

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-10-1008-07

半乳糖凝聚素 3 对心肌纤维化和心室重构的作用

邓文浩¹, 李树仁^{1,2}, 张跃华¹, 郝 潇¹, 李 沙¹, 马玉龙¹

(1.河北医科大学研究生学院,河北省石家庄市 050011;2.河北省人民医院心脏一科,河北省石家庄市 050051)

[关键词] 半乳糖凝聚素 3; 改良柑橘果胶; 心肌纤维化; 心室重构

[摘要] **目的** 通过半乳糖凝聚素 3 (Gal-3) 特异性竞争拮抗剂——改良柑橘果胶 (MCP) 抑制 Gal-3 途径, 探讨 Gal-3 在心功能不全心室重构中的作用。**方法** 将 30 只家兔随机分为假手术组、心功能不全组、MCP 组。结扎冠状动脉前降支, 制作心肌梗死后心功能不全模型。模型制作成功后, MCP 组用生理盐水配置 75 g/L MCP, 以 2 mL/(kg·d) 灌胃 4 周; 假手术组及心功能不全组给予生理盐水 2 mL/(kg·d) 灌胃 4 周。术前及术后 2、4、6 周, 用心脏超声仪测定各组家兔心功能, ELISA 检测血清 Gal-3、脑钠肽 (BNP) 水平。实时荧光定量 PCR 检测心肌组织 Gal-3、胶原蛋白 I、III mRNA 的表达, 计算 I/III 比值。术后 6 周, Masson 染色观察心肌梗死区域组织病理学情况, Western blot 检测 Gal-3、胶原蛋白 I、III 的蛋白表达。**结果** 给药 4 周后 MCP 组心功能较心功能不全组明显好转 ($P<0.01$)。心功能不全组血清 Gal-3 高于假手术组 ($P<0.05$), MCP 组血清 Gal-3 较心功能不全组明显下降 ($P<0.05$)。相关性分析显示, 心功能不全组家兔心功能左心室射血分数与血清 Gal-3 呈负相关性 ($r=-0.841$, $P=0.009$), 左心室舒张末期径与血清 Gal-3 呈正相关 ($r=0.905$, $P=0.002$)。与心功能不全组相比, MCP 组 Gal-3、胶原蛋白 I、III mRNA 表达明显减低 ($P<0.05$)。光学显微镜下心功能不全组可见心肌细胞排列紊乱, 部分心肌细胞坏死、水肿, 胶原大量沉积并伴有炎性细胞浸润; MCP 组可见心肌纤维增粗, 排列稍整齐。心功能不全组梗死区域心肌组织 Gal-3、胶原蛋白 I、III 蛋白表达明显高于 MCP 组和假手术组; 相关性分析显示, 心功能不全组梗死区域 Gal-3 与胶原蛋白 III 呈正相关 ($r=0.793$, $P=0.019$)。**结论** Gal-3 在心力衰竭心室重构和心肌纤维化进展中起到关键的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of galectin-3 on myocardial fibrosis and ventricular remodeling

DENG Wen-Hao¹, LI Shu-Ren^{1,2}, ZHANG Yue-Hua¹, HAO Xiao¹, LI Sha¹, MA Yu-Long¹

(1. Graduate College, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 2. Department of Cardiology, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

[KEY WORDS] Galectin-3; Modified citrus pectin; Myocardial fibrosis; Ventricular remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of galectin-3 (Gal-3) in ventricular remodeling of heart insufficiency, via the pathway of Gal-3 specific competitive antagonist--modified citrus pectin (MCP) inhibiting Gal-3. **Methods** 30 rabbits were randomly divided into sham operation group, cardiac insufficiency group and MCP group. A model of cardiac dysfunction after myocardial infarction was made by ligating the anterior descending branch of coronary artery. After the model was successfully made, MCP group was treated with 75 g/L MCP allocated with normal saline, and intragastric administration for 4 weeks with 2 mL/(kg·d), and sham operation group and cardiac insufficiency group received the intragastric administration of 2 mL/(kg·d) normal saline for 4 weeks. Before operation and 2, 4, 6 weeks after operation, cardiac function was measured by cardiac ultrasound, and serum levels of Gal-3 and brain natriuretic peptide (BNP) were detected by ELISA. The mRNA expressions of Gal-3, collagen I and III in myocardial tissue were detected by real-time quantitative PCR, and the ratio of I/III was calculated. 6 weeks after operation, Masson staining was used to observe the histopathology of myocardial infarction region, and the protein expressions of Gal-3, collagen I and III were detected by Western blot. **Results** After 4 weeks of administration, the heart function of the MCP group was significantly improved compared with the cardiac insufficiency group ($P<0.01$). The serum Gal-3 in cardiac insufficiency group was higher than

