

氟西汀对大鼠右心衰竭肺动脉高压的影响及机制探讨^{*}

冉 迅¹, 赵建洵¹, 聂 虎², 陈玉成³

1. 成都上锦南府医院暨四川大学华西医院上锦分院 心脏内科(成都 611743); 2. 四川大学华西医院 急诊科(成都 610041);
3. 四川大学华西医院 心脏内科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨氟西汀干预肺动脉压对右心衰竭大鼠心肌组织轴索生长抑制因子(Nogo)和胶原的影响。**方法** 将31只SD雄性大鼠随机分为治疗组、右心衰竭组、对照组。治疗组和右心衰竭组一次性腹腔注射野百合碱60 mg/kg诱发肺动脉高压致右心衰竭,对照组腹腔注射等量生理盐水。治疗组大鼠腹腔注射21 d后给予氟西汀10 mg/(kg·d)灌胃,直到第42天。右心衰竭组和对照组给予等量生理盐水灌胃。HE染色观察各组大鼠肺动脉和右心室心肌组织,Masson染色观察右心室心肌组织胶原生成情况。采用实时荧光定量PCR检测各组大鼠心肌组织Nogo-A、Nogo-B、I型胶原和Ⅲ型胶原mRNA的表达,同时采用Western blot方法对Nogo蛋白进行半定量分析。**结果** 氟西汀干预后,HE染色可见肺动脉狭窄明显减轻,右心室心肌组织病变减轻,Masson染色示右心室心肌组织胶原合成减少。实时荧光定量PCR结果显示,与右心衰竭组比较,治疗组心肌组织I型和Ⅲ型胶原mRNA表达下降,Nogo-A mRNA降低,Nogo-B mRNA上升(P 均 <0.05)。Western blot结果显示,与右心衰竭组比较,治疗组心肌组织Nogo-A蛋白表达降低,Nogo-B1蛋白表达增加(P 均 <0.05),Nogo-B2蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。**结论** Nogo可能影响右心衰竭的胶原合成,部分参与心肌纤维化。

【关键词】 氟西汀 右心衰竭 Nogo 心肌纤维化

Effects of Fluoxetine on Nogo Expression and Collagen Production with Decrease of Pulmonary Artery Pressure in Rats with Right Ventricular Failure RAN Xun¹, ZHAO Jian-xun¹, NIE Hu², CHEN Yu-cheng³. 1. Department of Cardiology, Chengdu Shangjin Nanfu Hospital & Shangjin Hospital, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 611743, China; 2. Department of Emergency Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Cardiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of fluoxetine on neurite growth inhibitor (Nogo) expression and collagen production of cardiac tissue in rats with right heart failure and pulmonary hypertension. **Methods** Thirty one male SD rats were randomly divided into the treatment group, right heart failure group and normal control group. The rats in the treatment group and right heart failure group received intraperitoneal injection of monocrotaline (MCT, 60 mg/kg) to induce pulmonary hypertension and right heart failure. After 21 days, the rats in treatment group were given fluoxetine of 10 mg/(kg·d) by gavage per day for 21 days, the rats in the other two groups were given saline. HE staining was used to observe the pulmonary artery and right ventricular myocardial tissue in rats. The collagen formation in right ventricular myocardium was observed by Masson staining. The expressions of Nogo-A, Nogo-B, type I collagen and type Ⅲ collagen mRNA in myocardium were measured by real-time fluorescence quantitative PCR, while the semi quantitative measurement of Nogo protein level was detected by Western blot. **Results** After the intervention of fluoxetine, pulmonary artery stenosis was significantly reduced, myocardial tissue lesion decreased, collagen synthesis decreased in right ventricular myocardium. RT-PCR showed that mRNA of Nogo-A decreased, and mRNA of Nogo-B increased ($P<0.05$). Western blot showed that the expression of Nogo-A protein decreased, while Nogo-B1 protein expression increased ($P<0.05$), Nogo-B2 expression was not significantly changed ($P>0.05$). **Conclusion** Nogo may affect the collagen synthesis in right heart failure, and partly involved in myocardial fibrosis.

