

基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂在大鼠心肌梗死后表达的变化

张 军, 贾国良, 王海昌, 邵 虹

(第四军医大学西京医院心脏内科, 陕西省西安市 710032)

[关键词] 病理学与病理生理学; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶抑制剂; 免疫印迹法; 心肌梗死; 心力衰竭; 心室重构

[摘要] 目的 为探讨基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂在心肌梗死后慢性心力衰竭大鼠心室重塑过程中的作用。方法 大鼠随机分为心肌梗死组及假手术对照组, 采用免疫组织化学法和免疫印迹法检测心肌基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂的表达水平。结果 梗死后心肌基质金属蛋白酶 2 表达持续增加, 其抑制剂表达也增加且以梗死后早期为主; 梗死后 1 周时表达最强, 1 月后其表达明显减弱。Western 印迹结果发现, 基质金属蛋白酶 2 在心肌梗死后表达明显增加, 其抑制剂表达也增加且以梗死后早期为主。结论 从与时间相关性来看, 梗死后时间越长, 心功能越差, 基质金属蛋白酶相对含量越高, 而其抑制剂表达则随梗死时间延长而减弱。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Matrix Metalloproteinases-2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 in Rat Cardiac Extracellular Matrix Remodeling after Acute Myocardial Infarction

ZHANG Jun, JIA Guo-Liang, WANG Hai-Chang, and SHAO Hong

(Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase; Tissue Inhibitor of Metalloproteinases; Immunohistochemical Analysis; Myocardial Infarction; Heart Failure; Ventricular Remodeling; Western Blot

[ABSTRACT] Aim To observe the role of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) on the left ventricular function and extracellular matrix remodeling after acute myocardial infarction. Methods Male SD rats were randomly divided into operator group and sham group, and the model was established by ligation of coronary artery. The left ventricular function (by catheter measuring) were studied at different time. The protein expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 was examined by immunohistochemical analysis and Western blot.

Results Compared with sham group, the left ventricular function deteriorated and ventricular remodeling occurred after acute myocardial infarction. And the protein expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 elevated ($P < 0.05$). Conclusion Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 involved in the left ventricular function deterioration and ventricular remodeling after acute myocardial infarction.

慢性心力衰竭发展过程中的一个重要病理改变是左心室泵衰竭。研究发现心力衰竭时基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 被激活, 该酶降解基质的胶原成分, 破坏胶原网的结构, 使心肌细胞之间的连接趋于松散。在持续的室壁压力作用下, 左心室出现几何构形的改变, 使室壁抗张能力更加低下, 进一步使左心室的大小和形状发生改变, 影响到左心室的功能, 这就是心室重构。有实验证明 MMP 是左心室重构发生的重要推动力^[1,2]。我们通过结扎冠状动脉法复制大鼠心肌梗死模型, 观察 MMP-2 及其抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase-

2, TIMP-2) 在心肌梗死后不同阶段的表达变化, 探讨心肌梗死后慢性心力衰竭过程中左心室重构与心肌 MMP/TIMP 表达变化的关系。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂

多导生理记录仪、动物手术用人工呼吸机和光学显微镜。山羊抗鼠 MMP-2 多克隆抗体、兔抗鼠 TIMP-2 多克隆抗体、辣根酶标记的第二抗体 (Santa Cruz)、羊抗兔第二抗体 (即用型), DAB 显色试剂盒, 其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 动物模型的建立、分组和标本制备

成年雄性 SD 大鼠 65 只, 体重 200 g 左右, 由第四军医大学实验动物中心提供, 30 g/L 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉, 气管插管后用小动物呼

[收稿日期] 2004-06-09

[修回日期] 2004-10-20

[作者简介] 张军, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病心力衰竭的诊断与治疗, E-mail 为 zhangjch@fmmu.edu.cn。贾国良, 主任医师, 主要从事冠心病介入治疗。王海昌, 主任医师, 主要从事冠心病介入的治疗。

吸机有氧正压通气,结扎冠状动脉左前降支复制大鼠心肌梗死模型^[3],连接多导生理记录仪记录心电图及血流动力学参数。术后 24 h 将存活大鼠随机分为心肌梗死组(简称 MI 组)和假手术对照组(简称 SH 组),按处死时间分别为 MI 4 周组(MI_{4W}组, $n = 10$); MI 8 周组(MI_{8W}组, $n = 8$); MI 12 周组(MI_{12W}组, $n = 7$); SH 4 周组(SH_{4W}, $n = 8$); SH 8 周组(SH_{8W}, $n = 7$); SH 12 周组(SH_{12W}, $n = 8$)。按光镜样品制备方法,大鼠麻醉后开胸,按常规取样方法取其左心室心尖部心肌组织,10%多聚甲醛固定,脱水,石蜡包埋,切片,烤片。

