DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.018
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
860 2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)09-0860-05

心肌梗塞愈后心力衰竭大鼠心肌 AE_3 mRNA 表达及其意义

黄 坚[1],钱桂生[1],李隆贵[2],夏前明[1] (第三军医大学附属新桥医院:[1]全军呼吸内科研究所;[2]心血管内科;重庆 400037)

提 要:目的 观察心梗愈后心力衰竭大鼠心肌 AE_3 mRNA 及其蛋白表达的变化,探讨其在心力衰竭中的病理生理意义。方法 结扎大鼠冠状动脉,造成心梗愈后心力衰竭模型,应用原位杂交及免疫组化技术,检测心肌 AE_3 mRNA 及其蛋白表达。结果 心衰组心肌 AE_3 mRNA 及其蛋白表达显著增加,其 IOD 值明显高于假手术组和正常对照组($P<0.01$)。结论 心力衰竭时心肌 AE_3 mRNA 及其蛋白表达显著增加是一种代偿反应,但可导致细胞内酸中毒及细胞内 Ca^{2+} 超负荷,使心衰加重。

关键词:阴离子交换蛋白;Cl^-/HCO_3^- 交换;心力衰竭,充血性;心肌梗塞/并发症
中图法分类号:R394.3;R541.61;R542.220.6 文献标识码:A

Gene expression of myocardial anion exchanger 3 and its siginificance in rats with congestive heart failure after recovery from myocardial infarction

HUANG Jian, QIAN Gui-sheng, Li LONG-gui, XIA Qian-ming (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate expressions of mRNAs and proteins of myocardial anion exchanger 3 in rats with congestive heart failure after recovered from myocadial infarction, and explore its pathophysiological significance in cardiac failure. Methods The model of congestive heart failure recovered from myocardial infarction in rats was established by ligating coronary artery. The expressions of mRNAs and proteins of myocardial anion exchanger 3 were determined with *in situ* hybridization and immunohistochemical method respectively. Results Expressions of mRNAs and proteins of myocardial anion exchanger 3 increased significantly. Integral optimal densities of images from rats with congestive heart failure were higher than sham-operation and normal control rats($P<0.01$). Conclusion The increase in the expressions of mRNAs and proteins of myocardial anion exchanger 3 in rats with congestive heart failure is a compensatory effect, which may lead to intracellular acidosis and Ca^{2+} overload and exacerbates the progression of congestive heart failure.

Key wores: anion exchanger; Cl^-/HCO_3^- exchange; heart failure

近年来的研究表明心肌存在阴离子交换蛋白(Anion exchanger 3, AE_3),其主要作用为在细胞内外转运 Cl^-/HCO_3^-,使细胞内酸化,精确调节心肌细胞 pHi,继而发挥调节心肌兴奋-收缩耦联、Ca^{2+} 转运、信号转导及其它代谢过程的作用[1,2]。但 AE_3 在病理情况下的变化几乎未见报道。本实验采用结扎大鼠冠状动脉造成急性心肌梗塞,形成心梗愈后心力衰竭,以模拟人类冠脉病变导致的心力衰竭,通过观察心肌 AE_3 mRNA 及其蛋白表达的变化,探讨其在心力衰竭中的病理生理意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2~3月正常健康 Wistar 大鼠(第三军医大学实验动物中心

作者简介:黄 坚(1965—),男,四川省成都市人,博士,主治医师,讲师,主要从事充血性心力衰竭、冠心病方面的研究,发表论文12篇,现在第四军医大学流行病学教研室,西安 710032。电话:(029)3374002

收稿日期:2000-01-07;修回日期:2000-05-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

提供), 体重 150～250 g, 雌雄不拘。

1.2　主要仪器及试剂

主要仪器为八道电生理记录仪(西门子公司)、电穿孔仪(Bio-Rad 公司)。主要试剂为: 大鼠心脏 AE_3 质粒 cDNA(美国 Gary E. Shull 博士惠赠)、JM109 大肠杆菌株(本校分子生物学教研室提供)、DNA 快速纯化回收试剂盒(北京原平生物技术有限公司)、DNA 地高辛随机引物标记试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)、质粒提取溶液Ⅰ、Ⅱ及Ⅲ(自行配制)、带 3 蛋白单克隆抗体(小鼠 Band 3 IgG_{2a}, Sigma 公司)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化染色试剂盒(S-P kit, 福州迈新生物技术开发公司)、液体 DAB 酶底物显色试剂盒(DAB kit, 来源同 S-P kit)。其它试剂均为进口或国产分析纯级。

