

论著·实验研究

曲尼司特对病毒性心肌炎小鼠心肌纤维化的作用

黄林枫 文纯 谢圭 陈淳媛

(中南大学湘雅三医院儿科, 湖南长沙 410013)

[摘要] **目的** 探讨曲尼司特在病毒性心肌炎心肌纤维化中的作用。**方法** 72只BALB/C小鼠随机分为对照组、模型组和干预组($n=24$)。模型组和干预组小鼠感染柯萨奇病毒B3建立病毒性心肌炎模型,其中干预组小鼠造模后即服用曲尼司特(200 mg/kg)灌胃给药直到取材前一天;对照组和模型组小鼠予等量生理盐水灌胃。造模后第7、14、28天取各组8只小鼠心肌组织,甲苯胺蓝染色、硫堇染色检测心脏肥大细胞数目,苏木精-伊红染色观察心肌组织病理学变化,Masson三色染色观察心肌纤维化,RT-PCR、免疫组化检测骨桥蛋白(OPN)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的mRNA及蛋白表达,并对OPN mRNA与肥大细胞数目作相关性分析。**结果** 模型组和干预组小鼠心肌组织OPN mRNA及蛋白的表达于第7天达最高,第14天次之,第28天最低;TGF- β 1 mRNA及蛋白的表达第7天升高,第14天达高峰,第28天较前稍下降;干预组小鼠心肌组织TGF- β 1、OPN mRNA及蛋白在各时间点的表达均低于模型组(均 $P<0.05$),但仍高于对照组(均 $P<0.05$)。肥大细胞的数目与OPN的表达呈正相关。**结论** 曲尼司特可能通过减少肥大细胞数,抑制TGF- β 1及OPN表达,在抗心肌纤维化过程中起重要作用。**[中国当代儿科杂志, 2014, 16(11): 1154-1161]**

[关键词] 曲尼司特;肥大细胞;骨桥蛋白;心肌纤维化;小鼠

Effect of tranilast on myocardial fibrosis in mice with viral myocarditis

HUANG Lin-Feng, WEN Chun, XIE Gui, CHEN Chun-Yuan. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China (Chen C-Y, Email: ccyzd@126.com)

Abstract: Objective To study the role of tranilast in the pathogenesis of myocardial fibrosis in viral myocarditis. **Methods** Seventy-two BALB/C mice were randomly divided into control, model and intervention groups ($n=24$ each). Mice in the model and intervention groups were infected with Coxsackievirus B3 to induce viral myocarditis. The intervention group was given with tranilast (200 mg/kg) by gavage until sacrifice for sampling, while the other two groups were administered with the same volume of normal saline. Cardiac tissues were obtained from 8 mice on 7, 14 and 28 days after modeling. The mast cell number was observed by toluidine blue staining and thionine staining. The cardiac tissues were stained with hematoxylin and eosin as well as masson trichrome to observe the pathological changes in cardiac tissues. The mRNA and protein expression of osteopontin and transforming growth factor- β 1 was measured by RT-PCR and immunohistochemistry respectively. **Results** In the model group, the mRNA and protein expression of osteopontin reached the highest level on the 7th day, decreasing from the 14th day, and became to the least on the 28th day; while the expression of TGF- β 1 increased from the 7th day, reaching a peak on the 14th day, and decreased slightly on the 28th day. The mRNA and protein expression of TGF- β 1 and OPN was lower in the intervention group than the model group ($P<0.05$), but higher than the control group ($P<0.05$). The expression of OPN mRNA was positively correlated to the number of mast cells. **Conclusions** Tranilast can reduce myocardial fibrosis by decreasing the number of mast cells, inhibiting the expression of TGF- β 1 and OPN. **[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(11): 1154-1161]**

Key words: Tranilast; Mast cell; Osteopontin; Myocardial fibrosis; Mice

[收稿日期] 2014-03-31; [接受日期] 2014-05-25

[基金项目] 湖南省自然科学基金(13JJ3034); 中南大学研究生创新课题(2013zzts340); 中南大学湘雅三医院重点学科建设基金。

[作者简介] 黄林枫,女,硕士,医师。

[通信作者] 陈淳媛,女,主任医师。

心肌炎是儿童发病和死亡的重要原因之一,柯萨奇病毒(coxsackievirus B3, CVB3)所致的病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是最常见病因^[1],可导致严重的心肌损伤、心肌纤维化。心肌组织过度纤维化引起心脏结构和功能异常,被认为是心肌炎发展到心肌病的关键因素,导致多种严重的并发症:心律失常、心力衰竭、心脏性猝死等。目前,VMC的治疗主要是通过改善心肌营养、大剂量丙种球蛋白免疫调节、皮质激素等对症支持治疗。近年来,肥大细胞和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在心血管疾病的研究取得了一定进展,肥大细胞和OPN可能参与VMC的急性期炎症反应及恢复期的胶原合成,最终导致心肌纤维化,并且肥大细胞还可能通过直接分泌OPN来参与心肌炎发病,影响VMC预后。

