论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1170-03

# 辛伐他汀对急性心肌梗死大鼠 RhoA 表达及心室重塑的影响

袁侨英[1],覃 数[2],司良毅[1],李学军[1] ([1]第三军医大学西南医院老年病科,重庆 400038;[2]重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

**摘 要:目的** 在大鼠心肌梗死模型上,观察辛伐他汀是否下调小G蛋白RhoA mRNA及蛋白质表达,及其与改善大鼠心肌梗死后心室重塑和心脏功能的关系。**方法** 制备心肌梗死模型,予辛伐他汀干预。8周后,测定心脏质量指数、血流动力学指标、心肌RhoA mRNA及蛋白质表达,并与假手术组比较。**结果** 心肌梗死组较假手术组大鼠心脏质量指数升高、血流动力学恶化($P<0.01$);心肌RhoA mRNA及蛋白质表达升高($P<0.01$)。辛伐他汀干预组较心肌梗死组心肌RhoA mRNA及蛋白质表达下降、心脏质量指数及血流动力学指标均改善($P<0.01$)。**结论** 辛伐他汀改善左室重塑和心功能,这可能与其在基因转录和蛋白质翻译水平抑制RhoA表达等综合作用有关。

**关键词:** 辛伐他汀;心肌梗死;心室重塑;基因;RhoA
**中图法分类号:** R322.11;R542.22;R972.6 **文献标识码:** A

# Effect of simvastatin on RhoA expression and cardiac remodeling with in acute myocardiac infarction rats

YUAN Qiao-ying[1], QIN Shu[2], SI Liang-yi[1], LI Xue-jun[1] ([1]Department of Geriatrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Cardiovascular Diseases, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of simvastatin on the abatement of the mRNA, protein expression of RhoA and the improvement of the cardiac remodeling and cardiac disfunction after the myocardiac infarction in rats. **Methods** Rats were divided into 3 groups: the control group, the myocardiac infarction group and Simvastatin intervened group. After 8 weeks, cardiac weight index and hemodynamics were observed, mRNA and protein expression of RhoA in cardiac muscles was measured. **Results** Compared with the control group, the cardiac weight index and the mRNA and protein expression were increased in rats with myocardiac infarction and the hemodynamics was worsened ($P<0.01$) while compared with the group with simvastatin intervention, the cardiac weight index and the hemodynamics were improved and the mRNA and expression of RhoA was decreased (each $P<0.01$). **Conclusion** Simvastatin abates the mRNA and protein expression of RhoA, which may be one of the mechnisms in the improvement of the cardiac remodeling and cardiac disfunction after acute myocardiac infarction.

**Key words:** Simvastatin; myocardiac infarction; RhoA; cardiac remodeling

RhoA属于小G蛋白Rho GTP激酶家族,是参与心肌肥大重塑及心脏功能衰竭的重要信号通路[1]。心肌梗死(MI)后RhoA含量及活性增加、AngⅡ过度激活致氧化应激增强,$H_2O_2$产生增多;同时NOS活性减弱,NO生成减少及生物利用度下降,共同促使心肌细胞及间质增生肥大形成重塑,影响心肌收缩、舒张功能。他汀类降脂药具有改善内皮功能、抑制炎症细胞因子、抑制胶原增生等降脂外心脏保护作用[2,3]。我们前期研究了辛伐他汀对急性心肌梗死大鼠心肌中NOS及AngⅡ活性及血清$H_2O_2$含量的影响,发现心肌梗死组心肌NOS活性较假手术组下降,心肌AngⅡ含量、血清$H_2O_2$含量则升高。辛伐他汀干预后,大鼠梗死心肌NOS活性升高,心肌AngⅡ、血清$H_2O_2$含量均下降[4,5]。我们继续观察辛伐他汀是否抑制急性心肌梗死后RhoA在转录和翻译水平的表达,及其与改善心室重塑和心脏功能的关系。

基金项目:重庆市自然科学基金[(2004)54号]
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing [(2004)54]
作者简介:袁侨英,女,四川省内江市人,博士研究生,主要从事心力衰竭方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)60783886
通信作者:覃 数,E-mail: qinshu@21cn.com
收稿日期:2007-04-19;修回日期:2007-07-20

