

法舒地尔对压力超负荷大鼠心肌肝细胞生长因子表达的影响

赵智明 张 静 张蓓蓓 蔡 辉

【摘要】 目的:观察法舒地尔对压力超负荷大鼠心肌肝细胞生长因子(HGF)表达的影响,探讨法舒地尔防治心肌纤维化的作用机制。 方法:采用腹主动脉缩窄法建立压力超负荷心肌纤维化大鼠模型。假手术组($n=8$)仅分离但不予结扎腹主动脉。术后4周末,将手术组存活的28只大鼠随机分为模型组($n=10$)、法舒地尔高剂量组(FH组, $n=9$)和法舒地尔低剂量组(FL组, $n=9$)。药物干预4周后,计算大鼠心脏质量指数(HMI)和左心室质量指数(LVMI)。观察心肌病理学改变,测量胶原容积分数(CVF)和血管周围胶原容积分数(PCVF)。免疫组织化学法分析心肌 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、磷酸化肌球蛋白磷酸酶靶蛋白亚基1(p-MYPT1)、HGF和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的表达。 结果:FH和FL组较模型组HMI、LVMI、CVF、PCVF及 α -SMA、p-MYPT1、TGF- β 1的平均光密度值明显降低,HGF的平均光密度值明显升高(P 均 <0.05),且FH组与FL组相比作用更明显。 结论:法舒地尔改善压力超负荷大鼠心肌纤维化的作用可能与促进HGF的表达有关。

【关键词】 法舒地尔;压力超负荷;心肌纤维化;肝细胞生长因子

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.01.008

Effect of Fasudil on myocardial hepatocyte growth factor expression in pressure-overload rats ZHAO Zhiming, ZHANG Jing, ZHANG Beibei, CAI Hui. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Jiangsu 210002, China

【Abstract】 Objective: To observe the effect of Fasudil on expression level of myocardial hepatocyte growth factor (HGF) in pressure-overload rats and investigate the mechanisms involved in anti-myocardial fibrosis effect of Fasudil. **Methods:** Pressure overload induced myocardial fibrosis models were established by abdominal aortic constriction. In Sham group ($n=8$), the abdominal aorta of rat was just separated but not ligated. After operation for 4 weeks, 28 survival rats in operation group were randomly divided into 3 groups, which were Model group ($n=10$), Fasudil-High dose group (FH group, $n=9$) and Fasudil-Low dose group (FL group, $n=9$). Another 4 weeks after drug intervention, the heart mass indexes (HMI) and left ventricular mass indexes (LVMI) of rats were calculated. Pathological changes of the myocardium were observed to assess the collagen volume fraction (CVF) and perivascular collagen volume fraction (PCVF). The expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), phosphorylated myosin phosphatase target subunit 1 (p-MYPT1), HGF and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) were analysed by immunohistochemistry. **Results:** The HMI, LVMI, CVF, PCVF and mean optical density of α -SMA, p-MYPT1 and TGF- β 1 in FH and FL groups were significantly decreased compared with those of Model group ($P<0.05$), whereas the mean optical density of HGF was markedly increased (all $P<0.05$). The effects in FH group were more obvious than those in FL group. **Conclusion:** Fasudil may attenuate pressure-overload rats' myocardial fibrosis by enhancing the expression of hepatocyte growth factor.

【Key words】 Fasudil; Pressure overload; Myocardial fibrosis; Hepatocyte growth factor

基金项目:南京军区南京总医院科研基金(2014016)

