

辛伐他汀对压力负荷下大鼠心肌骨桥蛋白表达的影响

肖蓬勃 刘争建 李高元 张雪红 张寅

(解放军第二十二医院内一科, 格尔木 816000)

摘要 研究辛伐他汀对压力负荷下大鼠心肌骨桥蛋白(OPN)的影响, 将 Sprague Dawley 大鼠随机分为 3 组: 假手术组($n=10$)、模型组($n=10$)和辛伐他汀组($n=10$)。腹主动脉缩窄术建立大鼠压力超负荷模型, 8 周后测定左室重量指数(LVWR)、B 超检测左室游离壁厚度及室间隔厚度 Westernblot 检测心肌 OPN 表达水平。结果是①模型组和辛伐他汀组 LVWR 高于假手术组, 辛伐他汀组 LVWR 低于模型组($P<0.01$)。②模型组和辛伐他汀组心肌 OPN 表达水平高于假手术组($P<0.01$), 辛伐他汀组低于模型组($P<0.01$)。辛伐他汀能够减轻压力负荷引起的大鼠的心肌肥厚, 其过程伴随着 OPN 水平的降低, 提示辛伐他汀改善心脏功能的过程与 OPN 有关。

关键词 辛伐他汀 骨桥蛋白 左室肥厚

中图法分类号 R331.31; **文献标志码** A

心力衰竭是各种心血管疾病发展的最后阶段。随着我国经济的发展, 人民生活水平的不断提高, 心血管疾病其发病率在我国逐年上升。现阶段我国已有心衰患者 400 万之多, 每年医疗费用消耗近 100 亿元^[1]。心肌肥厚是一种独立的心血管危险因素, 持续的心肌肥厚可最终引起心脏功能不全、心力衰竭甚至猝死。所以, 心肌肥厚作为心血管疾病研究领域的重点和热点, 越来越得到广泛的关注。心肌肥厚的过程包括心肌细胞的肥大以及间质的纤维化, 因此深入研究导致心肌细胞肥厚以及心肌成纤维细胞的增殖的病理生理过程, 以便通过各种可能的手段来抑制该动态过程成为改善心肌肥厚甚至逆转心衰的治疗策略。OPN 是一种磷酸化的糖蛋白, 最初由 Senger 在 1979 年发现并首次报道^[2], 它作为一种新的细胞因子, 参与早期细胞的免疫应答、肉芽肿、肿瘤发生以及转移。近年来, 有研究发现 AngII、内皮素-1 等均能够刺激血管内皮细胞表达 OPN, 而后者的表达介导了成纤维细胞的

迁移。另外最新研究表明 OPN 还与心肌炎后的心脏重构密切相关^[3]。因此 OPN 应该与心肌肥大密切相关。辛伐他汀为 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA)还原酶抑制剂, 近年来研究发现, 他汀类药物具有多效性作用, 其在调脂作用之外还有改善患者心功能的作用^[4,5]。本项研究通过制作压力负荷大鼠心肌肥厚模型, 探讨辛伐他汀对心肌肥厚的影响以及 OPN 水平的表达, 分析其可能的机制, 为辛伐他汀提供更多的多效性保护作用的临床用药依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验使用 SD 雄性大鼠 34 只, 体重约 200 g, 由新疆石河子大学实验动物中心提供; 辛伐他汀片; 丙烯酰胺、双丙烯酰胺购自上海化学试剂公司; OPN 兔抗大鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的Ⅱ抗及化学发光试剂购自 Santa Cruz 公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳装置均来自 Bio-Rad 公司; 其余试剂均为国产分析纯; HPSONOS 2 500 超声检测仪。

