

• 实验研究 •

转化生长因子- β_1 对大鼠心房纤维化和
缝隙连接蛋白 40 重构的影响

张卫泽 李丹丹 马 凌 陈永清 王 菲 宋振华 惠玲玲 王智刚

【摘要】 目的:采用大鼠心房纤维化的模型,探讨转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 对大鼠心房纤维化和缝隙连接蛋白(Cx)40 重构的影响及阿托伐他汀的防治作用。 **方法:**将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机等分为对照组(A)、盐酸异丙肾上腺素组(B)、盐酸异丙肾上腺素+阿托伐他汀组(C)。8 周后处死,Masson 染色法测大鼠心房纤维化程度,免疫组化法显示大鼠心肌组织 TGF- β_1 和 Cx40 分布特征,并半定量统计分析。rt-PCR 测大鼠心肌组织中 Cx40 mRNA 表达情况。 **结果:**与 A 组相比,B 组大鼠心肌组织 TGF- β_1 含量显著升高($P<0.01$),心房纤维化程度增加,Cx40 含量显著减少($P<0.01$),且分布紊乱;与 B 组相比,C 组大鼠心肌组织中 TGF- β_1 含量减少($P<0.05$),心房纤维化程度明显减轻,Cx40 含量升高($P<0.05$),分布基本恢复正常;与 A 组相比,C 组大鼠各指标均无明显变化($P>0.05$)。 **结论:**心肌组织中 TGF- β_1 含量增加可能是心房纤维化和 Cx40 重构的机制之一;阿托伐他汀可通过降低心肌组织中 TGF- β_1 含量显著改善心房纤维化程度和 Cx40 重构。

【关键词】 转化生长因子- β_1 ; 心房纤维化; 缝隙连接蛋白 40 重构; 阿托伐他汀

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2011.04.013

Effects of TGF- β_1 on atrial myocardial fibrosis and connexin 40 remodeling in rats ZHANG Weize¹, LI Dandan², MA Ling¹, CHEN Yongqing¹, WANG Fei¹, SONG Zhenhua², HUI Lingling¹, WANG Zhigang². 1. Department of Cardiology, Lanzhou Military General Hospital of PLA, Lanzhou Gansu 730050, China 2. The second affiliated hospital of Lanzhou University, Lanzhou Gansu 730000, China

【Abstract】 Objective: To observe the effects of TGF- β_1 on atrial myocardial fibrosis and connexin40 remodeling in rats and the protection of atorvastatin. **Methods:** 30 male Wistar rats were randomly divided into three groups. 8 weeks after the first intragastric administration, all the survival rats were anesthetized. The degree of atrial fibrosis was measured with Masson staining. Immunohistochemistry was used to measure the level and the distribution of TGF- β_1 and Cx40. RT-PCR was used to measure the expression of Cx40 mRNA. **Results:** Compared with group A, the level of TGF- β_1 and the degree of atrial fibrosis in the group B were markedly increased ($P<0.01$), while the mRNA expression and the level of Cx40 were decreased and the distribution was confused. Compared with group B, the level of TGF- β_1 and the degree of atrial fibrosis in the group C were reduced ($P<0.05$), while the mRNA expression and the level of Cx40 were elevated and the degree of confusion was reduced. Compared with group A, all the points of group C were unchanged.

Conclusion: The increase of TGF- β_1 in myocardium may be one of the important mechanism of atrial fibrosis and Cx40 remodeling, which can be inhibited effectively by atorvastatin.

【Key words】 TGF- β_1 ; Atrial myocardial fibrosis; Cx40 remodeling; Atorvastatin

近年来,随着对房颤研究的逐渐深入,心房纤

维化和缝隙连接蛋白 40(Cx40)重构以及两者之间的相互作用促使房颤发生和维持已成为研究热点。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 作为体内致纤维化的关键生长因子,其与心房纤维化和 Cx40 重构之间的

作者单位:730050 兰州军区兰州总医院心内科(张卫泽,马凌,李永清,王 菲,惠玲玲);730050 兰州大学第二临床医学院(李丹丹,宋振华,王智刚)

