

[文章编号] 1007-3949(2007)15-01-0047-04

• 实验研究 •

己酮可可碱对心肌肥厚大鼠基质金属蛋白酶 2 和 9 表达的影响

赵伟涛, 任江华, 曹茂银, 金晶

(武汉大学中南医院心内科, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 内科学; 基质金属蛋白酶; 去甲肾上腺素; 心肌肥厚; 己酮可可碱; 胶原; 细胞外基质

[摘要] 目的 观察基质金属蛋白酶 2 和 9 在心肌肥厚大鼠模型中的变化, 并采用己酮可可碱进行干预, 以确定己酮可可碱对基质金属蛋白酶的影响及其在心肌肥厚过程中的作用。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、去甲肾上腺素造模组(模型组)和去甲肾上腺素+己酮可可碱组(治疗组)。采用 VG 染色评价组织胶原表达, 并测定心肌组织胶原含量, 免疫组织化学法检测心肌组织基质金属蛋白酶 2 和 9 的蛋白表达。结果 模型组大鼠发生左心室肥厚, 胶原含量显著高于对照组(1.929±0.514 mg/g 比 1.009±0.442 mg/g, $P < 0.01$); 基质金属蛋白酶 2 和 9 表达(分别为 131.1±9.8、125.3±4.1)显著低于对照组($P < 0.01$)。己酮可可碱治疗组心肌总胶原含量较模型组显著降低(1.151±0.215 mg/g, $P < 0.01$); 基质中基质金属蛋白酶 2 和 9 的表达(分别为 153.5±6.9、149.5±5.3)较模型组显著增高($P < 0.01$)。结论 己酮可可碱能有效防治心肌肥厚的发生及细胞外基质重塑, 这一效应可能与其降低心肌组织中基质金属蛋白酶 2 和 9 的高表达有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effects of Pentoxifylline on the Protein Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in Rat Cardiac Hypertrophy Model

ZHAO Wei-Tao, REN Jiang-Hua, CAO Mao-Yin, and JIN Jing

(Department of Cardiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinases; Norepinephrine; Cardiac Hypertrophy; Pentoxifylline; Collagen; Extracellular Matrix

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes of matrix metalloproteinase-2 and 9 (MMP-2, MMP-9) in rat cardiac hypertrophy, and the effects of Pentoxifylline (PTX) on it in a rat model. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into control group, norepinephrine (model) group and norepinephrine + PTX (treated) group. The rat cardiac hypertrophy models were established by intraperitoneal injection of norepinephrine (NE) twice a day for 15 days. Extracellular matrix remodeling was evaluated by morphological examination, stained with Varr Gieson (VG). The content of hydroxyproline in the tissue of myocardium was measured. The protein expression of MMP-2 and MMP-9 were examined by immunohistochemical analysis. **Results** NE-induced hypertrophy and extracellular matrix remodeling predominantly occurred in the left ventricular, the expression of the collagen (1.929±0.514 mg/g vs 1.009±0.442 mg/g, $P < 0.01$) elevated obviously; the average of the grave scale of protein expression of the MMP-2 (131.1±9.8) and MMP-9 (125.3±4.1) were lower than those of the control group obviously ($P < 0.01$); After PTX treatment, the collagen (1.151±0.215 mg/g) was decreased and the average of the grave scale of protein expression of MMP-2 (153.5±6.9) and MMP-9 (149.5±5.3) were higher than those of the model group prominently ($P < 0.01$). **Conclusion** Pentoxifylline can prevent the cardiac hypertrophy and extracellular matrix remodeling, which was associated with the attenuation of myocardial MMP-2 and MMP-9.

目前大量实验研究结果发现基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 在心肌肥厚过程中起重要作用, 而金属蛋白酶的表达受到细胞因子特别是肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)

的调节。己酮可可碱是血液流变学改善剂, 是一种非选择性磷酸二酯酶抑制剂。目前实验研究证明, 己酮可可碱可通过抑制细胞因子活性^[1] (包括 TNF- α)、减少胶原的合成及分泌等多种途径缓解肝脏纤维化、肾脏纤维化以及肺纤维化的进展。而己酮可可碱与心肌组织中 MMP 之间的关系尚未见报道。本实验旨在观察 MMP-2 和 MMP-9 在大鼠心肌肥厚及细胞外基质重塑过程中的变化及己酮可可碱对该过程的影响并初步探讨其发生的机制。

[收稿日期] 2006-05-08 [修回日期] 2006-12-28

[作者简介] 赵伟涛, 硕士研究生, 主要从事血流动力学在基础及临床方面的研究, E-mail 为 zhaowcitao1981@163.com。通讯作者任江华, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血流动力学在基础及临床方面的研究。曹茂银, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事高血压的基础及临床研究。

