

[文章编号] 1007-3949(2009)17-02-0101-03

• 实验研究 •

白藜芦醇对动脉粥样硬化兔心肌纤维化和基质金属蛋白酶 2、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达的影响

高淑卿, 朱鹏立

(福建医科大学省立临床医学院二内科, 福建省福州市 350004)

[关键词] 心肌纤维化; 基质金属蛋白酶 2; 组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2; 白藜芦醇

[摘要] 目的 观察白藜芦醇对动脉粥样硬化兔心肌间质胶原纤维变化和基质金属蛋白酶 2 及组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达水平的影响。方法 33 只新西兰白兔随机分为对照组、模型组和白藜芦醇干预组。观察心肌间质胶原纤维的变化, 测量心肌间质胶原容积分数。逆转录聚合酶链反应检测心肌组织基质金属蛋白酶 2 及组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 mRNA 水平。结果 与对照组相比, 模型组胶原纤维明显增多、增粗、排列紊乱, 呈不规则网状或粗块状沉积于心肌间质, 胶原容积分数和基质金属蛋白酶 2 表达增多, 组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达减少 ($P < 0.01$)。白藜芦醇干预能显著减少上述指标的改变。结论 动脉粥样硬化进程中, 存在着心肌纤维化、基质金属蛋白酶 2 表达增多和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达减少等现象, 白藜芦醇能减轻基质金属蛋白酶 2/组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达的失衡, 改善心肌纤维化。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Resveratrol on Myocardial Fibrosis and Expression of Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2 in Atherosclerotic Rabbits

GAO Shu-Qing and ZHU Peng-Li

(Second Department of Internal Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350004, China)

[KEY WORDS] Myocardial Fibrosis; Matrix Metalloproteinase-2; Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2; Resveratrol

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of resveratrol on the change of myocardial interstitial collagen, the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in atherosclerotic rabbits. **Methods** Thirty-three New Zealand white rabbits were randomly divided into normal control group, model group and resveratrol intervention group. The change of myocardial interstitial collagen and the collagen volume fraction were measured. The expressions of MMP-2 and TIMP-2 were assessed by reverse transcription polymerase chain reaction.

Results Compared with control group, the collagen of model group increased, thickened and arranged irregularly in the myocardial interstitial. The collagen volume fraction and the expressions of MMP-2 increased, the expression of TIMP-2 reduced ($P < 0.01$). Resveratrol intervention can significantly reduce these changes above. **Conclusion** There was a phenomenon that myocardial fibrosis, MMP-2 expression increased, TIMP-2 expression reduced in the progress of atherosclerosis. Resveratrol can regulate the imbalance of MMP-2/TIMP-2 expression and improve myocardial fibrosis.

有研究表明, 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 形成过程中, 心肌胶原呈持续增高趋势, 且以 IV 型胶原为主, IV/Ⅲ型胶原比例升高, 即心肌纤维化^[1]。基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 是胶原降解成小分子多肽的关键酶, 在生理状态下与其特异性抑制剂组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, TIMP-2) 处于相对平衡状态, 使细胞外基质降解与合成达到动态平衡。在各种致病因素的作用下, 胶原合成多于降解是心肌纤维化的主要形成原因之一。白藜芦醇为抗 As 的活性物质, 但对 As 进程中心肌纤维化的影响尚未见相关报道。本研究旨在观察白藜芦醇对动脉粥样硬化兔心肌纤维化和 MMP-2、TIMP-2 表达水平的影响。

2 TIMP-2) 处于相对平衡状态, 使细胞外基质降解与合成达到动态平衡。在各种致病因素的作用下, 胶原合成多于降解是心肌纤维化的主要形成原因之一。白藜芦醇为抗 As 的活性物质, 但对 As 进程中心肌纤维化的影响尚未见相关报道。本研究旨在观察白藜芦醇对动脉粥样硬化兔心肌纤维化和 MMP-2、TIMP-2 表达水平的影响。

[收稿日期] 2009-10-13 [修回日期] 2009-02-15

[基金项目] 卫生部科学研究基金 - 福建省卫生教育联合攻关计划资助项目 (WKJ2005-2-017)

