

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000145

培哚普利对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚中碱性成纤维细胞生长因子-2 的影响

辛 颖,赵玉兰,董 静,黄亚萍

(郑州大学第二附属医院心内科,郑州 450014)

【摘要】目的:探讨培哚普利对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)所致心肌肥厚大鼠碱性成纤维细胞生长因子-2(basic fibroblast growth factor, bFGF-2)表达的影响。**方法:**将研究大鼠分为对照组、模型组及药物干预组,对照组大鼠背部行皮下注射生理盐水;模型组大鼠皮下注射 ISO;药物干预组大鼠皮下注射 ISO,培哚普利片灌胃,称量计算各组大鼠左心室质量/体质量(left ventricular mass/body mass, LVM/BM)和全心质量/体质量(heart mass/body mass, HM/BM)并进行对比,应用免疫组化及逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)的方法比较各组大鼠左心室中 bFGF-2 含量,3 组大鼠 LVM/BM 和 HM/BM。**结果:**大鼠 LVM/HM、HM/BM 比较,对照组<药物干预组<模型组,组间比较差异有统计学意义($F=25.220, P=0.000; F=76.761, P=0.000$)。免疫组化及 RT-PCR 显示药物干预组中 bFGF-2 mRNA 含量高于对照组,但低于模型组($P=0.000, P=0.038$)。**结论:**通过皮下注射 ISO 能成功制备心肌肥厚大鼠模型。bFGF-2 对大鼠心肌肥厚具有促进作用,培哚普利可通过降低 bFGF-2 表达抑制心肌肥厚。

【关键词】心肌肥厚;碱性成纤维细胞生长因子-2;培哚普利;逆转录聚合酶链反应

【中图分类号】R542.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-09-08

Effects of perindopril on bFGF-2 expression in isoproterenol-induced myocardial hypertrophy of rats

Xin Ying, Zhao Yulan, Dong Jing, Huang Yaping

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of perindopril on basic fibroblast growth factor(bFGF-2) expression in isoproterenol(ISO)-induced cardiac hypertrophy of rats. **Methods:** The research rats were randomly divided into three groups and 10 rats in each group: control group, model group(3mg/(kg·d) isoproterenol for 10 d) and intervention group(3 mg/(kg·d) isoproterenol and 1 mg/(kg·d) perindopril for 10 d). Left ventricular mass/body mass(LVM/BM) and heart mass/body mass(HM/BM) were detected and compared; in addition, FGF-2 mRNA and protein in left ventricular tissues were analyzed by RT-PCR and immunohistochemistry. **Results:** Results of LVM/BM and HM/BM in the 3 groups were: control group<intervention group<model group, with statistically differences among groups($F=25.220, P=0.000; F=76.761, P=0.000$). Results of RT-PCR and immunohistochemistry: bFGF-2 mRNA in the intervention group was higher than that in control group, but lower than that in model group obviously($P=0.000, P=0.038$). **Conclusions:** Subcutaneous injection of isoproterenol can successfully prepare rat model of myocardial hypertrophy. bFGF-2 may promote cardiac hypertrophy process of rats and perindopril can inhibit cardiac hypertrophy by reducing bFGF-2 expression.

【Key words】cardiac hypertrophy; basic fibroblast growth factor; perindopril; reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)

心肌肥厚作为最常见的心脏早期病理变化之一,由机械张力及神经内分泌因素共同作用产生,其中神经内分泌因素包括肾素-血管紧张素系统、儿茶酚胺及一系列生长因子等^[1]。成纤维生长因子

是一组多肽形成纤维细胞的有丝分裂原,包括酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),具有促进血管、骨形成和损伤修复的功能^[2]。国外研究表明, bFGF 与心肌细胞表达的功能性受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)结合,诱导酪氨酸磷酸化级联反应,影响心肌肥厚的发生发展。本实验采用逆转录聚合酶链反应

