文章编号:1000-5404(2006)12-1305-03

论著

IGF-1、PKC在大鼠心肌梗死后左室重构中的表达及意义

袁小媚,马康华 (重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

提 要:目的 研究心肌梗死后左室重构(left ventricular remodeling, LVRM)过程中蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)的表达以及药物干预研究。**方法** SD雌性大鼠建立心肌梗死模型,随机分为3组,分别为单纯心肌梗死(myocardial infarction, MI)组、卡托普利(captopril, Cap)组和缬沙坦(valsartan, Val)组,另设假手术(Sham)组不结扎冠状动脉。行心脏标本病理分析;用免疫组化染色法检测血管紧张素Ⅱ的Ⅰ型受体(AgT_1R)、PKC和IGF-1蛋白的表达;采用RT-PCR方法检测IGF-1 mRNA的表达。**结果** ①MI组左室重量(LVW)和指数(LVWI)及心肌AgT_1R、PKC、IGF-1 mRNA及蛋白表达均显著增加,与Sham组比较有差异性($P<0.05$, $P<0.01$);②卡托普利组和缬沙坦组LVWI、AgT_1R、PKC、IGF-1 mRNA及蛋白表达均比MI组减少($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** IGF-1、PKC可能在心肌梗死后大鼠左室重构过程中起重要作用。卡托普利和缬沙坦可能通过抑制IGF-1表达而改善LVRM。

关键词: 心肌梗死;卡托普利;缬沙坦;心室重构

中图法分类号: R322.11;R329.26;R542.22 **文献标识码:** A

IGF-1 and PKC expressions in left ventricular remodeling in rats after myocardial infarction

YUAN Xiao-mei, MA Kang-hua (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of cardiac protein kinase C (PKC), IGF-1 (insulin-like growth factor 1) and the effect of drugs in the process of left ventricular remodeling (LVRM). **Methods** SD rats were randomly divided into four groups: sham operation group, infracted group, Captopril group and Valsartan group. Except for sham operation group, left anterior descending coronary artery was ligated in all rats of the other three groups and the intragastric administration of solvent, 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} Captopril and 20 mg·kg^{-1}·d^{-1} Valsartan was done on day 3 after operation for 8 weeks, then LVRM was evaluated by pathologic analysis. Expression changes of cardiac AgT_1R, PKC, and IGF-1 were detected by immunohistochemistry and computer image analysis. IGF-1 mRNA expression was analyzed by RT-PCR. **Results** LVW, LVWI and the expressions of AgT_1R, PKC, IGF-1 mRNA and proteins were significantly enhanced ($P<0.05$ or 0.01) in infarcted group as compared with those in sham operation group. In Captopril group and Valsartan group, LVW, LVWI and the expressions of AgT_1R, PKC, IGF-1 mRNA and proteins were remarkably decreased as compared with those in infracted group ($P<0.05$ or 0.01). **Conclusion** IGF-1 and PKC play a key role in left ventricular remodeling in rats after myocardial infarction. Captopril and Valsartan may be reversed.

Key words: myocardial infarction; Captopril; Valsartan; ventricular remodeling

血管紧张素(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)是血管紧张素系统(reinin-angiotensin system, RAS)的主要活性物质,其主要生物学效应是通过AT_1受体(AgT_1R)介导的。AT_1受体(AgT_1R)存在于心肌细胞、内皮细胞、神经末梢和传导系统,介导所有已知的AngⅡ的心血管作用[1]。蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是一类丝氨酸和苏氨酸激酶,广泛参与细胞的增殖、分化,肿瘤的生长以及维持细胞内的钙离子稳定,在细胞的信息传递中起着重要作用[2]。AT_1受体通过激活磷脂酶C,而激活Ca^{2+}依赖性蛋白激酶C。胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是人体内重要的生长因子之一,在心血管