1.2 动物模型及分组

SD 大鼠适应环境饲养一周后随机分为模型组(实施腹主动脉结扎手术, $n = 12$)、辛伐他汀组(模型+辛伐他汀治疗, $n = 12$)和假手术组(不结扎腹主动脉, 手术过程与模型组相同, $n = 10$)。无菌环境下, 大鼠使用戊巴比妥钠(25 mg/kg)麻醉, 固定后手术区皮肤脱毛, 手术参照 Deepa H. Kumbar 等^[6]方法建立模型, 该手术采用部分结扎大鼠腹主动脉, 造成动物后负荷增大, 最终引起心脏肥厚。动物在手术后 1 周(腹部切口自然愈合后)进行超声检测, 观察腹主动脉缩窄情况并剔除不符合文献标准的大鼠。术后每只老鼠臀部注射青霉素 1 万单位, 预防感染。辛伐他汀治疗剂量为 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 于大鼠术后第一天灌胃给药, 持续 8 周, 其他两组给予等体积的生理盐水灌胃 8 周, 恒温(22 ± 3)℃、恒湿($55\% \pm 3\%$)℃环境单笼单只饲养, 自由饮食和饮水, 人工照明, 明暗交替各 12 h。

1.3 B 型超声检查

实验周期结束后的大鼠, 进行心脏超声检查。2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠(25 mg/kg)。使用微型探头置于大鼠胸骨左侧, 测量左心室舒张末期后壁厚度(L_{LVPWT})及舒张末期室间隔厚度(I_{VST})。

1.4 计算左室重量指数

超声测定结束后开胸取出心脏, PBS 缓冲液洗涤去除残留血液, 剪去周围结缔组织、心房和右心室游离壁, 保留左心室和室间隔称重(LVW), 记录数据并计算左室重量指数($L_{\text{VWR}} = L_{\text{VW}}/B_{\text{W}}$, 单位 g/kg)。将称重后的左心室剪成小块, 用锡箔包裹标记后立即投入液氮中, 用于之后的提取蛋白检测。

1.5 骨桥蛋白表达水平检测

将事先投入液氮的组织块浸入 10 倍体积组织裂解缓冲液中进行匀浆。Western blot 方法进行蛋白分离并转膜, 之后分别加入 I 抗和 II 抗, 化学发光, 暗盒 X 光片曝光分析。

1.7 统计分析

各分组所得计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示, 用 SPSS10.0 软件处理数据, 多组均数间比较用单因素方差分析, 2 组均数间比较采用 LSD-t

检验。检验水准 $\alpha = 0.01$, $p < 0.01$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 腹主动脉缩窄程度

我们使用腹主动脉缩窄术造成大鼠后负荷增加, 腹主动脉环形缩窄程度控制在 60% 左右, 术后 1 周使用超声对大鼠腹部腹主动脉血流进行检测, 去除腹主动脉缩窄程度不合格的大鼠(缩窄率为 $< 50\%$ 或者 $> 70\%$ 的为不符合文献[6]所述标准, 不符合标准的在模型组和辛伐他汀组各有 2 只)(图 1)。