## 1　材料与方法

### 1.1　主要试剂和仪器

辛伐他汀(20 mg/片)购于默沙东公司;RNA 抽提试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司,RNA PCR Kit 购于 TaKaRa 公司 RhoA 多克隆一抗购于华美生物有限公司,辣根过氧化物酶兔抗鸡二抗购于北京博奥森生物技术有限公司、DAB 显色试剂盒购于武汉博士德。

### 1.2　动物模型的建立及分组

参照文献[6]的方法:麻醉动物开胸,在左心耳下缘与肺动脉圆锥间距主动脉根部约 3 mm 处,结扎左冠状动脉前降支。体质量 200 ~ 250 g 的雄性 Wistar 大鼠(购于第三军医大学实验动物中心),随机分为 3 组($n = 8$):假手术组、心肌梗死组和心肌梗死 + 辛伐他汀组(辛伐他汀 20 mg · kg $^{-1}$ · d $^{-1}$)。所有药物经灌饲法喂给,心肌梗死组大鼠用生理盐水模拟灌饲,8 周后,测完血流动力学,摘取心脏,送液氮保存。

### 1.3　心肌组织总 RNA 提取和 mRNA 分离

按 RNA 抽提试剂盒操作步骤抽提 RNA,紫外分光法确定总 RNA 量和纯度,琼脂糖凝胶法鉴定 RNA 完整性。按照 PolyAT-tract mRNA Isolation System 分离纯化 mRNA。

### 1.4　RhoA 基因表达变化

采用 RT-PCR 方法。每份样品取等量 mRNA,逆转录合成 cDNA,然后按照分子克隆进行 PCR 扩增目的片段:引物序列上游 5′-GTTTATGTGCCCACGGTGTT-3′,下游 5′-ACTATCAGGGC-TGTCGATGGA-3′。反应总体积 30 μl,含 cDNA 200 ng,引物各 15 pmol,*Taq* DNA 聚合酶 2 U,10 × Buffer 3 μl,$MgCl_2$ 2 μl。扩增条件:预变性 94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,50 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min 共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min,产物长度为 176 bp。内参照 β-actin 引物序列上游 5′-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3′,下游 5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3′。反应总体积 30 μl,含 cDNA 200 ng,引物各 15 pmol,*Taq* DNA 聚合酶 2 U,10 × Buffer 3 μl,$MgCl_2$ 2 μl。扩增条件:预变性 94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s ,72 ℃,2 min 共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min,产物长度为 750 bp。PCR 在 PE-480 型热循环仪上完成。反应结束后取 PCR 产物 4 μl 进行 2% 琼脂糖凝胶分离,并用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析仪扫描,PCR 产物量以吸光度值 × 面积表示,目的片段与 β-actin 吸光度比值作为目的片段 mRNA 的相对含量。

### 1.5　免疫组织化学染色

RhoA 采用常规 ABC 法,4 μm 厚的石蜡切片常规脱蜡水化,用含 3% $H_2O_2$ 的甲醇封闭内源性过氧化酶, 微波加热修复抗原,山羊血清白蛋白室温 30 min 封闭非特异性抗原, 加鸡抗鼠 RhoA 多克隆一抗(1∶100) 4 ℃ 冰箱过夜,辣根过氧化物酶兔抗鸡二抗 (1∶150) 室温 30 min,DAB 显色后,分别用苏木精复染细胞核, 自来水冲洗,常规脱水、透明、封片。同时用 PBS 代替 Ⅰ 抗作阴性对照。免疫组化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。

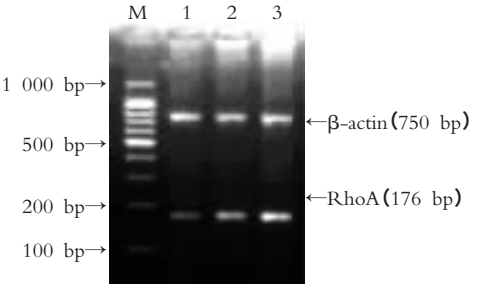
### 1.6　统计学处理

数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SAS 6.12 统计软件分析,两组间行 $t$ 检验,多组间用方差分析作 $q$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　辛伐他汀对心肌 RhoA mRNA 表达的影响

