维普资讯 http://www.cqvip.com

·论 著·

风湿性心脏病粘附斑激酶表达与心肌间质纤维化关系的研究

郝 嘉[1],郭 红[2],陈 林[1],肖颖彬[1] (第三军医大学附属新桥医院:1.心血管外科;2.消化科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 研究粘附斑激酶在风湿性心脏病心肌组织中的表达及其与风湿性心脏病的心肌间质纤维化之间的关系。**方法** 采用免疫组化法和原位杂交法检测粘附斑激酶在20例风湿性心脏病患者心肌组织和5例正常心肌组织中的表达,心肌行VG染色后,图像分析心肌胶原体积分数及心肌血管周围胶原面积比例,并测定心肌组织羟脯氨酸含量,将所得结果进行相关分析。**结果** 风湿性心脏病患者心肌组织不同程度表达粘附斑激酶,且较正常对照组明显升高($P<0.05$),粘附斑激酶蛋白和mRNA的表达量与心肌胶原体积分数、心肌血管周围胶原面积比例和羟脯氨酸含量呈显著正相关。**结论** 粘附斑激酶可能在风湿性心脏病心肌间质纤维化进程中发挥重要作用,它可能是促进风湿性心脏病心肌胶原合成的重要信号分子。

[关键词] 风湿性心脏病;粘附斑激酶;胶原
[中图分类号] R541.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2006)02-0073-03

Correlation between focal adhesion kinase in rheumatic heart disease and cardiac fibrosis

HAO Jia, GUO Hong, CHEN Lin, XIAO Ying-bin (Department of Cardiovascular Surgery, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the expression of focal adhesion kinase (FAK) in myocardium of rheumatic heart disease and its role in cardiac fibrosis. **Methods** The expressions of FAK gene and protein in resected myocardium from 34 rheumatic heart disease patients or 5 corpses died from accident were determined by in situ hybridization and immunohistochemistry Methods. The collagen volume fraction (CVF) and perivascular collagen area (PVCA) were analyzed after VG staining, and hydroxyproline content (Hyp) was detected. Correlation analysis was carried out between the expression of FAK gene and protein and CVF, PVCA, Hyp. **Results** The positive expression of FAK, CVF, PVCA and Hyp were higher in myocardium from rheumatic heart disease patients than control myocardium ($P<0.05$). There was positive correlativity between the increasing expression of FAK and the augment of CVF, PVCA and Hyp. **Conclusion** The FAK expression may increase the synthesis of collagen in myocardium, which maybe result in cardiac fibrosis of rheumatic heart disease.

Keywords: rheumatic heart disease; focal adhesion kinase; collagen

心肌间质纤维化是一种重要而常见的病理过程,它与风湿性心脏病、心功能不全、心律失常和心源性猝死等密切相关。风湿性心脏病心肌间质胶原纤维增生的机理目前尚不十分清楚。本研究应用免疫组化和原位杂交法对20例风湿性心脏病和5例正常心肌标本进行粘附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的检测,分析其与心肌胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF)、心肌血管周围胶原面积比例(perivascular collagen area, PVCA)和羟脯氨酸(hydroxproline, Hyp)的含量的相关性,探讨FAK在风湿性心脏病心肌间质纤维化进程中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

FAK mRNA原位杂交检测试剂盒、DAB显色试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供,SP9002免疫组化试剂盒购自中山公司,FAK抗体为美国Santa Cruz产品,羟脯氨酸试剂盒购自南京建成公司。临床标本选用2005年在我院行二尖瓣和主动脉瓣双瓣膜置换术时切除的心脏乳头肌标本20例,其中男12例,女8例,年龄31~54岁,平均42岁。5例正常心脏乳头肌标本来自意外死亡的尸体。标本离体后,用4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋。

1.2 方法

1.2.1 FAK免疫组化检测 用SP免疫组化法测定,FAK抗体浓度为1:100,对照组用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。用图象分析仪行半定量分析,每一玻片任选5个视野,计算FAK表达的吸光度值(A)。

