DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.016
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)03-0227-03

论著

卡维地洛改善腹主动脉缩窄术后大鼠左室肥厚的实验研究

胡 琴[1],李隆贵[1],李莲群[2] ([1]第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037;[2]重庆市肿瘤医院检验科,重庆 400036)

提 要:目的 对照观察卡维地洛(CAR)等药物干预对压力负荷性左室心肌胶原结合蛋白(A collagen-binding protein, Colligin)和肌凝蛋白同工酶(α/β-MHC)表达的影响,探讨卡维地洛改善左室重塑的机制。方法 将腹主动脉缩窄术(CAB)后4周的雄性Wistar大鼠分为CAR、美托洛尔(MET)、和特拉唑嗪(TER)干预组与CAB组,12周后对有关指标进行检测。结果 术后16周大鼠左室明显肥厚,α-MHC/β-MHC mRNA的比值下降,Colligin mRNA表达及Collagen Ⅰ和Colligin蛋白含量增加($P<0.05$);卡维地洛能够明显改善左室肥厚,美托洛尔次之,而特拉唑嗪作用不明显;CAR组大鼠左室心肌Collagen Ⅰ和Colligin蛋白的表达下降,α-MHC/β-MHCmRNA表达比值增加,Colligin mRNA表达下调($P<0.05$),但MET组和TER组无显著变化($P>0.05$)。结论 卡维地洛下调心肌细胞外基质蛋白和逆转肌凝蛋白同工酶转换的作用可能与其肾上腺素受体阻滞无关,可能部分地与其抗增殖作用可能有关,是改善左室重塑和治疗心力衰竭的一个新机制。

关键词:心室重塑;β-肾上腺能受体阻滞剂;胶原结合蛋白;肌凝蛋白同工酶
中图法分类号:R541;R654.3;R972.1 文献标识码:A

Pressure overload on left ventricular remodeling: effects of Carvedilol and its mechanism

HU Qin[1], LI Long-gui[1], LI Lian-qun ([1]Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Clinical Laboratory, Chongqing Tumor Hospital, Chongqing 400036, China)

Abstract: **Objective** To observe the changes of a collagen-binding protein (Colligin) and myosin heavy chain isoform (α/β-MHC) gene and protein expression in left ventricular hypertrophy following coarctation of abdominal aorta (CAB) in rats and effects of three kinds of adrenergic receptor blockers: Carvedilol (CAR), metoprolol (MET) and terazosin (TER), to elucidate the effects and new mechanism of CAR on cardiac remodeling regression. **Methods** Male Wistar rats undergoing coarctation of abdominal aorta were randomly divided into four groups after operation ($n=8$): CAB, CAR, MET and TER. Hemodynamic, and ventricular remodeling parameters, expressions of Colligin and α/β-MHC mRNA, protein expression of type I collagen and Colligin were determined in the experimental animals and sham operation after 12 weeks of treatment. **Results** Hypertrophy was found in the left ventricle 16 weeks after operation. The ratio of α-MHC/β-MHC mRNA decreased but expressions of type I collagen proteins and Colligin mRNA/protein increased ($P<0.05$). CAR could ameliorate the left ventricular remodeling significantly prior to MET and TER. CAR could also change gene and protein expressions of α-MHC/β-MHC, type I collagen and Colligin ($P<0.05$), but MET and TER had no effect on their expressions ($P>0.1$). **Conclusion** These results indicate that the effects of CAR on left ventricular extracellular matrix proteins and MHC isoform shift regression may be due to the antiproliferative effect, which has nothing to do with this unselective beta-adrenergic receptor antagonist. This represents a new mechanism of CAR that may contribute to the observed beneficial effects on congestive heart failure and left ventricular remodeling.

Key words: left ventricular remodeling; beta-adrenergic receptor antagonist; collagen-binding protein; myosin heavy chain isoform

心室肥厚是各种心血管疾病最常见的一个病理过程,也是心功能减退、心力衰竭的前奏。心肌肥厚包括心肌细胞肥大和心肌纤维化。纤维化是指结缔组织在血管外和间质中蓄积,减少心脏氧的供给,抑制心脏舒张。卡维地洛在心力衰竭的疗效及其对心室重构的影响已得到公认[1],但对左室肥厚的确切作用机制并不完全清楚。本研究观察卡维地洛对慢性压力超负荷左室心肌胶原和肌凝蛋白同工酶基因和蛋白表达的干预作用,并与选择性β_1-受体阻滞剂美托洛尔和α-受体阻滞剂特拉唑嗪相比较,探讨卡维地洛改善心室重塑的新机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000071)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000071)
作者简介:胡 琴(1972-),女,四川省南充市人,博士研究生,讲师,主要从事心肌肥厚发病机制方面的研究,现在贵阳医学院心血管内科。
电话:(0851)6742897
收稿日期:2002-07-12;修回日期:2003-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 大鼠腹主动脉缩窄模型及实验分组

