论著

文章编号:1000-5404(2005)23-2338-03

大鼠心肌再灌注不同时相 caspase-3 激活与心功能变化的关系

徐 强,司良毅,张 红 (第三军医大学西南医院老年病科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠心肌缺血再灌注(ischemic reperfusion,IR)不同时相半胱胺酸蛋白酶3(caspase-3)与左室功能之间的关系。**方法** 实验选用Wistar大鼠36只,随机设立缺血30 min后再灌注1、3、6、12及24 h等5组和假手术组(Sham)。分别检测caspase-3 P20活性片断及caspase-3活性、心肌细胞凋亡指数、左室功能和肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)。**结果** Caspase-3 P20活性片断增加及caspase-3活性、心肌细胞凋亡指数、CK-MB和左室功能随心肌再灌注不同时相而变化,caspase-3 P20活性片断增加与CK-MB于再灌注6 h最高;caspase-3活性与心肌细胞凋亡指数于再灌注12 h最高,其后基本维持在平台状态;LVSP、$\pm dp/dt_{max}$随IR时间逐渐增加,LVEDP随IR时间逐渐降低。和Sham比较差异显著($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** Caspase-3激活是心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡导致心功能下降的机制之一。

关键词:心肌缺血/再灌注损伤;半胱胺酸蛋白酶-3;凋亡;心功能

中图法分类号:R331.31;R345;R654.2 **文献标识码**:A

Relationship of caspase-3 activity and cardiac function in rat cardiomyocytes after myocardial reperfusion injury

XU Qiang, SI Liang-yi, ZHANG Hong (Department of Gerontology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between caspase-3 and left ventricular function at different phases after ischemia-reperfusion. Methods Totally 36 wistar rats were randomly divided into Sham operation group and ischemia-reperfusion(IR) group. The rat ischemic cardiac region of IR group was taken after 1, 3, 6, 12 and 24-hour reperfusion followed to 30-minute ischemia and detected for the activity fragment of caspase-3 P20, the activity of caspase-3, myocardial apoptosis index, left ventricular function (LVF) and creatine kinase-MB (CK-MB) respectively. Results With reperfusion time prolonging, the activity fragment of caspase-3 P20 increased, the activity of caspase-3, myocardial apoptosis index, left ventricular function and CK-MB all changed. The activity fragment of caspase-3 P20 and CK-MB peaked at 6 h, and the activity of caspase-3 and myocardial apoptosis index at 12 h, and then maintained platform; LVSP and $\pm dp/dt_{max}$ increased while LVEDP decreased gradually with the reperfusion time prolonging. All indexes mentioned above of IR group had statistical significance as compared with that of Sham operation group($P<0.05$,$P<0.01$). Conclusion The activation of caspase-3 may be one of the mechanism of heart function descent resulting from myocardial apoptosis after myocardial ischemia-reperfusion.

Key words: myocardial ischemic reperfusion injury; caspase-3; apoptosis; cardiac function

近来研究发现,在心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤过程中,心肌细胞发生坏死,同时也发生凋亡,凋亡机制参与了心肌缺血再灌注后心肌细胞的死亡和心肌再灌注后梗死范围的扩大[1]。在很多病理生理条件下,半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的激活导致细胞凋亡的发生[2]。但目前尚未了解心肌IR时caspase-3、细胞凋亡动态变化与心功能变化的关系。本实验应用大鼠心肌IR模型,观察IR时caspase-3、细胞凋亡和心功能的动态变化及相互关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型制备及分组

Wistar大鼠36只,体质量250~300 g,雌雄不拘,购自本校

作者简介:徐 强(1971-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事心肌缺血再灌注损伤的基础与临床方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68754151

收稿日期:2005-04-01;修回日期:2005-05-17

实验动物中心。随机分设缺血 30 min 再灌注 1、3、6、12、24 h 等 5 组和假手术组（Sham 组）；Sham 组只设 12 h 1 个时相点作总体对照。每组各 6 只大鼠，缺血再灌注组大鼠结扎左冠状动脉前降支，以收紧结扎线后心电图 I 或左前胸导联融合的 ST-T 抬高，放松后抬高的 ST-T 下降 1/2 以上为模型成功。Sham 组只埋线不结扎。连接多导生理记录仪行心电及血流动力学监护。于各相应时相点活杀动物取心脏缺血区心肌待测。

1.2　Western 印迹检测 caspase-3 P20 活性片断

按试剂盒说明书操作。取正常及伤后各时相点大鼠的心肌组织蛋白 50 μg，行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）。转膜，封闭。将滤膜与 caspase-3 P20 的一抗、二抗、化学发光底物孵育后（试剂购自 Santa Cruz 公司），于暗室中以感光胶片感光、冲洗。用 Bandscan 软件扫描正常对照及再灌注后各时相点蛋白条带的吸光度值，并分别计算其与正常对照吸光度值的比值，即得各自的相对表达倍数。

1.3　心肌组织 caspase-3 活性测定

取待测心肌组织 100 mg 匀浆、离心，考马斯亮蓝测定蛋白浓度，各组样本稀释成相同浓度。取样本蛋白 0.5 ml，加入 caspase-3 检测试剂盒（试剂购自 Clontech 公司），参照试剂盒说明书的方法测定 caspase-3 活性。

