

白藜芦醇抑制基质金属蛋白酶抗酒精性心肌纤维化

马双陶, 杨大春, 唐兵, 李德, 李刚, 杨永健

(成都军区总医院心血管内科, 四川省成都市 610083)

[关键词] 白藜芦醇; 酒精性心肌纤维化; 基质金属蛋白酶

[摘要] **目的** 探索白藜芦醇对酒精诱导的心肌纤维化的作用及其分子机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为对照组、酒精组和酒精 + 白藜芦醇组, 每组 10 只大鼠, 干预 6 个月取心肌行常规石蜡切片和 Masson 染色评估心肌纤维化, 采用冰冻切片和免疫荧光法检测纤连蛋白的表达, 采用免疫印迹法检测心肌组织中基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达。**结果** 6 个月酒精摄入可显著增加心肌间质纤维化并明显破坏纤连蛋白的结构, 白藜芦醇能显著削弱酒精诱导的心肌纤维化和纤连蛋白破坏。酒精摄入可显著增加心肌组织中基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达水平, 而白藜芦醇能显著抑制基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达水平。**结论** 白藜芦醇能通过抑制基质金属蛋白酶 2 和基质金属蛋白酶 9 的表达来抗酒精诱导的心肌纤维化。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Resveratrol Prevents Alcohol-Induced Myocardial Fibrosis Through Inhibiting Matrix Metalloproteinase

MA Shuang-Tao, YANG Da-Chun, TANG Bing, LI De, LI Gang, and YANG Yong-Jian

(Department of Cardiology, General Hospital of Chengdu Military Area Command, Chengdu, Sichuan 610083, China)

[KEY WORDS] Resveratrol; Alcohol-Induced Myocardial Fibrosis; Matrix Metalloproteinase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of resveratrol on alcohol-induced myocardial fibrosis and the underlying molecular mechanism. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were divided into three groups: control group, alcohol group, and alcohol plus resveratrol group, 10 rats in each group. After the intervention for six months, the myocardial fibrosis was evaluated by Masson staining, the fibronectin expression in myocardium was evaluated by immunofluorescence, the expressions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were determined by Western blot. **Results** Alcohol intake for six months caused a significant myocardial fibrosis and an obvious decrease in fibronectin. Oral administration with resveratrol partially reversed alcohol-induced myocardial fibrosis and fibronectin loss. Alcohol intake significantly increased the expressions of MMP-2 and MMP-9. Treatment with resveratrol remarkably attenuated alcohol-induced upregulations of MMP-2 and MMP-9. **Conclusion** Resveratrol inhibits MMP-2 and MMP-9 and consequently prevents alcoholic myocardial fibrosis.

长期大量饮酒可导致心肌细胞损害, 从而继发心肌成纤维细胞增殖和分泌基质胶原纤维增加, 形成心肌纤维化, 促进酒精性心脏损害的进程, 最终导致心力衰竭和各种心律失常^[1]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是调控心肌基质代谢的重要酶系^[2]。心肌间质胶原的沉积一方面有胶原的过量生成, 另一方面也有胶原的降解受抑。MMP 不仅在基质降解中起作用, 而且也参与胶原合

成的调节, 最终的结果常常是 MMP 表达增高同时伴随纤维化增多^[3]。因此, 曾有学者提出采用 MMP 抑制剂来预防心肌重构。心肌纤维化伴随着正常纤连蛋白 (FN) 骨架结构的破坏^[4]。既往有许多研究表明红葡萄酒中的白藜芦醇对心血管系统具有广泛的保护作用^[5]。但白藜芦醇在酒精诱导的心肌纤维化中的作用尚不清楚。曾有研究显示白藜芦醇可在多种细胞中抑制 MMP 的表达^[6]。因此, 我们推

[收稿日期] 2011-02-12

[基金项目] 成都军区医学科研“十一五”课题 (MB09023)

[作者简介] 马双陶, 硕士, 医师, 研究方向为心力衰竭的分子机制, E-mail 为 shuangtaoma@yahoo.cn。通讯作者杨永健, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心肌重构的发病机制, E-mail 为 yongjiany@yahoo.cn。

测其可能具有抑制心肌 MMP 表达和抗心肌纤维化的作用。本研究拟探讨白藜芦醇对酒精诱导的心肌纤维化的预防作用及其可能机制,旨在为酒精性心肌纤维化的防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,体重 250 ~ 300 g,购自第三军医大学实验动物中心[SCXK(渝)2007-0003],所有实验严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。白藜芦醇购自陕西中林医药有限公司。速眠新 II 购自长春市军需大学兽医研究所。抗 MMP-2、抗 MMP-9 及抗 β -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物分组及干预