曲尼司特(tranilast, TL)作为一种肥大细胞稳定剂主要应用于治疗变态反应性疾病。最近,TL被报道可抑制多种器官纤维化,比如肝纤维化、肾纤维化、心纤维化等^[2-4],为临床治疗纤维化疾病提供一个新的途径。本研究利用CVB3建立小鼠VMC模型,用肥大细胞稳定剂TL进行干预,检测心肌组织肥大细胞数目、OPN及转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)表达,探讨TL在VMC心肌纤维化中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及病毒

72只4周龄健康纯种雄性BALB/C小鼠由中南大学湘雅医学院动物学部提供,体重 17.0 ± 0.8 g,饲养于SPF环境中。嗜心性CVB3 Nancy株由上海第二医科大学微生物教研室惠赠。储存于 -80°C 冰箱中。

1.2 主要试剂

TL购于中国药科大学制药厂。OPN、TGF- β 1引物由南京金斯瑞生物科技公司合成;TRIzol、PCR Mix和Marker I等购于康为世纪公司;逆转录试剂盒购于Ferments公司。兔抗小鼠OPN一抗购于Abcam公司;兔抗小鼠TGF- β 1一抗购于Santa Cruz公司。抗兔二抗、ABC试剂盒和DAB试剂盒均购于美国Vector公司。

1.3 动物模型及分组

72只4周龄雄性BALB/C小鼠完全随机分为对照组、模型组及干预组,每组24只,各组又按照造模后7、14、28 d分为3个亚组($n=8$)。对照组腹腔内注射0.1 mL不含病毒的Eagles培养液;模型组及干预组小鼠参照Fairweather等^[5]的实验方法建立VMC模型:即腹腔内注射0.1 mL含100半数组织培养感染量(TCID₅₀)的CVB3的病毒液造模;造模后干预组小鼠立即予TL灌胃给药(每日200 mg/kg,药物浓度20 mg/mL),维持TL给药直到取材前一天;对照组和模型组小鼠予等量生理盐水灌胃。全部小鼠常规饲养,全程记录小鼠的一般情况。

1.4 标本采集

病毒接种日定为0日,选择造模后第7、14、28天为时间点,各随机挑选8只小鼠断颈法处死,开胸摘取心脏并沿左室长轴切开,一部分迅速保存于 -70°C 冰箱用于RT-PCR测定;另一部分心脏标本置于4%多聚甲醛固定24 h后,常规脱水、浸蜡、包埋、切片,进行染色观察、免疫组化等检测。

1.5 病理学检测

常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,光镜下观察心肌病理改变。每个标本随机选取5张切片,每张切片随机观察5个高倍镜视野,参照Rezkalla等^[6]方法半定量计算心肌病理组织积分:无病变计0分,病变面积 $<25\%$ 计1分,25%~50%计2分,50%~75%计3分, $>75\%$ 计4分。

采用Masson三色染色,光镜下观察心肌胶原纤维,计算胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF), $\text{CVF} = \text{胶原面积} / \text{总面积} \times 100\%$ 。

1.6 肥大细胞染色

常规石蜡切片,行甲苯胺蓝染色、硫堇染色,光镜下观察肥大细胞数量及脱颗粒情况,每个标本随机选取5张切片,每张切片随机观察5个高倍镜视野,计算肥大细胞的数量。

1.7 RT-PCR检测心肌组织中OPN mRNA、TGF- β 1 mRNA的表达

取各时间点心肌组织,TRIzol提取总RNA,逆转录合成cDNA,经过PCR扩增后,将目的产

物于1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳,110 V电压下跑胶30 min。引物序列如下:内参 β -actin引物序列:上游:5'-CCACAGCTGAGAGGGAATC-3',下游:5'-TCTCCAGGGAGGAAGAGGAT-3',片段长度:108 bp;OPN引物序列:上游:5'-CCCAGGTGATAGCTTGGCTTATG-3',下游:5'-TGGCTGCCCTTTCCTTGTT-3',片段长度201 bp;TGF- β 1引物序列:上游:5'-CGGAAGCGCATCGAAGCCATCC-3',下游:5'-GCAAGCGCAGCTCTGCACGGGAC-3',片段长度345 bp。PCR反应体系共20 μ L,OPN反应条件为:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,59℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环;72℃再延伸5 min,4℃保存。TGF- β 1的反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,共30个循环;72℃再延伸10 min,4℃保存。

1.8 免疫组化ABC染色法检测OPN、TGF- β 1的表达

切片脱蜡至水,80℃抗原修复20 min,切片自然冷却后PBS洗2次,每次5 min,过氧化氢浸泡5 min,羊血清封闭40 min,一抗4℃过夜,二抗室温放置2 h,ABC室温放置2 h,DAB显色,封片。光镜下观察,每个标本随机选取5张切片,每张切片随机观察5个高倍视野,采用Metic Med 6.0数码医学图像分析系统检测每个视野内OPN、TGF- β 1阳性表达率。

1.9 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件包对数据进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用SNK-*q*检验;相关分析采用直线相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

整个实验过程中,无小鼠死亡,全部纳入研究。对照组小鼠一般情况可,无异常表现;而模型组及干预组小鼠在病毒接种后出现焦躁、拱背,毛发暗淡、粗糙、易掉毛等现象,甚至出现精神萎靡、对刺激反应减退、觅食减少和体重减轻等现象;干预组小鼠的表现较模型组轻。

