

血管紧张素 及醛固酮阻滞剂对心肌梗死大鼠骨桥蛋白表达的影响

张玉玲, 周淑娴, 雷娟, 张静敏

(中山大学附属第二医院心血管内科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】研究血管紧张素 及醛固酮阻滞剂对心肌梗死大鼠非梗死区心肌组织骨桥蛋白(OPN)表达的影响。【方法】将心肌梗死后 24 h 存活大鼠随机分为 3 组: 盐水组(15 只, 5 mL/d), 培哚普利组(18 只, 2 mg/kg·d) 和螺内酯组(17 只, 20 mg/kg)。灌胃给药; 另设假手术组(15 只)作对照。分别于心肌梗死后 6 周: 导管法测定左室有创血流动力学; 组织学方法检测非梗死区胶原纤维沉积和心肌细胞横径; Western blot 检测非梗死区心肌组织 OPN 表达。【结果】假手术组大鼠心肌组织 Western blot 未检测到 OPN 表达, 心肌梗死大鼠 6 周后非梗死区心肌组织有大量 OPN 表达, 培哚普利及螺内酯治疗均能显著抑制该蛋白的上调, 差别均有统计学意义($P < 0.01$)。与假手术组相比, 所有心肌梗死大鼠均出现显著的心肌间质纤维沉积, 左室重量指数增大, 非梗死区心肌细胞横径增加, 差别均有统计学意义($P < 0.01$)。与盐水组相比, 培哚普利及螺内酯组心肌间质纤维沉积减轻, 左室重量指数及非梗死区心肌细胞横径降低, 差别均有统计学意义($P < 0.01$)。与假手术组相比, 所有心肌梗死大鼠 6 周后左室内收缩压(LVSP)和 dp/dt_{max} 均显著下降, 左室舒张末期压(LVEDP)显著上升, 差别均有统计学意义($P < 0.01$); 与盐水组相比, 培哚普利与螺内酯组大鼠心功能显著改善, 差别均有统计学意义($P < 0.01$)。【结论】心肌梗死后大鼠非梗死区心肌组织出现大量 OPN 表达及显著的心室重构; 血管紧张素 及醛固酮阻滞剂均能显著抑制心肌梗死大鼠 OPN 的表达, 并能改善心肌的纤维化, 改善心脏功能。

关键词: 骨桥蛋白; 心肌梗死; 血管紧张素-醛固酮阻滞剂

中图分类号: R542.220

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0662-04

Blockades of Angiotensin and Aldosterone Inhibit Osteopontin Expression in Non-infarcted Myocardium after Myocardial Infarction

ZHANG Yu-ling, ZHOU Shu-xian, LEI Juan, ZHANG Jing-min

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To elucidate the effects of blockades of angiotensin and aldosterone on cardiac osteopontin expression associated with cardiac remodeling in myocardial infarcted (MI) rats. 【Methods】 After ligating left anterior descending coronary artery, 50 rats that survived 24 h were randomly divided into three groups: MI-saline group ($n=15$, 5 mL/d), MI-perindopril group ($n=18$, 2 mg/kg·d) and MI-spiroindolactone ($n=17$, 20 mg/kg·d). Sham operated group ($n=15$) was selected as non-infarcted control. At 6 weeks after drug therapy by gastric gavage, hemodynamics and left ventricular function were measured with catheterization. Interstitial fibrosis infiltration and cardiomyocyte diameter were evaluated with histological methods. Myocardium osteopontin protein expression level in non-infarcted myocardium was detected with Western blot analysis. 【Results】 (1) No osteopontin protein was detected in myocardium of sham-operation rats. At 6 weeks after MI, high level osteopontin protein expression was detected in non-infarcted myocardium. Blockades of angiotensin and aldosterone significantly suppressed increased osteopontin protein expression in non-infarcted myocardium at 6 weeks ($P < 0.01$, respectively). (2) Compared with the sham operated group, the rats in MI group showed marked interstitial fibrosis infiltration in non-infarction area, higher ventricular weight/body weight ratio, significantly increased cardiomyocyte diameter ($P < 0.01$, respectively), and developed significant systolic and diastolic dysfunction, as was indicated by decreased left ventricular systolic pressure

