

酚妥拉明对心肌重构大鼠心肌细胞外基质的影响

唐燕, 庞晓

(新疆石河子大学医学院第一附属医院心内科, 新疆石河子市 832002)

[关键词] 酚妥拉明; 基质金属蛋白酶; 胶原蛋白 I; 细胞外基质重构

[摘要] **目的** 探讨酚妥拉明对去甲肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚心肌细胞外基质(ECM)重塑的影响及可能机制。**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+酚妥拉明组(治疗组)。采用超声心动图观察心脏结构及功能变化,测定胶原容积积分(CVF)、羟脯氨酸、心肌胶原含量,用免疫组织化学法检测心肌组织基质金属蛋白酶2和胶原蛋白I的蛋白表达。**结果** 模型组大鼠发生左室肥厚,其羟脯氨酸含量、CVF值显著高于对照组($P < 0.01$),基质金属蛋白酶2和胶原蛋白I蛋白表达上调($P < 0.01$)。治疗组心肌肥大明显改善,羟脯氨酸、CVF降低,基质金属蛋白酶2和胶原蛋白I蛋白表达下降($P < 0.05$)。**结论** 酚妥拉明可有效减轻SD大鼠心肌肥厚的发生及ECM重塑;酚妥拉明缓解ECM重塑可能与其降低心肌组织中基质金属蛋白酶2和胶原蛋白I的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Phentolamine on Myocardial Extracellular Matrix of Cardiac Remodeling in Rats

TANG Yan, and PANG Xiao

(Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of the Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

[KEY WORDS] Phentolamine; Matrix Metalloproteinases; Collagen I; Extracellular Matrix Remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of phentolamine on myocardial extracellular matrix of cardiac remodeling induced by norepinephrine in rats. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into control group, norepinephrine group (model group) and norepinephrine + phentolamine group (treatment group). Left ventricular structure and function among groups of rats were measured by echocardiography. Extracellular matrix remodeling was evaluated by morphological examination, stained with Van-Gieson (VG). The content of hydroxyproline in the tissue of myocardium was measured. The protein expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and collagen I were examined by immunohistochemical analysis. **Results** Compared with control group, left ventricular hypertrophy, the hydroxyproline content, collagen volume fraction (CVF) and protein expression of MMP-2 and collagen I was significantly higher in the model group rats ($P < 0.01$). In treatment group rats, myocardial hypertrophy obviously improved, hydroxyproline, CVF reduced, protein expression of MMP-2 and collagen I decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Phentolamine can prevent the cardiac hypertrophy and extracellular matrix remodeling, which was associated with the attenuation of myocardial MMP-2 and collagen I.

心肌重构是心力衰竭等心血管疾病发生、发展过程中的重要环节,是引起心血管疾病发病率和死亡率显著升高的一个独立危险因素。心肌重构的发生包括心肌细胞本身的改变及心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的重塑。在心脏间质重

构过程中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)起着重要作用^[1]。

交感神经递质儿茶酚胺作为心肌肥大的主要刺激因素之一已被很多研究所证实。临床和动物遗传学研究均显示 $\alpha 1$ 肾上腺素能受体($\alpha 1$ -adrener-

[收稿日期] 2013-12-25

[作者简介] 唐燕,硕士研究生,主治医师,研究方向为心血管疾病基础与临床,E-mail为 candyty111@126.com。通讯作者庞晓,博士,教授,主任医师,研究方向为心血管疾病基础与临床,E-mail为 px0993@163.com。

gic receptor, $\alpha 1$ -AR) 在心肌细胞生长发育和病理肥厚中有着重要的作用^[2], 但对于 α 受体阻滞剂对心脏基质重构的抑制作用研究较少。在本研究中, 使用去甲肾上腺素(norepinephrine, NE) 建立的大鼠心肌重构模型, 观察心肌细胞内 MMP-2 及胶原蛋白 I 的蛋白表达, 通过研究 α 受体阻滞剂酚妥拉明对心脏内上述蛋白表达的影响, 初步探讨酚妥拉明对心脏细胞外基质重构的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立

雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 240 ~ 280 g, 购自新疆医科大学实验动物中心。将大鼠随机分为 3 组: (1) 对照组 ($n=8$); (2) 去甲肾上腺素组 (模型组) ($n=8$); (3) 去甲肾上腺素 + 酚妥拉明组 (治疗组) ($n=8$)。对照组给予腹腔注射生理盐水; 模型组采用 NE 注射液 (上海和丰制药公司产品) 2.0 mg/(kg · d), 腹腔注射, 每天 2 次, 连续给药 15 天, 制备心肌重构模型; 治疗组 ($n=8$) 在给予 NE 注射液第 6 日时给予酚妥拉明 (上海旭东海普制药公司产品) 5 mg/(kg · d), 皮下注射 10 日。15 天后处死大鼠。

1.2 超声检查

各组动物在处死前以 3% 戊巴比妥钠行腹腔注射麻醉 (50 mg/kg), 剃去胸前体毛, 采用 PHILIPS-IE33 超声仪, 频率 8 ~ 12 MHz。于胸骨旁左心室短轴切面乳头肌水平, 清晰显示胸骨旁左心室长轴切面, 测量收缩期左心室后壁厚度 (systolic posterior wall, PWs)、舒张期左心室后壁厚度 (diastolic posterior wall, PWd)、收缩末期左心室内径 (left ventricular end-systolic dimension, LVEDs)、舒张末期左心室内径 (left ventricular end-diastolic dimension, LVEDd)、室间隔厚度 (interventricular septum thickness, IVST), 计算左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 及短轴缩短率 (fractional shortening, FS)。测量 3 个心动周期, 取均值。

1.3 心脏称重

检测完毕后处死动物, 称体重 (body weight, BW), 迅速摘取心脏, 冰生理盐水冲洗残血, 去除大血管残根和结缔组织, 称量全心重量 (whole heart weight, WHW), 剪除心房和右心室后称量左心室重量 (left ventricular weight, LVW), 计算左心室重量指数 (LVWI) = LVW/BW; 剪取部分左心室游离壁心肌组织, 固定于 4% 多聚甲醛液中做组织病理检查

及免疫组织化学染色, 剩余部分冻存于液氮中, 待用。

1.4 心肌羟脯氨酸测定

羟脯氨酸试剂盒购自南京建成生物工程研究所。按试剂盒说明操作, 测定左心室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, 间质胶原含量等于羟脯氨酸的含量乘以 7.46, 结果以 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 表示每毫克心脏组织中胶原的含量。

1.5 心肌胶原形态学观察及定量分析

石蜡包埋, 切片厚约 4 μm 。用 Van-Gieson (VG) 染色法, 光镜下可见: 心肌细胞呈黄色, 胶原呈红色。然后用 Image-Pro 5.1 图像分析软件进行图像分析, 测量左心室的胶原容积分数 (collagen volume fraction, CVF), $\text{CVF} = \text{左心室胶原面积} / \text{所测视野面积}$ 。随机取 6 个视野, 以均值作为该心脏的 CVF^[3]。

1.6 免疫组织化学法测定心肌 MMP-2、胶原蛋白 I 表达情况

石蜡切片, 常规脱蜡, 3 mL/L 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 热修复抗原后, 滴加一抗 MMP-2 (1:200 稀释, 购自 Milipore 公司)、胶原蛋白 I (1:200 稀释, 购自 Abcam 公司), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 滴加生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 Image-Pro 5.1 图像分析软件对 MMP-2 (细胞质中棕褐色颗粒为阳性)、胶原蛋白 I (心脏间质棕褐色颗粒为阳性) 蛋白表达进行图像分析, 每张切片取 5 个连续的高倍视野, 在阳性表达区随机选择 5 个视野, 测定平均阳性表达率, 其值越高, 表达量越多, 进行半定量分析。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件包对数据进行统计分析。各组计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 组间比较在方差齐时用方差分析, 两两比较用 LSD。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性意义。

2 结果

2.1 心肌肥厚指数

各组大鼠体重用药前后无统计学差异。模型组 LVW、LVWI 明显大于对照组 ($P < 0.01$), 治疗组 LVW、LVWI 仍大于对照组 ($P < 0.05$), 但较模型组明显减低 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1. 各组大鼠心脏重量指数比较