[作者简介] 高淑卿, 硕士研究生, 研究方向为老年医学和高血压, Email 为 gaoshuqing1216@163.com。通讯作者朱鹏立, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为高血压, Email 为 zhp7755@126.com。

1 材料与方法

1.1 主要材料

健康雄性新西兰白兔购自上海生旺实验动物有限公司 [许可证号: SCXK(沪)2002-0011]; 白藜芦

醇(上海纳贝生物科技股份有限公司,生产批号:RES20070401);逆转录试剂盒(Promega Corporation),Taq酶(Takara)。

1.2 动物分组及模型建立

33只新西兰白兔,随机分为:对照组($n=10$),以普通饲料+0.5%吐温80灌胃;④模型组($n=11$),以高脂饲料(1%胆固醇+5%蛋黄粉+5%猪油+0.5%胆盐+88.5%普通饲料)+0.5%吐温80灌胃;④白藜芦醇干预组($n=12$),以高脂饲料+白藜芦醇[8 mg/(kg·d)]灌胃;每天一次,连续喂养12周后,处死动物。12周末兔As模型建立成功^[2]。

1.3 心肌胶原染色及定量分析胶原容积分数

取冠状动脉左前降支支配的左心室前壁组织,行苦味酸天狼猩红染色。以图像分析系统定量分析胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。光镜下,任选5个视野,以视野中所有胶原面积之和除以总面积,得出CVF。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测心肌组织基质金属蛋白酶2和组织型基质金属蛋白酶抑制剂2 mRNA表达

从Genebank查获目标基因,MMP-2上游5'-AGC CTT CTC ACC CCC ACC TG-3',下游5'-GCC CTT ATC CCA CTG CCC C-3',扩增片长313 bp;TMP-2上游5'-GCG AGA AGG TGG ACT-3',下游5'-AGG AGA TGT AGC ACG GGA T-3',扩增片长351 bp; β -actin上游5'-AGA AGC TGT GCT ACG TGG CG-3',下游5'-AGG AAG GAG GGC TGG AAC A-3',扩增片长160 bp。由上海生工合成引物。取新鲜冻存心肌组织100 mg,参照Trizol RNA提取试剂盒说明书的流程提取组织总RNA。以核酸蛋白分析仪分析所提取RNA,260/280吸光度的比值在1.8~2.0范围内,提示RNA纯度好,取总RNA并依次加入10×逆转录Buffer,25 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L dNTP, RNA酶抑制剂、AMV逆转录酶、Oligo(dT)15 Primer,加去离子水配成20 μ L反应体系。经42℃ 15 min,95℃ 5 min,4℃ 5 min得到逆转录产物。取cDNA作为模板,分别加入Taq酶、2.5 mmol/L dNTP mixture,10×PCR buffer,25 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L上游引物、10 mmol/L下游引物,再补去离子水配成50 μ L反应体系,MMP-2反应条件为95℃预变性5 min,95℃变性30 s,64℃退火30 s,72℃延伸1 min,最后72℃延伸10 min,共32个循环; β -actin和TMP-2反应条件为94℃预变性5 min,94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,

最后72℃延伸10 min,共30个循环,得到相应的聚合酶链产物。各取聚合酶链产物5 μ L,经1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪摄像,计算目标条带灰度,并以 β -actin的灰度作为标准对比。

1.5 统计学处理

计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌胶原染色和定量分析心肌胶原容积分数

普通光镜下,苦味酸天狼猩红染色的心肌呈黄色,胶原纤维呈猩红色。对照组心肌细胞间隙和心肌间小血管周围可见胶原纤维分布,纵切面上,胶原呈粗细不等的条状,与肌束的走向平行;横切面上环绕着心肌细胞,并与相邻心肌细胞连接成网状。同时,心肌间小血管周围存在较丰富的胶原。与对照组相比,模型组心肌细胞间隙和心肌间小血管周围胶原纤维明显增多,排列紊乱,呈不规则网状或粗块状沉积在心肌间质。白藜芦醇干预组亦可见胶原纤维增多、增粗,不规则沉积,但较模型组有所减轻(图1)。定量分析CVF发现,与对照组比较,模型组CVF明显升高($P < 0.01$);白藜芦醇干预组CVF亦升高,但较模型组有所降低($P < 0.01$;表1)。

