

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-09-0786-03

心肌营养素 1 在压力超负荷致心肌肥大中的作用

杨爽^{1,2}, 杨凯³, 于波², 蔡海², 张莹莹²

(1. 黑龙江中医药大学中医内科学教研室, 黑龙江省哈尔滨市 150040; 2. 哈尔滨医科大学附属第二医院心内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086; 3. 哈尔滨理工大学医院检验科, 黑龙江省哈尔滨市 150080)

[关键词] 病理学与病理生理学; 心肌营养素 1; β -肌球蛋白重链; 血管紧张素 Ang II ; 心肌肥大; 放射免疫分析法; 压力负荷

[摘要] 目的 研究心肌营养素 1 在腹主动脉缩窄所致大鼠压力负荷性心肌肥大模型中的作用, 观察 AG490 对心肌肥大及心肌营养素 1 表达的影响。方法 用腹主动脉缩窄的方法建立心肌肥大大鼠模型, 检测左心室重量指数, 应用逆转录聚合酶链反应检测心肌营养素 1、 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达, 放射免疫分析法测定血浆和心肌血管中血管紧张素 Ang II 水平。结果 腹主动脉缩窄术后 14 天心肌肥大组左心室重量指数明显高于假手术组 ($P < 0.01$); AG490 干预组左心室重量指数明显低于心肌肥大组 ($P < 0.01$), 但仍高于假手术组 ($P < 0.01$)。心肌肥大组血浆和心肌血管紧张素 Ang II 增高, 与假手术组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$); AG490 干预组血管紧张素 Ang II 水平低于心肌肥大组 ($P < 0.05$), 但仍高于假手术组 ($P < 0.01$)。心肌肥大组心肌营养素 1 mRNA 表达较假手术组增加 ($P < 0.01$); AG490 干预组心肌营养素 1 表达较心肌肥大组无明显变化 ($P > 0.05$), 但与假手术组相比表达明显增加 ($P < 0.01$)。心肌肥大组心肌 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达明显高于假手术组 ($P < 0.01$); AG490 干预组 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达较心肌肥大组明显降低 ($P < 0.01$), 与假手术组相比表达仍增加 ($P < 0.01$)。结论 心肌营养素 1 参与腹主动脉缩窄所致大鼠压力负荷性心肌肥大的发病过程, AG490 可抑制心肌营养素 1 的表达及心肌肥大。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Role of Cardiotrophin-1 in Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy of Rat

YANG Shuang, YANG Kai, YU Bo, QI Hai, and ZHANG Ying-Ying

(Department of Chinese Internal Medicine, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[KEY WORDS] Cardiotrophin 1; β -Myosin Heavy Chain; Angiotensin Ang II ; Cardiac Hypertrophy; Radiomunoassay; Pressure Overload

[ABSTRACT] Aim To investigate the role of cardiotrophin 1 (CT-1) in the rat model of pressure overload-induced cardiac hypertrophy and the effect of AG490 on the cardiac hypertrophy and CT-1. Methods The model of pressure overload was established by constriction of abdominal aorta. The left ventricular mass index (LVMI) was observed. The mRNA levels of CT-1 and β -myosin heavy chain (β -MHC) were examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The circulating and ventricular angiotensin Ang II (Ang II) was measured by radiomunoassay. Results Fourteen days after constriction of abdominal aorta, the LVMI of the hypertrophic group was significantly increased than that of the control group ($P < 0.01$) and it was significantly decreased in AG490 group than in the hypertrophic group, but more than in the control group ($P < 0.01$).

The circulating and ventricular Ang II of the hypertrophic group was increased compared with the control group, and there was a significant difference between the two groups ($P < 0.01$); the Ang II level of AG490 group was less than that of the hypertrophic group, but still more than the control group ($P < 0.01$). The expression of CT-1 mRNA was similar in the hypertrophic group and the AG490 group ($P > 0.05$), and both groups were more than the control group ($P < 0.01$). The expression of β -MHC mRNA in the hypertrophic group was significantly increased than that in the control group ($P < 0.01$) and decreased in the AG490 group compared with the hypertrophic group ($P < 0.01$), but it was still more than the control group ($P < 0.01$). Conclusions The expression of CT-1 may play an important role in cardiac hypertrophy, AG490 may inhibit the expression of CT-1 and the development of cardiac hypertrophy.

