

· 论 著 ·

瑞舒伐他汀对心肌梗死后大鼠 Periostin 蛋白的影响

李丹丹, 万大国[△]

(郑州大学第二附属医院心内三科, 郑州 450014)

摘要:目的 观察瑞舒伐他汀(ROS)对心肌梗死后大鼠 Periostin 表达的影响,探讨其改善心肌重构的机制。方法 雌性 SD 大鼠 30 只,结扎左前降支建立急性心肌梗死(AMI)模型,术后 24 h 随机分为 AMI 组和 ROS 组各 15 只;另设 15 只为假手术组(Sham 组),只穿线不结扎。ROS 组大鼠每天给予 ROS 10 mg/kg(溶于 2 mL 清水)灌胃,另两组每天以 2 mL 清水灌胃。4 周后比较各组大鼠胶原容积分数(CVF)、Periostin 蛋白及转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和 Periostin 的 mRNA 表达差异。结果 与 AMI 组相比,ROS 组心肌 CVF、Periostin 蛋白及 TGF- $\beta 1$ 和 Periostin 的 mRNA 均显著降低($P < 0.05$),ROS 组和 AMI 组上述指标均显著高于 Sham 组($P < 0.05$)。结论 ROS 能够降低受损心肌中 Periostin 表达水平,可能是其改善心肌重塑的机制之一。

关键词:心肌梗死;大鼠;瑞舒伐他汀;Periostin

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.11.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)11-1204-03

Effects of rosuvastatin on expression of Periostin protein in rats with acute myocardial infarction

Li Dandan, Wan Daguo[△]

(Department of Cardiovascular, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China.)

Abstract: Objective To evaluate the effects of rosuvastatin(ROS) on expression of Periostin protein in rats with acute myocardial infarction and to investigate the improvement of myocardial reconstruction mechanism. **Methods** Thirty female SD rats with ligated LAD were used to establish models of acute myocardial infarction(AMI), twenty four hours later, the models were randomly divided into acute myocardial infarction(AMI) as control group($n=15$) and ROS group($n=15$); Another 15 rats were tested with pierced but not ligated LAD($n=15$) as sham-operated group(Sham group). Rats in ROS group were given ROS by gavage at 10 mg/kg dose levels to soluble in 2 mL clear water, whereas rats in the other two groups were given 2 mL clear water each day. Four weeks later, compare the differences of collagen volume fraction(CVF), Periostin protein, TGF- $\beta 1$ mRNA and Periostin mRNA. **Results** Myocardial CVF, Periostin protein, TGF- $\beta 1$ mRNA and Periostin mRNA were reduced in the ROS group compared with rats in the AMI group($P < 0.05$), both ROS group and AMI group were significantly higher than those in the Sham group($P < 0.05$). **Conclusion** ROS can reduce the expression of Periostin in the damaged myocardial, may be one of the mechanism of myocardial remodeling improvement.

Key words: myocardial infarction; rats; rosuvastatin; Periostin

心肌梗死后心肌肥厚、左室扩张、间质纤维化,导致心室重构,进而使心室功能进一步降低,从而导致心力衰竭发生。鉴于 Periostin 的病理性促纤维化与血管新生作用,越来越多的研究者已经开始关注它在心血管疾病中的特殊功能。本研究拟在利用瑞舒伐他汀(ROS)调脂以外的作用,观察其对急性心肌梗死(AMI)后 Periostin 的干预效果,探讨其改善心肌重塑的机制,为利用 ROS 改善 AMI 后心肌重塑提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 ROS(阿斯利康制药有限公司提供);Periostin 兔多克隆抗体(上海萨博生物工程有限公司);SP9000 试剂盒(北京中杉生物工程公司);DAB 试剂盒(北京中杉生物工程公司);RT-PCR 试剂盒(Transgene 公司);引物由北京博大泰克公司合成。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 8 周龄 SD 雌性大鼠,体质量 250~300 g,由郑州大学实验动物中心提供。按照文献[1]的方法结扎左前降支建立 AMI 模型。另设假手术组(Sham 组)

15 只在相应部位只穿线不结扎。术后每天给予青霉素预防感染,共 3 d。术后 24 h 将 30 只 AMI 大鼠随机分为 AMI 组($n=15$)和 ROS 组($n=15$)。ROS 组大鼠每天给予 ROS 10 mg/kg(溶于 2 mL 清水)灌胃,AMI 组和 Sham 组大鼠以 2 mL 清水灌胃。所有实验大鼠均自由饮食。4 周后颈椎脱臼法处死动物,摘取心脏,在梗死区沿左心室长轴一分二,取梗死交界区组织,一部分 10%甲醛固定后常规石蜡包埋切片;一部分液氮保存,留做 RT-PCR。