[收稿日期] 2016-11-25

[修回日期] 2017-01-03

[作者简介] 邓文浩, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为心力衰竭、心肌梗死, E-mail 为 dengwh1992@163.com。通讯作者李树仁, 博士, 主任医师, 研究方向为心力衰竭、心肌梗死、心肌病, E-mail 为 lsr64@126.com。

that in sham operation group ($P<0.05$), and serum Gal-3 in MCP group was significantly lower than that in cardiac insufficiency group ($P<0.05$). Correlation analysis showed that left ventricular ejection fraction was negatively correlated with serum Gal-3 ($r=-0.841$, $P=0.009$), and left ventricular end-diastolic diameter was positively correlated with serum Gal-3 ($r=0.905$, $P=0.002$), in cardiac insufficiency group. Compared with cardiac insufficiency group, the mRNA expression of Gal-3, collagen I and III in MCP group was significantly decreased ($P<0.05$). Under optical microscope, cardiac insufficiency group showed myocardial cell disorder, part of myocardial cell necrosis, edema, acollagen deposition and inflammatory cell infiltration; MCP group showed myocardial fiber thickening, arranging in a slightly tidy order. Protein expressions of Gal-3, collagen I and III in the infarcted myocardium of cardiac insufficiency group were significantly higher than those in MCP group and sham operation group. Correlation analysis showed that Gal-3 in infarction region was positively correlated with collagen III in cardiac insufficiency group ($r=0.793$, $P=0.019$). **Conclusion** Gal-3 plays a key role in the progressions of ventricular remodeling and myocardial fibrosis in heart failure.

心肌梗死是临床中常见危害人类健康的疾病之一,心肌梗死后由于心肌细胞损伤、神经内分泌激活、容量和压力负荷剧增而致心室重构,最终导致心功能不全的发生。心脏细胞外基质成分主要由胶原蛋白 I 型、III 型组成,当心室重构时 I 型、III 型胶原大量沉积在心肌间质,且 I 型、III 型胶原比例失调,从而造成心肌纤维化。细胞外基质半乳糖凝集素 3 (galectin-3, Gal-3) 是半乳糖凝集素家族的一员,含有对 β 半乳糖苷具有特殊亲和力的糖识别域,广泛存在于细胞核、细胞质、细胞表面和细胞基质^[1]。在大多数组织中 Gal-3 表达和纤维化发生进展之间的相关性已被发现,如在肝、肾和特发性肺纤维化的情况下 Gal-3 表达被上调^[2]。在细胞外基质,巨噬细胞通过分泌 Gal-3 激活静息成纤维细胞表型转化为成纤维细胞表型^[3]。Gal-3 参与心肌纤维化、心室重构并作为主要介质。Kolatsi-Joannou 等^[4]发现 Gal-3 能诱导心脏及肾脏纤维化,导致心脏功能障碍、急性肾损伤。有研究发现醛固酮可上调 Gal-3 表达,并且 Gal-3 在体内体外介导血管平滑肌细胞炎症、纤维化反应^[5]。目前国内有关 Gal-3 在心肌纤维化中的作用及其表达水平的研究较少,关于运用 Gal-3 特异性配体拮抗剂——改良柑橘果胶(modified citrus pectin, MCP) 的研究更是寥寥无几。本研究探讨 Gal-3 在缺血性心功能不全心肌纤维化中的作用,观察 Gal-3 拮抗剂对缺血性心功能不全的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验选用健康 3 月龄新西兰雄性家兔共 30 只,体重 2.73 ± 0.13 kg,由河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

Gal-3 及脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司);HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒、UltraSYBR Mixture (With ROX)、5 $\times$ RNA Loading Buffer (CWbio 公司);0.5%、1% 苏木素、0.5% 伊红 (Sigma 公司);Col1a1 抗体、Gal-3 抗体、Actin 抗体 (Abcam 公司);Col3a1 抗体 (Abbiotec 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG (Santa 公司);RIPA 裂解液(碧云天公司);Western blot 封闭液 (BD 脱脂奶粉配制);Western blot 显色液、PVDF 膜 (Thermo 公司)。

