基础研究 文章编号：0253-3626(2009)02-0164-04

辛伐他汀抑制心肌梗死后大鼠心肌细胞肥大与 RhoA 激酶关系

黄纪卫[1]，覃 数[2]，李向东[2]，张冬颖[2]

（1. 四川省自贡市第一人民医院心内科，自贡 643000；2. 重庆医科大学附属第一医院心内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察辛伐他汀对心肌梗死后大鼠心肌细胞肥大的抑制作用，探讨小 G 蛋白 RhoA 激酶（RhoA kinase，ROCK）在辛伐他汀调控心肌细胞肥大中的信号转导作用。方法：雄性 Wistar 大鼠，分为 4 组，每组 8 只。结扎冠状动脉左前降支，建立心肌梗死模型。假手术组（SHAM 组）和梗死组（MI 组）予生理盐水 1 ml/d 灌胃。辛伐他汀组（SIM 组）予辛伐他汀 40 mg/(kg·d)灌胃。Fasudil 组（F 组）予特异性 ROCK 抑制剂 Fasudil 7.5 mg/kg，bid 腹腔注射。术后 28 d，测定大鼠左室重量指数，心肌细胞横断面积，RT-PCR 检测 ROCK mRNA 表达，免疫组化和 Western-Blot 检测 ROCK 活性标志物－磷酸化 ERM（Phospho-ERM）蛋白表达水平。结果：术后 28 d，MI 组大鼠心肌左室重量指数，心肌细胞表面积，ROCK mRNA 表达水平以及 Phospho-ERM 蛋白表达水平较 SHAM 组明显增高，SIM 组和 F 组前述各项检测指标均较 MI 组显著降低。结论：辛伐他汀能抑制心梗后心肌细胞肥大，其作用机制可能与他汀抑制 ROCK 途径有关。

【关键词】心肌梗死；心肌细胞肥大；辛伐他汀；RhoA 激酶

【中国图书分类法分类号】R34；R541.4；R972.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-04

Simvastatin prevents rat cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction via RhoA kinase

HUANG Ji-wei, et al

(*Department of Cardiology, the First People's Hospital of Zigong*)

【Abstract】*Objective*: To study the inhibition effects of simvastatin on cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction, and to investigate whether simvastatin prevents cardiac hypertrophy through attenuation of RhoA kinase. *Methods*: Male Wistar rats were divided into four groups(n=8). Myocardial infarction model was established by ligation of left anterior descending coronary artery. Sham operation group (SHAM group) and myocardidal infarction group(MI group) were gavaged with 0.9% NaCl 1ml/day, Simvastatin group (SIM group) was gavaged with simvastatin 40 mg/(kg·d). Fasudil group (F group) was injected with fasudil 7.5mg/(kg·bid) through peritoneum. At the time point of 28 ds, the ratio of LV weight to body weight (LVW/BW) and the cross-sectional area of cardiomyocytes were measured. The mRNA expression level of ROCK was detected by RT-PCR. The expression level of Phosphorylated-ERM was detected by immunohistochemistry and Western blot. *Results*: 28ds after MI, the LVW/BW, the cross-sectional area of cardiomyocytes, the mRNA expression level of ROCK and the expression level of Phosphorylated-ERM significantly increased in the MI group compared with those in the SHAM group. And the indexes mentioned above significantly decreased both in the SIM group and F group compared with those in the MI group. *Conclusion*: Simvastatin prevents post-infarcted cardiomyocyte hypertrophy partly through inhibition of ROCK.

【Key words】Myocardial infarction; Cardiac hypertrophy; Simvastatin; RhoA kinase

心肌细胞肥大是心脏对导致其前后负荷增加的各种病理性刺激的代偿反应之一，是一个渐进而复杂的过程。早期的肥大对维持心脏功能具有代偿意义。但随着病程演变，则成为心力衰竭和猝死的重要危险因素。

小 G 蛋白超家族，尤其是其亚家族成员 RhoA 及其激酶 ROCK 在调节心脏结构和功能方面发挥着重要的作用[1]。近年来，关于他汀类药物多效性的报道主要集中在对小 G 蛋白的调节。有研究显示，罗苏伐他汀能够抑制 RhoA 活性，减少大鼠心肌缺血再灌注损伤[2]，辛伐他汀与阿托伐他汀均能够抑制佛波酯诱导的隐静脉平滑肌细胞 ROCK 活性的增

