

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.16.0916

·论著·

Ghrelin 及其受体在大鼠心肌梗死后的动态表达

袁明杰,孔彬,胡红耀,权力,王鑫,梁锦军,唐艳红

(武汉大学人民医院心血管内科,湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 Ghrelin 是近年发现的一种新的生长激素释放肽,具有心血管保护效应。本研究旨在观察心肌梗死(MI)后 Ghrelin 及其受体 GHSR-1a 的动态表达及其变化。**方法** 30 只 SD 雄性大鼠,随机分为四组,分别为假手术组(6 只),心肌梗死后 3 d 组(8 只),梗死 7 d 组(8 只),梗死 28 d 组(8 只)。采用冠状动脉结扎法制作心肌梗死模型,假手术组只在冠状动脉下穿线,但不结扎。采用实时定量 PCR 方法检测梗死边缘心肌 Ghrelin 及 GHSR-1a mRNA 表达,免疫印迹法检测梗死边缘心肌 Ghrelin 及 GHSR-1a 蛋白表达及分布。**结果** 与假手术组比较,MI 后 3 d、7 d、28 d 梗死周边区域心肌中 Ghrelin mRNA 表达明显降低($P<0.05$),且呈逐渐下降趋势;而 GHSR-1a mRNA 表达显著增加($P<0.05$);梗死 3 d 组与梗死 7 d 组差异无统计学意义($P>0.05$)。免疫印迹显示假手术组大鼠心肌显示出了较强的 Ghrelin 阳性表达,而心肌梗死后 Ghrelin 阳性表达明显降低($P<0.05$);与此相反,GHSR-1a 蛋白表达在梗死后明显增加($P<0.05$)。**结论** Ghrelin/GHSR-1a 系统在梗死后心脏重构中可能起着重要作用,并可作为防止心脏重构的一个新的干预靶点。

【关键词】 Ghrelin; GHSR-1a; 心肌梗死; 心脏重构

【中图分类号】 R-332 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003—6350(2014)16—2341—04

Expression of Ghrelin and its receptor in rats after coronary artery ligation. YUAN Ming-jie, KONG Bin, HU Hong-yao, QUAN Li, WANG Xin, LIANG Jin-jun, TANG Yan-hong. Department of Cardiology, Wuhan University Renmin Hospital, Wuhan 430060, Hubei, CHINA

[Abstract] **Objective** Ghrelin is a novel growth hormone-releasing peptide, which has been shown to exert beneficial effects on cardiac function and ventricular remodeling. The present study aimed to investigate the expression of ghrelin and the growth hormone (GH) secretagogue receptor 1a (GHSR-1a). **Methods** After ligation of the anterior descending artery (LAD), adult male Sprague-Dawley rats were randomized to 3 d, 7 d and 28 d groups, with eight rats in each group. Another six rats underwent thoracotomy and pericardiotomy, but not LAD ligation (Sham group). Expressions of both ghrelin and GHSR-1a were assessed by means of immunohistochemistry and real-time PCR. **Results** Cardiac expression of ghrelin increased on day 3, 7 and 28 compared with the sham group ($P<0.05$). In contrast, the GHSR-1a mRNA levels increased during the same days ($P<0.05$). Decreased expression of ghrelin and increased expression of GHSR-1a were also observed in infarcted heart. **Conclusion** The ghrelin/GHSR-1a system may play an important role in regulating cardiac remodeling after MI and provide a potential pharmacological target for treating cardiac remodeling.

