
NC 组	10	221.1 $\pm$ 8.691	10	297.4 $\pm$ 8.478	10	354.0 $\pm$ 9.680
CHF 组	15	228.1 $\pm$ 8.395	11	205.5 $\pm$ 7.459*	6	171.2 $\pm$ 10.241*

注: 与 NC 组比较, * $P < 0.05$ 。



注: A、B 为阿霉素造模组, C、D 为正常对照组。

图 1 大鼠 HE 染色情况

2.2 HE 染色结果 对造模后大鼠进行 HE 染色发现, CHF

组大鼠心肌细胞排列紊乱、间隙增宽(图 1A、B), 有的心肌细胞已经坏死、溶解(图 1A 箭头所示); 而对照组心肌细胞排列基本正常(如图 1C、D)。该结果符合 HF 的病理表现。

2.3 大鼠心功能测定情况 CHF 组 15 只 Wistar 大鼠经过 6 周阿霉素腹腔注射造模后, 存活 11 只, 而 NC 组 10 只大鼠全部存活, 进行心功能测定发现: CHF 组大鼠 LVEDV 和 LVESV 都比 NC 组明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而 CHF 组 LVEF(73.95%) 则较 NC 组(92.52%) 明显降低($P < 0.01$); 在 12 周时, CHF 组大鼠仅存活 6 只, LVEDV 和 LVESV 都较 6 周时未见明显升高($P > 0.05$), 然而 LVEF 则较 6 周时明显降低($P < 0.01$), 而 CHF 组与 NC 组比较, 心功能明显下降, LVEF 仅为 62.60% ($P < 0.01$), 见表 2。该结果结合上述 HE 染色表明阿霉素腹腔注射可以成功建立 Wistar 大鼠心力衰竭模型, 而且心功能衰竭会随着生存时间的延长而加重。

2.4 NGF 表达变化情况 经过尾静脉采血, 然后采用 ELISA 检测血浆 NGF 发现: CHF 组 NGF 表达量逐渐降低, 在 8 周时升高, 然后又逐渐下降, 而 NC 组整个过程未见明显升高或者下降; 在 4 周以后, CHF 组 NGF 表达量明显较 NC 组降低($P < 0.01$), 详见表 3。

表 2 两组大鼠心功能情况

时间	组别	<i>n</i>	LVEDV(mL)	LVESV(mL)	LVEF(%)
6 周	NC 组	10	0.449 $\pm$ 0.005 6	0.044 $\pm$ 0.001 2	92.52 $\pm$ 0.87
	CHF 组	11	0.551 $\pm$ 0.008 3*	0.143 $\pm$ 0.008 7*	73.95 $\pm$ 1.51*
12 周	NC 组	10	0.454 $\pm$ 0.008 4	0.043 $\pm$ 0.000 7	90.31 $\pm$ 0.22
	CHF 组	6	0.546 $\pm$ 0.014 3*	0.154 $\pm$ 0.012 5*	62.60 $\pm$ 2.28*#

注: 与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 6 周比较, # $P < 0.05$ 。

表 3 两组大鼠 NGF 表达情况

组别	0 周		2 周		4 周		6 周		8 周		10 周		12 周	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s(\text{ng/L})$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s(\text{ng/L})$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s(\text{ng/L})$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s(\text{ng/L})$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s(\text{ng/L})$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s(\text{ng/L})$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s(\text{ng/L})$
NC 组	10	300.3 $\pm$ 12.21	10	296.3 $\pm$ 10.42	10	314.1 $\pm$ 8.47	10	317.2 $\pm$ 8.76	10	297.9 $\pm$ 10.46	10	301.1 $\pm$ 8.34	10	294.1 $\pm$ 9.45
CHF 组	15	290.4 $\pm$ 6.45	15	276.2 $\pm$ 7.98	13	252.9 $\pm$ 7.41*	11	147.8 $\pm$ 9.52*	9	208.3 $\pm$ 6.84*#	7	148.2 $\pm$ 13.14*	6	108.4 $\pm$ 13.36*

注: 与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 6 周和 10 周比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨 论