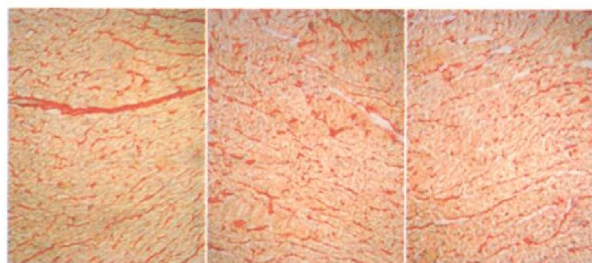


图1 光镜下苦味酸天狼猩红染色的心肌组织 左为对照组,中为模型组,右为白藜芦醇干预组。

2.2 心肌组织基质金属蛋白酶2和组织型基质金属蛋白酶抑制剂2 mRNA水平

与对照组比较,模型组MMP-2 mRNA表达明显增加,TMP-2 mRNA表达明显减少($P < 0.01$);白藜芦醇干预组较模型组MMP-2 mRNA表达明显减少($P < 0.01$),TMP-2 mRNA表达增加($P < 0.01$;图2和表1)。

3 讨论

本实验通过高脂喂养新西兰白兔建立As模型,

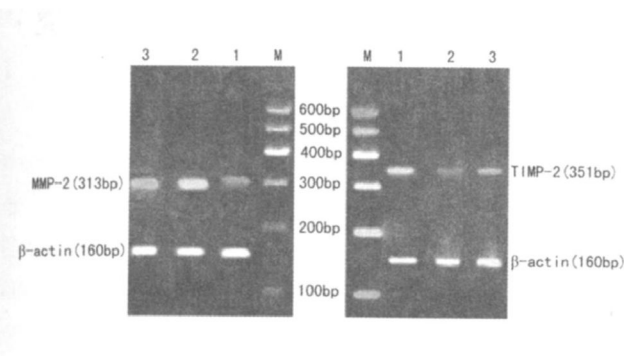


图 2 基质金属蛋白酶 2 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 mRNA 表达水平 1 为对照组, 2 为模型组, 3 为白藜芦醇干预组。

表 1 心肌胶原容积分数和基质金属蛋白酶 2、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 mRNA 水平

指 标	对照组	模型组	白藜芦醇干预组
CVF	4.34% ± 0.56%	10.16% ± 0.46% ^a	6.61% ± 0.43% ^{ab}
MMP-2	0.246 ± 0.049	0.648 ± 0.0637 ^a	0.475 ± 0.059 ^{ab}
TIMP-2	0.856 ± 0.178	0.360 ± 0.164 ^a	0.676 ± 0.165 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

于实验 12 周末观察到 As 兔心肌胶原纤维增多增粗、排列紊乱, 呈不规则网状或粗块状沉积于心肌间质, CVF 升高, 即存在着心肌纤维化, 与 Orlandi 等^[3]报道相符。但其致心肌纤维化的机制仍不明确, 可能有以下几方面: As 发生发展过程中, 无论是冠状动脉主干还是冠状微动脉的痉挛、狭窄、堵塞, 都可导致心肌细胞的损伤、坏死, 最终导致修复性纤维化。同时, As 进程中亦存在着过度激活的反应性氧系统和炎症因子水平升高, 而越来越多的证据表明, 氧化应激和炎症因子在多种疾病所致的心肌纤维化进程中起重大作用。Ross^[4]认为 As 是一炎症性疾病, 且其炎症累及血管的全层, 包括动脉外膜。高血脂导致心肌内冠状动脉内皮功能障碍, 氧化的脂蛋白穿过动脉壁和毛细血管壁外膜, 积聚在心肌间质, 招募更多的炎症细胞浸润^[5]。伴随炎症细胞而来的是心肌间质局部产生细胞因子、生长因子增多, 尤其是转化生长因子 β , 从而刺激心脏成纤维细胞表型改变, 胶原合成增多^[6]。更有学者认为心肌纤维化就是一慢性炎症过程^[7]。纤维化中过度激活的血管紧张素和醛固酮是作为炎症分子在炎症反应中起重要作用^[7, 8]。As 进程中亦存在着冠状动脉内皮功能障碍、内皮衍生因子分泌失衡, 如一氧化氮、前列环素和缓激肽分泌减少, 内皮素分泌增多。研究表明, 冠状动脉内皮也可调节心肌细胞和心肌