作者单位:210002 南京军区南京总医院中西医结合科

通信作者:蔡 辉,Email:njzy_caihui@163.com

压力超负荷除了使心肌细胞代偿性肥大外,还可促进心脏成纤维细胞过度增殖和胶原合成,引起心肌纤维化,导致慢性心力衰竭。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种高效的促修复因子。研究发现, HGF 在多种心血管疾病中能通过抗心肌细胞凋亡、促进血管新生和抑制心肌纤维化等机制,发挥保护心功能的作用^[1]。Rho 激酶(Rho-associated kinase, ROCK)抑制剂法舒地尔能改善压力超负荷大鼠心肌纤维化^[2],然而其作用机制尚不明确,本研究初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性 SD 大鼠 50 只,体质量(180±20) g,由南京军区南京总医院动物实验中心提供[动物合格证号:SYXK(苏)2003-0032]。饲养环境:室温 20~25℃,相对湿度 40%~60%,每日光照时间 8:00~20:00,常规饲料喂养,自由进食、饮水。

1.2 药品与主要试剂

盐酸法舒地尔注射液(2 mL:30 mg)由天津红日药业股份有限公司惠赠,羟脯氨酸测定试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司,磷酸化肌球蛋白磷酸酶靶蛋白亚基 1(phosphorylated myosin phosphatase target subunit 1, p-MYPT1)一抗购自北京博奥森生物公司, α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、HGF 和转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)一抗、辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗、DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒、EliVision plus 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 压力超负荷模型制备

给大鼠编号,随机抽取 42 只行腹主动脉缩窄术,其余 8 只行假手术。所有大鼠术前禁食 12 h,自由饮水。用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)行腹腔注射麻醉。于剑突下沿腹正中线逐层开腹,在肾动脉上方分离腹主动脉。手术组在肾动脉上方 0.5 cm 处用直径 0.70 mm 银夹夹闭,使腹主动脉缩窄 60%~70%,假手术组大鼠不夹闭腹主动脉。将脏器复位后逐层关闭腹腔。术后 6 h 后恢复大鼠饮食,连续 3 d 肌注青霉素 10 万 U·kg⁻¹·d⁻¹抗感染。

1.4 分组及给药方法

手术 4 周后,手术组死亡 14 只,假手术组无死亡。将手术组造模成功大鼠随机分为模型组

($n=10$)、法舒地尔高剂量组(FH 组, $n=9$)和法舒地尔低剂量组(FL 组, $n=9$),依据法舒地尔说明书及大鼠体内药理研究文献,分别经腹腔注射生理盐水 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹、法舒地尔 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹和法舒地尔 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹。假手术组($n=8$)经腹腔注射生理盐水 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹。

1.5 心脏质量指数测定

给药 4 周后,共存活大鼠 31 只,模型组死亡 3 只, FH 组和 FL 组各死亡 1 只,死亡原因为严重心力衰竭,假手术组无死亡。所有大鼠称体质量,麻醉完全后迅速开胸剪取心脏,洗去血液,滤纸吸干,除去心房及大血管,称取心脏质量,再剪去右心室游离壁,保留左心室及室间隔,称取左心室质量。计算心脏质量指数(heart mass index, HMI = 心脏质量/体质量)和左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI = 左心室质量/体质量)。透壁剪取左心室心尖部分组织投入液氮中,其余标本放于 4℃的 4%多聚甲醛中固定。

1.6 心肌病理学分析

心肌标本于甲醛中固定 24 h 后,常规取材、脱水、石蜡包埋,沿左室长轴线每隔 1 mm 横断面切取数张 4 μ m 厚的切片,作 HE 和 Masson 染色。光镜下观察组织病理形态,每个标本随机取 5 个视野,采用专业图片分析软件 Image-Pro Plus 6.0 测量胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF = 胶原面积/不包括血管周围胶原面积)/心肌纤维和结缔组织面积总和]和血管周围胶原容积分数(perivascular collagen volume fraction, PCVF = 血管周围胶原面积/血管面积)。

1.7 免疫组织化学法检测心肌 α -SMA、p-MYPT1、HGF 和 TGF- β 1 的表达

切片烘烤后,常规二甲苯脱蜡及乙醇梯度脱水,柠檬酸盐抗原修复缓冲液中进行抗原修复。灭活过氧化物酶,加入一抗孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗, DAB 显色,苏木素染核,脱水并封片。光镜下观察组织细胞中蛋白的表达情况,黄色为表达阳性,每张切片随机取 5 个视野拍照。用 Image-Pro Plus 6.0 测量这些区域的平均光密度。因为 α -SMA 还表达于血管平滑肌细胞,所以计算时应选择血管平滑肌细胞外区域进行分析。