大鼠随机分为三组:对照组、酒精组、酒精 + 白藜芦醇组,每组 10 只。酒精组和酒精 + 白藜芦醇组在第 1 周给予含 10% 乙醇的饮用水,第 2 周给予含 20% 乙醇的饮用水,第 3 周至实验结束均给予含 36% 乙醇的饮用水,动物模型的构建参照文献[7],以心肌显著纤维化为建模成功标准。酒精 + 白藜芦醇组大鼠给予含 0.5% 白藜芦醇的饲料^[8]。

1.3 心室标本采集

各组大鼠处死后取左心室游离壁,去除血液和脂肪组织后迅速投入液氮中速冻,随后转入 -80°C 低温冰箱中保存备用。

1.4 心肌纤维化评估

各组心肌组织经福尔马林固定后,常规石蜡切片,行 Masson 染色。用计算机图像分析仪(TE 2000,日本尼康公司)检测心肌纤维化面积,计算心肌胶原容积分数(CVF), $\text{CVF} = \text{胶原面积} / \text{总面积}$,计算方法参照文献[9]。每张切片随机取 4 ~ 6 个视野计算,取其平均值。

1.5 Western blot 检测

采用 Western blot 检测各组大鼠心肌组织中

MMP-2 及 MMP-9 的蛋白表达。按常规方法提取总蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上,加入一抗在 4°C 冰箱中孵育过夜,加入二抗后在 37°C 摇床中孵育 4 h,将膜置于化学发光剂中曝光,胶片显影及定影。用 Gel Doc 2000 Imager(Bio-Rad 公司)进行半定量,计算目的蛋白与 β -actin 的比值。

1.6 免疫荧光法

取各组心肌组织包埋后行冰冻切片(Leica CM1950,德国徕卡公司),在空气中干燥,在 -20°C 冰冻的丙酮中浸泡 5 min,在 5% 胎牛血清中 37°C 封闭 5 min。加用 1:200 的抗 FN 抗体(室温)60 min,再用 PBS 冲洗 3 次,室温下加 1:100 的 FITC 标记的二抗 30 min,用 PBS 冲洗后封片,400 倍荧光显微镜(TE 2000,日本尼康公司)下观察并摄相。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间差异比较采用单因素方差分析,将 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对酒精性心肌纤维化的影响

长期酒精摄入导致心肌基质胶原纤维显著增生,酒精组 CVF 较对照组显著增加($P < 0.01$);酒精 + 白藜芦醇组心肌基质纤维较酒精组显著减少,且酒精 + 白藜芦醇组 CVF 较酒精组显著降低($P < 0.01$;表 1 和图 1)。

表 1. 心肌组织的胶原容积分数

Table 1. The collagen volume fraction of myocardial tissue

分 组	CVF
对照组	1.94% \pm 0.46%
酒精组	10.56% \pm 1.56% ^a
酒精 + 白藜芦醇组	3.56% \pm 0.46% ^b

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与酒精组比较。

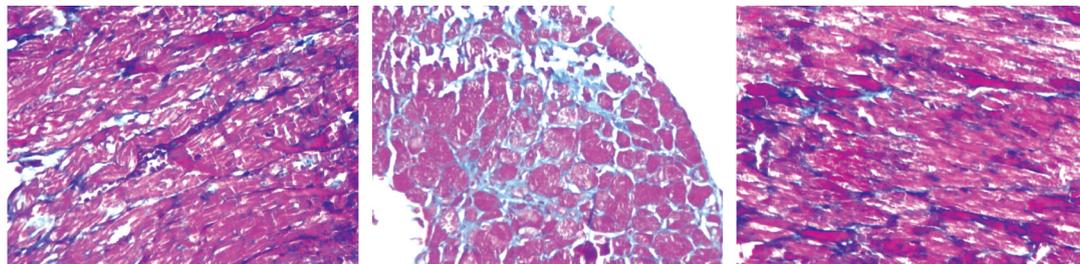


图 1. 白藜芦醇对酒精性心肌纤维化的影响(HE 染色, $400 \times$) 从左至右为对照组、酒精组、酒精 + 白藜芦醇组。

Figure 1. The effect of resveratrol on alcohol-induced myocardial fibrosis

2.2 白藜芦醇对酒精诱导的纤连蛋白破坏的影响

与对照组比较,酒精组心肌 FN 的完整性被显著破坏,加用白藜芦醇可显著抑制酒精诱导的心肌

FN 破坏(图 2)。酒精组心肌 FN 荧光强度比对照组明显降低($P < 0.01$),而白藜芦醇心肌 FN 荧光强度较酒精组显著增加($P < 0.01$;表 2)。