1.2.2 FAKmRNA原位杂交检测 石蜡切片脱蜡后,H_2O_2灭活内源性酶,双蒸水洗3次,3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶37℃消化30 min,原位杂交用PBS洗5 min×3次,双蒸水洗1

[基金项目] 第三军医大学青年基金(XG200530)
[作者简介] 郝 嘉(1973-),男,四川省荣县人,主治医师,讲师,博士,主要从事心肌间质纤维化的基础研究。电话:(023) 66938392
[通讯作者] 肖颖彬,第三军医大学附属新桥医院心血管外科主任医师,教授
[收稿日期] 2005-12-08 [修回日期] 2006-01-15

维普资讯 http://www.cqvip.com

次,1%多聚甲醛后固定 10 min,水洗 3 次。滴加预杂交液 38 ~ 42 ℃ 3 h,滴加杂交液,恒温箱中 38 ~ 42 ℃过夜。杂交后在 37 ℃水浴下依次 2 × SSC 液洗 5 min × 2 次,0.5 × SSC 液洗 15 min × 1 次,0.2 × SSC 液洗 15 min × 1 次;滴加封闭液 37 ℃ 30 min;滴加生物素化鼠抗地高辛 37 ℃ 60 min,PBS 洗 5 min × 4 次;滴加 SABC37 ℃ 60 min,PBS 洗 5 min × 4 次;滴加生物素化过氧化物酶 37 ℃ 20 min,PBS 洗 5 min × 4 次,二氨基联苯胺显色 10 ~ 15 min 后,水洗、复染、分化、自来水返蓝、封片。以预杂交液代替探针作探针阴性对照,PBS 取代生物素化鼠抗地高辛抗体作抗体阴性对照。组织细胞胞浆着色呈棕黄色为阳性细胞,使用 Leica Qwin 图象分析系统行半定量分析,每一玻片任选 5 个视野检测阳性细胞积分光密度(IOD)值。

1.2.3 心肌胶原 VG 染色 心肌胶原染色用苦味酸-酸性品红(VG)法,光镜检查心肌细胞呈黄色,胶原呈红色。测量心肌组织 CVF 及 PVCA。其中 CVF = 组织 VG 染色阳性标记区/总取样区,PVCA = 心肌血管周围胶原面积/动脉管腔面积。每一标本随机取 5 个视野测量,计算其均值。

1.2.4 心肌羟脯氨酸含量测定 心肌组织漂洗后吸干水分称重,剪碎、超声波匀浆(冰水中进行),离心 10 min 取上清,37 ℃消化 3 h,加入羟脯氨酸显色剂,用紫外分光光度计在波长 550 nm 检测吸光度,推算每毫克心肌组织中羟脯氨酸的含量。

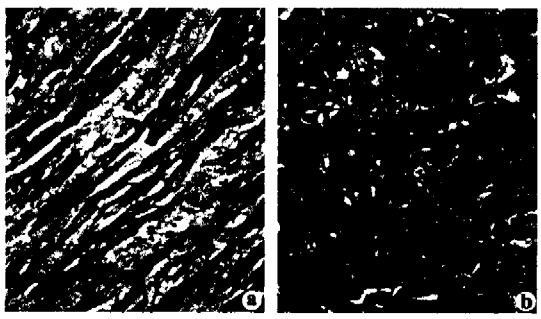
1.3 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件对数据进行 t 检验、相关分析及多个实验组与同一对照组比较的方差分析。

2 结果

2.1 FAK 蛋白和 mRNA 的表达

免疫组化和原位杂交显示正常组心肌细胞浆内可见少许淡黄色的颗粒物质,FAK 表达呈弱阳性,而风湿性心脏病组心肌胞浆及间质内满布棕黄色颗粒状物质,FAK 表达呈强阳性(图 1)。二组 FAK 及 FAK mRNA 相对含量比较,有显著性差异($P < 0.05$),见表 1。



a:对照组表达量少; b:风湿性心脏病组呈强阳性表达

图 1 心肌组织 FAK 表达 (SP 法 ×400)

