

法舒地尔对压力超负荷大鼠左心室肥厚的改善作用

蔡 辉,张蓓蓓,张 静,赵智明,赵凌杰,郭郡浩

[摘要] **目的:**探讨法舒地尔对压力超负荷大鼠左心室肥厚的影响及可能的作用机制。**方法:**42只6周龄SD大鼠行腹主动脉缩窄术制备压力超负荷模型作为手术组,另取8只大鼠作为假手术组(Sham组)。术后4周将存活的28只腹主动脉缩窄大鼠随机分为模型组(Model组)、法舒地尔高剂量组(FH组)和法舒地尔低剂量组(FL组)。4周后,计算各组大鼠左心室质量指数(LVMI),观察心肌病理改变,检测心肌细胞直径(MD),碱水法测定心肌羟脯氨酸(HYP)含量,酶联免疫吸附试验测定血浆和心肌血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)浓度,免疫组织化学法半定量分析心肌磷酸化肌球蛋白磷酸酶靶蛋白亚基1(p-MYPT1)、基质金属蛋白酶9(MMP9)和组织金属蛋白酶组织抑制剂1(TIMP1)的表达水平。**结果:**与Sham组比较,Model组心肌细胞肥大,间质大量胶原沉积,LVMI、MD、HYP含量和AngⅡ浓度均明显升高,p-MYPT1、MMP9和TIMP1的表达显著上调,MMP9/TIMP1比值明显下降($P < 0.01$);与Model组比较,FH组和FL组心肌细胞肥大和胶原沉积有所改善,LVMI、MD、HYP和AngⅡ含量均下降($P < 0.05 \sim P < 0.01$),p-MYPT1、MMP9和TIMP1的表达均明显下调($P < 0.01$)。**结论:**法舒地尔改善压力超负荷大鼠左心室肥厚的作用可能与调节心肌MMP9和TIMP1表达有关。

[关键词] 左心室肥厚;法舒地尔;压力超负荷;大鼠

[中图法分类号] R 541 [文献标志码] A DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.02.003

Protective effect of fasudil against left ventricular hypertrophy in rats with pressure overload

CAI Hui, ZHANG Bei-bei, ZHANG Jing, ZHAO Zhi-ming, ZHAO Ling-jie, GUO Jun-hao

(Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,

Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing Jiangsu 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of fasudil on left ventricular hypertrophy in rats with pressure overload, and its possible mechanism. **Methods:** Pressure overload model in 42 male 6-week-old SD rats were established by abdominal aorta constriction, and divided into the operation group. Eight healthy rats were set as sham group. Twenty-eight survival abdominal aorta constriction rats after 4 weeks of operation were randomly divided into the model group, high dose fasudil group (FH group) and low dose fasudil group (FL group). After four weeks of drug intervention, the left ventricular mass indexes (LVMI) of all groups were calculated. The myocardial pathological changes were observed. The myocyte diameters (MD) were detected. Myocardial hydroxyproline (HYP) contents were determined by alkali hydrolysis. Plasma and myocardial AngⅡ concentrations were detected by enzyme linked immunosorbent assay. Myocardial expression levels of phosphorylated myosin phosphatase targeting protein subunit 1 (p-MYPT1), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) were analyzed by immunohistochemical staining. **Results:** Compared with the sham group, myocardial cells hypertrophy and collagen deposition in myocardial interstitium were found, the levels of LVMI, MD, HYP, AngⅡ, p-MYPT1, MMP9 and TIMP1 increased significantly, and the ratio of MMP9/TIMP1 decreased significantly in model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, myocardial cells hypertrophy and collagen deposition were improved, and the levels of LVMI, MD, HYP, AngⅡ, p-MYPT1, MMP9, TIMP1 decreased significantly in FH group and FL group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). **Conclusions:** Fasudil improving left ventricular hypertrophy in pressure overload rats maybe related to the regulating myocardial MMP9 and TIMP1 expression levels

[Key words] left ventricular hypertrophy; fasudil; pressure overload; rat

左心室肥厚是高血压、瓣膜病、急性心肌梗死及先天性心脏病等心血管疾病的常见病理改变,是心脏对急/慢性血流动力学超负荷和以肾素-血管紧张素-醛固酮系统为代表的神经内分泌因素的一种

