

心血管疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000560

Ghrelin对糖尿病大鼠心肌梗死后心肌重塑 基质金属蛋白酶表达的影响

王 丽,李桂琼,陈庆伟,柯大智

(重庆医科大学附属第二医院老年心血管科,重庆 400010)

【摘要】目的:探讨生长激素分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体 ghrelin 对糖尿病大鼠心肌梗死后心室重塑基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达的影响。**方法:**选取 7~8 周龄的 SD 大鼠随机分为 4 组:①单纯心肌梗死组;②糖尿病合并心肌梗死组;③糖尿病合并心肌梗死+ghrelin 干预组;④糖尿病合并心肌梗死+ghrelin+GHSR1a 特异性拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6 干预组。建立链脲佐菌素糖尿病大鼠模型,12 周后所有大鼠均结扎冠状动脉左前降支建立急性心肌梗死模型。Ghrelin 干预组大鼠腹腔注射 ghrelin [200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$],ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 干预组大鼠分别腹腔注射 ghrelin[200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]+[D-Lys3]-GHRP-6[50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$],其余 2 组分别腹腔注射等量生理盐水。4 周后苦味酸天狼猩红染色检测其心肌纤维化情况,Masson 染色检测心肌梗死面积,免疫组织化学和 Western blot 分别检测左心室心肌组织基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和金属蛋白酶组织抑制因子 1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)分布与表达变化。**结果:**与单纯心肌梗死组相比,糖尿病合并心肌梗死组心肌胶原容量分数($P=0.003$)、心肌梗死面积明显增加($P=0.001$),MMP-2($P=0.000$)和 MMP-9($P=0.000$)明显增高,心肌间质纤维增生。Ghrelin 腹腔注射干预后可明显降低糖尿病心肌梗死大鼠胶原容量分数($P=0.001$)、心肌梗死面积($P=0.005$),MMP-2($P=0.001$)和 MMP-9($P=0.001$)表达减少,心肌间质纤维增生减轻。TIMP-1 在合并糖尿病的组别中均明显升高($P=0.000$),但 3 组间无统计学意义($P>0.05$)。Ghrelin 的上述效应均被 [D-Lys3]-GHRP-6 阻滞。**结论:**Ghrelin 可通过抑制糖尿病心肌梗死大鼠心肌组织 MMP-2 和 MMP-9 的表达,从而抑制糖尿病心肌梗死大鼠心肌间质纤维化、减少心肌梗死面积,抑制心肌细胞外基质重塑。

【关键词】ghrelin;生长激素分泌素受体;糖尿病;心肌重塑;基质金属蛋白酶

【中图分类号】R542.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-08-07

Effects of ghrelin on myocardial remodeling matrix metalloproteinases expression in post-myocardial infarction rats with diabetes mellitus

Wang Li, Li Guiqiong, Chen Qingwei, Ke Dazhi

(Department of Geriatrics Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of ghrelin on myocardial remodeling matrix metalloproteinases expression in post-myocardial infarction diabetic rats. **Methods:** Adult male SD rats were divided into four groups: myocardial infarction (MI), diabetes mellitus+myocardial infarction (DM+MI), DM+MI+ghrelin, DM+MI+ghrelin+GHSR1a inhibitor [D-Lys3]-GHRP-6. Diabetes was induced by injection of streptozotocin (STZ, 60 mg/kg). After three months, left anterior descending artery (LAD) ligation was performed in all groups. DM+MI+ghrelin group received ghrelin, 200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$. DM+MI+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 group received ghrelin, 200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ and [D-Lys3]-GHRP-6, 50 mg/(kg·d). The other two groups received the same amount sterile normal saline only. Four weeks later, Sirius red staining was used to detect myocardial fibrosis. Myocardial infarct size was detected by Masson staining. The distribution and expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were detected by immunohistochemistry and Western blot, separately. **Results:** Myocardial collagen volume fraction ($P=0.003$), myocardial infarct size ($P=0.001$), the expression of MMP-2 ($P=0.000$) and MMP-9 ($P=0.000$) were significantly increased in DM+MI group than in MI group. After ghrelin administration, myocardial collagen volume fraction ($P=0.001$), myocardial infarct size ($P=0.005$), the expres-

作者介绍:王 丽, Email: li_wang2010@yeah.net,

研究方向:心血管疾病。

通信作者:李桂琼, Email: 84134176@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31271262);重庆市博士后基金资助项目(编号:Xm201351)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2156.013.html>
(2015-03-10)

sion of MMP-2($P=0.001$) and MMP-9($P=0.001$) were significantly decreased in diabetic rats complicated with MI. TIMP-1 was significantly higher in diabetic groups than in MI group($P=0.000$), without significant difference among these groups($P>0.05$). However, [D-Lys3]-GHRP-6 blocked the above effects of ghrelin. **Conclusion:** Ghrelin can inhibit myocardial extracellular matrix remodeling and reduce myocardial infarct size by suppressing the expressions of MMP-2 and MMP-9.