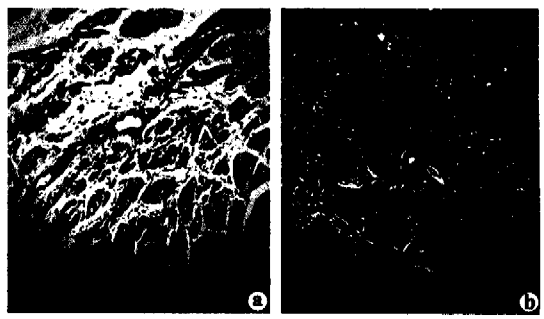
表 1 心肌 FAK 蛋白和 mRNA 检测($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	FAK	FAK mRNA
对照组	5	0.092 ± 0.012	0.081 ± 0.003
风湿性心脏病组	20	0.323 ± 0.032 *	0.272 ± 0.018#

*:与对照组比较,$P < 0.05$; #:与对照组比较,$P < 0.01$

2.2 心肌 CVF、PVCA 和 Hyp 含量

正常心肌小动脉外膜有少量胶原沉积,但不向周围间质延伸,肌间隙中有少量胶原占据。风湿性心脏病组肌间隙中胶原出现不同程度的增多,呈栅栏状紧裹心肌细胞。心肌壁内小血管周围外膜有异常的胶原堆积,且短距离向邻近间质延伸,呈反应性纤维化表现(图 2)。风湿性心脏病组 CVF、PVCA 和 Hyp 测得值均显著高于对照组($P < 0.05$),见表 2。



a:对照组见少量红色胶原; b:风湿性心脏病组见大量红色胶原

图 2 心肌组织 VG 染色 (×100)

表 2 心肌 CVF、PVCA 和 Hyp 含量($\bar{x} \pm s$)

分组	CVF(%)	PVCA	Hyp(μg/mg)
对照组	2.18 ± 0.14	0.76 ± 0.06	14.89 ± 0.96
风湿性心脏病组	11.36 ± 0.41 *	1.78 ± 0.16 *	33.49 ± 2.73#

*:与对照组比较,$P < 0.05$; #:与对照组比较,$P < 0.01$

2.3 FAK 表达与心肌胶原含量指标的相关性分析

心肌中 FAK 表达与心肌 CVF、PVCA 和羟脯氨酸含量呈明显正相关($P < 0.01$)。而心肌中 FAK mRNA 的表达也与心肌 CVF、PVCA 和羟脯氨酸含量显著正相关($P < 0.01$)。

3 讨论

心脏胶原网架的生理意义及其在心脏疾病中的病理变化,已成为心脏病学研究领域新的热点。瓣膜胶原与心脏胶原基质相互连接成一个连续的网状结构,称为心脏胶原网,它既是心肌细胞的支架结构,又具有运动传递功能。胶原合成代谢和降解代谢失衡会导致心肌间质纤维化,这种改变可引起心肌结构紊乱、僵硬度增加、心脏顺应性降低、组织异质性增高,是发生心律失常的结构基础,也是猝死和慢性心功能不全的潜在危险因素[1]。

FAK 本身是一个分子量为 125 kD 的非受体蛋白酪氨酸激酶,分布在细胞粘着斑部位。它作为整合素的下游信号分子、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)上游的关键信号分子,与多种信号转导有关,而且是细胞内多条信号转导通路的交汇点,参与调节细胞发育、生长、存活、凋亡、粘附、骨架重组、转化、扩散和迁延等过程[2-3]。细胞外基质信号经整合素传递至 FAK 后,能

维普资讯 http://www.cqvip.com

够使FAK发生酪氨酸磷酸化,从而活化细胞,促进一些类型的细胞胶原合成及合成细胞外基质蛋白。

我国风湿性心脏病患者现有至少250万人,远较西方国家多见。风湿性瓣膜病变是一种以间质胶原增生为特征的改变,胶原堆积程度与换瓣或成形术后心功能恢复程度密切相关。研究表明在慢性风湿性心脏病中无论是否有风湿活动,心肌间质中胶原蛋白的合成与代谢,都处于持续进行性过程[4]。心脏成纤维细胞(cardiac fibroblasts, CFs)增殖和/或胶原蛋白合成分泌的"过度"增加,是风湿性心脏病心肌间质纤维化发生的细胞生物学基础。血管紧张素Ⅱ在促进CFs增殖和胶原蛋白表达的同时,也增强了CFs的FAK活性,提示FAK可能参与了调节血管紧张素Ⅱ的促纤维化进程[5]。深入探讨胶原合成的调控因素,改善胶原的代谢过程,可能成为防止风湿性心脏病心肌进行性纤维化的一个新途径。