1.8 统计学分析

用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差表示。各组间均数比较采用单

因素方差分析; 两组间均数比较, 方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用 Dunnett T3 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏质量指数比数

手术 8 周后, 模型组大鼠 HMI 和 LVMI 较假手术组均显著升高 (P 均 <0.05); FH 组和 FL 组较模型组 HMI 和 LVMI 均显著降低 (P 均 <0.05), 其中 FH 组较 FL 组下降更明显, 但 2 组间差异无

统计学意义, 见表 1。
2.2 各组大鼠心肌病理形态比较

模型组大鼠心肌纤维较假手术组排列紊乱, 可见微小坏死灶, 间质和血管周围蓝色胶原大量沉积, CVF 和 PCVF 显著升高; 法舒地尔治疗 4 周后, FH 组和 FL 组大鼠心肌纤维化情况较模型组改善, 间质和血管周围胶原减少, CVF 和 PCVF 均明显降低 (P 均 <0.05), 且 FH 组较 FL 组 CVF 和 PCVF 显著降低 (P 均 <0.05), 见图 1、表 1。

表 1 各组大鼠 HMI、LVMI 及心肌 CVF、PCVF 的比较

组别	<i>n</i>	HMI/mg · kg ⁻¹	LVMI/mg · kg ⁻¹	CVF/%	PCVF/%
假手术组	8	2.63 ± 0.13	2.08 ± 0.11	1.74 ± 0.38	22.98 ± 3.23
模型组	7	3.23 ± 0.25 ⁽¹⁾	2.75 ± 0.20 ⁽¹⁾	5.99 ± 0.49 ⁽¹⁾	89.83 ± 3.54 ⁽¹⁾
FH 组	8	2.85 ± 0.15 ⁽²⁾	2.31 ± 0.13 ⁽²⁾	2.13 ± 0.71 ⁽²⁾⁽³⁾	49.43 ± 2.41 ⁽²⁾⁽³⁾
FL 组	8	3.00 ± 0.27 ⁽²⁾	2.50 ± 0.23 ⁽²⁾	5.39 ± 0.43 ⁽²⁾	84.08 ± 6.29 ⁽²⁾

注: 与假手术组比较, ⁽¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ⁽²⁾ $P<0.05$; 与 FL 组比较, ⁽³⁾ $P<0.05$

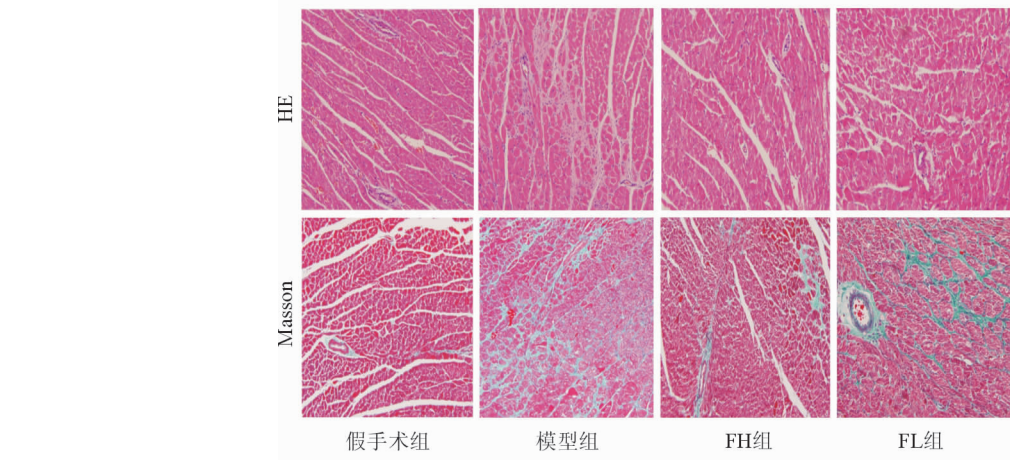


图 1 各组大鼠心肌 HE 和 Masson 染色 (×200)