1.3 实验仪器

心脏超声仪 (Toshiba 公司);紫外可见分光光度仪 (北京普析通用仪器有限责任公司);涡旋振荡仪 QL-902 (其林贝尔公司);离心机 Centrifuge 5415D (Eppendorf 公司);分光光度计 Nanodrop 2000 (Thermo 公司);荧光定量 PCR 仪 Line Gene 9600 Plus (Bioer Technology 公司);光学显微镜 Ni-U (日本尼康公司);双垂直电泳槽、转移槽、电泳仪 (Cavoy 公司);温控摇床 (其林贝尔公司)。

1.4 动物分组及处理

30 只家兔按随机数字表随机分为假手术组、心功能不全组、MCP 组。实验动物模型制备采用结扎家兔冠状动脉前降支的方法制作^[6]。记录术前及术后开胸结扎冠状动脉前降支的心电图,心肌梗死模型制备成功标准为心尖部及左心室前壁由红色变为暗紫色,局部心肌运动异常,心电图示胸前导联 ST 段持续弓背向上抬高^[7]。术后 3 天每天青霉素 80 万单位肌注。心肌梗死后 2 周左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) 低于 50% 为心功能障碍模型制作成功。心功能不全模型制作成功后, MCP 组用生理盐水配置 75 g/L MCP, 以 2 mL/(kg $\cdot$ d) 灌胃 4 周;假手术组及心功能不全组给予生理盐水 2 mL/(kg $\cdot$ d) 灌胃 4 周。

1.5 超声心动图检测心功能

各组于术前、术后 2、4、6 周由同一专门超声技术人员行超声心动图检测,取胸骨旁左心室长轴切面测定、测量各组左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、舒张末期左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness of end-diastole, LVPWD)、采用辛普森法测得 LVEF。所得的测量值均取 3 次测量的平均值。

1.6 ELISA 法检测血清中 Gal-3、BNP 含量

于术前与术后 2、4、6 周从家兔耳中动脉取血,采集后室温下静置 1~2 h 后,3000 r/min 离心 15 min,取上清。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,依据标准品浓度及其吸光度(absorbance, A)值求得对应公式,依据公式与样品 A 值计算样品 Gal-3、BNP 的浓度。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测心肌组织 Gal-3、胶原

蛋白 I、Ⅲ mRNA 的表达

制作心肌梗死模型成功后 4 周,每组各取 50 mg 心肌梗死区组织进行研磨,用超纯 RNA(CWbio 公司)提取试剂盒提取总 RNA;取 5 μ L RNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,以检测 RNA 的完整性。用 HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒(CWbio 公司)进行反转录,反应条件:65℃ 5 min, 37℃ 50 min, 70℃ 10 min。引物序列见表 1。将获得的 cDNA 用 UltraSYBR Mixture(With ROX)(CWbio 公司)进行扩增,实验操作按产品说明书进行。扩增程序为:95℃ 10 min;95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 45 个循环。以 Actin 为内参照,将目的基因表达的相对定量值用于统计学分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据的相对定量分析(ΔCt =目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值, $\Delta\Delta Ct$ =目的基因 ΔCt 值-对照组基因 ΔCt 值)。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequence

引物名称	引物序列	产物大小
Col1a1 上游引物	5'-TGAGCCAGCAGATTGAGAACAT-3'	165 bp
Col1a1 下游引物	5'-TGTCGCAGAAGACCTTGATGG-3'	
Col3a1 上游引物	5'-GTACAACCTAGCATTCCTCCGACTG-3'	203 bp
Col3a1 下游引物	5'-TTAGAGCAGCCATCTCCAGAAC-3'	
Lgals3 上游引物	5'-CTGTGCCTTATGACCTGCCTCT-3'	301 bp
Lgals3 下游引物	5'-TCATTGACCGCAACCTTGAAGTG-3'	
Actin 上游引物	5'-AGATCGTGCGGGACATCAAG-3'	182 bp
Actin 下游引物	5'-CAGGAAGGAGGGCTGGAAGA-3'	

1.8 心肌组织病理学检测

取左心室中段横截面心肌组织,多聚甲醛固定,石蜡包埋,制片。HE 染色:切片脱蜡至水,用苏木精染色 5 min,蒸馏水冲洗干净,放入 1% 盐酸中浸泡片刻去除非特异性染色,置于常温下片刻,用 0.5% 伊红复染,脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。用 HE、Masson 染色显示心肌组织和胶原组织。光学显微镜观察组织形态学改变。

1.9 Western blot 检测心肌组织 Gal-3、胶原蛋白 I、Ⅲ 蛋白表达

制作心肌梗死模型成功后 4 周,各组各取 50 mg 心肌梗死区组织进行破碎研磨并加入适量 RIPA 裂解液进行重悬,裂解提取蛋白。将蛋白质变性后经聚丙烯酰胺凝胶电泳。湿转转膜至 PVDF 膜;转移结束后将 PVDF 膜浸泡于 Western blot 封闭液中。封闭结束后,进行一抗稀释、孵育。TBST 洗膜 3 次,

