

基础研究

DOI:10.11699/cyxb20131125

替米沙坦对大鼠心肌肥厚组织中 Raf/MEK/ERK 信号通路的影响

屈春生¹, 陈莉萍¹, 李道麟²

(1. 河南科技大学第二附属医院心血管内科, 洛阳 471000; 2. 河南科技大学第一附属医院心血管内科, 郑州 450014)

【摘要】目的:观察替米沙坦对心肌肥厚大鼠左室心肌组织中 Raf/MEK/ERK 信号通路的影响。**方法:**清洁级健康 SD 大鼠 30 只, 随机分为对照组、模型组和干预组 3 组, 每组 10 只。模型组和干预组给予异丙肾上腺素皮下注射, 干预组在给予异丙肾上腺素注射同时灌胃应用替米沙坦, 对照组给予生理盐水皮下注射。进行心肌相关指数、病理学检测, 并采用 RT-PCR 方法检测大鼠左心室心肌房钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 表达, 检测模型建立成功情况; 模型建立成功后, 各组大鼠取左心室心肌组织采用免疫组化检测磷酸化 Raf (phosphorylation of Raf, p-Raf) 和磷酸化细胞外调节激酶 1/2 (phosphorylation of extracellular regulated protein kinase1/2, p-ERK1/2) 表达。**结果:**模型组 p-Raf 阳性区域平均积分光密度明显高于对照组 ($P=0.000$), 干预组介于模型组与对照组之间 ($P=0.041$, $P=0.031$); 模型组 p-ERK1/2 阳性区域平均积分光密度明显高于对照组 ($P=0.000$), 干预组介于模型组与对照组之间 ($P=0.0039$, $P=0.023$)。**结论:**替米沙坦可能抑制 p-Raf、p-ERK1/2 蛋白表达而抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路激活, 具有抗心肌肥厚的作用。

【关键词】心肌肥厚; 替米沙坦; 磷酸化; 磷酸化细胞外调节激酶 1/2

【中国图书分类法分类号】R542.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-17

Effect of telmisartan on Raf/MEK/ERK single pathway in rats with myocardial hypertrophy

QU Chunsheng¹, CHEN Liping¹, LI Daolin²

(1. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of telmisartan on Ras/Raf/ERK1/2 signal pathway in rats with myocardial hypertrophy. **Methods:** Totally 30 rats were randomly divided into 3 groups including control group, model group and intervention group. Each group has 10 rats. Hypodermic injection of normal saline was applied in control group; hypodermic injection of isoproterenol was applied in model group; hypodermic injection of isoproterenol and telmisartan was applied in intervention group. Myocardial index and pathological detections were performed. RT-PCR assay was used to detect ANP mRNA expression. After the model was successfully made, rats' left cardiac tissues were collected and p-Raf protein and p-ERK1/2 protein expression was detected by immunohis-

作者介绍: 屈春生, Email: quchunsheng1964@1626.com,

研究方向: 心血管内科。

Gao Y, Tang Y L, Liu H L. 186 e viral hepatitis patients serum liver enzyme index analysis[J]. Journal of Regional Anatomy and Operative Surgery, 2011, 20 (6): 694.

[5] 王 东, 郑艳华, 黄维星. 急性脑血管病与血清心肌酶学改变的关系[J]. 中国误诊学志, 2007, 7(22): 5285-5285.

Wang D, Zheng Y H, Huang W X. Acute cerebrovascular disease and the relationship between serum myocardial enzyme changes[J]. Chinese Journal of Misdiagnosis, 2007, 7(22): 5285-5285.

[6] 黄学成, 陈青萍, 袁智萍, 等. QT 离散度对大面积急性心肌梗死患者早期恶性心脏事件的预测价值[J]. 广西医科大学学报, 2010, 27 (4): 575-576.

Huang X C, Chen Q P, Yuan Z P, et al. Degree of QT dispersion of large areas of early malignant cardiac events in patients with acute myocar-

dial infarction predicted value[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2010, 27(4): 575-576.

[7] 杨利荣, 陈国兵, 张艳芳, 等. 急性心肌梗死患者 QT 离散度与预后相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(3): 167-169.

Yang L R, Chen G B, Zhang Y F, et al. QT dispersion degree and the prognosis of patients with acute myocardial infarction correlation studies[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2011, 27(3): 167-169.

