

甲状旁腺激素相关肽改善小鼠心肌梗死后心脏功能的研究

张浩 张定国 夏光伟 王一鸣 高阳

【摘要】 目的:探讨甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)的核定位序列(NLS)及 C 末端共同组成的 PTHrP(87-139)片段对小鼠心肌梗死后心脏功能的影响。 方法:将 C57BL/6 野生型雄性小鼠随机分为 3 组,每组 11 只。假手术组对心脏前降支穿针但不进行结扎,1 d 后腹部皮下注射生理盐水;心肌梗死组结扎心脏前降支,1 d 后腹部皮下注射生理盐水;心肌梗死 + PTHrP 组结扎心脏前降支,1 d 后腹部皮下注射 PTHrP(87-139),剂量为 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。各组每日注射 1 次,持续注射 4 周后,超声心动图评估心脏功能,免疫组织化学染色检测心肌 CD31 表达情况,马松染色检测心肌纤维化程度,Western blot 检测血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等血管相关因子的表达水平。 结果:与假手术组相比,心肌梗死组左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)均明显降低,左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)、心脏质量/体质量比值、肺质量/体质量比值、心肌梗死边缘区的心肌纤维化程度均明显升高(P 均 < 0.05);与心肌梗死组相比,心肌梗死 + PTHrP 组 LVEF、LVFS、LVEDD、LVESD 等显著改善,心脏质量/体质量比值、肺质量/体质量比值、心肌梗死边缘区的心肌纤维化程度均明显降低(P 均 < 0.05)。与假手术组相比,心肌梗死组心肌梗死边缘区 CD31 表达水平有轻微升高,但两组间差异无统计学意义,而 VEGF、VEGFR-2、bFGF 表达水平均明显降低(P 均 < 0.05);与心肌梗死组相比,心肌梗死 + PTHrP 组 CD31、VEGF、VEGFR-2、bFGF 表达水平均明显升高(P 均 < 0.05)。 结论:PTHrP(87-139)能够减少心肌梗死后心肌间质纤维化,促进梗死边缘区新生血管生成,改善心脏功能。

【关键词】 心肌梗死;核定位序列;甲状旁腺激素相关肽

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.06.005

Parathyroid hormone-related peptide preserves cardiac function in a mouse myocardial infarction model

ZHANG Hao¹, ZHANG Dingguo², XIA Guangwei¹, WANG Yiming², GAO Yang¹. 1. Department of Cardiology, The Affiliated Hospital of Yangzhou University, Jiangsu 225000; 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu 210000, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of fragment parathyroid hormone-related peptide 87 to 139 [PTHrP(87-139)] consisting of nuclear localization sequence (NLS) and C-terminal fragment of PTHrP on cardiac function after myocardial infarction (MI) in mice. **Methods:** Male wild-type C57BL/6 mice were randomly divided into three groups with 11 mice in each group. In the sham-operated group, the anterior descending artery was punctured but not ligated, and the mice were injected subcutaneously at abdomen with normal saline one day later. In the MI group, the anterior descending artery was ligated and normal saline was injected subcutaneously one day later. In the MI + PTHrP group, the anterior descending artery was ligated, and PTHrP(87-139) was injected subcutaneously into the abdomen at a

基金项目:国家自然科学基金(81000058)

作者单位:225000 扬州大学附属医院心脏科(张浩,夏光伟,高阳);210000 南京医科大学第一附属医院心脏科(张定国,王一鸣)

通信作者:高阳,Email:zyzygy@sina.com

dose of 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ one day later. Each group was injected subcutaneously once a day for 4 weeks. Echocardiography was performed to evaluate the cardiac function of mice in each group. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of CD31, and the degree of myocardial fibrosis was evaluated by Masson staining. Western blot was used to observe the expression of vascular-related factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and basic fibroblast growth factor (bFGF). **Results:** Compared with the sham-operated group, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular short axis shortening rate (LVFS) significantly decreased, and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), heart weight/body weight ratio, lung weight/body weight ratio and the degree of myocardial fibrosis in the marginal zone of MI were significantly increased in the MI group (P all < 0.05). Compared with the MI group, LVEF, LVFS, LVEDD and LVESD were significantly improved and heart/body weight ratio, lung/body weight ratio and the degree of myocardial fibrosis in the marginal zone of MI were significantly decreased in the MI + PTHrP group (P all < 0.05). Compared with the sham-operated group, the expression of CD31 in the marginal zone of MI increased slightly in the MI group, but there was no significant difference between the two groups, while the expression of VEGF, VEGF-2 and bFGF were significantly decreased in the MI group. Compared with the MI group, the expression of CD31, VEGF, VEGFR2 and bFGF in MI + PTHrP group were significantly higher (P all < 0.05). **Conclusions:** PTHrP (87-139) can reduce myocardial interstitial fibrosis after MI, promote angiogenesis at the edge of infarction, and improve cardiac function.