作者介绍：黄纪卫（1982- ），男，住院医师，硕士，研究方向：心肌肥大的分子生物学机制。

通讯作者：张冬颖，女，主治医师，E-mail: zdy.chris@gmail.com。

基金项目：重庆市自然科学基金[渝发科技字(2004)54 号文]。

加[3]。但该作用机制是否与他汀改善心肌梗死后心肌细胞肥大有关，尚未见相关的研究报道。本研究旨在探讨辛伐他汀对心肌梗死后大鼠心肌细胞肥大的作用，以及与 ROCK 的关系，为心肌肥大的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Wistar 雄性大鼠（202 ± 14）g，重庆医科大学动物实验中心提供；辛伐他汀（美国默沙东公司，批号：07317），法舒地尔（天津红日药业公司，批号：070212），RNA 抽提试剂 BIOZOL 及 RT-PCR 试剂盒（日本 BioFlux 公司），Phospho-Ezrin/Radixin/Moesin 兔抗鼠多克隆抗体（美国 Cell Signaling 公司），β-tubulin 兔抗鼠多克隆抗体和辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体（美国 Santa Cruz 公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立与分组 采用冠状动脉左前降支结扎法建立大鼠心肌梗死模型。假手术组只穿针不结扎。术后存活大鼠分为 4 组，每组 8 只。术后第 2 d 开始用药。(1)假手术组（SHAM 组）；(2)梗死组（MI 组）；(3)辛伐他汀组（SIM 组），予辛伐他汀 40 mg/(kg·d)灌胃；(4)特异性 ROCK 抑制剂法舒地尔组（F 组），予法舒地尔 7.5 mg/kg，bid 腹腔注射。SHAM 组和 MI 组予生理盐水 1 ml/d 灌胃。

1.2.2 标本留置 于术后 28 d，腹腔麻醉，开胸取出心脏，剪除左右心房，大血管及附着的结缔组织，称取左心室（LVW）（游离壁＋室间隔）重量，左室非梗死区于冠状位切取厚度 2~3 mm 的左室切面，40 g/L 甲醛固定，石蜡包埋切片，HE 染色。剩余心肌组织 -80℃冷冻保存。

1.2.3 形态学检测 按 Nozato 所用方法[4]，测量 100 个心肌细胞横断面积（9、10 个视野），取其平均值。

1.2.4 RT-PCR 检测心肌组织 ROCK mRNA 表达 ①100 mg 左右心肌组织，加入 1∶1000 BIOZOL 试剂匀浆，提取组织总 RNA。②引物合成（北京赛百胜公司）与引物序列：ROCK（277bp）正义链 5' TTCATGTCCGACCTGTTACTC 3'，反义链 5' ATGTGGCATCTACTGCACTCT 3'；β-actin（398bp）正义链 5'CTGCCGCATCCTCTTCCTC 3'，反义链 5'CTCCTGCTTGCTGATCCACAT 3'；③RT 反应条件：50℃45 min，95℃5 min，0℃5 min。④PCR 反应条件：94℃3min，94℃30 s，56℃30 s，72℃50 s，30 循环。BIO-RAD 凝胶成像仪采集图片，Quantity One 系统图像分析。以目的条带与 β-actin 扩增条带吸光面积积分比值评定指标 mRNA 表达水平。

1.2.5 Western blot 检测心肌组织磷酸化 ERM（Phospho-ERM）家族蛋白表达 ERM（ezrin，radixin，andmoesin）蛋白是 ROCK 作用底物，Phospho-ERM 蛋白表达水平高低可做为 ROCK 活性的判断标准[5]。100 mg 左右左室心肌组织加入 1ml 蛋白裂解液，提取蛋白，Bradford 法测定蛋白浓度。5%浓缩胶 40 V 衡压 1 h，10%分离胶衡压 60 V，电转 14 V 衡压 14 h，37℃摇床封闭 2 h，Phospho-ERM 兔抗鼠抗体 1∶800，37℃摇床孵育 2 h，TBST 洗膜 5 min×4 次，山羊抗兔抗体 1∶700，37℃摇床孵育 1.5 h，TBST 洗膜 5 min×4 次。二甲基联苯胺（DAB）显色。Quantity one 图像分析。目的条带与 β-tubulin 条带吸光面积积分比值评定蛋白表达水平。