Table 1. Comparison of LVWI among groups of rats

分 组	用药前体重(g)	用药后体重(g)	LVW(mg)	LVWI
对照组	257.63 ± 10.80	295.70 ± 12.02	628.03 ± 48.15	2.12 ± 0.14
模型组	261.35 ± 10.63	273.73 ± 13.59	772.13 ± 63.01 ^b	2.82 ± 0.15 ^b
治疗组	263.30 ± 13.37	287.27 ± 18.43	685.63 ± 26.79 ^{ac}	2.39 ± 0.13 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.01$, 与模型组相比。

2.2 VG 染色结果

对照组心脏组织可见少量纤维组织;模型组心肌细胞排列紊乱,心肌内小血管周围及心肌间质有较多

胶原沉积,左室心肌总体 CVF 明显增高($P < 0.01$;表 2);治疗组心肌胶原沉积较模型组减少,CVF 显著降低($P < 0.01$),但仍高于对照组($P < 0.05$)(图 1、表 2)。

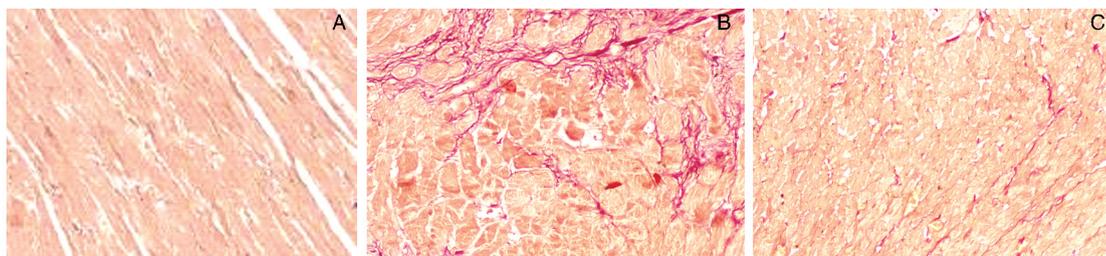


图 1. VG 染色胶原形态学观察($\times 100$) A 为对照组,B 为模型组,C 为治疗组。

Figure 1. The morphological observation of collagen with VG staining ($\times 100$)

表 2. 各组大鼠 CVF、羟脯氨酸比较

Table 2. Comparison of CVF, hydroxyproline in different groups of rats

分 组	CVF	羟脯氨酸 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	胶原含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
对照组	2.78% ± 0.30%	0.301 ± 0.013	2.24 ± 0.09
模型组	6.55% ± 0.89% ^a	0.502 ± 0.026 ^a	3.74 ± 0.19 ^a
治疗组	4.13% ± 0.77% ^{ab}	0.417 ± 0.019 ^{ab}	3.11 ± 0.09 ^{ab}

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

2.3 胶原含量测定结果

模型组心肌组织中羟脯氨酸、胶原含量比对照组显著升高($P < 0.01$);治疗组胶原含量比模型组显著降低($P < 0.01$),且与对照组相比也有显著差异($P < 0.01$;表 2)。

2.4 超声心动图测量结果

模型组 PWs、PWd、IVST 值较对照组显著升高($P < 0.01$),LVEDd、LVEF 值较对照组升高($P < 0.05$);治疗组 PWs、PWd、IVST 值比模型组显著降低($P < 0.01$),而与对照组之间差异无显著性(表 3)。

表 3. 各组大鼠超声左心室结构参数比较

Table 3. Comparison of left ventricular structure among groups of rats by echocardiographic measurement

分 组	PWd(mm)	PWs(mm)	IVST(mm)	LVEDd(mm)	LVEDs(mm)	LVEF
对照组	1.76 ± 0.17	2.09 ± 0.26	1.46 ± 0.18	5.58 ± 0.18	3.69 ± 0.48	78.13% ± 3.43%
模型组	2.57 ± 0.24 ^b	2.96 ± 0.13 ^b	2.04 ± 0.22 ^b	5.30 ± 0.14 ^a	3.58 ± 0.37	83.33% ± 3.32% ^a
治疗组	1.93 ± 0.14 ^c	2.25 ± 0.21 ^c	1.51 ± 0.15 ^c	5.50 ± 0.23	3.79 ± 0.41	80.01% ± 3.03%