收稿日期: 2007-09-05

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(4009434)

作者简介: 张玉玲(1968-), 女, 河南濮阳人, 在读博士, 主治医师; 周淑娴, 通讯作者, E-mail: zhoushuxian@yahoo.com.cn

(LVSP) and the maximum rising and dropping rates of left ventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$), as well as increased left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) ($P < 0.01$, respectively). Angiotensin and aldosterone blockades significantly prevented cardiac fibrosis and systolic and diastolic dysfunction ($P < 0.01$, respectively). [Conclusions] Angiotensin and aldosterone blockades inhibit increased osteopontin expression in non-infarcted myocardium and prevent cardiac remodeling after MI.

Key words: osteopontin; myocardial infarction; rats; cardiac remodeling; angiotensin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):662-665]

心肌梗死后心室重构,是引起心衰的主要机制。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种多功能的细胞因子,主要通过调节细胞外基质而促进纤维化和损伤的修复^[1]。研究表明 OPN 在心肌梗死后心肌的损伤修复中担任了重要角色^[2],肾素-血管紧张素系统可能参与了这个过程^[3,4];但醛固酮阻滞剂对心肌梗死后心肌组织 OPN 表达的影响国内外尚未见报道。本研究旨在观察急性心肌梗死大鼠 OPN 的表达及血管紧张素和醛固酮阻滞剂对其影响,研究 OPN 在心肌梗死后心室重塑的作用及其影响因素。

1 材料和方法

1.1 材料

Osteopontin 兔多克隆抗体(Abcam),辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(北京中山),辣根过氧化物酶标记 GAPDH 抗体(上海康成);培哚普利片剂(法国施维雅药厂),螺内酯片剂(杭州民生药业集团有限公司)。DH-50 型小动物呼吸机(浙江大学医学仪器厂生产),Medlab 生物信号采集系统(南京美易科技公司),电泳仪和转膜仪及图像分析系统(Bio-Rad)。

1.2 模型复制与动物分组

成年雄性 SD 大鼠(购自中山大学医学实验动物中心,清洁级)80 只,体重 250~300 g,左前降支结扎法复制急性前壁心肌梗死大鼠模型,24 h 后存活的大鼠随机分为 3 组:培哚普利组 18 只,培哚普利 45 mg/kg·d 溶于生理盐水中灌胃;螺内酯组 17 只,螺内酯 45 mg/kg·d 溶于生理盐水中灌胃;盐水组 15 只,生理盐水 5 mL/d 灌胃;另设假手术组 15 只,仅在前降支穿线,不结扎,同时予生理盐水 5 mL/d 灌胃。

1.3 血流动力学检测

大鼠心肌梗死 6 周后,导管法行血流动力学测定,以 4%水合氯醛(400 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,穿刺右颈动脉,连接压力换能器,稳定 20 min 后测

定心率(heart rate, HR)、左室内收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末期压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左室内压最大上升和下降速率(the maximum rising and dropping rates of left ventricular pressure, $\pm dp/dt_{max}$)。经股静脉注入 10%氯化钾 3 mL,使心脏停搏在舒张期。

1.4 心肌梗死面积及心室相对重量的测定

取出完整心脏,冰生理盐水漂洗后滤纸吸干,用电子天平称取心室重量;沿室间隔分离左心室(包括室间隔)称重,计算与体重的比值得出左室重量指数(left ventricular mass index, LVMI)。左室横断为 3 段,每段切取 1.5 mm 薄片,放入氯化三苯基四氮唑(TTC)中 37℃ 水浴染色。多媒体彩色病理图文分析系统计算左室梗死面积所占的百分比,取三者均值为该动物的梗死面积,梗死面积 < 30%者排除实验。