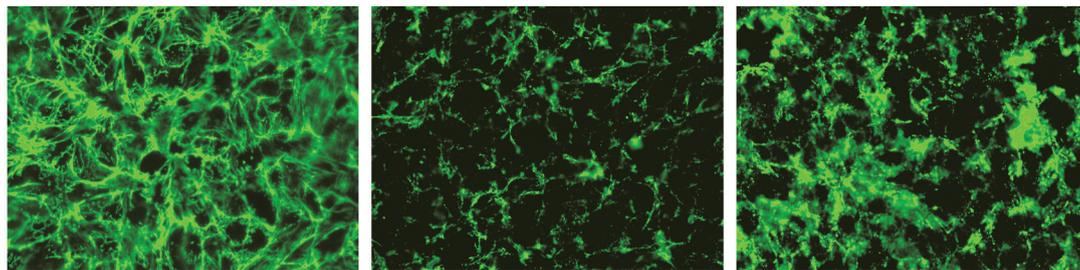


图 2. 白藜芦醇对酒精诱导的纤连蛋白骨架结构破坏的影响(免疫荧光法, 400 ×)

从左至右为对照组、酒精组、酒精 + 白藜芦醇组。

Figure 2.

The effect of resveratrol on alcohol-induced degradation of fibronectin

表 2. 心肌纤连蛋白的相对荧光强度

Table 2. The relative fluorescence intensity of cardiac fibronectin

分 组	相对荧光强度
对照组	100% ± 0%
酒精组	25.70% ± 3.57% ^a
酒精 + 白藜芦醇组	59.70% ± 5.70% ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与酒精组比较。

2.3 白藜芦醇对酒精诱导的 MMP-2 和 MMP-9 上调的影响

酒精组心肌组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而酒精 + 白藜芦醇组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平均显著低于酒精组 ($P < 0.01$; 图 3 和表 3)。

3 讨 论

长期大量摄入酒精可导致严重的心脏功能和结构损害, 但潜在机制尚不明确。一方面酒精可导致心肌细胞损害, 另一方面酒精可促进心肌间质纤维的沉积, 两方面的因素共同促进心肌结构损害, 最终导致终末期心力衰竭和各种严重的心律失常^[10]。

MMP 包括胶原酶、明胶酶、基质溶解素及膜型 MMP(MT-MMP)。明胶酶包括明胶酶 A(MMP-2) 和 B(MMP-9), 两种明胶酶均具有降解间质蛋白的能力^[2]。MMP-2 和 MMP-9 不仅参与基质纤维的降解, 同时也参与其合成。既往的研究表明, 随着心功能的恶化, MMP 的表达水平和活性水平均升高^[2]。而采用血管紧张素受体拮抗剂抗心肌重构后可伴随着 MMP 表达水平的降低^[2]。这说明 MMP 的表达水平与心肌重构呈正相关。本研究发现酒精可显著增加 MMP-2 和 MMP-9 的表达, 提示其为酒精性心肌损害的分子机制之一。因此, 抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达和活性可能是酒精性心肌损害的有效防治策略。

白藜芦醇系蒽醌萜类化合物, 存在于葡萄、虎杖等植物中, 同时也存在于红葡萄酒中。既往的研究表明白藜芦醇具有广泛的心血管系统保护效应^[11], 但具体机制尚不清楚。曾有研究在其他组织和细胞中发现白藜芦醇可抑制 MMP 的活性^[6]。还有研究表明白藜芦醇对动脉粥样硬化兔心肌纤维化时心肌 MMP-2 的表达具有调控作用^[12]。我们既往的研究还表明白藜芦醇可对抗酒精引起的心肌损害^[13]。本研究证实了白藜芦醇可显著削弱酒精导致的心肌组织中 MMP-2 和 MMP-9 的上调。同时还发现添加白藜芦醇可显著削弱酒精诱导的心肌纤维化。因