心肌肥大的诱导因素极为复杂, 多种细胞因子参与其中, 压力超负荷是诱导心肌肥大的独立发病

因素, 但是目前对于心肌肥大相关基因的表达和调控机制尚不清楚。心肌营养素 1 (cardiotrophin-1, CT-1) 属于白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 家族^[1], 是一个新发现的促心肌肥大因子, 通过胞质非受体酪氨酸蛋白激酶 (janus kinase or just another kinase, JAK)/信号转导和转录激活因子 (signal transducer and activators of transcription, STAT) 信号转导途径诱导心

[收稿日期] 2006-02-15 [修回日期] 2006-08-29

[作者简介] 杨爽, 博士后, 主治医师, 主要从事心血管内科临床工作和心脏病发病机制的研究。杨凯, 主管检验技师, 主要从事放射免疫分析法的实验诊断和临床应用。通讯作者于波, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 ys4yy@yahoo.com.cn。

肌细胞肥大。AG490 是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈的脂类衍生物,是新近发现的一种酪氨酸激酶抑制剂,通过抑制 JAK2 和/或 JAK3 的磷酸化活化,抑制 JAK/STAT 通路。为探讨 CT-1 与压力超负荷是否存在内在的联系以及 AG490 对 CT-1 诱导的细胞肥大的影响,本实验观察了腹主动脉缩窄所致大鼠压力负荷性心肌肥大过程中 CT-1 的表达,以期对心肌细胞肥大的机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

Trizol (Invitrogen 公司), AG490 (Biomol 公司), 血管紧张素 Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ) 放射免疫试剂盒 (北方生物技术研究), PCR 引物 (北京奥科生物工程有限公司), TakaRa TaqTM /RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司)。

1.2 实验分组及动物模型的建立

选取健康雄性 Wister 大鼠, 体重 170~200 g, 2% 戊巴比妥钠 (2 mL/kg) 腹腔麻醉, 腹正中切口, 在左肾动脉上方与腹主动脉汇合处上方分离一小段腹主动脉, 穿过一条丝线, 将直径 0.45 mm 针头平行于腹主动脉一并结扎, 抽出针头, 造成腹主动脉缩窄, 分层关闭腹腔。实验分三组, 每组大鼠 12 只。心肌肥大组: 行腹主动脉缩窄术。④AG490 干预组: 行腹主动脉缩窄术, 术后每天给予 AG490 (2 mg/kg) 腹腔注射。④假手术组: 除不结扎腹主动脉外其余操作均同心肌肥大组。所有动物均在术后 14 天处死, 检测左心室重量指数 (left ventricular mass index, LVMI), 血浆、心肌 Ang Ⅱ、β-肌球蛋白重链 (β-myosin heavy chain, β-MHC) 和 CT-1 mRNA。

1.3 左心室重量指数测定

迅速取出心脏以预冷的生理盐水洗净血液, 滤纸吸干后剪去心房及右心室, 称取左心室 (含室间隔) 重量, LVMI (mg/100 g 体重) = 左心室重量 / 体重。

1.4 血浆和心肌血管紧张素 Ⅱ测定

股动脉取血 1 mL 于抗凝管中 (0.3 mol/L EDTA 10 μL, 0.34 mol/L 8-羟基喹啉硫酸盐 10 μL, 0.32 mol/L 二巯丙醇 5 μL) 摇匀, 离心, 分离血浆后低温保存。取左心室前壁心肌组织 200 mg, 加入 1 mL 生理盐水研磨, 100℃水浴煮沸后制成匀浆, 离心取上清液低温保存。按照试剂盒说明书操作。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测心肌营养素 1、β-肌球蛋白重链 mRNA 表达

