论著

文章编号:1000-5404(2011)23-2508-04

辛伐他汀对心肌梗死后心肌骨桥蛋白表达的影响及其与心室功能的相关性

蒋正英[1],覃 数[2],喻永敏[3] (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所重症医学科[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心血管内科[2];400021 重庆,重庆市公安局物证鉴定中心[3])

[摘要] **目的** 在大鼠心肌梗死模型上,观察辛伐他汀是否下调 OPN mRNA 及蛋白表达,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 MI 模型,予辛伐他汀干预。分为 3 组:Sim 组、MI 组及假手术组。4 周后分别测定左、右心室质量指数,血流动力学指标,HE 染色观察心肌组织病理学改变,运用免疫组化、RT-PCR 方法检测 OPN 蛋白及 mRNA 表达并与假手术组比较。**结果** MI 组较 Sham 组左、右心室质量指数均有所增加($P<0.01$),血流动力学变化($P<0.01$),心肌中 OPN mRNA 及蛋白表达量明显增加($P<0.01$);Sim 组较 MI 组左、右心室质量指数均有下降($P<0.01$),血流动力学改善($P<0.01$),心肌中 OPN mRNA 及蛋白表达量明显降低($P<0.01$);MI 组 OPN mRNA 表达与左、右心室质量指数呈显著正相关($r=0.760$,$P=0.029$;$r=0.804$,$P=0.016$),与 LVEF、FS 变化呈显著负相关($r=-0.791$,$P=0.020$;$r=-0.841$,$P=0.009$)。**结论** 辛伐他汀改善 MI 后左心室重塑和心功能,这可能与其在基因转录和蛋白质翻译水平抑制 OPN 表达等综合因素有关。

[关键词] 辛伐他汀;骨桥蛋白;心肌梗死;心肌重塑
[中图法分类号] R542.22; R972.6; R969.4 [文献标志码] A

Effect of simvastatin on osteopontin expression and its correlation with ventricular remodeling in rats after myocardial infarction

Jiang Zhengying[1], Qin Shu[2], Yu Yongmin[3] ([1]Department of Intensive Care Medicine, Cancer Hospital of Chongqing, Chongqing, 400030; [2]Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Institute of Forensic Science, Chongqing Police Bureau, Chongqing, 400021, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of simvastatin on mRNA and protein expression of osteopontin (OPN) and simvastatin association with improvement of cardiac remodeling and cardiac function in rat model of myocardial infarction (MI). **Methods** Rat MI models were constructed in Wistar rats. There were three groups: a Sim group [Simvastatin 40mg/(kg·d)], an MI group [normal saline 40 mg/(kg·d)] and a Sham group [normal saline 40 mg/(kg·d)]. After four weeks treatment, indices of ventricular weight and hemodynamics were measured, pathological changes of cardiac muscular tissues were observed by HE staining, and mRNA and protein expression of OPN in cardiac muscles were measured by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** Compared with those in the Sham group, the indices of ventricular weight and hemodynamics and mRNA and protein expression of OPN in the MI group increased significantly ($P<0.01$). Compared with the MI group, indices of ventricular weight and hemodynamics and mRNA and protein expression of OPN in the Sim group decreased significantly ($P<0.01$). In the MI group, OPN mRNA expression positively correlated with ventricular weight index ($r=0.760$, $P=0.029$; $r=0.804$, $P=0.016$), and negatively correlated with echocardiogram indices (LVEF, FS) ($r=-0.791$, $P=0.020$; $r=-0.841$, $P=0.009$). **Conclusion** Simvastatin can effectively improve ventricular remodeling and cardiac function in rats with MI. The mechanism may be related to the inhibitory effect of simvastatin on mRNA and protein expression of OPN.

