文章编号:1000-5404(2008)08-0735-04

论著

别嘌呤醇对心肌梗死后大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用

肖 骏[1],佘 强[1],罗开良[1],黄开顺[2],曹友德[3] (重庆医科大学:[1]附属第二医院心血管内科,重庆 400010,[2]基础研究所,[3]基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)抑制剂别嘌呤醇对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响。**方法** 结扎冠脉前降支制作大鼠心肌梗死模型,随机分为假手术组(sham,$n=5$),心肌梗死组(MI,$n=16$)和别嘌呤醇组(50 mg·kg^{-1}·d^{-1},$n=15$),28 d后检测心肌梗死面积,TUNEL法检测心肌细胞凋亡,免疫组化法检测Fas蛋白表达,Western blot检测XO和caspase 3蛋白表达,比色法测定XO和清除活性氧活力。**结果** MI组非梗死区心肌细胞凋亡指数升高,Fas、XO、caspase 3蛋白表达增强,XO活力增加,清除活性氧活力降低($P<0.01$);别嘌呤醇组明显缓解了上述指标的变化。**结论** 别嘌呤醇能够抑制非梗死区心肌细胞凋亡,其作用机制可能与减少活性氧生成及降低Fas和caspase 3的表达有关。

关键词: 别嘌呤醇;黄嘌呤氧化酶;活性氧;细胞凋亡;心肌梗死
中图法分类号: R322.11;R329.25;R977.6 **文献标识码:** A

Allopurinol inhibits cardiomyocyte apoptosis in rats with myocardial infarction

XIAO Jun[1], SHE Qiang[1], LUO Kai-liang[1], HUANG Kai-shun[2], CAO You-de[3] ([1]Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing 400010; [2]Department of Basic Institute; [3]Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the effect of xanthine oxidase inhibitor allopurinol on cardiomyocyte apoptosis in rats after myocardial infarction (MI). **Methods** MI model was established by the ligation of anterior descending coronary artery. The survivors were randomly divided into 3 groups: sham operation group ($n=5$), MI group ($n=16$) and allopurinol group ($n=15$, receiving allopurinol 50 mg·kg^{-1}·d^{-1}). After 28 days, the infarct size was measured. In non-infarcted zone (NIZ), cardiomyocyte apoptosis was detected by TUNEL; the expression of Fas was detected by immunohistochemistry; the expressions of xanthine oxidase (XO) and caspase 3 were detected by Western blot. In addition, the activities of XO and ·O_2^-, ·OH-scavenging in NIZ were detected by colorimetry. **Results** Compared with sham operation group, the apoptosis index and expressions of Fas, XO, caspase 3 in NIZ were significantly increased in MI group. The activity of XO was increased but the activities of ·O_2^- and ·OH-scavenging were decreased ($P<0.01$). Compared with MI group, the changes of these parameters above were alleviated in allopurinol group. There was no significant difference in infarct size and XO expression between allopurinol and MI groups ($P>0.05$). **Conclusion** Allopurinol could inhibit the cardiomyocyte apoptosis in NIZ in rats. The protective mechanism of allopurinol involves the reduction of reactive oxygen species and depression of the expressions of Fas and caspase 3.

Key words: allopurinol; xanthine oxidase; reactive oxygen species; apoptosis; myocardial infarction

心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心肌细胞凋亡是触发心室重构导致心力衰竭的重要原因[1-4],而缺血心肌中大量生成的活性氧(reactive oxygen species, ROS)可诱导心肌细胞凋亡[4]。既往实验表明,MI后心肌组织中黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)高度表达和活性增加,通过催化ROS的大量生成,导致心肌肥厚和室腔扩张;而别嘌呤醇(allopurinol)作为XO的竞争抑制剂,可明显抑制MI后心室肥大和功能紊乱[5,6],但对心肌细胞凋亡的影响目前尚少见报道。本研究拟观察别嘌呤醇对大鼠MI模型心肌细胞凋亡的影响并探讨其可能的相关机制。

作者简介:肖 骏,男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事冠心病方面的研究。电话:(023)63693079,E-mail:xj73wy@163.com
通信作者:佘 强,电话:(023)63693079
收稿日期:2007-10-10;修回日期:2007-11-16