1.3　实验设计及分组

将 78 只动物分为下列 3 组: ①正常对照组(N): 18 只; ②假手术组(SO): 20 只, 开胸在左冠状动脉主干位置穿线, 但不结扎动脉; ③心力衰竭组(CHF): 40 只, 开胸结扎左冠状动脉主干(或左前降支＋左旋支), 造成急性心肌梗塞, 6～8 周后形成梗塞愈后充血性心力衰竭。

1.4　研究方法及主要步骤

1.4.1　心衰模型建立　　参照 Shi 等[3] 的方法。主要步骤为乙醚麻醉大鼠, 在胸骨左缘第 4、5 肋间打开胸腔, 轻压右侧胸壁, 使心脏暴露出来, 结扎左冠状动脉主干或左前降支＋左旋支, 迅速将心脏还位, 关闭胸腔。腹腔内注射青霉素, 80 万 U/次, 2 次/d, 连续 3 d, 以预防感染。假手术组只穿线而不结扎。模型评价指标测定包括: ①血流动力学测定: 各组大鼠在观察终点行血流动力学测定, 方法参照 Sanbe 和 Takeo[4]; ②病理学指标: 自颈动脉放血, 以 D Hanks 液行逆灌注心脏 5～8 min, 立即取材心肌组织块(除 Masson 氏三色染色取左室中段横断面心肌标本外, 其余检测均取远离梗塞瘢痕部位的左室心肌组织), 置液氮速冻 2 h, 转入－70 ℃低温冰箱保存, 做 Masson 氏三色染色、HE 染色及透射电镜检查。

1.4.2　原位杂交　　采用 cDNA 探针。大量扩增、提取、纯化回收 cDNA, 方法参照有关试剂盒进行。以地高辛随机引物标记法标记探针。原位杂交参照文献[5] 方法进行, 在显微镜下观察结果、照相, 并做图像分析。阴性对照为不加标记探针进行反应及未标记的探针进行杂交反应。

1.4.3　AE 免疫组化　　参照文献[2] 方法。阴性对照采用空白对照。显微镜下观察结果、照相, 做图像分析。

1.4.4　图像分析　　采用 Tiger 920 细胞图像分析仪及其软件(重庆大学泰格尔图形图像工程研究所研制)分析原位杂交及组化图像。在显微镜(200×)下以相同外部条件(亮度)摄取 BMP 图像, 每张切片摄 10 幅, 设定灰度阈值 50～250。得出统计场总面积的积分光密度(Integral optimal densities, IOD)值, 每张切片取均值。

1.5　统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组均数采用 Student's t 检验。

2　结果

2.1　心衰模型

2.1.1　一般情况　　假手术组大鼠术后 2～3 d 活动状态及饮食与正常大鼠比较无差异。心衰组大鼠术后 3 d 内活动明显减少, 饮食显著减少。1 周左右开始有不同程度的恢复, 存活者多数于术后 3～4 周左右开始出现程度不等的足底水肿、口鼻及肢端紫绀, 活动及饮食减少。各组大鼠死亡情况, 见表 1。

表 1　各组大鼠死亡原因一览表

Tab 1　Cause of death of rats

Group	Initial number	Operation	Hemorrage	Acute MI	Acute CHF	Progression of CHF	Sudden death	Ultimate number	Mortality
N	18							18	
SO	20	1	1					18	10%
CHF	40	15	2	1	1	2	2	17	57.7%

N: Normal control; SO: Sham-operation; CHF: Congestive heart failure; MI: Myocardial infarction

2.1.2　血流动力学　　心衰组平均主动脉压、左室收缩末压及 $\pm dp/dt_{max}$ 明显低于假手术对照及正常对照, 而平均肺小动脉压、左室舒张末压均显著高于假手术对照及正常对照。各组心率和左室重量/体重比值无显著差异, 见表 2。