[**Key words**] simvastatin; osteopontin; myocardial infarction; ventricular remodeling

Corresponding author: Qin Shu, Tel: 86-23-89012011, E-mail: qinshu@21cn.com

骨桥蛋白(osteopontin,OPN)为磷酸化糖蛋白,在多种细胞有表达。Oldberg 等[1]通过对大鼠骨肉瘤涎蛋白互补脱氧核糖核酸克隆而分离出来的一种酸性蛋白并命名为 OPN。研究表明在食管癌、胃癌、心肌梗死等疾病时 OPN 表达均增高[2-4],他汀类药物可降低

[通信作者] 覃 数,电话:(023)89012011,E-mail:qinshu@21cn.com

肾脏、主动脉瓣病变时 OPN 的高表达[5-6]。辛伐他汀能否调节 MI 后 OPN 的高表达目前报道甚少。我们推测辛伐他汀可调节 MI 后 OPN 的高表达从而改善心梗后心肌重塑。本实验建立心肌梗死大鼠模型,运用免疫组化、RT-PCR 及 Western bolt 方法观察,旨在探索辛伐他汀对骨桥蛋白表达的影响及其与心肌梗死后(MI)心肌重塑的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 24 只,体质量 175~220(198±7)g,第三军医大学野战外科研究所大坪医院实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂

辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司)PTC-200PCR 仪(MJRESEARCH,USA),S-P 免疫组化染色试剂盒(Santa Cruz 公司),柱离心式总 RNA 提取试剂盒(上海华舜),RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0(TaKaRa,Japan),250 bp DNA Marker(TaKaRa, Japan),50 bp DNA Ladder (TaKaRa,Japan),Goldview(中山生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 建立动物模型及分组 结扎雄性 Wistar 大鼠冠脉左前降支,制造 MI 模型,同等条件行血管下穿针,不结扎建立假手术模型。冠脉结扎术后 48 h 存活大鼠分为 2 组($n=8$):辛伐他汀组[Simvastatin 40 mg/(kg·d),Sim 组]与心肌梗死组(MI 对照组);假手术大鼠为 Sham 组($n=8$)。Sim 组于术后第 1 天起灌胃给药,连续 28 d;MI 组和 Sham 组每天以等量生理盐水灌胃。

1.3.2 超声心动图测定心脏超声学参数 大鼠麻醉后固定,连接心电图,应用美国通用 GEVIVID-7 型彩色超声诊断仪,探头频率 8.0~12.0 MHz,取胸骨旁左室短轴切面,在二尖瓣腱索水平记录 M 型超声运动曲线后,测量舒张末期的室间隔厚度(IVS)和左心室后壁厚度(LVPWT)、左心室舒张末期内径(LVDd)及左心室收缩末期内径(LVDs)。仪器将自动计算出左心室短轴缩短率(FS):FS=(LVDd−LVDs)/LVDd×100%,以及左心室射血分数(LVEF)。

1.3.3 左右心室质量和质量指数 将大鼠处死后迅速开胸取出心脏,用冰生理盐水灌注冲洗,切去双侧心房及根部血管,分离左右心室,清洁滤纸吸干水分后分别称取左心室(包括室间隔,LVW)和右心室(RVW)质量,计算左、右心室质量/体质量(BW)即为左、右心室质量指数(LVWI,RVWI,mg/g)。

1.3.4 S-P 免疫组化法测定 OPN 在心肌中的表达 步骤参照 S-P 试剂盒说明书。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。

1.3.5 心肌中 OPN mRNA 表达检测 苯酚/氯仿法抽提心肌组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,PCR 扩增目的片段:引物序列上游 5′-ACGACGATGATGACGATGAT-3′;下游 5′-TCCTTAGACTCACCGCTCTT-3′(301 bp),PCR 反应条件:94 ℃解链 2 min,94 ℃变性 40 s,53 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 3 min,40 个循环。内参照引物序列:上游 5′-AGAGCTATGAGCTGCCTGAC-3′,下游 5′-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3′(374 bp),退火温度 55 ℃。内参与 OPN 产物各取 5 μl 同时在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。用凝胶成相系统(美国 Bio-Rad 公司)对电泳影像进行光密度扫描,以 OPN 条带光密度与内参条带光密度比值表示目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.4 统计学方法