1.2.6 免疫组化检测心肌组织磷酸化 ERM 蛋白表达 40 g/L 中性甲醛液固定 24 h，石蜡包埋。连续切片 3 μm 厚，30 ml/L H_2O_2 室温 10 min 灭活内源性过氧化物酶。PBS 浸泡 5 min，95℃10 min 抗原活性修复，50 ml/L 血清封闭，Phospho-ERM 兔抗鼠抗体 1∶50，4℃孵育 12 h。PBS 冲洗 5 min×3 次。山羊抗兔二抗 1∶200，37℃孵育 60 min，PBS 冲洗 5 min×3 次，DAB 显色。苏木素复染 30 s，酒精梯度脱水封片。分析 AIOD 值（阳性积分光密度/管壁面积）。

1.2.7 统计学处理 计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，SAS 8.2 版统计分析软件，组间比较采用方差分析，两两比较采用 SNK-q 检验方法，$P<0.05$ 判定差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 光镜下 HE 染色

SHAM 组非梗死区心肌细胞排列整齐，结构清楚；MI 组非梗死区心肌细胞肥大，心肌细胞间隙增宽，可见散在出血灶；SIM 组及 F 组非梗死区心肌细胞未见明显肥大。见图 1~4。

2.2 心肌细胞肥大指标测定

以左室重量指数（LVW/BW）和 100 个心肌细胞横断面积作为心肌细胞肥大指标。检测显示，MI 组心肌细胞肥大指标较 SHAM 组明显增高（$P<0.05$），SIM 组和 F 组心肌细胞肥大指标均较 MI 组明显降低（$P<0.05$），SIM 组和 F 组心肌细胞肥大指标与 SHAM 组相比，无明显差异（$P>0.05$）。见表 1。

2.3 心肌细胞 ROCK mRNA 表达水平

RT-PCR 检测非梗死区心肌 ROCK mRNA 表达情况。MI 组 ROCK mRNA 表达较 SHAM 组明显增高（$P<0.05$），SIM 组和 F 组 ROCK mRNA 表达均较 MI 组明显降低（$P<0.05$），SIM 组和 F 组 ROCK mRNA 表达与 SHAM 组相比，无明显差异（$P>0.05$）。见图 5、表 2。

2.4 心肌细胞 Phospho-ERM 蛋白表达水平

免疫组化和 western blot 检测 Phospho-ERM 蛋白表达情况。MI 组 Phospho-ERM 蛋白表达较 SHAM 组明显升高（$P<0.05$），SIM 组和 F 组 Phos-

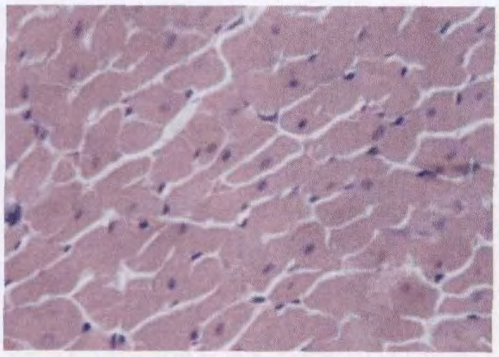


图 1　SHAM 组 HE 染色(×400)

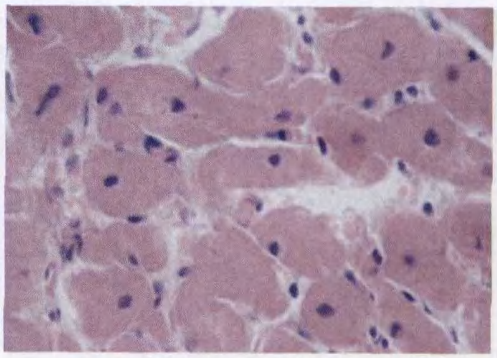


图 2　MI 组 HE 染色(×400)

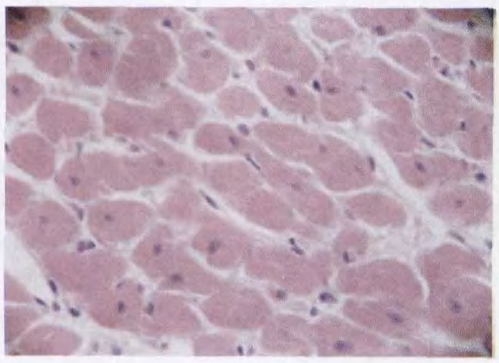


图 3　SIM 组 HE 染色(×400)