【Key words】 Myocardial infarction; Nuclear localization sequence; Parathyroid hormone-related peptide

甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)产生于哺乳动物的多种细胞类型,并通过自分泌、旁分泌及内分泌等形式调节细胞增殖、分化和凋亡^[1-2]。外源性 PTHrP 具有扩张动脉的作用,可增加局部心肌血流量,在离体大鼠心脏中,PTHrP 具有正性变时变力作用^[3]。PTHrP 可诱导人成骨细胞(hOB)和人骨肉瘤 MG-63 细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)^[4-5],同时还是与骨血管新生密切相关的溶骨因子,但 PTHrP 对心脏的作用,特别是对心肌梗死的作用仍不明确。

PTHrP 在各种类型的血管平滑肌细胞(VSMC)中均有表达,当动脉受损或者发生粥样硬化时,其表达水平会显著上调^[6]。研究表明,PTHrP 的核定位序列(NLS)和 C 末端可抑制基因 p27 表达,调节 VSMC 增殖、迁移和凋亡,促进血管内膜新生^[7],因此 NLS 和 C 末端两者共同组成的 PTHrP(87-139)片段对于缺血性心脏病可能具有潜在的价值。本研究旨在探讨 PTHrP(87-139)对心肌梗死后心脏功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

33 只体质量约为 25 g 的 6~8 周 C57BL/6 野生型雄性小鼠,由南京医科大学骨与干细胞实验中心 SPF 级实验动物中心饲养。本实验经动物实验

伦理委员会审核通过。

将小鼠随机分为 3 组,每组 11 只。假手术组:小鼠开胸后对心脏前降支穿针但不进行结扎,1 d 后腹部皮下注射生理盐水。心肌梗死组:结扎小鼠心脏前降支构建心肌梗死模型,1 d 后腹部皮下注射生理盐水。心肌梗死 + PTHrP 组:结扎小鼠心脏前降支构建心肌梗死模型,1 d 后腹部皮下注射 PTHrP(87-139),1 d 后腹部皮下注射 PTHrP(87-139),剂量为 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8]。各组每日注射 1 次,持续注射 4 周后行后续实验。

1.2 心脏功能检测

高频超声图像系统(Vevo 2100,加拿大 Visualsonics 公司)检测小鼠左室舒张末期内径(LVEDD)、左室收缩末期内径(LVESD)、左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS)。每个参数测量 3 次并且记录平均值。

1.3 心肌肥厚以及肺淤血程度评估

称量小鼠体质量后,分别取出小鼠的心脏和肺,清洗后称量心脏和肺的质量。计算心脏质量/体质量和肺质量/体质量的比值。

1.4 免疫组织化学染色检测 CD31 表达情况

将小鼠心脏心肌梗死边缘区(假手术组为针穿部位)冠状面切成片状,部分用于免疫组织化学染色以及马松染色,部分用于提取蛋白。

将石蜡切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐中进行抗原修复,滴加 3%过氧化氢溶液后室温避光静置 20~30 min,滴加 10%正常羊血清,室温封闭 60 min 以上。加入抗 CD31 抗体(1:400),4 ℃ 孵育过夜后,置于 37 ℃ 冰箱复温 0.5 h,加羊抗鼠 IgG 二抗(1:1 000),室温孵育 60 min。加 Elite ABC 配制液于切片上,室温孵育 30 min,行二甲氨基偶氮苯(DAB)染色,苏木素复染,1%盐酸酒精液中分化 2 s,冲洗,蓝化,酒精脱水,封片。每张病理切片于显微镜下取左上、右上、中间、左下、右下各 2 个不重叠视野。使用软件 Image-Pro Plus 对图像进行定量分析,分别计算 CD31 阳性点个数,并取各组平均值。

1.5 马松染色检测心肌纤维化

马松染色按试剂盒内说明书操作:石蜡切片常规脱蜡至水,Weigert 铁苏木素染色液染色 5~10 min,酸性乙醇分化液分化 5~15 s,Masson 蓝化液返蓝 3~5 min,丽春红品红液染色 5~10 min,磷钼酸溶液洗 1~2 min,苯胺蓝液染色 1~2 min,酒精脱水,封片。每张病理切片于显微镜下取左上、右上、中间、左下、右下各 2 个不重叠视野。使用软件 Image-Pro Plus 对图像进行定量分析,检测阳性面积和整个视野面积,计算阳性面积百分率=阳性