【Key words】 Fluoxetine Right heart failure Nogo Myocardial fibrosis

肺动脉高压和右心衰竭的治疗比较困难,目前慢性心力衰竭(CHF)已成为心血管疾病最后的主

要死亡原因^[1]。在各种制作肺动脉高压导致的右心衰竭模型中,肺组织中过度表达的血清素(5-HT)和血清素转运体(5-HTT)参与肺动脉高压的病理过程^[2-3]。氟西汀是一种5-HTT抑制剂,主要用于

^{*} 国家自然科学基金(No.81270227)资助

抗抑郁和神经性厌食症的治疗,众多文献报道,小剂量的氟西汀降低肺动脉压力不明显,大剂量氟西汀[10 mg/(kg·d)]能显著抑制肺组织中过表达的 5-HTT,明显降低野百合碱诱导的肺动脉压力^[4-7],从而减轻心力衰竭。在心脏组织,5-HT 和 5-HTT 表达甚微,并且其功能不起主要作用^[8-9],因此该药对心脏组织本身的病理生理状态影响较小。轴索生长抑制因子(neurite growth inhibitor, Nogo)属于网状蛋白(reticulon protein, RTN)家族第四成员。由于启动子和剪切方式不同,Nogo 编码 3 种蛋白质,即 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C。BULLARD 等^[10]的研究显示在左心衰竭时,Nogo-A mRNA 明显增加,Nogo-B/C mRNA 降低,对心力衰竭进行有效治疗后,Nogo-A mRNA 下降,Nogo-B/C mRNA 增加。然而,该研究并未涉及右心系统。故本实验选用氟西汀降低肺动脉压,治疗心力衰竭,探讨 Nogo 在右心功能改善后的变化情况和对胶原合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为四川大学实验动物中心提供的 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠,体质量为 200~250 g。Masson 三色染色试剂盒由凯基生物科技有限公司提供,野百合碱由 Sigma-Aldrich 公司提供,SABC 免疫组织化学试剂盒由博士德生物技术公司提供,小鼠抗增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体和兔多克隆 Nogo(A+B)抗体由 Abcam 公司提供,牛血清白蛋白(BSA)由荣海试剂公司提供,Trizol 由 Invitrogen 公司提供,BCA 蛋白提取试剂盒由碧云天生物研究所提供,Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 由 MBI 公司提供,Taq DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液(10×)、MgCl₂ 溶液(25 mmol/L)由博大泰克生物基因公司提供,DNA 相对分子质量标准(DNA Marker)由 TIANGEN 公司提供。BL-420E 生物机能实验系统由泰盟科技发展有限公司提供,免疫组化图像采集分析系统由 Olympus 提供,离心机 5702 由 Eppendorf 提供,图像分析系统和凝胶成像系统由 BIO-RAD 公司提供。

1.2 实验分组及处理

将 31 只 SD 雄性大鼠随机分为 3 组:治疗组($n=10$),野百合碱 60 mg/kg 一次性腹腔注射 21 d 后开始以 10 mg/(kg·d)氟西汀灌胃,直到第 42

天。右心衰竭组(CHF 组)($n=13$),野百合碱 60 mg/kg 一次性腹腔注射,21 d 后以与治疗组相等体积的生理盐水灌胃,每天一次,28 d 后按右心衰竭判断标准^[11]判断是否发生心力衰竭,直到第 42 天。对照组($n=8$),等剂量生理盐水一次性腹腔注射 21 d 后以与治疗组相等体积的生理盐水灌胃,每天一次,直到第 42 天。

1.3 HE 染色

干预结束时(第 42 天)颈椎脱臼法处死各组大鼠,开胸取出心脏和肺动脉,并分离右室游离壁和左心室,均包埋成石蜡块,4 μm 厚度切片,HE 染色观察组织。

1.4 Masson 染色

右心室心肌组织切片脱蜡处理至水。滴加 1 滴(50~100 μL)Masson 复合染色液染色 5 min;蒸馏水冲掉染液;滴加 1 滴(50~100 μL)磷钼酸染色 5 min,甩干,不需洗涤;直接滴加 1 滴(50~100 μL)苯胺蓝染色 5 min,蒸馏水稍微冲洗;滴加 1 滴(50~100 μL)分化液分化 30~60 s,连续两次。95%酒精、无水酒精脱水,透明,封固。

