

网络出版时间: 2019-9-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1433.009.html>

蛋白激酶 D1 调控胶原表达逆转心肌梗死后心室重构的作用

杨雷 刘暖 毛秉豫

摘要 目的 探讨蛋白激酶 D1 (PKD1) 是否通过调控胶原表达逆转心肌梗死 (MI) 后心室重构 (VR) 的作用。方法 应用雄性 Wistar 大鼠, 按照数字随机法分为 3 组: 假手术组、模型组和 PKD1 组, 每组大鼠均 15 只。模型组和 PKD1 组采用经典的左冠状动脉结扎术复制 MI 模型, 假手术组仅履行手术程序但不结扎冠状动脉。PKD1 组给予每日 1 mg/(kg·d) 的剂量灌胃给药, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。4 周后进行血流动力学评估, 并应用 HE 染色、心肌细胞横截面面积测定、Masson 染色、Western blot 等方法分析 PKD1 对心肌组织肥大程度的影响和对胶原蛋白表达的调控作用。结果 与模型组比较, PKD1 用药可改善 MI 后心肌组织的血流动力学指标和心肌组织的坏死程度, 降低心肌细胞的横截面面积和心肌组织的胶原占比, 上调心肌组织中基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1) 的表达, 下调基质金属蛋白酶 1 (MMP-1)、MMP-8、I 型胶原 (Col I)、Col III、前胶原 C 端蛋白酶增强子 (PCPE)、富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白 (SPARC)、大鼠粘胶蛋白/肌腱蛋白 (TN-C) 和核转录因子 (NF-κB) p50 的表达, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 PKD1 可能有调控心肌组织中的胶原表达而逆转 MI 后 VR 的作用。

关键词 蛋白激酶 D1; 心肌梗死; 胶原表达; 心室重构; 心肌肥大

中图分类号 R 392.31; R 361.1; R 361.2; R 361.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1535-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.008

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后心肌组织的缺血受损可导致心室重构 (ventricular remodeling, VR); 心肌细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在 VR 的进程中发挥着重要的作用, 特别是和 ECM 的主要组成成分 I 型胶原 (collagen type I, Col I) 和 Col III 的大量积聚密切相关^[1]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的主要功

能之一是降解 ECM, 而 ECM 的过度降解也是引发 VR 的重要原因^[2]。在组织重塑过程中, 基质金属蛋白酶抑制剂 (matrix metalloproteinase inhibitors, TIMPs) 被分泌并抑制 MMPs 的活性水平。因此 MMPs 和 TIMPs 的动态平衡调节也是影响 VR 的关键因素之一^[2]。前胶原 C 端蛋白酶增强子 (pro-collagen C-terminal protease enhancer, PCPE)、富含半胱氨酸的分泌型酸性蛋白 (secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC)、粘胶蛋白/肌腱蛋白 C (tenascin C, TN-C) 和核转录因子 (nuclear transcription factor, NF-κB) p50 也是参与胶原代谢的代表性调控蛋白^[2-3]。

研究^[4-6]表明, 蛋白激酶 D1 (protein kinase D1, PKD1) 具有促使血受损心肌组织血管新生的作用, 但其对 MI 后心肌胶原蛋白表达的调控作用尚不清楚。该研究旨在探讨 PKD1 给药 4 周是否会影响大鼠 MI 后的 VR, 并分析其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 45 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 8 周龄, 体质量 200~220 g, 所有动物在标准饲养的环境下 (温度和湿度范围分别为 22~26 °C 和 53%~60%) 饲喂食物和饮水, 并在南阳理工实验动物伦理委员会 (实验批准号: NYIST-20180126) 监控下进行。

1.2 药物与试剂 PKD1 购自美国 Pierce 公司; MMP-1、MMP-8、TIMP1、Col I、Col III、PCPE、SPARC、TN-C、NF-κB p50 的一抗抗体均购自圣克鲁斯生物技术 (上海) 有限公司; 羊抗兔 IgG 二抗、DAB 显色液、BCA 蛋白测定试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.3 主要仪器 164-5052 型 PowerPac HC 电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); T25 组织匀浆机 (德国 IKA 公司); HX-100E 型小动物呼吸机、BL-420F 生物机能实验系统 (成都泰盟科技有限公司); ERM-3100 型半自动病理切片机 (苏州郝思琳科技有限公司); TKY-BMB 型石蜡包埋机 (深圳博大精科技实业有限公司); Nikon Tis 型荧光显微镜及 Nikon NIS-Ele-

