

·基础研究·

TGF- β /TIMP-1/MMP-1信号通路在有氧运动改善心衰大鼠心脏重塑中的作用*

甄洁¹ 李晓霞^{2,3}

摘要

目的:观察10周有氧运动对慢性心力衰竭大鼠心脏重塑的影响并探讨转化生长因子- β /金属蛋白酶组织抑制物-1/基质金属蛋白酶-1(transforming growth factor- β /tissue inhibitors of metalloproteinase-1/matrix metalloproteinase, TGF- β /TIMP-1/MMP-1)信号通路在心衰运动康复中的作用。

方法:38只Wistar大鼠随机分为假手术对照组(S组)、心衰对照组(H组)和心衰运动组(HE组)。HE组大鼠进行10周跑台运动,S组和H组保持安静状态。利用心脏超声检测心脏结构与功能;利用Masson染色法检测心肌胶原容积分数(CVF);实时荧光定量PCR检测I型胶原(Col-I)、III型胶原(Col-III)和心钠素(ANF)mRNA表达,Western blot检测TGF- β 、TIMP-1和MMP-1蛋白表达水平。

结果:①与S组比较,H组左室重量(LVW)、左室质量指数(LVMI)、左室舒张期前壁厚度(LVAWDd)、左室收缩期前壁厚度(LVAWDs)、左室舒张期后壁厚度(LVPWDd)、左室收缩期后壁厚度(LVPWDs),胶原容积分数(CVF),Col-I、Col-III和心钠素(ANF)mRNA,TGF- β 、MMP-1和TIMP-1蛋白表达升高($P<0.05$),BW、LVIDd、FS、LVEF,MMP-1/TIMP-1比值降低($P<0.05$)。②与H组比较,HE组CVF,Col-I、Col-III和ANF mRNA,TGF- β 、MMP-1和TIMP-1蛋白表达降低($P<0.05$),LVW、LVMI、LVIDd、FS、LVEF,MMP-1/TIMP-1比值升高($P<0.05$)。

结论:长期运动改善心衰大鼠心脏重塑,其机制与部分恢复TGF- β /TIMP-1/MMP-1信号功能,减少胶原沉积并减轻心肌纤维化有关。

关键词 有氧运动;心力衰竭;大鼠;心脏重塑;基质金属蛋白酶;细胞外基质

中图分类号:R541.6 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2015)-12-1212-05

TGF- β /TIMP-1/MMP-1 signal pathway in aerobic exercise-induced improvement of cardiac remodeling in heart failure rats/ZHEN Jie, LI Xiaoxia//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2015, 30(12): 1212-1216

Abstract

Objective: To observe the effects of 10-week aerobic exercise on cardiac remodeling in chronic heart failure rats and investigate the possible role of transforming growth factor- β /tissue inhibitors of metalloproteinase-1/matrix metalloproteinase (TGF- β /TIMP-1/MMPs) signal pathway in exercise rehabilitation of heart failure.

Method: A total of 38 Wistar rats were randomly divided into sham operation control (S) group, heart failure control (H) group and heart failure exercise (HE) group. Rats in HE group performed aerobic treadmill exercise of 10 weeks, while those of S and H groups maintained in resting state. Cardiac structure and function parameters were determined by ultrasonic cardiography; heart collagen volume fraction (CVF) was acquired by Masson staining; mRNA expressions of myocardial collagen type I (Col-I), collagen type III (Col-III) and atrial natriuretic factor (ANF) were detected by real-time fluorescent quantitation PCR; protein expressions of TGF- β 、TIMP-1 and MMP-1 were determined by Western blot technique.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2015.12.003

*基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2012HM074)