每次 6 min。再用 Western blot 封闭液稀释二抗。TBST 洗膜 5 次,每次 5 min。ECL 反应、胶片曝光。用 Quantity One V 4.52 软件进行结果分析,以目的蛋白条带与内参蛋白条带灰度比值作为蛋白相对表达水平。

1.10 统计分析

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 21.0 软件进行数据处理,采用完全随机设计的单因素方差分析(One-way ANOVA),多个样本间两两比较采用 SNK- q 检验,相关变量间采用直线相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型情况

30 只新西兰雄性家兔接受手术处理,术后共有

25 只存活,其中假手术组 8 只,心功能不全组 8 只, MCP 组 9 只。

2.2 心脏超声检查结果

家兔于术前行心脏超声示 3 组的 LVEF、LVPWD、LVEDD 均无明显差别 ($P>0.05$)。手术 2 周后示心功能不全组、MCP 组较假手术组有明显差别 ($P<0.05$), 心功能不全组、MCP 组 LVEF、LVPWD、LVEDD 较同组术前有显著差别 ($P<0.05$), 且两组 LVEF 均 $<50\%$,提示心功能不全模型制作成功(图 1)。心功能不全后给药 4 周,MCP 组的 LVEF 较心功能不全组显著升高,LVEDD、LVPWD 较心功能不全组显著减轻($P<0.05$;图 2、表 2)。

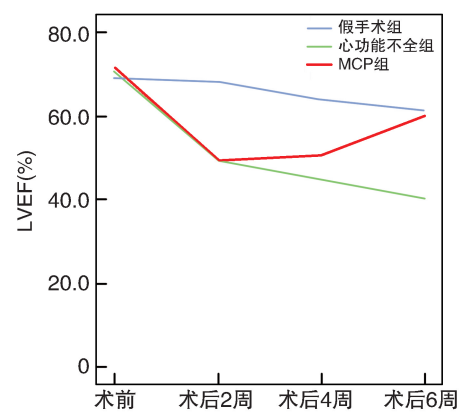


图 1. LVEF 变化趋势
Figure 1. Change trend of LVEF

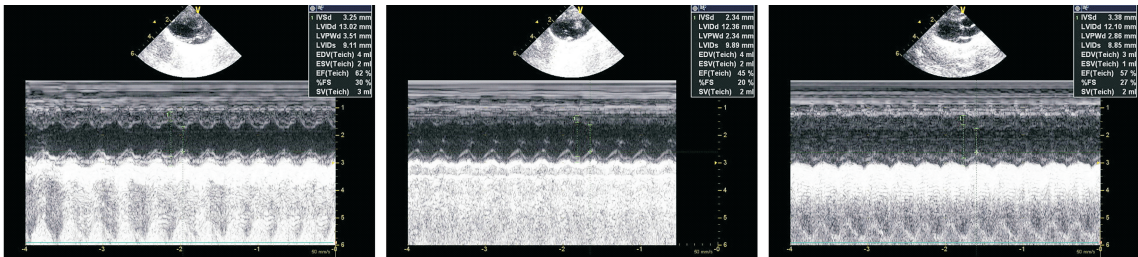


图 2. 术后 6 周超声心动图 从左至右依次为假手术组、心功能不全组、MCP 组。
Figure 2. Echocardiography at 6 weeks after operation

表 2. 造模前后 LVEF、LVPWD、LVEDD 变化

项 目		术前	术后 2 周	术后 4 周	术后 6 周
LVEF (%)	假手术组	68.97±1.79	67.83±1.94	63.83±1.64	61.37±5.45
	心功能不全组	70.65±2.40	49.17±1.28	44.89±1.62	40.22±0.87
	MCP 组	71.61±1.31	49.09±0.89 ^b	50.53±1.91 ^b	59.96±3.14 ^{ab}
LVPWD (mm)	假手术组	2.85±0.13	3.24±0.72	3.28±0.07	3.28±0.09
	心功能不全组	2.81±0.17	3.43±0.09	3.83±0.09	4.27±0.12
	MCP 组	2.96±0.45	3.58±0.24 ^b	3.42±0.07 ^b	3.28±0.09 ^{ab}
LVEDD (mm)	假手术组	10.08±0.41	11.30±0.25	11.58±0.19	11.81±0.31
	心功能不全组	10.38±0.31	14.14±0.49	15.19±0.77	16.59±0.54
	MCP 组	10.83±0.71	14.75±0.67 ^b	14.14±0.44 ^b	12.57±1.45 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与同期心功能不全组比较;b 为 $P<0.05$,与术前比较。