2.3 各组大鼠心肌 α-SMA、p-MYPT1、HGF 和 TGF-β1 的表达

各组大鼠心肌免疫组织化学染色及分析结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌 α-SMA、TGF-β1 和 p-MYPT1 在胞浆内的棕黄色沉淀明显增多, 三者的平均光密度均显著升高 (P 均 <0.05), 而 HGF 在胞浆内的棕黄色沉淀减少, 其平均光密度下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, FH 组和 FL 组

大鼠心肌 α-SMA、TGF-β1 和 p-MYPT1 在胞浆内的棕黄色沉淀均明显减少, 三者的平均光密度明显下降 (P 均 <0.05), 而两组 HGF 在胞浆内的棕黄色沉淀增多, 平均光密度值升高 ($P<0.05$); 与 FL 组比较, FH 组 α-SMA 和 TGF-β1 平均光密度降低 (P 均 <0.05), 而 HGF 平均光密度明显升高 ($P<0.05$), 两组间 p-MYPT1 的平均光密度差异无统计学意义, 见表 2、图 2。

表 2 各组大鼠心肌 α-SMA、p-MYPT1、HGF 和 TGF-β1 平均光密度的比较

组别	<i>n</i>	α-SMA	p-MYPT1	HGF	TGF-β1
假手术组	8	0.004 ± 0.003	0.029 ± 0.014	0.076 ± 0.005	0.019 ± 0.009
模型组	7	0.034 ± 0.009 ⁽¹⁾	0.063 ± 0.001 ⁽¹⁾	0.031 ± 0.005 ⁽¹⁾	0.058 ± 0.019 ⁽¹⁾
FH 组	8	0.016 ± 0.006 ⁽²⁾⁽³⁾	0.030 ± 0.013 ⁽²⁾	0.051 ± 0.005 ⁽²⁾⁽³⁾	0.022 ± 0.013 ⁽²⁾⁽³⁾
FL 组	8	0.027 ± 0.007 ⁽²⁾	0.040 ± 0.011 ⁽²⁾	0.037 ± 0.004 ⁽²⁾	0.039 ± 0.014 ⁽²⁾

注: 与假手术组比较, ⁽¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ⁽²⁾ $P<0.05$; 与 FL 组比较, ⁽³⁾ $P<0.05$

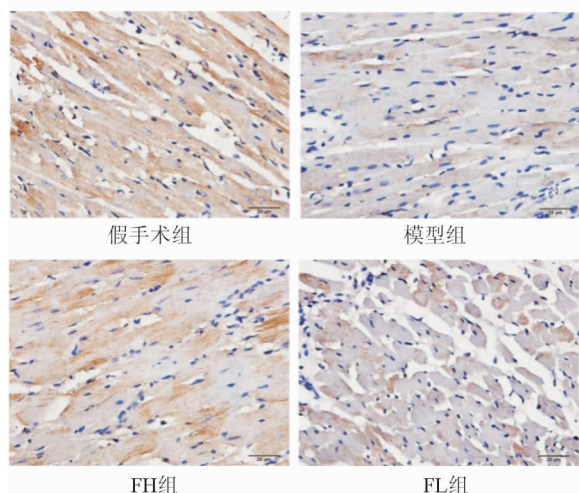


图 2 各组大鼠心肌 HGF 免疫组织化学染色($\times 400$)