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 55只雄性SD大鼠,体质量180~230 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2 药物与主要试剂 别嘌呤醇(批号:050104),重庆青阳药业有限公司生产;抑制与产生超氧阴离子自由基(·O_2^-)、羟自由基(·OH)测试盒和XO测试盒(南京建成);兔抗鼠多克隆抗体:XO、Fas(Santa Cruz公司,美国),caspase 3(NeoMarkers公司,美国);即用型SABC试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德);其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 GE Vivid 7彩色多普勒超声诊断仪(美国);Olympus IX-70显微镜(日本);电泳仪、转印仪、垂直电泳槽、凝胶图像分析系统(Bio-Rad公司,美国);752型紫外分光光度仪(上海青华科技仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及分组 参照文献[5]介绍的方法,取50只大鼠于肺动脉圆锥与左心耳之间距主动脉根部3 mm处用无创缝合线(7-0)结扎冠脉前降支制作MI模型,共存活31只。分为心肌梗死组(MI组,蒸馏水2 ml/d)16只,别嘌呤醇组(allo组,50 mg·kg^{-1}·d^{-1})15只;另设假手术组(sham组)5只,仅在前降支上留一松结,不结扎。术后24 h开始灌胃给药,连续28 d。

1.2.2 超声心动图检测 探头频率13 MHz,深度3.5 cm,速度200 mm/s。在取得满意的胸骨旁左心室短轴二维图像后,于乳头肌水平将M型取样线垂直于室间隔和左心室后壁获得M型图像,测定左心室舒张末期内径(left ventricular end disastolic dimension, LVEDD)、短轴缩短分数(fractional shortening, FS)、射血分数(ejection fraction, EF),取连续3个心动周期的平均值。

1.2.3 心肌梗死面积的测定 沿梗死区中部垂直于左心室长轴的方向制作石蜡组织切片(5 μm厚),HE染色后用Image Pro Plus 4.5图像分析软件测定左心室心外、内膜周长和梗死区心外、内膜长度,取平均值后按以下公式计算[5]:梗死面积(infarction size, IS)=(梗死区心外膜长度+梗死区心内膜长度)/(左心室心外膜周长+左心室心内膜周长)。剩余心肌组织经液氮速冻后存于-80 ℃冰箱。

1.2.4 心肌组织XO和清除·O_2^-、·OH活力检测 清除·O_2^-活力(activity of ·O_2^--scavenging)和清除·OH活力(activity of ·OH-scavenging)高则表明心肌组织中·O_2^-和·OH含量低。按测试盒说明书操作,取冻存心肌100 mg制备成10%的冰浴组织匀浆,12 000×g离心10 min吸取上清液,加入试剂混匀,终止反应后测定吸光度值,分别计算出XO和清除·O_2^-、·OH活力单位。

1.2.5 心肌细胞凋亡原位检测 采用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT酶)介导的地高辛标记的dUTP缺口末端标记(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling, TUNEL)法标记心肌凋亡细胞核中的DNA 3′-OH末端,按说明书操作。以已知阳性切片作为阳性对照,用TBS代替TdT反应液作为阴性对照。光镜下(10×20倍)观察,阳性细胞核为棕黄色,选择5个无重叠视野,分别计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数,二者百分比作为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.2.6 DNA凝胶电泳(DNA ladder) 酚/氯仿法抽提各组细胞总DNA,取10 μl DNA于1.5%琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统观察并成像。

1.2.7 心肌组织Fas基因表达检测 采用链霉亲和素-生物素-过氧化酶复合物法进行免疫组化检测,按说明书操作。以PBS代替一抗作为阴性对照。光镜下(10×20倍)观察,阳性细胞为棕黄色,随机选择5个无重叠视野,用Image Pro Plus 4.5软件测定阳性表达区积分光密度值(integrated optical density, IOD)作为半定量参数,用以反映Fas蛋白阳性表达程度。

1.2.8 Western blot检测XO和caspase 3蛋白表达 去垢剂法提取总蛋白,取40 μg蛋白量经SDS-PAGE电泳后电转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭后分别与XO和caspase 3抗体(1∶400)4 ℃孵育过夜,β-actin(1∶200)作为内标,加辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(1∶1 500)37 ℃孵育2 h,DAB显色,凝胶成像后用Quantity One 4.4图像分析软件进行半定量灰度分析,分别计算XO、caspase 3与β-actin吸光度比值代表其相对表达量。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SAS 8.0统计软件分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用Tukey-Kramer多重比较法。