2.3 血清 Gal-3、BNP 水平

心功能不全组、MCP 组血清 Gal-3、BNP 在术后 2 周较假手术组明显升高 ($P<0.05$)。术后 6 周即心力衰竭造模成功给药 4 周后 MCP 组较心功能不全组血

清 Gal-3、BNP 明显下降 ($P<0.01$;表 3、表 4)。Pearson 相关性分析显示,心功能不全家兔 LVEF 与血清 Gal-3 呈负相关 ($r=-0.841, P=0.009$), LVEDD 与血清 Gal-3 呈正相关 ($r=0.905, P=0.002$)。

表 3. 各组血清 Gal-3 水平 (μg/L)

分 组	术前	术后 2 周	术后 4 周	术后 6 周
假手术组 (n=8)	5.50±0.14	5.63±0.11	5.53±0.13	5.50±0.14
心功能不全组 (n=8)	5.49±0.03	6.80±0.21 ^b	7.41±0.26 ^b	7.68±0.10 ^b
MCP 组 (n=9)	5.44±0.08	6.78±0.20 ^b	6.31±0.07 ^b	5.49±0.11 ^a

a 为 $P<0.05$,与同期心功能不全组比较;b 为 $P<0.05$,与术前比较。

表 4. 各组血清 BNP 水平 (ng/L)

Table 4. Serum levels of BNP in each group (ng/L)

分 组	术前	术后 2 周	术后 4 周	术后 6 周
假手术组 (n=8)	415.98±10.45	418.66±9.58	422.46±9.02	417.42±9.54
心功能不全组 (n=8)	436.37±35.58	720.36±35.39 ^b	729.62±41.88 ^b	728.76±45.17 ^b
MCP 组 (n=9)	418.55±19.58	709.47±10.11 ^b	525.50±7.81 ^b	406.30±23.89 ^a

a 为 $P<0.05$, 与同期心功能不全组比较; b 为 $P<0.05$, 与术前比较。

2.4 心肌梗死区域 Gal-3、胶原蛋白 I、Ⅲ mRNA 表达及 I / Ⅲ 比值

与心功能不全组相比, MCP 组 Gal-3、胶原蛋白 I、Ⅲ mRNA 表达均明显减低(表 5)。

表 5. 心肌梗死区域 Gal-3、胶原蛋白 I、Ⅲ mRNA 表达水平

Table 5. Expression levels of Gal-3, collagen I, and collagen III mRNA in myocardial infarction region

分 组	胶原蛋白 I	胶原蛋白 III	Gal-3	胶原蛋白 I / Ⅲ
假手术组 (n=8)	1.16±0.09	0.93±0.06	1.20±0.15	1.26±0.16
心功能不全组 (n=8)	4.71±0.51 ^b	2.43±0.48 ^b	7.23±0.88 ^b	2.02±0.51 ^b
MCP 组 (n=9)	2.43±0.39 ^{ab}	1.17±0.09 ^a	2.22±0.13 ^{ab}	2.07±0.25 ^b

a 为 $P<0.05$, 与心功能不全组比较; b 为 $P<0.05$, 与假手术组比较。

2.5 心肌梗死区域组织病理学结果

光镜下观察,假手术组心肌细胞排列较整齐,间隙清楚,胞浆鲜红、丰富,着色均匀,心肌间质仅可见少量的胶原纤维,其他未见明显病理变化(图 3A)。心功能不全组可见心肌细胞排列紊乱,心肌细胞核溶解、坏死,心肌间质出现明显纤维化,血管周边严重纤维化,局部可见纤维瘢痕,部分心肌断裂,小血管壁增厚并可见周围有大量蓝绿色胶原纤维增生并包绕分割心肌细胞,胶原大量沉积并伴有炎性细胞浸润(图 3B、C、D)。MCP 组可见心肌纤维增粗,排列稍整齐,部分心肌细胞水肿、肥大,细胞间隙及血管壁周围仍可见胶原纤维增生包绕(图 3E、F)。

2.6 心肌组织 Gal-3、胶原蛋白 I、Ⅲ 蛋白表达水平

Western blot 结果显示,心功能不全组梗死区域心肌组织 Gal-3、胶原蛋白 I、Ⅲ 蛋白表达明显高于 MCP 组、假手术组(表 6、图 4)。Pearson 相关性分析显示,心功能不全组梗死区域 Gal-3 与胶原蛋白 III 呈正相关($r=0.793, P=0.019$)。