2.1.3　病理改变　　Masson 氏三色染色肉眼观左心室中段横断面梗塞区域呈蓝色, 梗塞区室壁明显变薄, 未梗塞区呈红色。普通光镜下可见梗塞区(瘢痕组织)为蓝色的胶原纤维替代, 附近少许呈红色的肌纤维, 未梗塞区心肌细胞浆染成红色, 核呈黑色, 见图 1。HE 染色光镜观察显示正常及假手术对照组肌纤维排列整齐, 未见肥大、肌溶解及间质病变。心衰组肌纤维不均匀性肥大, 排列规则。胞核增多增大, 深染。可见空泡变, 小灶状肌溶解。心肌间质轻度增生。电镜显示正常及假手术组

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

无明显差异，可见肌原纤维及肌丝排列整齐，Z 线清晰、规则。心衰组胞核增大，形状不规则，核膜皱折较深；线粒体数目增多，大小不一，可见空泡变、肿胀、嵴排列紊乱、断裂、溶解；肌浆网不同程度扩张、膜性结构退变；偶见局灶性肌丝溶解。

表 2 各组大鼠血流动力学比较

Tab 2 Comparison of hemodynamics in different groups of rats

Parameters	CHF(n=17)	SO(n=18)	N(n=18)
BW(m/g)	316.2±43.8	332.5±48.6	338.6±48.6
LV/BW(ω_B/mg·g^{-1})	2.32±0.29	2.15±0.27	2.16±0.22
HR(/min)	387.5±38.5	376.6±17.2	382.3±18.8
MPAP(p/mmHg)	32.4±11.2	20.5±5.9**	20.7±5.3**
LVEDP(p/mmHg)	23.4±5.7	8.6±2.4**	8.8±2.2**
LVESP(p/mmHg)	122.7±18.8	142.2±22.3**	141.2±24.5*
+dp/dt$_{max}$(mmHg/s)	4 583±387	6 771±364**	6 829±423
−dp/dt$_{max}$(mmHg/s)	3 589±288	5 486±396**	5 530±388**
MAP(p/mmHg)	103.9±14.3	125.6±13.7**	126.4±14.7**

BW: Body weight; LV/BW: Ratio of left ventricular weight and body weight; HR: Heart rate; MPAP: Mean pulmonary arterial pressure; LVEDP: Left ventricular end-diastolic pressure; LVESP: Left ventricular end-systolic pressure; MAP: Mean arterial pressure; 1 mmHg=0.133 kPa; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* CHF

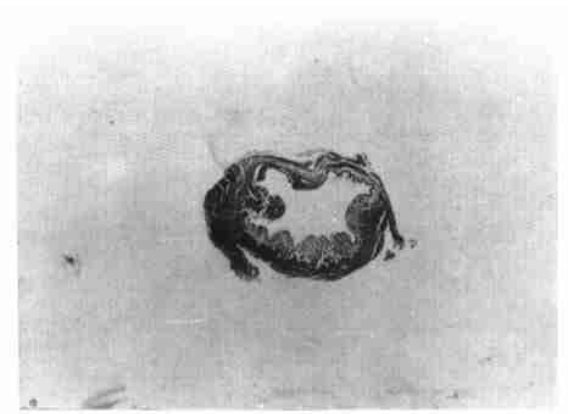


图 1 **CHF** 组大鼠左室横断面，可见呈蓝色的梗塞区域（Masson 氏三色染色×5）

Fig 1 Blue infarct region in left ventricular horizontal plane of rat in group CHF (Masson's three colors stain×5)

2.2 AE_3 cDNA 目的片段回收与鉴定

提取的质粒 pBR322 用 *Ava* Ⅰ 酶切得目的片段 AE_3 375 bp。在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳分离目的片段，再回收纯化，见图 2。