1 郑州大学体育系,河南郑州,450001; 2 山东体育学院; 3 通讯作者

作者简介:甄洁,女,硕士,讲师; 收稿日期:2014-12-04

Result: ①Compared with rats of S group, HR, left ventricular weight(LVW), left ventricular mass index(LVMI) (LVMI=LVW/BW), left ventricular anterior wall diameter at diastole(LVAWDd), left ventricular anterior wall diameter at systole(LVAWDs), left ventricular posterior wall diameter at diastole(LVPWDd), left ventricular posterior wall diameter at systole(LVPWDs), CVF, mRNA of Col-I, Col-III and ANF, protein of MMP-1 and TIMP-1 increased ($P<0.05$) while BW, LVIDd, FS, LVEF, MMP-1/TIMP-1 ratio decreased ($P<0.05$) in those of HF group.②Compared with animals of HF group, CVF, mRNA of Col-I, Col-III and ANF, protein of TGF- β , MMP-1 and TIMP-1 reduced ($P<0.05$) while LVW, LVMI, LVIDd, FS, LVEF and MMP-1/TIMP-1 ratio raised ($P<0.05$) in those of HE group.

Conclusion: Long-term aerobic exercise could improve cardiac remodeling in rats of heart failure, which was related to partially restore function of TGF- β /TIMP-1/MMP-1 signal pathway and reduce collagen deposition, alleviate myocardial fibrosis.

Author's address Physical Education Department of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001

Key word aerobic exercise; heart failure; rats; cardiac remodeling; matrix metalloproteinase; extracellular matrix

心脏重塑是慢性心力衰竭(简称心衰)发生发展的重要原因,胚胎基因激活、心肌肥大和细胞凋亡则是心脏重塑的主要病理生理机制,最终导致心功能下降^[1]。心衰时心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积引起心肌纤维化在心脏重塑中起重要作用^[2]。研究证实,胶原代谢受转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)等信号分子的调控,该信号途径出现异常时则造成胶原沉积和纤维化^[3]。临床研究显示,运动训练特别是中低强度有氧运动是心衰患者的重要康复手段,可改善心功能并提高患者生存质量^[4],可能与抑制心脏重塑有关^[5],但具体机制未明。本研究利用冠状动脉结扎法造成Wistar大鼠心衰模型,观察10周有氧运动对心脏结构、心功能、胶原含量以及心肌TGF- β 、TIMP-1和MMP-1基因表达的影响,探讨运动对心脏重塑的影响以及TGF- β /TIMP-1/MMP-1信号通路在其中的作用。

1 资料与方法

1.1 实验动物、心衰造模与分组

健康雄性SPF级Wistar大鼠38只,2月龄,体重250—280g,购自山东鲁抗医药股份有限公司(实验动物许可证号:SCXK[鲁]2008-0003)。随机选取28只动物进行心衰造模:1%戊巴比妥钠麻醉,仰卧固定,于胸骨左侧第3、4肋间开胸暴露心脏,由左心耳下方2—3mm处用0号丝线结扎左冠状动脉前降

支,迅速放回心脏,关闭胸腔缝合胸壁。另外10只大鼠进行假手术,即开胸后只栓线,不结扎,其他操作同上。术后一周肌注抗生素预防感染。4周后行超声心动检测,以左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) $\leq 45\%$ 作为造模成功的标志(其中2只动物造模失败,1只在造模后死亡)。将动物分为假手术对照组(S组, n=10)、心衰对照组(H组, n=12)和心衰运动组(HE组, n=13)。S组和H组保持安静状态, HE组进行10周跑台运动训练。

1.2 运动方案

首先参照本课题组已建立的递增负荷运动实验测定HE组大鼠的最大跑速^[6],方案为:15min热身(坡度0°,速度5m/min)后休息5min进行递增负荷实验,起始负荷为7m/min,每3min递增5m/min(坡度0°),直至力竭,记录最大跑速。HE组大鼠进行10周跑台运动训练,跑速:前2周为最大跑速的50%,后8周为最大跑速的60%;时间:第1天30min,以后每天递增10min,直至60min/d;频率:5d/week。

1.3 心脏结构与功能检测

动物腹腔麻醉后仰卧固定,用小动物超声仪(visualsonics vevo770,加拿大)检测心脏结构与功能(取胸骨旁左室短轴切面进行测量),参数包括左室舒张期内径(left ventricular internal diameter at diastole, LVIDd)、左室收缩期内径(left ventricular internal diameter at systole, LVIDs)、左室舒张期前壁厚度(left ventricular anterior wall diameter at diastole, LVAWDd)、左室收缩期前壁厚度(left ventricular anterior wall diameter at systole,