【Key words】ghrelin; growth hormone secretagogue receptor; diabetes; myocardial remodeling; matrix metalloproteinase

心肌在高血糖状态下可发生纤维化,加之心肌缺血、急性心肌细胞梗死后,心肌运动的同步性消失,心室重构程度进一步加重,出现相邻心肌节段收缩不一致,心肌收缩减弱、无收缩、反常收缩,收缩期膨出,严重影响心功能^[1-2]。细胞外基质重塑是导致糖尿病患者心室重构及心脏功能异常的主要病理基础。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组能特异性地降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分 Zn^{2+} 依赖的酶家族,目前发现作用于心肌细胞外基质的 MMPs 主要是 MMP-2、MMP-9 等^[3-4]。金属蛋白酶类组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是 MMPs 的特异性抑制因子,二者为 ECM 降解过程中一对重要的拮抗物,患糖尿病时各种病理因子可促进胶原合成分泌,打破 MMPs 和 TIMPs 间的平衡,对糖尿病心肌细胞 ECM 重塑起重要作用^[5-7]。近年来糖尿病合并冠心病心肌梗死的患者逐年增加,严重威胁人类生命和健康,减少心梗周围缺血区的心肌纤维化是减轻心室重构的重要措施。

Ghrelin 是 1999 年由日本学者 Kojima 等从大鼠胃黏膜中分离纯化的一个含有 28 个氨基酸的多肽,是生长激素分泌物受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体。研究发现,ghrelin 不仅具有抑制高血糖对心血管系统的损害^[8-10],还可在一定程度上抑制心肌与肝脏的纤维化^[11-14],而究竟 ghrelin 对糖尿病患者心肌梗死后心肌重构及心功能的影响如何,目前尚无研究报道,本课题组设计了该实验对此进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

选取雄性 SD 大鼠 80 只(由重庆医科大学实验动物中心提供),体质量 180~220 g, 7~8 周龄, SPF 级环境适应性饲养 1

周后随机分为 4 组(每组各 20 只):(1)单纯心肌梗死(MI)组:腹腔注射等量无菌生理盐水/d;(2)糖尿病合并心肌梗死(DM+MI)组:腹腔注射等量无菌生理盐水/d;(3)糖尿病合并心肌梗死+ghrelin 干预(DM+MI+ghrelin)组:腹腔注射 ghrelin [200 μ g/(kg·d)];(4)糖尿病合并心肌梗死+ghrelin+GHSR1a 特异性拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6 干预(DM+MI+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6)组:腹腔注射 ghrelin[200 μ g/(kg·d)]+[D-Lys3]-GHRP-6[50 mg/(kg·d)]。其中合并糖尿病组予链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病模型,成模后的糖尿病大鼠与非糖尿病大鼠均予普通饲料喂养 3 个月后,所有大鼠均构建心肌梗死模型。然后,在不同组别中分别予等量无菌生理盐水、ghrelin 及[D-Lys3]-GHRP-6 腹腔干预注射,4 周后 M 型超声检测大鼠心功能及进行组织化学和分子生物学检测。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

1.2 糖尿病模型的建立

大鼠禁食 12 h, 合并糖尿病组大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 60 mg/kg, 溶于 0.1 mmol/L, pH 4.4 的柠檬酸缓冲液, STZ 购于美国 Sigma 公司), 非糖尿病组大鼠腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液(0.1 mmol/L, pH 4.4)。每 3 d 剪尾采血测血糖 1 次(美国强生稳豪血糖仪), 连续两次空腹血糖超过 16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠成模标准。糖尿病大鼠共成模 60 只, 未见死亡。

1.3 心肌梗死模型的建立

将大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉及硫酸吗啡(50 mg/kg)镇痛, 仰卧位固定, 连接 II 导联心电图, 颈胸部备皮消毒。做颈部长约 1 cm 正中切口, 沿中线钝性分离颈前肌群, 显露气管, 经口腔做气管插管, 从颈部观察套管进去气管内表明插管成功, 固定套管, 连接呼吸机开始辅助呼吸。取胸骨左旁纵切口, 于胸骨左缘 0.5 cm 处剪断第 4 根肋软骨, 暴露心脏, 于左冠状动脉前降支上 1/3 处以无创针以 1.5 mm 深度缝扎, 缝线远端心肌色泽变深及心电图 ST 段弓背向上抬高表明造模成功。术后予青霉素 80 U/kg 肌肉注射抗感染 1 周。

1.4 苦味酸天狼猩红染色检测心肌纤维化

断颈处死所有实验组大鼠, 取心脏, 4%多聚甲醛固定 12 h 后, 从心尖到心底缝线结扎部位将心脏平均分成 3 段, 石蜡包埋在同一平面上, 然后切成 4 μ m 切片, HE 染色 1 张。

用苦味酸天狼猩红染色对梗死周边区心肌纤维化程度进行检测,Image-Pro Plus 图像分析软件(Media Cybernetics 公司,美国)进行定量分析。

1.5 Masson 染色检测心肌梗死面积

用 Masson 染色(康为世纪,中国)检测梗死边缘区胶原生成情况及心肌梗死面积。在进行此种染色时,梗死心肌被纤维组织替代,被染成蓝色,存活心肌为红色。计算梗死心肌与左心室心肌面积比值(%)。应用 IPP 6.0 软件测量并统计坏死心肌与全部左心室心肌面积的百分比,各组取其平均值。

1.6 免疫组化染色检测 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 在梗死边缘区心肌组织中分布

用 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1(均购自美国 Santa Cruz)的免疫组织化学染色检测心肌梗死边缘区 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的表达与分布:石蜡切片常规脱蜡、水化;微波抗原修复;封闭 15 min;一抗(MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的稀释比例均为 1:200),37 ℃ 2 h,PBS 洗 3 次;二抗,室温 15 min,PBS 洗 3 次;DAB(博士德,中国)显色,苏木素复染。显微镜观察 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的阳性着色部位及数量,Image-Pro Plus 图像分析软件行定量分析。MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 阳性表达量以阳性表达物的平均吸光度(average absorbance,A 值)(取 10 个视野的平均值)来表示。

