

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0367-04

• 实验研究 •

大鼠急性心肌梗死后心肌组织 整合素连接激酶表达的变化

戴庆¹, 白剑², 徐标¹

(1. 南京医科大学鼓楼临床医学院, 江苏省南京市 210008 2. 南京大学医学院, 江苏省南京市 210093)

[关键词] 急性心肌梗死; 心功能不全; 整合素连接激酶; 大鼠

[摘要] 目的 观察实验性大鼠急性心肌梗死后不同时间点心肌整合素连接激酶表达水平和心功能的动态变化, 探讨心肌梗死后心功能不全和整合素连接激酶表达变化的关系。方法 成年雄性 SD 大鼠, 开胸结扎左冠状动脉前降支建立心肌梗死模型, 在心肌梗死后不同时间点分别用超声心动图和左心室导管评估心功能, 实时定量 PCR 和 Western blotting 检测非梗死区心肌组织内整合素连接激酶表达。结果 与假手术组相比, 心肌梗死组心功能明显下降。在心肌梗死后第 1、4 和 8 周三个时间点中, 第 8 周组 $\pm dp/d\max$ 明显低于第 1 周组和第 4 周组, 左心室舒张末压明显高于第 1 周组和第 4 周组。实时定量 PCR 和 Western blotting 检测发现, 非梗死区心肌整合素连接激酶表达水平在心肌梗死后第 1、4 周显著升高, 第 8 周表达降低, 回落到假手术组水平, 且明显低于心肌梗死后第 1、4 周。结论 心肌梗死后非梗死区心肌组织内整合素连接激酶由短期内的表达增加到长期的表达减少, 可能参与心肌梗死后心功能由代偿到失代偿的发展过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Integrin-Linked Kinase Expression in Myocardium After Acute Myocardial Infarction in Rats

DAI Qing¹, BAI Jian², and XU Biao¹

(1. Drum Tower Clinical School of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210093, China)

[KEY WORDS] Acute Myocardial Infarction; Cardiac Dysfunction; Integrin-Linked Kinase; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of integrin-linked kinase (ILK) during progressive heart dysfunction after acute myocardial infarction (AMI), and observe the changes of heart function as well as ILK expression at different time points after AMI. **Methods** Left anterior descending arteries of adult male SD rats were ligated to form AMI models.

Cardiac function was evaluated by echocardiography and left ventricular catheter. Real time PCR and Western blotting were used to assess ILK expression in non-infarct area. The above parameters were examined in different time points after post AMI. **Results** After AMI, heart function was significantly decreased. Lower of $\pm dp/d\max$ and higher left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) of 8 weeks group was observed compared with 1 and 4 weeks groups post AMI. On the other hand, ILK expression of non-infarct area was increased in 1 and 4 weeks groups and decreased significantly in 8 weeks group post AMI. **Conclusion** Although temporary ILK up-expression in non-infarct area post acute myocardial infarction maintains compensatory cardiac function, long-term down-regulation of ILK pathway finally lead to cardiac decompensation.

心肌梗死后心室重构和心功能不全是心肌梗死患者的主要死亡原因^[1,2]。急性心肌梗死所致的心肌细胞丢失、胶原沉积、存活心肌细胞的代谢异常等导致心脏射血分数降低、心肌收缩功能下降。心脏收缩功能的降低可导致心腔内压力升高、室壁张力升高, 心脏发生进一步扩大而产生负性重构, 这可使心功能进一步恶化^[3,4]。

整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 是一种广泛存在的在心脏内高表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[5]。研究发现, ILK 可通过结合于 β -整合素蛋白的胞内段, 参与细胞内外的机械信号的转导, 广泛调节细胞骨架的重构、血管新生以及细胞的存活、增殖、分化^[6]。近年来的研究进一步发现 ILK 参与了心肌对机械应力的适应性反应。室壁张力升高可导致 ILK 通路激活, 通过启动一系列下游信号参与心肌对机械应力的适应过程, 包括促进心肌细胞的肥大、抗凋亡因子的活化、促血管旁分泌因子的合成等, 抑制心室在压力负荷下的负性重构过