面积/检测视野面积×100%,取各组阳性面积百分率平均值。

1.5 Western blot 检测多种血管相关因子表达情况

提取蛋白,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,转膜,封闭,兔抗鼠 VEGF 抗体、血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)抗体、碱性成纤维生长因子(bFGF)抗体(均 1:200)4 ℃ 孵育过夜,羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000)孵育 2 h,洗膜后,滴加显影液,于 Odyssey 近红外双色扫描系统上显影,使用 ImageJ 软件分别测量各目标条带和内参 GAPDH 的灰度值,计算蛋白的相对表达水平。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,计量资料采用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTHrP(87-139)改善小鼠心肌梗死后心功能
与假手术组相比,心肌梗死组 LVEF、LVFS 显著降低,LVEDD、LVESD 明显升高;与心肌梗死组相比,心肌梗死+PTHrP 组 LVEF、LVFS、LVEDD、LVESD 等指标明显改善(*P*均<0.05),见表 1。

表 1 各组小鼠超声心动图指标比较

组别	LVEF/%	LVFS/%	LVEDD/mm	LVESD/mm
假手术组(<i>n</i> =11)	63.66±1.79	32.98±1.11	3.80±0.13	2.63±0.09
心肌梗死组(<i>n</i> =11)	38.01±1.27 ⁽¹⁾	17.55±1.27 ⁽¹⁾	4.32±0.49 ⁽¹⁾	3.58±0.58 ⁽¹⁾
心肌梗死+PTHrP 组(<i>n</i> =11)	53.33±4.33 ⁽²⁾	26.53±2.68 ⁽²⁾	3.76±0.09 ⁽²⁾	2.84±0.16 ⁽²⁾

注:与假手术组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与心肌梗死组相比,⁽²⁾*P*<0.05

2.2 PTHrP(87-139)减轻心肌梗死后心肌肥厚
与假手术组相比,心肌梗死组心脏质量/体质量和肺质量/体质量的比值明显升高;与心肌梗死

组相比,心肌梗死+PTHrP 组心脏质量/体质量和肺质量/体质量的比值明显降低(*P*均<0.05),见表 2。

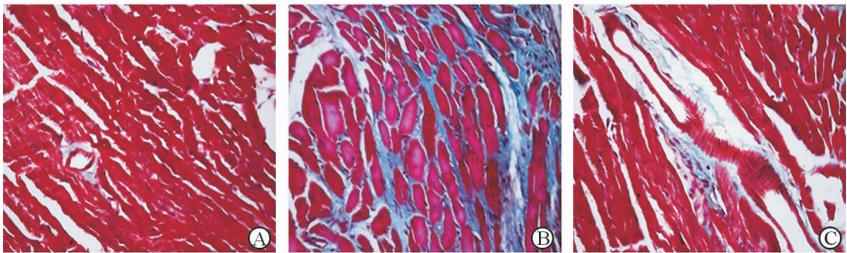
表 2 各组小鼠心脏质量/体质量和肺质量/体质量的比值比较/mg·g⁻¹

组别	心脏质量/体质量	肺质量/体质量
假手术组(<i>n</i> =11)	4.80±0.15	5.40±0.34
心肌梗死组(<i>n</i> =11)	6.16±0.31 ⁽¹⁾	6.63±0.35 ⁽¹⁾
心肌梗死+PTHrP 组(<i>n</i> =11)	5.17±0.19 ⁽²⁾	5.64±0.24 ⁽²⁾

注:与假手术组相比,⁽¹⁾*P*<0.05;与心肌梗死组相比,⁽²⁾*P*<0.05

2.3 PTHrP(87-139)改善缺血性心肌间质纤维化
马松染色结果,显示心肌梗死组[(14.69±1.28)%]心肌梗死边缘区的心肌纤维化程度较假

手术组[(1.61±0.57)%]明显升高,心肌梗死+PTHrP 组[(6.52±0.80)%]心肌纤维化程度较心肌梗死组明显降低(*P*均<0.05),见图 1。



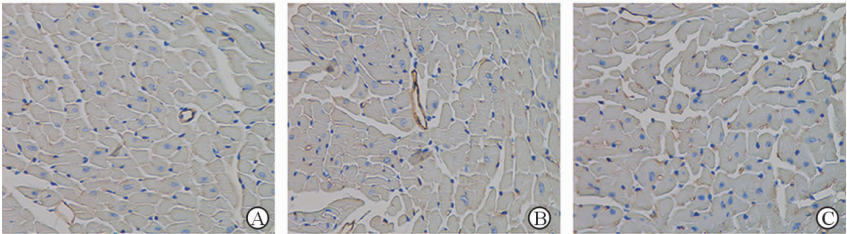
注：A 为假手术组；B 为心肌梗死组；C 为心肌梗死 + PTHrP 组

图 1 各组小鼠心肌马松染色(×400)