2.2 心肌组织病理改变

HE染色显示对照组小鼠心肌细胞排列规则、整齐,胞核呈卵圆形,血管周围无明显炎性细胞浸润。模型组小鼠感染后第7天心肌细胞出现水肿,部分坏死崩解,伴有炎性细胞浸润,主要在血管周围;第14天仍可见炎性细胞浸润,心肌坏死加重,细胞排列紊乱,部分心肌细胞萎缩;第28天炎性细胞浸润基本消失,代之以成纤维细胞,纤维化明显。干预组小鼠病变较模型组小鼠变轻(图1)。Masson三色染色显示光镜下心肌胶原纤维呈蓝色,细胞质染呈红色,细胞核呈蓝褐色。对照组小鼠各时间点心肌血管周围及间质极少见蓝色胶原纤维。模型组第14天血管周围可见少量蓝色胶原纤维,但心肌间质无明显胶原;第28天可见大量排列紊乱的蓝色胶原纤维。各时间点,干预组小鼠蓝色胶原纤维较模型组小鼠少,但较对照组多(图2)。各时间点,对照组小鼠病理积分为0,干预组小鼠心肌病理积分均较模型组低(均 $P<0.05$)(表1);干预组CVF均较模型组低(均 $P<0.05$),但高于对照组(均 $P<0.05$)(表2)。

2.3 心脏肥大细胞数目及形态改变

肥大细胞存在于心肌之间和靠近血管的位置。光镜下观察,可见肥大细胞呈圆形、卵圆形和不规则形,散在于心肌组织中。甲苯胺蓝染色、硫堇染色显示肥大细胞为蓝紫色,对照组小鼠心脏组织中可见少许肥大细胞,形状大多呈圆形或椭圆形,无明显脱颗粒。模型组和干预组心脏组织中可见较多蓝紫色的肥大细胞,主要分布于血管周围,呈不规则状(图3)。各时间点干预组小鼠心肌组织肥大细胞数目均低于模型组(均 $P<0.05$),但均较对照组高(均 $P<0.05$),见表3。

2.4 心肌OPN及TGF- β 1 mRNA表达

RT-PCR检测发现,3组小鼠心肌中均有OPN及TGF- β 1 mRNA表达,对照组各时间点比较差异无统计学意义。模型组和干预组小鼠心肌组织OPN mRNA表达在第7天最高,第14天次之,第28天最低($P<0.05$);TGF- β 1 mRNA的表达第7天升高,第14天达高峰,第28天较前稍下降($P<0.05$)。其中,干预组小鼠心肌组织OPN及TGF- β 1 mRNA在各时间点的表达均低于模型组(均 $P<0.05$),但仍高于对照组(均 $P<0.05$)。见图4,表4。