LVAWDs)、左室舒张期后壁厚度(left ventricular posterior wall diameter at diastole, LVPWDd)、左室收缩期后壁厚度(left ventricular posterior wall diameter at systole, LVPWDs)、左室缩短分数(left ventricular fractional shortening, LVFS)和LVEF。

1.4 动物取材

大鼠称体重(body weight, BW)后断头处死取心脏,分离左右心室,分别称量左室重量(left ventricular weight, LVW)、右室重量(right ventricular weight, RVW)并计算左室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)(LVMI=LVW/BW)。将左心室分成两部分,一部分进行胶原含量测定,另一部分迅速置于液氮中并转移至-80℃冰箱冻存待测基因表达。

1.5 心肌胶原含量测定

将左室心肌组织固定于10%的福尔马林中,经脱水、透明、包埋、切片(5μm)等操作后行Masson染色。每张切片随机选取5个视野,用图像分析软件计算心肌胶原面积,胶原组织面积占所测视野面积的百分比即为胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)。

1.6 基因表达水平检测

心肌组织匀浆后用Trizol法抽提总RNA,逆转录获得cDNA,实时荧光定量PCR(ABI 7900型荧光定量PCR仪,美国)测定心肌I型胶原(collagen type I, Col- I)、III型胶原(collagen type III, Col- III)和心钠素(atrial natriuretic factor, ANF)mRNA表达量。扩增条件为:预变性95℃/1min;95℃/15s, 55℃/15s, 72℃/15s,共40个循环。以β-actin作为内参,计算目的基因的相对表达量(S组的倍数)。引物序列见表1。蛋白水平使用Western blot法测定。

1.7 统计学分析

表1 引物序列设计

基因名称	序列	产物大小 (bp)
ANF	上游:5'-CATCACCTGGGCTTCTTCCT-3'	406
	下游:5'-TGGGCTCAATCCTGTCAATC-3'	
Col- I	上游:5'-TTGACCCTAACCAAGGATGC-3'	197
	下游:5'-CACCCCTTCTGCGTTGTATT-3'	
Col- III	上游:5'-AGATGGACTAAGTGGACATC-3'	450
	下游:5'-CATGTTTCTCCGGTTCCAT-3'	
β-actin	上游:5'-AGACCTCAACACCCAG-3'	316
	下游:5'-CACGATTCCCTCTCAGC-3'	

数据以均数±标准差表示,组间比较使用单因素方差分析。显著性水平定为P<0.05。使用SPSS 15.0对数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 样本量

实验过程中,S组拒跑大鼠1只,H组死亡2只、拒跑1只,HE组死亡3只、拒跑2只。剔除上述动物后,最终样本量n=26,其中S组(n=9)、H组(n=9)、HE组(n=8)。

2.2 心脏结构与功能变化

与S组比较,H组BW、LVIDd、FS和LVEF降低(P<0.05),LVW、LVMI、LVAWDd、LVAWDs、LVPWDd和LVPWDs增加(P<0.05);与H组比较,HE组LVW、LVMI、LVIDd、FS和LVEF升高(P<0.05)。见表2。

2.3 心脏组织病理学改变

S组心肌纤维着色均匀,无胶原成分;H组心肌细胞减少,胶原成分显著增多,纤维化程度明显,CVF高于S组(24.3%±5.8% vs 6.5%±1.1%, P<0.05);HE组较H组心肌细胞增多且排列较为整齐,胶原纤维(即CVF)明显减少(15.7%±3.9% vs 24.3%±5.8%, P<0.05)。Masson染色见图1。

2.4 基因表达的变化

与S组比较,H组ANF、Col- I和Col- III mRNA, MMP-1、TIMP-1和TGF-β蛋白水平升高(P<0.05),MMP-1/TIMP-1比值降低(P<0.05);与H组比较,HE组ANF、Col- I和Col- I II mRNA, MMP-1、

表2 心脏结构与功能变化 (x±s)