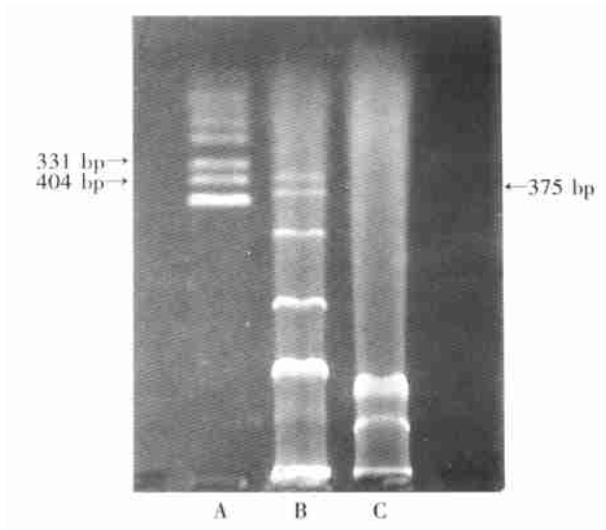


图 2 质粒 **pBR322** 酶切电泳图

Fig 2 Enzyme-splicing analysis of plasmid pBR322

A: Low molecular weight DNA marker;
B: pBR322+ *Ava* Ⅰ; C: pBR322

2.3 原位杂交

心肌细胞浆可见紫蓝色颗粒状或斑片状信号表达，颜色深浅不一，散在于肌纤维之间或胞膜下。图像分析表明 AE_3 在心衰时表达增加，IOD 值显著高于 SO 和 N 组（$P<0.01$），见表 3、图 3~4。

表 3 各组 AE_3 组化及原位杂交图像分析结果（IOD 值）

Tab 3 Results of AE_3 image analysis (IOD value)

Method	CHF(n=17)	SO(n=18)	N(n=18)
Immunohistochemistry	5 318±672	1 827±241**	1 796±253**
In situ hybridization	4 617±549	2 421±253**	2 387±264**

**: $P<0.01$ *vs* CHF

2.4 免疫组化

阳性着色为沿心肌细胞膜（包括胞膜皱褶处）、肌纤维附近棕黄色免疫沉积物，或线状、长条状、或斑点状，大小不一。图像分析表明 AE_3 蛋白在心衰时表达增加，IOD 值显著高于 SO 和 N 组（$P<0.01$），见表 3、图 5~6。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