作者介绍:辛 颖, Email: xiny125@126.com,

研究方向:冠心病及心力衰竭病因研究。

通信作者:赵玉兰, Email: zyl6616@126.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000145.html>

(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫组化的方法比较 bFGF-2 在正常大鼠、心肌肥厚大鼠、药物干预组大鼠心肌组织中的表达,了解 bFGF-2 影响心肌肥厚发生发展的机制以及培哚普利片对其的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

健康雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠 30 只,体质量 250~300 g,由郑州大学实验动物中心提供。盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)注射液 2 ml/1 mg,上海禾丰制药有限公司生产,批号 120801。培哚普利片 4 mg/片,由施维雅制药有限公司提供。琼脂糖粉(上海生化试剂公司),Trizol Reagent (Transgene 公司),一抗为兔抗大鼠 GATA4 多克隆抗体,RT-PCR 试剂盒、PCR 引物、DNAmark 由北京全式金生物技术有限公司生产。

1.2 实验动物模型制备

将 30 只大鼠应用随机数表法随机分为 3 组(每组 10 只)。①模型组:大鼠皮下注射 ISO 3 mg/(kg·d);②药物干预组:大鼠皮下注射 ISO 3 mg/(kg·d)+培哚普利 1 mg/(kg·d)溶于 2 ml 饮用水中灌胃;③对照组:大鼠皮下注射等剂量的生理盐水+等剂量生理盐水灌胃;连续 10 d。

1.3 心脏质量参数测定

测量注射 10 d 后 3 组大鼠的体质量(body mass, BM)。麻醉后迅速开胸取出心脏,剪去心脏周围组织和血管,称全心质量(heart mass, HM),沿冠状沟剪去左心房,沿室间沟剪去右室游离壁,称左心室质量(包括室间隔)(left ventricular mass, LVM),计算 HM/BM、LVM/HM 来判断心肌肥厚程度。将左心室分为 2 份,1 份放入 4%多聚甲醛中固定 24 h 后取出,石蜡包埋切片,另 1 份心肌组织放入液氮中储存。

1.4 免疫组化观察 bFGF-2 含量

切片脱蜡至水,修复抗原,加 bFGF-2 抗体,根据 SP 试剂盒进行操作,DAB 显色,图像采集后分析结果。

1.5 RT-PCR 检测 bFGF-2 表达

心肌组织总 RNA 的提取按说明书进行。以 3-磷酸甘油醛

脱氢酶(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参照。GAPDH:上游:5'-CACGGCAAGTTCAACGGCACA-3';下游:5'-GCGGCATGTCAGATCCACAACG-3';长度:589 bp,退火温度:58 ℃。设计 bFGF-2 引物序列及长度:bFGF-2:上游:5'-GGAGAAGAGCGACCCACA-3';下游:5'-AGGCC-TTCAAAGAAGAAACA-3',长度 589 bp,退火温度 58 ℃。琼脂糖凝胶电泳:取 5 μ l 扩增产物与缓冲液混合后加入琼脂糖凝胶的加样孔中,进行电泳。EB 染色,在紫外线投射仪下观察电泳条带,用 D-140 图像记录分析系统进行分析,目的基因 bFGF-2 mRNA 的表达量以 bFGF-2 mRNA 条带和 GAPDH 的 mRNA 条带灰度值比值计算。

1.6 统计方法

统计用 SPSS 17.0 软件。计量资料用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠 LVM/HM 和 HM/BM 的比较

对照组、模型组及药物干预组大鼠 LVW/HM 和 HW/BM 比较结果均为:对照组<药物干预组<模型组,组间比较有统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠心肌肥厚指标比较 (mg/g)