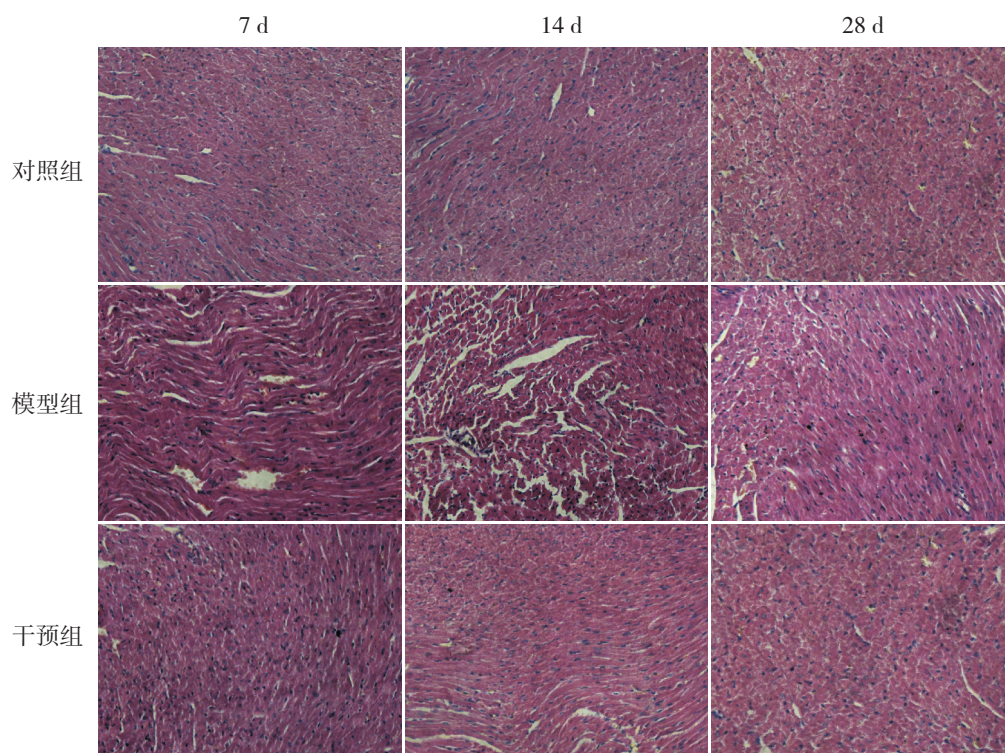


图 1 各组心肌组织病理改变（苏木精-伊红染色，×200） 对照组小鼠心肌排列规则、整齐，血管周围无明显炎性细胞浸润。模型组小鼠感染后第 7 天心肌细胞出现水肿，部分坏死崩解，伴有炎性细胞浸润，主要在血管周围；第 14 天仍可见炎性细胞浸润，心肌坏死加重，细胞排列紊乱，部分心肌细胞萎缩；第 28 天炎性细胞浸润基本消失，代之以成纤维细胞，纤维化明显。干预组各时间点病变较模型组病变轻。

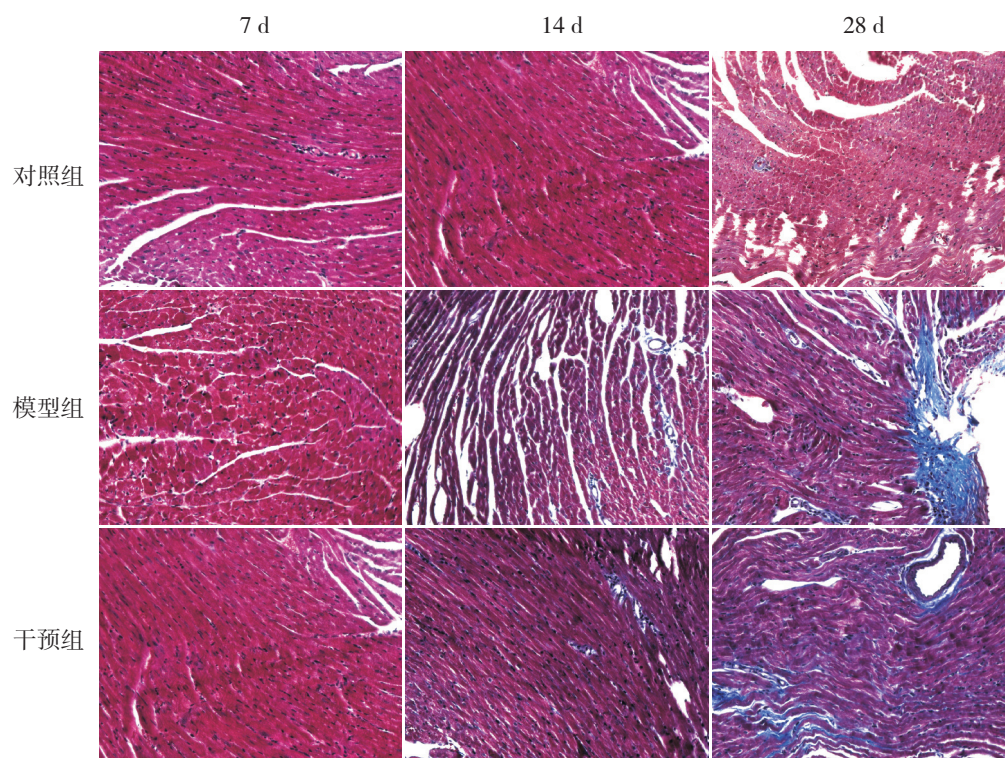


图 2 各组心肌组织胶原纤维染色结果（Masson 染色，×200） 光镜下心肌胶原纤维染呈蓝色，细胞质染呈红色，细胞核呈蓝褐色。对照组小鼠各时间点心肌血管周围及间质极少见蓝色胶原纤维。模型组第 14 天血管周围可见少量蓝色胶原纤维，但心肌间质无明显胶原；第 28 天可见大量排列紊乱的蓝色胶原纤维。各时间点，干预组小鼠蓝色胶原纤维较模型组小鼠少，但较对照组多。

表 1 各时间点各组心肌组织病理积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	7 d	14 d	28 d
对照组	8	0	0	0
模型组	8	2.4 ± 0.6^a	2.8 ± 0.7^a	1.5 ± 0.4^a
干预组	8	$1.7 \pm 0.4^{a,b}$	$2.1 \pm 0.5^{a,b}$	$1.1 \pm 0.3^{a,b}$
<i>F</i> 值		5.503	4.782	4.800
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各时间点各组心肌组织 CVF 比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	鼠数	7 d	14 d	28 d
对照组	8	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.4
模型组	8	1.5 ± 0.4^a	2.4 ± 0.7^a	4.3 ± 1.3^a
干预组	8	$1.1 \pm 0.4^{a,b}$	$1.7 \pm 0.6^{a,b}$	$2.8 \pm 0.8^{a,b}$
<i>F</i> 值		11.546	12.343	31.436
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