1.2.2 Masson 染色测定心肌胶原容积分数(CVF) 切片脱蜡至水,改良 Masson 染色法将胶原纤维染成绿色,将心肌染为红色,在光学显微镜下($\times 400$)随机选择 5 个视野进行观察,使用图像分析软件(Biosens Digital Imaging System v1.6)进行图像分析,CVF 的计算方法为:CVF=胶原面积/总面积。

1.2.3 免疫组化检测心肌梗交界区 Periostin 蛋白的表达 免疫组化染色(SP 法)的操作步骤按照试剂盒的说明书进行,最后经 DAB 显色、苏木素复染后,阳染产物胞质呈棕黄色或棕褐色。各组照片应用图像分析软件(Biosens Digital Imaging Sys-

tem v1.6)进行图像分析,随机选 5 个点测量,然后取平均值。阳性产物强度用图像处理系统灰度值表示。

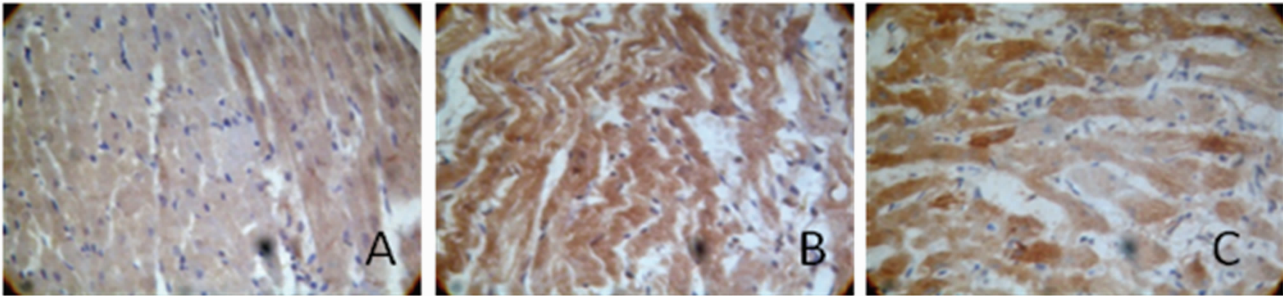
1.2.4 RT-PCR 检测心梗交界区 Periostin 和转化生长因子-β1(TGF-β1)mRNA 的表达 用 Trizol 试剂处理梗死交界区心肌组织(约 100 mg)提取总 RNA。使用逆转录酶将 8 μL 总 RNA 合成 cDNA。扩增 Periostin 序列上游引物:5'-ACT CCG TGT CTT CGT GTA TC-3',下游引物:5'-CTT TCT TCA TTA GTC ATT CCC T-3',扩增片段为 279 bp;扩增 TGF-β1 序列上游引物:5'-CCC ACT GAT ACG CCT GAG-3',下游引物:5'-GGT TGT AGA GGG CAA GGA C-3',扩增片段为 469 bp;内参 GAPDH 序列上游引物:5'-AAG TTC AAC GGC ACA GTC AA-3',下游引物:5'-TCC ACG ACA TAC TCA GCA CC-3',扩增片段为 128 bp。取 2 μL 逆转录产物分别应用各组上下游引物进行 PCR 扩增。扩增条件如下:94 ℃预变性 2 min,1 个循环;94 ℃变性 30 s,退火 30 s (Periostin 为 52 ℃,TGF-β1 为 54 ℃,GAPDH 为 55 ℃),72 ℃延伸 2 min,共 35 个循环;72 ℃总延伸 6 min。取 5 μL PCR 反应产物进行

2%琼脂糖凝胶电泳,在紫外线投射仪下观察电泳条带,用 D-140 图像记录分析系统进行分析,检测因子 mRNA 的表达量以检测因子的 DNA 条带和 GAPDH 的 DNA 条带灰度值比值计算。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组胶原容积分数及 Periostin 蛋白表达的比较 Mas-son 染色结果显示:AMI 组大量胶原纤维形成,Sham 组有极少量胶原纤维形成,ROS 组介于两者之间;免疫组化染色结果显示:AMI 组大鼠心肌细胞胞质中有大量 Periostin 表达,ROS 组相对减少;AMI 组及 ROS 组 CVF、Periostin 蛋白均显著高于 Sham 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),ROS 组 CVF、Periostin 蛋白与 AMI 组相比均显著降低($P < 0.05$),见图 1 及表 1。