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.01$, 与模型组相比。

2.5 心肌组织中 MMP-2 和胶原蛋白 I 蛋白表达

心肌组织中 MMP-2 在心肌细胞胞浆表达,胶原蛋白 I 在细胞外间质表达。模型组 MMP-2、胶原蛋

白 I 较对照组显著增高($P < 0.01$),治疗组 MMP-2、胶原蛋白 I 表达低于造模组,但高于对照组($P < 0.01$)(图 2、表 4)。

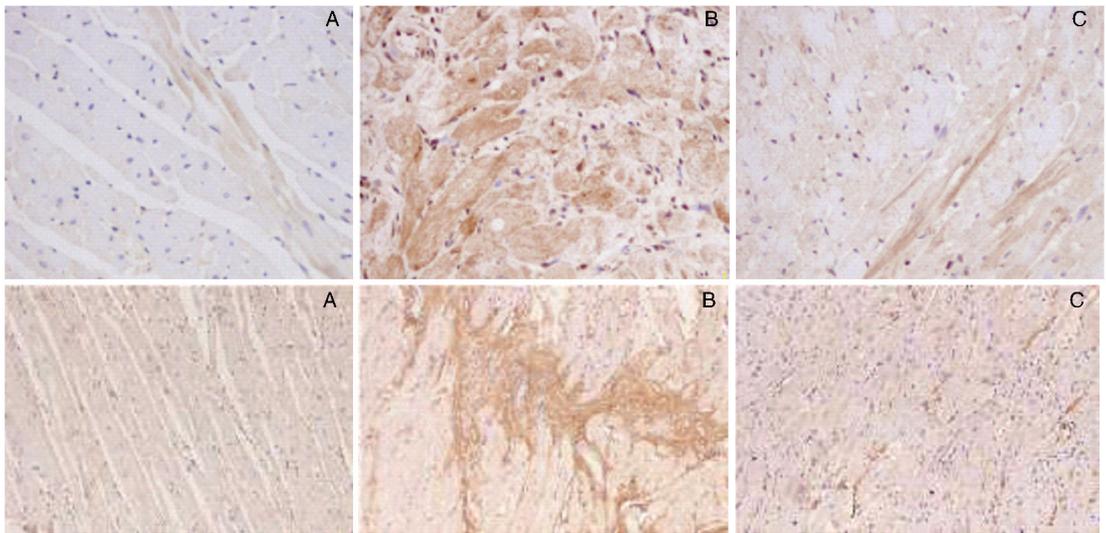


图 2. 免疫组织化学法检测 MMP-2 和胶原蛋白 I 上图为 MMP-2($\times 200$), 下图为胶原蛋白 I($\times 100$); A 为对照组, B 为模型组, C 为治疗组。

Figure 2. Immunohistochemical detection on the expression of MMP2 and collagen I

表 4. 心肌组织中 MMP-2、胶原蛋白 I 表达

Table 4. The expression of MMP2, collagen I in myocardial tissue

分 组	MMP-2	胶原蛋白 I
对照组	15.42 \pm 2.40	3.96 \pm 0.74
模型组	69.67 \pm 7.54 ^a	20.38 \pm 1.46 ^a
治疗组	34.04 \pm 5.55 ^{ab}	8.82 \pm 1.86 ^{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

心肌重塑既有心肌细胞的改变, 也有间质网络的重建。ECM 主要由 I、III 型胶原纤维组成, 其中 I 型约占心肌胶原总数 80%, 其僵硬度和抗牵拉性较强; III 型约占 11%, 其伸展性和弹性较大。当发生心肌重塑时 ECM 合成增加, 尤其是 I 型胶原大量沉积, 使心肌僵硬增高, 顺应性降低, 从而导致心脏舒张功能不全甚至心力衰竭。MMP 是一组降解 ECM 的重要酶, 对 ECM 的稳定有重要作用。当 MMP 表达增强时, 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, 使心肌不成熟的纤维组织增加, 致使心肌组织中胶原含量增加, 引发 ECM 重构^[4]。酚妥拉明是 α 受体阻滞剂中的一种, 可以部分阻滞由于交感神经兴奋引起的血管收缩, 扩张全身动静脉血管, 降低心脏的前后负荷。但酚妥拉明对 ECM 重构影响研究较少, 且结论不一。

