

## 西地那非对慢性心衰大鼠左室功能的影响

高辉德,邵东华,束微微,杭黎华,陈 正

(江苏大学附属人民医院麻醉科,江苏 镇江 212001)

**[摘要]** 目的:探讨西地那非对慢性心衰大鼠左室功能及对血清中转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和心肌组织中羟脯氨酸(Hyp)含量的影响。方法:雌性SD大鼠随机分为对照组、心衰组、西地那非治疗组,每组7只。对照组大鼠为正常大鼠;心衰组腹腔注射阿霉素制作心衰模型;西地那非治疗组为心衰造模成功后给予西地那非 21 mg/(kg·d)灌胃,连续4周;心衰组与对照组大鼠给予安慰剂(1 ml 蒸馏水)灌胃,连续4周。造模10周后心脏超声分别测定各组大鼠左室舒张末期期内径(LVDd)、左室收缩末期内径(LVDs)、左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS);酶联免疫吸附试验(ELISA法)检测各组大鼠血清中TGF- $\beta$ 1的水平,Hyp试剂盒检测各组大鼠左室心肌组织中胶原蛋白的含量。结果:心衰组与对照组和西地那非治疗组比较,LVDs、LVDd及血清中TGF- $\beta$ 1水平明显升高( $P < 0.01$ );EF、FS明显降低( $P < 0.01$ );心衰组大鼠左室心肌组织Hyp含量明显升高,与对照组相比, $P < 0.01$ ,与治疗组相比, $P < 0.05$ 。结论:西地那非可改善慢性心衰大鼠的左室舒缩功能,降低血清TGF- $\beta$ 1水平和减少心肌组织中胶原的沉积。

**[关键词]** 西地那非;慢性心衰;左室功能;转化生长因子- $\beta$ 1;羟脯氨酸

**[中图分类号]** R541.6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)04-471-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130410

## Effect of sildenafil citrate on left ventricular function in rats with chronic heart failure

Gao Huide, Shao Donghua, Shu Weiwei, Hang Lihua, Chen Zheng

(Department of Anesthesiology, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of sildenafil citrate on left ventricular function and the levels of serum TGF- $\beta$ 1 and hydroxyproline(Hyp) content of myocardial tissue in rats with chronic heart failure (CHF). **Methods:** Female SD rats were randomly divided into the control group, the CHF group and the CHF + sildenafil treated group ( $n=7$ ). The control rats derived from the normal rats; the CHF model rats were induced by intraperitoneal injection of doxorubicin; the CHF + sildenafil group were received the sildenafil 21 mg/(kg·d) gavage for 4 weeks after the success of CHF model rats. The CHF group and the control group rats were received placebo (1 ml distilled water) gavage for 4 weeks. After 10 weeks, the LVDd, LVDs, EF and FS of rats were measured by transthoracic echocardiography; the levels of serum TGF- $\beta$ 1 were tested by ELISA reagent kit and collagen content in myocardial tissue was determined by hydroxyproline assay. **Results:** Compared with the control group and the treatment group, the LVDs, LVDd, and the levels of serum TGF- $\beta$ 1 of the CHF group were significantly increased ( $P < 0.01$ ) and the EF, FS were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); Hyp content in cardiac tissue of the CHF group was significant increased compared with the control group ( $P < 0.01$ ) and the treatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Sildenafil could improve the left ventricular function and reduce the deposition of collagen in the myocardial tissue and the levels of serum TGF- $\beta$ 1 in the rat models of CHF.

**[Key words]** sildenafil; chronic heart failure; left ventricular function; TGF- $\beta$ 1; hydroxyproline

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 471-474]

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是各种心脏疾病导致心脏收缩和(或)舒张功能不全的一种综合征,是多种心脏疾病的终末期表现,与心肌纤维化有着密切的关系。如何防治心肌纤维化已成为

目前研究的热点之一。研究表明转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)能够促进心肌成纤维细胞分裂和胶原沉积<sup>[1]</sup>,加重心肌纤维化发生。

西地那非由于其具有选择性扩张血管的作用而用于治疗男性勃起功能障碍和肺动脉高压<sup>[2]</sup>,但其对慢性心衰后左室舒缩功能的影响鲜见报道。已有的研究表明西地那非可抑制 TGF-β1 诱导的肺纤维母细胞向肌成纤维细胞转化<sup>[3]</sup>,减轻肺纤维化的发生,但其是否可通过降低 TGF-β1 水平而减轻心肌纤维化的程度,从而改善 CHF 大鼠左室舒缩功能并不清楚。本研究应用阿霉素制备心肌病心衰模型,观察西地那非对 CHF 左室功能的影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