表 6. 心肌梗死区域 Gal-3、胶原蛋白 I、Ⅲ 蛋白表达水平

Table 6. Expression levels of Gal-3, collagen I and III proteins in myocardial infarction region

项 目	假手术组	心功能不全组	MCP 组
Gal-3	0.71±0.07	1.62±0.12 ^b	1.24±0.15 ^{ab}
胶原蛋白 I	0.57±0.03	0.97±0.09 ^b	0.63±0.05 ^{ab}
胶原蛋白 III	0.43±0.04	0.61±0.02 ^b	0.50±0.04 ^{ab}

a 为 $P<0.05$, 与心功能不全组比较; b 为 $P<0.05$, 与假手术组比较。

3 讨 论

心室重构是不同病因导致心力衰竭进展性发展的共同病理基础,其包括心肌细胞肥大、变性、坏死及心肌纤维化等,其中心肌纤维化是心室重构的重要病理特征之一。心肌梗死后相应的心肌细胞发生坏死,此时纤维化的产生是一种保护性的机制,是心肌修复性的表现^[8]。Gal-3 由巯基乙酸激活巨噬细胞产生,但是 Gal-3 表达不仅限于巨噬细胞的细胞谱系,在正常小鼠组织(肾、肠)内皮细胞也表达大量 Gal-3^[9]。在肾素基因过度表达的转基因大鼠模型中, Gal-3 的上调与高血压发展和心室重构相关^[10]。Frunza 等^[9]通过主动脉弓缩窄法制作心脏压力超负荷模型发现,心肌重塑与巨噬细胞浸润和 Gal-3 大量表达有关。

大量的体内外研究表明, Gal-3 在调节炎症和纤维化反应起到重要的作用^[11]。在巯基乙酸盐诱导的腹膜炎模型,敲除 Gal-3 基因组的小鼠表现为腹膜炎反应减弱,促炎症巨噬细胞凋亡,核因子 κ B 信号降低^[12]。

心肌纤维化是胶原代谢异常的结果。胶原蛋白由成纤维细胞产生、分泌,是构成细胞外基质的主要成分,其中 I、Ⅲ 型胶原是心肌间质的主要胶原。研究表明 I 型胶原纤维粗,伸展和弹性小,与心肌僵硬度有关; Ⅲ 型胶原纤维较细,伸展性和弹性大,与心室的顺应性有关; I 型、Ⅲ 型胶原两者恰到的比例是维持心肌功能的重要基础^[13]。本研究