[收稿日期] 2010-04-02 [修回日期] 2010-05-10

[作者简介] 戴庆, 硕士, 研究方向为心肌梗死后心衰的发病机制, Email为 daiqing811002@163.com。白剑, 博士, 研究方向为心力衰竭的发病机制。通讯作者徐标, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心力衰竭的发病机制, Email为 xubiao@medmail.com.cn。

程^[7,8]。靶向消除 ILK 基因则会导致小鼠发生扩张型心肌病和自发性心衰^[9]。我们的研究也发现心脏转染表达 ILK 的腺病毒可预防急性心肌梗死大鼠心脏重构,改善心功能^[8]。目前仍不清楚机体在急性心肌梗死后 ILK 相关通路是否能长时间激活。而且,在急性心肌梗死的自然病程中,总是不可避免的发生晚期心室重构和心功能不全。所以我们假设:在急性心肌梗死后的早期,ILK 通路激活,参与对室壁应力升高的适应和心功能的代偿;但是,长时间持续的室壁应力升高将使得原先激活的 ILK 相关通路下调,不能代偿心功能的降低,最终导致心肌梗死后晚期心室发生负性重构,心功能失代偿。

本研究目的就是通过观察急性心肌梗死模型大鼠梗死后不同时间点 ILK 表达的变化和心功能的变化,探索心肌梗死后非梗死区心肌组织 ILK 的表达是否存在由短期增加到长期减少的变化规律,以及 ILK 表达变化是否和心功能由代偿转化为失代偿存在时间上的对应关系。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立和分组

体重 200~220 g 的成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠,氯胺酮 (5 mg/kg) 和地西泮 (5 mg/kg) 混合液给大鼠腹腔注射进行麻醉,气管内插管机械通气,左侧第四肋间开胸暴露心脏后,于左心耳下缘以下 1~2 mm 处以 6/0 丝线结扎左冠状动脉前降支。以左心室前壁心肌颜色变白、运动减弱作为心肌梗死成功的标志,逐层关闭胸腔。假手术组只开胸不结扎冠状动脉。各组动物在手术后不同时间点 (1、4 及 8 周) 评估心功能后处死取心脏标本。

1.2 超声心动图评估心功能

采用 10 MHz 频率探头的超声心动仪 (Vivid 7, General Electric) 评估心功能。大鼠称重并按上述相同方法麻醉后,获取心脏二维超声图像及左心室乳头肌水平的 M 型曲线,包括左心室舒张末内径 (LVEDD)、左心室收缩末内径 (LVESD)、左心室短轴缩短率 (LVFS) 和左心室射血分数 (LVEF)。各项原始数据取连续 3 个心动周期的平均值。数据的测量和计算由同一名专科医师以单盲法进行。

1.3 血流动力学检测

各组大鼠分别在术后相应时间称重并麻醉,采用聚乙烯导管 (PE 50 Becton-Dickinson) 经右侧颈动脉入路测量平均动脉压 (MAP)、左心室收缩压 (LVSP),左心室舒张末压 (LVEDP),左心室内压力

最大变化率 ($\pm dp/dt_{max}$) 和心率。数据的测量由同一名研究者以单盲法进行。

1.4 实时定量 PCR 检测心肌组织 ILK mRNA 表达

取大鼠非梗死区的左心室组织于液氮中研磨后,加入 Trizol (Invitrogen 公司) 提取总 RNA。用 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa 公司) 生成 cDNA。用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒 (TaKaRa 公司) 配制 Real time PCR 反应液,应用 ABI PRISM 7500 Fast Real time PCR System (Applied Biosystems) 两步法 PCR 扩增标准程序进行 real time PCR 反应。ILK mRNA 相对水平用 ILK mRNA / GAPDH mRNA 比值表示。引物序列: ILK 上游 5' -CAA CCC TCA TCA CAC ACT GG-3', 下游 5' -GCC ATG TCC AAA GCA AAC TT-3'; GAPDH 上游 5' -AAC GAC CCC TTC ATT GAC-3', 下游 5' -TCC ACG ACA TAC TCA GCA C-3'。