1 材料和方法

1.1 材料及动物模型制造

雄性SD大鼠24只,体重180~230g,来源于武汉大学中南医院实验动物中心,随机分为正常对照组($n=8$)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)组(模型组)($n=8$)和NE+己酮可可碱(德国Merckle公司)组(治疗组)($n=8$)。采用NE注射液1.06 mg/(kg·d),腹腔注射,2次/d,连续给药15天,制备心肌梗厚模型,对照组腹腔注射生理盐水,治疗组在给予NE注射液的同时给予己酮可可碱6 mg/(kg·d)早晨1次腹腔注射给药,疗程为15天。

1.2 病理检查

1.2.1 左心室重量指数的测定 动物称重后处死,取出心脏,分离左、右心室,用电子天平称取左心室重量(left ventricle weight, LVW),计算左心室重量指数即左心室重量与体重(body weight, BW)比(LVW/BW),观察造模是否成功及左心室肥厚程度。

1.2.2 心肌胶原形态学的观察及半定量分析

取部分左心室肌组织,4%甲醛液固定,石蜡包埋,4 μ m厚切片。Van-Gieson(VG)染色法使胶原特殊染色(光镜下,心肌细胞呈黄色,胶原呈红色),然后用全自动图像分析仪行图像处理。每个标本选一个切片,测量左心室心肌的胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)(左心室胶原面积/所测视野面积)。随机取6个视野,以均值作为该心脏的CVF。

1.3 胶原含量测定

按试剂盒的操作方法测定心肌组织中羟脯氨酸含量,间质胶原平均包含13.4%羟脯氨酸,因此间质胶原含量等于羟脯氨酸的含量乘以7.46,结果以mg/g表示每克组织中胶原的含量。

1.4 免疫组织化学法测定心肌组织中基质金属蛋白酶2和9蛋白的表达

石蜡切片常规脱蜡至水,3 mL/L过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,热修复抗原后,100 mL/L正常山

羊血清封闭非特异性抗原,滴加一抗(1:100稀释)(购自武汉博士德生物公司),4 $^{\circ}$ C过夜;滴加生物素标记的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30 min;滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液;DAB显色,封片。应用多功能彩色图像分析系统对MMP-2、MMP-9蛋白(细胞质中棕褐色颗粒为阳性)表达进行图像分析,表达强度用平均灰度值表示,其表达越强平均灰度值越低。

1.5 统计学处理

应用SPSS 11.5软件包对数据进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较在方差齐时用方差分析,方差不齐时用非参数秩和检验。

2 结果

2.1 左心室重量指数

模型组左心室重量指数明显高于对照组($P < 0.05$),而右心室重量指数与对照组未见明显差异;在己酮可可碱治疗组,左心室重量指数较模型组明显降低($P < 0.05$,表1)。

表1. 各组大鼠左、右心室指数及心脏指数的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	体重(g)	左心室指数(mg/g)	右心室指数(mg/g)	心脏指数(mg/g)
对照组	251.6 \pm 22.1	1.916 \pm 0.088	0.393 \pm 0.031	2.826 \pm 0.065
模型组	250.9 \pm 18.7	2.385 \pm 0.028 ^a	0.380 \pm 0.047	3.268 \pm 0.097 ^a
治疗组	247.6 \pm 17.2	2.107 \pm 0.025 ^{ab}	0.385 \pm 0.036	3.033 \pm 0.084 ^{ab}

a为 $P < 0.05$,与对照组相比; b为 $P < 0.05$,与模型组相比。

2.2 VG胶原染色结果

对照组心脏组织结构正常,细胞间隙较宽,有少许纤维组织;模型组心肌细胞排列较为紧密,心肌内小血管周围及心肌间质有较多胶原沉积,左心室心肌总体CVF明显增高($P < 0.01$,表2)。己酮可可碱治疗组心肌胶原沉积较模型组减少, CVF显著降低($P < 0.01$);而与对照组之间差异无显著性($P > 0.05$,图1)。

