论著

文章编号:1000-5404(2011)03-266-04

辛伐他汀对心肌梗死大鼠心室重构与 FoxO3a 表达的影响

常广磊,刘 剑,张冬颖,覃 数 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心内科)

【摘要】 **目的** 探讨辛伐他汀对大鼠心肌梗死后心室重构和 FoxO3a 表达的影响。**方法** 建立大鼠 MI 模型,24 h 后存活大鼠随机分成心肌梗死组(MI 组,$n=8$)、辛伐他汀 20 mg 组[20 mg/(kg·d),Sim 组,$n=8$],并同时建立假手术组(Sham 组,$n=10$)。4 周后观察心室质量指数(LVWI)、天狼猩红染色分析左室非梗死区胶原容积分数(CVF)、HE 染色观察心肌组织病理改变,RT-PCR 和 Western blot 检测 FoxO3a 在非梗死区 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** MI 组较 Sham 组 LVWI [(2.62±0.16) *vs* (1.80±0.13),$P<0.05$]、非梗死区Ⅰ型胶原容积分数[(18.81±2.65) *vs* (5.01±0.84),$P<0.05$]、Ⅲ型胶原容积分数[(3.83±0.38) *vs* (1.52±0.23),$P<0.05$]及Ⅰ/Ⅲ比值[(4.96±0.90) *vs* (3.31±0.40),$P<0.05$]显著增加;左室心肌非梗死区 FoxO3a mRNA[(0.29±0.05) *vs* (0.57±0.06),$P<0.05$]与蛋白[(0.28±0.04) *vs* (0.62±0.07),$P<0.05$]表达均降低。与 MI 组相比,Sim 组 LVWI[(2.27±0.08) *vs* (2.62±0.16),$P<0.05$]、非梗死区Ⅰ型胶原容积分数[(9.26±1.13) *vs* (18.81±2.65),$P<0.05$]、Ⅲ型胶原容积分数[(2.37±0.23) *vs* (3.83±0.38),$P<0.05$]及Ⅰ/Ⅲ比值[(3.98±0.79) *vs* (4.96±0.90),$P<0.05$]均显著下降;但高于 Sham 组($P<0.05$);左室心肌非梗死区 FoxO3a mRNA[(0.49±0.06) *vs* (0.29±0.05),$P<0.05$]与蛋白[(0.38±0.08) *vs* (0.28±0.04),$P<0.05$]表达均显著增高;但低于 Sham 组($P<0.05$),心肌组织病理结构得到改善。**结论** 辛伐他汀能有效改善 MI 后心肌损伤和心室重构,其机制可能与其在基因转录和蛋白质翻译水平促进 FoxO3a 表达综合作用有关。

【关键词】 心肌梗死;辛伐他汀;心室重构;FoxO3a(FKHRL1)
【中图法分类号】 R542.22;R968;R972 【文献标志码】 A

Effect of simvastatin on FoxO3a expression and ventricular remolding in rats with myocardial infarction