用 Trizol 提取心肌组织中总 RNA, 用紫外分光

光度计测总 RNA 纯度和含量, 按照 TakaRa RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。选取 β-actin 为内参, 扩增产物 DNA 全长 764 bp, 上游引物为 5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3', 下游引物为 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3'; CT-1 扩增产物 DNA 全长 482 bp, 上游引物为 5'-TCT ATG GCT AGT GAG TGA GC-3', 下游引物为 5'-AGC GAG CAA GCA AAG CAA GA-3'; β-MHC 扩增产物 DNA 全长 596 bp, 上游引物为 5'-ACC AAG CAG CCA CGC CAG TA-3', 下游引物为 5'-TGC TTT GCC TTT GCC CTT GT-3'。逆转录条件: 42℃逆转录 30 min, 99℃预变性 5 min, 5℃退火 5 min。PCR 反应条件: 94℃变性 5 min 后, 94℃30 s→59℃30 s→72℃45 s, 共进行 30 个循环, 72℃延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 经紫外透射分析拍摄电泳条带。结果以 CT-1/β-actin 和 β-MHC/β-actin 密度比值表示。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 左心室重量指数测定

腹主动脉缩窄术后 14 天心肌肥大组 LVMI (340 ±24) 明显高于假手术组 (249 ±15, *P* < 0.01)。AG490 干预组 LVMI (311 ±16) 明显低于心肌肥大组 (*P* < 0.01), 但仍高于假手术组 (*P* < 0.01)。

2.2 血浆和心肌血管紧张素 Ⅱ测定

术后 14 天心肌肥大组血浆和心肌 Ang Ⅱ增高, 与假手术组比差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。AG490 干预组 Ang Ⅱ水平低于心肌肥大组 (*P* < 0.05), 但仍高于假手术组 (*P* < 0.01)。见表 1。

表 1. AG490 对血浆、心肌血管紧张素 Ⅱ表达的影响

组别	血浆 Ang Ⅱ (ng/L)	心肌 Ang Ⅱ (ng/L)
假手术组	124 ±15	27 ±2
心肌肥大组	395 ±28 ^a	92 ±8 ^a
AG490 干预组	374 ±25 ^{ab}	86 ±6 ^{ab}

a 为 *P* < 0.01, 与假手术组相比; b 为 *P* < 0.05, 与心肌肥大组相比。

2.3 心肌组织心肌营养素 1 和 β-肌球蛋白重链 mRNA 表达

腹主动脉缩窄术后心肌肥大组 CT-1 mRNA 表达较假手术组增加 (*P* < 0.01); AG490 干预组 CT-1 mRNA 表达与心肌肥大组比差异无统计学意义 (*P*

> 0.05), 但高于假手术组 ($P < 0.01$)。心肌肥大组心肌 β -MHC mRNA 表达明显高于假手术组 ($P < 0.01$); AG490 干预组 β -MHC mRNA 表达较心肌肥大组明显降低 ($P < 0.01$), 但仍高于假手术组 ($P < 0.01$, 表 2 和图 1)。

表 2. AG490 对心肌细胞心肌营养索 1 和 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达的影响

分 组	CT-1/ β -actin	β -MHC/ β -actin
假手术组	0.208 \pm 0.016	0.388 \pm 0.021
心肌肥大组	0.386 \pm 0.019 ^a	0.758 \pm 0.037 ^a
AG490 干预组	0.375 \pm 0.018 ^a	0.539 \pm 0.027 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.01$, 与心肌肥大组相比。

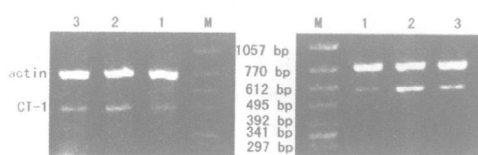


图 1. 心肌营养索 1 和 β -肌球蛋白重链 mRNA 表达电泳图

左为心肌营养索, 右为 β -肌球蛋白重链。M 为 Marker, 1 为假手术组, 2 为心肌肥大组, 3 为 AG490 干预组。

3 讨论

压力负荷增加是临床心肌肥厚发生的主要原因, 可引起心肌细胞肥大、间质细胞增生等病理改变, 阐明心肌肥大的发生机制对多种心脏疾病的治疗具有重要意义。最近研究提示, CT-1 具有很强的诱导心肌细胞肥大作用, 大鼠腹腔内注射 CT-1 后心脏重量和心室重量均呈剂量依赖性增加, 但体重不增加, 说明 CT-1 在心肌厚度的发育中起重要作用^[2]。本实验结果表明, 腹主动脉缩窄引起压力负荷增加时 CT-1 表达明显增加, 说明 CT-1 参与了压力负荷增加所致的心肌肥大。

