维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)01-0047-03

结缔组织生长因子在大鼠心肌梗死后心肌间质重塑中表达的研究

顾永林，马康华，罗素新

（重庆医科大学附属第一医院心内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨心肌梗死后心肌间质重塑中结缔组织生长因子（CTGF）在心肌组织的表达，以进一步探讨心肌重塑的分子机制。方法：SD 大鼠 24 只，随机分为假手术组和心肌梗死组，结扎左冠状动脉前降支建立大鼠心肌梗死后心肌间质重塑模型，假手术组不结扎左冠状动脉，均观察 8w。用生物化学方法测定心肌组织胶原蛋白含量以了解心肌间质重塑。用免疫组织化学染色法进行检测分析 CTGF 表达的变化。用 RT-PCR 方法检测 CTGF mRNA 表达的变化。结果：心肌梗死组 CTGF 蛋白和 mRNA 表达增强，与假手术组比较有显著性差异（$P<0.05$）。结论：CTGF 与心肌梗死后心肌间质重塑有关，其可能参与心肌梗死后心力衰竭的发展，影响患者预后。

【关键词】结缔组织生长因子；心肌梗死；间质重塑

【中国图书分类法分类号】R542.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-12-29

Research on expression of CTGF in myocardial interstitial remodeling in infracted rat model

GU Yonglin, et al

(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To discuss the expression of CTGF in myocardial tissue during myocardial remodeling and to understand the molecular mechanism of myocardial remodeling after myocardial infarction. *Methods*: Twenty four SD rats were randomly divided into two groups sham group and infracted group. In infracted group left anterior descending coronary artery was ligated for 8 weeks but not in sham group. Collagen protein of myocardial tissue was tested with chemistry to understand myocardial interstitial remodeling. CTGF protein were studied with immunohistochemistry analysis. CTGF mRNA expression was tested by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Results*: Expressions of CTGF protein and mRNA were significantly enhanced($P<0.05$) in infracted group, as compared with those in sham group. *Conclusion*: CTGF relates to myocardial interstitial remodeling after myocardial infarction, which may be associated with the development of CHF and prognosis of myocardial infarction.

【Key words】 Connective tissue growth factor; Myocardial infarction; Myocardial interstitial remodeling

心肌梗死（MI）后梗死区心肌细胞坏死、凋亡、纤维化及非梗死区心肌细胞肥大、成纤维细胞增殖、间质胶原沉积，这种心脏结构的变化即左室重塑（LVRM）。LVRM 是影响心肌梗死后预后的重要因素，但其确切的分子机制还不十分清楚。CTGF 是近年发现的一种新的致纤维化生长因子，是多种组织器官纤维化形成过程中的重要介质，CTGF 能促使Ⅰ型、Ⅲ型胶原及纤维连接蛋白的合成。本实验用大鼠急性心肌梗死模型，观察其在左室心肌重塑中的表达变化，并探讨其参与心肌间质重塑可能的作用机制，为逆转心室重塑提供实验依据。

作者介绍：顾永林（1972- ），男，住院医师，硕士，主要研究方向：冠心病的诊断和治疗。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 大鼠 24 只，由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供，雌雄不拘 3~4 个月龄，体重为（240±30）g。

1.2 试剂

总 RNA 提取试剂盒 TRIZOL，M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒，PCR 扩增试剂盒，均购自上海生工生物工程技术有限公司；兔抗大鼠 CTGF 抗体购自武汉博士德生物工程技术

维普资讯 http://www.cqvip.com

有限公司;SP 免疫组化染色试剂盒购自中山生物技术有限公司;考马斯亮兰蛋白测定试剂盒和羟脯氨酸测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;CTGF 引物上游序列 5′-CTAAGACCTGTGGCATGCGC-3′ 下游序列 5′-CTCAAA-GATGTCATTGTCCCC-3′(383bp)由上海生物工程技术公司合成。

1.3 动物模型制作和实验分组

SD 大鼠 24 只,随机分为 2 组,每组 12 只。组 1 为假手术组;组 2 为心肌梗死组。采用 3.5% 水合氯醛 10ml/kg 体重腹腔注射麻醉,气管切开插管,左侧胸骨旁开胸暴露心脏,在左心耳下缘与肺动脉圆锥间距主动脉根部 3mm 处缝扎左冠状动脉前降支,心电图监测出现 2 个以上肢体导联 QRS 波宽大、振幅增高,持续 30min 为结扎成功[6]。假手术组不结扎冠状动脉。术后 8w 处死动物,在梗死区与正常组织交界处取材 2 块,留做 RT-PCR 的标本放置在液氮中,后置入 -80℃ 低温冰箱保存,留做免疫组化的标本用福尔马林固定。