	假手术对照组 (n=9)	心衰对照组 (n=9)	心衰运动组 (n=8)
BW(g)	430±38	316±36 ^①	337±45
LVW(mg)	802±105	988±112 ^①	1178±118 ^②
RVW(mg)	185±19	178±20	185±24
LVMI(mg/g)	1.89±0.26	3.16±0.50 ^①	3.59±0.52 ^②
LVIDd(mm)	8.5±1.3	7.2±1.0 ^①	8.6±1.2 ^②
LVIDs(mm)	5.3±0.8	5.1±1.1	5.4±0.9
LVAWDd(mm)	1.3±0.3	1.9±0.2 ^①	1.8±0.2
LVAWDs(mm)	2.6±0.4	3.2±0.7 ^①	3.0±0.9
LVPWDd(mm)	1.4±0.2	2.2±0.5 ^①	2.2±0.6
LVPWDs(mm)	2.2±0.5	2.8±0.8 ^①	2.6±0.7
FS(mm/s)	47.6±6.7	31.2±4.6 ^①	38.8±3.9 ^②
LVEF(%)	56.5±7.6	38.5±5.7 ^①	47.2±5.8 ^②

①与假手术对照组比较P<0.05;②与心衰对照组比较P<0.05

TIMP-1 和 TGF-β 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), MMP-1/TIMP-1 比值升高 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 2。

图1 心肌 Masson 染色

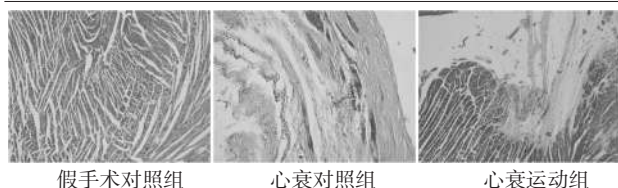
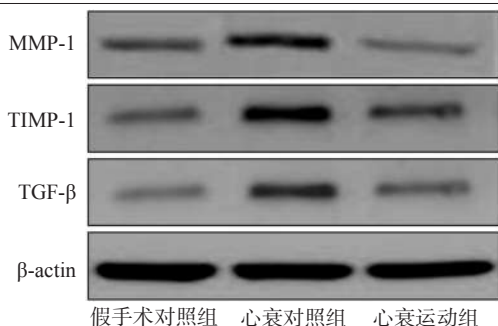


表3 基因表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

	假手术对照组 (n=9)	心衰对照组 (n=9)	心衰运动组 (n=8)
mRNA			
ANF	1.00±0.10	3.78±0.65 ^①	1.59±0.20 ^②
Col- I	1.02±0.12	2.67±0.56 ^①	1.86±0.55 ^②
Col- I II	0.99±0.15	3.39±0.68 ^①	1.80±0.36 ^②
蛋白			
MMP-1	0.99±0.12	1.76±0.16 ^①	1.20±0.10 ^②
TIMP-1	1.01±0.11	3.19±0.40 ^①	1.55±0.16 ^②
TGF-β	1.00±0.10	2.80±0.30 ^①	1.70±0.20 ^②
MMP-1/TIMP-1	1.00±0.11	0.52±0.08 ^①	0.80±0.09 ^②

①与假手术对照组比较 $P < 0.05$; ②与心衰对照组比较 $P < 0.05$

图2 蛋白表达图



3 讨论

本研究成功建立心梗后心衰模型,形态学上表现为心脏重量(LVW、LVMI)增加、心腔缩小(LVIDd降低)、心壁增厚(LVAWDd、LVAWDs、LVPWDd和LVPWDs增加),即向心性肥大;基因水平上表现为胚胎基因(ANF)重新激活;心脏发生重塑并最终导致心功能进行性下降(FS和LVEF降低)。经过10周有氧运动后,与H组比较,HE组左室重量(LVW、LVMI)增加、心腔内径(LVIDd)增大,室壁厚度无明显改变,即左室发生“离心性肥大”,可能是由于有氧运动增加回心血量(即前负荷或容量负荷)造成的^[7]; ANF表达下调说明胚胎基因异常激活得到抑制,FS

和LVEF增加预示心肌收缩力提高;上述结果提示,运动诱导的左室生理性重塑与病理性重塑在心衰大鼠运动康复过程中同时存在并相互抗衡^[8],最终前者的良性作用逆转了后者的负面效应,表现为左室结构由病理性肥大向生理性肥大转变,心功能得到提高。因此,长期有氧运动通过抑制心衰时心脏重塑改善心功能。