1.7 Western blot 检测 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的表达变化

取梗死边缘区心肌组织,按照蛋白抽提试剂盒说明书(碧云天,中国)提取总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳:加适量的 5 × 上样缓冲液 99 ℃ 变性 5 min,分离胶的浓度是 12%,每泳道加 36 μg 蛋白。蛋白样品先 80 V 电泳 30 min,进入分离胶,然后 100 V 电泳 1.5 h 至胶下端 1 cm 左右,85 V 湿转 90 min 将蛋白印迹到 PVDF 膜上,剪出目的条带;5%脱脂牛奶浸泡封闭 1 h,加一抗(兔抗大鼠 MMP-2,1:200;兔抗大鼠 MMP-9,1:200;兔抗大鼠 TIMP-1,1:200;小鼠抗大鼠 β-action,1:500,购自江苏碧云天生物科技有限公司)4 ℃ 摇晃过夜,TBST(pH=7.5,10 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl 和 0.2% Tween-20)液洗膜 10 min × 3 次;加二抗(山羊抗兔,1:1 000,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;山羊抗小鼠,1:5 000,购自北京鼎国生物技术有限公司)室温下摇晃 2 h;用 TBST 液洗膜 10 min × 3 次;将膜放

在 0.5 ml ECL 检测试剂混合液中孵育约 1 min,利用化学发光法进行图像扫描,保存图像。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析。糖尿病成模前和成模 3 个月后体质量变化和血糖水平的比较采用配对 *t* 检验。心肌胶原容量分数、心肌梗死面积、MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 组化 A 值、MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 Western blot 条带灰度值在 DM+MI 组、DM+MI+ghrelin 组和 DM+MI+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 组与 MI 组比较采用单因素方差分析中两两比较的 Dunnett-*t* 法,数据均以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 实验动物情况

本实验过程中共死亡 5 只大鼠,糖尿病造模及后续饲养的 3 个月内未见大鼠死亡。在心肌梗死造模过程中,DM+MI 组死亡 2 只,DM+MI+ghrelin 组死亡 1 只。急性心梗模型造模后 1 周内,DM+MI+ghrelin 组和 DM+MI+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 组分别死亡 1 只。糖尿病模型在成模前和成模后 3 个月,各组大鼠血糖和体质量变化见表 1。

2.2 梗死边缘区心肌纤维化

2.2.1 HE 染色 MI 组心肌纤维无肥大,细胞核呈圆形或椭圆形,据于细胞中心,心肌间质结构正常(图 1A)。DM+MI 组心肌细胞肥大、深染,细胞核大小不均匀(图 1B)。Ghrelin 干预后,心肌细胞形态基本完整、无肿大(图 1C)。Ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 明显抑制了 ghrelin 的上述效应,心肌细胞肥大、深染,心肌细胞边界不清,细胞核大小不均匀(图 1D)。

2.2.2 苦味酸天狼猩红染色 MI 组梗死周边区染成黄色的心肌组织中镶嵌有少量染成红色的胶原纤维(图 2A),DM+MI 组梗死周边区有大量染成红色的胶原纤维增生(图 2B),ghrelin 干预后梗死周边区间质胶原增生明显减轻(图 2C),ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 腹腔注射干预后明显抑制了 ghrelin 的上述效应(图 2D)。各组大鼠胶原容量分数(collagen volume fraction,CFV)(%)见表 2。

表 1 各组大鼠成模前与成模后体质量及血糖变化

Tab.1 Body weight and blood glucose before STZ injection and three months after STZ injection

组别	例数	体质量		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	血糖		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
		成模前	成模后			成模前	成模后		
MI 组	18	197.9 ± 20.8	235.5 ± 5.1	21.796	0.081	5.9 ± 1.4	5.6 ± 1.0	8.032	> 0.050
DM+MI 组	17	205.6 ± 18.1	160.6 ± 4.7	15.964	0.014	5.6 ± 1.0	20.1 ± 4.0	3.555	0.004
DM+MI+ghrelin 组	18	198.3 ± 20.6	158.7 ± 7.9	16.530	0.036	5.8 ± 0.6	20.3 ± 3.1	3.679	0.001
DM+MI+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 组	18	200.4 ± 19.0	150.4 ± 10.1	13.712	0.016	5.6 ± 1.0	20.9 ± 3.2	3.560	0.001

2.3 心肌梗死面积

Masson 染色显示 MI 组梗死周边区染成红色的心肌组织中镶嵌有少量染成蓝色的间质纤维(图 3A),DM+MI 组梗死周边区间质纤维增生明显加重,可见大片染成灰蓝色的间质纤维(图 3B),ghrelin 腹腔注射干预后可见其间质纤维的增生较糖尿病合并心梗明显减少(图 3C),ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 腹腔注射干预后可明显抑制 ghrelin 的上述效应(图 3D)。IPP6.0 计算各组心肌梗死面积的百分比见表 2。

2.4 免疫组织化学检测 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的分布与表达

与 MI 组相比,DM+MI 组 MMP-2 和 MMP-9 表达较多,与胶原纤维的分布一致,细胞浆可见棕黄色沉淀物(图 4B,图 5B)。Ghrelin 干预后可使 MMP-2 和 MMP-9 的表达明显

减少(图 4C,图 5C),[D-Lys3]-GHRP-6 可明显拮抗 ghrelin 的上述效应(图 4D,图 5D)。TIMP-1 在合并糖尿病的组别(包括 DM+MI 组、DM+MI+ghrelin 组及 DM+MI+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 组)较 MI 组明显升高(图 6),但 3 组间无统计学差异(图 6)。其具体 A 值见表 2。