1.5 实时荧光定量 PCR

取出液氮保存的右心室游离壁心肌组织并匀浆破碎心肌组织,Trizol 法行右心组织总 RNA 提取。采用 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 系统行 RNA 逆转录反应,合成 cDNA,并在 PCR 仪上进行扩增,通过下列合成引物行荧光定量 PCR 检测心脏组织 I 型胶原、Ⅲ型胶原、Nogo-A、Nogo-B mRNA 的表达。I 型胶原上游引物:5'-CCCTGAAGTCAGCTGCAT-3',下游引物:5'-ATATTCTTCTGGGCAGAA-3';Ⅲ型胶原上游引物:5'-CCACCCTGAACTCAAGAGTGG-3',下游引物:5'-CCATCCTCTAGAACTGTGTAAAGTG-3';Nogo-A 上游引物:5'-CTCAGTGGATGAGACCCTTT-3',下游引物:5'-GTTACCAAGGTATCCATGTTCT-3';Nogo-B 上游引物:5'-ACGACGAGGACCTAGAGGAAC-3',下游引物:5'-TGTAGGC CGTTACACTGACAAT-3';内参 β-actin 上游引物:5'-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3',下游引物:5'-AAAGAAAGGGTGTA AACGCA-3'。胶原扩增反应条件:94℃ 5 min,然后进入 PCR 循环,94℃ 预变性 30 s,分别 60℃、60℃、58℃、62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,循环 37 次后 72℃ 再延伸 7 min。Nogo 扩增反应条件:94℃ 2 min,然后进入 PCR 循环,94℃ 预变性 30 s,

分别 60℃、60℃、58℃、62℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,循环 45 次后72℃再延伸 7 min。引物合成由上海生物工程有限公司合成。以 2^{-ΔΔCt}表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.6 Western blot 检测 Nogo-A、Nogo-B 蛋白表达

采用 RIPA 溶解液提取右室心肌组织总蛋白，SDS-聚丙烯酰胺变性胶(SDS-PAGE)电泳法检测蛋白质，每份取 30 μg 蛋白样品，以 80 V 电压电泳 1 h直至染料条带进入分离胶，最后电压改为100 V，继续电泳 3 h,转移至 PVDF 膜。以 PBS-T 稀释液按 1：1 000 的比例稀释检测蛋白的一抗〔Nogo (A+B)〕(体积为 10 mL)后加入杂交盒，用封闭液按 1：20 000的比例稀释 HRP 标记的二抗(体积为 5 mL)后加入杂交盒，对胶片进行显色处理，凝胶图像处理系统分析，以目标条带相对内参蛋白 β-actin 的灰度值为各目的蛋白表达量。

1.7 统计学方法

正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，非正态分布计量资料以中位数(四分位间距)表示，计数资料用频数(百分比)表示。正态分布的计量资料两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用 *F* 检验，组间两两比较采用 SNK 检验；非正态分布计量资料组间比较采用秩和检验；计数资料组间比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中对照组大鼠体质量增加迅速，活动正常，耳朵色泽正常。CHF 组大鼠体质量增加缓慢，部分大鼠体质量甚至低于注射野百合碱前的体质量，活动明显减少，呼吸明显增快，均有不同程度的耳朵发绀等，实验过程中 3 只大鼠死亡。治疗组大鼠无心力衰竭表现，活动、呼吸均较 CHF 组好，但较对照组差，无耳朵发绀，实验过程中 1 只大鼠死亡。

2.2 HE 染色(肺动脉、右心室组织)和 Masson 染色(右心室组织)结果

结果见图 1、图 2。肺动脉 HE 染色结果显示，

CHF 组大鼠肺小动脉中膜显著增生，管腔变小，血管周围可见炎症细胞；治疗组显示经治疗后肺小动脉中膜增生减轻，管腔直径基本恢复正常，血管周围仍有炎症反应。心肌组织 HE 染色见 CHF 组心肌细胞肥大，间质增生和炎症细胞浸润明显；治疗组心肌细胞肥大减轻，但仍较对照组肥大，间质炎症减轻。Masson 染色中，心肌细胞染成红色，胶原染成蓝色。CHF 组心肌细胞间可见较多蓝色的胶原，细胞肥大明显，排列紊乱；治疗组心肌细胞间胶原明显减少。

