

## 环孢霉素 A 对缺氧大鼠右心室心肌 CaN 活性及血浆 NO、一氧化氮合酶、内皮素 -1 水平的影响

谭建新<sup>1</sup>, 刘郴州<sup>1</sup>, 揭育丽<sup>2</sup>, 王 优<sup>1</sup>, 黄宇戈<sup>1</sup> (广东医学院附属医院<sup>1</sup> 儿科,<sup>2</sup> 同位素科, 广东 湛江 524023)

**摘要:** 目的 通过研究钙调神经磷酸酶 (CaN) 抑制剂对缺氧大鼠右心室心肌 CaN 活性及血浆一氧化氮合酶 (iNOS)、NO、内皮素 -1 (ET-1) 水平的影响, 探讨 CaN 在慢性缺氧性右心室心肌肥厚中的作用。方法 将大鼠置于氧浓度为 (10.0±0.5)% 的大型玻璃舱中, 每天 24 h 缺氧, 持续 7 d, 建立大鼠慢性缺氧模型。实验大鼠分 3 组, 即正常组、缺氧组、环孢霉素 (CsA) 处理组, 每组各 8 只。缺氧组持续缺氧 14 d, 处理组在缺氧的同时腹腔内注射 CsA (20 mg/kg·d)。第 14 天处死大鼠, 取血, 测 NO、ET-1、iNOS 水平, 分离心脏称质量, 并留右心室测 CaN 活性水平。结果 (1) 缺氧组右室与左室加室间隔的质量比、右室质量 / 体质量均明显高于正常组和 CsA 处理组 ( $P < 0.01$ )。 (2) 缺氧组右心室心肌 CaN 活性明显高于正常组 ( $P < 0.01$ ), 而 CsA 处理组则明显低于缺氧组 ( $P < 0.01$ )。 (3) 缺氧组血浆 NO、iNOS 水平明显低于正常组 ( $P < 0.01$ ), ET-1 水平则明显高于正常组 ( $P < 0.01$ ); 而 CsA 处理后血浆 NO、iNOS 水平明显高于缺氧组 ( $P < 0.01$ ), ET-1 水平则明显低于缺氧组 ( $P < 0.01$ ), 与正常组之间差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 CaN 抑制剂 CsA 对心肌肥厚的抑制作用可能与抑制 CaN 活性, 调节血 NO、iNOS 和 ET-1 水平, 改善肺动脉压力等有关。

**关键词:** 缺氧; 心肌肥厚; 钙调神经磷酸酶; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 内皮素 -1; 环孢霉素 A

中图分类号: R392.2; R342.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)06-0656-03

## Effect of cyclosporine A on myocardial calcineurin activity of the right ventricle and plasma NO, nitric oxide synthase and endothelin-1 levels in rats with chronic hypoxia

TAN Jian-xin<sup>1</sup>, LIU Chen-zhou<sup>1</sup>, JIE Yu-li<sup>2</sup>, WANG You<sup>1</sup>, HUANG Yu-ge<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, <sup>2</sup>Department of Isotope, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

**Abstract:** **Objective** To study the role of calcineurin in the progression of right ventricle myocardial hypertrophy in rats exposed to chronic hypoxia by examining the effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on the activation of calcineurin and plasma levels of nitric oxide (NO), NO synthase, and endothelin-1 (ET-1). **Methods** Rat models of right ventricle myocardial hypertrophy were established by exposing the rats to chronic hypoxia in 10.0%±0.5% O<sub>2</sub> for 7 d. The 24 rat models were assigned into normoxic group, hypoxic group and cyclosporin A (CsA)-treated hypoxic group. The rats in normoxic group were kept under normoxic environment, while those in the other 2 groups were subjected to further hypoxic treatment for 14 d, with the rats in CsA group receiving intraperitoneal CsA injection at 20 mg/kg on a daily basis. On day 21 of the experiment, all the rats were killed to collect the hearts for measuring the weight ratio of the right ventricle to the left ventricle and interventricular septum [RV/(LV+S)], as well as the right ventricle to body weight ratio (RV/BW); blood samples were also drawn from the ventricles for measuring plasma NO, iNOS, and ET-1 levels, with the ventricular myocardial [Ca<sup>2+</sup>], and the activity of calcineurin also determined. **Results** The RV/(LV+S) and RV/BW were significantly higher in hypoxic group than those of the normoxic and CsA groups ( $P < 0.01$ ); the right ventricular myocardial [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in CsA group was significantly higher than that in the other two groups ( $P < 0.01$ ). In comparison with the normoxic group, the right ventricular myocardial calcineurin activity was significantly increased in the hypoxic group. CsA treatment significantly suppressed calcineurin activity ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Calcineurin possibly plays a role in the progression of right ventricle myocardial hypertrophy in rats with chronic hypoxia. Blocking L-type Ca<sup>2+</sup> channels with CsA effectively prevents the development of myocardial hypertrophy possibly by inhibiting calcium influx and suppressing calcineurin activity.