1.5 心肌细胞横径的测定

心肌组织以 PBS 甲醛溶液固定 48 h 后,石蜡包埋。制备 5 μ m 厚度不同部位的组织切片,H&E 染色,选取非梗死区边界清晰的心肌细胞,在细胞核水平测量其最短横径,每只动物随机选取 100 个细胞,取其均值作为该动物心肌细胞横径。

1.6 心肌胶原沉积及胶原容积分数的测定

心肌组织 5 μ m 石蜡切片,以 Masson 三色染色评价非梗死区心肌间质纤维沉积。染色结果:胶原纤维绿色,弹性纤维棕褐色,肌纤维红色,纤维素红色,细胞核紫红色。以上述图像分析处理系统计算出非梗死区心肌组织胶原纤维面积占整个组织面积的百分比,取 8 个视野的平均值。

1.7 Western blot 检测心肌组织 OPN 表达水平

以组织裂解液提取心肌组织总蛋白,考马斯亮兰法测定浓度。取总蛋白 40 μ g,加入 4 \times 加样缓冲液,煮沸 3 min 变性,继以 SDS-PAGE 电泳。将蛋白从凝胶转移到 PVDF 膜上后,常规给予漂洗、封闭,然后将膜放入 1:1000 稀释的 OPN 兔多克隆抗体,室温振荡 1 h,继以 4 \times 过夜。次日,经漂洗后,将

膜放入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗稀释液中,室温下振荡 1 h,漂洗后将膜放入 ECL 试剂中温浴,X 光片曝光显影。Bio-Rad 成像分析系统扫描,以 Quantity one 软件分析各样本灰度值。同时进行 GAPDH 蛋白的 Western blot 检测,以 OPN 条带灰度值与相应 GAPDH 灰度值的比值作为该样本 OPN 的相对含量。

1.8 统计学分析

用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析。数据采用均数 ±标准差表示。多组间均数的比较用单因素方差分析,有显著差异者用 LSD 检验。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠非梗死区心肌组织 OPN 的表达

Western blot 结果示,假手术组大鼠心肌组织未检测到 OPN 表达,心肌梗死组大鼠 6 周后非梗死区心肌组织 OPN 表达显著增加(P 均 < 0.01);与盐水组相比,培哚普利及螺内酯治疗显著抑制非梗死区心肌组织 OPN 表达,差别均有统计学意义(P 均 < 0.01,图 1)。

2.2 各组大鼠非梗死区心肌胶原沉积及胶原容积分数的比较

与假手术组相比,心肌梗死组大鼠 6 周后均出现显著的心肌间质纤维沉积,心肌胶原容积分数增加,差别均有统计学意义(P 均 < 0.01);与盐水组相

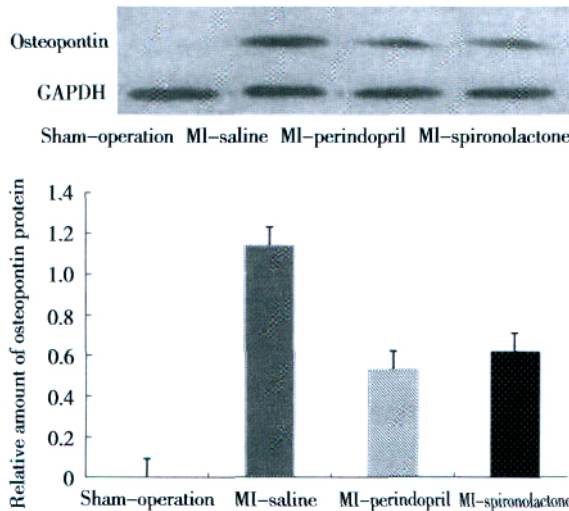


图 1 Western blot 检测各组大鼠心肌组织 OPN 表达水平
Fig.1 Osteopontin expression of myocardium in experimental groups (Western blot)

Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, each group, $n=15$, * $P < 0.01$ vs sham-operation group; # $P < 0.01$ vs MI-saline group