Chang Guanglei, Liu Jian, Zhang Dongying, Qin Shu (Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of simvastatin on ventricular remodeling and FoxO3a expression in rats with myocardial infarction (MI). **Methods** After a MI model of rats was established, 24 survived rats were randomly divided into MI group ($n=8$), simvastatin treatment group ($n=8$) and sham-operation group ($n=10$). After 4 weeks, left ventricular weight index (LVWI) and collagen volume fraction (CVF) were detected in non-infarction zone (NIZ) with Picric-Sirius red staining. mRNA and protein expression of FoxO3a in NIZ was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. Myocardial histopathology was examined with H&E staining. Data were analyzed with the SAS 9.1 statistical software. **Results** The LVWI, types I and III CVF, and their ratio in NIZ were significantly higher in MI group than in sham operation (2.62±0.16 *vs* 1.80±0.13, 18.81±2.65 *vs* 5.01±0.84, 3.83±0.38 *vs* 1.52±0.23, and 4.96±0.90 *vs* 3.31±0.40, $P<0.05$). The mRNA and protein expression level of FoxO3a in NIZ was significantly lower in MI group than in sham operation (0.29±0.05 *vs* 0.57±0.06, 0.28±0.04 *vs* 0.62±0.07, $P<0.05$). The LVWI, types Ⅰ and Ⅲ CVF, and their ratio in NIZ were significantly lower in simvastatin treatment group than in MI group (2.27±0.08 *vs* 2.62±0.16, 9.26±1.13 *vs* 18.81±2.65, 2.37±0.23 *vs* 3.83±0.38, and 3.98±0.79 *vs* 4.96±0.90, $P<0.05$), which were higher than those in sham operation group ($P<0.05$). The mRNA and protein expression level of FoxO3a in NIZ was significantly higher in simvastatin treatment group than in MI group (0.49±0.06 *vs* 0.29±0.05, 0.38±0.08 *vs* 0.28±0.04, $P<0.05$), which was lower than that in sham operation ($P<0.05$). The improvement in lesions of myocardial tissue was better in simvastatin treatment group than in MI group ($P<0.05$). **Conclusion** Simvastatin can

【基金项目】 重庆市卫生局医学科学技术项目(渝 2010-01-07)
【通信作者】 刘 剑,E-mail:liujian819@126.com

effectively improve the ventricular remodeling in rats with MI. The mechanism of simvastatin may be related with its role in up-regulation of FoxO3a expression at gene transcription and protein translation level.

[Key words] myocardial infarction; simvastatin; ventricular remodeling; foxo3a (FKHRL1)

Supported by the Program of Science and Technology of Chongqing Health Bureau (2010-01-07). Corresponding author: LiuJian, E-mail: liujian819@126.com

心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心室重构是导致慢性心力衰竭的重要环节。大量研究表明,转化生长因子β(transforming growth factor beta, TGF-β)/Smads超家族信号转导蛋白,参与调控细胞的增殖、转化、合成、分泌和凋亡,与心肌肥大、间质纤维化等密切相关[1]。叉头框蛋白家族(forkhead box, Fox)是一类DNA结合区具有翼状螺旋结构的核转录因子家族,FoxO属于Fox亚家族,为TGF-β/Smads、PI3K-Akt/PKB等多种信号转导通路的下游调控因子[2-3]。FoxO3a作为FoxO在心脏组织的主要亚型,具有抑制血管平滑肌增殖[4]、内皮祖细胞分化成熟[5]、心肌细胞增生肥大[6-7]、抗氧化应激[8]及胶原增生[9]等作用。我们前期的研究已经探讨和证实他汀改善心室重塑与TGF-β/Smads通路有关[10-11]。本研究拟探讨辛伐他汀对MI后大鼠FoxO3a表达的影响,深入了解他汀类药物对心室重构影响机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级[证书号:SCXK(渝)2007-0001]健康成年雄性Sprague-Dawley大鼠,体质量180~210 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂

辛伐他汀(批号:09327,杭州默沙东制药有限公司);RT-PCR试剂盒(重庆升博科技有限公司),总RNA提取试剂Tiozol(北京天根生化科技有限公司),RT-PCR引物由北京赛百盛科技有限公司合成;兔抗鼠FoxO3a多克隆抗体(ab47409,美国Abcam公司);总蛋白提取试剂(南京凯基生物科技发展有限公司),β-肌动蛋白抗体(北京博奥森生物技术有限公司),Bradford蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究所)。

1.3 实验方法

1.3.1 建立动物模型及分组 30只雄性Sprague-Dawley大鼠,适应性喂养1周。采用本课题组前期研究方法同时建立心梗和假手术组模型[10],24 h后心梗模型存活大鼠16只(手术死亡率20%),随机数字表法分为:①心梗组(MI组,$n=8$);②辛伐他汀(Sim组)[20 mg/(kg·d),Sim组,$n=8$];③假手术组(Sham组,$n=10$)。Sim组术后48 h起以0.4%辛伐他汀溶液灌胃给药,连续4周;MI组和Sham组每日以等量0.9%氯化钠溶液灌胃。灌胃时间为每日17:30~18:00。