2019-06-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81873106、81473438、81202791)

作者单位: 南阳理工学院河南省张仲景方药与免疫调节重点实验室, 南阳 473004

作者简介: 杨雷男副教授;

毛秉豫男教授, 责任作者, E-mail: maobingyu2005@126.com

ments Software BR 分析系统(日本尼康公司)。

1.4 动物造模 雄性 Wistar 大鼠 45 只,按照数字随机法分为 3 组,假手术组(Sham 组)、模型组(Model 组)和 PKD1 给药组(PKD1 组),每组大鼠均 15 只。参照之前的方法^[6],Model 组和 PKD1 给药组结扎大鼠左冠状动脉前降支造成 MI,Sham 组仅履行手术程序但不结扎冠状动脉。术后 3 d,PKD1 组开始给予 PKD1 灌胃给药,即按照每日 1 mg/(kg·d) 的剂量稀释至 2 ml 生理盐水中,连续灌胃 4 周。Sham 组和 Model 组每日生理盐水灌胃 2 ml,连续 4 周。在 4 周结束时,应用戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠,进行血流动力学评估。评估结束,75 mg/kg 戊巴比妥钠深麻醉下颈总动脉放血法处死动物,进行后续分析。

1.5 血流动力学评估 通过侵袭性手术评估动物的血流动力学数据。动物腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,将 SPR-838 压力容积导管经左颈动脉插入左心室(left ventricle, LV)腔内。连续监测 LV 的压力和容积,以便正确定位导管,定位后的导管被连接到压力换能器上。通过 BL-420F 生物机能实验系统记录左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左室压最大上升和下降速率等数据。

1.6 HE 染色及心肌细胞横截面面积测定 取处死后大鼠的心脏,将左心室与其他心脏结构分离,用 10% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,制作组织学 4 μm 厚切片,参照之前的方法^[4],制作 HE 染色切片,根据 Stefanon et al^[7] 所描述的方法,光学显微镜 400×放大视野下对左心室未梗死区域心肌组织进行分析,每只大鼠观察 5 个视野,手动计数 50 个细胞(10 个细胞/视野),采用 Nikon NIS-Elements Software BR 分析软件测量心肌细胞横截面积,作为评估 MI 后心室肥厚程度的指标之一。

1.7 Masson 染色 心肌组织取材同 HE 染色部分。参照之前的方法^[6],制作 Masson 染色病理切片。染色后,心肌胶原纤维在光镜下呈蓝绿色,心肌

组织呈现红色,胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)采用日本尼康公司的软件分析系统 Nikon NIS-Elements Software BR 进行分析。

1.8 Western blot 检测 取心尖部心肌组织,用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液浸泡后,JKA-T25 组织匀浆机将样品进行均匀化和离心分离,提取总蛋白。用 BCA 蛋白测定试剂盒测定总蛋白量。取 40 μg 的蛋白质应用于 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白条带转移到 0.2 μm 硝酸纤维素膜上。用蛋白封闭液封闭 2 h 后与 MMP-1、MMP-8、TIMP1、Col I、Col III、PCPE、SPARC、TN-C 和 NF-κB p50 的一抗抗体孵育。加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗孵育 2 h,置入 DAB 显色溶液中显色,以 β-actin 蛋白表达水平作为内参对照,AlphaView SA 软件分析各样本与 β-actin 蛋白灰度的比值,记录蛋白相对含量。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PKD1 对 MI 大鼠血流动力学的影响 与 Sham 组比较,Model 组大鼠 LVSP、左室压最大上升和下降速率值均减小($P < 0.01$),而 LVEDP 增大($P < 0.01$);与 Model 组比较,PKD1 组大鼠 LVSP、左室压最大上升和下降速率值均增大($P < 0.01$),而 LVEDP 减小($P < 0.01$),且所有值接近于 Sham 组大鼠。见表 1。