适应性反应,也是充血性心力衰竭和复杂室性心律失常等发生的独立危险因素。Rho激酶是小G蛋白Rho的主要下游因子,能调控细胞增殖、迁移、收缩、黏附、分裂和基因表达等行为。Rho激酶活性在许多心血管疾病中均有所增加,而抑制Rho/Rho激酶信号途径有益于改善患者心脏功能^[1-2]。目前关于Rho激酶特异性抑制剂法舒地尔对左心室肥厚作用的报道较少,本实验旨在探究法舒地尔对压力超负

[收稿日期] 2015-01-07

[基金项目] 南京军区南京总医院科研项目(2014016)

[作者单位] 南京军区南京总医院 中西医结合科,江苏 南京 210002

[作者简介] 蔡 辉(1959-),男,博士研究生导师,主任医师,教授。

荷模型大鼠左心室肥厚的作用及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 6 周龄雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 (180 ± 20) g [许可证号: SYXK(苏)2003-0032], 由南京军区南京总医院动物实验中心提供。饲养环境: 室温 $20 \sim 25$ °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 周期光照时间为 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(规格: 2 mL, 30 mg) 由天津红日药业股份有限公司惠赠, 血管紧张素 II (Ang II) 酶联免疫吸附试验试剂盒购自上海雅吉生物公司, 磷酸化肌球蛋白磷酸酶靶蛋白亚基 1 (p-MYPT1) 一抗购自北京博奥森生物公司, 基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、组织金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1)、辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗、DAB 显色剂、EliVision plus 免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 左心室肥厚模型制备 大鼠适应性喂养 5 d 后, 术前禁食 12 h, 自由饮水。编号后按照随机数字表法抽取 8 只作为假手术组 (Sham 组), 另 42 只作为手术组。所有大鼠用 10% 水合氯醛 ($0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$) 行腹腔注射麻醉。常规备皮消毒后, 于剑突下沿腹正中中线逐层开腹, 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 0.7 mm 银夹夹闭, 使腹主动脉缩窄 60% ~ 70%, 而 Sham 组不夹闭腹主动脉。确认无出血, 将脏器复位后逐层关闭腹腔。术后禁食 6 h, 并给予青霉素 $10 \text{ 万 U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 肌内注射 3 d 预防感染。

1.3.2 分组及药物干预 手术 4 周后, 42 只手术组大鼠死亡 14 只, 8 只 Sham 组大鼠无死亡。将手术组大鼠存活的 28 只按照随机数字表法分为 Model 组 ($n = 10$)、FH 组 ($n = 9$) 和 FL 组 ($n = 9$)。Model 组腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; FH 组腹腔注射盐酸法舒地尔注射液 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; FL 组腹腔注射盐酸法舒地尔注射液 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; Sham 组腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.3.3 标本采集及左心室质量指数 (LVMI) 检测 药物干预 4 周后, Model 组大鼠死亡 3 只, FH 组和 FL 组大鼠各死亡 1 只, 死亡原因均为严重心力衰竭, 而 Sham 组无死亡。将最终存活的 31 只大鼠称

质量 (BM) 后, 10% 水合氯醛 ($0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$) 腹腔注射麻醉, 麻醉完全后打开胸腔, 暴露心脏。心脏穿刺收集血液 5 ~ 10 mL。剪取心脏, 洗净后除去心房及大血管, 称取心脏质量 (HM), 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 (LVM)。计算心脏质量指数 ($\text{HMI} = \text{HM}/\text{BM}$) 和左心室质量指数 ($\text{LVMI} = \text{LVM}/\text{BM}$)。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 °C 的 4% 多聚甲醛溶液中固定。血液以 $3000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min, 取上清液存放于 -80 °C 冰箱待用。

1.3.4 左心室肌病理学分析 心肌标本于甲醛溶液中固定 24 h 后, 常规取材、脱水、石蜡包埋, 沿左心室长轴线每隔 1 mm 横断面切取数张 $4 \mu\text{m}$ 切片, 作 HE 和 Masson 染色。400 倍光镜下观察组织形态, 每个 HE 标本随机取 5 个视野, 每个视野选 10 个心肌细胞, 采用专业图片分析软件 Image-Pro Plus 6.0 计算心肌细胞直径 (MD)。

1.3.5 心肌羟脯氨酸 (HYP) 含量测定 HYP 几乎只存在于胶原蛋白, 其含量能反应心肌胶原的水平。准确称取 60 mg 液氮中心肌组织放入试管中, 按照 HYP 试剂盒说明书以碱水解法提取蛋白, 比色法检测样本吸光度, 计算 HYP 含量。