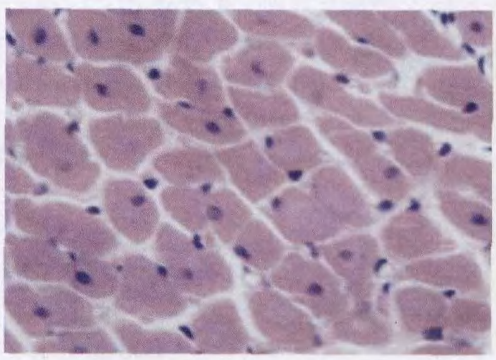


图 4　F 组 HE 染色(×400)

表 1　各组大鼠心肌细胞肥大指标比较($\bar{x}\pm s$)

	SHAM 组	MI 组	SIM 组	*F* 组
心肌细胞横断面积（μm^2）	1 029 784 ± 638 93	2 427 208 ± 215 642[a]	1 468 527 ± 124 910[b,c]	1 505 051 ± 108 448[b,c]
LVW/BW (*mg/g*)	1.69 ± 0.11	2.29 ± 0.18[a]	1.79 ± 0.06 [b,c]	1.89 ± 0.15[b,c]

注：[a] $P<0.05$，与 SHAM 组比较；[b] $P<0.05$，与 MI 组比较；[c] $P>0.05$，与 SHAM 组比较

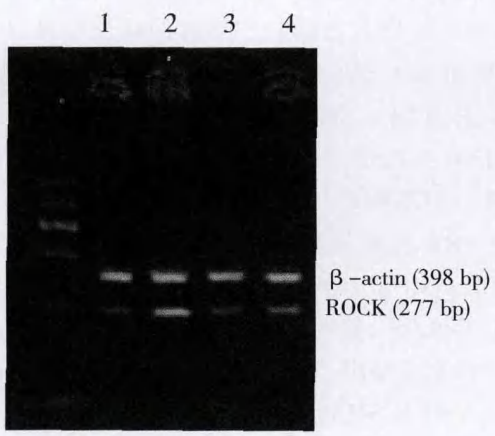


图 5　各组大鼠心肌细胞 ROCK mRNA 表达

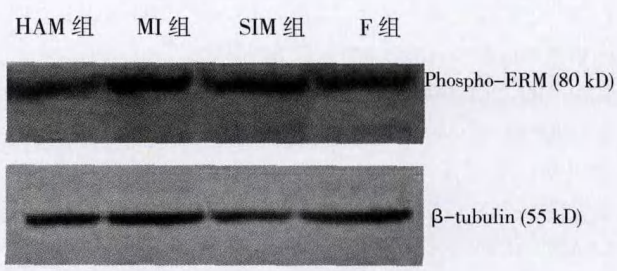


图 6　Weston-blot 检测 Phospho-ERM 蛋白表达水平

pho-ERM 蛋白表达均较 MI 组明显降低($P<0.05$)，SIM 组和 F 组 Phospho-ERM 与 SHAM 组相比，差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 6、表 2。

3　讨　论

心肌肥大可明显增加心力衰竭及恶性心律失常的发生率，研究阻断心肌细胞肥大的分子机制具有重要临床意义。

近年来，关于小 G 蛋白 RhoA 及其激酶 ROCK 和心肌细胞肥大关系的研究越来越多。Asad 等[6]报道，

表 2 外迁移民和当地居民 SCL-90 各因子比较($\bar{x}\pm s$)

	SHAM 组	MI 组	SIM 组	F 组
ROCK mRNA 吸光面积 积分比值	0.618 25 ± 0.036 2	0.865 75 ± 0.040 5[a]	0.632 75 ± 0.022 2[b,c]	0.650 0 ± 0.044 4[b,c]
Phospho-ERM AIOD 值	0.004 1 ± 0.001 0	0.012 2 ± 0.004 0[a]	0.005 6 ± 0.001 6[b,c]	0.006 0 ± 0.002 5[b,c]
Phospho-ERM 蛋白吸光 面积积分比值	0.885 3 ± 0.051 5	1.203 9 ± 0.061 6[a]	0.925 7 ± 0.055 4[b,c]	0.945 9 ± 0.035 1[b,c]