VG染色主要用于显示组织、器官的损伤修复及硬化情况,特别是用于鉴别组织中的胶原纤维,可为诊断提供重要依据。羟脯氨酸是胶原蛋白中特有的氨基酸,含量相对恒定,占胶原中总氨基酸的13.4%,而一般蛋白质含量极微,故羟脯氨酸的测定值可间接反映胶原蛋白的合成情况[6]。本实验通过析因分析,认为在风湿性心脏病中FAK的表达增加和胶原蛋白的合成量上升之间存在显著的相关性($P<0.05$)。说明心肌FAK途径的激活可能参与了风湿性心脏病心肌间质纤维化过程,提示从FAK基因水平调控胶原合成、分泌与代谢,控制和逆转心肌间质胶原网的重建,可能成为有效防治慢性风湿性心脏病心肌间质纤维化的新途径。

[参考文献]

[1] 杨莹,白小涓. 增龄过程中心肌纤维化的发生机制及研究进展[J]. 中国老年学杂志,2004,24(2):166-168.
[2] Kuppuswamy D. Importance of integrin signaling in myocyte growth and survival[J]. Circ Res, 2002,90(12):1240-1242.
[3] Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1692(2-3):77-102.
[4] 宋智钢,徐志云,张宝仁,等. 风湿性心脏病及先天性心脏病心包组织病理改变及胶原含量的变化[J]. 临床心血管病杂志,2000,16(8):345-347.
[5] Kawano H, Do YS, Kawano Y, et al. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts[J]. Circulation, 2000,101(10):1130-1137.
[6] 张建军,史晨辉,陈发国. 1,25双羟维生素D_3对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖和胶原合成的影响[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2005,23(2):179-182.

(编辑:余汇洋)

·个案与短篇·

护患沟通在妇产科患者中的应用

李 涛 (新疆伊犁洲奎屯医院妇产科,新疆 奎屯 833200)

[关键词] 沟通;妇产科;患者
[中图分类号] R473.71;G206.2 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2006)02-0075-01

沟通是指人与人之间的信息传递与交流,即人与人之间交流意见、观点、情况或感情的过程。护患关系是一种人际关系,而人际关系的好坏可直接影响到人与人之间的交流效果。从患者住院,护士接触患者一开始,就开始了双方之间的交流,护士询问病情、患者向护士提问,实际上就是双方之间的信息交流,良好的护患关系可以提高治疗效果。

1 沟通的模式

有效的沟通交流应是接受患者所收到的信息,恰好是信息发出者所表达的意思。其沟通交流的过程模式图如下:要沟通的事物—信息发出者—信息—途径—信息接受者—反馈—信息发出者。例如:妇产科护士要监听产妇的胎心音。会将听胎心音这一要沟通的事物用语言的形成表达信息,用说的途径传递给患者。"请您躺好,我准备给您听胎心音"。如果是成功的沟通其结果是患者收到护士发出的信息后按指定的位置和体位躺好。患者没有行动,说明患者没有收到正确的信息,存在着沟通障碍。护士通过患者收到信息的反馈信息来了解患者是否收到了信息,判断沟通是否能继续及沟通的效果。

2 沟通的方式

2.1 语言性沟通

语言性沟通是用语言或文字进行沟通,即口头与书面两种。在语言性沟通时应注意以下几点:①语言应通俗易懂,简单明确。用于交流的语言要能互相理解,用词简单明了,避免过于专业化的语言和医院常用的省略句,应尽可能把一些医学术语变成通俗语言,以便于理解和接受。②应使用礼貌性语言,尊重患者人格。使用的文明规范化语言,减少了护患关系

(下转81页)

[收稿日期] 2005-11-16 [修回日期] 2005-12-01