1.3.6 酶联免疫吸附试验测定心脏和血浆 Ang II 的含量 取冻存的心肌组织 50 ~ 100 mg, 研磨成匀浆后离心, 以 $3000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min。取上清液, 测定总蛋白浓度。按照酶联免疫吸附试验试剂盒说明书, 分别测定心肌组织和血浆样品中 Ang II 的浓度。结果以测定蛋白浓度/总蛋白浓度的比值来表示。

1.3.7 免疫组织化学法检测心肌 p-MYPT1、MMP9 及 TIMP1 的表达 切片烘烤后, 常规二甲苯脱蜡及乙醇梯度脱水, 枸橼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 HRP 标记二抗, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水并封片。光镜下观察组织细胞中蛋白的表达情况, 细胞质中黄色为阳性, 每张切片随机取 5 个视野拍照。用 Image-Pro Plus 6.0 测量区域的平均吸光度 (MOD), 即阳性累积吸光度/照片总面积。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 4 组大鼠病理学检查结果 与 Sham 组比较, Model 组心肌细胞明显肥大增宽, 心肌纤维排列紊

乱,间质和血管周围大量蓝色胶原沉积,肌束间隙呈不同程度增大,FH组心肌细胞增粗、紊乱明显改善,

接近 Sham 组,FL组心肌细胞增粗、紊乱,间质和血管周围胶原沉积,但较 Model 组减轻(见图1)。

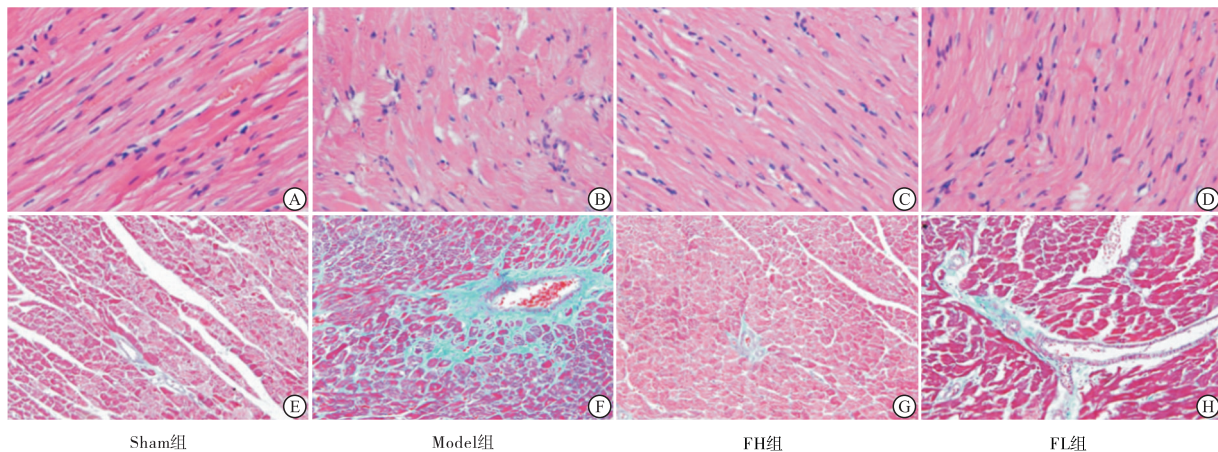


图1 4组大鼠心肌组织病理检查结果(图A~D为HE染色,图E~H为Masson染色)

2.2 4组大鼠左心室肥厚程度比较 与 Sham 组比较,Model组大鼠 HMI、LVMI、MD 和 HYP 含量均显著升高($P < 0.01$)。与 Model 组比较,FH组和FL组大鼠 HMI、LVMI、MD 及 HYP 含量均有不同程度降低($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见表1)。

表1 4组大鼠 HMI、LVMI 和 MD 水平比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	HMI/(mg/kg)	LVMI/(mg/kg)	MD/ μm	HYP/($\mu\text{g/g}$)
Sham组	8	2.63 \pm 0.13	2.08 \pm 0.11	6.78 \pm 1.07	445.57 \pm 84.48
Model组	7	3.23 \pm 0.25**	2.75 \pm 0.20**	12.61 \pm 1.09**	858.58 \pm 144.95**
FH组	8	2.85 \pm 0.15###	2.31 \pm 0.13###	8.51 \pm 1.20###	539.46 \pm 73.49##
FL组	8	3.00 \pm 0.27#	2.50 \pm 0.23#	11.19 \pm 0.76##	695.30 \pm 86.26##
F	—	11.13	20.16	40.73	19.49
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS组内	—	0.043	0.030	1.354	12 055.057

q 检验:与 Sham 组比较 ** $P < 0.01$;与 Model 组比较 # $P < 0.05$,## $P < 0.01$

2.3 4组大鼠心肌组织和血浆 Ang II 含量比较 与 Sham 组比较,Model组大鼠心肌组织和血浆 Ang II 含量均明显升高($P < 0.01$)。与 Model 组比较,FH组和FL组大鼠心肌组织和血浆 Ang II 含量均明显降低($P < 0.01$)(见表2)。