纯种雄性 Wistar 大鼠 40 只，由第三军医大学实验动物中心提供。体质量(189±22.3) g。以 0.5% 戊巴比妥钠行麻醉后，按 Sahlgren[2] 方法建立腹主动脉缩窄模型，使腹主动脉缩窄达 65%~70%。术后常规抗感染 3 d。将术后 4 周的动物分为每组 8 只：卡维地洛干预组(CAR，以卡维地洛 30 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 加入饮水中)、美托洛尔干预组(MET，美托洛尔 50 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 加入饮水中)、特拉唑嗪干预组(TER，特拉唑嗪 2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 加入饮水中)共 12 周，腹主动脉缩窄组(CAB，未加药物干预)，另以条件相同的体质量为(179±31.3) g 大鼠在腹主动脉穿线但不结扎，作为假手术组(sham-operation group，SH)，术后观察 16 周。

1.2 血流动力学指标检测及留取心肌组织标本

术后观察期满，各组大鼠用 10% 氨基甲酸乙酯溶液(10 ml/kg)行腹腔麻醉后，分离右颈动脉、静脉，分别插管，以 RM-6000 型 8 道生理记录仪(日本 Nihon Kohden 公司产)记录主动脉、左心室压力曲线，以及心率(HR)、主动脉收缩压(SAP)、主动脉舒张压(DAP)及左室舒张末压(LVEDP)。随后分别称取左心室(包括室间隔)与右心室湿质量。以左、右心室湿质量/体质量作为相应的心肌肥厚指数(LVW/BW、RVW/BW)。取各组左室心肌液氮冻存备用。全过程于冰浴中进行。

1.3 RT-PCR 检测心肌 Colligin 和 α/β-MHC mRNA 的表达

采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法，按 TRIZOL 试剂盒说明提取心肌组织 RNA。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性。紫外分光法确定 RNA 的量和纯度。取总 RNA 2.5 μg 逆转录合成 cDNA，然后按照分子克隆进行半定量 PCR 反应。寡聚核苷酸引物的合成见表 1。α-MHC 反应条件：94 ℃变性 30 s，54 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，进行 26 个循环，72 ℃延伸 10 min；β-MHC 反应条件：94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，进行 28 个循环，72 ℃延伸 10 min；Colligin 反应条件：95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，进行 30 个循环，72 ℃延伸 10 min；β-actin 反应条件同 α-MHC。反应结束后，各取 PCR 产物 4 μl 进行 1.2% 琼脂糖电泳，并用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析仪扫描，PCR 产物量以光密度值×面积表示，目的片段与 β-actin 的光密度比值(*D*)作为目的片段 mRNA 的相对含量。

表 1 PCR 引物序列

Tab PCR primer sequences

	Upper primer	Lower primer
α-MHC(440 bp)	5′-AC/GCAGC/CAGGC/CAGTA-3′	5′-TCCAG/CCAGC/CG/ATGTT-3′
β-MHC(569 bp)	5′-AC/GCAGC/CAGGC/CAGTA-3′	5′-TGCTT/TGCCT/TTGCC/CTTGT-3′
Colligin(699 bp)	5′-ACCTT/ATGCC/TCCTG/GCTGT-3′	5′-CCTGT/CCGGT/GCATC/ATGT-3′
β-actin(764 bp)	5′-TTGTA/ACCAA/CTGCG/ACGAT/ATGG-3′	5′-GATCT/TGATC/TTCAT/GGTGC/TAGG-3′

1.4 聚丙烯酰胺电泳和免疫印迹

1.4.1 组织核蛋白提取方法 在管中配制蛋白质匀浆缓冲液 1 ml，临用时加入苯甲磺酰氟(PMSF)50 μg/ml。自液氮中取出组织分装于 EP 管中，每克组织加上述配好的缓冲液 1 ml。组织剪碎后，用超声波破碎 DNA。－20 ℃冻存组织 20 min，12 000 r/min，4 ℃离心 20 min。上清液移至另一 EP 管(100 μl/管)中，加热 100 ℃，6 min。Lowry 法测定蛋白浓度(60~100 μg/μl 较为理想)。每 EP 管加等量加样缓冲液 100 μl，根据蛋白浓度计算所需上样量。