1.4 心肌组织总蛋白和羟脯氨酸测定

按照试剂盒说明书操作步骤,用考马斯亮兰蛋白测定法测定心肌组织总蛋白,用羟脯氨酸测定试剂盒测定心肌组织羟脯氨酸含量,了解心肌组织胶原蛋白含量。

1.5 免疫组织化学染色

(1)心肌组织块常规福尔马林固定,石蜡包埋切片,切片厚度为 4μm,常规脱蜡至水;(2)新鲜配制的 3% 过氧化氢孵育 10min,蒸馏水冲洗 3min 3 次(3)抗原修复:采用微波炉热修复 5min 左右;(4)正常山羊血清室温下孵育 20 min,甩掉多余血清;(5)加入兔抗鼠 CTGF 抗原一抗,4℃冰箱过夜,PBS 冲洗 5min 3 次;(6)滴加羊抗兔 IgG 二抗,37℃ 孵育 40min,PBS 冲洗 5min 3 次;(7)滴加 SP 液 37℃ 孵育 40min,PBS 冲洗 5min 3 次;(8)DAB 显色试剂盒显色,显微镜下观察效果明显后苏木素复染 3 min,烤箱烘干,脱水透明,中性树胶封片。(9)将封片在显微镜下观察,CTGF 蛋白表达阳性者,免疫组织化学染色结果为棕黄色,表达越多显色越深。

1.6 RT-PCR

用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,其纯度在 OD260nm 和 OD280nm 比值 >2.0 的样品进一步实验。(1)RT:总 RNA 5μl,$Oligo(dT)_{18}$ 引物 1μl,无 RNase 双蒸水数 μl,使总体积为 12μl,70℃ 5min,冰上骤冷;加入 5×reaction buffer 4μl,10mm dNTP Mix 2μl,Rnase Inhibitor 20U,37℃ 5min;再加 M-MuLV 20U,37℃ 60min,70℃ 10min,冰上骤冷。(2)PCR:RT 产物 1μl,2mm dNTP 2.5μl,10×PCR 缓冲液 2.5μl,$MgCl_2$ 2.5mm,TaqDNA 聚合酶 2.5u,上、下游引物各 100 pmol/L,无 RNase 双蒸水数 μl,使总体积为 25μl。94℃ 5min 预变性,94℃ 40s,55℃ 40s,72℃ 30s,35 个循环,72℃ 10min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 统计学处理

测定数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SAS8.0 统计软件分析,当 $P<0.05$ 时为有显著性差异。

2 结 果

2.1 心肌组织羟脯氨酸含量

羟脯氨酸在假手术组心肌含量正常,在梗死组心肌中含量增加,两组比较具有显著差异($P<0.05$,表 1)

表 1 两组大鼠心肌羟脯氨酸含量($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

	羟脯氨酸含量(ng/mg)	P 值
假手术组	3.61 ± 0.92	<0.05
梗死组	5.62 ± 2.54	

2.2 心肌 CTGF 蛋白的表达

免疫组织化学染色结果显示,CTGF 蛋白在假手术组心肌表达极少,梗死 8w 时在梗死区心肌细胞和成纤维细胞的细胞浆内显著表达,在非梗死区心肌细胞胞浆内也有明显表达,与假手术组比较均具有显著差异;结果如下图所示。



图 1 假手术组 CTGF IHC 结果×100

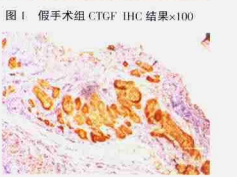


图 2 手术组梗死区 CTGF IHC 结果×100

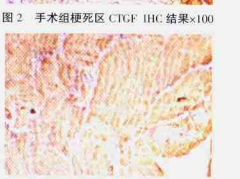


图 3 手术组非梗死区 CTGF IHC 结果×100

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 心肌 CTGF 表达的变化

RT-PCR 结果显示，心肌 CTGF mRNA 在假手术组无表达，梗死后 8w 在心肌组织明显表达。

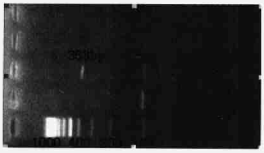


图 4 手术组 CTGF RT-PCR 凝胶电泳结果

3 讨 论

3.1 心肌梗死后存在心肌间质重塑

羟脯氨酸是组成机体胶原蛋白的一种特有的氨基酸，除弹性蛋白含少量羟脯氨酸外，几乎所有羟脯氨酸都存在于胶原中，胶原是心肌间质重塑时细胞间质的主要成分，心肌梗死后胶原的量和性质发生改变，故心肌组织中羟脯氨酸含量能反映心肌间质重塑的程度。本实验研究表明，心肌梗死组羟脯氨酸含量明显增加，非梗死组正常，表明心肌梗死后存在心肌间质重塑。