1.4　凋亡细胞原位标记与凋亡指数（AI）计算

心肌组织常规石蜡包埋，每一标本取 3 个不同部位的切片各 1 张，采用末端脱氧核苷酸转移酶（TdT 酶）介导的带荧光的 dUTP 缺口末端标记法（TUNEL）标记凋亡细胞核中 DNA 3′-OH 末端（试剂盒购自 Roche 公司）。在 10×40 倍的光镜下观察心肌细胞凋亡情况，每张切片在缺血区取 5 个视野，每个视野计数 300 个心肌细胞中阳性细胞数，以平均计算阳性细胞数所占的百分比作为凋亡指数。

1.5　肌酸激酶同工酶 MB（CK-MB）活性动态测定

分离 Sham 及再灌注各时相点大鼠的血清，采用日本日立公司 7020 型全自动生化分析仪，以常规酶抑制动力学法检测。

1.6　左室收缩压（LVSP）、左室舒张末压（LVEDP）、左室内压最大上升及下降速率（$\pm dp/dt_{max}$）

采用多导生理记录仪记录。

1.7　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 软件进行两组 t 检验。

2　结果

2.1　IR 时心肌细胞 caspase-3 P20 活性片断和 caspase-3 活性变化

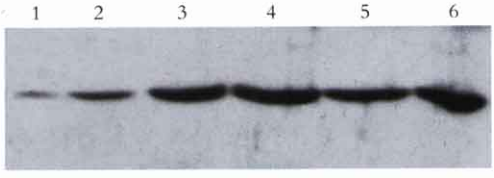
缺血再灌注后 1 h 时 caspase-3 P20 活性片断增加的相对表达倍数和 caspase-3 活性升高，caspase-3 P20 活性片断增加在再灌注 6 h 达到高峰，caspase-3 活性在再灌注 12 h 达到高峰，其后都维持在较高水平。IR 组的 caspase-3 活性与 Sham 组比较差异显著（$P<0.05$，$P<0.01$）（表 1，图 1）。

表 1　IR 时 caspase-3 P20 活性片断、caspase-3 活性、心肌细胞 AI、CK-MB 变化（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Changes of caspase-3 P20 activity fragment, caspase-3 activity, AI, and CK-MB in different groups（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

Groups	caspase-3 P20	caspase-3 activity (U)	AI(%)	CK-MB activity (U/L)
Sham	1	0.19 ± 0.06	1.12 ± 0.43	2.0 ± 0.4
IR 1 h	1.50	0.43 ± 0.08 *	7.45 ± 2.43 *	6.5 ± 1.4 * *
IR 3 h	5.67	0.64 ± 0.12 **	12.52 ± 4.71 **	25.2 ± 4.5 **
IR 6 h	7.80	0.86 ± 0.14 **	23.75 ± 6.26 **	52.5 ± 9.3 **
IR12 h	5.70	1.34 ± 0.27 **	34.83 ± 9.35 **	42.9 ± 8.4 **
IR24 h	6.57	1.26 ± 0.23 **	33.78 ± 9.36 **	35.5 ± 7.4 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* Sham group



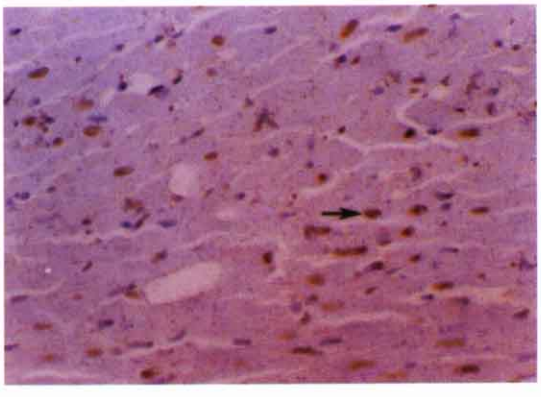
1：Sham；2：IR 1 h；3：IR 3 h；4：IR 6 h；5：IR 12 h；6：IR 24 h

图 1　再灌注各时相点 caspase-3 P20 活性片断的 Western 印迹检测结果

Fig 1　caspase-3 p20 in the myocardial tissue after reperfusion by Western blotting

2.2　IR 时心肌细胞凋亡指数变化规律

IR 组于再灌注 1 h 出现凋亡的心肌细胞，并逐渐增多，凋亡的心肌细胞在再灌注 12 h 达到高峰，至 IR 24 h 仍然维持高水平。与 Sham 组比较差异显著（$P<0.05$，$P<0.01$）（表 1，图 2）。



→：Apoptotic myocyte

图 2　再灌注 12 h，心肌细胞凋亡达到高峰　（TUNEL×400）

Fig 2　Cardiomyocyte apoptosis peaked at 12 h after reperfusion　（TUNEL×400）

2.3　IR 时 CK-MB 活力的变化

IR 组 CK-MB 活力随再灌注时间延长而逐渐增加，CK-MB 活力在再灌注 6 h 达到高峰，以后开始下降。与 Sham 组比较差异显著（$P<0.01$）（表 1）。