2.2 PKD1 对 MI 大鼠组织形态学的影响 3 组大鼠 HE 染色组织形态学结果表明,Sham 组大鼠呈现清晰规整的红色心肌,细胞轮廓清晰;Model 组大鼠心肌组织坏死严重,坏死的心肌被瘢痕组织取代,残存的心肌细胞明显肥大(绿色箭头),成纤维细胞(黄色箭头)增生明显,伴炎症细胞(红色箭头)浸润;PKD1 治疗组大鼠心肌细胞较 Sham 组仍显肥大,红色心肌组织结构清晰,少见坏死心肌和炎症细胞浸润,伴随明显的毛细血管和散在分布的红细胞。

表 1 PKD1 对 MI 大鼠血流动力学的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

项目	Sham 组	Model 组	PKD1 组	F 值
LVSP(mmHg)	129.64 ± 9.32	86.55 ± 7.21 **	125.37 ± 9.44 ##	111.269
LVEDP(mmHg)	4.23 ± 1.78	16.54 ± 1.82 **	4.15 ± 1.73 ##	241.501
左室压最大上升速率(mmHg/s)	6.16 ± 1.52	4.24 ± 1.43 **	6.07 ± 1.61 ##	7.604
左室压最大下降速率(mmHg/s)	6.26 ± 1.45	3.98 ± 1.32 **	6.11 ± 1.42 ##	12.486

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

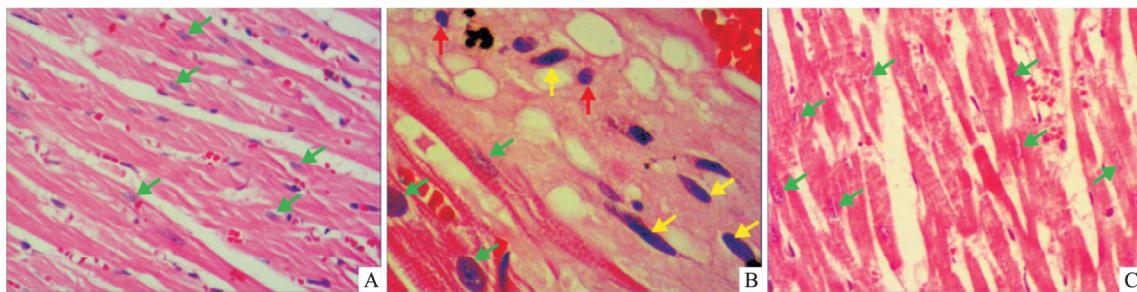


图1 PKD1对MI大鼠组织形态学的影响 HE×400

A: Sham 组; B: Model 组; C: PKD1 组; 绿色箭头示心肌细胞, 黄色箭头示成纤维细胞, 红色箭头示炎症细胞

表2 PKD1对MI大鼠心肌组织的胶原占比和心肌细胞截面积的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	Sham 组($n=15$)	Model 组($n=15$)	PKD1 组($n=15$)	F 值
CVF(%)	10.38 ± 3.28	$19.23 \pm 3.36^{**}$	$14.02 \pm 3.41^{\# \#}$	26.439
心肌细胞截面积(μm^2)	1332.49 ± 326.41	$2640.74 \pm 338.47^{**}$	$1696.62 \pm 323.24^{\# \#}$	63.012

