

• 研究报告 •

西拉普利和缬沙坦对大鼠心肌梗死后心肌间质成分水平的干预研究

孙静 张世珠 毛用敏 孙根义 赵鸿铭 刘国庆 崔让庄

【关键词】 心肌梗死； 基质金属蛋白酶； 组织金属蛋白酶抑制剂； 血管紧张素转换酶； 肾上腺素能受体拮抗剂

细胞外基质(ECM)是血管壁的主要成分,这些成分的合成和降解与动脉粥样硬化的发生发展密切相关,合成过多可造成血管狭窄,降解过多可诱发斑块破裂。心脏间质细胞(又称 ECM 成分)主要由 I 型和 III 型胶原构成的纤维网络组成,基质成分合成和降解的平衡受成纤维细胞分泌的基质金属蛋白酶(MMPs)和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)的调节。本研究拟分析心肌梗死(心梗)后心肌间质相关成分 mRNA 表达的变化,探讨血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)西拉普利及其受体拮抗剂缬沙坦的干预作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备: 雄性 Wistar 大鼠 40 只,16 周龄,体重 300~350 g。结扎冠状动脉右前降支制备大鼠心肌梗模型。心电图示 ST 段呈弓背向上抬高,提示制模成功。假手术组(8 只)仅在左心耳与肺动脉圆锥之间穿线、不结扎。将术后 24 h 存活的心梗大鼠按随机数字表法分为梗死组(8 只)、西拉普利组(8 只,西拉普利 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃)、缬沙坦组(8 只,缬沙坦 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹腹腔注射)及联合用药组(8 只,同时给予西拉普利 0.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹和缬沙坦 15 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。各组均给予标准鼠料和饮水。

1.2 实验方法: 用药 2 周后处死各组大鼠,取梗死区心肌。采用 UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提纯化法提取心肌总 RNA; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)逆转录生成 cDNA,以 cDNA 为模板扩增目的基因,引物序列参考相关文献,从基因库下载全长 mRNA 目的基因序列后核对自行设计。引物序列见表 1。TIMP-1 扩增产物长度为 499 bp, MMP-2 扩增

作者单位:300051 天津市胸科医院(孙静,毛用敏,孙根义,赵鸿铭,刘国庆,崔让庄);300100 天津市南开医院(张世珠)

作者简介:孙静(1970-),女(汉族),天津市人,主治医师。

表 1 RT-PCR 中各引物的序列

引物	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
TIMP-1	GCT AGA GGC GAT AGC ACG ATG GCG	TGC AAG GGA TGG CTG AAC AGG G
MMP-2	ACA CCA TCG AGA CCA TCG GG	TGC GAC CAG TGT CTG TAC AG
AT1R	AGG CTG GCA GGC ACA ATT AC	AAC TGA CGC TGG CAG AAG CG
AT2R	ACC TGC ATG AGT GTT GAT AGG	CAG GTC AAT GAC TGC TAT AAC TTC A
GAPDH	AGT CCA TCG CAT CAC TGC CAC	TGG GAG TTG CTG TTG AAG TCA C

表 2 两组心脏间质成分 mRNA 表达的比较

组别	动物数(只)	TIMP-1	MMP-2	AT1R	AT2R
梗死组	8	0.62±0.20*	0.62±0.20	0.92±0.14**	1.07±0.20**
假手术组	8	0.45±0.09	0.50±0.19	0.31±0.08	0.33±0.13

注:与假手术组比较:*P<0.05,**P<0.01

表 3 各组心脏间质成分 mRNA 表达的比较

组别	动物数(只)	TIMP-1	MMP-2	AT1R	AT2R
梗死组	8	0.69±0.20	0.62±0.20	0.92±0.14	1.07±0.20
西拉普利组	8	1.27±0.40*	0.72±0.35	0.68±0.09*	0.80±0.31
缬沙坦	8	1.21±0.38	0.77±0.18	0.63±0.12*	1.45±0.28 [△]
联合用药组	8	1.08±0.12	1.13±0.09*	0.69±0.13*	1.04±0.25

注:与梗死组比较:*P<0.05;与西拉普利组比较:[△]P<0.05

产物长度为 483 bp,血管紧张素 I 受体(AT1R)扩增产物长度为 270 bp,AT2R 扩增产物长度为 485 bp;内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)扩增产物长度为 342 bp。将 PCR 产物经质量分数为 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外线激发下拍照,采用凝胶成像系统分析,以特异 DNA 带与内参照的灰度比值作为该 mRNA 表达的相对水平。