1.3.2 标本采集 给药4周后,采用本课题组前期研究的方法[10]采集和保存用以HE染色、天狼猩红胶原染色、RT-PCR和Western blot的心肌组织标本。

1.3.3 心肌组织胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)测定 将用0.1%苦味酸天狼猩红染液染色的切片,在偏振光显微镜下观察可见:Ⅰ型胶原纤维排列紧密,显示强的双折光性,为黄色或红色纤维;Ⅲ型胶原纤维排列疏网状,显示弱的双折光,为绿色细纤维。在偏振光显微镜下选取4个不含血管视野,Image Pro Plus 6.0图像分析系统计算每个视野中Ⅰ型、Ⅲ型胶原组织所占面积百分比,取均数代表Ⅰ型、Ⅲ型CVF,并计算Ⅰ/Ⅲ比值。

1.3.4 病理组织结构观察 在左心室冠状面NIZ中部,切取厚2~3 mm环状心肌组织块,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,切片厚3~4 μm,HE染色后观察心肌组织结构。

1.3.5 RT-PCR测定心肌组织FoxO3a mRNA的表达 按Tiozol提取总RNA说明书,提取心肌组织总RNA;逆转录及PCR扩增体系均按RT-PCR试剂盒说明书操作,β-actin内参、引物序列、目的片段长度、Tm值(表1),PCR反应条件为94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,58 ℃退火50 s,72 ℃延伸1 min,72 ℃再延伸5 min,30循环。取8 μl反应产物于2%琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)处理后,用Quantity One 4.62图像分析软件,进行光密度值测定,目的片段与β-actin光密度值比值作为目的片段mRNA的相对表达量。

表1 RT-PCR引物序列

mRNA	引物序列(5′-3′)	基因库代码	产物大小(bp)	Tm值(℃)
FoxO3a	上游 AATCGTACGCCCTCCCGCCT 下游 AGGAGCGTGGCCGACTCTGT	NM001106395	247	63.5
β-actin	上游 TCGGCAATGAGCGGTTCCGATG 下游 GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT	NM031144	400	63.5

1.3.6 Western blot测定心肌组织FoxO3a蛋白的表达 按照蛋白提取试剂说明书,提取总蛋白进行含量测定,常规方法进行Western blot测定,一抗(兔抗鼠FoxO3a多克隆抗体,1∶500),β-actin内参,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体,1∶2 000),ECL显影,用Bio-Rad凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司)处理后,采用Quanty One 4.62进行图像分析后作蛋白表达量的半定量分析。

1.3 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SAS 9.1统计软件对实验数据进行分析。多组均数比较采用单因素方差分析,均数两两比较采用SNK检验。

2 结果

2.1 各组大鼠左心室重量指数比较

各组大鼠4周后,体质量比较差异无统计学意义;MI组和Sim组左心室质量(LVW)及左心室质量指数(LVWI)较Sham组明显增加($P<0.05$),Sim组LVW及LVWI较MI组降低

($P<0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠左心室质量指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量(g)	左心室质量(mg)	左心室质量指数(mg/g)
Sham组	10	289.40±20.36	519.41±43.36	1.80±0.13
MI组	8	299.63±16.68	783.64±24.36[a]	2.62±0.16[a]
Sim组	8	286.50±34.24	646.01±68.86[ab]	2.27±0.08[ab]

a:$P<0.05$,与Sham组比较;b:$P<0.05$,与MI组比较

2.2 各组大鼠左室心肌非梗死区CVF比较

在非梗死区MI组和Sim组Ⅰ型、Ⅲ型CVF及Ⅰ/Ⅲ比值较Sham组显著升高($P<0.05$);Sim组Ⅰ型、Ⅲ型CVF及Ⅰ/Ⅲ比值较MI组降低($P<0.05$),见表3。