2.4 各组大鼠心肌组织 p-MYPT1、MMP9 和 TIMP1 水平比较 与 Sham 组比较,Model组大鼠心肌 p-MYPT1、MMP9 和 TIMP1 的表达均明显升高($P < 0.01$),MMP9/TIMP1 比值显著下降($P < 0.01$);与 Model 组比较,FH组 p-MYPT1、MMP9 和 TIMP1 及 FL组 p-MYPT1 与 TIMP1 的表达均明显下降($P < 0.01$),而 FL组 MMP9 和 FH组及 FL组 MMP9/TIMP1 比值与 Model 组差异均无统计学意义($P > 0.05$)(见表3)。

表2 4组大鼠心肌和血浆 Ang II 含量比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	心肌 Ang II / (pg/mL)	血浆 Ang II / (pg/mL)
Sham组	8	14.31 \pm 2.91	41.93 \pm 8.26
Model组	7	30.85 \pm 7.12**	85.16 \pm 8.86**
FH组	8	13.82 \pm 1.53##	43.71 \pm 7.70##
FL组	8	19.93 \pm 2.03##	57.23 \pm 8.53##
F	—	30.3	42.07
P	—	<0.01	<0.01
MS组内	—	15.136	69.368

q 检验:与 Sham 组比较 ** $P < 0.01$;与 Model 组比较 ## $P < 0.01$

表3 4组大鼠心肌免疫组织化学染色半定量结果比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	p-MYPT1	MMP9	TIMP1	MMP9/TIMP1
Sham组	8	0.029 \pm 0.014	0.055 \pm 0.002	0.041 \pm 0.002	1.324 \pm 0.052
Model组	7	0.063 \pm 0.009**	0.079 \pm 0.003**	0.077 \pm 0.003**	1.033 \pm 0.353**
FH组	8	0.029 \pm 0.013###	0.061 \pm 0.003##	0.054 \pm 0.002##	1.139 \pm 0.019
FL组	8	0.040 \pm 0.011##	0.076 \pm 0.004	0.070 \pm 0.003##	1.075 \pm 0.031
F	—	13.04	108.26	312.09	95.603
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS组内	—	0.001	0.000	0.000	0.001

q 检验:与 Sham 组比较 ** $P < 0.01$;与 Model 组比较 ## $P < 0.01$

3 讨论

心肌细胞肥大和心肌间质纤维化是心室肥厚重要的病理学基础,可影响心肌细胞的舒缩功能和电传导性,导致心力衰竭、心律失常及心脏性猝死。Rho/Rho 激酶信号通路参与心室肥厚的形成。Rho 激酶单体 2 在肺动脉缩窄小鼠肥厚右心室和腹主动脉缩窄肥厚左心室的表达均显著升高^[3]。伴有左心室肥厚的高血压患者血浆中 p-MYPT1 的水平(即

Rho 激酶活性)较无左心室肥厚的高血压患者增加了 2 倍,而在离心性左心室肥厚时更高^[4]。Rho 激酶单体 1 基因敲除对病理性代偿性肥厚的心肌细胞凋亡和心力衰竭有明显改善作用^[5]。

本实验采用腹主动脉缩窄法制备压力超负荷模型,除了通过升高血压,增加左心室射血阻力外,还通过减少肾脏血流,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,引起手术组大鼠左心室肥厚。Ang II 是肾素-血管紧张素-醛固酮系统最重要的效应因子,能直接活化心肌细胞和心脏成纤维细胞(CFB)引起心室肥厚。手术 8 周后,大鼠 LVMI 和 MD 显著增加,心肌间质大量胶原沉积,心肌和血浆 Ang II 水平明显升高,说明左心室肥厚模型已经建立。并且,模型大鼠心肌组织 Rho 激酶活性较 Sham 组明显升高,法舒地尔能改善腹主动脉缩窄大鼠心肌细胞肥大和间质纤维化,与文献^[6]报道一致。