A; Sham 组; B; AMI 组; C; ROS 组。
图 1 各组大鼠心肌组织的免疫组化染色(SP 染色法,×400)

表 1 ROS 对 CVF、Periostin 蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

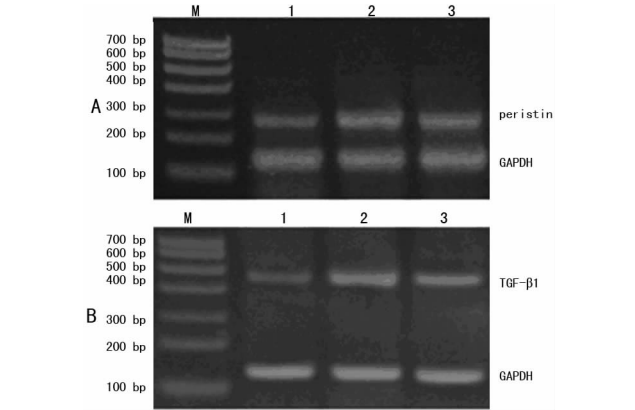
组别	CVF	Periostin 蛋白
Sham 组	10.049±5.744	106.728±6.445
ROS 组	35.730±11.794*△	125.202±13.062*△
AMI 组	47.104±4.084*	152.114±5.999*

2.2 各组 Periostin mRNA 表达的比较 RT-PCR 结果显示,AMI 组和 ROS 组与 Sham 组相比较,TGF-β1 及 Periostin mRNA 的表达均显著增加($P < 0.05$);ROS 组与 AMI 组相比,TGF-β1 及 Periostin mRNA 的表达均显著减少($P < 0.05$),见图 2、表 2。

表 2 ROS 对 Periostin、TGF-β1 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Periostin 蛋白	TGF-β1
Sham 组	0.098±0.017	0.129±0.027
ROS 组	0.387±0.020*△	0.380±0.010*△
AMI 组	0.422±0.022*	0.521±0.034*

*: $P < 0.05$,与 Sham 组比较;△: $P < 0.05$,与 AMI 组比较。



A; Periostin mRNA 的表达; B; TGF-β1 mRNA 的表达; M; DAN maker; 1; Sham 组; 2; AMI 组; 3; ROS 组。

3 讨 论

心肌梗死后心肌细胞坏死使心肌整体收缩力下降,细胞外基质、胶原纤维网发生异常变化,纤维化的增加使心室的顺应性下降,重塑更趋明显,最终心力衰竭必然会出现。心肌梗死后肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活,血管紧张素Ⅱ(Ang-Ⅱ)可以刺激成纤维细胞等分泌 TGF-β1,引起胶原合成增多,从而促进导致纤维化的发生、发展。体外实验证实,TGF-β1 诱导胶原分泌增加,使大鼠心脏成纤维细胞Ⅰ型、Ⅲ型胶原 mRNA 表达增高。TGF-β1 在体内也刺激细胞外基质蛋白表达,诱导心肌纤维化。

图 2 各组大鼠心肌组织 Periostin mRNA 的表达

Periostin 是一种主要由成纤维细胞分泌的细胞外基质蛋白,在成年正常心肌中不表达,但心脏受到损伤时就会大量表达^[2]。最早研究的主要是其在肿瘤病理进程的作用,还有研究报道其在皮肤^[3]、肾脏及心脏瓣膜^[4]、肌肉损伤等条件下亦有表达。压力负荷、应激、炎症等均可引起骨膜蛋白表达上调。Periostin 蛋白可与胶原-I、胶原-V、粘连蛋白等基质蛋白结合参与生理性及病理性纤维化的形成^[3]。有研究表明,Periostin 蛋白参与病毒性心肌炎心肌纤维化的发生、发展,并与 Ang-Ⅱ 及 TGF-β1 有关^[5]。Periostin 蛋白还可通过血管生长调节等途径促进动脉粥样硬化斑块的生长及不稳定性,从而参与冠心病的发生、发展过程^[6]。Iekushi 等^[7]在 AMI 大鼠中使用缬沙坦治疗后发现,缬沙坦可通过抑制 Periostin 表达来改善心功能及心肌梗死后心室重塑。李佳戎等^[8]发现芪苈强心胶囊和雷米普利均能通过降低心肌梗死区 Periostin mRNA 表达改善心室重构。然而他汀类药物对 AMI 后心室重构的影响是否也与 Periostin 信号通路有关,目前仍未见报道。