心肌梗死组较假手术组心肌 RhoA mRNA 表达升高[(0.58 ± 0.06) *vs* (1.13 ± 0.17), $P < 0.01$]。辛伐他汀组较心肌梗死组,心肌 RhoA mRNA 表达下降[(1.13 ± 0.17) *vs* (0.70 ± 0.04),$P < 0.01$,图 1]。

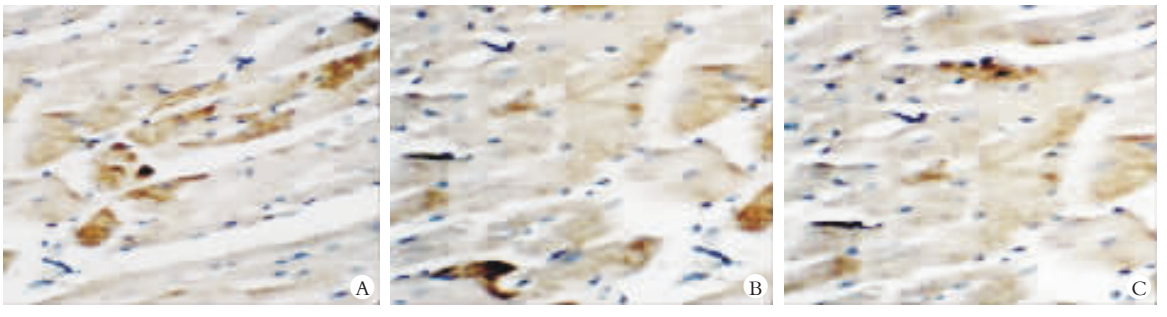



M:标准; 1: 假手术组; 2: 辛伐他汀组; 3: 心肌梗死组

**图 1　3 组大鼠心肌 RhoA mRNA 的 RT-PCR 产物**

### 2.2　辛伐他汀对心肌 RhoA 蛋白表达的影响

免疫组化染色结果显示,RhoA 蛋白在假手术组心肌细胞表达极少(0.039 ± 0.015),心肌梗死组细胞质表达显著(0.190 ± 0.003)($P < 0.01$);辛伐他汀组细胞质内均有表达,而与心肌梗死组比较明显减少(0.062 ± 0.007)($P < 0.01$,图 2)。




A:心肌梗死组;B:辛伐他汀组;C:假手术组

**图 2　3 组大鼠心肌 RhoA 蛋白免疫组化染色结果**　(ABC × 400)

### 2.3 RhoA 表达与心脏功能相关性分析

在前期的研究中显示辛伐他汀组与心肌梗死组比较,血流动力学各项指标均改善,左室质量指数(LVWI)、右室质量指(RVWI)降低。直线相关与回归分析则表明,辛伐他汀组 RhoA mRNA 的表达与左室、右室质量指数(LVWI、RVWI)均呈明显正相关,相关系数 $r$ 分别为 0.75、0.77($P<0.05$);与血流动力学指标 LVSP 呈负相关($r=-0.79$,$P<0.05$),与 LVEDP 呈正相关($r=0.76$,$P<0.05$)。

## 3 讨论

RhoA 过度表达诱导心房及心室肌 ANF、肌球蛋白重链(β-MHC)基因转录,促进心肌及血管重塑,导致心脏功能衰竭[7]。另外,Rho GTP 激酶的级联反应也影响 NOS 表达,RhoA 通过抑制 NO 生成,加重心脏功能障碍。

心肌梗死后机械牵张及神经激素激活致 AngⅡ水平升高,诱导原癌基因及胚胎型基因的表达,促进心肌肥厚、重塑及心肌细胞坏死[8,9]。心肌中 AngⅡ激活 RhoA 酶联反应致 RhoA 水平升高,所以 RhoA 参与 AngⅡ导致的血管肥大。近年发现 AngⅡ也通过激活 NADH/NADPH 还原酶使血管平滑肌产生 $O_2^-$、$H_2O_2$,影响血管壁氧化还原状态,增加血管壁及心肌梗死后 $O_2^-$ 等自由基,导致 NO 失活,引发炎症与黏附分子的产生,形成复杂的分子网络共同促进心血管损伤、加重心功能恶化[10]。