2.4 PTHrP(87-139)促进心肌梗死后血管生成

与假手术组相比,心肌梗死组心肌梗死边缘区 CD31 表达水平有轻微升高,但两组间差异无统计学意义[(59.17 ± 4.91)个阳性点对(54.83 ± 4.79)个

阳性点, $P>0.05$];与心肌梗死组相比,心肌梗死 + PTHrP 组 CD31 表达水平[(111.17 ± 12.34)个阳性点]明显升高($P<0.05$),见图 2。



注：A 为假手术组；B 为心肌梗死组；C 为心肌梗死 + PTHrP 组

图 2 各组小鼠心肌 CD31 免疫组织化学染色(×400)

2.5 PTHrP(87-139)促进多种血管相关因子生成

与假手术组相比,心肌梗死组 VEGF、VEGFR-2、bFGF 表达水平明显降低;与心肌梗死组相比,心肌梗死 + PTHrP 组 VEGF、VEGFR-2、bFGF 表达水平则明显升高(P 均 <0.05),见图 3、表 3。

3 讨论

改善心肌血供是治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)尤其是心肌梗死的重要策略^[9]。PTHrP 及其受体分布于人体的各个组织器官,并通过自分泌、旁分泌及内分泌的方式,调节组织器官的生长及分化过程。体外细胞实验及转基因小鼠实验表明,PTHrP 参与调节细胞增殖、分化和凋亡,是骨骼、乳腺、牙齿和血管系统正常发育所必需的体液因子。研究证实,PTHrP 具有促进血管生成的

作用,能够增强多种细胞中 VEGF 的表达和分泌^[10],也能促进移植体血管生成^[11]。去除 PTHrP 的 NLS 和 C 末端,会影响 VSMC 的细胞周期,抑制血管新生内膜的形成^[12],提示 PTHrP(87-139)可促进血管内膜形成,进而刺激血管生成。

促进血管生成改善血供对于缺血组织来说非常重要^[13]。VEGF 可通过调节血管生成信号,促使

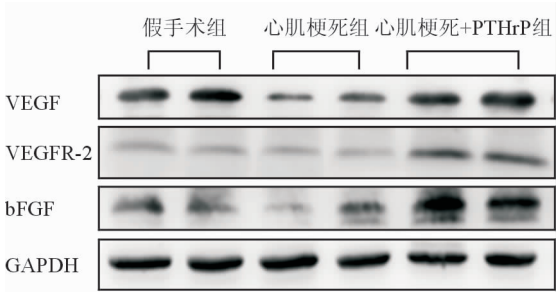


图 3 各组小鼠心肌 VEGF、VEGFR-2、bFGF 蛋白表达水平

表 3 各组小鼠心肌 VEGF、VEGFR-2、bFGF 蛋白表达水平比较

组别	VEGF	VEGF-2	bFGF
假手术组($n=11$)	0.912 ± 0.036	0.567 ± 0.018	0.787 ± 0.043
心肌梗死组($n=11$)	0.619 ± 0.025 ⁽¹⁾	0.486 ± 0.032 ⁽¹⁾	0.684 ± 0.109 ⁽¹⁾
心肌梗死 + PTHrP 组($n=11$)	0.917 ± 0.03 ⁽²⁾	0.744 ± 0.028 ⁽²⁾	1.215 ± 0.038 ⁽²⁾

注：与假手术组相比，⁽¹⁾ $P<0.05$ ；与心肌梗死组相比，⁽²⁾ $P<0.05$

不成熟或杂乱无序的血管形成稳定和具有功能性的微血管网络,从而恢复不同组织,特别是缺血组织的血流^[14]。bFGF 也是重要的血管生成因子,可诱导缺血心肌的血管生成,加快心肌梗死后的心脏修复^[15]。在本研究中,小鼠持续皮下注射 PTHrP(87-139) 4 周后,心肌梗死边缘区 VEGF、VEGFR-2 和 bFGF 表达上调,表明 PTHrP(87-139)能够促进血管生成。