1.5 Western blotting 检测心肌组织 ILK 蛋白表达

取大鼠非梗死区的左心室组织,经旋刀破碎后,加入裂解液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2), 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% DOC, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 50 mmol/L NaF, 0.2 mmol/L PMSF 和 protease inhibitor cocktail (complete EDTA-free, Roche)], 4℃作用 40 min, 12000 g 离心 10 min, 上清为蛋白溶液。BCA 蛋白测试试剂盒 (Pierce) 检测蛋白浓度。取含 40 μ g 总蛋白的样品进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore), 封闭,一抗 (小鼠抗人 ILK 抗体 1:3000 BD Transduction Laboratories), 小鼠抗 GAPDH 抗体 (1:3000 Kangchen Biotech) 孵育,漂洗,二抗 (均为 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 1:10000 Santa Cruz Biotechnology) 孵育,漂洗,化学发光 HRP 底物 (Millipore) 显示条带并曝光于 BioMax 胶片。Quantity One 凝胶电泳分析软件 (Bio-Rad) 测量条带光密度、计算 ILK / GAPDH 比值。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌梗死后心功能的变化

与假手术组相比,心肌梗死组左心室心腔逐渐扩大,室间隔和左心室后壁心肌变薄, LVFS、MAP、 $\pm dp/dt_{max}$ 下降, LVEDP 升高。在心肌梗死后第

1、4及 8周, LVEDD 和 LVESD 在心肌梗死后持续增大, LVFS 没有差异。心肌梗死后 4 周组 $\pm dp/dt_{max}$ 稍高于心肌梗死后 1 周组, 但差异无统计学意义; 而 8 周组 $\pm dp/dt_{max}$ 明显低于 1 周组和 4 周组。心肌梗死后 4 周组 LVEDP 与 1 周组相比无明显差异, 但

8 周组 LVEDP 明显升高。提示实验大鼠心肌梗死后左心功能明显下降。心肌梗死后 4 周心功能尚处于部分代偿阶段, 心肌梗死后 8 周心功能已失代偿 (表 1)。

表 1 心肌梗死后各时间点心功能变化 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	假手术组 ($n=8$)	心肌梗死后 1 周 ($n=6$)	心肌梗死后 4 周 ($n=6$)	心肌梗死后 8 周 ($n=5$)
LVEDD (mm)	5.95 \pm 0.19	6.32 \pm 0.21	8.14 \pm 0.22 ^{ab}	9.46 \pm 0.35 ^{abc}
LVESD (mm)	2.93 \pm 0.15	4.62 \pm 0.15 ^a	5.93 \pm 0.21 ^{ab}	7.02 \pm 0.36 ^{abc}
IVSD (mm)	1.83 \pm 0.07	1.2 \pm 0.03 ^a	1.19 \pm 0.03 ^a	1.04 \pm 0.09 ^a
LVPWD (mm)	1.78 \pm 0.08	1.12 \pm 0.02 ^a	1.26 \pm 0.02 ^a	1.21 \pm 0.002 ^a
LVFS	50.93% \pm 1.67%	26.92% \pm 0.15% ^a	27.06% \pm 1.88% ^a	25.8% \pm 2.49% ^a
心率 (次/分)	413.94 \pm 11.23	390.79 \pm 18.52	445.61 \pm 29.56	424.51 \pm 29.81
MAP (mmHg)	109.79 \pm 6.33	73.57 \pm 3.13 ^a	85.91 \pm 2.5 ^a	66.44 \pm 5.24 ^a
$\pm dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	3398 \pm 119	1646 \pm 28 ^a	1991 \pm 126 ^a	915 \pm 123 ^{abc}
LVEDP (mmHg)	1.61 \pm 0.24	7.26 \pm 0.83 ^a	7.16 \pm 0.67 ^a	21.65 \pm 3.26 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与梗死后 1 周组比较; c 为 $P < 0.05$ 与梗死后 4 周组比较。