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

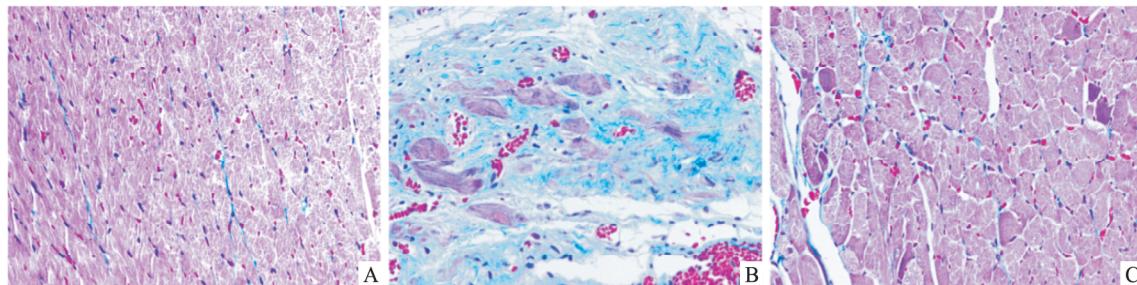


图2 PKD1对MI大鼠心肌纤维化的影响 Masson×400

A: Sham 组; B: Model 组; C: PKD1 组

见图1。

2.3 PKD1对MI大鼠心肌细胞截面积的影响 3组大鼠非梗死区心肌细胞的截面积分析结果表明, Sham 组大鼠心肌细胞的截面积正常; 与 Sham 组比较, MI 大鼠残存非梗死区域心肌组织中心肌细胞的截面积增大($P < 0.01$); 与 Model 组比较, PKD1 组大鼠心肌组织中心肌细胞的截面积减小($P < 0.01$), 但较 Sham 组增大($P < 0.01$)。见表2、图1。这表明 PKD1 给药后可改善 MI 大鼠心肌细胞的肥大程度。

2.4 PKD1对MI大鼠心肌纤维化的影响 3组大鼠心肌组织的纤维化程度和胶原占比分析结果表明, Sham 组大鼠心肌组织中红色的心肌组织中间杂有蓝色的胶原纤维, 但胶原占比较少; 与 Sham 组比较, Model 组大鼠残存的红色心肌组织较少, 心肌组织坏死严重, 坏死的心肌组织由大片蓝色的胶原纤维取代, 胶原占比升高($P < 0.01$); 与 Model 组比较, 应用 PKD1 后, 心肌组织坏死的程度明显减轻,

胶原纤维占比下降($P < 0.01$)。见表2、图2。这表明, PKD1 给药后可改善 MI 大鼠心肌组织的坏死程度, 降低心肌组织的胶原占比。

2.5 PKD1对MI大鼠心肌组织中胶原相关蛋白表达的影响 Western blot 结果表明, 与 Sham 组比较, MI 大鼠残存心肌组织中 MMP-4、MMP-8、Col I、Col III、PCPE、SPARC、TN-C 和 NF-κB p50 的表达均升高($P < 0.01$), TIMP1 表达降低($P < 0.01$); 与 Model 组比较, PKD1 组大鼠心肌组织中 TIMP1 的表达升高($P < 0.01$), 而 MMP-4、MMP-8、Col I、Col III、PCPE、SPARC、TN-C 和 NF-κB p50 的表达均降低($P < 0.01$), 但除了 NF-κB p50 的表达外, 均仍高于 Sham 组($P < 0.01$)。这表明 PKD1 给药可影响 MI 大鼠心肌组织中胶原相关蛋白的表达。见图3。

3 讨论

MI 后受损心肌组织的 ECM 中胶原产生和沉积增多, 导致心肌纤维化、心室壁僵硬以及心肌的收缩

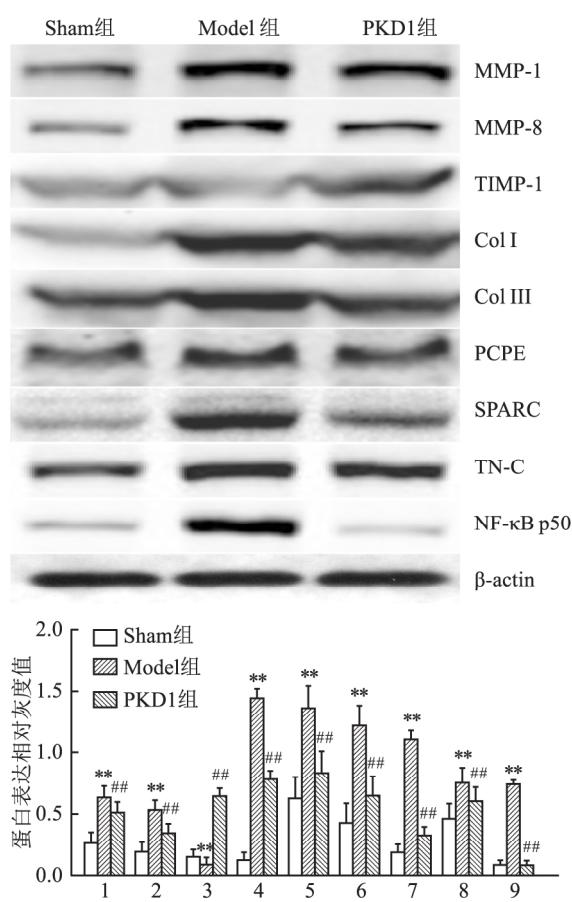


图3 PKD1 对 MI 大鼠心肌组织胶原相关蛋白表达的影响

1: MMP-1; 2: MMP-8; 3: TIMP-4; 4: Col I; 5: Col III; 6: PCPE; 7: SPARC; 8: TN-C; 9: NF-κB p50; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: # $P < 0.01$