作者简介:袁小媚(1981-),女,四川省绵阳市人,硕士研究生,主要从事冠心病的发病机制及防治方面的研究。电话:(023)60636728

收稿日期:2005-09-10;修回日期:2005-12-31

系统中起着重要的作用。它存在包括 PKC 在内的多条细胞内信号传导途径，这些信号传导通路可直接导致细胞内 Ca^{2+} 水平增高，引发正性肌力反应[3]。本研究旨在探讨 IGF-1 和 AgT_1R、PKC 在心肌梗死后左室重构中的意义，以及血管紧张素转换酶抑制剂（angiotensin converting enzyme inhibitor，ACEI）和血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂（AT_1-receptor blockers，ARB）对此的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 雄性大鼠 40 只，体质量 160～180（170±10）g。第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 兔抗大鼠 AgT_1R、PKC、IGF-1 购自武汉博士德生物工程有限公司；S-P 免疫组化染色试剂盒、Poly-L-Lysine 多聚赖氨酸、PBS 磷酸盐缓冲液、DAB 显色液购自中山生物技术有限公司；Trizol 试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司；逆转录 PCR 试剂盒[RNA PCR KIT（AMV）Ver.2.1]购自大连宝生物工程有限公司；卡托普利由常州制药厂有限公司提供，缬沙坦由北京诺华公司提供。IGF-1 cDNA 引物上游序列 5′-GGCTCCTCCTACATTCTGTA-3′，下游序列 5′-GCATTGTGGATGAGTGTTGC-3′（202 bp），β-actin cDNA 引物上游序列 5′-ATGTCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3′，下游序列 5′-ATGGATGATGATATCGCCGCG-3′（254 bp）；以上引物均由上海生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制和实验分组 结扎冠状动脉左前降支，假手术组只穿线不结扎。冠脉结扎术后 48 h 存活大鼠 29 只随机分为 3 组：心肌梗死组（MI 组，10 只），卡托普利组（100 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 卡托普利，9 只，死亡 1 只）和缬沙坦组（20 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 缬沙坦，10 只），另设假手术对照组（10 只）。卡托普利组和缬沙坦组均于术后第 3 天起灌胃给药，连续 8 周；MI 和 Sham 组每日以等量等浓度溶剂灌胃，连续 8 周。术后 8 周处死动物，取材 2 块，留做免疫组化的标本用甲醛固定，RT-PCR 的标本放置在液氮中保存。

1.2.2 心脏质量及其指数的测定 用电子天平称取左室质量（left ventricular weight，LVW），除以大鼠的体质量（body weight，BW），可得到其质量指数 LVWI（LVW/BW）。

1.2.3 免疫组织化学染色 S-P 法实验步骤严格按照试剂说明书进行。染色结果用彩色病理图像分析系统进行分析，每张切片任选 10 个视野进行面密度值统计分析，计算平均值。

1.2.4 RT-PCR 用 Trizol 试剂抽提心肌组织总 RNA，抽提的总 RNA 进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性和污染情况，用紫外分光光度仪定量并检测 RNA 纯度。按实验说明进行操作。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，计算机图像分析系统扫描并摄片，采用 UVP 图像采集及分析系统软件包进行分析，测定目的基因扩增条带和与之配对的内参照 β-actin 的绝对积分 IOD 值。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SNK 检验进行多组间两两比较，所有统计分析过程均使用 SAS8.02 统计软件完成。

2 结果

2.1 各组 LVRM 参数的变化

与对照组相比，梗死组、卡托普利组和缬沙坦组的左室质量、左室质量指数均有所增加（$P<0.05$）。与梗死组相比，卡托普利组和缬沙坦组左室质量、左室质量指数均有所下降（$P<0.01$），见表 1。

表 1 各组大鼠体重、左室重量及其指数的变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	体质量（g）	左室质量（mg）	左室质量指数（mg/g）
对照组	10	305.60±19.41	646.10±33.16	2.12±0.20
梗死组	10	264.81±17.50	721.60±36.14 ^{a}	2.74±0.22^{a}
卡托普利组	9	287.12±16.25	685.90±35.12^{ab}	2.18±0.70^{ab}
缬沙坦组	10	284.90±20.86	682.40±34.18^{ab}	2.40±0.15^{ab}