【Key words】 Ghrelin; GHSR-1a; Myocardial infarction; Cardiac remodeling

心肌梗死(Myocardial infarction, MI)是临床常见的心血管系统疾病之一,死亡率高。随着诊疗技术的提高,目前生存率得到了显著的提高,但是心肌坏死后将进一步引起心室重构、心律失常和心力衰竭。MI 后心脏的一系列变化时动态进展与压力负荷增加、交感神经活性增强及 RAS 系统的活化密切相关,多种炎症介质也参与其中。心功能的进行性下降,最终导致心力衰竭。

Ghrelin 是一种促生长激素释放激素,作为内源性的配体,能与体内生长激素促分泌素受体(GHSR)相结合,发挥生理功能^[1]。以往的研究显示, Ghrelin 具有多种心血管保护功能,包括:抗炎作用^[2-3],舒血管效应^[4],调节心肌细胞能量代谢,改善心脏恶病质等^[5-6]。

充分的了解 MI 后 Ghrelin 及其受体的动态变化有利于明确 Ghrelin 心脏保护作用的作用靶点,帮助

阐明其作用机制,为其药用价值的开发提供基础研究依据。本实验旨在通过建立大鼠 MI 模型,观察不同时间段心肌组织中 Ghrelin 及其受体的表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只成年雄性 SD 大鼠,10 周龄,体重为(250±30) g,由武汉大学医学动物中心提供。采用随机数字的方法被随机分为四组:假手术组 6 只,心肌梗死组 24 只(心梗后 3 d 组、7 d 组及 28 d 组,每组各 8 只)。实验动物在武汉大学人民医院动物房 SPF 环境中喂养,饲养环境符合实验条件要求。

1.2 主要试剂 3% 戊巴比妥钠,北京化工厂;DEPC 处理水,碧云天生物技术研究所;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;Marker 及引物由上海生工合成;PCR 试剂盒购自武汉众一生物科技公司;Ghrelin 及 GHSR-1a 多克隆抗体,Abcam 公司;HRP 标记羊抗免

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81300105);湖北省自然科学基金项目(编号:2012FFB04417)。

通讯作者:袁明杰。E-mail:yuanmingjie8341@163.com

多克隆抗体,碧云天生物技术研究所;S-P 免疫组化试剂盒购自深圳晶美生物科技公司。

1.3 主要仪器 小动物实验器械,上海手术器械厂;小动物呼吸机(TKR-200C 型),江西特力麻醉呼吸设备公司;LEAD-2000B32 道电生理记录仪,中国四川锦江通用实业有限公司;压力换能器,上海益联科教设备有限公司;MDF392 超低温冰箱,日本三洋公司;低温高速离心机,德国 Heraeus 公司;荧光定量 PCR 扩增仪,Biometra;VL 凝胶成像分析系统

1.4 模型制作 大鼠称重后,用 3% 戊巴比妥钠以 30 mg/kg 的剂量经腹腔注射麻醉,待呼吸平稳后,将大鼠后背位固定于实验用木板上,将心电图针形电极插入四肢皮下,用肢体导联进行心电图监测。颈部皮肤备皮,常规消毒。于左心耳根部下方 2 mm 处结扎冠状动脉前降支。在肺动脉圆锥和左心耳之间进针,进针深度 0.5 mm,以 6/0 缝线穿过心肌表层,在肺动脉圆锥侧出针,并观察心电图变化。如发现结扎线以下区域立刻变成暗红色,同时 I、aVL 导联 ST 段弓背向上抬高大于 0.2 mV 并持续 0.5 h 以上,则说明结扎成功。术后挤压胸腔,排出残留空气,清除胸腔内积血,逐层缝合关闭胸腔。待动物苏醒后拔除气管插管,缝合颈部切口。术后每天肌肉注射青霉素 40 万 U,共 3 d,预防感染。假手术组,只在开胸暴露心脏后,在冠脉前降支下穿线,而不结扎。

1.5 标本留取 分别在术后 3 d、7 d 及 28 d 迅速处死动物,迅速处死动物,取出心脏,用生理盐水洗净。沿房室环剪去左右心房及右室游离壁。沿着心脏长轴,从结扎点将左心室剪成两半。一半立刻保存在 -80℃ 冰箱,作为后面的 Real-time PCR 研究。另一半在 4% 中性福尔马林中固定后作为免疫组化研究。梗死边缘区界定为梗死疤痕外 0.5~1.0 mm。为了避免混淆梗死边缘区及非梗死区左室心肌,在留取标本时,梗死边缘区外 1~2 mm 心肌被去除掉。