早期心肌肥大是心脏维持有效心输出量的一种代偿性机制, 但持久的心肌肥大会导致心脏进入失代偿阶段, 继而发生不可逆转的心肌肥大和扩张, 心肌收缩力下降, 导致心力衰竭^[3,4]。正常状态下肌球蛋白重链以 α -MHC 为主, 主司收缩功能。当心肌细胞发生肥大时, 心肌细胞收缩蛋白转变为以 β -MHC 为主, 它可以增殖, 但收缩功能差^[5]。本实验通过缩窄腹主动脉形成压力超负荷心肌肥厚模型, 术后 β -MHC 表达增加, 且 LVMI 增加, 表明此模型能够诱导心肌肥大, 所形成的肥厚以左心室肥厚为主, 与文献报道相一致^[6]。

血管紧张素 Ang II 是一种非常重要的致心肌细胞肥大因子, 在压力负荷升高时表达增加。研究发现 Ang II 和 CT-1 均通过 JAK/STAT 信号途径促进细胞肥大^[7]; AG490 是一种人工合成的苯亚甲基丙二腈的脂类衍生物, 因结构类似酪氨酸而与受体酪氨酸激酶竞争结合位置, 从而阻断 JAK2 和 JAK3^[8], 是 JAK/STAT 通路的有效阻断剂。研究发现 CT-1 通过激活的 STAT3 可增加心肌血管紧张素原 mRNA 的表达。Fukuzawa 等^[9]也有类似的报道, CT-1 使 STAT3 酪氨酸磷酸化和结合到血管紧张素原基因启动子 St 区域可被 JAK 抑制剂 AG490 所阻断。因此, AG490 在理论上能够抑制 CT-1 的促心肌肥大作用及其引起的 Ang II 表达, 本实验结果也证明了这一点, 应用 AG490 明显降低 LVMI 和 β -MHC 表达, 同时减少血浆和心肌 Ang II 表达。提示 CT-1 参与压力超负荷所致的心肌肥厚, CT-1 与血管紧张素系统密切相关。这说明心肌细胞肥大的调节因素极为复杂, 多种细胞因子参与其中, 它们相互联系、相互制约, 是一个极其复杂的调节网络。

目前, 对于 AG490 的研究主要集中在抗肿瘤方面; 在心血管系统 AG490 主要用于心肌缺血的治疗, 而其对心肌细胞肥大的影响报道很少^[9]。本实验发现 AG490 能改善压力超负荷所致的心肌肥厚, 为其在临床治疗与压力超负荷密切相关的疾病提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 姚佳梅, 庄汉屏. 心肌营养索 1 的研究[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2005, 32 (3): 165-167
- [2] Jin H, Yang R, Keller GA, Ryan A, Ko A, Finkle D, et al. In vivo effects of cardiotrophin 1 [J]. *Cytokine*, 1996, 8 (12): 920-927
- [3] Sudhiranjana Gupta, Purcell NH, Lin AN, Subha Sen. Activation of nuclear factor- κ B is necessary for myotrophin induced cardiac hypertrophy [J]. *J Cell Biol*, 2002, 159: 1 019-028
- [4] Purcell NH, Molkenin JD. Is nuclear factor B an attractive therapeutic target for treating cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2003, 108: 638-640
- [5] Doud SK, Pan LX, Carleton S, Marmorstein S, Siddiqui MA. A adaptational response in transcription factors during development of myocardial hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27 (10): 2 359-372
- [6] 曹政, 王家宁, 杨桂元, 李建军. 醛固酮促进血管紧张素 II 诱导大鼠心脏成纤维细胞合成胶原[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (2): 135-138
- [7] 王克明, 王彬, 贺大林. JAK/STAT 通路阻断剂 AG490 的研究现状[J]. 现代泌尿外科杂志, 2003, 8 (1): 57-59
- [8] Tian ZJ, Cui W, Li YJ, Hao YM, Du J, Liu F, et al. Different contributions of STAT3, ERK1/2, and PI3-K signaling to cardiomyocyte hypertrophy by cardiotrophin 1 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25 (9): 1 157-164
- [9] Fukuzawa J, Booz GW, Hunt RA, Noriko Shimizu, Vijaya Karoor, Baker KM, et al. Cardiotrophin 1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3: an autocrine loop for hypertrophy [J]. *Hypertension*, 2000, 35 (6): 1 191-196

(此文编辑 许雪梅)