心衰时心肌ECM过度沉积,心室壁顺应性下降,电离散度增加,易引发致命性心律失常,因此心肌纤维化在心脏重塑中起重要作用^[9]。心肌ECM主要由I型和III型胶原组成,其生理功能在于为心肌细胞提供支持、传导应力并保证心肌顺应性^[10]。在本研究中,H组Col- I和Col- III mRNA表达上调,Masson染色示胶原成分显著增多,CVF明显升高,提示心衰时胶原过度沉积并导致心肌纤维化。有氧运动后,HE组Col- I和Col- III mRNA表达较H组下调,CVF明显减少,与Kwak等^[5]针对衰老模型的研究结果一致,说明有氧运动可减轻心肌胶原沉积,抑制心脏重塑。此外,Choi等^[11]发现,12周跑台训练在改善衰老大鼠心功能的同时降低了心肌胶原交联,提示运动对胶原含量和胶原的空间排列及相互作用均具有良性作用。

胶原代谢主要受MMP、TIMP和TGF-β调控。MMP是胶原降解的蛋白水解酶,心肌可表达多种MMP,其中MMP-1主要负责降解I型和III型胶原。TIMP-1是MMP-1的内源性抑制物,与MMP-1结合后使其失活。MMP-1和TIMP-1之间呈现动态平衡状态,调节着胶原蛋白的合成、代谢与更新。TGF-β与心血管疾病密切相关,心肌特异性表达TGF-β可导致心肌肥厚和心肌纤维化^[12]。内皮素、血管紧张素II等诱导心肌纤维化的因子均可导致TGF-β增加,因此TGF-β上调是多种因素诱导心肌纤维化的共同通路。新近的研究还发现,TGF-β是TIMP-1上游的信号分子^[13],TGF-β通过上调TIMP-1表达参与心脏重塑进程,降低TGF-β表达则可减弱心肌胶原堆积^[14]。一般认为,心衰时TGF-β和TIMP-1表达上调^[15],但关于心脏重塑时MMPs表达的变化尚有争议,有学者认为MMPs表达下调导致胶原堆积,心肌发生纤维化^[16];但Mukherjee等^[17]和礼海^[18]等则发现,心衰时心肌MMP-1明显增加,

Oyamada 等^[19]证实缺血-再灌注损伤时 MMP-1 表达上调, MMP-1 过度分解胶原蛋白引起心肌细胞间质退化, 导致心肌排列紊乱、心肌扩张并发展为心室腔扩大, 最终发生心脏重塑; 研究结论的差异可能与实验模型、心衰程度以及心衰持续时间有关。在本研究中, 与 H 组比较, HF 组 TGF- β 、TIMP-1 和 MMP-1 蛋白表达均出现上调, 而 MMP-1/TIMP-1 比值下降, 提示 TIMP-1 的抑制作用增强, MMP-1 的相对活性减弱, 降解胶原的能力下降。MMP-1 表达上调可能是一种代偿反应, 胶原代谢平衡最终由 MMP-1/TIMP-1 比值决定^[20]。经过 10 周有氧运动后, HE 组 TGF- β 、TIMP-1 和 MMP-1 表达量均下调, MMP-1/TIMP-1 比值则增加, 提示 TIMP-1 对 MMP-1 的抑制作用得到部分解除, 说明长期有氧运动可通过抑制 TGF- β 过表达调节 MMP-1/TIMP-1 动态平衡, 减少胶原沉积并减轻心肌纤维化, 从而抑制心衰时心脏重塑。总之, TGF- β /TIMP-1/MMP-1 信号通路参与了运动改善心肌重塑的过程, 可能是运动对心衰心脏起保护效应的机制之一。

4 结论

心衰时心脏发生重塑, 表现为心脏肥大、心功能下降, 其机制与 TGF- β /TIMP-1/MMP-1 信号转导异常造成的胶原沉积有关; 长期有氧运动通过抑制胶原合成并促进其降解减轻心衰大鼠心肌纤维化并改善心功能, 心脏重塑得到抑制和改善, 其机制可能与部分恢复 TGF- β /TIMP-1/MMP-1 信号功能有关。