成纤维细胞的代谢: 一氧化氮以浓度依赖方式抑制胶原蛋白的合成; 前列环素能够以浓度依赖方式减少体外培养的心脏成纤维细胞合成胶原, 还能显著增加基质金属蛋白酶 1 的活性; 缓激肽能抑制胶原的增生, 内皮素有致心肌纤维化的作用。

本实验中纤维化的心肌组织中 MMP-2 表达增加, TIMP-2 表达减少。基质金属蛋白酶能直接降解细胞外基质中的胶原, 引起细胞外基质退化, 心肌排列紊乱; 能增加趋化作用, 促使成纤维细胞进入其作用后的区域, 引起胶原沉积; 基质金属蛋白酶介导许多物质的活化, 如肿瘤坏死因子 α 、转化生长因子 β 及白细胞介素 1β , 这些物质一方面增加新胶原的合成, 并破坏心肌细胞; 另一方面促使基质金属蛋白酶表达增加, 构成恶性循环, 进一步加重心肌纤维化。

白藜芦醇有抗氧化、抗炎症、抗 As 和抗纤维化的作用^[9]。此外, 白藜芦醇的抗血管生成和抗肿瘤活性与其能显著减少基质金属蛋白酶的表达水平并抑制其裂解明胶的活性密不可分^[10, 11]。综合本研究结果, 白藜芦醇能降低 MMP-2 的表达, 升高 TIMP-2 的表达, 调节 MMP-2/TIMP-2 的比值, 对高脂喂养兔 As 进程中心肌纤维化具有预防作用。

[参考文献]

- [1] 贾琴, 常青, 唐海兰. 实验性动脉粥样硬化家兔心肌胶原的动态变化 [J]. 广东医学, 2006, 27 (4): 456-457.
- [2] 蒋娜. 白藜芦醇对兔动脉粥样硬化 PPAR γ 及相关炎症因子表达的影响 [D]. 福建: 福建医科大学, 2008.
- [3] Orlandi A, Francesconi A, Marcellini M, et al. Role of ageing and coronary atherosclerosis in the development of cardiac fibrosis in the rabbit [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 64 (3): 544-552.
- [4] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115.
- [5] Beltrami CA, Finato N, Rocco M, et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans [J]. *Circulation*, 1994, 89: 151-163.
- [6] Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor- β during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts [J]. *Hypertension*, 2002, 39: 258-263.
- [7] 吕晓蕾, 赵陪, 张振刚. 心肌纤维化: 一个慢性炎症反应过程 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11 (51): 10 416-420.
- [8] Gallego M, Espina L, Vegas et al. Spironolactone and captopril attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats [J]. *Pharmacological Res*, 2001, 44 (4): 311-315.
- [9] Godchaud S, Krisa S, Couronné R, et al. Deactivation of cultured human liver myofibroblasts by trans-resveratrol: a grapevine-derived polyphenol [J]. *Hepatology*, 2000, 31 (4): 922-931.
- [10] Gagliano N, Moscheni C, Torricelli C, et al. Effect of resveratrol on matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) on human cultured glioblastoma cells [J]. *Biomol Pharmacother*, 2005, 59 (7): 359-364.
- [11] Sun CY, Hu Y, Guo T, et al. Resveratrol as a novel agent for treatment of multiple myeloma with matrix metalloproteinase inhibitory activity [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27 (11): 1 447-452.

(此文编辑 许雪梅)