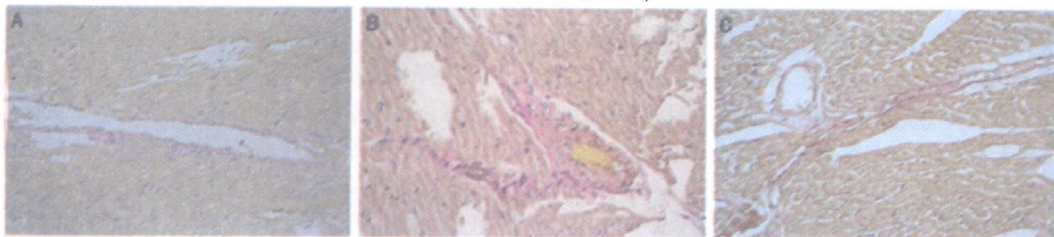


图1. VG胶原染色结果($\times 400$) A为对照组, B为模型组, C为己酮可可碱治疗组。

2.3 胶原含量测定结果

模型组心肌组织中胶原含量比对照组显著升高 ($P < 0.01$); 己酮可可碱治疗组胶原含量比模型组显著降低 ($P < 0.01$), 而与对照组之间差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2. 左心室心肌总体胶原容积分数及胶原含量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	CVF	胶原含量 (mg/g)	羟脯氨酸含量 (mg/g)
对照组	1.64% \pm 0.23%	1.009 \pm 0.442	0.135 \pm 0.060
模型组	14.01% \pm 0.88% ^a	1.929 \pm 0.514 ^a	0.259 \pm 0.069 ^a
治疗组	2.33% \pm 0.33% ^b	1.151 \pm 0.215 ^b	0.154 \pm 0.029 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与模型组相比。

2.4 心肌组织中基质金属蛋白酶 2 和 9 蛋白表达

模型组心肌组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达与对照组相比显著增高, 其平均灰度值较对照组显著偏低 ($P < 0.01$), 己酮可可碱治疗组与模型组比, MMP-2 和 MMP-9 表达降低, 其平均灰度值显著高于模型组 ($P < 0.01$)。而治疗组与对照组之间差异也有显著性 (图 2 和表 3)。

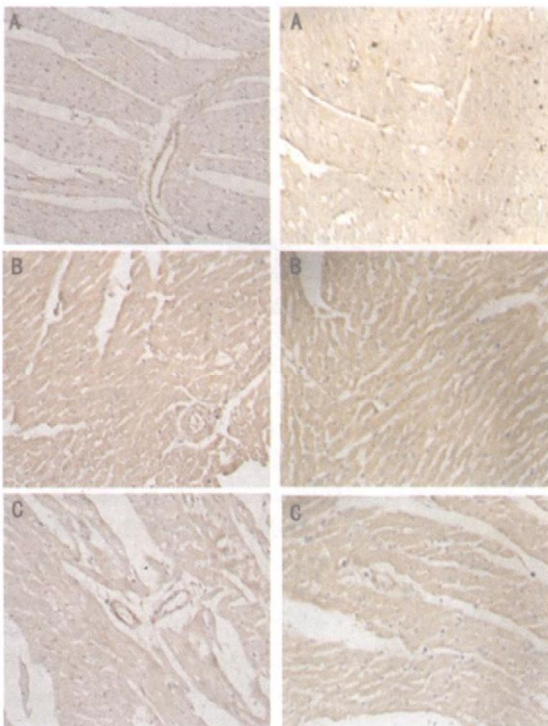


图 2. 免疫组织化学法检测基质金属蛋白酶 2 (左) 和 9 (右) 表达的结果 ($\times 400$) A 为对照组, B 为模型组, C 为治疗组。

表 3. 心肌组织中基质金属蛋白酶 2 和 9 表达的灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组 别	MMP-2	MMP-9
对照组	177.9 \pm 9.2	184.0 \pm 2.8
模型组	131.1 \pm 9.8 ^a	125.3 \pm 4.1 ^a
治疗组	153.5 \pm 6.9 ^{ab}	149.5 \pm 5.3 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与模型组相比。