[8] 周少华, 付守芝. 急性脑卒中时血清心肌酶学及心电图 QT 离散度的变化研究[J]. 中华急诊医学志, 2005, 14(5): 428-429.

Zhou S H, Fu S Z. Acute cerebral apoplexy in serum myocardial enzyme and the change of electrocardiogram QT dispersion degree study [J]. Chinese Journal of Emergency Medicine, 2005, 14 (5): 428-429.

(责任编辑: 冉明会)

tochemistry. **Results:** Average integral optical density in p-Raf positive area was the highest in model group ($P=0.000$) followed by intervention group and control group ($P=0.041, P=0.031$). Average integral optical density in p-ERK1/2 positive area was the highest in model group ($P=0.000$) followed by intervention group and control group ($P=0.0039, P=0.023$). **Conclusions:** Telmisartan resists myocardial hypertrophy since it can reduce expressions of Raf protein and ERK1/2 and inhibit the activation of Raf/MEK/ERK signal pathway

【Key words】myocardial hypertrophy; telmisartan; phosphorylation of Raf; phosphorylation of extracellular regulated protein kinase1/2 (p-ERK1/2)

心肌肥厚作为心肌对各种致肥厚因素的代偿性反应,是心力衰竭、心律失常和心脏猝死独立危险因素^[1]。肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)过度激活参与了心肌肥厚进程,其机制与 Raf/MEK/ERK 信号通路激活有关^[2],因此抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路激活可抑制心肌肥厚的发生发展。研究表明 Raf/MEK/ERK 信号通路激活主要表现在磷酸化 Raf(phosphorylation of Raf, p-Raf)和磷酸化细胞外调节激酶 1/2 (phosphorylation of extracellular regulated protein kinase1/2, p-ERK1/2)的表达升高^[3]。p-Raf 可通过级联反应磷酸化 ERK1/2,而 ERK1/2 可以调节细胞质和细胞核多种靶蛋白,这些蛋白共同组成了 Ras/Raf/ERK1/2 信号通路,涉及到心肌肥厚的发生。替米沙坦作为一种 ARB 类药物,可阻止血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)与血管紧张素受体结合而抑制 Ras/Raf/ERK1/2 信号通路的激活,而心肌肥厚的发生包括 Ras/Raf/ERK1/2 信号通路的激活,因此 ARB 抑制心肌肥厚可能是通过此通路实现的。本研究旨在观察替米沙坦干预下大鼠肥厚心肌组织中 p-Raf 和 p-ERK1/2 的表达,探讨替米沙坦抗心肌肥厚的作用机制,为临床治疗心肌肥厚提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 要仪器及试剂

ASB240U 生物信号采集分析系统(成都遨生电子有限公司)、Biosens Digital Imaging System v1.6(上海山富科学仪器有限公司)、异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司,批号 101104, 2 ml/mg)、替米沙坦(勃林格殷格翰提供, 80 mg/片)、Bio Rad PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)、逆转录试剂盒及 PCR 扩增试剂盒(Fermentas)、兔抗大鼠 p-Raf 抗体(BioBasic)、兔抗大鼠 p-ERK1/2 抗体(BioBasic)。

1.2 实验分组及模型建立

选取 8~10 周龄清洁级健康雌性 SD 大鼠 30 只,购自河南省实验动物中心(合格证号:410118),体质量 200~220 g。将动物按随机数字表法随机分为 3 组:对照组、模型组和干预组,每组 10 只。对照组背部皮下注射生理盐水 6 ml/kg,模

型组和干预组背部皮下注射异丙肾上腺素 3 mg/kg,连续 10 d。干预组在给予异丙肾上腺素的同时,给予替米沙坦 8.33 mg/kg 灌胃,对照组和模型组予等量生理盐水灌胃。

1.3 心脏指数测定

建模成功的大鼠进行血液动力学测定,之后分别称体质量(body mass, BM),麻醉后迅速开胸采集大鼠心脏,去掉心脏旁缀(周围组织和血管等),培养皿盛放,用 4 ℃生理盐水冲洗,滤纸吸干,用天平称全心湿质量(heart mass, HM)和左室湿质量(包括室间隔)(left ventricular mass, LVM),计算心脏指数(HM/BM)和左室指数(LVM/BM),判断心肌肥厚程度。