2.2 心肌梗死后非梗死区心肌组织 ILK 的表达

实时定量 PCR 显示, 与假手术组相比, 心肌梗死后 1 周组非梗死区心肌组织 ILK mRNA 水平略有升高, 但差异没有统计学意义; 心肌梗死后第 4 周 ILK mRNA 水平明显高于假手术组和心肌梗死后 1 周组; 而心肌梗死后 8 周组 ILK mRNA 水平较心肌梗死后 4 周组明显下降。Western blotting 检测显示, 与假手术组相比, 心肌梗死后 1 周组 ILK 蛋白水平升高; 心肌梗死后 4 周组 ILK 蛋白水平更高, 约为假手术组的 3.2 倍; 而心肌梗死后 8 周组 ILK 蛋白水平回落到接近假手术组水平, 且明显低于心肌梗死后 4 周组 (表 2 和图 1)。

表 2 心肌梗死后各时间点非梗死区心肌组织 ILK mRNA 和蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	ILK mRNA	ILK 蛋白
假手术组	8	0.97 \pm 0.07	0.35 \pm 0.08
心肌梗死后 1 周	6	1.07 \pm 0.17	0.72 \pm 0.11 ^a
心肌梗死后 4 周	6	1.48 \pm 0.18 ^{ab}	1.12 \pm 0.11 ^{ab}
心肌梗死后 8 周	5	0.81 \pm 0.13 ^c	0.51 \pm 0.09 ^c

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与梗死后 1 周组比较; c 为 $P < 0.05$ 与梗死后 4 周组比较。

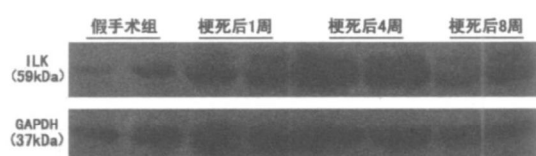


图 1 心肌梗死后各时间点非梗死区的心肌组织 ILK 蛋白的表达

3 讨论

急性心肌梗死后心功能不全的发生、发展涉及多种复杂机制, 不仅仅是梗死区心肌细胞的丢失或梗死区瘢痕形成、重构。非梗死区心室整体的重构也是心肌梗死后心功能不全进展的重要原因^[10]。急性心肌梗死后心功能和射血分数降低可导致心室腔内压力升高, 在心腔内压力的作用下, 梗死区室壁变薄、扩张, 梗死区发生膨展。同时升高的室壁应力也可作用于非梗死区, 导致非梗死区心肌细胞凋亡, 发生替代性纤维化, 引起收缩和舒张障碍^[11, 12]。上述机制导致舒张末期心室内压力进一步升高, 心室腔进行性扩大, 室壁应力持续增高, 进入梗死区不断膨胀、非梗死区剩余心肌细胞不断凋亡、心室整体不断重构、心功能不断恶化的恶性循环。关于心肌梗死后心功能由代偿发展为失代偿、特别是非梗死区心肌发生重构的具体分子机制仍有待进一步完善。

ILK 作为细胞机械-化学信号传导的重要分子, 是心脏机械应力感受器的关键性组成, 在整合素介导的机械应力-应答/化学信号转导通路中起重要作用^[13]。在细胞外机械应力的作用下, 细胞与细胞外基质间的机械牵拉触动整合素, 整合素将信号传递给 ILK, ILK 通过作用于下游的分子如蛋白激酶 B (PKB/Akt)、糖原合成酶激 3 β (GSK-3 β) 等, 维持心肌细胞收缩力、促进细胞迁移和黏附、抑制心肌细胞凋亡、促进血管新生, 以维持心脏在压力负荷下正常的机构和功能^[14]。我们之前的研究发现, 心肌梗死周围区局部转染表达 ILK 的腺病毒, 使心肌 ILK 高