3 讨论

心肌细胞外基质中胶原过度沉积,即心肌纤维化,是左心室肥厚、心律失常^[3]及慢性心力衰竭的重要原因。纤维化心肌的重要特征是肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)的出现,其特征性标志物为 α -SMA^[4]。本实验采用腹主动脉缩窄法制作压力超负荷大鼠模型,于造模手术 4 周后开始给予法舒地尔干预。手术 8 周后,模型组大鼠 HMI 和 LVMI 较假手术组升高,病理切片可见心肌纤维排列紊乱、间质和血管周围大量蓝色胶原沉积,CVF 和 PCVF 显著升高,且 α -SMA 的表达升高,说明压力超负荷可引起左心室肥厚和心肌纤维化。

ROCK 是小 GTP 结合蛋白 Rho 的效应分子,在心肌纤维化过程中起着重要作用。Rho/ROCK 信号通路介导的肌动蛋白骨架重组对成纤维细胞向 MFB 分化及 MFB 收缩和迁移等行为起关键作用^[5-6],故阻断 Rho/ROCK 信号通路是防治组织纤维化的有效方法^[7]。MYPT1 是 ROCK 的特异性底物,故本实验利用 p-MYPT1 的表达水平反映 ROCK 的活性。实验结果显示,模型组大鼠心肌 p-MYPT1 表达水平较假手术组显著升高,反映了模型组 ROCK 活性显著升高。法舒地尔是 Rho 激活酶抑制剂,可抑制心肌 ROCK 活性,改善大鼠心肌间质和血管周围的胶原沉积,降低 CVF 和 PCVF,下调 α -SMA 的表达,说明 ROCK 在压力超负荷诱导的心肌纤维化过程中具有重要作用。

HGF 是重要的抗纤维化因子,在人体中分布广泛,参与多个器官的结构修复^[8]。心肌纤维化与局部 HGF 浓度降低、抗纤维化作用下降密切相关,同

时外源性 HGF 能改善心肌纤维化^[9-10]。拮抗 TGF- β 1 的作用是 HGF 抗心肌纤维化的重要机制之一。Yi 等^[11]发现,HGF 的表达水平在经 TGF- β 1 处理 48 h 的心脏成纤维细胞中显著降低,而使 HGF 过表达则可抑制 TGF- β 1 诱导的心脏成纤维细胞的增殖、分化和分泌,从而降低 α -SMA 和 I、III 型胶原的表达。Okayama 等^[12]报道,HGF 可抑制 TGF- β 1 诱导的冠状动脉内皮细胞向 MFB 分化,从而改善心肌纤维化。Wang 等^[13]认为,抑制神经内分泌激活及抑制心肌细胞凋亡,可能是腺病毒重组 HGF 改善肺动脉高压模型大鼠右心室肥厚和纤维化的作用机制。本实验发现,心肌纤维化模型大鼠心肌 HGF 表达明显降低,TGF- β 1 表达升高,而法舒地尔治疗可使 HGF 表达明显升高,TGF- β 1 表达明显降低,这与上述研究报道一致。

法舒地尔可改善压力超负荷诱导的心肌纤维化的作用,可能与促进心肌 HGF 的表达有关。

参 考 文 献

- [1] Gallo S, Sala V, Gatti S, et al. HGF/Met axis has anti-apoptotic and anti-autophagic function in hypoxic cardiac injury [J]. *Biomedicines*, 2014, 1(6), 292-294.
- [2] 张培勇,蔡 辉,赵凌杰. Rho 激酶抑制剂对压力超负荷大鼠心肌纤维化的影响[J]. *微循环学杂志*, 2013, 23(1): 12-15.
- [3] Fontes MS, Raaijmakers AJ, van Doorn T, et al. Changes in Cx43 and NaV 1.5 expression precede the occurrence of substantial fibrosis in calcineurin-induced murine cardiac hypertrophy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e87226.
- [4] 张蓓蓓,张 静,常文静,等. 丹参酮 II A 对压力超负荷大鼠心肌纤维化的影响[J]. *国际心血管病杂志*, 2015, 42(4): 251-255.
- [5] Cavin S, Maric D, Diviani D. A-kinase anchoring protein-Lbc promotes pro-fibrotic signaling in cardiac fibroblasts [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(2):335-345.
- [6] Manickam N, Patel M, Griendling KK, et al. RhoA/Rho kinase mediates TGF- β 1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 307(2): F159-171.
- [7] Tsou PS, Haak AJ, Khanna D, et al. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 8. Current and future drug targets in fibrosis: focus on Rho GTPase-regulated gene transcription[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 307(1):C2-13.
- [8] Kim MD, Kim SS, Cha HY, et al. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis [J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46:e110.