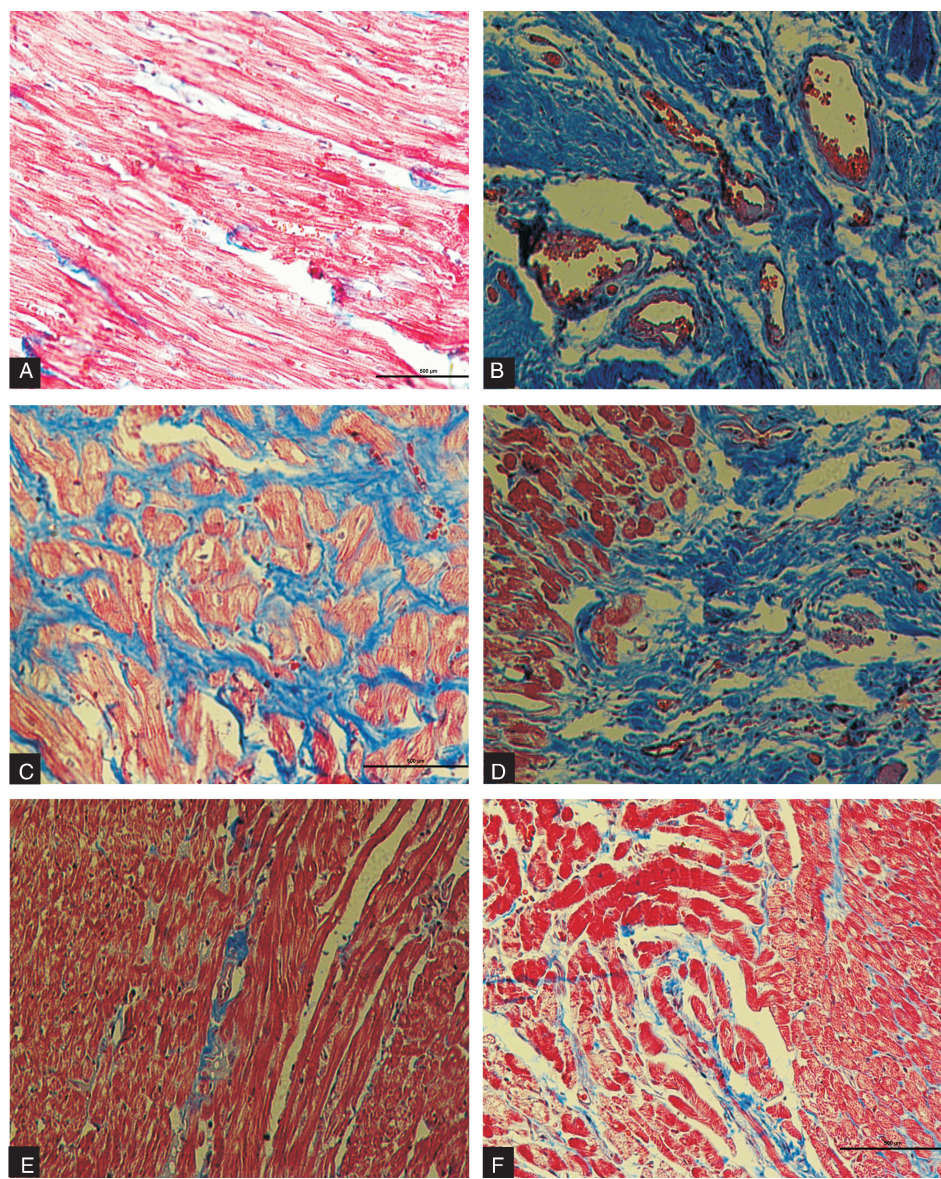


图 3. 用药 4 周后心肌组织 Masson 染色 (200×) 细胞核呈黑蓝色,胶原纤维呈绿色,心肌纤维、红细胞呈红色。A 为假手术组;B、C、D 均为心功能不全组,其中 B 图示小血管壁内大量血栓,并可见周围有大量蓝绿色胶原纤维增生,胶原大量沉积,C 图可见大量蓝绿色胶原纤维分割心肌细胞,D 图心肌间质出现明显纤维化,局部可见纤维瘢痕;E、F 为 MCP 组,E 图示部分心肌细胞水肿、肥大,F 图可见细胞间隙及部分血管壁周围胶原纤维增生包绕。

Figure 3. Masson staining of myocardial tissue after 4 weeks with the medicine(200×)

发现在心功能不全组中 I 型、Ⅲ型胶原的表达明显高于假手术组及 MCP 组;相关性分析显示:Gal-3 与Ⅲ型胶原呈正相关。在 MCP 组中, I 型、Ⅲ型胶原蛋白及 Gal-3 蛋白表达明显低于心功能不全组。表明心力衰竭进展中 I 型、Ⅲ型胶原蛋白的大量产生是导致纤维化的病理基础,其中 Gal-3 又与Ⅲ型胶原蛋白呈正相关;通过运用 Gal-3 特异性配体阻断剂 MCP 可以减轻 I 型、Ⅲ型胶原蛋白在心肌间质中的沉积。提示 Gal-3 可能位于 I 型、Ⅲ型胶原蛋白产生的上游,并受其调节。Gal-3 促进巨噬细胞表面上的 CD98 二聚化、活化后通过信号途径使 $\beta 2$ 整联

蛋白结合到胶原上。本实验和以往研究均证实,心功能不全时 Gal-3 诱导纤维化的产生,其上调与纤维化程序激活有关。在肝纤维化实验模型中,敲除 Gal-3 基因可以抑制转化生长因子 β 介导的肌成纤维细胞的活化^[14]。Yu 等^[15]发现在由压力过载诱导的纤维化心肌病模型中, Gal-3 在纤维化和功能障碍进展中起到重要作用。在由醛固酮诱导的心脏纤维中, Gal-3 是激活成纤维细胞的关键因素^[16]。研究证实,醛固酮可通过磷酸肌醇 3 激酶抑制剂/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶和细胞核因子 κB 转录信号通路诱导巨噬细胞分泌 Gal-3^[17]。Martínez-

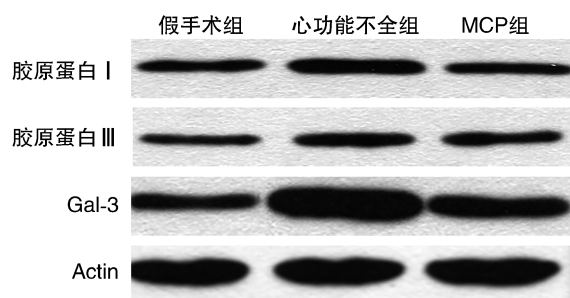


图 4. Western blot 检测心肌梗死区域 Gal-3、胶原蛋白 I、III 蛋白表达

Figure 4. Expression of Gal-3, collagen I and III proteins detected by Western blot in myocardial infarction area