雌性 SD 大鼠 21 只,由江苏大学实验动物中心提供[实验动物许可证号:SRXK(苏):2008-0024]。大鼠 TGF-β1 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 实验分组及模型建立

雌性 SD 大鼠随机分为对照组、心衰组和西地那非治疗组,每组 7 只。对照组大鼠为正常大鼠;心衰组腹腔注射阿霉素(批号 101003,浙江海正药业股份有限公司)4 mg/(kg·只)<sup>[4]</sup>,每周 1 次,共 6 周,累计总量 24 mg/(kg·只),制作心衰模型;西地那非治疗组为心衰造模成功后西地那非(批号 1183026,大连辉瑞制药有限公司)灌胃[21 mg/(kg·只)]<sup>[5]</sup>,连续 4 周;心衰组与对照组大鼠给予安慰剂(1 ml 蒸馏水)灌胃,连续 4 周。

##### 1.2.2 大鼠左室收缩功能检测

10 周后到达观察终点时动物以水合氯醛腹腔注射麻醉后,应用心脏超声(Agilent 5500 彩色超声心动图仪,探头 S12,美国 Agilent 公司)测量左室舒张末期内径 LVDd)、左室收缩末期内径(LVDs)、左室射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS),检测结束后内眦采血 2 ml 留待 TGF-β1 检测。10%氯化钾 1~3 ml 处死大鼠后迅速取出心脏,保留左心室(包括室间隔),将其置于液氮速冻后放入-80℃冰箱保存。

##### 1.2.3 大鼠 TGF-β1 的测定

干净试管收集后的血液,室温凝固 30 min 后,2℃~8℃放置过夜,以利 TGF-β1 的完全释放。离心 1 000 r/min × 15 min,收集血清后按说明书操作。以 CVXPT32 软件做标准曲线计算样本吸光值。

##### 1.2.4 心肌羟脯氨酸浓度的测定

羟脯氨酸(Hyp)是胶原蛋白的主要成分,而且动物组织中的 Hyp 几乎完全来自胶原。因此,心肌

组织内 Hyp 的含量可以代表胶原的水平,即反映心肌纤维化的程度。通过样本碱水解法测定 Hyp 含量(南京凯基生物工程公司),严格按试剂说明书操作,100 mg 心肌组织匀浆、消化、水解,取上清液,使用分光光度计在 550 nm 处测各管吸光度。

#### 1.3 统计学方法

使用 SPSS19.0 软件包进行统计学处理。数据均采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD-t 检验, $P \leq 0.05$  表明差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 各组大鼠心脏左室功能的变化

与对照组和治疗组比较,心衰组 LVDs、LVDd 明显升高,有显著差异( $P < 0.01$ );治疗组和对照组相比明显升高,有显著差异性( $P < 0.01$ ,图 1)。心衰组 EF、FS 明显降低,有显著差异性( $P < 0.01$ ),治疗组和对照组相比,EF、FS 明显降低,有显著差异性( $P < 0.01$ ,图 2)。

#### 2.2 各组大鼠血清 TGF-β1 含量

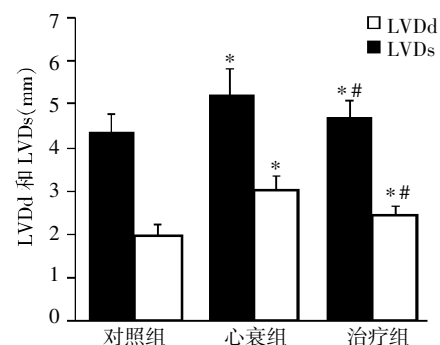
心衰组与对照组和治疗组相比明显升高,有显著差异( $P < 0.01$ ),治疗组与对照组相比明显升高,有显著差异( $P < 0.01$ ,图 3)。

#### 2.3 各组大鼠心肌组织 Hyp 含量

心衰组与对照组相比明显升高,有显著差异( $P < 0.01$ ),心衰组与治疗组相比有统计学意义( $P < 0.05$ , $P = 0.042$ ),治疗组与对照组比较无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 4)。