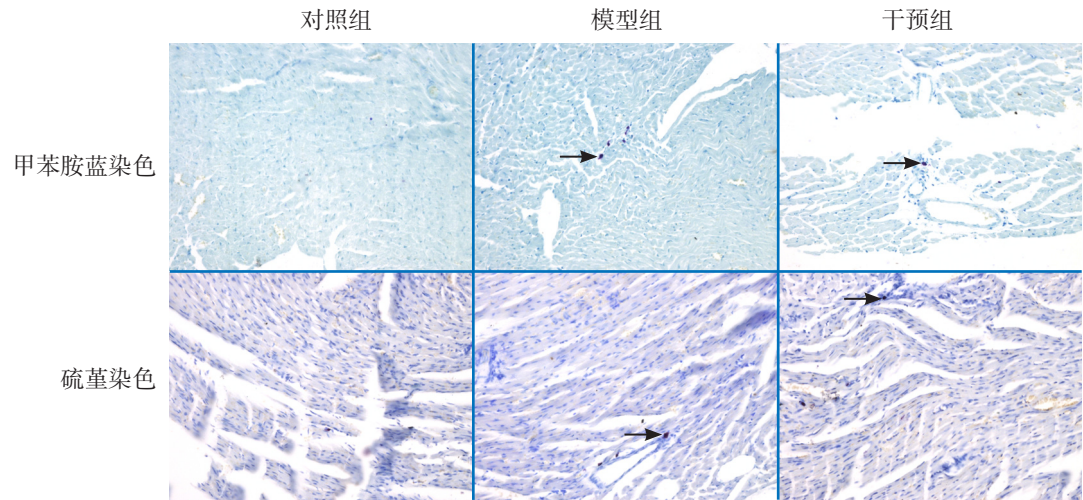


图 3 第 7 天肥大细胞甲苯胺蓝及硫堇染色图 ($\times 200$) 对照组少见蓝紫色肥大细胞; 模型组及干预组血管周围可见肥大细胞聚集, 呈圆形或不规则状, 其中干预组的肥大细胞数目要少于模型组。图中箭头所示为肥大细胞。

表 3 各时间点各组心肌组织肥大细胞数目比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/高倍镜视野)

组别	鼠数	7 d	14 d	28 d
对照组	8	0.8 ± 0.7	0.7 ± 0.5	0.4 ± 0.4
模型组	8	2.3 ± 0.6^a	1.7 ± 0.5^a	1.5 ± 0.4^a
干预组	8	$1.7 \pm 0.5^{a,b}$	$1.2 \pm 0.4^{a,b}$	$1.0 \pm 0.6^{a,b}$
<i>F</i> 值		15.445	11.288	13.374
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: 来自甲苯胺蓝染色结果; a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

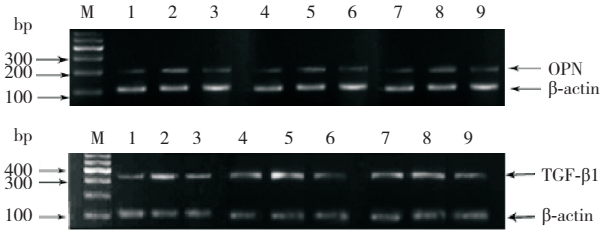


图 4 各时间点各组心肌组织 OPN 及 TGF- β 1 mRNA 表达 上图为 OPN mRNA 表达; 下图为 TGF- β 1 mRNA 表达; M: Marker (600 bp); 1、4、7 为对照组 7、14、28 d 条带; 2、5、8 为模型组 7、14、28 d 条带; 3、6、9 为干预组 7、14、28 d 条带。

表 4 各时间点各组心肌组织 OPN 及 TGF- β 1 mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	OPN mRNA			<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	TGF- β 1 mRNA			<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
		7 d	14 d	28 d			7 d	14 d	28 d		
对照组	8	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02	1.346	0.512	1.20 ± 0.21	1.21 ± 0.24	1.22 ± 0.23	1.205	0.941
模型组	8	0.98 ± 0.04^a	$0.76 \pm 0.02^{a,c}$	$0.50 \pm 0.02^{a,c,d}$	39.012	<0.01	1.80 ± 1.47^a	$3.49 \pm 0.56^{a,c}$	$2.59 \pm 0.52^{a,c,d}$	9.4148	<0.01
干预组	8	$0.60 \pm 0.03^{a,b}$	$0.55 \pm 0.03^{a,b,c}$	$0.32 \pm 0.01^{a,b,c,d}$	44.701	<0.01	$1.67 \pm 0.34^{a,b}$	$3.16 \pm 0.51^{a,b,c}$	$2.14 \pm 0.42^{a,b,c,d}$	10.623	<0.01
<i>F</i> 值		746.118	683.765	304.889			6.283	63.723	23.420		
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01	<0.01		

注: a 示与同时时间点对照组比较, $P < 0.05$; b 示与同时时间点模型组比较, $P < 0.05$; c 示与同组 7 d 比较, $P < 0.05$; d 示与同组 14 d 比较, $P < 0.05$ 。

2.5 心肌 OPN 及 TGF- β 1 蛋白表达

显微镜下观察到 OPN、TGF- β 1 在心肌细胞的胞浆及间质内表达，呈棕黄色（图 5）；统计学结果提示 3 组小鼠心肌细胞 OPN、TGF- β 1 的蛋白水平与 mRNA 表达趋势一致，见表 5。