1.4 心肌病理学检查

每只大鼠分别取左室心肌 1 块,迅速放入液氮中保存,剩余左心室组织经福尔马林固定,常规石蜡包埋制片,HE 染色,在光镜(200×)下观察心肌组织形态变化。

1.5 心肌组织心房钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP) mRNA 的检测

无菌采取大鼠左室心肌 1 块,Trizol 法提取总 RNA,按照 Fermentas 逆转录试剂盒说明书操作步骤,取 2.5 μg 总 RNA,在 M-MVL 酶作用下逆转录得 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。内参 β-actin 引物序列:上游 5'-CCCATC-TATGAGGGTTACGC-3',下游 5'-TTTAATGTCACGCACGA-TTTC-3',扩增片段 150 bp;ANP 引物序列:上游 5'-CTAGA-CCACCTGGAGGAGAAGA-3',下游 5'-GCTCCAATCCTGT-CAATCTAC-3',扩增片段 290 bp。反应条件:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μl,琼脂糖凝胶中电泳,用 Gel-Pro 凝胶扫描成像仪采集图像并分析,以 ANP 与 β-actin 条带光密度的比值表示 ANP mRNA 的相对表达量。

1.6 心肌组织 p-Raf 和 p-ERK1/2 蛋白的检测

心肌组织切片脱蜡,根据 SP 试剂盒说明进行操作,修复抗原山羊血清封闭,分别加入兔抗大鼠 p-Raf 抗体(1:300)和 p-ERK1/2 抗体(1:300)4 ℃孵育过夜,DAB 显色,在光镜下观察 p-Raf 和 p-ERK1/2 蛋白表达并采用 Biosens Digital Imaging System v1.6 图像分析系统采集图像行半定量分析。p-Raf 和 p-ERK1/2 蛋白阳性反应信号呈棕黄色,以阳性区平均积分光密度表示 p-Raf 和 p-ERK1/2 蛋白的相对表达量。

1.7 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较用单因素资料方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心室肥厚指数比较

与对照组相比,模型组和干预组的 HM/BM、LVM/BM 均明显增加,但干预组的变化幅度小于模型组(表 1),经统计学分析,3 组之间具有统计学差异 ($F=5.735, P=0.026; F=5.174, P=0.036$),模型组明显高于对照组 ($P=0.000, P=0.000$),干预组低于模型组 ($P=0.046, P=0.043$),干预组高于对照组 ($P=0.038, P=0.047$),提示替米沙坦应用于心肌肥厚大鼠治疗后, HM/BM 及 LVM/BM 明显下降。

表 1 大鼠心肌肥厚指数的变化 (mg/g)

Tab.1 Changes in myocardial hypertrophy index of rats (mg/g)

组别	例数 (n)	HM/BM	LVM/BM
对照组	10	3.04 ± 0.02	2.21 ± 0.01
模型组	10	4.26 ± 0.03^{ac}	3.16 ± 0.09^{df}
干预组	10	3.42 ± 0.01^b	2.57 ± 0.07^e
F 值		5.753	5.174
P 值		0.026	0.036

注: HM/BM: a, 模型组与对照组比较, $P=0.000$ 为; b, 干预组与对照组比较, $P=0.038$; c, 干预组与模型组比较, $P=0.046$; LVM/BM: d, 模型组与对照组比较, $P=0.000$; e, 干预组与对照组比较, $P=0.047$; f, 干预组与模型组比较 $P=0.043$

2.2 大鼠心肌组织病理学表现

对照组大鼠心肌细胞排列规律整齐(图 1A); 模型组大鼠心肌细胞排列紊乱, 大量的心肌纤维增生并伴有炎性渗出(图 1B); 干预组介于对照组和模型组之间(图 1C), 心肌细胞出现紊乱, 心肌纤维增生。

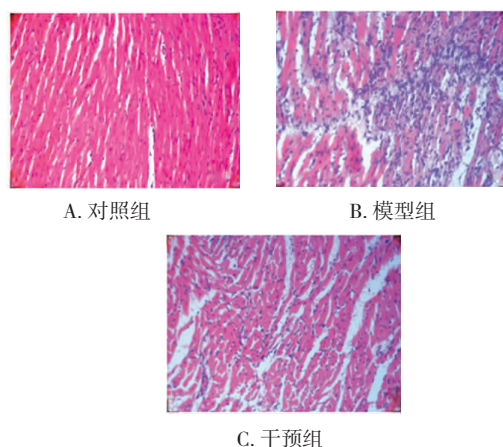


图 1 大鼠心肌组织病理学表现 (HE, 200 ×)