2 结果

2.1 超声心动图结果和心肌梗死面积

28 d后大鼠MI组死亡6只,allo组死亡1只,sham组全部存活。allo组与MI组比较,LVEDD明显降低,FS和EF明显升高($P<0.01$);梗死面积两组间差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1 大鼠心肌梗死后28 d LVEDD、FS、EF和IS的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	LVEDD(mm)	FS(%)	EF(%)	IS(%)
sham组	5	5.8±0.9	53.94±8.41	74.86±5.66	
MI组	10	7.2±0.8[a]	31.97±5.88[a]	35.47±2.25[a]	30.6±3.2
allo组	14	6.2±0.5[b]	46.50±7.82[b]	56.38±5.45[ab]	28.4±2.9

a:$P<0.01$,与sham组比较;b:$P<0.01$,与MI组比较

2.2 心肌细胞凋亡指数

TUNEL染色结果显示,凋亡心肌细胞主要分布在梗死区周围(图1)。allo组与MI组比较,AI明显下降($P<0.01$,表2)。

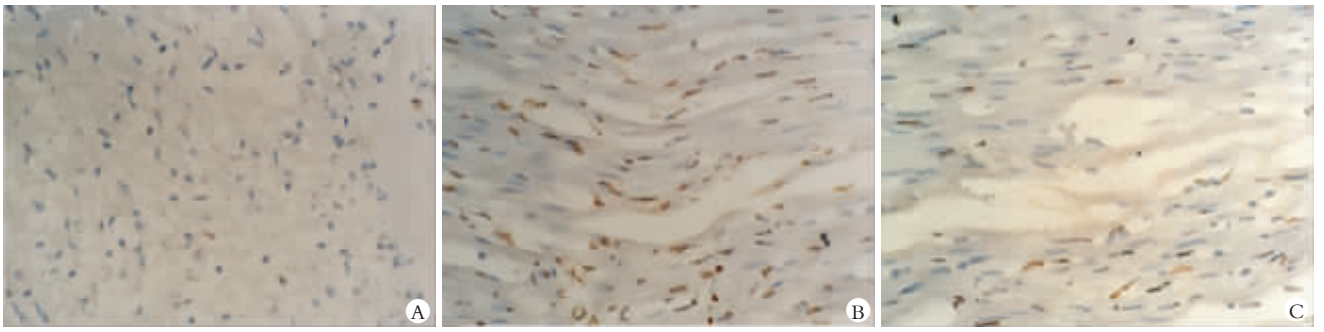
表2 非梗死区心肌AI和Fas、caspase 3、XO蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	AI(%)	Fas(IOD)	caspase 3/β-actin	XO/β-actin
sham组	5	0.50±0.20	10 681±2 079	0.04±0.01	0.15±0.06
MI组	10	21.10±1.38[b]	77 328±5 151[b]	0.45±0.08[b]	0.53±0.09[b]
allo组	14	6.24±0.76[bc]	31 925±3 263[bc]	0.12±0.04[ac]	0.51±0.07[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与sham组比较;c:$P<0.01$,与MI组比较