3.2 CTGF 参与心肌梗死后心肌间质重塑

心肌梗死后心肌细胞数量减少、结构紊乱、心肌纤维破坏；非梗死区心肌细胞代偿性肥大增生、间质纤维增生，左室重量指数与右室重量指数均明显增加，表明心肌梗死后心脏各个部分均发生重塑[2]，这是多种心肌损伤的共同结局。心肌梗死后心肌间质重塑包括梗死区心肌替代性纤维化和非梗死区反应性纤维化，在此基础上心腔扩张与心脏重量增加，降低心室壁的顺应性，舒张和收缩功能受到损害，发展成为难治性心力衰竭[3]，同时影响心肌细胞力的产生和传递，影响心肌组织电传播，增加心肌组织电兴奋的离散度，易产生室性心律失常[4]。结缔组织生长因子（CTGF）是一种富含半胱氨酸的分泌性多肽，分子量为 36~38KD，是近年发现的一种新的致纤维化生长因子。它可促进细胞的粘附、增生和细胞外基质形成。现有研究表明，它与多种组织，器官纤维化形成有密切关系，在心血管疾病的发生发展中也起重要作用，与动脉粥样硬化，心肌梗死，高血压，血管形成有关[5,6]。本实验研究表明，心肌梗死后在梗死区与非梗死区 CTGF 蛋白，mRNA 均有显著表达，而在非梗死组几乎无表达，说明 CTGF 参与了心肌梗死后细胞外基质和纤维化的形成，在心室间质重构中起重要作用。在正常情况下 CTGF 表达水平很低，而且主要在间质细胞表达，其作用也限于结缔组织。Ohnishi 等[7]结扎大鼠左冠状动脉造成心肌梗死的动物模型，在结扎第 2，7 和 14 天梗死区 CTGF mRNA 分别增加 6，28 和 8 倍。结扎第 2 天 CTGF mRNA 定位于梗死边缘区的心肌细胞和间质细胞。第 7 天 CTGF mRNA 出现在梗死区中心，且周围有肉芽组织包绕，CTGF mRNA 表达与 α1（Ⅰ）胶原和 α1（Ⅲ）胶原 mRNA 信号表达位置一致，说明 CTGF 在梗死区引起胶原合成。CTGF 蛋白在第 2，7，14 天也显著增加，说明在心肌梗死区 CTGF 的表达增加，CTGF 在心肌梗死的病理过程中起重要作用。Chen 等[8]发现 CTGF mRNA 水平在心肌成纤维细胞中是心肌细胞中的 2 倍。用 TGF-β 处理人心肌成纤维细胞，CTGF mRNA 增加 2~3 倍，同时纤维连接蛋白增加 7 倍，纤溶酶原活性抑制物 -1 增加 3 倍。另外，用 cAMP 的刺激因子 forskolin 进行干预，发现 forskolin 以剂量依赖性方式显著抑制 CTGF 表达。同一浓度水平的 forskolin 使 TGF-β 诱导的 CTGF 水平下降 4 倍，而 CTGF 基础水平下降 6 倍，说明 CTGF 表达的调节是通过 TGF-β 依赖和非依赖两种机制进行的，成纤维细胞产生的内源性 TGF-β 可调节 CTGF 的基础水平。本实验研究表明，心肌梗死后 8 周大鼠心脏的左室梗死区和非梗死区羟脯氨酸含量、CTGF 蛋白和 mRNA 显著升高，进一步证实了 CTGF 表达在心肌梗死后心肌间质重塑中的作用。

CTGF 在不同细胞种类、不同病理生理阶段、体内与体外的不同实验条件下有着不同的作用，同时它还受多种其它致纤维化细胞因子和血管活性物质的影响等。有实验研究表明，AngⅡ能促使 CTGF mRNA 表达增高，且呈剂量依赖性[9]。而 AngⅡ是心肌梗死后心肌组织的重要激活因子，两者之间的机制、与心肌梗死后其它神经内分泌激活的关系有待于进一步深入研究。它可能作为心肌梗死的早期诊断指标之一及基因治疗中的靶基因，以逆转左室重塑，防止发展成难治性心力衰竭。

参 考 文 献

（下转第 131 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Andrulli A, Perri F, Annese V. Guidelines for treatment of acute pancreatitis[J]. Gut, 1999; 44:579-580.