表3 各组大鼠左室心肌非梗死区CVF比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Ⅰ型	Ⅲ型	Ⅰ/Ⅲ
Sham组	10	5.01±0.84	1.52±0.23	3.31±0.40
MI组	8	18.81±2.65[a]	3.83±0.38[a]	4.96±0.90[a]
Sim组	8	9.26±1.13[ab]	2.37±0.23[ab]	3.98±0.79[ab]

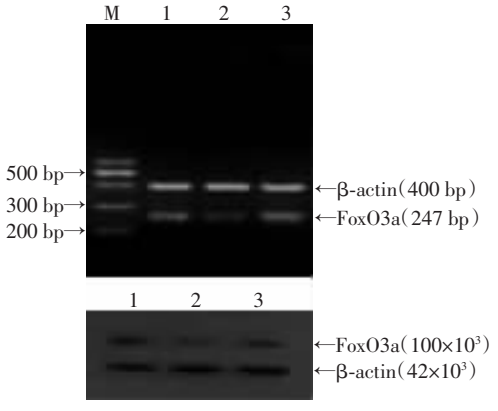
a:$P<0.05$,与Sham组比较;b:$P<0.05$,与MI组比较

2.3 组织病理学检查

普通光镜下,苏木精-伊红染色显示,Sham组大鼠心肌细胞排列规则,走向好,无肌丝断裂,细胞间隙均匀,可见少量炎性细胞浸润;MI非梗死区有大量炎性粒细胞和单核细胞浸润和原纤维细胞增生,残存心肌细胞代偿性增生肥大;与MI组相比,Sim组非梗死区有大量炎性细胞浸润,心肌细胞较小。

2.4 各组大鼠左室心肌非梗死区FoxO3a mRNA和蛋白的表达

RT-PCR和Western blot结果显示:与Sham组和Sim组比较,MI组FoxO3a mRNA和蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),Sim组和MI组相比,FoxO3a mRNA和蛋白表达水平增高($P<0.05$),但较Sham组低($P<0.05$),见图1、表4。



M:标准,1:Sham组,2:MI组,3:Sim组

A:RT-PCR;B:Western blot

图1 各组左室心肌非梗死区FoxO3a RT-PCR和Western Blot检测结果

表4 各组大鼠心肌FoxO3a mRNA和蛋白表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FoxO3a(mRNA)	FoxO3a(Western blot)
Sham组	10	0.57±0.06	0.62±0.07
MI组	8	0.29±0.05[a]	0.28±0.04[a]
Sim组	8	0.49±0.06[ab]	0.38±0.08[ab]

a:$P<0.05$,与Sham组比较;b:$P<0.05$,与MI组比较

3 讨论

他汀类药物可抑制心肌细胞肥大及间质纤维化,对改善MI后心室重构有重要作用[12],但其机制尚未阐明。根据我们前期研究[13],本研究采用20 mg/(kg·d)辛伐他汀观察。结果显示,MI后梗死区心肌细胞坏死、凋亡、细胞数减少,但MI组较Sham组LVW及LVWI均增加,表明MI后发生了心室重构,存在心肌细胞肥大和间质纤维化。辛伐他汀20 mg/(kg·d)干预(Sim组)4周后LVW及LVWI较MI组降低,表明辛伐他汀能降低MI后心室质量和质量指数,改善MI后心室重构;这与Habibi等[14]研究发现瑞舒伐他汀治疗3周后能降低MI后心室重量的实验结果一致。

心肌成纤维细胞(cardiac fibroblasts,CFB)在不良刺激下增殖,合成分泌胶原蛋白,能导致心肌间质胶原沉淀与纤维化,Ⅰ型、Ⅲ型CVF比例失调,导致心室重构。本研究结果显示,MI后MI组和Sim组Ⅰ型、Ⅲ型CVF及Ⅰ/Ⅲ比值均较Sham组显著升高,提示MI后非梗死区发生了胶原网络结构重建。Sim组与MI组相比,非梗死区Ⅰ型、Ⅲ型CVF及Ⅰ/III比值均显著降低,表明辛伐他汀可抑制非梗死区CFB增殖,改善了胶原类型比例及间质纤维化,这与国外研究结果一致[15-16]。