关系却鲜有报道。有证据表明,阿托伐他汀具有与调脂无关的抗心律失常作用。本实验采用大鼠心房纤维化的模型,初步探讨 TGF- β_1 与心房纤维化、Cx40 重构之间的关系及阿托伐他汀的作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作

将 30 只体重 200~220 g 健康雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组(A)、盐酸异丙肾上腺素组(B)和盐酸异丙肾上腺素 + 阿托伐他汀组(C),每组 10 只。A 组大鼠连续 7 d 给予左下腹皮下注射等体积生理盐水,B 组和 C 组大鼠连续 7 d 给予左下腹皮下注射 5 mg/kg 盐酸异丙肾上腺素;C 组大鼠在给予盐酸异丙肾上腺素的第 2 天及之后每天给予 30 mg/kg 阿托伐他汀灌胃,而 A 组和 B 组大鼠则分别每天给予 30 mg/kg 生理盐水灌胃,每周测量 1 次体重,调整药物剂量,相同环境下喂养 8 周。

1.2 标本采集及处理

取部分心脏组织置于 10% 福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,取心脏冠状面最大横径处切片,连续切片 3 张,切片厚 4 μ m,1 张用于 Masson 染色,另 2 张用于免疫组化染色。

1.3 Masson 染色及胶原容积分数计算

二甲苯溶液脱蜡,梯度酒精分化,水洗。苏木素染 5 min、流水冲洗 2 min、丽春红品红溶液染 5 min、蒸馏水洗,1% 磷钼酸分化切片约 5 min、蒸馏水洗,1% 亮绿滴染 10 s、水洗,梯度酒精分化、吹干、二甲苯透明、树脂封固。每组大鼠随机选取 5 张心肌切片,随机选取 3 个无血管视野($\times 400$),通过灰度调节区别胶原和非胶原成分,计算心肌胶原容积分数(CVF)。CVF = 胶原面积/全视野面积 $\times 100\%$ 。

1.4 免疫组织化学染色

脱蜡,1 份 30% H_2O_2 加 10 份蒸馏水混合液中处理 10 min,水洗;置于枸橼酸缓冲液(pH6.0)中,加热至沸腾后冷却,PBS 清洗 2 次;加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加 1:150 稀释的 TGF- β_1 和 Cx40 多克隆抗体(兔抗鼠 IgG),4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 清洗 2 min、3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 20 min,PBS 清洗 2 min、3 次;加入链酶亲和素-生物素-过氧化物酶,37 $^{\circ}$ C 20 min,PBS 清洗 5 min、2 次;显色 10 min,脱水、透明、封片。每组选取 5 张切片光镜下观察心肌组织,每张切片随机选取 3 个视野,测定阳性物质平均吸光度(OD),对大鼠 TGF- β_1 和 Cx40 光密度参数进行半定量分析。

1.5 RT-PCR 反应

将 100 mg 心肌组织于液氮中充分研磨,参照试剂盒说明提取组织 RNA,测 OD 值均在 1.8~2.0 之间。取 4 μ g RNA 稀释液配 20 μ l 反应体系进行逆转录,反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,生成 cDNA。目标基因 Cx40 引物为上游:5'-GCTGGTATTTG GATGGCTGAAGA-3'、下游:5'-AGAATCATA GCGTCGGTGTCAGG-3',扩增片段长度为 97 bp;内参照基因 GAPDH 引物上游:5'-GGCAC AGTCAAGGCTGAGAATG-3',下游:5'-ATGGT GGTGAAGACGCCAGTA-3',扩增片段长度为 143 bp。反应条件:50 μ l 反应体系,94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

产物采用 3% 琼脂糖凝胶电泳,BIO2RAD 凝胶成像系统拍照,Quantity One 软件进行面积灰度扫描,以密度代表基因表达丰度并进行半定量,半定量指标为 Cx40 丰度/GAPDH 丰度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS10.0 进行数据处理,计量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,相关分析采用偏相关分析, $P \leq 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 Masson 染色及胶原容积分数计算