表达,可以促进心肌梗死后的血管新生、减少梗死区和非梗死区的心肌细胞凋亡,并有可能促进心肌细胞增殖^[8]。非心脏领域的研究也发现 ILK 可以抑制内皮细胞凋亡^[15]。这些都提示 ILK 在心脏拮抗机械应力增高方面有重要作用。急性心肌梗死后心室内压力增高,ILK 通路理论上应该激活,参与对室壁应力升高的适应和心功能的代偿,但急性心肌梗死后总是不可避免发生心脏重构和心功能不全,是否和长时间持续的室壁应力升高将使得原先激活的 ILK 相关通路下调,不能代偿心功能的降低,最终导致心肌梗死后心室发生负性重构,心功能失代偿仍未见报道。

本研究中,大鼠急性心肌梗死后心脏逐渐扩大,但梗死后 1 周、4 周时超声心动图和心导管检查提示心功能仍能部分代偿,心肌梗死后第 8 周心功能显著下降,提示心功能失代偿的发生。与此相对应的是,心肌梗死后 1 周、4 周时非梗死区的心肌组织中 ILK 表达水平高于假手术组,且心肌梗死后 4 周时升高更加明显,而心肌梗死后 8 周时 ILK 水平较 4 周时明显回落。故我们有理由推证:心肌梗死后心脏收缩功能降低,室壁应力增加,ILK 表达上调,部分代偿了心功能的降低。但随着时间的推移,一方面,长时间持续的室壁应力升高可能使得原先激活的 ILK 相关通路下调;另一方面,由于非梗死区剩余心肌细胞不断凋亡,ILK 表达也可能随之减少。ILK 表达的减少会加重心肌重构,从而构成恶性循环,最终导致心肌梗死后晚期心室不断发生负性重构,心功能失代偿。提示急性心肌梗死后非梗死区 ILK 表达水平由早期的升高到长期的下降,可能是心肌梗死后心功能由代偿进展为失代偿的一种分子机制。

为何心脏在长时间机械应力增高情况下发生 ILK 表达下调本研究仍不能回答,仍需要进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Gheorghiade M, Bonow RO. Chronic heart failure in the united states: a manifestation of coronary artery disease [J]. *Circulation*, 1998 **97**: 282-289.
- [2] Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000 **35**: 569-582.
- [3] Sutton MGSJ, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy [J]. *Circulation*, 2000 **101**: 2981-988.
- [4] Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity [J]. *N Engl J Med*, 2008 **358** (13): 1370-380.
- [5] Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase [J]. *Nature*, 1996 **379**: 91-96.
- [6] Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005 **5**: 51-63.
- [7] Lu H, Fedak PWM, Dai X, et al. Integrin-linked kinase expression is elevated in human cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice [J]. *Circulation*, 2006 **114**: 2271-279.
- [8] Ding L, Dong L, Chen X, et al. Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2009 **120** (9): 764-773.
- [9] White DE, Coutu P, Shi YF, et al. Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure [J]. *Genes Dev*, 2006 **20**: 355-360.
- [10] Migniro RQ, Zhu X, Morke M, et al. Myocardial dysfunction in the perinfarct and remote regions following anterior infarction in rats quantified by 2D radial strain echocardiography: an observational cohort study [J]. *Cardiovasc Ultrasound*, 2008 **6**: 17.
- [11] 边素艳, 刘宏斌, 杨庭林. 厄贝沙坦对急性心肌梗死后晚期心室重构及心室功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (8): 649-652.
- [12] 贾志梅, 高远, 周瀛, 等. 心肌梗死大鼠非梗死区心肌细胞凋亡与间质纤维化的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007 **15** (5): 349-352.
- [13] Bendig G, Grimmer M, Huttner IG, et al. Integrin-linked kinase: a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor: controls contractility in the zebrafish heart [J]. *Genes Dev*, 2006 **20**: 361-372.
- [14] Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, et al. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair [J]. *Nature*, 2004 **432** (7016): 466-472.
- [15] Friedrich ER, Liu E, Sinha S, et al. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development [J]. *Mol Cell Biol*, 2004 **24**: 134-144.

(此文编辑 文玉珊)