Martínez 等^[18]研究表明,通过 MCP 药理干预或阻止 Gal-3 基因表达,可以阻止由醛固酮诱导的心功能障碍小鼠的心脏纤维化进展。本实验通过结扎冠状动脉前降支制作心肌梗死后心功能不全模型,同样发现 Gal-3 在心肌梗死后纤维化和心功能障碍中占据主要作用。

本研究通过运用 Gal-3 特异性配体抑制剂 MCP 以改善左心室收缩功能,同时发现在心功能不全家兔中随着心力衰竭程度加重血清 Gal-3 浓度也随之升高。相关性分析显示:心功能不全家兔 LVEF 与血清 Gal-3 呈负相关性,LVEDD 与血清 Gal-3 呈正相关。既往研究表明,血清 Gal-3 水平升高与早期心肌梗死密切相关^[19]。Piper 等^[20]研究揭示血清 Gal-3 浓度是监测心力衰竭治疗转归和预后的有效标记物。本研究结果支持 Gal-3 是预测心力衰竭预后和转归的一项新型标记物;同时证实抑制 Gal-3 可以逆转左心室重构和左心室收缩功能障碍。

综上所述,在心力衰竭家兔中,Gal-3 表达的增加与心脏功能障碍、纤维化、心肌胶原蛋白大量沉积有关,Gal-3 特异性抑制剂 MCP 可以阻止 Gal-3 的表达,改善心肌梗死区域及边缘区域的纤维化程度。研究结果表明 Gal-3 在心室重构和其引起的心功能障碍中起到关键作用,在不久的将来 Gal-3 可作为治疗心力衰竭新的靶点。

[参考文献]

- [1] Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(4): 616-635.
- [2] Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(2): 288-298.
- [3] Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(13): 5 060-065.

- [4] Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, et al. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): 183-186.
- [5] Calvier L, Miana M, Reboul P, et al. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(1): 67-75.
- [6] Fujita M, Morimoto Y, Ishihara M, et al. A new rabbit model of myocardial infarction without endotracheal intubation[J]. *J Surg Res*, 2004, 116(1): 124-128.
- [7] 郝 潇, 李树仁, 孟田田, 等. 不同剂量培哚普利对缺血性心功能障碍家兔心功能及 ACE2/Ang-(1-9)/Ang-(1-7) 轴的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(3): 554-557.
- [8] Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2005, 7(1): 223-253.
- [9] Frunza O, Russo I, Saxena A, et al. Myocardial galectin-3 expression is associated with remodeling of the pressure-overloaded heart and may delay the hypertrophic response without affecting survival, dysfunction, and cardiac fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2016, 5(186): 1 114-127.
- [10] Vergaro G, Prud'Homme M, Fazal L, et al. Inhibition of galectin-3 pathway prevents isoproterenol induced left ventricular dysfunction and fibrosis in mice[J]. *Hypertension*, 2016, 67(3): 606-612.
- [11] Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 351(2): 336-343.
- [12] Hsu DK, Yang RY, Pan Z, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(3): 1 073-083.
- [13] 张海燕. 心肌梗死后心室重构病理过程的研究进展[J]. *实用老年医学*, 2012, 26(3): 251-252.
- [14] Jiang JX, Chen X, Hsu DK, et al. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(4): 439-446.
- [15] Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, et al. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis[J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(1): 107-117.
- [16] Calvier L, Martínez-Martínez E, Miana M, et al. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries[J]. *JACC Heart Fail*, 2015, 3(1): 59-67.
- [17] Lin YH, Chou CH, Wu XM, et al. Aldosterone induced galectin-3 secretion in vitro and in vivo: from cells to humans[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): 952-954.
- [18] Martínez-Martínez E, Calvier L, Fernández-Celis A, et al. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension[J]. *Hypertension*, 2015, 66(4): 767-775.
- [19] Winter MP, Wiesbauer F, Alimohammadi A, et al. Soluble galectin-3 is associated with premature myocardial infarction[J]. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46(5): 386-391.
- [20] Piper SE, De CJ, Sherwood RA, et al. Serial galectin-3 for the monitoring of optimally treated stable chronic heart failure: A pilot study[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 2(7): 279-281.

(此文编辑 曾学清)