HF 已经成为严重危害人类健康的重大疾病之一, 给人类和社会带来严重负担, 其防治刻不容缓^[1]。对于其防治, 目前已经有较好的临床措施(如强心、利尿、扩管等), 但目前多局限于 HF 后的组织结构重构和电重构(如 β 受体阻滞剂、血管紧张素转化酶抑制剂等的治疗)^[3-4]。现有研究表明 HF 后神经重构也是 HF 治疗和预后的关键因素, 目前主要发现 NGF、酪氨酸羟化酶、生长相关蛋白 43 等可能与神经重构有关^[6-7]。NGF 目前在临床已经有人或鼠重组型运用于滋养神经、营养神经细胞等, 主要用于外伤或者卒中后康复治疗^[11]。国内已经有研究者在临床发现 HF 患者血浆 NGF 表达会下降, 而血管紧张素转换酶抑制剂、 α_1 受体阻断剂和 β 受体阻滞剂等可能会改善 NGF 的表达^[9-10, 12], 不过都还是一些小样本观察性研究, 还需要更深层研究。另有研究者发现有氧运动可以改善 HF 后 NGF 的表达^[13]。也有研究者通过建立急性心肌梗死模型探讨 NGF 与交感神经重构的关系, 发现心肌梗死后 NGF 表达也下调^[14-18]。然而关于 HF 与 NGF 具体关系的研究较少。

本研究通过腹腔注射阿霉素成功建立 HF 模型, 发现阿霉

素腹腔注射 4 周以后, CHF 组大鼠相比于 NC 组出现食欲下降、活动减少、体质量减轻和死亡等情况; 并通过 HE 染色发现 CHF 组大鼠心肌细胞排列紊乱、间隙增宽, 并出现心肌细胞坏死、溶解等情况; 通过超声测定基本心功能发现 CHF 组大鼠 LVEDV 和 LVESV 都比 NC 组明显升高, 而 CHF 组 LVEF 则较 NC 组明显降低, 同时发现 CHF 组大鼠心功能衰竭会随着生存时间的延长而加重; 通过对大鼠血浆 NGF 检测发现在 HF 后大鼠 NGF 的表达明显下降, 而且随着病程延长和病情加重而持续下降, 而在 8 周时呈现上升趋势, 可能与机体代偿等有关, 当失代偿后 NGF 继续下降, 说明 NGF 与 HF 密切相关, 而其具体机制可能与交感神经重构等有关, 还有待进一步研究。本研究只是从动物层面发现 HF 后 NGF 表达下降, 未进行干预和治疗, 有一定局限性, 还有待后续研究确定具体机制和关系。

综上所述, 本研究通过采用 Wistar 大鼠腹腔注射阿霉素可以成功诱导慢性 HF 动物模型, NGF 在阿霉素诱导的 HF 模型中呈现低表达, 可能与阿霉素诱导的 HF 发病机制密切相关。

参考文献

[1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2014》概要[J]. 中国循环杂志,2015,30(7):617-622.

[2] 张敏,孟照辉. 心力衰竭发病机制及药物治疗进展[J]. 临床医学,2015,35(5):118-121.

[3] 钱方毅. 重视心力衰竭发病机制中的神经内分泌细胞因子系统的研究[J]. 中国循环杂志,2001,16(4):243-245.

[4] Rogers C, Bush N. Heart failure: pathophysiology, diagnosis, medical treatment guidelines, and nursing management [J]. Nurs Clin North Am, 2015, 50(4): 787-799.

[5] Hasan W, Smith PG. Decreased adrenoceptor stimulation in heart failure rats reduces NGF expression by cardiac parasympathetic neurons [J]. Auton Neurosci, 2014, 181(181):13-20.

[6] Xing J, Lu J, Li J. Nerve growth factor decreases in sympathetic and sensory nerves of rats with chronic heart failure [J]. Neurochem Res, 2014, 39(8):1564-1570.

[7] D'elia E, Pascale A, Marchesi N, et al. Novel approaches to the post-myocardial infarction/heart failure neural remodeling [J]. Heart Fail Rev, 2014, 19(5):611-619.

[8] Singh S, Sayers S, Walter JS, et al. Hypertrophy of neurons within cardiac ganglia in human, canine, and rat heart failure: the potential role of nerve growth factor [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(4):e000210.

[9] 李书国,毛小波,郭张强,等. $\alpha 1$ 受体阻断剂对慢性心力衰竭大鼠心肌神经生长因子表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(17):2110-2113.

[10] 焦蓉,朱小燕. 心力衰竭患儿血浆神经生长因子水平及卡托普利的干预研究 [J]. 医药导报, 2011, 30(8): 1013-

1015.

[11] 唐中力,李浪. 神经调节蛋白 1 治疗慢性心力衰竭的新进展 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(2):209-211.