1.3 免疫组织化学染色及图像分析

石蜡切片脱蜡;2.3%过氧化氢溶液室温下放置 30 min,封闭内源性过氧化物酶;微波抗原修复,15 min;正常山羊血清室温封闭 30 min;滴加一抗(MMP-2 山羊抗鼠多克隆抗体及 TIMP-2 兔抗鼠多克隆抗体),以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,然后按文献方法进行染色。4℃过夜;37℃复温 1 h;滴加 1:100 稀释的辣根酶标二抗,37℃ 30 min;以上每一步骤后用 0.01 mol/L PBS 缓冲液振洗 3 次,每次 5 min;滴加新鲜配制的 DAB 显色液,镜下控制显色;阳性颗粒呈棕黄色。

1.4 Western 印迹法

将大鼠左心室心肌组织称重、匀浆、加水和

buffer,煮沸、离心,上清液用于实验。制备 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,上样,电泳分离蛋白质样本,转膜,固定,洗膜,封闭,PBS 洗。加一抗体,PBS 洗,加二抗,PBS 洗,将膜置于化学发光试剂中反应 10~30 s,在暗室中使 X 光片曝光,显影、定影;凝胶扫描成像系统进行分析,蛋白表达量用光密度值表示。

1.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

一共有 65 只大鼠进行冠状动脉结扎手术,48 只手术成功。不同时相点 MI 组大鼠出现进食量减少,精神状态差,活动减少,口鼻及肢体远端紫绀,体重较同期 SH 组大鼠下降,以 MI_{12W}组下降最为明显,并且随术后时间延长,上述表现呈进行性加重。

2.2 大鼠血流动力学及心功能参数的改变

与相应的 SH 组相比,心肌梗死后 4 周 LVDP 明显增高,并呈时间依赖性(MI_{4W} < MI_{8W} < MI_{12W})。LVSP、+ dp/dt_{max} 和 - dp/dt_{max} 均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$) (表 1, Table 1)。

表 1. 心肌梗死后大鼠血流动力学参数的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The blood and left ventricular function change of the rats with myocardial infarction ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	收缩压 (mm Hg)	舒张压 (mm Hg)	LVSP (mm Hg)	LVDP (mm Hg)	+ dp/dt _{max} (mm Hg/s)	- dp/dt _{max} (mm Hg/s)
SH _{4W} 组	8	125 ± 13	88 ± 12	143 ± 8	3.89 ± 0.95	4 885 ± 324	4 068 ± 269
SH _{8W} 组	7	120 ± 10	85 ± 10	136 ± 7	4.96 ± 1.25	5 063 ± 385	4 151 ± 305
SH _{12W} 组	8	118 ± 11	83 ± 9	128 ± 12	4.21 ± 1.79	5 966 ± 395	4 221 ± 309
MI _{4W} 组	10	104 ± 9 ^a	75 ± 10 ^a	121 ± 9 ^a	9.53 ± 7.06 ^b	2 546 ± 541 ^a	2 441 ± 395 ^b
MI _{8W} 组	8	107 ± 10 ^a	72 ± 21 ^b	114 ± 10 ^a	12.65 ± 8.40 ^a	2 657 ± 484 ^b	2 492 ± 149 ^b
MI _{12W} 组	7	113 ± 6 ^b	79 ± 12 ^b	112 ± 10	21.13 ± 2.40 ^b	3 522 ± 477 ^b	3 510 ± 528 ^b

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, 与相应 SH 组比较。

2.3 心肌组织中基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂蛋白表达的变化

免疫组织化学结果表明,假手术组心肌 MMP-2 表达为阴性;心肌梗死组 MMP-2 表达为阳性,胞浆被染成棕黄色。假手术组 TIMP-2 表达为阴性;心肌梗死组 TIMP-2 表达为阳性,早期表达强,以后表达逐渐减弱。

Western 印迹结果表明,心肌梗死后 MMP-2 表达明显增强,TIMP-2 在梗死后早期表达增加。从与时间相关性来看,梗死后时间越长,心功能越差,MMP-2 相对含量越高;TIMP-2 则相反。与 SH 组相比,不同时相点 MI 组心肌组织中 MMP-2 蛋白表达水平显著增加($P < 0.01$),其变化呈上升趋势(MI 组_{4W} < MI 组_{8W} < MI 组_{12W})。与 SH 组相比,心肌梗死后早期心

肌组织中 TIMP-2 蛋白表达水平升高, 后期表达下降 ($P > 0.05$) (表 2, Table 2)。

表 2. 心肌梗死后基质金属蛋白酶 2 及其抑制剂蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Changes in myocardial MMP-2 protein expression after myocardial infarction

分 组	n	MMP-2	TIMP-2
SH _{4w} 组	8	0.26 ± 0.02	1.33 ± 0.06
SH _{8w} 组	7	0.28 ± 0.05	1.34 ± 0.05
SH _{12w} 组	8	0.28 ± 0.02	1.36 ± 0.04
MI _{4w} 组	10	1.4 ± 0.07 ^a	1.44 ± 0.04 ^a
MI _{8w} 组	8	1.71 ± 0.12 ^{ab}	1.41 ± 0.07 ^a
MI _{12w} 组	7	2.11 ± 0.15 ^{acd}	1.39 ± 0.07 ^{ab}

a: $P < 0.01$, 与相应 SH 组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与 MI_{4w}组比较; d: $P < 0.05$, 与 MI_{12w}组比较。