2.5 Western blot 检测 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的表达

与 MI 组相比,Western blot 显示 DM+MI 组 MMP-2 和 MMP-9 表达明显增高(图 7A、B)。Ghrelin 干预后可使 MMP-2 和 MMP-9 的表达明显减少(图 7A、B),[D-Lys3]-GHRP-6 可明显拮抗 ghrelin 的上述效应(图 7A、B)。TIMP-1 在合并糖尿病的组别(包括 DM+MI 组、DM+MI+ghrelin 组及 DM+MI+ghrelin+[D-Lys3]-GHRP-6 组)较 MI 组明显升高(图 7C),但 3 组间无统计学差异(图 7C)。其具体灰度值见表 2。

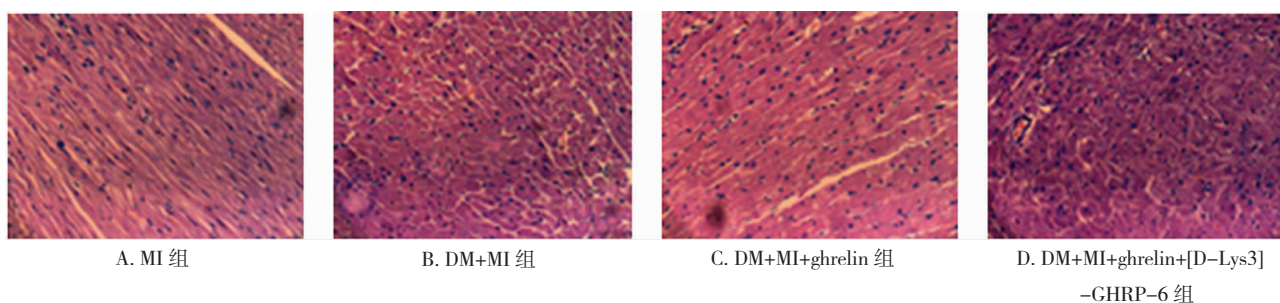


图 1 各组大鼠梗死边缘区心肌组织 HE 染色 (200 ×)
Fig.1 HE staining for infarcted border-zone myocardium (200 ×)

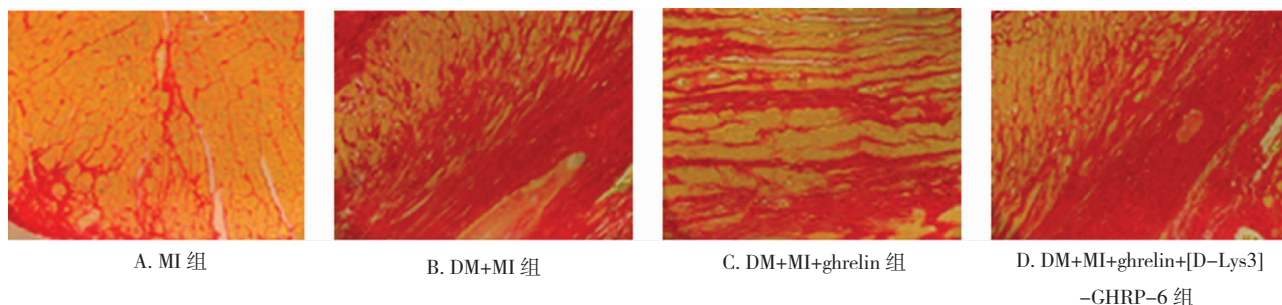


图 2 天狼猩红染色检测梗死区胶原生成 (200 ×)
Fig.2 Sirius red staining for infarcted border-zone myocardium (200 ×)

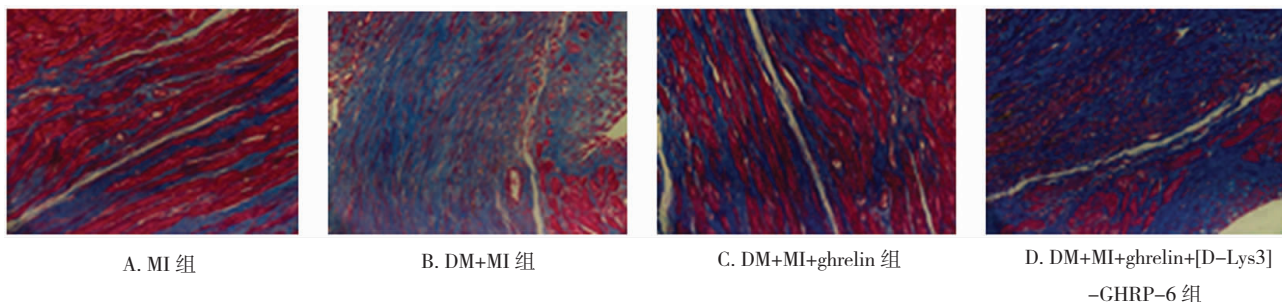


图 3 Masson 染色梗死周边区心肌组织 (200 ×)
Fig.3 Masson staining for infarcted border-zone myocardium (200 ×)

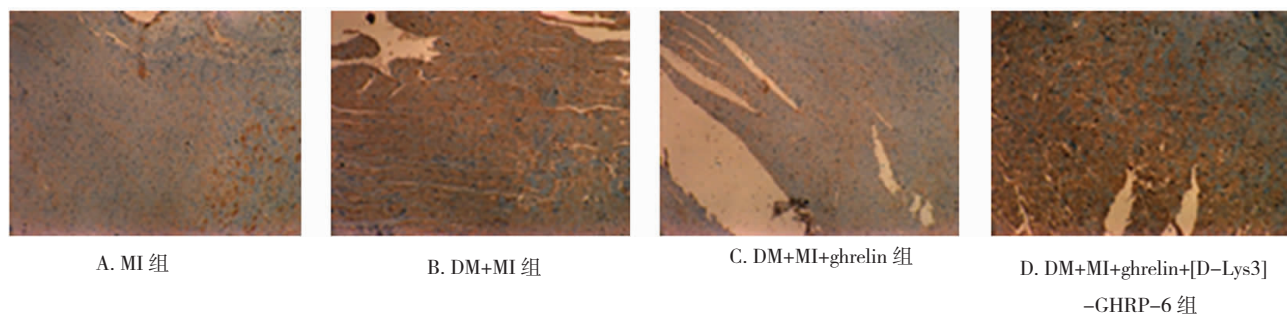


图 4 MMP-2 免疫组化染色 (200 ×)