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用非配对 t 检验、χ^2 检验,多组比较采用方差检验,所有统计分析均使用 SPSS 10.0 统计软件完成;并采用直线相关回归分析,分析 OPN mRNA 表达与心脏质量指数和超声心动图指标的相关性。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量,左、右心室质量和质量指数的比较

MI 组体质量较 Sham 组降低($P<0.01$);Sim 组大鼠体质量增加,较 MI 组有显著性差异($P<0.01$);MI 组和 Sim 组与 Sham 组相比,左、右心室质量均有所增加($P<0.01$,$P<0.05$);MI 组和 Sim 组间无显著差异($P>0.05$);MI 组左、右心室质量指数均较 Sham 组增加($P<0.01$);Sim 组均较 MI 组降低($P<0.01$)。见表 1。

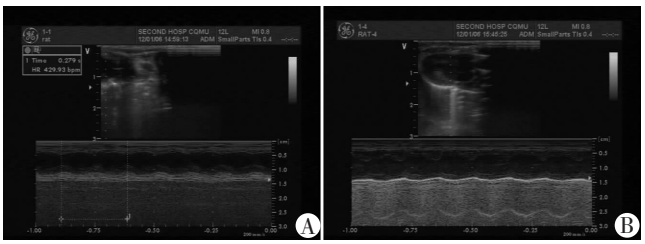
表 1 各组大鼠体质量,左、右心室质量和指数的比较($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	BW(g)	LVW(mg)	RVW(mg)	LVWI(mg/g)	RVWI(mg/g)
Sham 组	242.00±14.71	446.50±20.58	134.74±17.89	1.85±0.04	0.56±0.04
MI 组	200.88±15.33[a]	495.53±33.38	171.54±25.83[b]	2.47±0.03a	0.83±0.08[a]
Sim 组	237.25±16.81[c]	482.06±26.32[a]	159.73±16.07[b]	2.03±0.05a[c]	0.67±0.03[ac]

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 Sham 组比较;c:$P<0.01$,与 MI 组比较

2.2 各组大鼠左心室结构和功能的比较

术后 4 周超声心动图左心室短轴切面 M 型超声取样显示:与 Sham 组比较,MI 组大鼠左心室后壁(LVPWT)增厚($P<0.01$),左心室舒张末期内径(LVDd)明显增加($P<0.01$),LVEF、FS 下降($P<0.01$);而 Sim 组大鼠的 LVDd 及 LVPWT 明显小于 MI 组($P<0.05$),LVEF 和 FS 明显高于 MI 组($P<0.05$)。见图 1,表 2。



A:MI 组;B:Sim 组

图 1 2 组大鼠心脏彩超表现

表 2 各组大鼠超声心动图检测指标的比较($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	LVDd	LVPWT	FS(%)	LVEF(%)
Sham 组	4.23±0.49	1.73±0.24	56.88±6.44	81.49±5.27
MI 组	6.13±0.49[a]	2.28±0.25[a]	29.83±4.06[a]	62.11±6.69[a]
Sim 组	5.41±0.31[ab]	1.94±0.25[b]	35.60±4.04[ab]	70.77±5.47[ab]

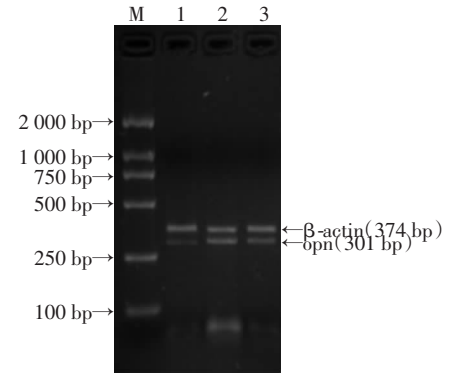
a:$P<0.01$,与 Sham 组比较;b:$P<0.05$,与 MI 组比较