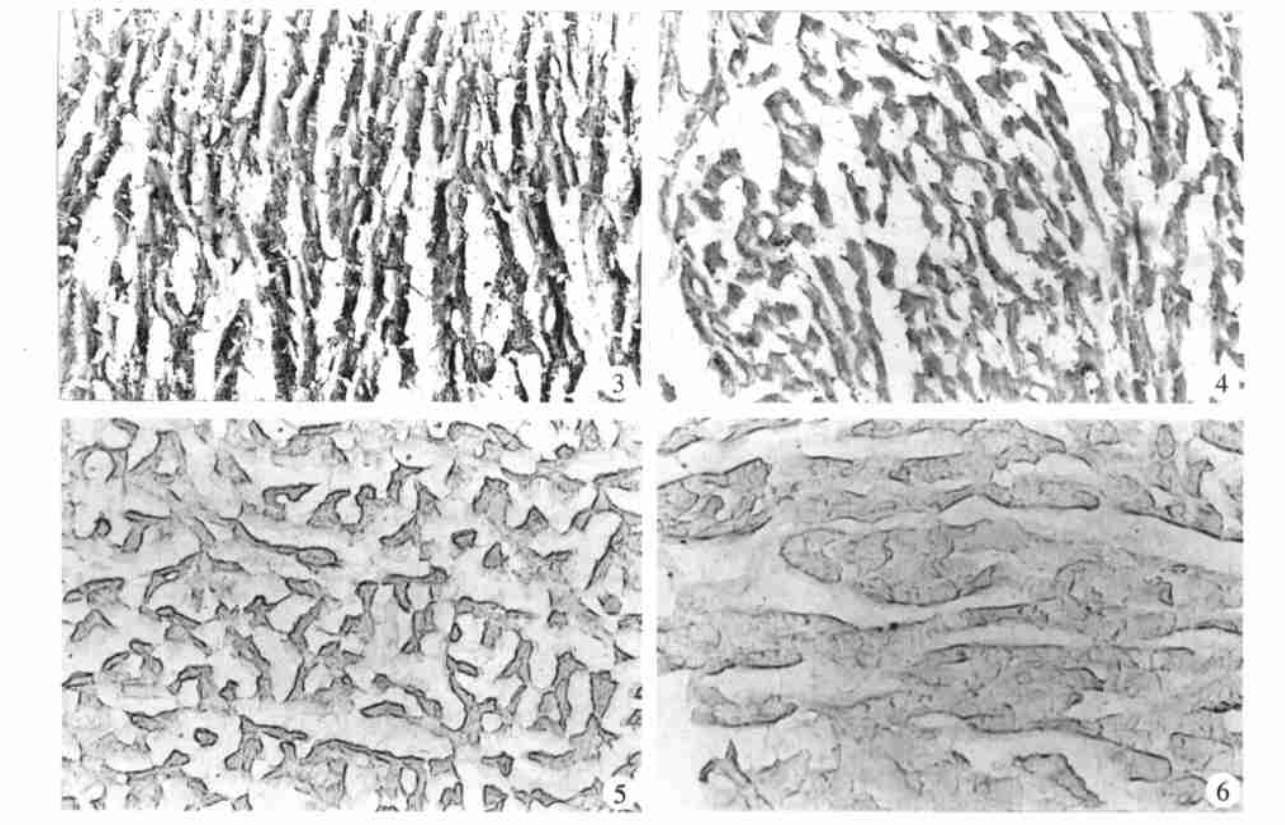


图 3　CHF 组心肌组织 AE_3 mRNA 表达　（原位杂交× 200）

Fig 3　Expression of myocardial AE_3 mRNA in group CHF　（*In situ* hybridization× 200）

图 4　SO 组心肌组织 AE_3 mRNA 表达　（原位杂交× 200）

Fig 4　Expression of myocardial AE_3 mRNA in group SO　（*In situ* hybridization× 200）

图 5　CHF 组心肌组织 AE_3 免疫组化酶染色　（免疫组化× 200）

Fig 5　Immunohistochemical staining of myocardial AE_3 in group CHF　（ICC/S-P× 200）

图 6　SO 组心肌组织 AE_3 免疫组化酶染色　（免疫组化× 200）

Fig 6　Immunohistochemical staining of myocardial AE_3 in group SO　（ICC/S-P× 200）

3　讨论

本实验显示结扎冠状动脉致心梗愈合大鼠 MPAP 及 LVEDP 较正常及假手术对照显著升高, 而 MAP、$\pm dp/dt_{max}$及 LVESP 明显下降, 提示血流动力学显著异常。左心室中段横断面 Masson 氏三色染色显示梗塞区域室壁变薄, 光镜下为蓝色的胶原纤维所替代; HE 染色光镜下可见心肌纤维不均匀肥大、核深染, 肌纤维小灶状坏死; 电镜下见线粒体、肌浆网病变。表明结扎冠脉大鼠形成了心梗愈后心力衰竭模型。

以心脏特异的 AE_3 cDNA 探针[6] 作原位杂交实验, 结果表明心衰组心脏 AE_3 mRNA 表达量明显高于正常和假手术组。提示心梗愈后心力衰竭大鼠心脏 AE_3 mRNA 的表达增加。尚未见到类似报道。Linn 等[6] 用 AE_3 外显子 C_1 及 3′端做探针进行 Northern 杂交分析, 表明小鼠心房和心室均含有心脏特异的 3.6 kb mRNA, 而 4.4 kb AE_3 转录子仅出现在心房。Yannoukakos 等[7] 证实成年人心衰心脏存在 AE_3 mRNA 表达, 但未与正常比较。最近, Richards 等[1] 证实新生及成年大鼠心肌细胞存在 AE_1、AE_2 及 AE_3 mRNA 的表达, 但无 AE_2 蛋白的表达, 且 AE_1 mRNA 是一种新的红细胞 AE_1 mRNA 的剪截类型。

组化分析表明心衰组大鼠心脏 AE_3 蛋白表达量亦显著高于正常对照组和假手术组大鼠。心衰的心脏 AE_3 mRNA 及其蛋白表达增加的机制尚不清楚。充血性心力衰竭的一个重要病理生理特征就是神经体液的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

过度激活[8]。有研究表明去甲肾上腺素、异丙肾上腺素、血管紧张素Ⅱ及压力过负荷可快速诱导心肌细胞核内原癌基因如 c-myc、c-fos、c-jun 表达[9,10]。机制可能为这些体液因子作用于相应的受体，通过 G 蛋白介导激活磷脂酶 C 和 D，后者将磷脂酰肌醇-4，5-双磷酸水解为二酯酰甘油及 IP_3，继而激活蛋白激酶 C(PKC)，后者可磷酸化调控基因表达的转录因子或与翻译有关的因子，从而使原癌基因的表达增加。血管紧张素Ⅱ经 AT_1 受体可激活 MAPK 通路，而压力负荷可直接激活PKC 和 MAPK[11]，继而促进基因表达。心衰心脏 AE_3 mRNA 表达增加很可能通过上述机制，进而使 AE_3 蛋白表达增加。但需实验加以证实。