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与梗死组比较

2.2 各组大鼠心肌 AgT_1R、PKC 和 IGF-1 蛋白表达变化

AgT_1R、PKC、IGF-1 蛋白在对照组心肌细胞有少量表达。与对照组相比，梗死组表达上调显著（$P<0.01$）；与梗死组相比，卡托普利组和缬沙坦组表达均明显下降（$P<0.01$），见表 2。

表 2 各组大鼠心肌 AgT_1R、PKC 和 IGF-1 蛋白表达（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	AgT_1R	PKC	IGF-1
对照组	10	0.1386±0.0415	0.0455±0.0137	0.0654±0.0108
梗死组	10	0.5306±0.0743^{a}	0.3509±0.0321^{a}	0.4138±0.0514^{a}
卡托普利组	9	0.2014±0.0511^{b}	0.0945±0.0207^{ab}	0.2079±0.0194^{ab}
缬沙坦组	10	0.2048±0.0531^{b}	0.0994±0.0184^{ab}	0.2134±0.0216^{ab}

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与梗死组比较

2.3 心肌 IGF-1 mRNA 表达变化

与对照组比较，梗死组、卡托普利组和缬沙坦组 IGF-1 mRNA 表达均上调（$P<0.05$）；与梗死组比较，卡托普利组和缬沙坦组 IGF-1 mRNA 表达均明显降低（$P<0.05$），但尚未恢复至对照组水平。

3 讨论

AngⅡ的主要生物学效应是通过 AT_1 受体介导的。AT_1 受体既存在于心肌细胞，亦存在于非心肌细胞。有研究表明梗死心肌的成纤维细胞和血管内皮细胞 AT_1 受体 mRNA 的表达均上调[4]。已知多种信号通路参与了 AT_1 受体（AT_1R）的生物学作用，其中起关键作用的是 PKC。AT_1R 通过激活磷脂酶 C，从而活化 PKC

并通过直接或间接的作用活化 Raf-1,激活丝裂原活化的蛋白激酶系统(MAPKs),这提示心肌梗死后心肌 PKC 的激活和表达增强可能参与了心肌重塑过程,但迄今为止还未能确定是 PKC 的何种同工酶参与此过程[5]。

胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)是人体内重要的生长因子之一,分子质量为 7 500,是由 70 个氨基酸组成的单链多肽。IGF-1 对心血管系统起到舒张血管,促进心肌细胞肥大,增强心肌收缩力及保护缺血心肌等明显的心脏保护作用[6]。Davani 等[7]通过对小鼠急性心肌梗死模型研究认为 IGF-1 可以提高心功能防止心肌缺血再灌注损伤。有研究表明如把过度表达 IGF-1 心脏的冠脉结扎,可发现其心肌细胞的死亡和右室扩张较对照组明显减少,机制是其作为生长因子通过抗凋亡促进 DNA、蛋白质合成,新生血管形成,延长 PAI mRNA 半衰期,促进心肌细胞的肥厚,改善心功能,减轻心脏的重构和促进侧支循环的形成[8]。另有研究报道应用 IGF-1 治疗普通和心肌梗死后心力衰竭已取得较好的效果[9]。低血清 IGF-1 水平是一种在以前无心肌梗死老年人患充血性心衰的一个重要危险因子,早期用 IGF-1 治疗可减少心室 AMI 后心室重构[10]。与 IGF-1 相关的细胞内信号传导途径包括酪氨酸激酶,酪氨酸激酶磷酸酶,肌醇磷脂-3-激酶(PI-3)和 PKC,这些信号传导通路可直接导致细胞内 Ca^{2+} 水平增高,引发正性肌力反应。心脏的非心肌细胞如成纤维细胞和内皮细胞等,在心脏生长发育及心脏疾病的组织重塑过程中起着重要的作用。这些细胞既是 IGF-1 产生的来源,又是 IGF-1 的靶细胞,它能刺激成纤维细胞合成分泌胶原。