2.3 组织病理学检查

普通光镜下HE染色,MI组大鼠梗死区局部大量纤维组织增生,残存个别心肌细胞,可见小灶性出血,心肌细胞变形、坏死,肌横纹模糊不清,核不同程度溶解,交界区残存散在小灶心肌细胞,残存心肌细胞变性,大量纤维组织包裹心肌细胞灶;非梗死区心肌间隙增宽,心肌细胞代偿性肥大,心肌间有散在出血;Sim组大鼠梗死区病理结构变化与MI组相同;交界区心肌间可见纤维组织增生形成纤维疤痕替代灶,非梗死区心肌细胞未见明显异常,心肌间可见小灶性及散在出血。见图2。

2.4 各组大鼠心肌非梗死区OPN mRNA和蛋白的表达

免疫组化、RT-PCR结果显示:MI组心肌组织中OPN mRNA和蛋白表达量较Sham组显著增加($P<0.01$);Sim组OPN mRNA和蛋白表达量与MI组比较明显减少($P<0.05$)。见图3、4,表3。



M:Marker;1:Sham组;2:MI组;3:Sim组

图4 各组大鼠心肌非梗死区OPN mRNA的RT-PCR检测结果

表3 各组大鼠心肌OPN mRNA和蛋白表达量($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	蛋白表达	mRNA表达
Sham组	0.042 4±0.004 0[b]	0.16±0.04[b]
MI组	0.114 9±0.022 0	0.48±0.10
Sim组	0.089 7±0.016 0[a]	0.33±0.12[a]

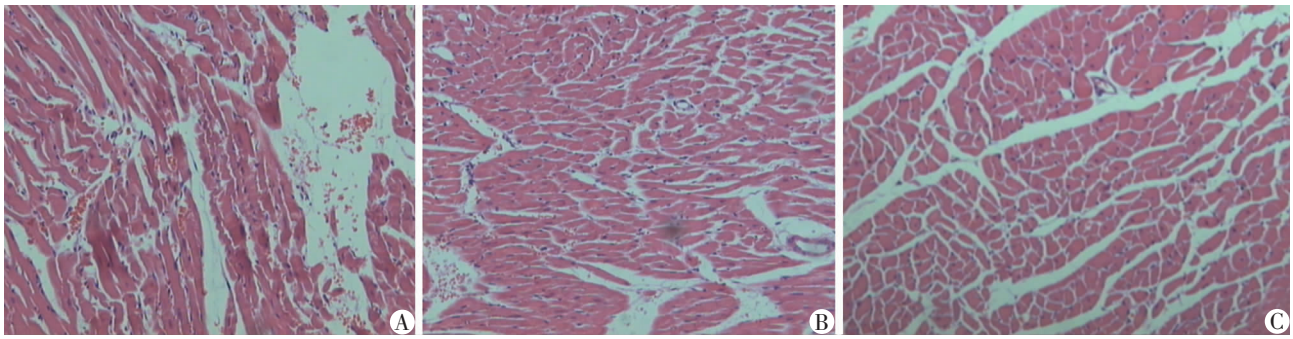
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与MI组比较

2.5 MI大鼠心肌OPN mRNA表达与心室质量指数及心功能的相关性分析

MI大鼠心肌中OPN mRNA表达变化与左、右心室质量指数呈显著正相关($r=0.760, P=0.029$;$r=0.804, P=0.016$),与LVEF、FS呈显著负相关($r=-0.791, P=0.020$;$r=-0.841, P=0.009$)。