3 讨论

心室重构是慢性心力衰竭的重要病理改变之一。心室重构包括心肌实质重构和间质重构, 越来越多的研究表明, 间质重构主要是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 胶原网的量和组成的变化对心力衰竭的发展起到重要的作用。实验证明, 心肌细胞外基质构成的变化主要与心肌基质金属蛋白酶及其特异性组织抑制剂活性有关。Cleutjens 等^[4]发现大鼠心室 TIMP 表达及活性在心肌梗死后发生显著变化。他们通过结扎大鼠冠状动脉的左前降支使其发生心肌梗死, 在结扎后 6 h 到 28 天用 Northern blot 和原位杂交法检测了 TIMP 的表达, 发现 TIMP 在梗死后 6 h 升高 2 倍 (与正常对照组比较), 在梗死后 2 天达峰值, 较对照组升高 8 倍, 此后缓慢下降。Sun 等^[5]研究了大鼠透壁性心肌梗死后 TIMP 的表达, 发现第 3 天后在修复的心肌部位 TIMP-1、2 和 3 mRNA 的表达明显升高并持续 28 天。Iwanaga 等^[6]检测了心力衰竭患者心脏 MMP 和 TIMP 的表达, 发现 TIMP-2、TIMP-4 和 MMP-2 在左心室肥厚阶段无活性, 但在向心力衰竭转变过程中 TIMP 和 MMP 的活性明显升高, 且 MMP-2 的活性超过了 TIMPs 的活性, 导致了细胞外基质的降解, 促进了左心室的扩大。Creemers 等^[7]研究发现 TIMP-1 缺乏的大鼠心肌梗死后发生基质重构, 与对照组相比明显严重, 心室功能更差, 说明 TIMP-1 在心肌梗死后心肌重构中发挥着重要的作用。Fedak 等^[8]研究了人类和实验性动物衰竭心脏中 TIMP-3 的表达, 发现 TIMP-3 的减少增加了基质的重构, 使心功能从代偿期转变为失代偿

期。

本研究也观察到大鼠心肌梗死后 MMP-2 及 TIMP-2 表达发生变化。免疫组织化学染色结果表明: 梗死后心肌间质 MMP-2 表达显著增加, 并随时间延长逐渐增强; TIMP-2 表达也显著增加, 梗死后早期表达最强, 随后其表达逐渐减弱。Western 印迹结果表明, MMP-2 在心肌梗死后表达明显增强, 梗死后早期表达依然增强。TIMP-2 表达在心肌梗死后早期时也增加, 其后表达明显减弱。从与时间相关性来看, 梗死后时间越长, 心功能越差, MMP-2 相对含量越高; TIMP-2 则相反。

本实验结果显示, 心肌梗死后大鼠心肌 MMP-2 蛋白表达明显增加同时, 尽管 TIMP-2 蛋白表达水平增加, 但很快就下降。提示心肌梗死后 MMP-2 表达增高伴有 TIMP-2 内源性抑制作用的减低; 二者均参与心肌梗死后心室重塑的过程。

衰竭心肌 MMP/TIMP 平衡状态被破坏, 有利于 MMP 的持续激活, 从而引起 ECM 蛋白水解及心肌间质重构。这表明 MMP 表达上调与心肌间质重塑及心力衰竭进展之间存在因果关系。有学者认为通过直接抑制 MMP 活性, 有可能达到调控心脏重塑和改善心功能的目的。有研究用 MMP 抑制剂治疗快速起搏引起的猪的心力衰竭模型, 发现 MMP 抑制剂可以减轻左心室扩张和后壁变薄的程度, 改善左心室功能。因此调控 MMP 活性及表达有可能成为心力衰竭治疗的新靶点。

[参考文献]

- [1] Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*, 1991, **84**: 2 123-126
- [2] Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D' Armiento J. Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction. *J Clin Invest*, 2000, **106**: 857-859
- [3] Jugdill BI, Khan MI, Jugdill SJ, Tian L. Effect of prolonged inotropic stimulation on ventricular remodeling during healing after myocardial infarction in the dog: mechanistic insights. *JACC*, 1996, **27**: 1 787-792
- [4] Cleutjens JP, Kandala JC, Guardia E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, **27**: 1 281-285
- [5] Sun Y, Zhang JQ, Zhang J. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med*, 2000, **135**: 316-320
- [6] Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39**: 1 384-387
- [7] Creemers EE, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dondy KB, Hapke E. Difficiency of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase exacerbates LV remodeling following myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284** (1): H364-371
- [8] Fedak PW, Altamentova SM, Weisel RD, Nili N, Ohno N, Vema S. Matrix remodeling in human heart failure: a possible regulatory role for TIMP-3. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284** (2): H626-634

(此文编辑 朱雯霞)