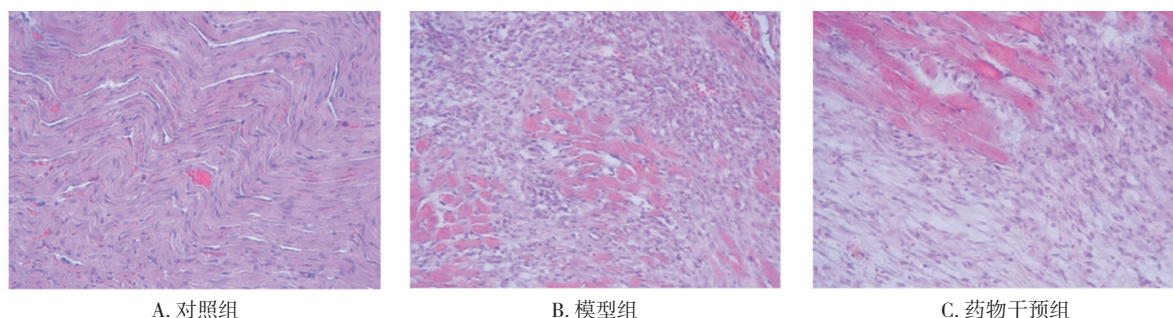
Tab.1 Comparison of indexes of myocardial hypertrophy in three groups (mg/g)

组别	HM/BM	LVM/BM
对照组	1.93 $\pm$ 0.11	1.46 $\pm$ 0.11
模型组	3.79 $\pm$ 0.11	2.49 $\pm$ 0.07
药物干预组	2.71 $\pm$ 0.34	1.96 $\pm$ 0.12
统计结果	$F=76.761, P=0.000$	$F=25.220, P=0.000$

注:HM/BM 中组间两两比较均 $P=0.000$;LVM/HM 中对照组与模型组比较 $P=0.000$,对照组与药物干预组比较 $P=0.002$,模型组和药物干预组比较 $P=0.001$

2.2 3 组大鼠心肌组织病理学表现

对照组心肌细胞排列规律整齐;模型组心肌细胞排列紊乱,大量的心肌纤维增生;药物干预组病理学表现介于对照组和模型组之间。见图 1。



A. 对照组

B. 模型组

C. 药物干预组

图 1 3 组大鼠心肌组织 HE 染色 (200 $\times$)

Fig.1 Results of myocardial tissue HE staining in three groups (200 $\times$)

2.3 免疫组化测定 bFGF-2

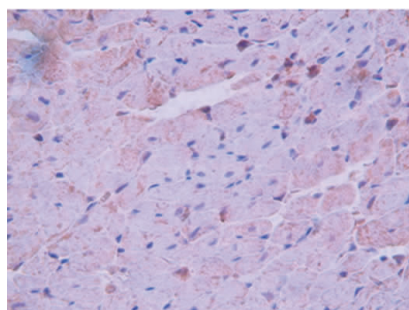
免疫组化染色后 bFGF-2 在心肌细胞中呈棕色颗粒,正常组织中心肌细胞胞浆中可见少量深棕色颗粒,呈微弱阳性表达;模型组中心肌细胞胞浆内可见大量棕色颗粒,呈强阳性表达;干预组中可见棕黄色颗粒,呈阳性表达,较模型组少。组间比较有统计学意义。见表 2 和图 2。

表 2 3 组大鼠心肌组织免疫组化染色阳性区平均灰度

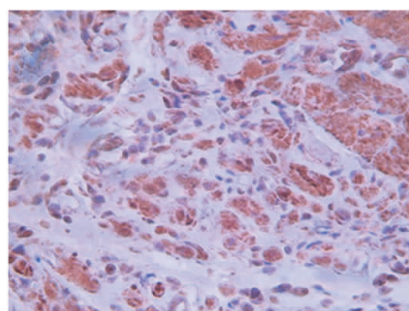
Tab.2 Average grey degree in positive area of myocardial tissue immunohistochemical staining in three groups

组别	阳性区平均灰度
对照组	79.41 ± 7.85
模型组	141.07 ± 9.39
药物干预组	127.11 ± 13.04
统计结果	$F=98.005, P=0.000$