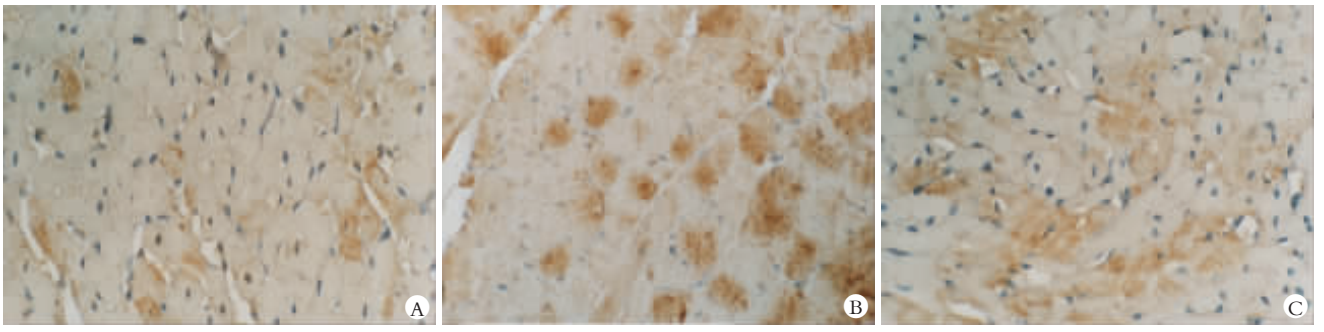
2.3 Fas基因表达

免疫组化结果显示,Fas蛋白阳性表达定位于细胞膜或细胞质内(图2)。allo组与MI组比较,Fas蛋白阳性表达IOD值显著降低($P<0.01$,表2)。



A：sham 组；B：MI 组；C：allo 组

图 1　心肌组织凋亡细胞的病理学观察　（TUNEL ×200）

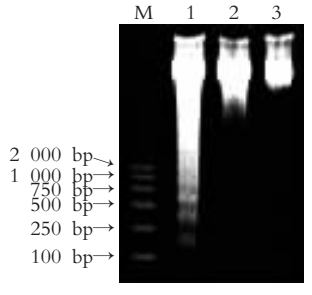


A：sham 组；B：MI 组；C：allo 组

图 2　心肌组织 Fas 蛋白的表达　（SABC ×200）

2.4　DNA 凝胶电泳结果

如图 3 所示,sham 组呈现一条光亮的条带,紧靠加样孔,为正常心肌细胞 DNA 带型;MI 组 DNA 片段分布较弥散,可见典型的梯状带纹(DNA ladder);allo 组 DNA 片段弥散程度较轻,DNA ladder 消失。



M：DNA 标准(DL 2000)；1：MI 组；2：allo 组；3：sham 组

图 3　心肌组织 DNA 凝胶电泳图

2.5　caspase 3 蛋白表达

Western blot 结果显示,与 MI 组比较,allo 组心肌组织 caspase 3 蛋白表达明显降低($P<0.01$,表 2,图 4)。

2.6　XO 活力及蛋白表达

allo 组与 MI 组比较,XO 活力显著降低($P<0.01$,表 3),XO 蛋白表达两组间差异无统计学意义($P>0.05$,表 2,图 4)。

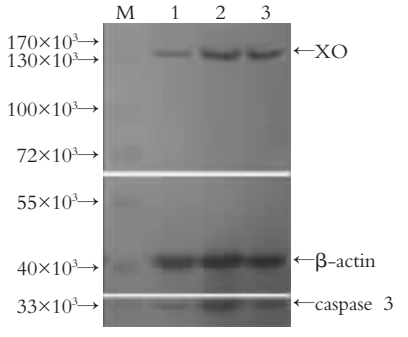
2.7　清除・O_2^-、・OH 活力

allo 组与 MI 组比较,心肌组织清除・O_2^-、・OH 活力明显升高($P<0.01$,表 3)。

表 3　非梗死区心肌 XO 和清除・O_2^-、・OH 活力的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	XO 活力 (U/mg)	清除・O_2^--活力 (U/g)	清除・OH-活力 (U/mg)
sham 组	5	0.21 ± 0.05	151.38 ± 9.57	253.03 ± 17.39
MI 组	10	1.62 ± 0.19[a]	64.77 ± 8.50[a]	98.67 ± 16.21[a]
allo 组	14	0.43 ± 0.13[b]	97.72 ± 8.99[ab]	177.02 ± 9.56[ab]

a:$P<0.01$,与 sham 组比较;b:$P<0.01$,与 MI 组比较



M：蛋白标准；1：sham 组；2：MI 组；3：allo 组

图 4　心肌组织 XO 和 caspase 3 蛋白表达

3　讨论

心肌梗死后心室重构主要包括心肌细胞重构与间质重构,而应用别嘌呤醇治疗可抑制心室重构,改善心功能[5,6]。本研究进一步观察了别嘌呤醇对大鼠 MI 后心肌细胞凋亡的影响,结果表明 allo 组 LVEDD 明显降低,EF 和 FS 明显升高,与文献[1,2]报道相一致。

MI 后,梗死边缘区和非梗死区心肌细胞凋亡是引起晚期左心室重构和心功能不全的重要因素[7]。本研究用 TUNEL 方法证实,在心肌梗死后 28 d,MI 组非梗死区心肌细胞凋亡指数明显高于 sham 组,凋亡细胞主要分布在梗死区周围的心肌,这可能与该区域存活的心肌细胞因缺血程度较轻但仍受到 ROS 的持续作用有关,而缺血中心区因严重的缺血、缺氧而发生细胞坏死。经琼脂糖凝胶电泳后,MI 组出现典型的 DNA ladder 图谱,也支持 TUNEL 检测结果。allo 组非梗死区心肌细胞凋亡指数与 MI 组比较显著降低,DNA 降解程度减轻,梯状带纹消失,表明别嘌呤醇明显抑制了非梗死区心肌细胞凋亡。另外本研究表明,别嘌呤醇对梗死区扩展未产生明显影响,这可能与研究时限和样本例数有关。

