基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0019-04

雷米普利通过干预瞬时感受器阳离子通道 C3 的表达对心肌纤维化的影响

余冬梅,陈 明
(重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究雷米普利(Ramipril,RAM)对自发性高血压大鼠(Spontaneously hypertensive rats,SHR)心肌纤维化时心脏瞬时感受器阳离子通道 C3 亚族表达的影响。方法:12 周龄 SHR 大鼠随机分为安慰剂组、RAM 组,同龄 Wistar Kyoto rats(WKY)为正常对照组,RAM 给药 4 周后测左室质量指数、心肌胶原容积分数和心脏组织中瞬时感受器阳离子通道 C 3(Canonical transient potential receptor channel 3, TRPC 3)的 mRNA 的表达和蛋白的表达。结果:安慰剂组左室质量指数,Ⅰ、Ⅲ型胶原容积分数显著高于 WKY 组;RAM 组上述指标较安慰剂组明显降低。3 组心脏均有 TRPC3 的表达,但安慰剂组 TRPC3 mRNA 及蛋白表达显著高于 WKY 组,RAM 组 TRPC3 表达则明显少于 SHR 组($P<0.05$)。结论:SHR 及 WKY 大鼠存在 TRPC3 蛋白的表达,心脏 TRPC3 蛋白可能参与了心肌纤维化发生发展的过程,RAM 可能通过下调心脏 TRPC3 mRNA 及蛋白的表达发挥抗心肌纤维化的作用。

【关键词】雷米普利;心肌纤维化;瞬时感受器阳离子通道 C3;钙离子
【中国图书分类法分类号】R542.2+3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-08-29

The effect of ramipril on the cardiac fibrosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats through intervening the expression of TRPC3

YU Dong-mei, et al
(*Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of ramipril on the expression of TRPC3 in the overload induced cardiac fibrosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Methods*: 12-week-old SHRs were divided into two groups: the placebo group (SHRs) and the Ramipril group (Ram-SHR), the same aged Wistar Kyoto rats (WKYs) were used as control group (WKY). Four weeks after drug intervention, the left ventricle mass index (LVMI), the cardiac collagen volume fraction (CVF) and the expression of TRPC3 mRNA and protein were detected. *Results*: The expression of TRPC3 mRNA and protein were detected in each group. Compared with the WKYs, the LVMI, CVF) and the expression of TRPC3 mRNA and protein were significantly increased in SHRs. These data mentioned above were decreased obviously in Ramipril group. *Conclusion*: Expression of TRPC3 mRNA and protein TRPC3 were found in both SHRs and WKYs. TRPC3 could have play an important role in the development of cardiac fibrosis. Rmipril could inhibit the cardiac fibrosis through down-regulating the expression of TRPC3 mRNA and protein.

作者介绍:余冬梅(1984-),女,硕士,
研究方向:高血压的发病机制、治疗及研究进展。
通信作者:陈 明,男,教授,Email:chenmingcq@126.com。

【Key words】ramipril; cardiac fibrosis; canonical transient potential receptor channel 3; calciumion

2008.

[4] Inserte J, Barba I, Hernando V, et al. Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(1): 116-122.

[5] 乔 欣,刘新伟.酸处理对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的影响及心肌 PI3K 信号通路在其中的作用[J].中华麻醉学杂志,2009,29(3):272-275.

[6] Lemasters J J, Bond J M, Chacon E, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes[J]. EXS, 1996, 76: 99-114.

[7] Inserte J, Barba I, Hernando V, et al. Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage[J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(4): 782-790.

[8] Rodríguez-Sinovas A, Cabestrero A, García del Blanco B, et al. Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs[J]. Basic Res Cardiol, 2009, 104(6): 761-771.

[9] Heintz A, Koch T, Deussen A. Intact nitric oxide production is obligatory for the sustained flow response during hypercapnic acidosis in guinea pig heart[J]. Cardiovasc Res, 2005, 66(1): 55-63.