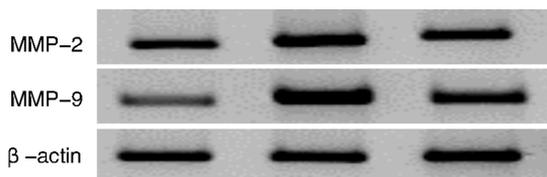


图 3. 心肌纤连蛋白的相对荧光强度

a 为 $P < 0.01$, 与对照

组比较; b 为 $P < 0.01$, 与酒精组比较。

Figure 3. The relative fluorescence intensity of cardiac fibronectin

表 3. 酒精和白藜芦醇对 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Table 3. The effects of alcohol and resveratrol on the protein expressions of MMP-2 and MMP-9

项 目	对照组	酒精组	酒精 + 白藜芦醇组
MMP-2	0.82 ± 0.11	1.35 ± 0.09 ^a	0.98 ± 0.12 ^b
MMP-9	0.45 ± 0.08	1.86 ± 0.21 ^a	1.02 ± 0.08 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与酒精组比较。

此,抑制 MMP-2 和 MMP-9 的过度表达可能是白藜芦醇抗酒精性心肌纤维化的分子机制。此外,酒精性心肌纤维化与其他多种炎症标志物也有密切关系^[14]。而 MMP 及其他炎症标志物能否作为酒精性心肌纤维化诊断和治疗的靶点尚需进一步研究。

既往的研究表明适量饮用红葡萄酒可能具有心血管保护作用,但其机制尚不清楚^[15]。本研究提供了部分证据,认为红葡萄酒中所含的白藜芦醇可能部分对抗大量酒精诱导的心肌纤维化,这可能是红葡萄酒心血管保护效应的机制之一。

综上所述,本研究一方面揭示了 MMP-2 和 MMP-9 表达水平的增加可能是酒精性心肌纤维化的发病机制之一;另一方面证实了白藜芦醇可能是酒精性心肌纤维化的新型预防药物。此外,本研究也为研究红葡萄酒对心血管系统的保护机制提供了初步实验依据。

[参考文献]

- [1] Piano MR. Alcoholic cardiomyopathy incidence, clinical characteristics, and pathophysiology [J]. *Chest*, 2002, 121 (5): 1 638-650.
- [2] 杨永健,张鑫,朱文玲,等. 基质金属蛋白酶参与心力衰竭患者心肌细胞外基质的调控[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86 (24): 1 693-696.
- [3] Van Linthout S, Seeland U, Riad A, et al. Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy [J]. *Basic Res Cardiol*, 2008, 103 (4): 319-327.
- [4] Yang D, Ma S, Li D, et al. Angiotensin II receptor blockade improves matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 balance and restores fibronectin expression in rat infarcted myocardium [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388 (3): 606-611.
- [5] Cordova AC, Jackson LS, Berke-Schlessel DW, et al. The cardiovascular protective effect of red wine [J]. *J Am Coll Surg*, 2005, 200 (3): 428-439.
- [6] Gagliano N, Moscheni C, Torri C, et al. Effect of resvera-

rol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) on human cultured glioblastoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59 (7): 359-364.

- [7] Licheri D, Vargiu R, Fadda F, et al. Long-term voluntary ethanol consumption induces impairment of the mechanical performance in the papillary muscle of Sardinian alcohol-preferring rats [J]. *Alcohol Alcohol*, 2001, 36 (1): 44-47.
- [8] Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats [J]. *Alcohol Alcohol*, 2006, 41 (3): 236-239.
- [9] 陈凡,颜宇波,杨天伦,等. 氯沙坦和曲尼司特抗高血压大鼠心肌纤维化的对比观察 [J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20 (7): 1 000-003.
- [10] Ren J. Mechanisms of alcoholic heart disease [J]. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2008, 2 (6): 497-506.
- [11] Bradamante S, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2004, 22 (3): 169-188.
- [12] 高淑卿,朱鹏立. 白藜芦醇对动脉粥样硬化兔心肌纤维化和基质金属蛋白酶 2、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (2): 101-103.
- [13] 马双陶,杨大春,李德,等. 白藜芦醇通过激活腺苷酸活化蛋白激酶预防酒精性心肌病 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18 (12): 948-950.
- [14] 崔香丹,金武丕,俞成林. IL-6、IL-10 及氧自由基在大鼠急性酒精性心肌损伤中的作用及意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20 (19): 2 898-900.
- [15] Streppel MT, Ocke MC, Boshuizen HC, et al. Long-term wine consumption is related to cardiovascular mortality and life expectancy independently of moderate alcohol intake: the Zutphen Study [J]. *J Epidemiol Community Health*, 2009, 63 (7): 534-540.

(此文编辑 文玉珊)