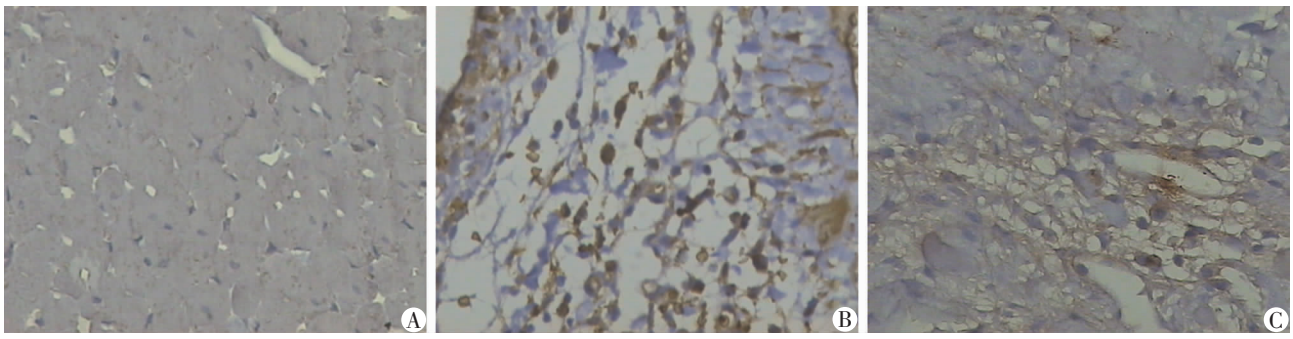
3 讨论

急性心肌梗死后左心室重塑是反映心肌梗死后预后的敏感指标,也是远期发生心脏性死亡最重要的危险因素之一,决定心肌梗死患者疾病与生命转归,因此心室重塑的临床治疗已成为焦点与热点问题。目前基础及临床实验提示他汀类药物可通过多种信号途径改善和逆转心肌梗死后心室重塑[7-9]。本研究采用40 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,MI组较Sham组大鼠体质量降低,但左、右心室质量均增加,表明MI后发生了心室重塑,存在心肌细胞肥大和间质纤维化。辛伐他汀干预4周后,左心室质量及质量指数较MI组降低,表明辛伐他汀能改善MI后心室重塑。



A:MI组;B:Sim组;C:Sham组

图2 3组大鼠非梗死区心肌组织病理变化 (HE×100)



A:Sham组;B:MI组;C:Sim组

图3 3组大鼠心肌OPN蛋白免疫组化观察 (S-P×400)

OPN作为一个作用广泛的细胞因子,通过促进胶原沉积及血管紧张素受体表达加速心肌梗死后心脏重塑进程[10]。Trueblood等[11]对野生型和OPN基因敲除大鼠心肌梗死4周后模型发现,野生型大鼠心肌间质内OPN mRNA、Ⅰ型胶原mRNA表达是增加的,而OPN基因敲除大鼠心肌间质内Ⅰ型胶原mRNA并没有出现改变,说明OPN与Ⅰ型胶原mRNA表达存在相关性。张玉玲等[4]研究发现,心肌梗死大鼠心肌组织OPN表达明显增高,予厄沙贝坦治疗后,心肌组织OPN表达被显著抑制。而他汀类改善MI后心室重塑是否与其下调OPN表达有相关性,目前尚少见报道。本研究结果显示,MI后非梗死区OPN表达较Sham组明显增高,予Sim干预后心肌中OPN表达受到抑制,MI大鼠心脏OPN表达与心室质量指数呈显著正相关,与心功能呈显著负相关。表明MI后OPN的过度表达和分泌可引起异常的瘢痕修复及非梗死部位组织重塑,辛伐他汀可通过下调OPN表达改善心室重塑,为以后探讨他汀类在AMI后心室重塑中的作用及机制奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Oldberg A, Franzen A, Heingard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(23): 8819-8823.

[2] 陈小勇, 宣世海, 周玉贵. 食管癌患者血清骨桥蛋白水平检测的临床意义[J]. 重庆医学, 2011, 40(2): 145-146.

[3] 刘鲁英, 韩艳春, 赵铭锋, 等. 胃癌中骨桥蛋白、结缔组织生长因子的表达及其意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(2): 130-134.