**Key words:** hypoxia; cardiac hypertrophy; calcineurin; nitric oxide synthase; nitric oxide; endothelin-1; amlodipine A

缺氧、肺部炎症、肺发育不良等是致右心室心衰的常见原因, 其中缺氧是最常见的原因。许多研究认

为慢性缺氧致肺动脉高压是引起右心室肥厚的主要原因, 肺动脉高压的发病机制与一氧化氮 (NO) 和内皮素 -1 (ET-1) 的调节失衡有关。本研究观察抑制钙调神经磷酸酶 (CaN) 活性后周围血 NO、ET-1 及一氧化氮合酶 (iNOS) 的变化, 旨在探讨钙 CaN 在慢性缺氧性右心室心肌肥厚中的作用。

收稿日期: 2004-02-23

基金项目: 广东省自然科学基金 (020566)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (020566)

作者简介: 谭建新 (1966-), 男, 硕士研究生, 副教授、副主任医师,

E-mail: isaac\_t@gdmc.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级SD大鼠,8周龄,体质量(217.18±19.11)g,雌雄不拘,购自广东医学院实验动物中心。

1.1.2 仪器和试剂 CYK-50型数字控氧仪及电磁阀购自杭州立华仪器有限公司,Optima7m LE-80K超速离心机购自美国BECKMAN公司(湛江海洋大学分析测试中心提供),PE LS-50B荧光分光光度计购自美国PE公司,CaN活性测定试剂盒购自德国CALBIOCHEM公司,环孢霉素A(CsA)为Novartis公司产品,ET-1测定试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供,NO和iNOS试剂盒由南京建成生物制品公司提供。

### 1.2 慢性持续缺氧致右心室肥大动物模型的建立

参照文献[1]的方法建立SD大鼠慢性缺氧致心肌肥厚模型。将大鼠每天24h置于含氧浓度(10.0±0.5)%、二氧化碳分压<0.2%的大型玻璃罐(自制)中,常规饲养。7d可出现稳定的心肌肥大。模型建立成功的标准:右心室/(左心室+室间隔)[RV/(LV+S)]、右心室/体质量(RV/BW)的比值增高,右心室心钠素水平增高。

### 1.3 实验分组和处理

实验大鼠24只,分3组:缺氧组、CsA处理组和正常对照组,每组各8只。缺氧组持续缺氧连续14d;CsA处理组持续缺氧,且每天腹腔注射CsA(20mg/kg·b.w.);正常对照组于常氧下喂养。14d后用10%乌拉坦(1ml/100g·b.w.)腹腔麻醉,3组同时处死动物,快速取心脏,同时取心室内血,待测NO、ET-1和iNOS。分离右心室及左心室和室间隔,并记录RV/(LV+S)、RV/BW比值,然后迅速将右心室标本液氮保存以备用,进一步作CaN活性测定。

### 1.4 CaN活性检测

取50mg右心室组织置匀浆器中,在液氮条件下研磨成粉,加入0.25ml含蛋白酶抑制剂lysis缓冲液继续匀浆。匀浆液4℃条件下150000×g离心45min,上清液经去盐凝胶树脂过滤除去样本中游离的磷酸盐;按照CaN活性测定试剂盒说明,分别加样,于30℃反应30min,然后每管加100μl GREEN™终止反应,用酶标仪分别测出D(620),对照标准曲线求出相应的磷酸盐含量;按照试剂盒所提供的公式分别求出CaN相对应的磷酸盐的含量,取两者的平均值,以每g心肌组织CaN相对应的磷酸盐含量表示该右心室组织CaN活性。