心脏受到压力超负荷、氧化应激和缺血缺氧等刺激时,过度激活神经内分泌及细胞因子,心肌细胞发生自噬、凋亡或坏死而丢失。细胞外基质正常的网状结构在 MMPs 的作用下遭到破坏,CFB 活化和迁移,并通过分化为肌成纤维细胞(MFB)加强合成胶原纤维的能力,以修复组织损伤。MFB 持续存在使心肌间质胶原容积/成分改变,且排列紊乱。同时,残余心肌细胞肥大以暂时维持心脏功能。在此过程中,Rho 激酶介导的细胞骨架重组既是 CFB 迁移和 MFB 分化的主要动力^[7],也是促进心肌细胞肥大的关键。Rho 激酶可能通过激活 ERK1/2 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路,诱导心肌细胞肥大^[3,8]。

另外,本实验发现法舒地尔在降低 Ang II 水平的同时,还能降低心肌 MMP9 和 TIMP1 的表达。MMP9 在心肌肥厚中具有重要作用^[9-10]。TIMP1 一方面可与 MMP9 酶原结合延缓后者的活化,另一方面,可与活性 MMP9 以 1:1 比例共价结合形成不可逆复合物,阻断 MMP9 与底物结合,从而减少胶原的降解。MMP9/TIMP1 比值降低是间质胶原过度沉积的重要因素。FRANZ 等^[11]研究发现,高血压左心室肥厚患者血清 MMP9、TIMP1 较正常人明显升高,且离心性肥厚组 MMP9 水平较向心性肥厚组患者低,但 2 组 TIMP1 水平并无显著差别。从无心血管疾病临床依据的志愿者获得的几组数据显示,随年龄增长,血浆 MMP9 水平呈下降趋势,而 TIMP1 水平呈上升趋势,MMPs 和 TIMP1 的改变与左心室向心性肥厚和左心室舒张功能障碍相关^[12],这或许能部分解释 MMP9、TIMP1 水平在不同研究中相悖

的原因。

综上所述,Rho 激酶活性在压力超负荷左心室肥厚模型大鼠心肌明显升高,法舒地尔改善腹主动脉缩窄大鼠左心室肥厚的作用与降低心肌 MMP9 和 TIMP1 表达有关。

[参 考 文 献]

- [1] ZHOU Q, GENSCHE C, LIAO JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32(3): 167.
- [2] SOGA J, NOMA K, HATA T, *et al.* Rho-associated kinase activity, endothelial function, and cardiovascular risk factors [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(10): 2353.
- [3] IKEDA S, SATOH K, KIKUCHI N, *et al.* Crucial role of rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(6): 1260.
- [4] GABRIELLI L, WINTER JL, GODOY I, *et al.* Increased rho-kinase activity in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy [J]. *Am J Hypertens*, 2014, 27(6): 838.
- [5] SHI J, ZHANG YW, YANG Y, *et al.* ROCK1 plays an essential role in the transition from cardiac hypertrophy to failure in mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(5): 819.
- [6] HO TJ, HUANG CC, HUANG CY, *et al.* Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, protects against excessive endurance exercise training-induced cardiac hypertrophy, apoptosis and fibrosis in rats [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2012, 112(8): 2943.
- [7] LEE TM, LIN SZ, CHANG NC. Membrane ERalpha attenuates myocardial fibrosis via RhoA/ROCK-mediated actin remodeling in ovariectomized female infarcted rats [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(1): 43.
- [8] ZEIDAN A, JAVADOV S, KARMAZYN M. Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72(1): 101.
- [9] JIANG B, LI D, DENG Y, *et al.* Salvianolic acid A, a novel matrix metalloproteinase-9 inhibitor, prevents cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59621.
- [10] ZILE MR, DESANTIS SM, BAICU CF, *et al.* Plasma biomarkers that reflect determinants of matrix composition identify the presence of left ventricular hypertrophy and diastolic heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2011, 4(3): 246.
- [11] FRANZ M, BERNDT A, ALTENDORF-HOFMANN A, *et al.* Serum levels of large tenascin-C variants, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in concentric versus eccentric left ventricular hypertrophy [J]. *Eur J Heart Fail*, 2009, 11(11): 1057.
- [12] BONNEMA DD, WEBB CS, PENNINGTON WR, *et al.* Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) [J]. *J Card Fail*, 2007, 13(7): 530.