(责任编辑:张学颖)

心肌肥厚高血压最常见的靶器官损害之一，同时也是多种心血管疾病的后期病理改变，也可能是各种心血管事件的独立危险因素。心肌肥厚时，除了有心肌细胞的肥大，同时伴有非心肌细胞的增生和间质纤维化。间质纤维化主要是心肌细胞外基质(Extracellular matrix，ECM)增加，使Ⅰ、Ⅲ型胶原增加，心肌间质和心肌内冠脉小血管周围胶原过度增多、沉积，心肌僵硬度增加，导致心室功能不全，冠脉储备减少和室性心律失常。近来有研究报道心肌成纤维细胞内 Ca^{2+} 的增加会激活钙调神经磷酸酶信号通路，但是引起这种钙离子变化的钙通道类型目前尚不明确。瞬时感受器阳离子通道 C 亚族(Canonical transient receptor potential，TRPC)是一种非选择性的阳离通道，有 7 个亚型。此通道广泛分布于各种组织中。近来有报道指出 TRPC 家族多种心血管疾病的病理生理过程密切相关。

1 材料与方法

1.1 材料

雷米普利(Ramipril，RAM)(赛诺菲安万特制药有限公司)；Trizol (Invitrogen 公司)；反转录试剂盒(日本东洋纺，TOYOBO)；2×Taq PCR MasterMix(天根生化科技有限公司)；DNA Marker(BioFlux)；PCR 引物(上海生工生物技术有限公司)；PCR 仪(美国 BIO-RAD)；兔抗 TRPC3 多克隆抗体(Millipore 公司)；BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)；膜蛋白提取试剂盒(贝博生物有限公司)；GAPDH 多克隆抗体(Millipore 公司)；硝酸纤维素膜(美国 Millipore 公司)；SHR 及 Wistar Kyoto rats(WKY)大鼠[中国医学科学院中国协和医科大学实验动物研究所，许可证编号 SCXK(京)2009-0004]。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组 12 周龄自发性高血压大鼠(Spontaneously hypertensive rats，SHR)12 只随机分为 RAM 组，RAM 5 mg/(kg·d)溶于生理盐水灌胃)和安慰剂组(SHR 组)，每组 6 只。同龄 Wistar Kyoto rats(WKY) 6 只为正常对照组(WKY 组)。SHR 组及 WKY 组予以等量生理盐水灌胃。试验期间所以动物分笼饲养，喂食普通混合饮食及自来水，共喂养 4 周。

1.2.2 左室质量指数(Left ventricle mass index，LVMI)的测定 RAM 干预 4 周后，电子天平称重后以 3.5%水合氯醛(1 ml/100 mg)腹腔麻醉后，迅速开胸取出大鼠心脏，灭菌 DEPC 灌洗，滤纸吸干水分，迅速分离左心室及室间隔称重，计算 LVMI。

1.2.3 胶原纤维的定性及半定量分析 左心室中部沿横轴切取 0.5 cm 厚的心肌组织置于 40 g/L 多聚甲醛溶液(pH=7.4)中固定，常规石蜡包埋，连续切片，厚度为 4 μm，每个标本切 12 张组织切片：6 张组织切片行苏木精－伊红(HE)染色，观察心肌细胞形态 6 张行 Van-Gieson 胶原染色，进行半定量分析，测定Ⅰ、Ⅲ型胶原容积分数(Collagen volume fraction，CVF)，通过灰度值来反映各组纤维化程度。