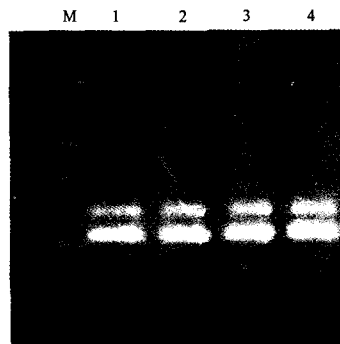
1.3 统计学分析: 采用 SPSS10.0 进行统计分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用方差分析,两组间均数比较采用 t 检验,组间两两比较采用 q 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

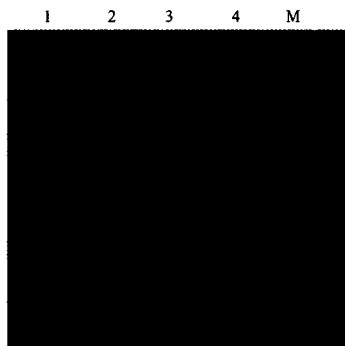
2.1 梗死组和假手术组心脏间质成分 mRNA 表达的比较(表 2): 梗死组 TIMP-1、AT1R、AT2R 的 mRNA 表达均明显高于假手术组,差异有显著性(P<0.05或 P<0.01);梗死组 MMP-2 mRNA 表达与假手术组比较差异无显著性(P>0.05)。

2.2 不同药物对心脏间质成分 mRNA 表达的干预效果比较(表 3,图 1~4):

西拉普利组 TIMP-1 mRNA 表达明显上调,与梗死组比较差异有显著性(P<0.05),而与其余两组比较差异无显著性(P均>0.05)。西拉普利和缬沙坦单独使用或联合应用均能明显下调 AT1R mRNA 表达,3 个组与梗死组比较差异均有显著性(P均<0.05)。西拉普利和缬沙坦联合用药组可明显上调 MMP-2 mRNA 表达,与梗死组相比较差异亦有显著性(P<0.05)。缬沙坦组则可明显上调 AT2R mRNA 表达,与西拉普利组比较差异有显著性(P<0.05)。