迄今发现,AT_1 受体抑制剂可阻止 Ang Ⅱ 与 AT_1 受体的结合抑制细胞生长。进一步研究表明[11,12],ACEI 的抗重塑作用是通过下调转化生长因子-β_1 和基质金属蛋白酶的表达,减少心脏胶原沉积、促进胶原降解等机制实现。并有实验结果表明在慢性心肌梗死动物模型中,卡托普利可以改善左室负荷和预防左室重构。

本实验结果显示,梗死后 AgT_1R、PKC 和 IGF-1 的表达均比假手术组显著增加($P<0.01$)。卡托普利组和缬沙坦组的 AgT_1R、PKC 和 IGF-1 表达均比梗死组显著减少($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,心肌梗死后 LVRM 过程中心肌的 AgT_1R、PKC 和 IGF-1 表达均增强;卡托普利、缬沙坦均可抑制 AgT_1R、PKC 和 IGF-1 表达。本实验结果还显示,梗死组有明显的 IGF-1 mRNA 表达;卡托普利组和缬沙坦组 IGF-1 mRNA 有弱表达。这提示 IGF-1 可能在调节心肌梗死后左室重塑中起着重要的作用。卡托普利和缬沙坦可能通过转录和蛋白表达水平抑制 IGF-1 表达而改善 LVRM。但是具体关于 IGF-1 的作用机制及其与 RAS 系统之间的关系,都是值得进一步研究的问题。

参考文献:

[1] DIEP Q N, EL-MABROUK M, TOUYZ R M, *et al*. Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin Ⅱ-infused rats: role of AT(1) receptors[J]. Hypertension, 2001, 37(2 Pt 2): 604-608.

[2] PUCEAT M, VASSORT G. Signalling by protein kinase C isoforms in the heart [J]. Mol Cell Biochem, 1996, 157(1-2): 65-72.

[3] FLORINI J R, EWTON D Z, COOLICAN S A. Growth hormone and insulin-like growth factor system in myogenesis [J]. Endocr Rev, 1996, 17(5): 481-517.

[4] VAN-KATS J P, DUNCKER D J, HAITSMA D B, *et al*. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin Ⅱ type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin Ⅱ[J]. Circulation, 2000, 102(13): 1556-1563.

[5] STRASSER R H, SIMONIS G, SCHON S P, *et al*. Two distinct mechanisms mediate a differential regulation of protein kinase C isozymes in acute and prolonged myocardial ischemia [J]. Circ Res, 1999, 85(1): 77-87.

[6] FRYSTYK J, LEDET T, MOLLER N, *et al*. Cardiovascular disease and insulin-like growth factor I[J]. Circulatiun, 2002, 106(8): 893-895.

[7] DAVANI E Y, BRUMME Z, SINGHERA G K, *et al*. Insulin-like growth factor-1 protects ischemic murine myocardium from ischemia/reperfusion associated injury[J]. Crit Care, 2003, 7(6): R176-R183.

[8] WANG L, MA W, MARKOVICH R, *et al*. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I [J]. Circ Res, 1998, 83(5): 516-522.

[9] LERI A, LIU Y, CLAUDIO P P, *et al*. Insulin-like growth factor-1 induces Mdm2 and down-regulates p53, attenuating the myocyte renin-angiotensin system and stretch-mediated apoptosis [J]. Am J Pathol, 1999, 154(2): 567-580.

[10] FARB A, SANGIORGI G, CARTER A J, *et al*. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans[J]. Circulation, 1999, 99(1): 44-52.

[11] YU C M, TIPOE G L, WING-HON-LAI K, *et al*. Effects of combination of angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor antagonist on inflammatory cellular infiltration and myocardial interstitial fibrosis after acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(4): 1207-1215.

[12] SEELAND U, KOUCHI I, ZOLK O, *et al*. Effect of ramipril and furosemide treatment on interstitial remodeling in post-infarction heart failure rat hearts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(2): 151-163.

(编辑　王　红)