### 1.5 血清NO、ET-1、iNOS测定

严格按照试剂盒要求,采用比色法测定硝酸盐和

亚硝酸盐水平,间接测定NO浓度;免疫放射方法测定ET-1水平;分光光度计检测iNOS活性。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS软件处理数据,行One-Way ANOVA分析,两两比较用SNK法。

## 2 结果

### 2.1 缺氧大鼠右心室肥厚程度的改变及CsA的作用

从表1可见,大鼠慢性持续缺氧14d后缺氧组RV/(LV+S)、RV/BW较正常组均明显增高( $P<0.01$ );而CsA处理组上述指标较缺氧组明显降低( $P<0.01$ ),且与正常组差别无统计学意义( $P>0.05$ )。

表1 各组大鼠RV/(LV+S)、RV/BW的变化( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Changes of RV/(LV+S), RV/BW in the 3 groups

(n=8, Mean±SD)		
Group	RV/(LV+S) (g/g)	RV/BW(mg/g)
Normoxic	0.24±0.03	0.48±0.07
Hypoxic	0.37±0.04*	0.73±0.08*
CsA-treated hypoxic	0.25±0.03#	0.51±0.07#

\* $P<0.01$  vs normoxic group; # $P<0.01$  vs hypoxic group. RV: Right ventricle; LV: Left ventricle; S: Interventricular septum; BW: Body weight

### 2.2 缺氧大鼠右心室心肌CaN活性及CsA的作用

从表2可见,大鼠慢性持续缺氧14d后缺氧组CaN活性较正常组均明显增高( $P<0.01$ );而CsA处理后CaN活性明显低于缺氧组( $P<0.01$ ),且与正常组差别无统计学意义( $P>0.05$ )。

表2 CsA对缺氧大鼠右心室心肌CaN活性的影响( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Effect of CsA on myocardial calcineurin activity of the right ventricle of rats with chronic hypoxia( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Group	CaN
Normoxic	0.96±0.24
Hypoxic	2.29±0.49*
CsA-treated hypoxic	0.99±0.23#

CaN was measured in μmol in equivalence to phosphate per gram of myocardium. \* $P<0.01$  vs normoxic group; # $P<0.01$  vs hypoxic group.

CsA: Amlodipine

### 2.3 缺氧大鼠血浆NO、ET-1、iNOS水平变化及CsA的作用

从表3可见,大鼠慢性持续缺氧14d后缺氧组血浆NO、iNOS水平明显低于正常组( $P<0.01$ ),ET-1水平则明显高于正常组( $P<0.01$ );而CsA处理后血浆NO、iNOS水平明显高于缺氧组( $P<0.01$ ),ET-1水平则明显低于缺氧组( $P<0.01$ ),与正常组差别无统

计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 3 CsA 对缺氧大鼠血浆 ET-1、NO、iNOS 水平的影响  
( $n=8, \bar{x}\pm s$ )

Tab.3 Effect of CsA on plasma levels of ET-1, NO, iNOS in rats with chronic hypoxia ( $n=8, \text{Mean}\pm\text{SD}$ )

Group	ET-1 (pg/ml)	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	iNOS (U/ml)
Normoxic	4.80 $\pm$ 8.56	11.05 $\pm$ 2.37	11.92 $\pm$ 2.59
Hypoxic	96.97 $\pm$ 10.10*	4.58 $\pm$ 1.40*	5.04 $\pm$ 1.53*
CsA-treated hypoxic	46.19 $\pm$ 8.63 <sup>#</sup>	9.98 $\pm$ 2.41 <sup>#</sup>	10.82 $\pm$ 2.44 <sup>#</sup>

\* $P<0.01$  vs normoxic group; <sup>#</sup> $P<0.01$  vs hypoxic group

### 3 讨论

CaN 是受  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素 (CaM) 调节的多功能信号酶, 存在于多种细胞内。通过转基因动物发现了 CaN 信号通路介导心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  增加导致心肌细胞肥大这一重要过程, 并在增加左心室后负荷和心肌培养等实验中得到证实。心肌细胞内钙离子浓度升高通过  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 激活 CaN, CaN 通过去磷酸化胞质中的转移核因子 NFAT3, NFAT3 进入细胞核与心肌的锌指转录因子 GATA-4 相互作用启动心肌肥大基因表达, 最后导致心肌肥大。而特异性抑制剂 CsA、FK-506 分别与 CsA 受体、FKBP12 结合抑制 CaN 的活性, 从而抑制心肌肥大<sup>[2,3]</sup>。本研究观察慢性缺氧致大鼠右心室心肌肥厚, CaN 活性增加, 与正常组比较, 差异有显著性意义, CsA 处理可抑制慢性缺氧所致右心室心肌肥厚, 说明  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM/CaN 信号通路可能参与了慢性缺氧致右心室心肌肥大的发病过程。