1.2.4 左室心肌瞬时感受器阳离子通道 C 3(Canonical transient potential receptor channel 3，TRPC 3)mRNA 表达的检测 各组取组织块 50 mg 用液氮研磨成粉，加入 1 ml Trizol(Invitrogen，USA)，使组织充分裂解提取总 RNA。紫外分光光度计测定 A_{260} 及 A_{280}，选大于 1.8 而小于 2.0 的样本。取 2 μg 总 RNA 反转录生成 cDNA 文库。1 μl 模板用于目的基因的 PCR 扩增。TRPC3 及内参基因 GAPDH 引物序列见表 1。TRPC3 的 PCR 反应条件 95℃ 预变性 5 min，95℃变性 40 s，62℃退火 30 s，72℃延伸 40 s，共扩增 30 个循环，72℃再延伸 5 min。GAPDH 的 PCR 条件：95℃ 预变性 5 min，95℃变性 40 s，60℃退火 30 s，72℃延伸 40 s，共扩增 30 个循环，72℃再延伸 5 min。反应结束后，各取 5 μl PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳分析，凝胶成像系统进行灰度扫描，以 TRPC 条带灰度/GAPDH 灰度的比值，作为 TRPC mRNA 的相对含量。

1.2.5 左室心肌 TRPC3 蛋白表达的检测 根据膜蛋白提取试剂盒的说明书提取大鼠心肌细胞膜蛋白。BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，电转至聚偏二氟乙烯膜(Polyvinylidene fluoride，PVDF)膜上。TBS 冲洗，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h；TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；加一抗(TRPC3 为 1:500，GAPDH 为 1:400)4℃孵育过夜；TBST 洗膜 3 次，每次 10 min；加二抗室温孵育 2 h；TBST 洗膜，ECL 显色，X 片曝光 1 min，显影，定影。凝胶成像系统采集图像，用 TRPC 蛋白条带灰度分别与其对应的 GAPDH 蛋白标准条带的比值进行定量分析。

1.2.6 统计学分析 采用 SAS9.1.3 软件对数据进行处理，实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异采用方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LVMI 及 CVF 的变化

如表 2 所示，SHR 组 LVMI、Ⅰ、Ⅲ型 CVF 均明显高于 WKY 组($P<0.001$)；RAM 组 LVMI、Ⅰ、Ⅲ型 CVF 均较 SHR 组明显减低($P<0.001$)。

2.2 TRPC3 PCR 扩增结果

如图 1 所示，TRPC3 产物电泳结果，扩增片段长度为 443 bp。3 组均可见清晰的条带，SHR 组 TRPC3 mRNA 显著高于 WKY 组 ($P<0.001$)，TRPC3 RAM 干预 4 周后，TRPC3 mRNA 显著减少($P<0.001$)。各组 TRPC3 mRNA/GAPDH 灰度值见表 3。

2.3 TRPC3 的免疫印迹结果

图 2 为 TRPC3 Western blot 结果，将 3 组的蛋白提取液进行实验，在相对分子量 84 kDa 处可以见到清晰的蛋白条带。3 组均有 TRPC3 的表达，SHR 组 TRPC3 蛋白的表达高于 WKY 组($P<0.001$)，而雷米普利组 TRPC3 蛋白较 SHR 组显

表 1 TRPC3、TRPC6 及 GAPDH 的引物序列

上游引物	下游引物	产物大小(bp)
trpc3 5'-ctggcacaaatgtgggcaata-3' (NM_021771)	5'-gcgttcgcggatgagaaggtagg-3'	443
GAPDH 5'-acggcaaattcaacggcacagtca-3' (NM_017008)	5'-tgggggcatcggcagaagg-3'	231

表 2 LVMI 及 CVF 的改变($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	LVMI(mg/g)	CVF	
		Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原
SHR-RAM 组	2.42 ± 0.04*	3.24 ± 0.23*	4.99 ± 0.1*
SHR 组	3.09 ± 0.21*	7.69 ± 0.32*	11.88 ± 0.23*
WKY 组	2.09 ± 0.17	2.98 ± 0.09	1.53 ± 0.09

注:与 WKY 组比较,*P<0.001;与 SHR 组比较,*P<0.001



图 1 TRPC3 扩增结果

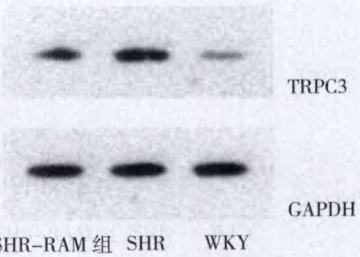


图 2 Western blot 检测各组心肌细胞 TRPC3 蛋白的表达

表 3 TRPC3 mRNA 及蛋白表达的改变($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	mRNA	蛋白
SHR-RAM 组	0.79 ± 0.01*	0.57 ± 0.01*
SHR 组	1.39 ± 0.08*	0.93 ± 0.09*
WKY 组	0.47 ± 0.02	0.21 ± 0.03