有研究表明心肌细胞 AE_3 具有 Cl^-/HCO_3^- 交换功能，Cl^- 进入细胞，HCO_3^- 转移至细胞外，使细胞内酸化。Camilion-de-Hurtado 等[12]证实血管紧张素Ⅱ可激活猫心肌细胞 AE_3 Cl^-/HCO_3^- 交换活性。Ennis 等[13]报道依那普利使自发性高血压大鼠心肌增高的 Na^+/H^+ 交换蛋白和 Cl^-/HCO_3^- 交换蛋白活性恢复正常的同时，亦逆转了心室的肥厚。心衰时肾素血管紧张素醛固酮系统过度激活，可能使 Cl^-/HCO_3^- 交换蛋白功能增强。本实验表明心衰心脏 AE_3 mRNA 及蛋白表达显著增加，可能也增加了功能性 AE_3 蛋白的数量；神经体液的过度激活也可使 AE_3 蛋白的交换功能增强，因而细胞内酸化趋势明显。这种结果可能是心衰时的一种代偿反应。正常生理情况下，心肌细胞的 H^+ 排出主要靠 Na^+/H^+ 交换和 Na^+/HCO_3^- 交换，而 HCO_3^- 的排出依赖 Cl^-/HCO_3^- 交换，神经体液因子激活这些交换活性，使心肌细胞的酸碱缓冲容量扩大，有利于细胞应付内外环境 pH 的突然或剧烈变化，调节 pHi 在相对恒定的范围，以维持心肌收缩力。但在病理情况下，Cl^-/HCO_3^- 交换过度增强引起细胞内酸中毒，易导致 Ca^{2+} 超负荷[14]，引起心律失常；细胞内酸中毒尚可使兴奋-收缩耦联障碍。这可能是心力衰竭加重或恶化的病理生理机制之一。

参考文献：

[1] Richards S M, Jaconi M E, Vassort G, *et al*. A spliced variant of AE_1 gene encodes a truncated form of Band 3 in heart: the predominant anion exchanger in ventricular myocytes[J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 10): 1 519—1 528.

[2] 黄 坚，钱桂生，李隆贵，等. 大鼠心肌细胞阴离子交换蛋白免疫细胞化学定位的研究[J]. 第三军医大学学报，1999，21(9)：654—657.

[3] Shi B, Heavner J E, Boylan L M, *et al*. Dietary magnesium deficiency increases Gi alpha levels in the rat heart after myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30(6): 923—929.

[4] Sanbe A, Takeo S. Diminished responsiveness to cardiac beta 1-adrenoceptor agonists in rats with chronic heart failure following myocardial infarction[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(10): 1 362—1 366.

[5] 蔡文琴，王伯弥云 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 406—434.

[6] Linn S C, Askew G R, Menon A G, *et al*. Conservation of an AE_3 Cl^-/HCO_3^- exchanger cardiac-specific exon and promoter region and AE_3 mRNA expression patterns in murine and human hearts[J]. Circ Res, 1995, 76(4): 584—591.

[7] Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez H A, *et al*. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE_3 anion exchanger from human heart[J]. Circ Res, 1994, 75(4): 603—614.

[8] Kawaguchi H, Kitabatake A. Alterations of signal transduction system in heart failure[J]. Jpn Heart J, 1997, 38(3): 317—332.

[9] Brand T, Sharma H S, Schaper W. Expression of nuclear proto-oncogenes in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 1993, 25(11): 1 325—1 337.

[10] Kolbeck-Ruhmkorff C, Zimmer H G. Proto-oncogene expression in the isolated working rat heart: combination of pressure and volume overload with norepinephrine[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(1): 501—511.

[11] Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, *et al*. Angiotensin Ⅱ partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 1995, 77(2): 258—265.

[12] Camilion-de-Hurtado M C, Alvarez B V, Perez N T I, *et al*. Angiotensin Ⅱ activates Na^+-independent Cl^-/HCO_3^- exchange in ventricular myocardium[J]. Circ Res, 1998, 82(4): 473—481.

[13] Ennis I L, Alvarez B V, Camilion-de-Hurtado M C, *et al*. Enalapril induces regression of cardiac hypertrophy and normalization of pHi regulatory mechanisms[J]. Hypertension, 1998, 31(4): 961—967.

[14] 王关嵩，钱桂生，杨晓静. 一氧化碳对大鼠肺动脉平滑肌细胞[Ca^{2+}]、cAMP、cGMP 的作用[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(5)：417—419.

（编辑 潘式文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net