3 讨论

本实验复制模型后, 经心肌组织病理形态学观察及左心室重量指数测定, 表明模型复制成功。以往对心肌肥厚的研究多集中在心肌细胞本身的异常, 但随着近年来进一步的研究发现, 心脏细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 尤其是心肌胶原的异常改变在心肌重塑发病机制中也起着重要作用。MMP 对维持 ECM 的稳定起着重要作用。MMP 活性增强被证实有促进组织纤维化和 ECM 成分异常改变的作用, MMP 表达增强可直接降解 ECM 中的基质蛋白, 基质蛋白的降解产物又可以作为胶原合成的刺激因子, 从而导致心肌不成熟的纤维组织沉积增加, 组织中胶原含量增加, 引发 ECM 成分异常改变导致心肌肥厚, 这种改变在心功能衰竭过程中起着重要作用^[25]。本实验结果表明模型组心肌肥厚主要发生于左心室, 心肌组织中总胶原 (VG 染色) 及羟脯氨酸含量明显增多, MMP-2 和 MMP-9 的表达明显高于正常对照组。采用己酮可可碱对心肌肥厚进行干预, 结果发现, 治疗组心肌组织中总胶原 (VG 染色) 及羟脯氨酸含量较模型组明显减少, 而与对照组比差异无显著性, MMP-2 和 MMP-9 的表达较模型组明显减少。推测其发生的可能机制之一是由于心肌在压力超负荷的病理刺激下, 心肌细胞释放一系列细胞因子, 包括 TNF- α 、白细胞介素 1 和 6 等^[6,7], 这些细胞因子尤其是 TNF- α 可以激活 $c-jun$ 基因的表达, 进而通过作用于金属蛋白酶基因的 AP-1 位点激活金属蛋白酶基因的表达^[8], 使 MMP 表达与活化增强^[7,9], 进而引起 ECM 成分改变导致心肌肥厚发生^[10]。己酮可可碱减轻心肌肥厚的机制之一可能是其具有抑制环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 降解的作用, cAMP 降解减慢使 cAMP 依赖的蛋白激酶 A 活化, 引起靶蛋白质如 cAMP 反应元素结合蛋白磷酸化, 这些磷酸化的转录因子与特定基因启动子区域的特异序列如位于 TNF- α 基因 5' 末端区域的特异的 CRE 序列结合, 从而抑制 TNF- α 生成^[11], 降低血液及心脏组织中 TNF- α 含量^[12,13],

阻断其对金属蛋白酶基因的影响,降低心肌组织中金属蛋白酶的表达和含量,从而阻断一系列的后继反应,减轻心肌肥厚的发生。总之,本实验结果发现,在去甲肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚模型中,MMP-2和MMP-9在心肌组织中的表达显著增高,组织中的胶原含量也显著增高;而用己酮可可碱进行干预可抑制心肌组织中MMP-2和MMP-9的表达,减少组织中的胶原含量,有利于延缓心肌肥厚的进程。

[参考文献]

- [1] Kozaki K, Egawa H, Bermudez L, Keefe EB, So SK, Esquivel CO. Effects of pentoxifylline pretreatment on kupffer cells in rat liver transplantation [J]. *Hepatology*, 1995, **21** (4) : 1 079-082.
- [2] Spinale FG, Cocker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **46** (2) : 225-238.
- [3] Schubert A, Wather T, Falk V, Binner C, Loscher N, Kanev A, et al. Extracellular matrix gene expression correlates to left ventricular mass index after surgical induction of left ventricular hypertrophy [J]. *Basic Res Cardiol*, 2001, **96** (4) : 381-387.
- [4] Shah BH, Catt KJ. Matrix metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in hypertension and left ventricular hypertrophy [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, **15** (6) : 241-243.
- [5] Lopez B, Gonzalez A, Diez J. Role of matrix metalloproteinases in hypertension-associated cardiac fibrosis [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004, **13** (2) : 197-204.
- [6] Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation [J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, **65**: 81-101.
- [7] Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, et al. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction [J]. *Circulation*, 2004, **110** (20) : 3 221-228.
- [8] Conca W, Kaplan PB, Krane SM. Increase in levels of procollagenase mRNA in human fibroblasts induced by interleukin 1, tumor necrosis factor-alpha, or serum follow c-jun expression and are dependent on new protein synthesis [J]. *Trans Assoc Am Physicians*, 1989, **102**: 195-203.
- [9] Porter KE, Turner NA, O' Regan DJ, Ball SG. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **64** (3) : 507-515.
- [10] 谢萍, 徐义先, 祝善俊, 杨铮, 高志凌. 肿瘤坏死因子 α 介导大鼠心肌梗死后心功能变化的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6) : 662-664.
- [11] Zhang M, Xu YJ, Saini HK, Turan B, Liu PP, Dhalla NS. Pentoxifylline attenuates cardiac dysfunction and reduces TNF- α level in ischemic-reperfused heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **289** (2) : H832-H839.
- [12] Sliwa K, Woodiwiss A, Candy G, Badenhorst D, Libhaber C, Norton G, et al. Effects of pentoxifylline on cytokine profiles and left ventricular performance in patients with decompensated congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *Am J Cardiol*, 2002, **90** (10) : 1 118-122.
- [13] Skudicky D, Bergemann A, Sliwa K, Candy G, Sareli D. Beneficial effects of pentoxifylline in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy treated with angiotensin converting enzyme inhibitors and carvedilol: results of a randomized study [J]. *Circulation*, 2001, **103** (8) : 1 083-088.

(此文编辑 许雪梅)