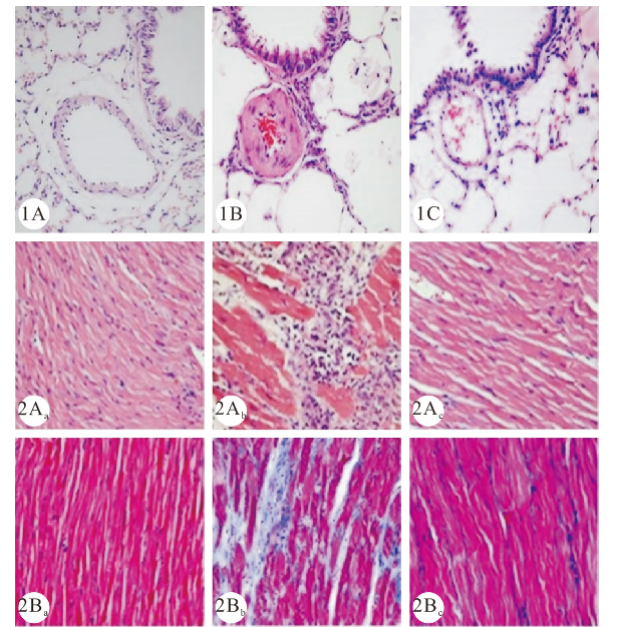


图 1 药物治疗后对 CHF 大鼠肺动脉病变的影响。HE ×40
图 2 药物治疗后对 CHF 大鼠右心室心肌组织的影响。×40
Fig 1 Effect of drug therapy on pulmonary artery lesion in CHF rats. HE ×40
Fig 2 Effects of drug therapy on the right ventricular myocardial tissue in CHF rats. ×40

1A: Control group; 1B: CHF group; 1C: Therapy group; 2A: HE staining; 2B: Masson staining; a: Control group; b: CHF group; c: Therapy group

2.3 实时荧光定量 PCR 检测大鼠心肌组织中 Nogo 和胶原的表达

结果见表 1。与 CHF 组比较，治疗组 *Nogo-A* mRNA 降低，*Nogo-B* mRNA 升高，I 型胶原和 III 型胶原 mRNA 表达均下降，差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。

Table 1 Expression of <i>Nogo</i> and collagen gene in myocardium of rats in each group [2 ^{-ΔΔCt} , median (P ₂₅ -P ₇₅)]			
Gene	Control group (n=8)	CHF group (n=10)	Therapy group (n=9)
<i>Nogo-A</i>	1.04 (0.92-1.11) *	2.06 (1.88-2.19) *	1.42 (1.35-1.56)
<i>Nogo-B</i>	1.03 (0.95-1.07) *	0.49 (0.37-0.59) *	0.79 (0.65-0.95)
Collagen I	1.23 (0.70-1.52) *	3.48 (3.14-3.97) *	2.04 (1.84-2.38)
Collagen III	1.19 (0.73-1.45) *	3.55 (3.10-4.08) *	2.18 (1.82-2.39)

* *P* < 0.05, vs. therapy group

2.4 Western blot 检测大鼠心肌组织中 Nogo 蛋白的表达

结果见图 3、表 2。与 CHF 组比较,治疗组 Nogo-A 蛋白降低,但高于对照组($P<0.05$);Nogo-B1 蛋白增加,但低于对照组($P<0.05$)。Nogo-B2 蛋白表达在 3 组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。