Fig.4 Immunohistochemistry of MMP-2 expression (200 ×)

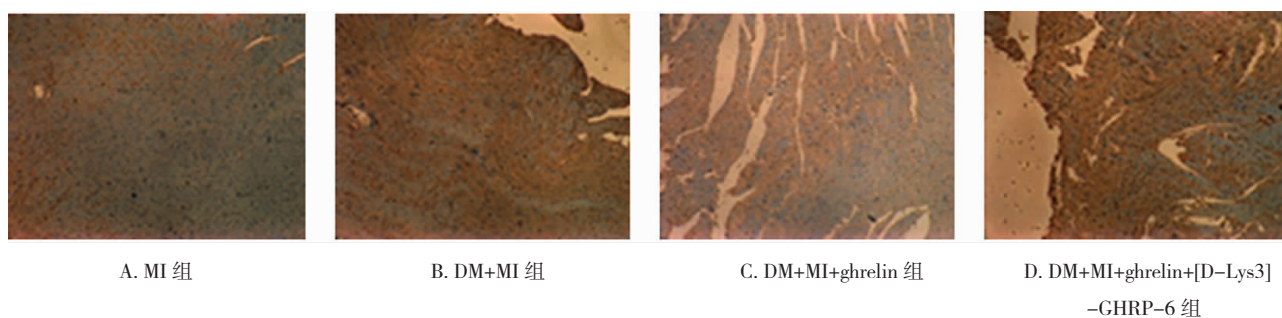


图 5 MMP-9 免疫组化染色 (200 ×)

Fig.5 Immunohistochemistry of MMP-9 expression (200 ×)

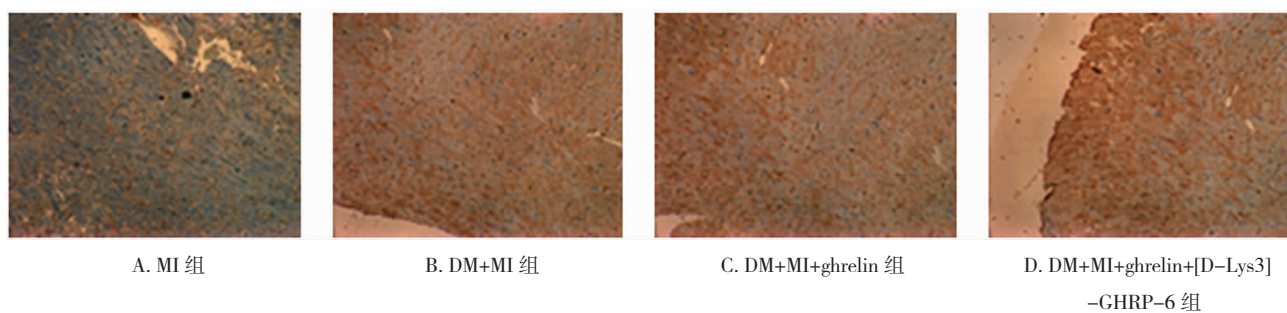


图 6 TIMP-1 免疫组化染色 (200 ×)

Fig.6 Immunohistochemistry of TIMP-1 expression (200 ×)

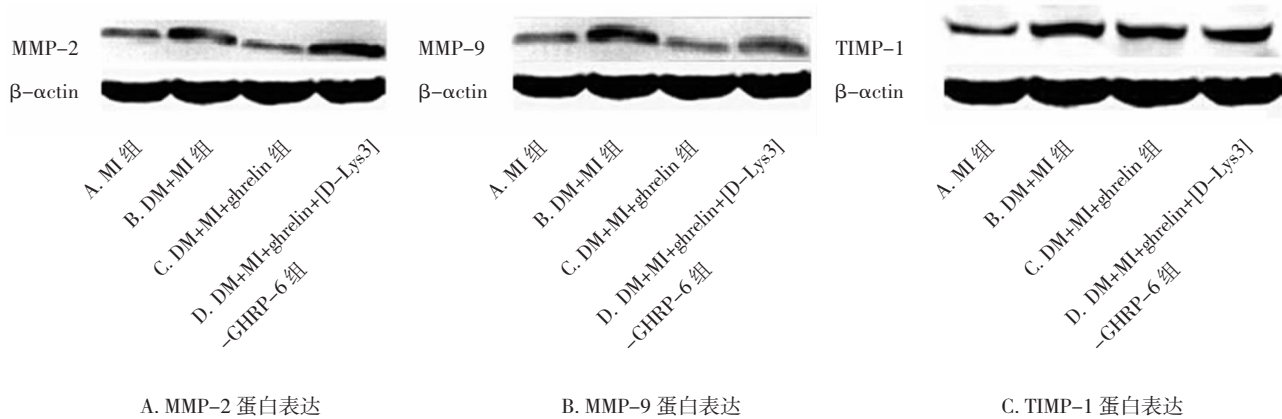


图 7 各组心肌梗死边缘区 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的蛋白表达

Fig.7 Protein expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in infarcted border-zone myocardium