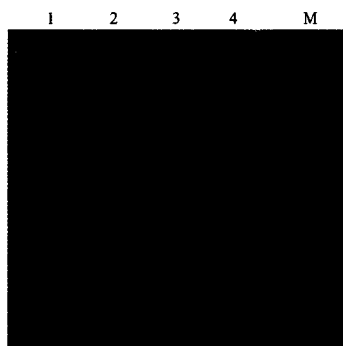


M:Marker;1~4 依次为梗死组、西拉普利组、缬沙坦组、联合用药组
图 1 各组 AT1R mRNA 的表达



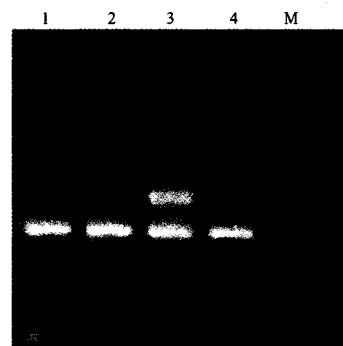
M; Marker; 1~4 依次为梗死组、西拉普利组、缬沙坦组、联合用药组

图 2 各组 AT2R mRNA 的表达



M; Marker; 1~4 依次为梗死组、西拉普利组、缬沙坦组、联合用药组

图 3 各组 MMP-2 mRNA 的表达



M; Marker; 1~4 依次为梗死组、西拉普利组、缬沙坦组、联合用药组

图 4 各组 TIMP-1 mRNA 的表达

3 讨论

MMPs 是心梗后心肌组织重塑过程中基质降解的主要酶,心肌 ECM 构成的变化与心脏 MMPs 及其特异性组织抑制剂活性有关。MMPs 不仅在心脏基质成分的降解中发挥作用,而且对胶原蛋白的合成具有调节作用^[1]。MMPs/TIMPs 平衡对维持心肌间质胶原合成与降解代谢的动态平衡具有重要作用。MMPs/TIMPs 比例失调是导致心室重构、心肌纤维化的直接原因^[2]。因此,调控 MMPs 和 TIMPs 的表达及活性可能成为心梗后预防心力衰竭的新靶点。本研究结果中梗死组 TIMP-1 mRNA 表达显著升高, MMP-2 mRNA 表达也有所增加,梗死组 TIMP-1 和 MMP-2 的 mRNA 表达均升高的现象是否可以理解为机体的应激反应,尚需进一步探讨。心梗发生后由于交感神经的激活,引起血浆 AT II 升高,同时心肌局部的 AT II 也增高,促进纤维母细胞内 I 型和 II 型胶原合成,诱导心肌纤维化。这些效应主要通过 AT1R 介导,而 AT2R 具有拮抗

AT1R 的效应。本研究结果显示,梗死组 AT1R 和 AT2R 的 mRNA 表达均明显升高,推测可能是因为 AT II 与两型受体结合后,通过 AT I 促进细胞增殖和 AT II 的抗增殖,从而发挥组织重塑的调节作用。

在心室重塑中, MMPs/TIMPs 的失衡与局部的生物活性因子如 AT II 呈浓度依赖关系^[3],使用 ACEI 和肾上腺素能受体拮抗剂对 MMPs 和(或) TIMPs 的合成及释放的影响与 AT II 水平有关。在本研究结果中,联合用药组 MMP-2 mRNA 表达显著高于梗死组,而 MMP-2 mRNA 表达升高有利于防止动脉粥样硬化的形成;西拉普利组 TIMP-1 mRNA 表达显著高于梗死组,而 TIMP-1 mRNA 表达升高有利于斑块的稳定;AT1R 和 AT2R 在心肌的生物学中发挥相互拮抗的作用,其相对表达或绝对表达的改变对心脏功能和结构产生重要影响。本实验结果显示,实验大鼠 ACEI 治疗后梗死区 AT1R mRNA 表达明显降低,但不影响 AT2R mRNA

表达, AT II /AT I 相对升高。

缬沙坦是特异性、竞争性 AT1R 拮抗剂,缬沙坦组 AT1R mRNA 表达较梗死组明显降低,而 AT2R mRNA 表达则较梗死组明显升高,表明 AT1R 拮抗剂的心血管保护作用并不单纯依赖阻断 AT1R,而是通过对两型受体表达的不同调节而达到抑制心室重塑的目的。

参考文献:

- 1 Briest W, Holz A, Rassler B, et al. Significance of matrix-metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts [J]. Cardiovasc Res, 2003, 57 (2): 379-387.
- 2 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. Circ Res, 2003, 92 (8): 827-839.
- 3 Spinale F G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart [J]. Circ Res, 2002, 90 (5): 520-530.

(收稿日期: 2006-12-10)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

海藻糖抑制脓毒性休克大鼠巨噬细胞促炎基因的活化

以往研究表明,脓毒症时巨噬细胞促炎基因的活化能导致多器官功能障碍,而海藻糖可以提高应激状态下细胞的存活率。最近,意大利学者用内毒素诱导的脓毒性休克模型研究了海藻糖抑制巨噬细胞促炎基因的活化并降低死亡率的作用。实验用 50 mg/L 肠沙门菌脂多糖(LPS)刺激大鼠腹腔巨噬细胞,然后加入 25、50 和 100 mmol 海藻糖与 100 mmol 蔗糖进行孵育,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测上清液中细胞外调节激酶、c-Jun 氨基末端蛋白激酶(JNK)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白的表达,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)动态检测白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因表达,同时测定上清液中促炎细胞因子和亚硝酸盐浓度。结果显示:海藻糖可以减少内毒素刺激后细胞外调节激酶、JNK 和 iNOS 蛋白的表达,抑制 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的基因表达,并显著降低上清液中促炎细胞因子和亚硝酸盐浓度。另外,海藻糖将给予致死剂量 LPS(20 mg/kg)刺激大鼠 24 h 和 72 h 后的存活率分别提高到 80% 和 70%,并可降低血浆 TNF- α 浓度,蔗糖则不能降低内毒素诱导的巨噬细胞死亡率。因此研究者认为,海藻糖可以抑制内毒素诱导的巨噬细胞促炎基因的活化并降低死亡率。

吴静,周国勇,编译自《Shock》,2007,27(1):91-96;胡森,审校