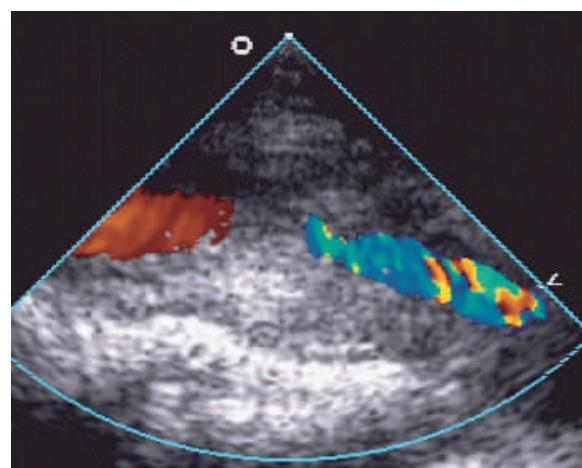


图 1 大鼠腹主动脉缩窄超声筛选

注:超声检测显示, 腹主动脉在结扎处形成了部分狭窄。图 1 中白色箭头处所示为腹主动脉狭窄部位。

2.2 左室重量指数

辛伐他汀组、模型组的 L_{VWR} 高于假手术组($P < 0.01$); 辛伐他汀组 L_{VWR} 低于模型组, ($P < 0.01$) (表 1)。

2.3 心脏功能检测

B 型超声检测结果显示, 辛伐他汀组和模型组的左心室舒张末期后壁厚度(L_{LVPWT})及舒张末期室间隔厚度(I_{VST})均高于假手术组, ($P < 0.01$); 模型组 L_{LVPWT} 及 I_{VST} 高于辛伐他汀组, ($P < 0.01$) (表 1)。

2.4 心肌组织 OPN 表达

用 GAPDH 作为内参照对心肌组织的 OPN 表达

水平在不同组之间进行对比。检测指标为 OPN/GAPDH, 表示骨桥蛋白的相对表达水平。模型组和辛伐他汀组的 OPN 表达高于假手术组 ($P < 0.01$), 辛伐他汀组的 OPN 表达低于模型组 ($P < 0.01$, 表 1, 图 2)。

**表 1 L_{VWR} , L_{LVPWT} , I_{VST} 以及 OPN/GAPDH 的变化
(n=10, $\bar{X} \pm S$)**

实验分组	L_{VWR} / (g · kg ⁻¹)	L_{LVPWT} / mm	I_{VST} / mm	OPN / GAPDH
假手术组	2.65 ± 0.14	1.94 ± 0.02	1.86 ± 0.01	0.33 ± 0.01
模型组	3.75 ± 0.03▲	2.70 ± 0.02▲	2.55 ± 0.02▲	1.40 ± 0.05
辛伐他汀组	2.75 ± 0.01◆■	2.39 ± 0.02◆■	2.24 ± 0.01◆■	0.78 ± 0.01

注:▲ $P < 0.01$ 模型组 vs. 假手术组;◆ $P < 0.01$ 辛伐他汀组 vs.

模型组;■ $P < 0.01$ 辛伐他汀组 vs. 假手术组

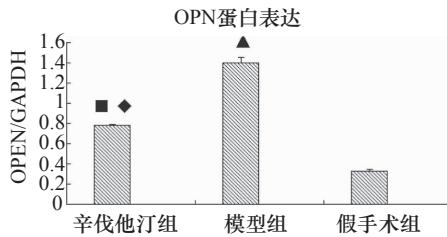


图 2 OPN 蛋白表达

注:▲ $P < 0.01$ 模型组 vs. 假手术组;◆ $P < 0.01$ 辛伐他汀组

vs. 模型组;■ $P < 0.01$ 辛伐他汀组 vs. 假手术组

3 讨论

OPN 是一种磷酸化的糖蛋白, 同时也作为一种细胞因子, 在维持组织的完整性以及重建方面发挥着重要的作用, 参与其中的炎症反应应答过程^[7]。近年来有研究表明, OPN 参与了心血管疾病的发生和发展过程, 尤其在心肌纤维化和心脏肥大的病理生理过程中, OPN 表达水平发生了明显的变化^[8]。之后的不同研究都证实了骨桥蛋白与心肌的纤维化、胶原的生成成正相关^[9,10,3]。

在动物实验中, 我们对大鼠实施腹主动脉缩窄术, 并使用超声手段对缩窄率进行控制, 以达到使观察对象标准化的目的。实验结束后 1 周对大鼠腹主动脉进行检测, 观察到大鼠腹主动脉缩窄成功, 排除不符合标准的 4 只, 其余进行实验。8 周后模型组较假手术组大鼠在舒张末期左室后壁厚度以及间隔厚度水平上较假手术组有明显增加, 证明大鼠心脏在持续慢性后负荷的情况下发生肥厚, 如果持续不加干预最终大鼠左心室失代偿形成心衰, 这个过程包括了心肌细胞的肥大、成纤维细胞的增殖以及胶原的合成增加。在未到达心衰、而仅仅形成左心室肥厚的这段时间中, 辛伐他汀的药物干预表现出了明显的抑制左心室肥厚的作用。