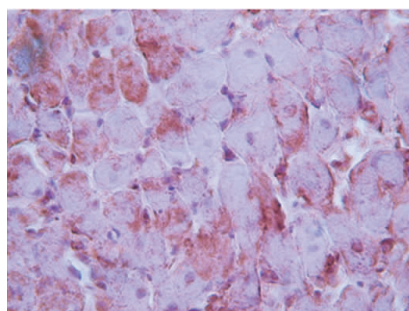
注:对照组和模型组比较 $P=0.000$,对照组和药物干预组比较 $P=0.000$,模型组和药物干预组比较 $P=0.005$



A. 对照组



B. 模型组



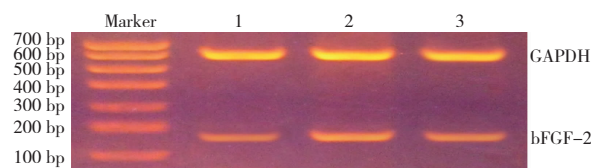
C. 药物干预组

图 2 3 组大鼠心肌组织免疫组化染色 (400×)

Fig.2 Results of myocardial tissue immunohistochemical staining in three groups (400×)

2.4 大鼠肥厚心肌中 bFGF-2 mRNA 的量

通过 RT-PCR 测定心肌肥厚大鼠心肌细胞中 bFGF-2 含量的结果为:对照组<药物干预组<模型组,组间比较有统计学意义。见图 3 和表 3。



1. 对照组;2. 模型组;3. 药物干预组

图 3 3 组大鼠心肌组织中 bFGF-2 mRNA 的表达

Fig.3 Expression of bFGF-2 mRNA in three groups

表 3 3 组大鼠心肌组织中 bFGF-2 mRNA 的表达

Tab.3 Expression of bFGF-2 mRNA in three groups

组别	bFGF-2 mRNA
对照组	0.39 ± 0.07
模型组	0.73 ± 0.12
药物干预组	0.63 ± 0.12
统计结果	$F=27.026, P=0.000$

注:对照组和模型组比较 $P=0.000$,对照组和药物干预组比较 $P=0.000$,模型组和药物干预组比较 $P=0.038$

3 讨论

心肌肥厚是各种心脏疾病早期的病理改变,分为病理性和生理性,病理性心肌肥厚表现为心肌纤维增生,心肌细胞排列紊乱,继续发展则引起心室重构、心力衰竭。因此,研究心肌肥厚的机制,并据此对其进行干预可有效抑制心室重构,并改善心力衰竭预后。

心肌肥厚模型制备方法包括压力负荷型、结扎肾动脉及 ISO 刺激等方法,White 等^[3]报道,用 ISO 慢性刺激大鼠,可通过改变心肌基因表达造成心肌肥厚和心脏纤维化。本实验中对大鼠皮下注射 ISO 10 d 后,检测模型组和药物干预组大鼠心脏质量和左心室质量均较对照组升高,表明成功复制 ISO 致大鼠心肌肥厚模型。

心肌纤维增生的主要成分为成纤维细胞,其生长主要依靠 FGF。FGF 包括性 aFGF 和 bFGF,大量实验表明 bFGF 活性比 aFGF 强 30~100 倍^[4],与细胞表面的 FGFR 结合,在激活 Shc/Frs2Raf/MAPKK 和 K2MAPKK2MAPK 通路的基础上,大量释放磷脂酶 C、蛋白激酶 C、磷脂酰肌醇 32 激酶系统和 Ca^{2+} ,向细胞内传递信号^[5]。bFGF-2 为 FGF 家族中的一员,已