(下转第 42 页)

参 考 文 献

- [1] 朱晓东. 心脏外科基础图解[M]. 第 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社,2010;374-375.
- [2] Constantine M, Carl LB. 小儿心脏外科学[M]. 第 4 版. 上海:上海世图出版社, 2014;467-481.
- [3] Jonas RA. 先天性心脏病外科综合治疗学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2009;439-452.
- [4] Dohlen G, Chaturvedi RR, Benson LN, et al. Stenting of the right ventricular outflow tract in the symptomatic infant with tetralogy of Fallot[J]. Heart, 2009, 95(2): 142-147.
- [5] Chern MJ, Wu MT, Her SW. Numerical study for blood flow in pulmonary arteries after repair of tetralogy of Fallot[J]. Comput Math Methods Med, 2012, 2012;198108.
- [6] Kim H, Sung SC, Chang YH, et al. Early and midterm outcomes of left pulmonary artery angioplasty using an anterior wall flap of the main pulmonary artery in tetralogy of Fallot repair[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 148(6): 2597-2601.
- [7] Chowdhury UK, Agarwal S, Kothari SS, et al. Alternative approach for angioplasty of stenosed left pulmonary artery following intracardiac repair of tetralogy of Fallot[J]. Heart Lung Circ, 2002, 11(2): 121-125.
- [8] Zhang W, Liu J, Yan Q, et al. Computational haemodynamic analysis of left pulmonary artery angulation effects on pulmonary blood flow[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016, 23(4):519-525
- [9] Wilson WJ, Amplatz K. Unequal vascularity in tetralogy of Fallot[J]. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med, 1967, 100(2): 318-321.
- [10] Snider AR, Enderlein MA, Teitel DF, et al. Two-dimensional echocardiographic determination of aortic and pulmonary artery sizes from infancy to adulthood in normal subjects[J]. Am J Cardiol, 1984, 53(1):218-224.
- [11] van Meurs-van Woezik H, Debets T, Klein HW, et al. Growth of the internal diameters in the pulmonary arterial tree in infants and children[J]. J Anat, 1987, 151(4): 107-115.
- [12] Lappen RS, Riggs TW, Lapin GD, et al. Two-dimensional echocardiographic measurement of right pulmonary artery diameter in infants and children[J]. J Am Coll Cardiol, 1983, 2(1):121-126.

(收稿:2016-06-26 修回:2016-11-29)

(本文编辑:胡晓静)

(上接第 33 页)

- [9] Hu ZP, Bao Y, Chen DN, et al. Effects of recombinant adenovirus hepatocyte growth factor gene on myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2013, 18(5):476-480.
- [10] Nakano J, Marui A, Muranaka H, et al. Effects of hepatocyte growth factor in myocarditis rats induced by immunization with porcine cardiac myosin [J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2014, 18(3):300-307.
- [11] Yi X, Li X, Zhou Y, et al. Hepatocyte growth factor regulates the TGF- β 1-induced proliferation, differentiation and secretory function of cardiac fibroblasts[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(2):381-390.
- [12] Okayama K, Azuma J, Dosaka N, et al. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition[J]. Hypertension, 2012, 59(5): 958-965.
- [13] Wang X, Wang Y, Rong S, et al. Hepatocyte growth factor improves right ventricular remodeling in pulmonary arterial hypertensive rats via decreasing neurohormonal activation and inhibiting apoptosis[J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(10): 1924-1930.

(收稿:2016-02-15 修回:2016-09-20)

(本文编辑:丁媛媛)