本研究结果显示MI后非梗死区FoxO3a表达水平较Sham组明显降低,Sim组FoxO3a表达量则明显增加,与LVW、LVWI及CVF在非梗死区含量变化趋势相反,提示辛伐他汀能改善心梗后心室重构,有保护心脏的作用,其机制可能与心肌局部组织内FoxO3a的表达上调有关。

综上所述,MI后大鼠心肌存在心室重构和FoxO3a mRNA及其蛋白表达降低,经辛伐他汀干预后MI后心室重构得到改善,心肌组织FoxO3a mRNA及其蛋白表达增高,推测FoxO3a表达增高对MI后心脏可能具有保护作用,辛伐他汀改善MI后心室重构的作用可能与FoxO3a表达变化相关。其确切的作用及其机制尚有待于下一步深入的探讨。

参考文献:

[1] Bujak M, Frangogiannis N G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling[J]. Cardiovasc Res, 2007, 74(2):184-195.

[2] 曹冬梅, 卢建. 叉头框(Fox)转录因子家族的结构与功能[J]. 生命科学, 2006, 18(5):491-496.

[3] Evans-Anderson H J, Alfieri C M, Yutzey K E. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors[J]. Circ Res, 2008, 102(6):686-694.

[4] Lee H Y, Chung J W, Youn S W, *et al*. Forkhead transcription factor

FOXO3a is a negative regulator of angiogenic immediate early gene CYR61, leading to inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia[J]. Circ Res, 2007, 100(3): 302-304.

[5] Mogi M, Walsh K, Iwai M, *et al*. Akt-FOXO3a signaling affects human endothelial progenitor cell differentiation[J]. Hypertens Res, 2008, 31(1): 153-159.

[6] Tan W Q, Wang K, Lv D Y, *et al*. Foxo3a inhibits cardiomyocyte hypertrophy through transactivating catalase[J]. J Biol Chem, 2008, 283(44): 29730-29739.

[7] Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, *et al*. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(21): 20814-20823.

[8] Chiribau C B, Cheng L, Cucoranu I C, *et al*. FOXO3A regulates peroxiredoxin III expression in human cardiac fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2008, 283(13): 8211-8217.

[9] Vahtola E, Louhelainen M, Forsten H, *et al*. Sirtuin1-p53, forkhead box O3a, p38 and post-infarct cardiac remodeling in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rat[J]. Cardiovas Diabetol, 2010, 9: 5.

[10] 肖祥彬, 覃数, 张冬颖, 等. 辛伐他汀改善心室重构与转化生长因子β1/Smad3信号途径的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 654-658.

[11] 肖祥彬, 覃数, 张冬颖, 等. 辛伐他汀对心肌梗死大鼠Smad7表达与心室重塑影响[J]. 临床心血管杂志, 2009, 25(6): 445-448.

[12] 常广磊, 张冬颖, 刘剑. 他汀类药物治疗慢性心力衰竭的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2009, 30(3): 518-521.

[13] 张冬颖, 覃数, 唐显军, 等. 辛伐他汀对心肌梗死大鼠心功能、心肌肌球蛋白重链与肌动蛋白的影响[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(18): 1652-1655.

[14] Habibi J, Whaley-Connell A, Qazi M A, *et al*. Rosuvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, decreases cardiac oxidative stress and remodeling in Ren2 transgenic rats[J]. Endocrinology, 2007, 148(5): 2181-2188.

[15] Li T S, Takahashi M, Suzuki R, *et al*. Pravastatin improves remodeling and cardiac function after myocardial infarction by an antiinflammatory mechanism rather than by the induction of angiogenesis[J]. Ann Thorac Surg, 2006, 81(6): 2217-2225.