[2] 刘又玲.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊断标准（草案）[J].中华结核和呼吸病杂志,2000; 23(4): 203.

[3] 王茂旭, 田伏洲, 李素芝, 等. 经内镜胆管引流术治疗急性胰腺炎[J]. 中国消化内科杂志, 1998;15 : 208.

[4] 陆仁达, 李能平, 周鸣清.早期 EST 治疗重症胰腺炎[J]. 肝胆外科学杂志, 1999; 11: 70.

[5] Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1996; 110:639-642.

[6] Mandell GL, Karl IE , Timmins HS, et al. Neutrophils and pentoxiofylline[J].Am Rev Respir Dis,1988;138:1103-1105.

[7] 钟 清, 甘 华, 杜晓刚,等. 连续性静脉－静脉血液滤过在重症胰腺炎治疗中的价值 [J]. 中华内科杂志, 2003;7: 483-485.

[8] 王锦权, 高玉华, 刘 宝,等. 连续性静脉血液滤过在 ICU 中的应用研究[J]. 中国血液净化, 2002; 4: 17-19.

[9] 刘长文, 秦宗和, 王海燕, 等. 早期呼吸机支持加床边血液滤过治疗急性重症胰腺炎合并急性肺损伤[J]. 中国呼吸与危重症监护杂志, 2003; 6: 343-345.

[10] 解力新,刘又宁.肺内源性急性呼吸窘迫综合征（ARDS）与外源性 ARDS [J]. 中华内科杂志, 2003; 42(7): 517-519.

[11] 杨廷旭,吴河山,王彩芝,等.重症急性胰腺炎并多脏器功能障碍综合征 62 例报告[J]. 中国基层医药, 2005;12(1):110-111.

（上接第 49 页）

[1] 覃 数,陈运贞. 大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点[J]. 重庆医科大学学报, 1998;23(1): 8-11.

[2] Kozlovskis PL, Gerdes AM, Smets M, et al. Regional increase in isolated myocyte volume in chronic myocardial infarction in rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 1991;23:1459-1466.

[3] Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network[J]. J Am Coll Cardiol, 1989;13:1637-1652.

[4] Anderson KP,Walker R, Urie P, et al. Myocardial electrical propagation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. J Clin invest, 1993;92:122-140.

[5] Chen MM, Lam A, Abraham JA, et al. CTGF expression is induced by TGF-? in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol[J], 2000;32:1805-1819.

[6] Ruperez, Lorenzo, Blanco-Colio, et al. Connective tissue Growth Factor is a Mediator of Angiotensin Ⅱ-Induced Fibrosis Circulation[J], 2003;108(12):1499-1505.

[7] Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, et al. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats[J]. J Mol Cell Cardial, 1998;30(11):2411-2422.

[8] 黄颂敏,刘 芳,刘小青. 血管紧张素Ⅱ及其受体拮抗剂在系膜细胞培养中对结缔组织生长因子表达的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2000;9(5):423.

（上接第 90 页）

观察耐药菌比例,与 MTB 菌株活菌量多少无关。但比例法由于操作繁琐、费时,所以我国至今还没有普遍应用。我国大部分地区都用绝对浓度法测定 MTB 药物敏感性，与国际推行的比例法有差别,标准也不一致,不便准确比较评价。比例法由于方法复杂,又不适用临床大量标本。杨立涛等[4]对比例法进行改良,将比例法接种 10^{-3}mg/ml、10^{-5}mg/ml 菌悬液 0.1ml 改为接种 10^{-2}mg/ml、10^{-4}mg/ml 菌悬液 0.1ml，观察显示药敏结果无差异。基础培养基上 MTB 不生长的数目、<50 个菌落的数目、污染的数目随菌液浓度的递减而增高。这表明菌液浓度越低,MTB 药敏试验成功率越低，菌液浓度越高其成功率越高[5]。

参 考 文 献

[1] 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志,1996;18(2):80-85.

[2] Bowends SE, Kurzynski TA, Norden MA, et al. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry[J]. J Clin Microbiol, 1996;34(6):1386-1390.

[3] 熊礼宽主编.结核病实验诊断学[J]. 第 1 版, 北京:人民卫生出版社, 2003;147-151.

[4] 刘宇红,姜广路,赵立平,等.第四次全国结核病流调分枝杆菌药敏试验的方法学探讨 [J]. 中国防痨杂志, 2003;25(1): 16-20.

[5] 杨立涛,张 莉,李爱华.结核菌药敏试验方法（比例法）改进的研究[J]. 预防医学情报杂志, 2000;16(4):18-20.