2.6 心肌 OPN mRNA 与肥大细胞数目的相关性

模型组各时间点心肌组织中 OPN mRNA 表达与肥大细胞数目（甲苯胺蓝染色）呈正相关（ $R^2=0.4159$ ， $P<0.05$ ）。

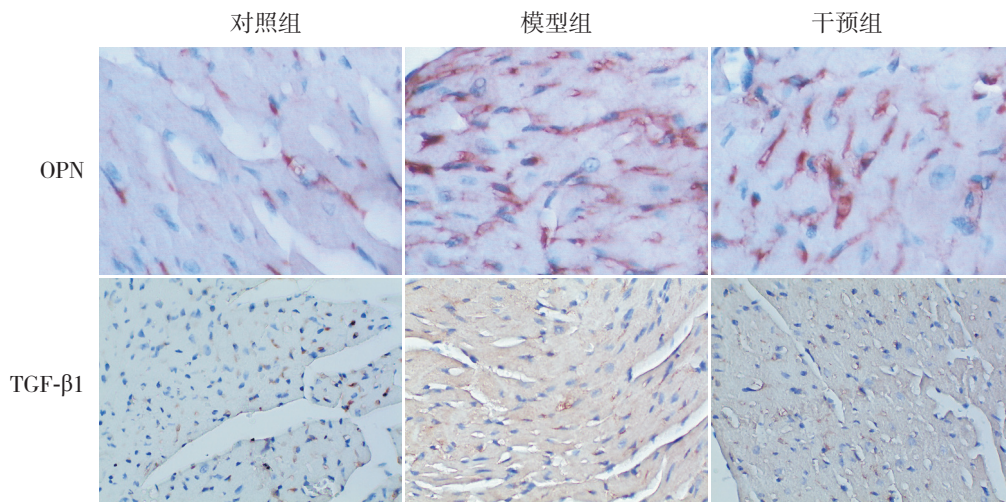


图 5 第 14 天各组心肌组织 OPN 和 TGF- β 1 蛋白表达（免疫组化， $\times 400$ ） 对照组少见棕黄色产物，模型组胞浆及间质内可见大量棕黄色产物，干预组棕黄色产物较模型组明显减少。图中棕黄色物质为 OPN、TGF- β 1 的阳性表达。

表 5 各时间点各组心肌组织 OPN 及 TGF- β 1 的阳性面积表达率（ $\bar{x} \pm s$ ，%）

组别	例数	OPN			F 值	P 值	TGF- β 1			F 值	P 值
		7 d	14 d	28 d			7 d	14 d	28 d		
对照组	8	1.20 $\pm$ 0.30	1.21 $\pm$ 0.29	1.21 $\pm$ 0.30	0.010	0.995	5.29 $\pm$ 0.67	4.74 $\pm$ 0.59	4.60 $\pm$ 0.62	0.109	0.947
模型组	8	3.49 $\pm$ 0.35 ^a	2.59 $\pm$ 0.71 ^{a,c}	1.87 $\pm$ 0.43 ^{a,c,d}	36.209	<0.01	12.56 $\pm$ 2.14 ^a	27.43 $\pm$ 3.61 ^{a,c}	21.79 $\pm$ 2.82 ^{a,c,d}	17.458	<0.01
干预组	8	3.16 $\pm$ 0.37 ^{a,b}	2.14 $\pm$ 0.25 ^{a,b,c}	1.57 $\pm$ 0.21 ^{a,b,c,d}	22.948	<0.01	8.65 $\pm$ 1.67 ^{a,b}	17.50 $\pm$ 3.12 ^{a,b,c}	15.60 $\pm$ 2.52 ^{a,b,c,d}	24.198	<0.01
F 值		99.286	17.683	11.157			40.643	134.332	123.866		
P 值		<0.01	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01	<0.01		

注：a 示与同时点对照组比较， $P<0.05$ ；b 示与同时点模型组比较， $P<0.05$ ；c 示与同组 7 d 比较， $P<0.05$ ；d 示与同组 14 d 比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

TL 化学名为 N-（3,4-二甲氧基肉桂酰基）邻氨基苯甲酸，其作为一种肥大细胞稳定剂，主要作用为减少肥大细胞数目并稳定肥大细胞膜抑制肥大细胞脱颗粒，降低炎性介质及细胞因子的释放。TL 最初在日本由 Kissei Pharmaceuticals 发明，于 1982 年在日本和韩国首次被批准用于治疗 I 型变态反应疾病如特应性皮炎、过敏性鼻炎、支气管哮喘等^[7]。最近，TL 抗纤维化研究取得了显著的成果，使其应用的学科和适应病种也不断增加。

肥大细胞在心脏间质基质调节中起重要作用，

细胞外基质成分作为心肌细胞的骨架，决定着心肌细胞的整体性和有序性。正常心脏表达少量肥大细胞，在心脏负荷增加或心肌损伤等刺激下，如 VMC^[8]、心肌梗死^[9]时肥大细胞数目增加，通过各种机制介导心脏细胞和其周围的细胞外基质的相互作用，最终引起心肌纤维化进而引起心脏的适应性重构。因此，肥大细胞在 VMC 的发病及纤维化过程中有着不可忽视的作用，肥大细胞本身及其颗粒活性介质以及产生的细胞因子直接或间接参与了这一过程。OPN 作为一种多功能细胞因子，能够协同多种炎症细胞分泌的细胞因子激活成纤维细胞，有报道称 OPN 在各种不同的细胞