1.6 实时定量 PCR 取心肌组织 100~150 mg,加入 1 ml TRIzol,冰上匀浆,提取总 RNA,采用 PCR 试剂盒扩增目的基因。引物序列设计如下:Ghrelin,上游 5'-GAAGCCACCAGCTAACTGC-3',下游 5'-TGCTGGTACTGAGCTCCTGA-3';GHSR-1a,上游 5'-CTCGGATCTGCTCATCTTCC-3',下游 5'-GGAAGC AGATGGCGAAGTAG-3';用 GAPDH (100 bp) 作为参照,其引物序列为:上游 5'-GCAAGTTCAACGGCA-CAG3',下游 5'-ATTGATGTTAGCGGGAT-3'。PCR 反应仪设置条件为 94℃ 5 min,其后以 94℃ 变性 10 s;58℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 5 s,循环 45 个周期,最后 72℃ 4 min 终止。反应完成后计算机自动分析 ct 值。根据溶解曲线和产物电泳结果判断反应产物特异性。目的基因相对 GAPDH 的含量表达采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算^[7]。

1.7 免疫组化研究 切片经常规二甲苯、梯度乙醇脱蜡后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 5 min×3 次。浸入新鲜配置的 3% H₂O₂ 溶液 10~15 min 以封闭内源性过氧化物酶活性,并行酶消化抗原修复。滴加正常山羊血清,室温孵育 10~15 min 以封闭荷电点,直接在切片上滴加 Ghrelin 及 GHSR-1a 多克隆抗体(工作浓度 1:100),37℃ 孵育 1 h 后转入 4℃ 冰箱,放置 24 h。PBS 洗涤后滴加生物素化山羊抗兔 IgG 二抗,37℃ 孵育 20 min,滴加试剂 SABC,37℃ 孵育 40 min。最后镜下 DAB 显色,PBS 终止反应。经苏木素复染后脱水,树胶封片。显微镜下观察阳性表达密度在总面积中所占的比例。

1.8 统计学方法 计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。统计处理由 SPSS17.0 软件包完成,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌 Ghrelin mRNA 与 GHSR-1a mRNA 表达的动态改变 Ghrelin 和 GHSR-1a 扩增曲线及溶解曲线见图 1(A-D),扩增产物电泳结果见图 2。结果显示,与假手术组比较,MI 后 3 d、7 d 至 28 d 梗死周边区域心肌中 Ghrelin mRNA 表达明显降低($P<0.05$),且呈逐渐下降趋势;但梗死 3 d 组与梗死 7 d 组差异无统计学意义($P>0.05$)。与假手术组比较,MI 后 3 d、7 d 至 28 d 梗死周边区域心肌中 GHSR-1a mRNA 表达显著增加($P<0.05$),且随着梗死时间的延长,其表达量呈逐渐升高趋势($P<0.05$),见图 1~4。

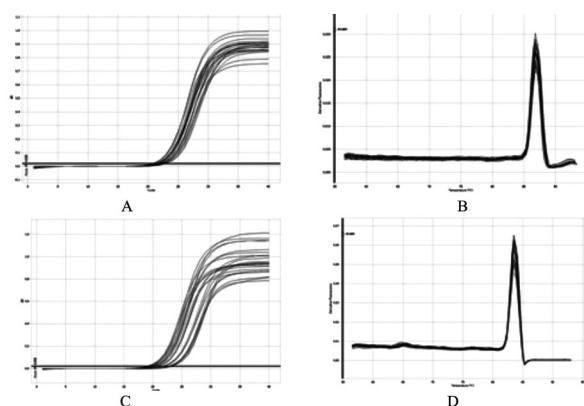


图 1 Ghrelin 扩增曲线(A)及溶解曲线(B),GHSR-1a 扩增曲线(C)及溶解曲线(D)。目的基因溶解曲线都只有一个高峰,提示引物设计特异,扩增高效。