注:与 WKY 组比较,*P<0.001;与 SHR 组比较,*P<0.001

著降低(P<0.001)。各组 TRPC3 蛋白 /GAPDH 的比值见表 3。

3 讨 论

ECM 在维持心脏正常组织结构和功能,细胞的生长分化中起到重要的作用。各种原因引起的心肌纤维化使 ECM 含量增加,结构和成分发生改变。心肌纤维化使心室顺应性降低,舒张期充盈受限;影响心肌组织的电传播,增加心肌组织兴奋的离散度,容易发生恶性心律失常。本研究采用 SHR 为动物模型,从 SHR 发病机制、高血压心血管并发症、外周血管阻力的变化及对盐敏感性等多发面来看,均与人类高血压相似, 因此 SHR 是目前国际公认的最接近于人类原发性高血压的动物模型。高血压是后负荷增加,引起压力介导的心肌纤维化。在本实验中,在给予 RAM 组干预 4 周后,RAM 组大鼠 LVMI、Ⅰ、Ⅲ型 CVF 等反应心肌纤维化的指标均较安慰剂组明显降低,提示 RAM 在一定程度上可以抑制 SHR 心肌纤维化的发生发展。

近来多项研究显示 TRPC 亚族参与了多种心血管疾病的病理生理过程。Bush 等研究发现 SHR,胸主动脉缩窄大鼠及去甲肾上腺素刺激的大鼠心脏 TRPC3 蛋白表达明显增加[1]。心脏低水平过表达 TRPC3 的转基因小鼠出现心肌肥厚,高水平过表达 TRPC3 的小鼠心脏重量明显增加,存活率降低[2]。因此,TRPC3 介导的细胞内钙离子浓度的改变在心肌细胞肥大的病理生理过程中发挥重要作用。用 ET-1[3]、钙神经素或过度压力负荷刺激小鼠和人的心肌细胞,瞬时感受器阳离子通道 C6(Canonical transient potential receptor channel 6,TRPC 6)蛋白表达显著上调,特别是在 TRPC6 过表达的转基因小鼠中,伴随着活化性 T 细胞核因子刺激的肌球蛋白重链的表达增加[4]。Liu 等[5]率先在 SHR 大鼠单核细胞中发现TRPC3 的表达增加。后又发现 SHR 大鼠血管平滑肌 TRPC3 表达上调,siRNA 靶向抑制 TRPC3 表达可减少 AngⅡ诱导的钙内流[6]。

鉴于 TRPC3 是 TRPC 亚家族中的核心成员,且在目前的研究中,作为广泛采用的研究对象,本研究也将 TRPC3 作为研究对象。TRPC 通道可被磷脂酶 C 信号通路激活开放,因此被认为是最可能的钙库操纵性钙通道和受体操纵性钙通道的分子基础[7,8]。心肌肥厚是心肌细胞的肥大及心肌纤维化共同作用的结果,我们上一阶段的研究已经正式 TRPC3 参与了心肌细胞肥大的病理生理过程,本实验中,我们继续前面