参考文献

[1] Johnson FL. Pathophysiology and etiology of heart failure [J]. *Cardiol Clin*, 2014, 32(1): 9—19.
[2] Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2014, 19(2): 173—185.
[3] Khanna AK, Hosenpud JS, Plummer MS, et al. Analysis of transforming growth factor-beta and profibrogenic molecules in a rat cardiac allograft model treated with cyclosporine[J]. *Transplantation*, 2002, 73(10): 1543—1549.
[4] Brum PC, Bacurau AV, Cunha TF, et al. Skeletal myopathy in heart failure: effects of aerobic exercise training[J]. *Exp Physiol*, 2014, 99(4): 616—620.
[5] Kwak HB, Kim JH, Joshi K, et al. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart[J]. *FASEB J*, 2011, 25(3): 1106—1117.
[6] 周义义, 李晓霞. 运动对慢性心力衰竭大鼠心脏交感神经功能

的调节——去甲肾上腺素转运蛋白的作用[J]. *体育科学*, 2012, 32(3): 67—73.
[7] Lewis EJ, McKillop A, Banks L. The Morganroth hypothesis revisited: endurance exercise elicits eccentric hypertrophy of the heart[J]. *J Physiol*, 2012, 590(Pt 12): 2833—2834.
[8] 刘冠楠, 陈钢. 运动性与病理性心脏肥大[J]. *沈阳体育学院学报*, 2014, 33(2): 90—96.
[9] 王忠振, 夏云龙. 心脏核磁共振成像技术对心力衰竭患者心肌纤维化的评估与临床应用[J]. *心血管病学进展*, 2013, 34(1): 104—107.
[10] Mercer SE, Odelberg SJ, Simon HG. A dynamic spatiotemporal extracellular matrix facilitates epicardial-mediated vertebrate heart regeneration[J]. *Dev Biol*, 2013, 382(2): 457—469.
[11] Choi SY, Chang HJ, Choi SI, et al. Long-term exercise training attenuates age-related diastolic dysfunction: association of myocardial collagen cross-linking[J]. *J Korean Med Sci*, 2009, 24(1): 32—39.
[12] Hao X, Zhang Y, Zhang X, et al. TGF-beta1-mediated fibrosis and ion channel remodeling are key mechanisms in producing the sinus node dysfunction associated with SCN5A deficiency and aging[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2011, 4(3): 397—406.
[13] Ji H, Tang H, Lin H, et al. Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor-beta/Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation[J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(6): 787—792.
[14] Chen R, Xue J, Xie ML. Reduction of isoprenaline-induced myocardial TGF-beta1 expression and fibrosis in osthole-treated mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 256(2): 168—173.
[15] Kapur NK. Transforming growth factor-beta: governing the transition from inflammation to fibrosis in heart failure with preserved left ventricular function[J]. *Circ Heart Fail*, 2011, 4(1): 5—7.
[16] Deatrick KB, Luke CE, Elflin MA, et al. The effect of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 2/9 deletion in experimental post-thrombotic vein wall remodeling[J]. *J Vasc Surg*, 2013, 58(5): 1375—1384.
[17] Mukherjee R, Snipes JM, Saunders SM, et al. Discordant activation of gene promoters for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of the metalloproteinases following myocardial infarction[J]. *J Surg Res*, 2012, 172(1): 59—67.
[18] 礼海, 张艳, 马金. 益气活血复方联合运动疗法对慢性心力衰竭大鼠心肌组织 MMP-1 及 III 型胶原表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(7): 955—960.
[19] Oyamada S, Bianchi C, Takai S, et al. Chymase inhibition reduces infarction and matrix metalloproteinase-9 activation and attenuates inflammation and fibrosis after acute myocardial ischemia/reperfusion[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339(1): 143—151.
[20] Yang DC, Ma ST, Tan Y, et al. Imbalance of matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and loss of fibronectin expression in patients with congestive heart failure[J]. *Cardiology*, 2010, 116(2): 133—141.