Fig.1 Pathological manifestation of myocardial tissues of rats (HE, 200 ×)

2.3 大鼠心肌组织 ANP mRNA 的表达

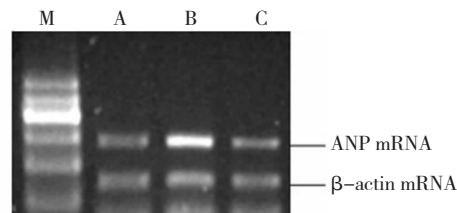
与对照组相比,模型组和干预组 ANP mRNA 增高 ($LSD-t=2.67, P=0.000; LSD-t=1.85, P=0.047$); 与模型组相比,干预组 ANP mRNA 的表达降低 ($LSD-t=1.94, P=0.039$), 见表 2、图 2。

表 2 大鼠心肌组织 ANP mRNA 相对表达量 (OD 值 = ANP mRNA/β-actin mRNA)

Tab.2 Relative expression of ANP mRNA in myocardial tissues of rats

组别	例数 (n)	ANP mRNA
对照组	10	0.07 ± 0.33
模型组	10	0.26 ± 0.56^{ac}
干预组	10	0.17 ± 0.49^b

注: $F=4.810, P=0.032$; a, 模型组与对照组相比, $P=0.000$; b, 干预组与对照组相比, $P=0.047$; c, 模型组与干预组相比, $P=0.039$



M. Mark (DL1000); A. 对照组; B. 模型组; C. 干预组

图 2 大鼠心肌组织 ANP mRNA 表达结果

Fig.2 Expression of ANP mRNA in myocardial tissues of rats

2.4 大鼠心肌组织 p-Raf 和 p-ERK1/2 蛋白的表达

在光镜 (400 ×) 下可见棕黄区域为特异性结合 p-Raf 和 p-ERK1/2 部位。与对照组相比,模型组和干预组的 p-Raf 和 p-ERK1/2 蛋白表达明显升高; 与模型组相比,干预组 p-Raf 和 p-ERK1/2 蛋白表达明显减低, 见表 3、图 3、4。

表 3 大鼠 p-Raf 和 p-ERK1/2 表达

Tab.3 Expression of p-Raf protein and p-ERK1/2 in myocardial cells of rats

组别	例数 (n)	p-Raf	p-ERK1/2
对照组	10	115.94 ± 4.06	92.03 ± 7.34
模型组	10	160.72 ± 11.49^a	154.23 ± 4.02^d
干预组	10	133.28 ± 2.73^{bc}	129.24 ± 3.49^{ef}
F 值		5.380	5.763
P 值		0.036	0.031

注: p-Raf: a, 模型组与对照组比较, $P=0.000$; b, 干预组与对照组比较, $P=0.031$; c, 干预组与模型组比较, $P=0.410$; p-ERK1/2: d, 模型组与对照组比较, $P=0.000$; e, 干预组与对照组比较, $P=0.023$; f, 干预组与模型组比较, $P=0.390$

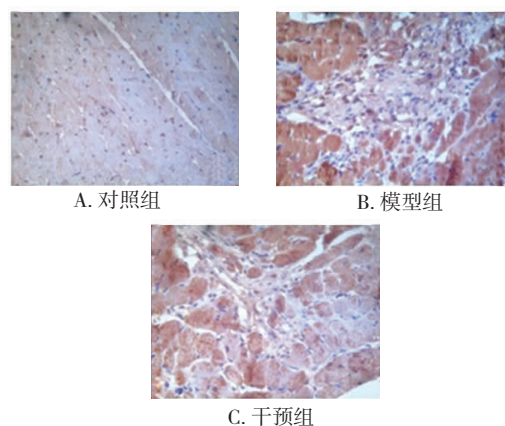
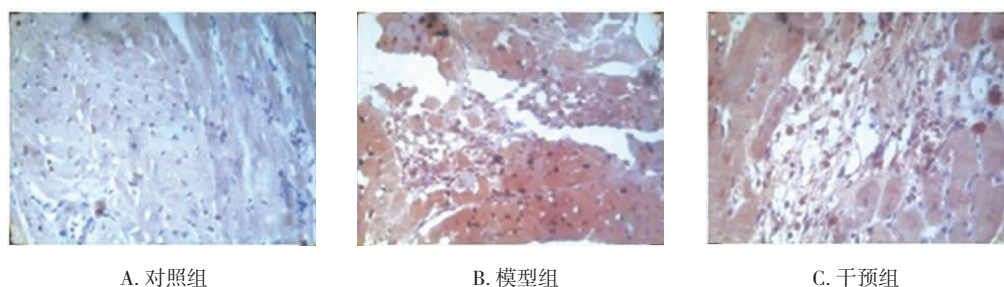