有很多研究表明, 辛伐他汀除明确的脂质代谢调节作用之外, 还具有明显的降低心血管事件发生率的作用, 可表现为减轻心室的重构、抑制心肌纤维化等, 但是其机制目前尚未完全明了。本实验中, 辛伐他汀抑制左心室肥厚的同时伴随着 OPN 表达水平的降低, 可能是辛伐他汀改善心脏功能的潜在机制。但是, 是否辛伐他汀通过 OPN 作为靶点来改善心脏功能还是辛伐他汀在改善心脏功能之后引起 OPN 表达下调目前尚未研究清楚, 其中的分子机制还需进一步的研究和探索, 希望对 OPN 的进一步的研究结果能够为临床用药提供新的理论支持。

参 考 文 献

- 沈秀云. 心力衰竭的最新临床进展. 海南医学, 2009; 20 (9): 289—292
- Senger D R, Wirth D F, Hynes R O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. Cell, 1979; 16 (4): 885—893
- Szalay G, Sauter M, Haberland M, et al. Osteopontin: a fibrosis-related marker molecule in cardiac remodeling of enterovirus myocarditis in the susceptible host. Circ Res, 2009; 104 (7): 851—859
- Liu J, Shen Q, Wu Y. Simvastatin prevents cardiac hypertrophy in vitro and in vivo via JAK/STAT pathway. Life SCI, 2008; 82 (19): 991—996
- Stypmann J, Schubert A, Welp H, et al. Atorvastatin therapy is associated with reduced levels of N-terminal prohormone brain natriuretic peptide and improved cardiac function in patients with heart failure. Clin Cardiol, 2008; 31 (10): 478—481

- 6 Kumbar D H, VanBergen A, Ocampo C, et al. Adapter molecule DOC-2 is differentially expressed in pressure and volume overload hypertrophy and inhibits collagen synthesis in cardiac fibroblasts. *J Appl Physiol*, 2007;102:2024—2032
- 7 Graf K, Stawowy P. Osteopontin: a protective mediator of cardiac fibrosis? *Hypertension*, 2004;44(6):809—810
- 8 Trueblood N A, Xie Z, Communal C. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ Res*, 2001;88(10):1080—1087
- 9 Sing K, Balligand J L, Fischer T A. Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1995;270(47):28471—28478
- 10 Liaw L, Birk D E, Ballas. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest*, 1998;101(7):1468—1478

Effects of Simvastatin on OPN in Rats Undertaken Pressure Overload

XIAO Peng-bo, LIU Zheng-jian, LI Gao-yuan, ZHANG Xue-hong, ZHANG Yan*

(The 22th Hospital of the People's Liberation Army, Golmud 816000 P. R. China)

[Abstract] Objective to investigate the effects of simvastatin on OPN in rats undertaken pressure overload. Methods Sprague-Dawley rats were randomly allocated into three groups: The sham-operated groups ($n = 10$) , model groups($n = 10$) and simvastatin-treated groups($n = 10$). The model of pressure overload rat was established by abdominal aorta constriction. At the end of the treatment period, the left ventricular weight/body weight ratio , left ventricular mass,wall thickness (by echocardiography) , myocardial content of OPN (by westernblot) were assessed . Results ① The L_{VWR} of model group, as well as simvastatin-treated group , was significantly higher than sham-operated group($P < 0.01$) ; compared with model group, the ratio was lower in simvastatin-treated group($P < 0.01$). ② We observed a higher level of OPN expression in model group, as well as simvastatin-treated group , as compared to sham-operated group($P < 0.01$) ; significant higher level of OPN expression was observed in model group compared to simvastatin-treated group($P < 0.01$). The present data suggests that simvastatin's effects on cardiac function in rats undertaken pressure-overload can be related to OPN.

[Key words] simvastatin OPN hypertrophy left ventricular