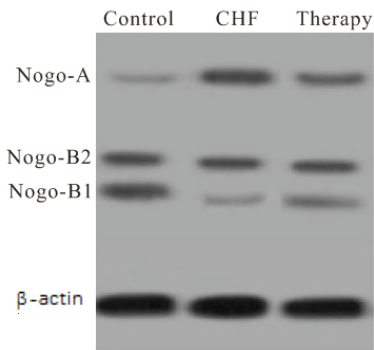


图 3 各组大鼠心肌组织 Nogo-A、Nogo-B1 和 Nogo-B2 蛋白的表达
Fig 3 Expressions of Nogo-A, Nogo-B1 and Nogo-B2 proteins in myocardium of rats

表 2 各组大鼠心肌组织中 Nogo-A、Nogo-B1 和 Nogo-B2 蛋白的表达量
Table 2 Expressions of Nogo-A, Nogo-B1 and Nogo-B2 proteins in myocardium of rats

Protein	Control group (n=8)	CHF group (n=10)	Therapy group (n=9)
Nogo-A	0.95±0.15*	1.42±0.31*	1.10±0.22
Nogo-B1	1.38±0.23*	0.38±0.08*	0.88±0.17
Nogo-B2	0.89±0.17	0.85±0.14	0.94±0.11

* $P<0.05$, vs. therapy group

3 讨论

目前对肺动脉高压和右心衰竭的治疗比较困难,通常对继发性肺动脉高压进行病因治疗,对原发性肺动脉高压则缺乏有效的治疗手段。肺动脉高压常继发性导致右心衰竭。右心衰竭是心脏和肺血管疾病的重要不良预后因子^[12]。心室重塑参与了右心衰竭的病理生理过程。

心肌纤维化是心室重塑的表现之一^[13-15]。病理条件下,心脏成纤维细胞合成和分泌胶原增多是心肌纤维化的病理基础。心脏的胶原主要是 I 型胶原,其含量增加反映心肌纤维化。BULLARD 等^[10]研究提示 Nogo 可能与心力衰竭有关,Nogo-A 可能参与心肌纤维化。Nogo-A mRNA 和蛋白在肺动脉高压右心室衰竭后表达增加,心力衰竭改善后表达下降,同时胶原合成呈相似的变化,可能因为肺动脉高压下,右心室负荷加重,心肌细胞和心肌间质细胞表达 Nogo-A 增多,后者以旁分泌的方式作用

于心脏各种细胞组织的 RhoA/ROCK 通路,导致心肌细胞肥大、凋亡、炎症反应,各种炎症介质促进心脏成纤维细胞合成和分泌胶原,使心脏发生适应性改变以适应增加的压力负荷,最终适应性改变失去代偿,使心力衰竭加重。

本研究结果显示,与 CHF 组比较,药物治疗后反映心肌纤维化的指标 I 型胶原和 III 型胶原 mRNA 降低,同时 Nogo-A mRNA 和蛋白合成下降,Nogo-B mRNA 和蛋白上升,可能因为肺动脉压力降低,心室重塑减轻,心室应激反应减轻,胶原合成和分泌减少,同时还可能与心脏组织的心肌细胞和间质细胞合成和分泌 Nogo-A 减少,对 ROCK 通路的作用减弱,胶原合成减少有关。本研究认为可能为 Nogo-A 的下调使 ROCK 活化减少,从而使心肌细胞和心脏间质细胞合成和分泌胶原较少,说明 Nogo-A 在心脏可能有致纤维化作用。

KRITZ 等^[16]报道,利用腺病毒表达增强载体增加病变组织的 Nogo-B,能减轻急性或慢性损伤对血管壁的损害。进一步研究表明,发挥血管保护功能的主要是 Nogo-B1,而 Nogo-B2 基本无变化,Nogo-B2 对血管的作用目前还不清楚^[17]。尽管 Nogo-B1 对血管有保护作用,但不足以对抗肥大的心肌对血管的挤压和周围炎症对血管的损伤,最终导致破坏血管平衡状态的物质增多,血管内皮损害,Nogo-B1 合成和分泌减少,心力衰竭改善后心肌压力负荷和容量负荷减轻,心脏间质炎症减轻,心脏间质内血管内皮功能恢复,Nogo-B1 合成和分泌增加,促进血管生成和组织修复,恢复血流,使受损的心肌细胞恢复功能,减轻间质炎症,减轻心肌纤维化。Nogo-B1 的血管保护功能与其特异性受体 Nogo-BR 有关^[18],但目前对 Nogo-BR 的作用研究较少。