经 Masson 染色,心肌染红色、细胞核染蓝色、胶原纤维染绿色。各组心肌 Masson 染色片见图 1。

CVF 比较: B 组大鼠心肌组织胶原容积分数明显高于 A 组,C 组大鼠心肌组织中胶原容积分数较 B 组减少($P < 0.05$,见表 1)。

2.2 免疫组化染色观察

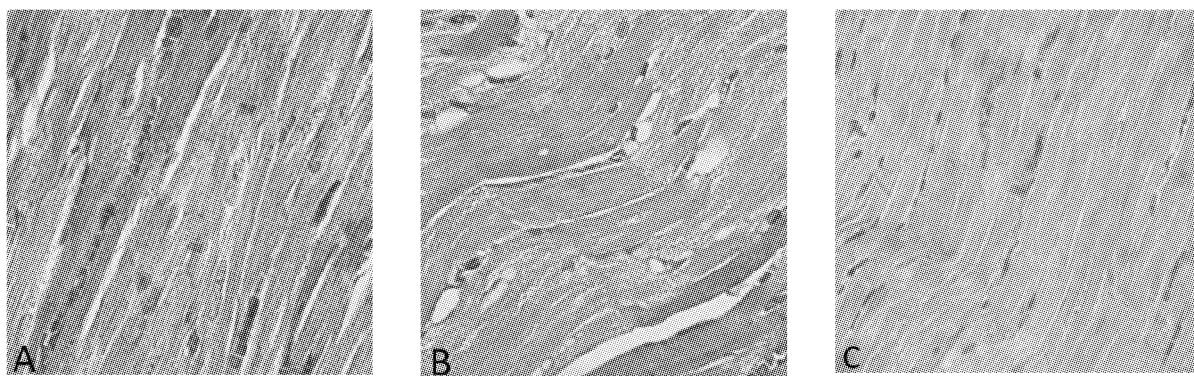
TGF- β_1 阳性染色呈棕黄色见图 2,Cx40 阳性染色呈棕黄色颗粒见图 3。

半定量分析:与 A 组相比,B 组大鼠心肌组织 TGF- β_1 含量显著升高,Cx40 含量显著减少;与 B 组相比,C 组大鼠心肌组织中 TGF- β_1 含量减少,Cx40 含量升高(见表 1)。

表 1 3 组大鼠心肌 CVF、TGF- β_1 和 Cx40 比较

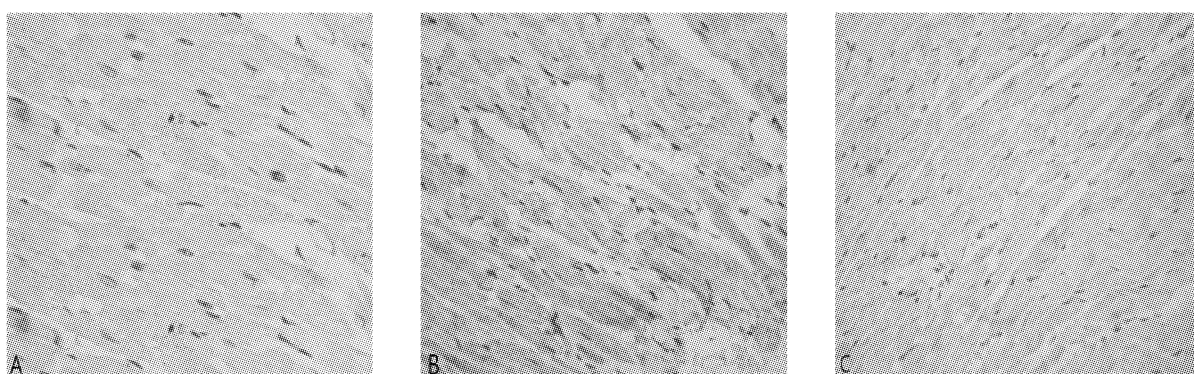
组别	CVF(%)	TGF- β_1 (OD)	Cx40 (OD)
A	4.98 \pm 1.84	1.83 \pm 1.07	0.39 \pm 0.06
B	10.20 \pm 2.43 ⁽¹⁾	3.96 \pm 0.87 ⁽¹⁾	0.29 \pm 0.02 ⁽¹⁾
C	6.90 \pm 0.85 ⁽²⁾	2.35 \pm 0.69 ⁽²⁾	0.36 \pm 0.05 ⁽²⁾