2.4　IR 时 LVSP、LVEDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 的变化

IR 组 LVSP、$\pm dp/dt_{max}$ 随再灌注时间延长而逐渐降低，LV-

EDP 随再灌注时间延长而逐渐增加，与 Sham 组比较差异显著（$P<0.05$，$P<0.01$）（表2）。

表2 IR 时 LVSP、LVEDP、$\pm dp/dt_{max}$ 的变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Changes of LVSP, LVEDP, $\pm dp/dt_{max}$ after myocardial ischemia-reperfusion（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Groups	LVSP(kPa)	LVEDP(kPa)	$+dp/dt_{max}$(mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$(mmHg/s)
Sham	17.87±1.73	0.08±0.01	6 911±591	4 248±243
IR 1 h	15.2±1.07*	0.51±0.07**	5 911±470*	3 253±343*
IR 3 h	13.87±1.06*	0.72±0.11**	5 818±440*	2 871±342**
IR 6 h	13.33±1.06**	1.06±0.14**	5 306±290**	2 470±422**
IR 12 h	12.1±1.15**	1.40±0.24**	4 505±637**	1 843±362**
IR 24 h	11.47±0.84**	1.57±0.44**	3 898±701**	1 473±571**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* Sham group

3 讨论

凋亡是在基因控制和酶促反应下按一定程序进行的细胞的自主死亡方式，它常在有害信号的温和刺激下或个体发育过程中发生[3]。Caspase-3 是凋亡发生过程中所需要的一种重要的蛋白酶，同时也是凋亡发生的标志酶[4]。当凋亡刺激信号出现后，通过线粒体途径和膜表面死亡受体途径，经过一系列生化反应使在正常细胞中以无活性的酶原形式存在的 caspase-3 被上游的 caspase 水解激活。激活后的 caspase-3 可裂解其底物而形成凋亡。

本实验显示：在体大鼠心肌缺血再灌注可诱导心肌细胞 caspase-3 P20 活性片断和 caspase-3 活性的增加，其变化趋势与缺血区心肌细胞凋亡变化类似，caspase-3 P20 活性片断表达高峰早于心肌细胞凋亡，caspase-3 活性高峰与心肌细胞凋亡相同，提示再灌注后 caspase-3 激活，激活后 caspase-3 酶切其底物使细胞形态改变和 DNA 降解而使缺血区心肌细胞发生凋亡。近来有作者发现可以通过抑制 caspase-3 激活减少细胞凋亡达到减轻再灌注损伤的目的[5]。同时在再灌注不同时相点缺血区心肌细胞凋亡增加的变化趋势和心功能恶化的趋势相同，随着心肌细胞凋亡数量的增多，心功能恶化加重，提示细胞凋亡对缺血再灌注后心功能产生重要的影响，细胞凋亡可能通过加重缺血再灌注损伤或减少心肌功能细胞数量，从而使心功能恶化。有研究表明可以通过抑制心肌细胞凋亡来显著减少急性心肌梗死后的梗死范围及改善左室功能[6]，而且抑制凋亡可以改善缺血再灌注大鼠的心功能，从而提高心脏移植的成功率[7]。因此，caspase-3 激活导致细胞凋亡，而心肌细胞凋亡增多可降低心脏功能，细胞凋亡的多少决定着缺血再灌注损伤的轻重和心功能的好坏。从而提示人们可以从抑制 caspase-3 激活减少细胞凋亡的角度，对缺血再灌注损伤的防治和心功能的保护进行研究。

综上所述，caspase-3 激活是心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡导致心功能下降的机制之一。缺血再灌注中抑制 caspase-3 激活的研究必将为缺血再灌注损伤的防治提供崭新的思路和新的方法。

参考文献：

[1] Black S C, Huang J Q, Rezaiefar P, *et al*. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after *in vivo* myocardial ischemia and reperfusion in the rat[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(4): 733-742.

[2] Cardier J E, Erickson Miller C L. Fas (CD95)- and tumor necrosis factor-mediated apoptosis in liver endothelial cells: role of caspase-3 and the p38 MAPK[J]. Microvasc Res, 2002, 63(1): 10-18.

[3] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death[J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 3-15.

[4] Higuchi M, Aggarwal B B, Yeh E T. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function[J]. J Clin Invest, 1997, 99(7): 1751-1758.

[5] Hatip Al Khatib I, Iwasaki K, Chung E H, *et al*. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3, but not caspase-1, prevents apoptosis and improves spatial memory of rats with twice-repeated cerebral ischemia[J]. Life Sci, 2004, 75(16): 1967-1978.

[6] 宋明宝，黄 岚，李爱民，等. 肝细胞生长因子对兔心肌梗死后心肌细胞的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(14)：1255-1257.

[7] Ryugo M, Sawa Y, Ono M, *et al*. Myocardial protective effect of human recombinant hepatocyte growth factor for prolonged heart graft preservation in rats[J]. Transplantation, 2004, 78(8): 1153-1158.

（编辑 汪勤俭）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每3位分1节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如2,431改为2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部