本研究表明:辛伐他汀下调急性心肌梗死后 RhoA mRNA 及蛋白质表达,降低 AngⅡ水平[11],也使 AngⅡ诱导的 $H_2O_2$ 生成减少,增加 NOS 活性,改善大鼠急性心肌梗死后心室重塑和心脏功能,以上作用涉及到辛伐他汀非降脂心脏保护机制。RhoA 法尼基化依赖于蛋白类异戊二烯化作用,而 RhoA 法尼基化是其翻译后修饰的重要调节子,也是 RhoA 膜结合活性所必需。辛伐他汀通过抑制小 G 蛋白 RhoA 类异戊二烯化作用,下调 RhoA 表达及活性。辛伐他汀[4,12]也抑制 AngⅡ诱导的 $H_2O_2$ 生成、使其对 NO 降解减少;阻止 AngⅡ促进心肌肥大。同时,辛伐他汀增加部分 NOS 的mRNA 及蛋白表达,提高 NO 依赖的血管舒张,促进内皮功能的恢复,发挥抗氧化损伤、抗炎症反应等作用[13]。

总之,本研究显示辛伐他汀改善急性心肌梗死后心室重塑和心脏功能,其机制可能为辛伐他汀抑制急性心肌梗死后 RhoA mRNA 及蛋白质表达,改善 RhoA 诱导的心室重塑和心脏功能障碍,发挥有益的心血管效应。

## 参考文献:


[1] Kishi T, Hirooka Y, Masumoto A, *et al*. Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure[J]. Circulation, 2005, 111(21): 2741-2747.

[2] Collins R, Armitage J, Parish S, *et al*. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5 963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2003, 361(9374): 2005-2016.

[3] 薛 红,张 晔,王旭开,等. 阿托伐他汀与硝苯地平控释片的协同降压作用及对血管内皮功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(15): 1616-1618.

[4] 袁侨英,覃 数. 辛伐他汀抑制大鼠急性心肌梗死后血管紧张素Ⅱ的生成和改善心室重塑的研究[J]. 重庆医学, 2005, 34(1): 66-67.

[5] 张金盈,廖玉华,程 翔,等. 辛伐他汀对大鼠急性心肌梗死后Ⅰ型胶原合成及 TNF-α 表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2005, 40(2): 205-207.

[6] 覃 数,陈运贞,王志华. 大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点[J]. 重庆医科大学学报, 1998, 23(1): 8-11.

[7] Winaver E, Ovcharenko I, Rubinstein K, *et al*. Involvement of Rho kinase pathway in the mechanism of renal vasoconstriction and cardiac hypertrophy in rats with experimental heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(5): H2007-H2014.

[8] Ye P, Sheng L, Zhang C, *et al*. Atorvastatin attenuating down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in preventing cardiac hypertrophy of rats *in vitro* and *in vivo*[J]. J Pharm Pharm Sci, 2006, 9(3): 365-375.

[9] Zhang R Y, Wang L F, Zhang L, *et al*. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor, angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor blocker and their combination on postinfarcted ventricular remodeling in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(8): 649-655.

[10] Takimoto E, Kass D A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling[J]. Hypertension, 2007, 49(2): 241-248.

[11] Haas M J, Horani M H, Parseghian S A, *et al*. Statins prevent dextrose-induced endothelial barrier dysfunction, possibly through inhibition of superoxide formation[J]. Diabetes, 2006, 55(2): 474-479.

[12] Delbosc S, Cristol J P, Descomps B, *et al*. Simvastatin prevents angiotensin Ⅱ-induced cardiac alteration and oxidative stress[J]. Hypertension, 2002, 40(2): 142-147.

[13] Budzyn K, Marley P D, Sobey C G. Chronic mevastatin modulates receptor-dependent vascular contraction in eNOS-deficient mice[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 287(2): R342-R348.


(编辑 汪勤俭)