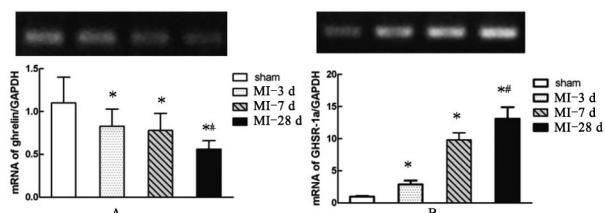


图 2 A Ghrelin mRNA 电泳图;B GHSR-1a mRNA 电泳图

2.2 心肌 Ghrelin 及其受体 GHSR-1a 的表达及分布 如图3所示,假手术组大鼠心肌显示出了较强的Ghrelin阳性表达,而心肌梗死后3 d、7 d及28 d,Ghrelin阳性表达明显较假手术组降低($P<0.05$);GHSR-1a在正常心肌中表达量很少,而心肌梗死后GHSR-1a表达明显增加,且随着时间延长,其表达量呈逐渐升高趋势,见图4($P<0.05$)。

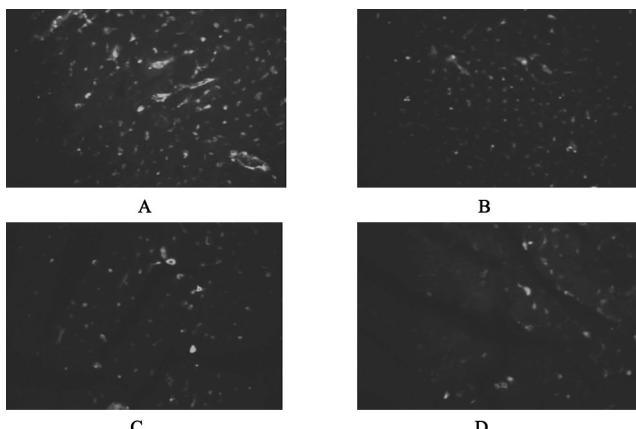


图3 Ghrelin免疫表达

注:A,对照组;B,MI后3 d组;C,MI后7d组;D,MI后28 d组。

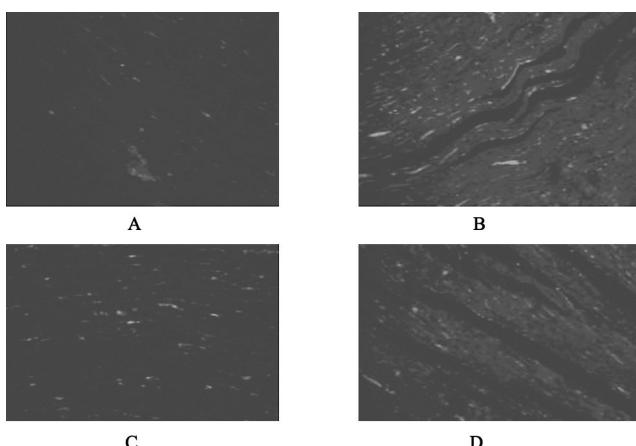


图4 GHSR-1a免疫表达

注:A,对照组;B,MI后3 d组;C,MI后7d组;D,MI后28 d组。

3 讨论

Ghrelin最早是日本学者在动物的胃内分离得到的,主要在胃肠组织表达,在全身其他组织也有分布^[8]。Ghrelin的生物学效应部分是通过其受体GHSR介导。(GHSR)为G蛋白耦联受体,广泛分布于下丘脑、垂体、心脏、胰腺、肠、脂肪组织、性腺等多种组织器官,主要包括GHSR-1a和GHSR-1b两种亚型,Ghrelin经过乙酰化后主要与GHSR-1a结合发挥作用。研究发现Ghrelin在心脏细胞本身及血管内皮细胞中可自身合成,而GHSR在心血管组织中也有表达,这提示Ghrelin可能直接对心血管系统发挥作用^[3,9]。