慢性缺氧引起肺动脉高压是右心室肥厚的主要原因。在肺动脉高压形成机制中, NO、iNOS 和 ET-1 的失衡起了重要作用<sup>[4-6]</sup>。近年 CaN 信号通路在调节 iNOS 和 ET-1 表达中的作用受到广泛重视。Kim 等<sup>[7-9]</sup>研究显示 CaN 降解不同组织和细胞内 I $\kappa$ B, 激活 NF- $\kappa$ B, 后者发生核转移诱导心肌、上皮细胞、巨噬细胞等的 NOS 表达 (包括 eNOS、iNOS), 从而合成 NO 增加; 而 CsA 则可抑制这一通道, 导致 NO 合成减少。Morimoto 等<sup>[10]</sup>研究发现肾上腺素等  $\beta$  受体激动剂引起心肌 ET-1 表达增加由 CaN/GATA4 介导, CaN 抑制剂可拮抗 ET-1 表达。本研究观察到慢性缺氧时 ET-1 水平明显高于对照组, 而 iNOS、NO 明显低于对照组, 此可能为缺氧时肺动脉压力增高的原因; 而 CsA 处理后大鼠周围循环 NO、iNOS 水平增高接近正常水平, ET-1 则降低, 此可导致肺动脉压力下

降, 而肺动脉压力的下降有利于心肌肥厚的改善, 所以研究结果提示 CaN 活性抑制剂 CsA 对心肌肥厚的抑制作用可能与调节血 NO、iNOS 和 ET-1 水平、改善肺动脉压力等有关。但是血中 NO、iNOS 和 ET-1 水平的改变与肺血管内皮细胞内分泌还是与心肌分泌有关, 有待进一步阐明。另外, 本实验未直接测定肺动脉压力, 肺动脉压力下降程度及其与右心室肥厚的改变亦需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Rouet-Benzineb P, Eddahibi S, Raffestin B, *et al.* Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(9): 1697-708.
- [2] 符民桂, 许松, 庞永正, 等. 钙调神经磷酸酶介导碱性成纤维细胞生长因子诱导的大鼠心肌细胞肥大 [J]. *北京医科大学学报*, 2001, 33(1): 38-41.
- [3] Fu MG, Xu S, Pang YZ, *et al.* Role of calcineurin in signal transduction of bFGF-induced cardiac myocyte hypertrophy of rats [J]. *J Peking Univ (Health Sci)*, 2001, 33(1): 38-41.
- [4] Sussman MA, Lim HW, Gude N, *et al.* Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition [J]. *Science*, 1998, 281(5383): 1690-3.
- [5] Fagan JM, Rex SE, Hayes-Licitra SA, *et al.* L-arginine reduces right heart hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254(1): 100-3.
- [6] Jasmin JF, Cernacek P, Dupuis J, *et al.* Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2003, 105(6): 647-53.
- [7] Michel RP, Langleben D, Dupuis J, *et al.* The endothelin system in pulmonary hypertension [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003, 81(6): 542-54.
- [8] Kim Y, Moon JS, Lee KS, *et al.*  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates the expression of iNOS through I $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B activity in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(3): 695-703.
- [9] Ritter O, Schuh K, Brede M. AT2 receptor activation regulates myocardial eNOS expression via the calcineurin-NF-AT pathway [J]. *FASEB J*, 2003, 17(2): 283-5.
- [10] Bengoechea-Alonso MT, Pelacho B, Osés-Prieto JA, *et al.* Regulation of NF- $\kappa$ B activation by protein phosphatase 2B and NO, via protein kinase A activity, in human monocytes [J]. *Nitric Oxide*, 2003, 8(1): 65-74.
- [11] Morimoto T, Hasegawa K, Wada H, *et al.* Calcineurin-GATA4 pathway is involved in  $\beta$ -adrenergic agonist-responsive endothelin-1 transcription in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(14): 276-81.