类型中可以调节基质金属蛋白酶的活性(MMPs)^[10]。OPN是肥大细胞脱颗粒释放的介质之一,反过来,OPN又可直接影响IgE介导的肥大细胞脱颗粒和迁移,从而参与各种病理过程。本课题组前期研究发现:CVB3感染心肌成纤维细胞后12h,OPN mRNA及蛋白表达即增高,于第2天达到高峰,第3天开始有下降趋势^[11],提示CVB3可诱导心肌成纤维细胞OPN表达。VMC小鼠急性期心肌OPN mRNA表达增加,以第7天最高,第14天开始下降,但仍高于对照组,OPN可能与VMC急性期的炎症反应及恢复期后的胶原合成有关^[12]。

本实验中,小鼠感染CVB3后7d出现焦躁、拱背、毛发粗糙、暗淡、易掉毛等现象,病理切片显示心肌细胞开始出现混浊肿胀和溶解坏死,炎性细胞广泛浸润,小鼠的行为异常及病理改变,提示造模成功。肥大细胞数目,OPN、TGF- β 1的表达也明显升高,急性期,OPN通过促进各种炎性介质的产生及单核细胞、巨噬细胞等炎性细胞的趋化发挥促炎作用。14d时心肌组织仍然可见心肌细胞坏死及炎性细胞浸润,肥大细胞数目、OPN表达开始下降,TGF- β 1处于表达高峰,VMC小鼠急性期心肌组织大量TGF- β 1表达,是反映心肌炎症性损伤修复的灵敏指标^[13]。Masson染色显示心肌组织开始出现少量蓝色纤维。慢性期后(28d),心肌组织炎性细胞基本消失,成纤维细胞、心肌间质增多,心肌纤维化明显。肥大细胞数目、OPN的表达明显下降,TGF- β 1的表达较前稍减少,但仍高于对照组,Masson染色可见心肌内出现大量束状、排列紊乱的蓝色纤维,此期CVF最高,说明OPN、TGF- β 1参与VMC慢性期胶原合成。结合Masson染色及CVF结果可知模型组小鼠第28天时心肌组织纤维化最明显,而此时纤维化因子TGF- β 1的表达较前有下降,可能与以下原因有关:(1)慢性VMC的发展依赖于病毒的持续存在,聂宏刚等^[14]发现CVB3反复感染组TGF- β 1含量明显增高,与一次感染组相比差异具有统计学意义。而本次实验中慢性期VMC模型组仅采用了单次病毒注射造模;(2)在心脏纤维化过程中,TGF- β 1的表达先于纤连蛋白和I型、III型胶原的增加,进入慢性期后,TGF- β 1表达虽在下降,但仍高于对照组,TGF- β 1仍在不停促进胶原及成纤维细胞生成,累积生成的成纤维细胞又可促进胶原的合成,因此胶原蛋白表达持续增加。综上所述,

正常心肌组织中可表达少量OPN和TGF- β 1。模型组小鼠感染CVB3后,OPN的表达第7天最高,第14天次之,第28天最低,这与本课题组前期研究相符合^[12]。肥大细胞数目与OPN的表达呈正相关,提示肥大细胞可能通过自分泌OPN参与心肌炎的发生发展过程。TGF- β 1的表达第7天较高,第14天明显升高,第28天较前稍下降,这与韩福生等^[15]的研究结果一致。各时间点,TL干预后心肌组织肥大细胞数目、OPN及TGF- β 1的表达均低于模型组,说明TL可减少心肌组织OPN及TGF- β 1的表达,改善心肌纤维化。TL改善心肌纤维化的机制可能为:(1)TL抑制TGF- β 1介导的胶原形成和心肌间质细胞的增殖分化。TGF- β 1被认为是致心肌纤维化的首要因子,在各系统与胶原代谢之间起桥梁作用。已有研究发现TL有抑制TGF- β 1和抗心肌纤维化的作用^[16-17]。

(2)肥大细胞脱颗粒时可释放OPN,肥大细胞-OPN信号通路参与VMC的病理过程。此信号通路可被肥大细胞稳定剂TL抑制。正常心脏只表达少量的OPN,病理状态下,OPN在心脏中的表达显著增加^[18]。研究发现,肥大细胞可能产生OPN,并通过各种机制影响OPN的功能和参与不同的病理过程^[19]。OPN增强IgE介导的肥大细胞脱颗粒和迁移,通过配体结合到肥大细胞表面的同源OPN受体^[20]。OPN主要促进I型胶原和III型胶原分泌,OPN基因缺失的小鼠其血管损伤后的胶原含量较正常对照组明显减少,提示OPN有可能直接影响胶原生成^[21-22]。