### 3 讨论

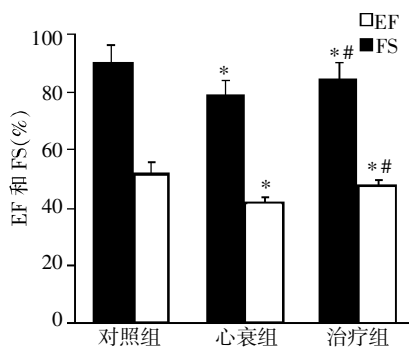
大量研究表明,在心肌肥厚及纤维化的发生发



与对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与心衰组比较,# $P < 0.01$ 。

图 1 3 组 LVDd、LVDs 比较

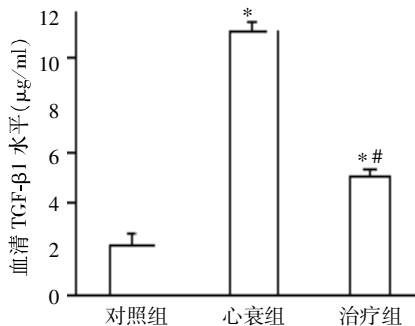
Figure 1 The comparison of capacitance of LVDd and LVDs in three groups



与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与心衰组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图 2 3 组 EF 和 FS 比较

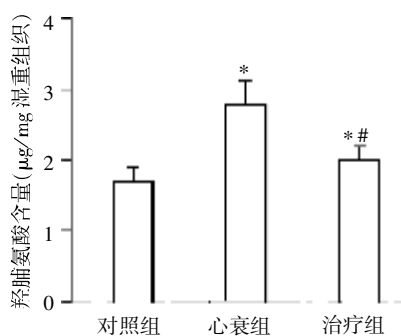
Figure 2 The comparison of percentage of EF and FS in three groups



与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与心衰组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图 3 3 组血清 TGF-β1 水平

Figure 3 The levels of serum TGF-β1 in three groups



与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与心衰组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

图 4 3 组心肌组织中羟脯氨酸的含量

Figure 4 The contents of hydroxyproline in myocardial tissue of three groups

展过程中,心肌组织内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和胶原的异常增多和过度沉积起了关键的作用。其特征是不成比例的胶原蛋白的沉积(主要是 I 型胶原)导致室壁僵硬增加和心室充盈受损<sup>[6]</sup>。TGF-β1 是 TGF-βs 最主要亚型,作为多效性因

子广泛存在于人体细胞之中,与多种细胞功能有关。其主要调节炎症反应,细胞外基质的沉积,细胞增殖、分化和生长<sup>[7]</sup>,刺激纤维母细胞增生和诱导细胞外基质分子的产生<sup>[8]</sup>。在心脏,TGF-β1 已被证明上调前胶原基因的表达和促进 ECM 组分的合成,从而导致心肌纤维化<sup>[9]</sup>,TGF-β1 过度表达的小鼠表现出显著的心肌肥厚并伴有间质纤维化<sup>[10]</sup>,全身性的和心肌组织内的 TGF-β1 水平在人类心肌病患者中也增加,如扩张型心肌病<sup>[11]</sup>、肥厚梗阻性心肌病<sup>[12]</sup>和主动脉狭窄心肌肥厚<sup>[13]</sup>等。

西地那非是磷酸二酯酶-5(PDE-5)特异性抑制剂,通过抑制 PDE-5 使细胞内 cGMP 浓度升高而激活蛋白激酶 G(PKG)导致细胞内  $Ca^{2+}$  外流减少而发挥扩血管作用<sup>[14]</sup>。实验动物数据显示,西地那非对未受损的心脏有预保护样效果,可保护心肌缺血再灌注损伤引起的心肌细胞坏死和凋亡,其发挥作用的机制是通过内源性和内皮型一氧化氮合成酶产生的氧化亚氮信号(NO)途径<sup>[15]</sup>,以及细胞外信号调节激酶依赖的 PKG 磷酸化作用<sup>[16]</sup>,还有线粒体 ATP 敏感的钾通道<sup>[17]</sup>,而且西地那非能保留肺血管内皮功能,并防止舒张性心力衰竭的肺血管重塑<sup>[18]</sup>。