注:A 组比较,⁽¹⁾ $P < 0.01$;与 B 组比较⁽²⁾ $P < 0.05$



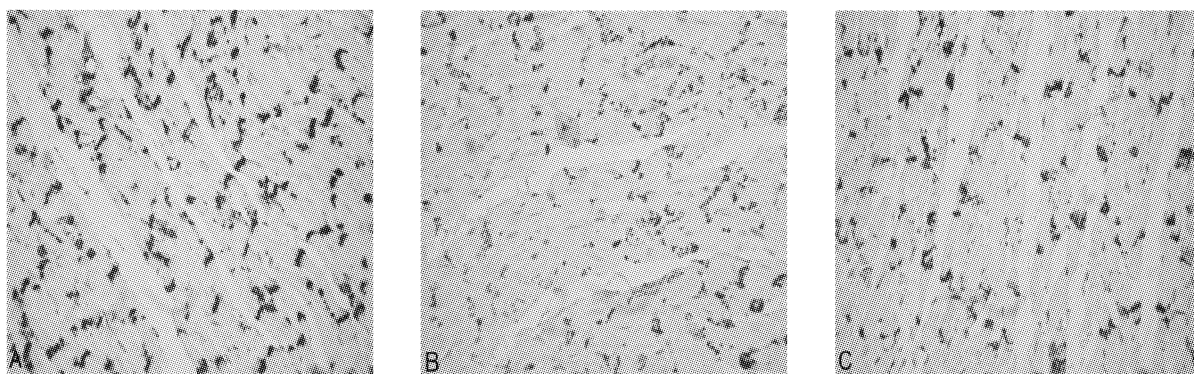
注: A 组心肌未见明显胶原纤维; B 组心肌间质出现明显胶原纤维, 染深绿色; C 组胶原纤维含量较 B 组明显减少($\times 400$)

图 1 3 组大鼠心肌 Masson 染色片



注: A 组未见 TGF- β_1 明显阳性表达; B 组 TGF- β_1 明显阳性表达, 呈大范围棕黄色染色; C 组 TGF- β_1 阳性表达较 B 组明显减弱($\times 400$)

图 2 3 组大鼠心房肌 TGF- β_1 免疫组化染色结果



注: A 组 Cx40 分布密集, 排列规则, 多位于心肌细胞端-端相接处; B 组 Cx40 分布密度降低, 多位于心肌细胞的侧边、细胞浆中或聚集于细胞核周围; C 组 Cx40 分布不均一程度较 B 组明显减轻($\times 400$)

图 3 3 组大鼠心房肌 Cx40 免疫组化染色结果

2.3 大鼠心肌 Cx40mRNA 表达情况

半定量分析表明, B 组大鼠心肌组织 Cx40 mRNA 表达量(0.34 ± 0.06)较 A 组(0.42 ± 0.06)明显减少($P < 0.01$); C 组(0.41 ± 0.05)较 B 组增加($P < 0.05$); C 组与 A 组相比 Cx40 mRNA 表达量无明显变化($P > 0.05$)。

2.4 相关性分析

心肌组织中 TGF- β_1 含量与心房纤维化程度呈

正性相关($r = 0.577, P < 0.05$); 与 Cx40 含量呈负相关($r = -0.514, P < 0.01$)。

3 讨论

TGF- β_1 作为体内致纤维化的关键生长因子, 能在转录、转录后及翻译水平增加纤维结合素、胶原、玻璃黏连蛋白和蛋白聚糖等基质成份的合成; 同时可通过抑制胶原酶等金属蛋白酶(MMPs)的分泌及刺激金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)的表达而抑制胶

原等的降解,从而在肾、肺及皮肤等组织器官纤维化过程中起重要的作用。本实验发现,正常组大鼠心肌组织中 TGF- β_1 含量较低,大鼠心肌未见明显胶原纤维;随着大鼠心肌组织中 TGF- β_1 含量的升高,心肌纤维化程度也随之升高,表明 TGF- β_1 可能也在心房纤维化过程中发挥重要作用。