图 3 大鼠心肌细胞中 p-Raf 蛋白的表达 (SP, 400 ×)

Fig.3 Expression of p-Raf protein in myocardial cells of rats (SP, 400 ×)



A. 对照组

B. 模型组

C. 干预组

图 4 大鼠心肌细胞中 p-ERK1/2 蛋白的表达 (SP, 400 ×)

Fig.4 Expression of p-ERK1/2 protein in myocardial cells of rats (SP, 400 ×)

3 讨论

本实验使用儿茶酚胺类药物异丙肾上腺素诱导成功建立大鼠心肌肥厚模型^[4],检测大鼠模型心肌组织 p-Raf 与 p-ERK1/2 蛋白表达情况,分析心肌肥厚与 Raf/MEK/ERK 信号通路的联系,以探讨替米沙坦在逆转心肌肥厚方面可能存在的机制。该机制主要是通过异丙肾上腺素与 β 受体结合使 RAAS 过度激活而实现的。而在造模同时予替米沙坦干预后大鼠心脏质量指数、左心室质量指数和 ANP mRNA 趋于正常,心肌细胞排列较规整,说明替米沙坦能有效防止心肌肥厚发生,该作用与抑制 RAAS 的过度激活有关^[5],而 RAAS 的过度激活主要与 Ras 信号通路有关。Ras 信号通路涉及多种疾病的发生如肿瘤和心肌肥厚,该通路被激活后首先使位于细胞膜内侧的 p-Ras 蛋白活化为 Ras-GTP,其可以使下游 Raf 磷酸化。Raf 以级联反应的方式调节涉及到心肌肥厚发生的相关靶蛋白如转录因子、细胞骨架蛋白、蛋白激酶调节因子等。同时磷酸化 Raf 又可以活化 Ras 蛋白,使其保持 Ras-GTP 状态维持 Ras 信号通路不断激活,最终使心脏由心肌肥厚逐渐发展至心力衰竭^[6],因此抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路是阻遏心肌肥厚至心力衰竭的关键。

本实验研究结果提示:心肌肥厚模型组与正常心肌组织相比,p-Raf 和 p-ERK1/2 在心肌肥厚组织中表达明显增多,说明 p-Raf 和 p-ERK1/2 可能是心肌肥厚的正性调节因子,提示 Ras/Raf/ERK1/2 信号通路过度激活,可能是因为此通路的过度激活导致了心肌肥厚的发生,因此本研究认为有效抑制

Raf/MEK/ERK 信号通路激活也许可以有效抑制心肌肥厚的发生。同时本实验发现替米沙坦干预下的肥厚心肌组织 p-Raf 和 p-ERK1/2 表达减少,提示替米沙坦作为 ARB 能够阻断 Raf/MEK/ERK 信号通路激活,这可能是其抗心肌肥厚的新机制。但是替米沙坦通过怎样的途径来抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路激活目前尚不清楚。综上所述,替米沙坦抗心肌肥厚机制可能与抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路激活有关,但具体机制仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Milani R V, Drazner M H, Lavie C J, et al. Progression from concentric left ventricular hypertrophy and normal ejection fraction to left ventricular dysfunction[J]. Am J Cardiol, 2011, 108(7): 992-996.
- [2] Zhang P, Mende U. Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets[J]. Circ Res, 2011, 109(3): 320-333.
- [3] Bueno O F, Molkentin J D. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death[J]. Circ Res, 2002, 91(9): 776-781.
- [4] Wright J W, Mizutani S, Harding J W. Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure[J]. Heart Fail Rev, 2008, 13(3): 367-375.
- [5] Mantziari L, Guha K, Khaligue Z, et al. Relation of dosing of the renin-angiotensin system inhibitors after cardiac resynchronization therapy to long-term prognosis[J]. Am J Cardiol, 2012, 109(11): 1619-1625.
- [6] Lorenz K, Schmitt J P, Vidal M, et al. Cardiac hypertrophy: targeting Raf/MEK/ERK1/2 signaling[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(12): 2351-2355.

(责任编辑:冉明会)