和舒张功能障碍^[8]。本研究表明,PKD1 在改善 MI 大鼠心肌组织的血流动力学方面作用显著,这与之前的动物实验研究^[4]结果相一致,表明 PKD1 治疗可减轻心脏的损伤程度,改善心脏的收缩和舒张功能障碍。

本研究通过 Masson 染色分析评估了 MI 心肌组织的胶原占比,证实 PKD1 治疗可有效减轻心肌组织的纤维化程度。并证实 PKD1 可下调心肌组织中 Col I、Col III、MMP-1 和 MMP-8 的表达。MMPs 在心肌组织中被激活后可迅速降解 ECM 成分,导致心室壁变薄和扩张,心肌纤维化而引发 VR,甚至可能导致心功能衰竭^[9]。因此,MI 后 MMPs 的分泌增多很可能是 VR 及心力衰竭发生的起始因素^[9-11]。TIMPs 是 MMPs 的特异性内源性调节因子,TIMPs 参与调控心肌炎症和心室腔扩张的进程^[10],是维持心室几何结构的基础^[11]。本研究显示 PKD1 可下调 MMP-1 和 MMP-8 的表达,并上调 TIMP1 的表达。

这表明 PKD1 可能通过上调 TIMPs 和下调 MMPs 的表达而减少 ECM 的过度降解,抑制心肌纤维化的进展,减轻心肌组织的胶原沉积,并最终逆转 VR。

PKD1 还通过调控两种特异性蛋白 PCPE 和 SPARC 的表达而影响胶原的合成。PCPE 具有增强前胶原 C 蛋白酶调控合成新胶原蛋白的作用^[12]。SPARC 通过与胶原蛋白前体的结合而调节新胶原纤维的形成^[13]。本研究证实,PKD1 可下调 PCPE、SPARC、Col I 和 Col III 的表达水平。这表明 PKD1 可有效减少组织胶原的合成并促进其降解,从而改善心肌组织的纤维化程度。

TN-C 参与新胶原分子的形成并调节 NF-κB 活化^[14]。TN-C 的缺失可减少 MI 后心肌纤维化程度,并改善心脏的舒张功能而减轻 MI 后的心功能障碍^[13]。本实验表明 PKD1 治疗可减少 MI 大鼠心肌组织中的 TN-C 及 NF-κB p50 的表达。这可能是由于 PKD1 治疗抑制了 TN-C 和 NF-κB p50 激活的炎症信号通路参与的 VR。

本研究还显示,PKD1 用药组大鼠心肌细胞横截面积、心肌细胞的肥大程度及胶原相关蛋白的含量,尽管较 Model 组明显改善,但较 Sham 组仍存在着差异。这表明 PKD1 用药在抑制心肌肥厚方面的作用是有限的。然而,PKD1 用药组大鼠在改善 MI 大鼠的血流动力学方面却十分显著,几乎接近于 Sham 组大鼠,而血流动力学指标又是评估心功能的重要指标之一。据此,课题组推测 PKD1 改善 MI 后的 VR 作用除了和一定程度上逆转心肌肥厚有关,同时也可能与 PKD1 的促血管新生作用密切相关^[4-6]。PKD1 作用后诱导新的毛细血管生成,可以满足肥厚心肌的血供,而这种肥厚的心肌在保证心肌强有力收缩的同时并不引发心肌缺血。因而,PKD1 用药后未完全被抑制的心肌肥厚未必是一种病理性心肌肥厚,有可能是一种生理性肥厚,这对于基于“PKD1”靶点的新药开发提供了一种新的思路。

参考文献

- Reichert K, Pereira do Carmo H R, Galluce Torina A, et al. Atorvastatin improves ventricular remodeling after myocardial infarction by interfering with collagen metabolism [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166845.
- Hibbert S A, Watson R E B, Griffiths C E M, et al. Selective proteolysis by matrix metalloproteinases of photo-oxidised dermal extracellular matrix proteins [J]. Cell Signal, 2018, 54: 191-9.
- Stujanna E N, Murakoshi N, Tajiri K, et al. Rev-erb agonist im-