1.4.2 Western blotting 分析 灌制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶，10% 分离胶，5% 浓缩胶。上样量 40 μg，同时加蛋白分子量标准(Promega 公司产品)。电泳时，浓缩胶电压 75 V，分离胶 150 V。电泳结束后，取出凝胶，和相同大小处理过的聚偏二氟乙烯(PVDF 膜)置于五层滤纸中间，放入 BioRad 转移槽中。电转膜后，室温下封闭过夜。0.01 mol/L PBST 洗 PVDF 后，分别加入 0.01 mol/L PBST(1∶1 000)配制的山羊多克隆抗体 Colligin 和 Collagen Ⅰ(Santa Cruz)，室温下孵育 3~4 h。洗膜后用 0.01 mol/L PBST 配制兔抗羊辣根过氧化酶标记的二抗(北京中山)，室温下孵育 1~2 h。洗膜后将 PVDF 膜置于 3，3′-二胺基联苯胺(DAB)中反应 1~3 min 后，用 Gel Doc 2 000 凝胶图像分析仪扫描成像，并计算光密度值(*D*)。

1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较用单因素方差分析(One Way ANOV)，两两比较用 Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

各组大鼠未出现呼吸困难、水肿、进食困难、尿少等心衰症状。药物干预后未见大鼠死亡。处理动物发现术后 16 周左室肥厚明显，而右室未见明显改变。

2.2 大鼠血流动力学及心室重塑指标的改变，见表 2

表 2 大鼠血流动力学和心室重塑指标的改变($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

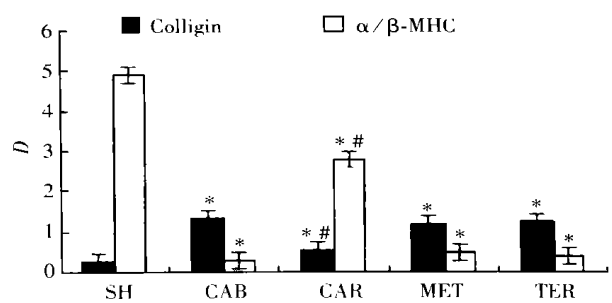
Tab 2 Changes of hemodynamical and ventricular remodeling parameters in rats ($n=8$，$\bar{x}\pm s$)

Group	LVW/BW (mg/g)	RVW/BW (mg/g)	HR (bpm)	MAP (mmHg)	LVEDP (mmHg)
SH	2.46±1.3	0.68±0.07	425±15	118.0±14.2	4.2±0.8
CAB	3.41±1.3△	0.66±0.05	399±15△	194.2±19.8△	14.0±1.4△
CAR	2.79±1.1△*	0.66±0.05	345±20*△	146.0±17.0*△	8.3±0.7△*
MET	3.15±1.3△*	0.66±0.06	351±23*△	151.0±23.7*△	11.1±1.1△*
TER	3.35±1.0△	0.65±0.04	415±36*	130.0±16.5*	12.0±0.1△

*：$P<0.05$，*vs* each group；△：$P<0.05$，*vs* SH

2.3 Colligin、α-MHC 和 β-MHC 的 PCR 扩增结果

Colligin、α-MHC 和 β-MHC 产物电泳结果显示扩增片段长度分别为 699、440、569 bp，与预期设计的目的片段大小相同，见图 1。



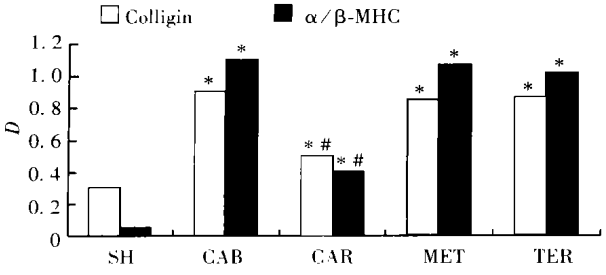
*：$P<0.05$，*vs* SH；#：$P<0.05$，*vs* CAB

图 1 大鼠心肌 Colligin 和 α/β-MHC mRNA 表达变化

Fig 1 Changes of expressions of Colligin and the ratio of α/β-MHC mRNA in rats

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　Colligin 和 Collagen Ⅰ免疫印迹结果及蛋白表达变化　见图 2。



*: $P<0.05$ *vs* SH; #: $P<0.05$, *vs* CAB

图 2　大鼠左室心肌 **Colligin** 和 **Collagen Ⅰ**蛋白表达变化

Fig 2　Changes of Colligin and type Ⅰ collagen protein expressions in left ventricle

3　讨论

胶原结合蛋白(Colligin)属丝氨酸蛋白酶抑制剂家族, 也是一种热休克蛋白, 又名 HSP47。它是多个组织胶原合成的重要分子伴侣(molecular chaperones)[3]。未进入细胞外基质的前胶原在细胞内折叠和装配时需要 Colligin; 此外, Colligin 能够抑制前胶原的降解, 因此, Colligin 在调控胶原的代谢中起重要作用[4,5]。Colligin 与Ⅰ型和Ⅳ型胶原的亲和力高, 几乎不与Ⅲ型胶原结合。肌凝蛋白(MHC)包括 α-MHC 和β-MHC, 它们分别由相反的调控基因编码。MHC 的 ATP 酶活性决定于高活性 α-MHC 和低活性 β-MHC 二者的比值。MHC 的 ATP 酶活性是心肌收缩速率的主要决定因素, 反映心室收缩储备。