的研究,探讨 TRPC3 在心肌纤维化发生发展中的作用。本研究结果显示:SHR 组 TRPC3 mRNA 表达水平显著高于 WKY 组,蛋白表达较 WKY 组显著增加 77.42%($P<0.05$)。Kiselyov[9] 通过研究证实了 TRPC3 钙库依赖性的激活机制,提示 TRPC3 可能是钙库调控钙离子通道。TRPC3 作为 TRPC 亚家族中重要的一员,具有较小的电导,短暂(<1 ms)的单通道开放,双向整流等特性[10],因此可以传递长时程的钙离子信号,参与细胞增殖、凋亡等过程。TRPC3 过表达可能通过介导钙库操纵的钙离子通道的开放,引起细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加,从而激活钙神经磷酸酶信号通路引起心肌纤维化的发生。最新研究采用表达显性失活的 TRPC3、TRPC6、TRPC4 基因的转基因小鼠证实阻滞 TRPC3/6/7 及 TRPC4/5 亚家族的活性能减弱了神经内分泌激动剂及压力负荷过重导致的心肌肥厚,且是通过抑制钙神经素 - 活化性 T 细胞核因子信号通路的活性来发挥作用[11]。

在本研究中,给予 RAM 干预 4 周后,SHR 大鼠心脏中的 TRPC3 基因表达显著减,同时蛋白表达也显著减少38.71%($P<0.05$)。血管紧张素转换酶抑制剂 RAM,可能通过减少血管紧张表Ⅱ受体激活的 SOCE,减少血管紧张素Ⅱ诱导的钙离子内流,降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,抑制心肌纤维化的发生。

TRPC 作为 TRP 家族中的重要一员,在心血管系统中的作用的研究才刚刚起步。TRPC 可能是受体激活的钙通道的实体结构,使其具有广阔的研究前景。本研究采用单药 RAM 干预 SHR 模型心肌纤维化的发生发展,研究结果显示 SHR心肌纤维化指标及 TRPC3 基因和蛋白的表达显著高于 WKY,而 RAM 可以显著降低心肌纤维化指标,同时减少 TRPC3 基因及蛋白的表达,进一步证实了 TRPC3 蛋白表达的增加可能是导致心肌纤维化的细胞内 Ca^{2+} 浓度增加的离子通道基础,而血管紧张素转换酶抑制剂 RAM 可能通过减少 TRPC3 蛋白的表达,减少心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度,减轻钙超载,抑制心肌纤维化的发生。同时,本研究还提示 TRPC 作为新的药物靶点,寻找非电压门控性的 TRPC 离子通道特异性的激活剂和阻断剂具有重要的现实意义和广阔的发展前景,将为多种心血管疾病治疗的开拓新的思路,提供新的治疗途径。

参 考 文 献

[1] Bush E W, Hood D B, Papst P J, et al. Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling[J]. Biol Chem, 2006, 281(44): 33487-33496.

[2] Nakayama H, Wilkin B J, Bodi I, et al. Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart[J]. FASEB, 2006, 20(10): 1660-1670.

[3] Nishida M, Onohara N, Sato Y, et al. G α 12/13-mediated Up-regulation of TRPC6 negatively regulates endothelin-1-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through nuclear factor of activated T cells activation[J]. Biol Chem, 2007, 282(32): 23117-23128.

[4] K Kuwahara Y, Wang J, McAnally J A, et al. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling[J]. Clin Invest, 2006, 116(12): 3114-3126.

[5] Liu D, Scholze A, Zhu Z, et al. Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats[J]. Hypertens, 2005, 18(11): 1503-1507.

[6] Liu D Y, Yang D C, He H B, et al. Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats[J]. Hypertension, 2009, 53(1): 70-76.

[7] Plant T D, Schaefer M. TRPC4 and TRPC5: receptor-operated Ca^{2+}-Permeable nonselective cation channels cell calcium[J]. 2003, 33 (5-6): 441-450.

[8] Ambudkar I S, Brazer S C, Liu X, et al. Plasma membrane localization of TRPC channels: role of caveolar lipid rafts[J]. Novartis Found SymP, 2004, 258(4): 63-70.

[9] Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, et al. The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels[J]. Mol Cell, 1999, 4(3): 423-429.

[10] Hoffman T, Obukhov A G, Schaefer M, et al. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol[J]. Nature, 1999, 397 (6716): 259-263.

[11] Wu X, Eder P, Chang B J, et al. TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(15): 7000-7005.

(责任编辑:张学颖)