本研究以检测心肌 Periostin 的变化来反映 ROS 的抗心肌重构作用。结果发现,与 AMI 组相比,ROS 组心肌 Periostin、TGF-β1 表达明显降低,胶原容积分数降低。实验结果证实,ROS 能够降低梗死交界区心肌 Periostin 的表达,可改善 AMI 后心室重塑,其机制可能为 ROS 通过降低 TGF-β1 的水平,调节 Periostin 的表达,从而减少胶原的沉积,这为治疗 AMI 后心室重构提供了实验依据,但深入的其他机制尚待进一步探讨。

参考文献:

[1] 王勇,高大中,殷跃辉,等.大鼠心肌梗死模型建立方法选择及心电图表现[J].中国实验动物学报,2011,9(6):525-

529.

[2] Stansfield WE,Andersen NM,Tang RH,et al. Periostin is a novel factor in cardiac remodeling after experimental and clinical unloading of the failing heart[J]. Ann Thorac Surg,2009,88(6):1916-1921.
[3] Zhou HM,Wang J,Elliott C,et al. Spatiotemporal expression of Periostin during skin development and incisional wound healing;lessons for human fibrotic scar formation [J]. J Cell Commun Signal,2010,4(2):99-107.
[4] Norris RA,Moreno-Rodriguez RA,Sugi Y,et al. Periostin regulates atrioventricular valve maturation[J]. Dev Biol,2008,316(2):200-213.
[5] 吴岚,宋丽君,王朝霞,等.骨膜蛋白在实验性病毒性心肌炎小鼠的表达及意义[J].临床儿科杂志,2011,29(7):661-664.
[6] 杨余,丁志坚,朱傲霜,等.冠心病患者血浆 Periostin 蛋白与血管内皮生长因子的相关性[J].中国动脉硬化杂志,2011,19(2):135-138.
[7] Iekushi K,Taniyama Y,Azuma J,et al. Novel mechanisms of valsartan on the treatment of acute myocardial infarction through inhibition of the antiadhesion molecule Periostin[J]. Hypertension,2007,49(6):1409-1414.
[8] 李佳戎,杨萍.芪苈强心胶囊对心梗后心力衰竭大鼠 Periostin 蛋白表达干预作用的研究[J].中国实验诊断学,2009,13(2):170-172.

(收稿日期:2012-11-08 修回日期:2013-01-22)

(上接第 1203 页)

[2] Kazanis I,Ffrench-Constant C. The number of stem cells in the subependymal zone of the adult rodent brain is correlated with the number of ependymal cells and not with the volume of the niche[J]. Stem Cells Dev,2012,21(7):1090-1096.
[3] Fletcher RB,Prasol MS,Estrada J,et al. p63 regulates olfactory stem cell self-renewal and differentiation[J]. Neuron,2011,72(5):748-759.
[4] Zou L,Jin G,Zhang X,et al. Proliferation, migration, and neuronal differentiation of the endogenous neural progenitors in hippocampus after fimbria fornix transection[J]. Int J Neurosci,2010,120(3):192-200.
[5] 王振宇,季丽莉,佟雷,等.不同鼠龄生后大鼠海马神经干细胞的传代和分化[J].解剖科学进展,2008,14(1):28-31.
[6] 葛岩,王医术,张丽红,等. Wistar 大鼠胚胎脑源性神经干细胞分离、培养及其鉴定[J].中风与神经疾病杂志,2009,26(3):266-269.
[7] Wang S,Roy NS,Benraiss A,et al. Promoter-based isola-

tion and fluorescence- activated sorting of mitotic neuronal progenitor cells from the adult mammalian ependymal/subependyma zone[J]. Dev Neurosci,2000,22(1/2):167-176.
[8] Bajpai R,Lesperance J,Kim M,et al. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells[J]. Mol Reprod Dev,2008,75(5):818-827.
[9] 姚瑞芹,朱海宾,徐铁军,等.不同分离方法对人胚胎脑海马区神经干细胞体外生长的影响[J].徐州医学院学报,2003,23(4):298-302.
[10] 翟中和,王喜忠,丁明孝.细胞生物学[M].北京:高等教育出版社,2000:87-94.
[11] 刘耀,张曦.间隙连接细胞间通讯在造血调控中的作用[J].重庆医学,2011,40(30):3046-3047.
[12] Jöderstad J,Jöderstad LM,Li J,et al. Communication via gap junctions underlies early functional and beneficial interactions between grafted neural stem cells and the host [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010,07(11):5184-5189.

(收稿日期:2012-11-06 修回日期:2013-01-22)