凋亡是由基因控制的程序性细胞死亡,许多基因和蛋白参与细胞凋亡过程。Fas 基因是一种重要的凋亡促进基因,易受氧化应激激活而促进细胞凋亡[8]。Fas/ FasL 系统是体内直接启动细胞凋亡的死亡信号转导系统,其通过与 FADD (Fas-associated death domain)蛋白的死亡区结合,激活 FADD 的死亡效应区,并使其与 caspase 8 结合,caspase 8 再激活其下游的 caspase 3,导致细胞凋亡[9]。Zhu 等[1]报道,Fas 蛋白表达的程度与细胞凋亡增加的时相一致。研究证实[10],caspase 3 是 Fas 介导细胞凋亡蛋白酶级联反应中处于中心地位的执行者,抑制 caspase 3 酶活性或拮抗 caspase 3 功能可使细胞凋亡受抑。Sam 等[7]发现心肌梗死后非梗死区心肌细胞凋亡增加,伴有 caspase 3 活性增高。本研究用免疫组化和 Western blot 技术检测非梗死区心肌组织,结果显示在心肌梗死后 28 d,MI 组 Fas 和 caspase 3 蛋白表达明显增加,与上述结果相符。而 allo 组与 MI 组比较,Fas 和 caspase 3 蛋白表达显著降低,表明别嘌呤醇抑制了非梗死区心肌组织 Fas 基因和 caspase 3 的表达。

别嘌呤醇抑制心肌细胞凋亡可能与降低舒张末压,减轻室壁张力有关;也可能通过抑制缺血心肌产生大量 ROS,包括 $\cdot O_2^-$、$\cdot OH$、H_2O_2 等介导的细胞凋亡[11]而发挥作用。业已证实,直接清除 H_2O_2 可以抑制梗死后心肌细胞凋亡和改善心功能[12]。本研究表明,allo 组心肌组织 $\cdot O_2^-$、$\cdot OH$ 含量和 XO 活性明显降低,据此推测别嘌呤醇可能通过抑制 XO 活性,减少 ROS 的生成,从而抑制氧化应激敏感的 Fas 基因和 caspase 3 的表达,减少心肌梗死后非梗死区心肌细胞凋亡而发挥作用。

别嘌呤醇还可能通过其他途径抑制心肌细胞凋亡[11],如抑制 p53 基因的表达,降低应激激活蛋白激酶(SAPK)的活性,抑制凋亡信号调节激酶 1(ASK1)等,这些都有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Zhu Y Z, Zhu Y C, Wang Z J, *et al*. Time-dependent apoptotic development and pro-apoptotic genes expression in rat heart after myocardial infarction[J]. Jpn J Pharmacol, 2001, 86(3): 355 – 358.

[2] Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, *et al*. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(6): H2726 – H2731.

[3] 吴 强, 李隆贵, 耿昭华. 心肌梗死后心衰大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关基因表达的变化[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 434 – 436.

[4] Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction[J]. Pharmacol Ther, 2004, 104(1): 1 – 16.

[5] Mellin V, Isabelle M, Oudot A, *et al*. Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure[J]. Eur Heart J, 2005, 26(15): 1544 – 1550.

[6] Engberding N, Spiekermann S, Schaefer A, *et al*. Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug? [J]. Circulation, 2004, 110(15): 2175 – 2179.

[7] Sam F, Sawyer D B, Chang D L, *et al*. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(1): H422 – H428.

[8] Lee P, Sata M, Lefer D J, *et al*. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion *in vivo*[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(2): H456 – H463.

[9] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation [J]. Science, 1998, 281(5381): 1305 – 1308.

[10] 徐 强, 司良毅, 赵小兰, 等. 大鼠心肌缺血再灌注时心肌细胞凋亡 caspase-3 活性变化规律及药物对其影响[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(15): 1355 – 1357.

[11] Krijnen P A, Nijmeijer R, Meijer C J, *et al*. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(11): 801 – 811.

[12] Matsushima S, Ide T, Yamato M, *et al*. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice[J]. Circulation, 2006, 113(14): 1779 – 1786.

(编辑 栾 嘉)