表 2 各组不同指标间的比较
Tab.2 Comparison of different indicators in each group

指标	MI组	DM+MI组	DM+MI+ghrelin组	DM+MI+ghrelin + [D-Lys3]-GHRP-6 组	F 值	P 值	两两比较结果
胶原容量分数 (%)	8.6 ± 0.9	12.0 ± 0.7 ^a	7.6 ± 0.9 ^b	11.7 ± 1.0 ^c	21.482	P=0.000	^a P=0.003 ^b P=0.001 ^c P=0.006
心肌梗死面积 (%)	35.7 ± 2.5	55.8 ± 3.1 ^a	35.4 ± 4.4 ^b	52.1 ± 1.0 ^c	24.564	P=0.000	^a P=0.001 ^b P=0.005 ^c P=0.020
MMP-2 A 值	0.091 ± 0.003	0.294 ± 0.019 ^a	0.196 ± 0.020 ^{a,b}	0.084 ± 0.011 ^c	135.952	P=0.000	^a P=0.000 ^b P=0.001 ^c P=0.000
MMP-9 A 值	0.088 ± 0.006	0.290 ± 0.014 ^a	0.162 ± 0.036 ^b	0.086 ± 0.006 ^c	72.475	P=0.000	^a P=0.000 ^b P=0.001 ^c P=0.022
TIMP-1 A 值	0.081 ± 0.009	0.220 ± 0.030 ^a	0.221 ± 0.030 ^a	0.219 ± 0.024 ^a	23.444	P=0.000	^a P=0.000
MMP-2/β-action	0.217 ± 0.028	0.634 ± 0.009 ^{a,c}	0.348 ± 0.015	0.626 ± 0.012 ^{a,c}	317.133	P=0.000	^a P=0.000 ^c P=0.000
MMP-9/β-action	0.195 ± 0.009	0.438 ± 0.013 ^{a,c}	0.286 ± 0.030	0.437 ± 0.024 ^{a,c}	260.139	P=0.000	^a P=0.000 ^c P=0.000
TIMP-1/β-action	0.235 ± 0.003	0.564 ± 0.008 ^a	0.534 ± 0.030 ^a	0.539 ± 0.015 ^a	347.612	P=0.000	^a P=0.000

注:a,与 MI 组比较;b,与 DM+MI 组比较;c,与 DM+MI+ghrelin 组比较

3 讨 论

Ghrelin主要由胃的 X/A 样细胞(亦称为 Ghrelin 或 Cr 细胞)分泌产生,在左心室、主动脉弓等处亦有 ghrelin 的少量合成,并以自分泌和/或旁分泌的形式作用于局部组织、细胞^[15-16]。GHSR 是典型的 G 蛋白偶联受体家族中的一员,其有 2 个亚型,分别为 GHSR-1a、GHSR-1b,其中 GHSR-1a 为功能性受体。GHSR 分布广泛,在心脏的左心房、左心室及主动脉、冠状动脉及微血管系统均有广泛表达^[17-21],并通过与其配体 ghrelin 结合来发挥其降低血压^[22-24]、对抗炎症反应^[25-26]、抑制氧化应激反应^[27]、保护血管内皮细胞^[28-29]、改善心衰患者的心脏功能^[30]等一系列心血管系统的保护作用。

此外,Xu 等^[31]研究发现 ghrelin 类似物 hexarelin 可通过与其天然受体 GHSRs 结合来调节基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制剂(MMPs/TIMP)基因和蛋白表达,减少胶原纤维的合成和促进胶原纤维的降解来抑制自发高血压大鼠的心肌纤维化。Pei 等^[32]发现 ghrelin 可通过非 GHSR1a 依赖的 ERK 和 Akt 磷酸化表达抑制阿霉素诱导的 C57BL/6 小鼠心肌纤维化及心肌细胞的凋亡,并改善其心功能。同时,ghrelin 可通过促进 NO 的释放改善大鼠肝脏损伤和纤维化^[11]。Ota 等^[33]亦证实 ghrelin 可抑制系

统性硬化症患者皮肤胶原纤维的产生并抑制其纤维化。以上研究提示 ghrelin 可能广泛参与调节体内组织器官的纤维化,其可能具有潜在的抑制心肌纤维化的效应。

实验证实,高血糖状态下可出现心肌细胞、基质、微血管发生显著变化致使心肌重构。若进一步发生心肌缺血缺氧梗死时,则不仅会出现心肌细胞的凋亡、坏死肥大和心室肌肥厚,还表现为间质纤维胶原合成和降解之间的动态平衡破坏,导致间质成分组成和量的改变,从而出现心室重塑进一步加剧,最终出现严重心力衰竭、甚至死亡。研究发现,ghrelin 不仅具有抑制高血糖对心血管系统和内皮细胞的损害^[34-36],还可能具有潜在抑制心肌纤维化的效应^[31-32],究竟 ghrelin 对糖尿病患者心肌梗死后心肌重构基质金属蛋白酶表达的影响如何,目前尚无研究报道。在本实验中,通过腹腔一次性注射 STZ 构建糖尿病模型,基础饲料喂养 12 周后我们发现合并糖尿病的组别中空腹血糖(fasting plasma glucose,FBG)较单纯心肌梗死组明显升高(均 FBG>16.7 mmol/L),而体质量明显降低,糖尿病大鼠多饮、多尿、多食、明显消瘦,提示已成功构建糖尿病模型。在此基础上进一步构建心肌梗死模型,模拟临床上糖尿病患者长期高血糖损害后继发急性心肌缺血损伤。