在本的研究中,心衰组 LVDs、LVDd 显著升高,经西地那非治疗后 LVDs、LVDd 明显下降。心衰组 EF、FS 显著下降,经西地那非治疗后 EF、FS 均升高。因此,西地那非可降低左室收缩和舒张末期容积,改善左室的射血功能,提高左室的短轴缩短率而增加室壁顺应性。Bishuk 等<sup>[19]</sup>也认为西地那非可以通过磷酸化肌联蛋白改善左室舒张能力和室壁僵硬。

实验结果显示,心衰组心肌组织中 Hyp 含量和血清 TGF-β1 水平显著高于对照组,西地那非治疗后均明显降低。纤维母细胞的主要来源是内皮-间质之间的转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT),TGF-β1 能诱导心肌组织内皮细胞的 EndMT<sup>[20-21]</sup>,重组人类成骨蛋白-7(rhBMP-7)可阻止 EndMT 的发生而减缓心衰纤维化进程<sup>[22]</sup>。在本实验中 Hyp 和 TGF-β1 在治疗后的下降,也进一步证实慢性心衰发生过程中二者之间的相互关系。因此,本文推测西地那非也能阻止 TGF-β1 诱导心肌组织内皮细胞的 EndMT,以减缓心肌纤维化的发生从而改善心功能。总之,西地那非可改善心衰后大鼠左室舒缩功能、降低血清 TGF-β1 水平和减轻心肌组织中胶原的沉积,从而延缓心肌纤维化的进程,为临床治疗慢性心衰提供理论依据。

## [参考文献]

- [1] Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling[J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 123(2): 255-278
- [2] Schwartz BG, Levine LA, Comstock G, et al. Cardiac uses of phosphodiesterase-5 inhibitors[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(1): 9-15
- [3] Dunkern TR, Feurstein D, Rossi GA, et al. Inhibition of TGF- $\beta$  induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 572(1): 12-22
- [4] Delgado RR, Nawar MA, Zewail AM, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment improves left ventricular function and mortality in a murine model of doxorubicin-induced heart failure[J]. *Circulation*, 2004, 109(11): 1428-1433
- [5] Chau VQ, Salloum FN, Hoke NN, et al. Mitigation of the progression of heart failure with sildenafil involves inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(6): H2272-H2279
- [6] Kania G, Blyszczuk P, Eriksson U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2009, 19(8): 247-252
- [7] Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(4): 600-606
- [8] Yun SH, Shin JO, Lim BK, et al. Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Coxsackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse[J]. *Virus Res*, 2007, 126(1-2): 62-68
- [9] Xiao H, Zhang YY. Understanding the role of transforming growth factor-beta signalling in the heart: overview of studies using genetic mouse models[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(3): 335-341
- [10] Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, et al. Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF- $\beta$  (1)[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(3): H1253-H1262
- [11] Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio[J]. *Circulation*, 1999, 99(21): 2750-2756
- [12] Li G, Borger MA, Williams WG, et al. Regional overexpression of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta1 in the myocardium of patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(1): 89-95
- [13] Villar AV, Cobo M, Llano M, et al. Plasma levels of transforming growth factor-beta1 reflect left ventricular remodeling in aortic stenosis[J]. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8476
- [14] Kukreja RC, Salloum F, Das A, et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: Basic mechanisms and clinical implications[J]. *Vascul Pharmacol*, 2005, 42(5-6): 219-232
- [15] Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12944-12955
- [16] Das A, Salloum FN, Xi L, et al. ERK phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(5): H1236-H1243
- [17] Wang X, Fisher PW, Xi L, et al. Essential role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in sildenafil-induced late cardioprotection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44(1): 105-113
- [18] Yin J, Kukucka M, Hoffmann J, et al. Sildenafil preserves lung endothelial function and prevents pulmonary vascular remodeling in a rat model of diastolic heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2011, 4(2): 198-206
- [19] Bishu K, Hamdani N, Mohammed SF, et al. Sildenafil and B-type natriuretic peptide acutely phosphorylate titin and improve diastolic distensibility *in vivo*[J]. *Circulation*, 2011, 124(25): 2882-2891
- [20] Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3): 1074-1080
- [21] Lee K, Nelson CM. New insights into the regulation of epithelial-mesenchymal transition and tissue fibrosis [J]. *Int Rev Cell Mol Bio*, 2012, 294: 171-221
- [22] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis [J]. *Nat Med*, 2007, 13(8): 952-961

[收稿日期] 2012-12-09