CD31 是一种血小板-内皮细胞黏附分子,作为内皮细胞标志物,可在一定程度上反映血管生成密度,本研究显示心肌梗死小鼠皮下注射 PTHrP(87-139)后,心肌 CD31 表达水平上升,心功能改善,心肌间质纤维化程度降低,这表明 PTHrP(87-139)对于抑制心肌梗死后重构具有重要意义。

PTHrP 可舒张动脉血管床,如冠状动脉、胃肠道相关动脉、肾动脉以及肺动脉,而这种作用与 VSMC 腺苷酸环化酶的激活和一氧化氮(NO)的产生密切相关^[16]。PTHrP 前体通过转录后剪接可产生成熟的 N 末端、中段、NLS 以及 C 末端^[17]。研究表明,NLS 能够进入细胞核发挥功能,刺激细胞增殖和抑制细胞凋亡,而 C 末端对于 NLS 发挥作用是不可或缺的^[18]。PTHrP 在 NLS 和 C 末端缺失时,可通过改变相关基因的表达,使细胞生长迟缓和早期衰老。NLS 和 C 末端对于 PTHrP 发挥多种生理功能,尤其对促进 VSMC 增殖极为重要。然而,NLS 和 C 末端组成的 PTHrP(87-139)通过何种机制发挥以上作用,目前尚不明确,相关实验表明可能与其调节 p27 基因密切相关。

参 考 文 献

- [1] Roethig A, Schreckenberger R, Weber K, et al. Effects of nicotine on PTHrP and PTHrP receptor expression in rat coronary endothelial cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 29(3/4):485-492.
- [2] Meyer R, Schreckenberger R, Kretschmer F, et al. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) signal cascade modulates myocardial dysfunction in the pressure overloaded heart[J]. *Eur J Heart Fail*, 2007, 9(12):1156-1162.
- [3] Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, et al. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology[J]. *Physiol Rev*, 1996, 76(1):127-173.
- [4] Martinez P, Esbrit P, Rodrigo A, et al. Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells[J]. *Osteoporos Int*, 2002, 13(11):874-881.
- [5] Isowa S, Shimo T, Ibaragi S, et al. PTHrP regulates angiogenesis and bone resorption via VEGF expression[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7):2755-2767.
- [6] Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, et al. Parathyroid

hormone-related protein and its receptors; nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets[J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(6):1113-1136.

- [7] Fiaschi-Taesch N, Sicari B, Ubriani K, et al. Mutant parathyroid hormone-related protein, devoid of the nuclear localization signal, markedly inhibits arterial smooth muscle cell cycle and neointima formation by coordinate up-regulation of p15Ink4b and p27kip1[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(3):1429-1439.
- [8] Fernandez De Castro L, Lozano D, Portal-Nunez S, et al. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(4):1752-1760.
- [9] 邢力. 应用瑞舒伐他汀与阿托伐他汀治疗冠心病的疗效[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2017, 5(32):38-39.
- [10] Esbrit P, Alvarez-Arroyo MV, De Miguel F, et al. C-terminal parathyroid hormone-related protein increases vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(6):1085-1092.
- [11] Cackowski FC, Anderson JL, Patrene KD, et al. Osteoclasts are important for bone angiogenesis[J]. *Blood*, 2010, 115(1):140-149.
- [12] Fiaschi-Taesch N, Takane KK, Masters S, et al. Parathyroid-hormone-related protein as a regulator of pRb and the cell cycle in arterial smooth muscle[J]. *Circulation*, 2004, 110(2):177-185.
- [13] Araki S, Izumiya Y, Hanatani S, et al. Akt1-mediated skeletal muscle growth attenuates cardiac dysfunction and remodeling after experimental myocardial infarction[J]. *Circ Heart Fail*, 2011, 5(1):116-125.
- [14] Murakami M. Signaling required for blood vessel maintenance; molecular basis and pathological manifestations[J]. *Int J Vasc Med*, 2012, 2012:293641.
- [15] Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(9):1100-1113.
- [16] Fritsch S, Lindner V, Welsch S, et al. Intravenous delivery of PTH/PTHrP type 1 receptor cDNA to rats decreases heart rate, blood pressure, renal tone, renin angiotensin system, and stress-induced cardiovascular responses[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(10):2588-2600.
- [17] Zhang D, Zhang F, Zhang Y, et al. Erythropoietin enhances the angiogenic potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat model of myocardial infarction[J]. *Cardiology*, 2007, 108(4):228-236.
- [18] Funk JL, Trout CR, Wei HB, et al. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) induction in reactive astrocytes following brain injury: a possible mediator of CNS inflammation[J]. *Brain Res*, 2001, 915(2):195-209.

(收稿:2019-04-19 修回:2019-07-23)

(本文编辑:胡晓静)