[16] Lee T M, Lin M S, Chou T F, *et al*. Additive effects of combined blockade of AT1 receptor and HMG-CoA reductase on left ventricular remodeling in infarcted rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(3): H1281-H1289.

(收稿:2010-09-09 修回:2010-10-26)
(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2011)03-0269-01

个案与短篇

窦性组织细胞增生症伴类风湿关节炎、强直性脊柱炎1例

成 娴,王 勇,曹彦飞,石 颖 (400038 重庆,第三军医大学西南医院风湿免疫科)

【关键词】 窦性组织细胞增生症;类风湿关节炎;强直性脊柱炎
【中图法分类号】 R364.31 【文献标志码】 B

窦性组织细胞增生伴巨大淋巴结肿大(sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy, SHML),简称为窦性组织细胞增生症,是一类少见的组织细胞增生性疾病,易误诊为其他良性和恶性组织细胞增生症。我科收治1例窦性组织细胞增生症患者,同时伴有类风湿关节炎及强直性脊柱炎,现报告如下。

1 临床资料

患者,男性,17岁,因反复多关节肿痛及腰骶部疼痛1年余,间断发热、乏力3月余入院。2008年1月出现下腰背部疼痛、臀区交替痛,右膝、双足跟及下腰部疼痛,腰骶部僵硬感,活动后减轻,休息无缓解。同年3月逐渐出现双手小关节、双腕、双肘、双肩、双髋、双膝、双踝、双足跖趾关节肿胀疼痛,双手晨僵半天,伴腰部活动受限。外院诊断"强直性脊柱炎",服用强的松、雷公藤多甙近7月,同年11月出现双手小关节及跖趾关节畸形,伴发热,体温40℃,2009年2月我院查血常规示WBC 6.1×10^9/L,HGB 55 g/L,PLT 895×10^9/L;血沉100 mm/h;C反应蛋白10.1 mg/dl;肝功GGT 72 IU/L,ALP 197 IU/L,Alb 28.6 g/L;乙肝两对半、结核抗体、抗环胍氨酸肽抗体、AKA、RF、ANA、自身抗体谱均阴性,HLA-B27阳性。胸部CT未见明显异常。骶髂关节CT示:双侧骶髂关节硬化、密度增加,有锯齿样改变。双手X片示:双手第2、3近端指间关节、掌指关节及腕关节间隙轻度狭窄。右腋窝淋巴结活检提示CD68(+),S100(+),Bcl-2滤泡周细胞(+),窦组织细胞增生。入院后体检:双侧颈部、腋窝、腹股沟可扪及数个直径约1 cm大小肿大淋巴结,质硬,无压痛,活动度可。Schober试验阴性,活动度4 cm,胸廓扩张度8 cm,指地距10 cm,枕墙距0 cm。双侧骶髂关节压痛。左手第2~4近端指间关节及第2、3掌指关节,右手第2、3近端指间关节及掌指关节中度肿胀及压痛。右腕轻度受限,左手第2、3指呈纽扣花畸形,双侧"4"字交叉试验阳性。

本例患者出现发热、贫血、多处淋巴结肿大,淋巴结活检提示CD68(+),S100(+),Bcl-2滤泡周细胞(+),窦组织细胞增生,符合窦性组织细胞增生症的诊断。同时,患者有:①手关节炎;②受累关节超过三个区域;③呈对称性;④晨僵持续半天,结合X线改变,根据1987年ACR诊断标准,符合"类风湿关节炎"诊断标准。另外,患者有:①下腰背痛,病程持续3月以上,疼痛随活动改善,但休息不减轻;②腰椎前屈受限;③双侧骶髂关节炎Ⅱ级改变。根据1984年修订的纽约标准,符合"强直性脊柱炎"诊断标准。患者关节疼痛指数VAS评分为50,类风湿关节炎疾病活动度DAS28(4)评分6.44。根据上述

(下转273页)

【通信作者】 成 娴,E-mail:chengxian@yeah.net