[4] 张玉玲, 周淑娴, 雷娟, 等. 血管紧张素Ⅱ-1型受体拮抗剂对心肌梗死大鼠骨桥蛋白表达及胶原沉积的影响[J]. 中国循环杂志, 2007, 22(4): 307-310.

[5] Li C, Yang C W, Park J H, *et al*. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(1): F46-F57.

[6] Rajamannan N M, Subramaniam M, Springett M, *et al*. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve[J]. Circulation, 2002, 105(22): 2660-2665.

[7] 常广磊, 刘剑, 张冬颖, 等. 辛伐他汀对心肌梗死大鼠心室重构与FoxO3a表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3): 266-269.

[8] 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]. 临床心血管病杂志, 2009, 25(6): 445-448.

[9] 袁桥英, 覃数, 司良毅, 等. 辛伐他汀对急性心肌梗死大鼠RhoA表达及心室重塑的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1170-1172.

[10] Kusuyama T, Yoshiyama M, Omura T, *et al*. Angiotensin blockade inhibits osteopontin expression in non-infarcted myocardium after myocardial infarction[J]. J Pharmacol Sci, 2005, 98(3): 283-289.

[11] Trueblood N A, Xie Z, Communal C, *et al*. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin[J]. Circ Res, 2001, 88(10): 1080-1087.

(**收稿**:2011-08-15;**修回**:2011-09-15)

(编辑 王 红)

(上接2507页)

可致幽门松弛[2]。常合并腹胀、呕吐而易误诊为消化性溃疡、幽门梗阻、消化道肿瘤等,上消化道钡餐透视可明确诊断。治疗包括保守及手术解除十二指肠淤滞2种措施。本例诊断明确,考虑患者较年轻,十二指肠淤滞程度不重,并有自适倾向,随年龄增长有逐步改善可能,故采用保守疗法,并嘱其调节饮食,适当增加体质量,餐后俯卧或左侧卧位以减轻梗阻,坚持随访。

胡桃夹综合征(nutcracker syndrome,NCS)指LRV经AO和SMA夹角时受压损伤而出现的血尿、蛋白尿和左腰腹痛等症状,又称左肾静脉受压综合征[3]。常表现为腰痛、肉眼血尿、蛋白尿,易误诊为肾小球肾炎等疾病,B超可显示SMA与AO的夹角及LRV受压情况,可资鉴别及确诊。治疗主要包括保守、介入(左肾静脉支架植入术)、手术(SMA移位、自体肾移植、左肾静脉下移)等。本例患者诊断明确,考虑症状较轻,随年龄增长,SMA与AO夹角处脂肪及结缔组织增加可使左肾静脉受压程度减轻[4]。故本例适合保守观察,随访3个月病情平稳。

此2种疾病均好发于体型瘦长的青少年,临床上应予重视。对于年轻且症状不重患者,可保守观察,长期随访。对于年龄大、症状严重或保守处理无好转者,可行介入及手术等治疗。一般早期确诊,恰当处理,疗效较好。

参考文献:

[1] Chen H H, You Z H, Chuang S H, *et al*. Nutcracker syndrome[J]. Intern Med J, 2011, 41(6): 503-504.

[2] 刘勇,罗羽宏.肠系膜上动脉压迫综合征的诊疗进展[J].中国普外基础与临床杂志, 2011, 18(2): 225-228.

[3] Genc G, Ozkaya O, Bek K, *et al*. A rare cause of recurrent hematuria in children: Nutcracker syndrome[J]. J Trop Pediatr, 2010, 56(4): 275-277.

[4] Kurklinsky A K, Rooke T W. Nutcracker phenomenon and nutcracker syndrome[J]. Mayo Clin Proc, 2010, 85(6): 552-559.

(**收稿**:2011-09-09;**修回**:2011-10-20)

(编辑 龙 亮)