本实验显示腹主动脉缩窄术后 16 周左室明显肥厚, α-MHC mRNA 表达减少, β-MHC mRNA 的表达增加, 肌凝蛋白同工酶比值发生转换, Colligin 基因和蛋白水平上调, Ⅰ型胶原蛋白表达增加。说明压力超负荷能够诱导细胞外基质蛋白表达, 引起心肌纤维化。12 周药物干预显示: 卡维地洛(30 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)减少 Colligin 基因表达, 减少压力超负荷诱导的细胞外基质蛋白(包括Ⅰ型胶原和 Colligin)的合成, 逆转肌凝蛋白同工酶的转换, 从而逆转左室重塑。产生相同的血流动力学效应的美托洛尔(50 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$) 和卡维地洛(30 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)也降低心率和左室舒张末压, 但对左室肥厚指数的影响不如卡维地洛明显。3 类肾上腺素受体阻滞剂中, 特拉唑嗪降低平均动脉压最显著, 但增加术后心率。美托洛尔和特拉唑嗪均不影响 α、β-MHC mRNA、Colligin mRNA 和蛋白及Ⅰ型胶原蛋白的表达。以上表明: 卡维地洛显著地降低细胞外基质蛋白、肌凝蛋白基因和蛋白的表达, 这一作用与 α 受体和 β 受体阻滞作用无关。

Wei[6] 发现: 在心梗后大鼠的长期治疗中, 产生相同血流动力学效应的卡维地洛(150 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)和美托洛尔(250 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)比较, 仅仅卡维地洛能抑制非梗塞部位胶原含量的增加。两种药物效应的差异是独立于血流动力学的, 由内在的固有特性所决定, 且与血管紧张素转化酶抑制剂作用相似。Grimm 等[7] 通过在体与离体实验证实: 卡维地洛对培养的慢性压力负荷性左室成纤维细胞有抗增生的作用, 而且减少纤粘连蛋白、Ⅰ型和Ⅲ型胶原的合成, 其抗增生作用与 γ-干扰素相似, 而美托洛尔和派唑嗪无此作用。本实验的结果与这些作者的报道相一致。

卡维地洛与美托洛尔对血流动力学的影响相似, 对左室肥厚都有不同程度的逆转的作用, 但前者更明显, 说明血流动力学变化并非导致左室肥厚的惟一因素。我们推测卡维地洛的独特效应可能部分地与其抗增生作用有关。Massart 等[8] 发现卡维地洛改善心肌重塑的作用并不完全依赖于血压的下降, 而与抑制腹主动脉缩窄诱导的前内皮素-Ⅰ的过度表达有关。因此全面认识卡维地洛的这些特性, 将有利于进一步提高对高血压、心力衰竭等常见心血管疾病的疗效。

参考文献:

[1] Sackner Bernstein J D. Use of carvedilol in chronic heart failure: challenges in therapeutic management[J]. Pro Cardiovasc Dis 1998, 41(1suppl1): 53－58.

[2] Sahlgren B, Eklof AC, Aperia A. Studies of the renal component of the hypertension in rats with aortic construction. Role of angiotensin Ⅱ[J]. Acta Physiol Scand, 1986, 127(4): 443－448.

[3] Pak B J, Vanhorne J B, Pang S C. Tissue distribution and immunohistochemical localization of the collagen-binding heat-shock protein gp46 in neonatal rats[J]. Histochem J, 1996, 28(12): 895－902.

[4] Ball E H, Jain N, Sanwal B D. Colligin, a collagen binding serpin[J]. Adv Exp Med Biol, 1997, 425: 239－245.

[5] Sauk J J, Norris K, Moehring J, *et al*. The expression of colligin/hsp47 after stress in human periodontal fibroblasts *in vitro*[J]. Arch Oral Biol, 1990, 35(8): 645－651.

[6] Wei S, Chow L T, Sanderson J E. Effects of carvedilol in comparison with metoprolol on myocardial collagen postinfarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(1): 276－281.

[7] Grimm D, Huber M, Jabusch H C, *et al*. Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(3): 487－501.

[8] Massart P E, Donckier J, Kyselovic J, *et al*. Carvedilol and lacidipine prevent cardiac hypertrophy and endothelin-1 gene overexpression after aortic banding[J]. Hypertension, 1999, 34(6): 1197－1201.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net