比,培哚普利及螺内酯组大鼠心肌间质纤维沉积减轻,心肌胶原容积分数下降,但未能恢复到假手术组水平,差别均有统计学意义(P 均 < 0.01,图 2,表 1)。

2.3 各组大鼠左室重量指数、心肌细胞横径的比较

与假手术组相比,心肌梗死组大鼠 6 周后均出现显著的左室重量指数及非梗死区心肌细胞横径增加,差别均有统计学意义(P 均 < 0.01);与盐水组相比,培哚普利及螺内酯组大鼠左室重量指数及非梗

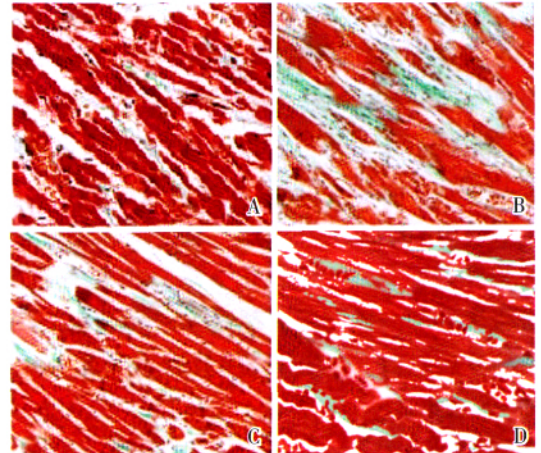


图 2 各实验组大鼠心肌胶原纤维染色

Fig.2 Myocardial collagen fiber in experimental groups

A: Sham-operation group; B: MI-saline group; C: MI-perindopril group; D: MI-spirolactone group (masson staining $\times 400$)

表 1 心肌梗死 6 周后各组大鼠血流动力学、心室重量、心肌细胞横径及胶原容积分数的比较

Table 1 Hemodynamics, ventricle weight, cardiomyocyte diameter and CVF at 6 weeks after myocardial infarction (MI)

	Sham-operation	MI Group		
		MI-saline	MI-perindopril	MI-spirolactone
n	15	15	18	17
Heart rate(bpm)	310 ± 7	307 ± 0	309 ± 8	305 ± 1
LVSP(mmHg)	137 ± 2	79 ± 0 [#]	108 ± 11 ^②	97 ± 4 ^②
LVEDP(mmHg)	3.9 ± 1.0	15.5 ± 2.7 ^①	7.5 ± 2.1 ^②	8.8 ± 2.0 ^②
+dp/dt(mmHg·s ⁻¹)	6974 ± 929	4327 ± 397 ^①	5897 ± 562 ^②	5146 ± 333 ^②
- dp/dt(mmHg·s ⁻¹)	6843 ± 567	4159 ± 398 ^①	5569 ± 435 ^②	5439 ± 419 ^②
LVMI (g/kg)	3.06 ± 0.30	5.26 ± 0.29 ^①	3.89 ± 0.36 ^②	4.12 ± 0.43 ^②
Cardiomyocyte diameter (μm)	11.5 ± 2.3	21.4 ± 3.8 ^①	17.9 ± 2.7 ^②	18.1 ± 1.9 ^②
CVF (%)	1.4 ± 0.8	8.9 ± 1.7 ^①	5.9 ± 1.8 ^②	6.0 ± 1.5 ^②
MI size(%)	0	44 ± 3	42 ± 4	43 ± 3

LVSP: left ventricular systolic pressure; LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure; ±dp/dt: the maximum rising and dropping rates of left ventricular pressure; LVMI: left ventricular mass index; CVF: the collagen volume fraction.

Data were expressed as mean ±SD, * $P < 0.01$ vs sham-operation group; # $P < 0.01$ vs MI-saline group

死区心肌细胞横径降低,但未能恢复到假手术组水平,差别均有统计学意义(P 均 < 0.01 ,表1)。

2.4 各组大鼠血流动力学的比较

与假手术组相比,心肌梗死组大鼠6周后均出现LVSP和 $\text{dp/dt}_{\text{max}}$ 显著下降,LVEDP显著上升,差别均有统计学意义(P 均 < 0.01),提示了显著的左室收缩和舒张功能不全;与盐水组相比,培哚普利及螺内酯组大鼠心功能均改善,但未能恢复到假手术组水平,差别均有统计学意义(P 均 < 0.01 ,表1)。