目前Ghrelin对心血管的作用效应还存在争论。

心肌细胞可以生成和分泌Ghrelin。近期研究表明Ghrelin可以促进人类胚胎干细胞在梗死心肌环境中生存和分化^[10]。通过激活GHSR-1a,Ghrelin对缺血心肌细胞产生保护效应,防止缺血再灌注损伤及防止恶性心律失常的发生^[11-12]。Ghrelin也可以改善缺血心肌的能量代谢并且防止血管紧张素诱导的心肌损伤。然而也有学者提出了不一样的意见,Ghrelin直接注射并不能对GH缺乏的患者产生心血管效应,且动物研究也发现Ghrelin并不能改善心功能及减小心脏扩大^[13-14]。

本研究成功制作了大鼠心肌梗死模型。通过研究发现,在心肌梗死后,随着时间的延长,梗死区域及梗死周边区域的Ghrelin表达量是动态降低的,于28 d明显降低。而梗死区及梗死周边区GHSR-1a的表达量则是动态升高的,于28 d明显升高。上述这些动态变化将减弱Ghrelin的心血管保护作用,而损伤因子持续存在,最终导致心衰的发生。也有研究认为在严重心衰患者中,血浆Ghrelin水平是降低的,且与增加的生长因子及炎症因子呈正相关^[15],笔者推测血浆Ghrelin水平增高可能是对心肌组织Ghrelin表达的代偿反应。

生长激素释放激素GHRH可以直接激活GHSR-1a高脂营养诱导的心肌细胞重构伴随着增加的GHSR-1a表达,PI3K及Akt^[16]。我们推测增加的GHSR-1a表达可能会对心脏重构起保护作用,但是Ghrelin系统在心血管中的保护机制尚不清楚。进一步可研究Ghrelin过表达对心脏重构及心力衰竭的影响。

本研究尚存在一些不足之处,如没有确切计算梗死面积,进一步Ghrelin及GHSR-1a的空间分布及相关关系尚需要进一步明确。总体来说,Ghrelin/GHSR-1a系统可能在心血管系统中发挥积极的作用,但具体机制尚不明确。

参 考 文 献

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. Nature, 1999, 402: 656-660.
- Ma Y, Zhang L, Edwards JN, et al. Growth hormone secretagogues protect mouse cardiomyocytes from *in vitro* ischemia/reperfusion injury through regulation of intracellular calcium [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e352-365.
- Huang CX, Yuan MJ, Huang H, et al. Ghrelin inhibits post-infarct myocardial remodeling and improves cardiac function through anti-inflammation effect [J]. Peptides, 2009, 30(12): 2286-2291.
- Ueberberg B, Unger N, Saeger W, et al. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues [J]. Horm Metab Res, 2009, 41: 814-821.
- Yuan MJ, He-Huang, Hu HY, et al. Myocardial angiogenesis after chronic ghrelin treatment in a rat myocardial infarction model [J]. Regul Pept, 2012, 179(1-3): 39-42.

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.16.0917

• 论著 •

激活 β_3 肾上腺素能受体 对心衰家兔室性心律失常及心率变异性、心率震荡的影响

李海涛¹, 吴明¹, 马建林¹, 林劲¹, 张敬文¹, 王裕岱¹, 韩丽娟²(海南省人民医院心血管病临床诊疗中心¹、病案室², 海南 海口 570311)

【摘要】 目的 观察给予 β_3 肾上腺素能受体(β_3 -AR)激动剂及抑制剂其对心力衰竭兔心律失常及心率变异性、心率震荡的影响。方法 构建容量及压力负荷型心力衰竭家兔模型, 动态心电图同步记录给药期间心律失常并进行心率变异性与心率震荡分析, 比较平均正常RR间期的标准差(SDNN)、低频成分(LF)、高频成分(HF)、低频与高频比值(LF/HF)、震荡初始(TO)和震荡斜率(TS)。结果 给予 β_3 -AR激动剂显著降低室性心律失常发生率($P<0.05$), 增加SDNN、LF、HF、LF/HF值($P<0.05$)及降低TO值, 增加TS值($P<0.05$), 给予 β_3 -AR抑制剂可以拮抗上述效应。结论 激动 β_3 肾上腺素能受体可减少心力衰竭室性心律失常发生, 可能与其对交感神经张力平衡相关。