进一步通过 HE 染色光镜下观察不同组别大鼠

心肌组织形态,发现糖尿病合并心肌梗死组较单纯心肌梗死组心肌细胞肥大、深染、细胞核大小不一。接着本研究通过苦味酸天狼猩红染色和 Masson 染色检测各组大鼠心梗周边区心肌纤维化、间质纤维的增生情况及计算心肌梗死面积,发现糖尿病心肌梗死组较单纯心肌梗死组心肌纤维化程度明显加重、间质纤维增生明显、梗死周边区胶原容量分数及心肌梗死面积明显增加,提示高血糖对心肌缺血后心肌纤维化的促进效应及对心脏的损害效应。进一步用 ghrelin[200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]腹腔注射干预糖尿病心梗大鼠 4 周,发现 ghrelin 干预后其心肌细胞形态基本完整、无肿大,明显减轻其心肌纤维化、间质纤维的增生,降低其心肌胶原容量分数及心肌梗死面积,提示 ghrelin 可能具有潜在抑制糖尿病大鼠在发生急性心肌缺血损伤后心肌纤维化的效应、减少心肌梗死面积,进一步维持心脏的收缩与泵血功能,具有重要临床意义。

心肌间质的主要成分是胶原蛋白,其作用是维持心肌细胞的排列、协调心肌收缩性和保持左室几何形状。细胞外基质(extracellular matrix,ECM)重塑是导致糖尿病患者心室重构及心脏功能异常的主要病理基础。在正常活体组织,ECM 处于产生和降解的动态平衡中,MMPs 是体内参与 ECM 降解最主要的酶系,是心肌重塑的主要推动力量^[37]。TIMPs 是组织中 MMPs 的天然特异抑制物,MMPs 和 TIMPs 之间的动态平衡是保持 ECM 稳态的重要条件,当两者比例失衡时就会引起正常胶原结构遭到破坏,使缺乏交联结构的不正常胶原纤维增生沉积,引起胶原重构^[38-41]。心脏的胶原纤维以 I、III 型胶原为主,而 MMP-2、MMP-9 的底物主要是明胶、变性的 I、II、III 型胶原。研究证实在心肌梗死后重构期间,心脏 MMP-2、MMP-9 的活性和表达都有增加^[38-41]。TIMP-1 能阻断 MMP-2、MMP-9 与底物结合,从而抑制其溶解胶原和明胶的活性,延缓心室重构的发展^[37]。在本研究中分别通过免疫组织化学染色和 Western blot 检测各组心肌梗死周边区 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的分布与表达,发现糖尿病合并心肌梗死组 MMP-2 和 MMP-9 较单纯心肌梗死组明显增加、与胶原纤维的分布一致、细胞浆可见棕黄色沉淀物,提示 MMP-2 和 MMP-9 表达增加是糖尿病大鼠心梗后心肌重构的重要病理机制。Ghrelin[200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]腹腔注射干预糖尿病心梗大鼠 4 周后,发现其梗死周边区 MMP-2 和 MMP-9 的表达明显减少,提示 ghrelin 可能通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达抑制糖尿病心梗大鼠心肌纤维化。同时发现 TIMP-

1 在合并糖尿病的 3 组中较单纯心肌梗死组明显升高,但合并糖尿病的 3 组间 TIMP-1 的表达无统计学差异。提示 TIMP-1 表达增加亦参与了糖尿病大鼠心梗后心肌重塑,ghrelin 及其拮抗剂腹腔注射干预后,并未影响糖尿病心梗大鼠 TIMP-1 的表达,但 ghrelin 干预后可进一步使 MMPs/TIMP-1 的比值降低,其可降低胶原含量、抑制间质纤维化,从而改善心肌间质重塑。另外,本研究检测到腹腔同时注射 ghrelin[200 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]+GHSR1a 特异性拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6(50 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$)4 周后,可明显拮抗 ghrelin 上述改善糖尿病大鼠心肌梗死后心肌纤维化等效应,提示 ghrelin 的上述效应均是通过 GHSR1a 介导的。

综上所述,本研究结果首次证实了 ghrelin 可改善糖尿病大鼠心肌梗死后心肌纤维化、减少其心肌梗死面积、减轻心肌间质重塑,进一步其维持心肌收缩力,且这种效应可能是通过抑制 MMP-2、MMP-9 的表达来发挥效应的,且依赖于 GHSR1a 的介导。但本实验结果仅仅局限于动物的在体实验研究,究竟 ghrelin 在人体内是否具有相似的作用效果,尚待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Mohammadzadeh F, Desjardins JF, Tsoporis JN, et al. S100B: role in cardiac remodeling and function following myocardial infarction in diabetes[J]. Life Sci, 2013, 92(11): 639-647.
- [2] Martin JH, Connelly KA, Boyle A, et al. Effect of atorvastatin on cardiac remodelling and mortality in rats following hyperglycemia and myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2010, 143(3): 353-360.
- [3] Zhang J, Zhuang P, Lu Z, et al. Suxiaojiuxin Pill enhances atherosclerotic plaque stability by modulating the MMPs/TIMPs balance in apoE-deficient mice[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 64(2): 120-126.
- [4] Cogni AL, Farah E, Minicucci MF, et al. Metalloproteinases-2 and -9 predict left ventricular remodeling after myocardial infarction[J]. Arq Bras Cardiol, 2013, 100(4): 315-321.
- [5] Zayani Y, Allal-Elasmi M, Jacob MP, et al. Abnormal circulating levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in diabetes mellitus[J]. Clin Lab, 2012, 58(7-8): 779-785.
- [6] Lu L, Zhang Q, Pu LJ, et al. Dysregulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to abnormality of left ventricular geometry and function in streptozotocin-induced diabetic minipigs[J]. Int J Exp Pathol, 2008, 89(2): 125-137.
- [7] Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, et al. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects[J]. Diabetes Metab, 2007, 33(2): 129-134.
- [8] Tesaro M, Schinzari F, Iantorno M, et al. Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome[J]. Circulation, 2005, 112(19): 2986-2992.