Nogo 功能多种多样,如抑制神经轴突再生,参与血管调控、抑制肿瘤生长,参与炎症反应等,可能还通过其它通路介导心力衰竭的病理生理过程,具体机制需在细胞和信号转导水平进行干预和研究。总之,随着对 Nogo 在心血管中的作用及其机制研究的不断深入,Nogo 在心血管领域有更为广阔的研究和应用前景。

参 考 文 献

[1] MANN DL, BRISTOW MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*, 2005, 111(21): 2837-2849.
[2] GUIGNABERT C, RAFFESTIN B, BENFERHAT R, *et al*. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses

- monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation*, 2005, 111(21): 2812-2819.
- [3] MACLEAN MR, DEUCHAR GA, HICKS MN, *et al.* Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene; effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 2004, 109(17): 2150-2155.
- [4] WANG HM, WANG Y, LIU M, *et al.* Fluoxetine inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling involved in inhibition of RhoA-Rho kinase and Akt signalling pathways in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(11): 1506-1515.
- [5] ZHU SP, MAO ZF, HUANG J, *et al.* Continuous fluoxetine administration prevents recurrence of pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(8): e1-e5[2016-03-25]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1681.2009.05181.x/abstract>; jsessionid = 69561A4C354DEB8E48F2C9A168C65826.f04t02. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05181.x.
- [6] LIU Y, LI M, Warburton RR, *et al.* The 5-HT transporter transactivates the PDGFBeta receptor in pulmonary artery smooth muscle cells. *FASEB J*, 2007, 21(11): 2725-2734.
- [7] GUILLUY C, EDDAHIBI S, AGARD C, *et al.* RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension; role of 5-HT signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(12): 1151-1158.
- [8] YUSUF S, AL-SAADY N, CAMM AJ. 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation; how significant is this piece in the puzzle. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, 14(2): 209-214.
- [9] LEVY FO, QVIGSTAD E, KROBERT KA, *et al.* Effects of serotonin in failing cardiac ventricle; signalling mechanisms and potential therapeutic implications. *Neuropharmacology*, 2008, 55(6): 1066-1071.
- [10] BULLARD TA, PROTACK TL, AGUILAR F, *et al.* Identification of Nogo as a novel indicator of heart failure. *Physiol Genomics*, 2008, 32(2): 182-189.
- [11] HARDZIYENKA M, CAMPION ME, DE BRUIN-BON R, *et al.* Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat. *J Am Soc Echocardiography*, 2006, 19(10): 1272-1279.
- [12] HADDAD F, COUTURE P, TOUSIGNANT C, *et al.* The right ventricle in cardiac surgery, a perioperative perspective: II. Pathophysiology, clinical importance, and management. *Anesth Analg*, 2009, 108(2): 422-433.
- [13] SCHWARTZ SM, DUFFY JY, PEARL JM, *et al.* Cellular and molecular aspects of myocardial dysfunction. *Crit Care Med*, 2001, 29(10 Suppl): S214-S219.
- [14] COHN JN, FERRARI R, SHARPE N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications; a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 35(3): 569-582.
- [15] CLARKE M, BENNETT M, LITTLEWOOD T. Cell death in the cardiovascular system. *Heart*, 2007, 93(6): 659-664.
- [16] KRITZ AB, YU J, WRIGHT PL, *et al.* *In vivo* modulation of Nogo-B attenuates neointima formation. *Mol Ther*, 2008, 16(11): 1798-1804.
- [17] PAN JW, ZHENG X, YANG PY, *et al.* Different expressions of Nogo-B1 and Nogo-B2 in mouse heart microvascular endothelial cell dysfunction induced by lysophosphatidylcholine. *Microvasc Res*, 2006, 72(1/2): 42-47.
- [18] MIAO RQ, GAO Y, HARRISON KD, *et al.* Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(29): 10997-11002.

(2016-06-30 收稿, 2016-09-29 修回)

编辑 余琳