3 讨论

OPN是一种细胞外基质蛋白,介导细胞-细胞和细胞-基质之间的相互作用。在心肌梗死、心力衰竭和高血压等疾病的病理发展过程中促进心脏肥大和纤维化,在压力或容量负荷过重及心肌损伤后的调节中起重要作用^[9]。OPN最早从骨基质中分离出来,但研究证明^[4]OPN可在多种细胞基质中表达,包括心肌细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞等,并可介导多种生理功能,如细胞黏附、趋化现象及信号转导等。研究证明由于OPN在基质的构成及稳定性中担任了重要角色,因此OPN在纤维的形成及胶原的沉积中起到了重要作用。

心肌梗死早期左室梗死区域心肌细胞的坏死、凋亡,晚期细胞外基质的改变尤其是胶原沉积的增加均参与了心肌重塑的过程。由于OPN在病理生理条件下表达增加,并可能在细胞外基质的重构中担任了重要角色,因此OPN可能参与了心肌梗死后心肌的重构^[9]。本实验发现假手术组大鼠心肌组织OPN不表达,在心肌梗死大鼠模型上,观察到冠状动脉左前降支结扎6周后,非梗死区心肌组织OPN表达明显增加,同时大鼠出现显著的胶原纤维沉积、心肌细胞肥大和心功能下降。

研究表明OPN缺陷的小鼠出现进行性的心肌重塑并可被血管紧张素受体阻滞剂与醛固酮拮抗剂所阻断;Collins等^[7]发现敲除了OPN基因的小鼠对血管紧张素诱导的血压升高反应仍存在,但对其诱导的心肌纤维化反应显著减弱。Matsui等^[8]的研究也同样提示OPN在血管紧张素诱导的心室肥厚和纤维化中起着重要作用。这些结果均提示OPN可能受RAS的调节并参与了血管紧张素诱导的心肌纤维化,但血管紧张素及醛固酮阻滞对MI后OPN的影响国内外尚未见报道。本研究发现,与盐

水组相比培哚普利与螺内酯治疗均能显著抑制非梗死区心肌组织OPN表达,使胶原纤维沉积减少,心肌细胞肥大程度减轻,改善心脏功能。

本研究结果提示,OPN在心肌梗死后心肌的纤维化及心室的重构中起了重要作用,血管紧张素及醛固酮阻滞剂均可抑制心肌梗死大鼠心肌组织OPN表达,这可能是其抗左室重构作用的机制之一。研究OPN在心室重构中的细胞及分子机制,发现防治心室重构的新靶点具有重要意义。

参考文献:

- [1] SCHELLINGS M W, PINTO Y M, HEYMANS S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64(1): 4-31.
- [2] SUEZAWA C, KUSACHI S, MURAKAMI T, et al. Time-dependent changes in plasma osteopontin levels in patients with anterior-wall acute myocardial infarction after successful reperfusion: correlation with left-ventricular volume and function [J]. *J Lab Clin Med*, 2005, 145(1): 33-40.
- [3] 耿登峰,伍卫,雷娟,等.罗格列酮对心肌梗死大鼠血流动力学及肾素血管紧张素系统的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(2):114-118.
- [4] KUSUYAMA T, YOSHIYAMA M, OMURA T, et al. Angiotensin blockade inhibits osteopontin expression in non-infarcted myocardium after myocardial infarction [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 98(3): 283-289.
- [5] TRUEBLOOD N A, XIE Z, COMMUNAL C, et al. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin [J]. *Circ Res*, 2001, 88(10): 1080-1087.
- [6] GRAF K, STAWOWY P, OSTEOPONTIN: A Protective Mediator of Cardiac Fibrosis? [J]. *Hypertension*, 2004, 44(6): 809-810.
- [7] COLLINS A R, SCHNEE J, WANG W, et al. Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(9): 1698-1705.
- [8] MATSUI Y, JIA N, OKAMOTO H, et al. Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2004, 43(6): 1195-1201.