本研究观察了 TGF- β_1 对心房 Cx40 含量和分布的影响,发现随着心肌组织中 TGF- β_1 含量的升高,心房组织中 Cx40 含量逐渐减少,且分布紊乱,远离闰盘,这提示心肌组织中 TGF- β_1 含量的升高可能导致 Cx40 重构。本实验结果与 Luo 等^[3]的研究结果相一致。其机制可能是 TGF- β_1 通过改变细胞周期,使 Cx40 表达减少^[4]和 I、III 型胶原合成、分泌增加^[5],一部分缝隙连接被心肌纤维化分开,导致电传导脱耦联,而另一部分缝隙连接则局部发生聚集。缝隙连接蛋白的合成减少以及重新分布导致了心肌传导速度减慢和传导各向异性的增加。

如能阻止心肌组织中 TGF- β_1 含量升高,则能有效阻止心房纤维化和 Cx40 重构。本实验发现,在 C 组大鼠给予阿托伐他汀治疗 8 周后,心肌组织中 TGF- β_1 含量较 B 组明显下降,未见明显成纤维细胞增生和胶原纤维形成,且心肌组织中 Cx40 含量基本恢复正常,分布不均一程度亦较明显减轻,C 组与 A 组相比各项指标均无明显变化。这一实验结果证实了上述设想的可行性。他汀类药物可抑制类异戊二烯的生成,类异戊二烯可与小分子单体 G 蛋白 Rho、Ras 和 Rac 等的 C 末端相连,增加后者的亲脂性(异戊烯化)。异戊烯化是激活小 G 蛋白的关键步骤,而这些小分子单体 G 蛋白对于 TGF- β_1 的表达及其通过 Rho/ROCK 等通路介导结缔组织生长因子(CTGF)、I α 胶原和血纤维蛋白溶酶原激活抑制剂-1(PAI-1)等的活性是必须的,故阿托伐他汀可能是通过抑制异戊烯化而降低了 TGF- β_1 含量及其在心房纤维化和 Cx40 重构过程中的强大

作用^[6]。

总之,本实验证明了心肌组织中 TGF- β_1 含量增加可能是心房纤维化和 Cx40 重构的机制之一;阿托伐他汀可通过降低心肌组织中 TGF- β_1 含量显著改善心房纤维化程度和 Cx40 重构。本实验为 TGF- β_1 成为有效预防和治疗房颤的新靶点提供了有力证据,同时为阿托伐他汀应用于房颤的临床防治提供了新的依据。房颤的发生和维持机制极其复杂,本实验结论还需要大量的基础和临床研究证实。

参 考 文 献

- [1] Araújo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher - Moreno AM, et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardiopathy [J]. J Infect Dis, 2002, 186(12):1823-1828.
- [2] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.
- [3] Luo MH, Li YS, Yang KP. Fibrosis of collagen I and remodeling of connexin 43 in atrial myocardium of patients with atrial fibrillation[J]. Cardiology, 2007, 107(4): 248-253.
- [4] Waghbi MC, Coutinho-Silva R, Feige JJ, et al. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor-beta treatment and Trypanosoma cruzi infection[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009, 104(8): 1083-1090.
- [5] Rucker-Martin C, Pecker F, Godreau D, et al. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(1): 38-52.
- [6] Burke JP, Watson RW, Murphy M, et al. Simvastatin impairs smad-3 phosphorylation and modulates transforming growth factor β_1 -mediated activation of intestinal fibroblasts [J]. Br J Surg, 2009, 96(5): 541-551.
- [7] Cordle A, Koenigsnecht-Talboo J, Wilkinson B, et al. Mechanisms of statin mediated inhibition of small G-protein function[J]. J Biol Chem, 2005, 280(40): 34202-34209.

(收稿:2010-12-17 修回:2011-02-23)

(本文编辑:丁媛媛)

• 敬告读者 •

因主办单位上海市医学科学技术情报研究所电话线路改造,自 2011 年 6 月起,本编辑部电话号码改为:021-33262055;传真号码改为:021-33262059。

《国际心血管病杂志》编辑部