[a]:$P<0.05$,与 SHAM 组比较;[b]:$P<0.05$,与 MI 组比较;[c]:$P>0.05$,与 SHAM 组比较

在来普汀所诱导大鼠心肌细胞肥大模型中,RhoA 活性明显增高,而特异性 RhoA 抑制剂 C3 外切酶能显著降低心肌细胞肥大。Mita 等[7]证实,盐敏感性高血压大鼠模型中,ROCK 特异性抑制剂 Y-27632 能够显著降低左室心肌细胞肥大,并且改善左室功能。本实验发现,特异性 ROCK 抑制剂法舒地尔,能使 ROCK mRNA 表达和蛋白活性同时降低,并能延缓 MI 后大鼠心肌细胞肥大。从而证实 RhoA 及其激酶 ROCK 是心肌细胞肥大信号转导通路中的重要环节,抑制 RhoA 及其激酶 ROCK,能减轻心肌细胞肥大。有研究提示:RhoA/ROCK 可能通过激活胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)-锌指转录因子(GATA)通路促进心肌细胞肥大[8]。也有研究认为,RhoA/ROCK 部分通过降低内源性一氧化氮合酶表达,减少一氧化氮生成,从而发挥抗心肌肥大作用[7]。

RhoA 属于小 G 蛋白超家族,需要 FPP(Farnesyl pyrophosphate)和 GGPP (Gerany 1 gerany 1 pyrophosphate) 介导的异戊二烯化修饰才能被激活, 进而活化其特异性激酶 ROCK,发挥作用。FPP 和 GGPP 是甲羟戊酸通路中产生的重要类异戊二烯中间体,他汀对胆固醇合成限速酶的抑制阻断了甲羟戊酸的生成,同时也阻断了 FPP 和 GGPP 的产生,这两者是许多蛋白质,包括小 G 蛋白翻译后修饰的重要脂质附件。这正是他汀多效性的理论基础[9]。我们的前期试验已经证实他汀能够逆转心肌梗死后心室重塑,且与降脂作用无关[10,11]。本实验发现,SIM 组 ROCK mRNA 表达减少,活性降低,提示他汀能够在转录和转录后水平抑制 ROCK 的表达,阻碍其作用发挥。表明辛伐他汀能够减轻 MI 大鼠心肌细胞肥大,这种有利的作用至少部分通过抑制 ROCK 途径实现,但其详细机制仍需进一步研究。

本研究证实辛伐他汀能够下调 ROCK 基因表达和活性,抑制心肌梗死后心肌细胞的肥大进程,这为研究他汀类药物对心肌肥大的抑制作用提供了新依据。

参 考 文 献

[1] Brown J H, Del R, Mark A, et al. The rac and rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits[J]. Circulation Research, 2006, 98(6): 730-742.

[2] Aliaksandr B, Joy R, Ulf H, et al. Cardioprotective effect of rosuvastatin in vivo is dependent on inhibition of geranylgeranyl pyrophosphate and altered rhoA membrane translocation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(6): 3158-3163.

[3] Neil A, Turner D J, O'Regan S, et al. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA level[J]. FASEB J, 2005, 19(7): 804-806.

[4] Nozato T, Ito H, Tamamori M, et al. G1 cyclins are involved in the mechanism of cardiac myocyte hypertrophy induced by angiotensin II[J]. Japanese Circulation Journal, 2000, 64(8): 595-601.

[5] Midoriko H, Hiroaki S, Tsuyoshi H, et al. Long-term inhibition of rho-kinase suppresses angiotensin II - induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system[J]. Circulation Research, 2003, 93(8): 767-775.

[6] Asad Z, Sabzali J, Morris K, et al. Role of rho-mediated processes and intactactin cytoskeleton in leptin induced cardiomyocytes hypertrophy [J]. The FASEB Journal, 2006, 20(3): 691-697.

[7] Mita S, Kobayashi N, Yoshida K, et al. Cardioprotective mechanisms of rho-kinase inhibition associated with eNOS and oxidative stress-LOX-1 pathway in Dahl salt-sensitive hypertensive rats[J]. J Hypertens, 2005, 23(1): 87-96.

[8] Tetsuhiko Y, Koji H, Hiromichi W, et al. Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy[J]. The journal of biological chemistry, 2002, 277(10): 8618-8625.

[9] Rikitake Y, Liao, James K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide[J]. Circulating Research, 2005, 97(12): 1232-1235.

[10] 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.

[11] 袁侨英,覃 数,司良毅.辛伐他汀对急性心肌梗然死大鼠 RhoA 表达及心室重型的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1170-1172.

(责任编辑:冉明会)