【关键词】 β_3 肾上腺素能受体; 室性心律失常; 心率变异性; 心率震荡; 心力衰竭

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2014)16—2344—03

Effects of β_3 -AR activation on incidences of ventricular arrhythmia, heart rate variability and heart rate turbulence in rabbits with heart failure. LI Hai-tao¹, WU Ming¹, MA Jian-lin¹, LIN Jing¹, ZHANG Jing-wen¹, WANG Yu-dai¹, HAN Li-juan². Center of Cardiovascular Disease¹, Medical Records Office², People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan, CHINA

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of β_3 -adrenoceptor (β_3 -AR) activation on incidences of ventricular arrhythmia, heart rate variability and heart rate turbulence in rabbits with HF. **Methods** β_3 -AR agonists and inhibitors were administrated in 24 rabbits with heart failure (HF) induced by combination of artificial aortic insufficiency and aortic constriction. 6 hours Holter monitoring was performed to evaluate incidences of ventricular arrhythmia, heart rate variability and heart rate turbulence. **Results** β_3 -AR agonists significantly prevented incidences of ventricular arrhythmia ($P<0.05$), enhanced SDNN, LF, HF and LF/HF ($P<0.05$), and increased the TO and flatten TS ($P<0.05$). These effects were markedly antagonized when treated with specific β_3 -AR inhibitor ($P<0.05$). **Conclusion** β_3 -AR activation may decrease prevalence of ventricular arrhythmia in HF through rebalance sympathetic tone.

【Key words】 β_3 -adrenoceptor; Ventricular arrhythmia; Heart rate variability; Heart rate turbulence; Heart failure

基金项目: 国家自然科学地区基金(编号: 81260052); 海南省自然科学基金(编号: 812147); 海南省卫生厅自然科学基金(编号: 琼卫 2011-11)

通讯作者: 李海涛。E-mail: mdjht@hotmail.com

-
- [6] Kishimoto I, Tokudome T, Hosoda H, et al. Ghrelin and cardiovascular diseases [J]. J Cardiol, 2012, 59: 8-13.
 - [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (-Delta DeltaC) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
 - [8] Garcia EA, Korbonits M. Ghrelin and cardiovascular health [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2006, 6(2): 142-147.
 - [9] Maguire JJ, Kirby HR, Mead EJ, et al. Inotropic action of the puberty hormone kisspeptin in rat, mouse and human: cardiovascular distribution and characteristics of the kisspeptin receptor [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27601.
 - [10] Gao M, Yang J, Liu G, et al. Ghrelin promotes the differentiation of human embryonic stem cells in infarcted cardiac microenvironment. Peptides, 2012, 34:373-379.
 - [11] Casanueva FF, Camina JP, Carreira MC, et al. Growth hormone-releasing hormone as an agonist of the ghrelin receptor GHSR-1a [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105: 20452-20457.
 - [12] Mao Y, Tokudome T, Otani K, et al. Ghrelin prevents incidence of malignant arrhythmia after acute myocardial infarction through vagal afferent nerves [J]. Endocrinology, 2012, 153:3426-3434.
 - [13] Janssen JA, Poldermans D, Hofland LJ, et al. There are no acute cardiac effects of a single iv dose of human ghrelin in severe growth hormone deficient patients [J]. J Endocrinol Invest, 2004, 27: 659-664.
 - [14] Torsello A, Bresciani E, Rossoni G, et al. Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat [J]. Endocrinology, 2003, 144: 1787-1792.
 - [15] Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure-Relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors [J]. Circulation, 2001, 104: 2034-2038.
 - [16] Lacerda-Miranda G, Soares VM, Vieira AK, et al. Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice [J]. Peptides, 2012, 35: 65-73.

(收稿日期: 2014-03-10)