本研究采用 NE 成功诱导大鼠心肌肥厚模型,

经 NE 处理大鼠的超声心动图 PWs、PWd、IVST、LVEDd、LVEF 较对照组显著升高, 动物 LVW、LVWI 值较对照组明显增大, 由此可说明采用该方法成功诱导出了心肌肥厚的动物模型。在本研究中模型组心肌组织中总胶原 (VG 染色) 及羟脯氨酸含量明显增多, 证实 NE 刺激可导致大鼠心脏重构和纤维化的发生, 模型组 MMP-2 和胶原蛋白 I 的蛋白表达也明显高于对照组, 与有关研究报道^[5] 相同。用酚妥拉明对心肌重构大鼠进行干预后, 超声心动图、LVWI、CVF、羟脯氨酸含量和 MMP-2、胶原蛋白 I 蛋白表达均较模型组明显减少, 但仍高于对照组, 说明酚妥拉明可能部分阻断 NE 诱导的心肌肥大及纤维化。酚妥拉明抑制 ECM 重构可能是由于降低 MMP-2 表达, 使胶原蛋白 I 及胶原含量减少。推测其发生的可能机制之一是由于在交感神经过度激活时, 心肌细胞释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1、6 等一系列细胞因子^[6,7], 其中 TNF- α 可以激活 c-Jun 基因的表达, 进而激活金属蛋白酶基因的表达, 使 MMP 的表达与活化增强^[7,8], 可直接促使心肌胶原的增多^[9]。MMP-2 既可降解明胶, 又可以分解间质中的胶原, 在心肌肥厚及心力衰竭左心室扩张发挥重要作用^[10]。酚妥拉明可抑制交感神经活性, 使心肌细胞释放 TNF- α 及炎症因子减少, 从而减少 MMP-2 表达, 改善 ECM 重构。

目前认为, NE 主要通过 $\alpha 1$ 受体介导心肌肥大, 但 β 受体也参与其中并发挥了重要作用^[11]。王桂君等^[12] 提出 NE 的这种致心肌肥大作用能被 $\alpha 1$ -

AR 阻断剂哌唑嗪或 β -AR 阻断剂心得安部分阻断, 被二者联合作用完全阻断。本研究证实酚妥拉明有效减轻 NE 诱导大鼠的心肌肥厚发生及 ECM 重塑, 因此推测在一些高交感神经活性的心血管疾病 (如: 冠心病、高血压性心脏病、心力衰竭) 早期联合使用 $\alpha 1$ 和 β 受体阻滞剂, 可改善慢性交感神经激活所致的心脏重构, 减缓心力衰竭发生发展的病理进程, 但具体机制尚不清楚, 需进一步证实及探讨。

[参考文献]

- [1] 束长城, 魏万林. 中医药逆转心肌纤维化的研究进展 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2011, 3(1): 74-78.
- [2] Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, et al. Cardiac $\alpha 1$ -adrenergic drive in pathological remodelling [J]. Cardiovascular Research, 2008, 77(3): 452-462.
- [3] 赵丽霞, 马洪滨, 李春祥, 等. 间充质干细胞移植对缺血/再灌注大鼠心肌胶原与去甲肾上腺素转运蛋白的影响 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 6(1): 76-79.
- [4] Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function [J]. Physiological Reviews, 2007, 87(4): 1 285-342.
- [5] Briest W, Hölzl A, Rabler B, et al. Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts [J]. Cardiovascular Research, 2003, 57(2): 379-387.
- [6] Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from

adaptation to maladaptation 1 [J]. Annual Review of Physiology, 2003, 65(1): 81-101.

- [7] Sun M, Dawood F, Wen WH, 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] Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, et al. Tumor necrosis factor α induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion; inhibition by simvastatin [J]. Cardiovascular Research, 2004, 64(3): 507-515.
 - [9] Shin MH, Moon YJ, Seo JE, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2008, 44(4): 635-645.
 - [10] Graham HK, Trafford AW. Spatial disruption and enhanced degradation of collagen with the transition from compensated ventricular hypertrophy to symptomatic congestive heart failure [J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007, 292(3): H1 364-372.
 - [11] Leicht M, Greipel N, Zimmer HG. Comitogenic effect of catecholamines on rat cardiac fibroblasts in culture [J]. Cardiovascular Research, 2000, 48(2): 274-284.
 - [12] 王桂君, 姚玉胜, 王洪新. U50488H、哌唑嗪及心得安对去甲肾上腺素诱导心肌肥大的作用比较 [J]. 中国应用生理学杂志, 2010, 16(1): 82-85.
- (此文编辑 曾学清)