[12] 李书国,杨俊,丁家望,等. 慢性心力衰竭大鼠心肌神经生长因子表达及卡维地洛治疗的影响 [J]. 中国医师杂志, 2009, 11(6):846-849.

[13] 甄洁,李晓霞. 有氧运动抑制心梗后心力衰竭大鼠左室重塑及交感神经重塑 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(6): 973-979.

[14] Kimura K, Kanazawa H, Ieda M, et al. Norepinephrine-induced nerve growth factor depletion causes cardiac sympathetic denervation in severe heart failure [J]. Auton Neurosci, 2010, 156(1/2):27-35.

[15] Lam NT, Currie PD, Lieschke GJ, et al. Nerve growth factor stimulates cardiac regeneration via cardiomyocyte proliferation in experimental heart failure [J]. PLoS One, 2012, 7(12):e53210.

[16] Qin F, Vulapalli RS, Stevens SY, et al. Loss of cardiac sympathetic neurotransmitters in heart failure and NE infusion is associated with reduced NGF [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(1):H363-H371.

[17] Kaye DM, Vaddadi G, Gruskin SL, et al. Reduced myocardial nerve growth factor expression in human and experimental heart failure [J]. Circ Res, 2000, 86(7):E80-E84.

[18] Govoni S, Pascale A, Amadio M, et al. NGF and heart: Is there a role in heart disease? [J]. Pharmacol Res, 2011, 63(4):266-277.

(收稿日期:2016-01-29 修回日期:2016-05-17)

(上接第 2085 页)

时还受镁、磷、ALP、钙及 25-OH-D 间的相互影响^[6],有研究表明 25-OH-D 与 PTH 呈负相关^[7]。

本研究显示产褥期妇女钙、磷、镁水平在产后逐渐趋于健康人水平,但仍有 60% 以上出现维生素 D 不足或缺乏。产褥期妇女由于分娩时体力消耗大,身体内各器官要恢复,产妇的消化能力减弱,又要分泌乳汁供新生儿生长,所以饮食营养应多进蛋白质和多吃汤汁食物,并适当补充维生素和铁剂^[8-10]。现在全世界都在大力提倡母乳喂养,完全母乳喂养的乳母如果不补充维生素 D,同时又缺乏足够的光照,则其婴儿维生素 D 缺乏和(或)佝偻病的风险增加^[3]。

综上所述,本研究对妊娠期和产褥期妇女的钙吸收水平和维生素 D 营养状况进行评价,结论为妊娠期和产褥期妇女普遍存在低钙、低镁、维生素 D 不足或缺乏的现象,合理地补充维生素 D 与其他矿物质元素是必要的。本研究同时可以帮助临床及时修改治疗方案,有效地预防胎儿和新生儿佝偻病和骨质疏松症的发生,对保障和提高妇幼人群身体健康具有重要意义。

参考文献

[1] El-Khoury JM, Reineks EZ, Wang S. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues [J]. Clin Biochem, 2011, 44(1):66-76.

[2] 聂敏,王鸥,张葵,等. 妊娠中晚期 25-羟维生素 D 状况初

步研究 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2009, 2(2):83-87.

[3] 周建烈,陈炜俊. 美国儿科学会预防佝偻病和维生素 D 缺乏 2008 年指南简介 [J]. 中华临床营养杂志, 2009, 17(3):184-186.

[4] 张秀琴,许飞,孙慧. 2517 例妊娠期妇女 25 羟基维生素 D 水平营养分析 [J]. 现代医学, 2014, 42(3):323-324.

[5] 李力,陈竹钦,张雅玲,等. 正常孕妇、妊娠征孕妇血清 PTH 的变化 [J]. 标记免疫分析与临床, 1996, 3(1):59.

[6] Holick MF. Vitamin D deficiency [J]. N Engl J Med, 2007, 357(3):266-281.

[7] 马燕,庞小芬. 老年男性血清维生素 D 水平状况及其与甲状旁腺激素的相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(4):424-428.

[8] Hathcock JN, Shao A, Vieth R, et al. Risk assessment for vitamin D [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(1):6-18.

[9] Wager CL, Greer FR. The section on breastfeeding and committee on nutrition. prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents [J]. Pediatrics, 2008, 122(5):1142-1152.

[10] Metab JE. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency [J]. Endocr Soc Clin Guidelines, 2011, 96(7):1911-1930.

(收稿日期:2016-03-20 修回日期:2016-05-23)