- [9] Zhao H, Liu G, Wang Q, et al. Effect of ghrelin on human endothelial cells apoptosis induced by high glucose[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 677–681.
- [10] Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, et al. Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(5): 573–577.
- [11] Kabil NN, Seddiek HA, Yassin NA, et al. Effect of ghrelin on chronic liver injury and fibrogenesis in male rats: Possible role of nitric oxide[J]. *Peptides*, 2014(52): 90–97.
- [12] Xu X, Ding F, Pang J, et al. Chronic administration of hexarelin attenuates cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(6): H703–711.
- [13] Ota Y, Kawaguchi Y, Takagi K, et al. Ghrelin attenuates collagen production in lesional fibroblasts from patients with systemic sclerosis[J]. *Clin Immunol*, 2013, 147(2): 71–78.
- [14] Pei X, Yung BY, Yip SP, et al. Desacyl ghrelin prevents doxorubicin-induced myocardial fibrosis and apoptosis via GHSR-independent pathway[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(3): E311–323.
- [15] Iglesias MJ, Piñeiro R, Blanco M, et al. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(3): 481–488.
- [16] Kleinz MJ, Maguire JJ, Skepper JN, et al. Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl Ghrelin in the regulation of vascular tone in man[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(1): 227–235.
- [17] Wang L, Chen Q, Li G, et al. Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1a-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells[J]. *Peptides*, 2012, 33(1): 92–100.
- [18] 王丽, 陈庆伟, 李桂琼, 等. 生长激素分泌受体的内源性配体 ghrelin 促进大鼠心肌微血管内皮细胞体外血管生成[J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40(1): 50–56.
- [19] Chen X, Chen Q, Wang L, et al. Ghrelin induces cell migration through GHSR1a-mediated PI3K/Akt/eNOS/NO signaling pathway in endothelial progenitor cells[J]. *Metabolism*, 2013, 62(5): 743–752.
- [20] 王丽, 陈庆伟, 李桂琼, 等. Ghrelin 对骨髓源性内皮祖细胞迁移功能的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(10): 16–23.
- [21] Wang Y, Narsinh K, Zhao L, et al. Effects and mechanisms of ghrelin on cardiac microvascular endothelial cells in rats[J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(2): 135–140.
- [22] 王丽, 陈庆伟. Ghrelin 与动脉粥样硬化[J]. *心血管病学进展*, 2010, 31(6): 476–478.
- [23] 王丽, 陈庆伟. 冠心病患者血浆 ghrelin 水平与基因多态性的研究[J]. *临床心血管病杂志*, 2009, 25(12): 933–937.
- [24] Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, et al. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats[J]. *Hypertension*, 2004, 43(5): 977–982.
- [25] Li WG, Gavrilu D, Liu X, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B activation in human endothelial cells[J]. *Circulation*, 2004, 109(18): 2221–2226.
- [26] Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(1): 57–66.
- [27] Hedayati N, Annambhotla S, Jiang J, et al. Growth hormone-releasing peptide ghrelin inhibits homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human endothelial cells[J]. *J Vasc Surg*, 2009, 49(1): 199–207.
- [28] Zhao H, Liu G, Wang Q, et al. Effect of ghrelin on human endothelial cells apoptosis induced by high glucose[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 677–681.
- [29] Tesouro M, Schinzari F, Iantorno M, et al. Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome[J]. *Circulation*, 2005, 112(19): 2986–2992.
- [30] Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(2): 146–151.
- [31] Xu X, Ding F, Pang J, et al. Chronic administration of hexarelin attenuates cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(6): H703–711.
- [32] Pei X, Yung BY, Yip SP, et al. Desacyl ghrelin prevents doxorubicin-induced myocardial fibrosis and apoptosis via GHSR-independent pathway[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(3): E311–323.
- [33] Ota Y, Kawaguchi Y, Takagi K, et al. Ghrelin attenuates collagen production in lesional fibroblasts from patients with systemic sclerosis[J]. *Clin Immunol*, 2013, 147(2): 71–78.
- [34] Tesouro M, Schinzari F, Iantorno M, et al. Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome[J]. *Circulation*, 2005, 112(19): 2986–2992.
- [35] Zhao H, Liu G, Wang Q, et al. Effect of ghrelin on human endothelial cells apoptosis induced by high glucose[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 677–681.
- [36] Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, et al. Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(5): 573–577.
- [37] Hijova E. Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2005, 106(3): 127–132.
- [38] Cheng Z, Ou L, Liu Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor exacerbates cardiac fibrosis after myocardial infarction in a rat model of permanent occlusion[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 80(3): 425–434.
- [39] Yang D, Ma S, Li D, et al. Angiotensin II receptor blockade improves matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 balance and restores fibronectin expression in rat infarcted myocardium[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(3): 606–611.
- [40] Mukherjee R, Snipes JM, Saunders SM, et al. Discordant activation of gene promoters for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of the metalloproteinases following myocardial infarction[J]. *J Surg Res*, 2012, 172(1): 59–67.
- [41] Kuliczowski W, Urbaniak J, Hallén J, et al. Matrix metalloproteinases and the activity of their tissue inhibitors in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty[J]. *Kardiologia Pol*, 2013, 71(5): 453–463.

(责任编辑: 冉明会)