- proves adverse cardiac remodeling and survival in myocardial infarction through an anti-inflammatory mechanism [J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0189330.
- [4] 杨雷, 刘暖, 毛秉豫, 等. 蛋白激酶 D1 促血管新生的体内外实验分析 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(1): 146–50, 155.
- [5] 刘暖, 杨雷, 毛秉豫, 等. 蛋白激酶 D1 在大鼠骨髓源性内皮祖细胞中的促血管新生作用 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(9): 1259–63.
- [6] 付卫云, 刘暖, 王延柯, 等. 黄芪甲苷通过调控 PKD1-HDAC5–VEGF 通路促进心肌梗死大鼠血管新生 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(4): 643–9.
- [7] Stefanon I, Valero-Munoz M, Fernandes A A, et al. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64986.
- [8] Suthahar N, Meijers W C, Sillje H H W, et al. From inflammation to fibrosis—molecular and cellular mechanisms of myocardial tissue remodelling and perspectives on differential treatment opportunities [J]. Curr Heart Fail Rep, 2017, 14(4): 235–50.
- [9] 王汉章, 马礼坤, 王磊, 等. ERK1/2 信号通路介导 PDGF-CC 诱导的鼠心肌纤维化及其机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(10): 1489–94.
- [10] Hopps E, Lo Presti R, Caimi G. Matrix metalloproteases in arterial hypertension and their trend after antihypertensive treatment [J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(2): 347–57.
- [11] Barlow S C, Doviak H, Jacobs J, et al. Intracoronary delivery of recombinant TIMP-3 after myocardial infarction: effects on myocardial remodeling and function [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313(4): H690–9.
- [12] Massoudi D, Germer C J, Glisch J M, et al. Procollagen C-proteinase enhancer 1 (PCPE-1) functions as an anti-angiogenic factor and enhances epithelial recovery in injured cornea [J]. Cell Tissue Res, 2017, 370(3): 461–76.
- [13] Frangogiannis N G. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease [J]. Physiol Rev, 2012, 92(2): 635–88.
- [14] Shimojo N, Hashizume R, Kanayama K, et al. Tenascin-C may accelerate cardiac fibrosis by activating macrophages via the integrin $\alpha v \beta 3$ /nuclear factor- κB /interleukin-6 axis [J]. Hypertension, 2015, 66(4): 757–66.

Protein kinase D1 reverses ventricular remodeling after myocardial infarction through modulating collagen expression

Yang Lei, Liu Nuan, Mao Bingyu

(Henan Key Laboratory of Zhang Zhongjing Formulae and Herbs for Immunoregulation, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004)

Abstract Objective To determine whether protein kinase D1 (PKD1) would reverse ventricular remodeling after myocardial infarction (MI) through modulating collagen expression. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into three groups: sham group, model group and PKD1 group, number of rats was 15 in each group. MI was induced in rats by ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD), while sham surgery without LAD ligation. PKD1 group was given PKD1 by 1 mg/(kg·d) after oral administration, while the sham and model groups were fed the same equivalent normal saline. After 4 weeks, hemodynamic characteristics were obtained by a pressure-volume catheter, and HE staining, the histologic analysis of myocyte cross-sectional area, the Masson staining and the Western blot method were implemented to assess the effect of PKD1 on the hypertrophy and expression of collagen proteins. **Results** Compared with the model group, PKD1 significantly improved the hemodynamic parameters and the degree of myocardial necrosis after MI, decreased the cross-sectional area of myocardial cells and collagen percentage of myocardial tissue, up-regulated the protein expression of matrix metalloproteinase inhibitors 1 (TIMP1), and down-regulated the expression of matrix metalloproteinase-4 (MMP-4), MMP-8, collagen type I (Col I), Col III, procollagen C-terminal protease enhancer (PCPE), secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), Tenascin-C (TN-C) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) p50, while the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Protein kinase D1 might reverse the ventricular remodeling after MI through regulation of the collagen expression in myocardium.

Key words protein kinase D1; myocardial infarction; collagen expression; ventricular remodeling; myocardial hypertrophy