有研究表明 bFGF-2 通过激活细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 使 p70S6 激酶 1 和 2 等大量调节蛋白磷酸化, 从而激活控制心脏结构基因和肥大应答基因的 GATA4 转录因子, 使心肌纤维表达升高, 导致心肌肥厚^[6]。本研究应用 RT-PCR 和免疫组化的方法, 发现模型组 bFGF-2 的 RT-PCR 量和免疫组化灰度明显高于对照组, 即 bFGF-2 在模型组大鼠心肌细胞中表达明显升高, 表明 bFGF-2 可能是导致心肌肥厚的原因之一, 但具体机制仍需进一步研究证实。

血管紧张素 (angiotensin, Ang) II 是由 Ang I 在 Ang 转换酶作用下水解形成的多肽物质, 是致心肌肥厚的神经内分泌因素中肾素-血管紧张素系统的重要成分, 可使胞内 CaN (calcineurin, CaN)^[7]、ERK^[8]、JNK (c-Jun N-terminal kinase, JNK)^[9]、p38^[10] 活化, 导致心肌细胞肥大。血管紧张素转换酶抑制剂阻断 Ang I 向 Ang II 转化, 使 Ang II 生成减少, 抑制心肌肥厚发生发展。培哚普利为血管紧张素转换酶抑制剂中的一种, 通过抑制 Ang II 生成, 继发性抑制 Ang II 激活的 CaN、JNK 依赖的胞内信号传导通路, 逆转心肌肥厚^[11]。本实验观察并比较模型组大鼠和药物干预组大鼠 HM、LHM 及 bFGF-2 mRNA 表达量, 发现通过培哚普利的干预, 心肌肥厚大鼠 HM、LHM、bFGF-2 mRNA 表达量均低于模型组, 不仅表明 bFGF-2 在心肌肥厚发生发展中起促进作用, 并提示培哚普利可抑制 bFGF-2 在心肌组织的表达, 进而抑制心肌肥厚。

综上所述, 在 ISO 所致大鼠心肌肥厚的心肌组织中 bFGF-2 的表达升高, 而培哚普利可能是通过阻断 bFGF-2 的信号转导通路抑制心肌肥厚, 但本实验只是在分子水平进行研究, 其基因水平的机制需要进一步研究证实; 同时本实验只针对 ISO 所致大鼠左心室心肌肥厚组织中 bFGF-2 的表达进行初步研

究, 其在右心房、右心室、室间隔等部位的表达以及它们表达量之间的差异需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 戴文建, 王以光. 心肌肥厚分子机制研究进展[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(1): 47-50.
- [2] 许英蕾, 孙建义. 成纤维细胞生长因子与其受体的研究进展[J]. 药物生物技术, 2004, 11(3): 194-198.
- [3] White P, Brestelli JE, Kaestner KH, et al. Identification of transcription networks during liver regeneration[J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 3715-3722.
- [4] Lu W, Luo Y, Kan M, et al. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate[J]. J Biol Chem, 1999, 274(18): 12827-12834.
- [5] 韩萨茹拉, 高爱琴, 李金泉, 等. 成纤维细胞生长因子 (FGF) 研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3008-3010.
- [6] House SL, House BE, Glascock B, et al. Fibroblast growth factor 2 mediates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through activation of the extracellular regulated kinase[J]. Mol Cell Pharmacol, 2010, 2(4): 143-154.
- [7] Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, et al. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(3): 1196-1201.
- [8] Ruf S, Piper H, Schlüter KD. Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro[J]. Pflügers Archiv, 2002, 443(3): 483-490.
- [9] Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, et al. Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats[J]. Circ Res, 1997, 80(1): 139-146.
- [10] Wei C, Cardarelli MG, Downing SW, et al. The effect of angiotensin II on mitogen-activated protein kinase in human cardiomyocytes[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2000, 1(4): 379-384.
- [11] 盛红专, 杨 笛, 张寄南. 培哚普利对肾血管性高血压大鼠心肌钙调神经磷酸酶及丝裂原活化蛋白激酶的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(11): 999-1003.

(责任编辑: 冉明会)