TL在临床被广泛应用于变态反应性疾病的治疗,有良好的耐受性。本实验也证实了它具有较好的抗心肌纤维化的作用。已有研究证明它能抑制TGF- β 1的表达,本实验提示其还可能通过减少肥大细胞数目,进而抑制OPN的表达,为改善心肌纤维化提供了一个新的途径。心脏肥大细胞在心肌炎的发病和纤维化过程中起着重要作用,应用肥大细胞稳定剂为心肌炎治疗提供了新方法。

志谢:感谢湖南省自然科学基金、中南大学创新课题基金以及中南大学湘雅三医院重点学科建设基金经费的支持,感谢形态学实验室周老师及分子生物学实验室黄老师的实验指导,感谢师姐师妹的无私帮助,使我得以顺利完成论文。最后,再次对关心、帮助我的老师和同学表示衷心地感谢。

[参 考 文 献]

- [1] Hua W, Jiang JB, Rong X, et al. The dual role of the cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway in CVB3-induced myocarditis in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(3): 595-600.
- [2] Said E, Said SA, Elkashef WF, et al. Tranilast ameliorates impaired hepatic functions in *Schistosoma mansoni*-infected mice[J]. *Inflammophar*, 2012, 20(2): 77-87.
- [3] Tan SM, Zhang Y, Cox AJ, et al. Tranilast attenuates the up-regulation of thioredoxin- interacting protein and oxidative stress in an experimental model of diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(1): 100-110.
- [4] See F, Watanabe M, Kompa AR, et al. Early and delayed tranilast Treatment reduces pathological fibrosis following myocardial infarction[J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22(2): 122-132.
- [5] Fairweather D, Rose NR. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity[J]. *Methods*, 2007, 41(1): 118-122.
- [6] Rezkalla S, Kloner RA, Khatib G, et al. Effect of metoprolol on the acute phase of coxsackievirus B3 murine myocarditis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1988, 12(2): 412-414.
- [7] Azuma H, K.Banno T, Yoshimura, et al. Pharmacological properties of N-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'), a new anti-atopic agent[J]. *Br J Pharmacol*, 1976, 58(4): 483-488.
- [8] 李辉, 黄林枫, 文纯, 等. 心脏肥大细胞及TLR4在小鼠病毒性心肌炎的作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(10): 896-902.
- [9] Engels W, Reuters PH, Daemen MJ, et al. Transmural changes in mast cell density in rat heart after infarct induction in vivo[J]. *J Pathol*, 1995, 177(4): 423-429.
- [10] Krishnamurthy P, Peterson JT, SubramanianV, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases improves left ventricular function in mice lacking osteopontin after myocardial infarction[J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 322(1-2): 53-62.
- [11] 孙跃女, 陈淳媛, 杨作成, 等. 柯萨奇病毒B3诱导体外培养心肌成纤维细胞增殖与骨桥蛋白表达[J]. *中华儿科杂志*, 2008, 46(12): 930-931.
- [12] 蔡姿丽, 杨敏, 黄林枫, 等. 病毒性心肌炎小鼠心肌骨桥蛋白和I型胶原表达的动态变化[J]. *中南大学学报医学版*, 2012, 37(3): 271-277.
- [13] 成建定, 陈玉川, 胡丙杰, 等. 病毒性心肌炎急性期心肌胶原增生与TGF- β 1的表达[J]. *法医学杂志*, 2000, 16(4): 208-216.
- [14] 聂宏刚, 关振中, 侯桂英, 等. 反复CVB3感染对小鼠心肌的影响[J]. *中国地方病学杂志*, 2003, 22(4): 295-297.
- [15] 韩福生, 孙辉, 刘立志, 等. TIMP-1 mRNA表达在病毒性心肌炎小鼠心肌胶原重构中的作用及其与TGF- β 1的关系[J]. *中国地方病学杂志*, 2005, 24(6): 604-606.
- [16] Pinto YM, Pinto-Sietsma SJ, Philipp T, et al. Reduction in left ventricular messenger RNA for transforming growth factor β 1 attenuates left ventricular fibrosis and improves survival without lowering blood pressure in the hypertensive TGR(mRen2) 27 rat[J]. *Hypertens*, 2000, 36(5): 747-754.
- [17] Hoher B, Godes M, Oliver J, et al. Inhibition of left ventricular fibrosis by tranilast in rats with renovascular hypertension[J]. *J Hypertens*, 2002, 20(4): 745-751.
- [18] Schipper ME, Scheenstra MR, van Kuik J, et al. Osteopontin: a potential biomarker for heart failure and reverse remodeling after left ventricular assist device support[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2011, 30(7): 805-810.
- [19] Nagasaka A, Matsue H, Matsushima H, et al. Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(2): 489-499.
- [20] Bulfone-Paus S, Paus R. Osteopontin as a new player in mast cell biology[J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(2): 338-341.
- [21] Ström Å, Franzén A, Wängnerud C, et al. Altered vascular remodeling in osteopontin-deficient atherosclerotic mice[J]. *J Vasc Res*, 2004, 41(4): 314-322.
- [22] Trueblood NA, Xie Z, Communal C, et al. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin[J]. *Circ Res*, 2001, 88(10): 1080-1087.

(本文编辑: 万静)