论著

文章编号:1000-5404(2009)24-2448-04

Neuregulin-1β对阿霉素致心衰大鼠心肌细胞凋亡及bax、bcl-2蛋白表达的干预效应

刘启亮,宋耀明,刘 超 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 观察阿霉素所致心衰大鼠心肌细胞凋亡和bax、bcl-2蛋白表达情况及Neuregulin-1β(NRG-1β)的干预作用。**方法** 60只雄性SD大鼠,体质量200~250 g,分成3组:①模型组,即阿霉素心肌病组(ADR-DCM,$n=20$),阿霉素2 mg/kg,尾静脉注射,每周1次,连续注射8周;②阿霉素心肌病+NRG-1治疗组(NRG,$n=20$),在注射ADR后8周后即开始给予NRG-1β 10 μg/(kg·d)尾静脉注射,连续5 d;③正常对照组($n=20$),用2 ml/kg生理盐水,尾静脉注射,连续8周。9周后取心肌行HE染色病理观察,TUNEL法观察心肌细胞凋亡,Western blot检测bax、bcl-2蛋白的表达。**结果** 模型组与NRG治疗组心肌细胞凋亡指数较正常对照组显著增高($P<0.05$),与模型组相比,NRG治疗组凋亡指数显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,NRG治疗组bcl-2蛋白表达明显上调($P<0.05$),bax蛋白表达明显下调($P<0.05$)。**结论** NRG-1β能够抑制阿霉素所致心衰大鼠心肌细胞凋亡,其机制可能与bcl-2蛋白表达上调、bax蛋白表达下调、bcl-2/bax值上调有关。

关键词:neuregulin-1β;心力衰竭;心肌凋亡;bax;bcl-2

中图法分类号:R542.2;R972.9;R979.14 **文献标识码**:A

Neuregulin-1β inhibits cardiomyocyte apoptosis in adriamycin-induced rat cardiomyopathy by regulating bcl-2 and bax

LIU Qi-liang, SONG Yao-ming, LIU Chao (Cardiovascular Disease Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the cardiomyocyte apoptosis and protein expressions of bcl-2 and bax in adriamycin (ADM)-induced myocardial damage in rats treated with neuregulin-1β (NRG-1β). **Methods** Sixty male SD rats weighing 200 to 250 g were randomly divided into 3 groups: control, ADR-DCM and ADR + NRG groups. ADR-DCM group ($n=20$) was weekly injected 2.0 mg/kg of ADR *via* tail vein once a week for 8 weeks to produce cardiomyopathy. The rats of ADR + NRG group ($n=20$) was given an injection of NRG-1β at 10 μg/(kg·d) *via* tail vein for 5 d after the establishment of cardiomyopathy by ADR injection. The animals from control group ($n=20$) received 2 ml/kg normal saline by injection, once a week for 8 weeks. Nine weeks later, rats were executed under anesthesia and their heart was resected. Apoptotic cardiomyocytes were detected by using the terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. The expressions of bcl-2 and bax protein were determined by Western blotting. **Results** The index of apoptotic cardiomyocytes was increased significantly in ADR-DCM group and ADR + NRG group compared with control group ($P<0.05$), and compared with ADR-DCM group, the index of apoptotic cardiomyocytes was significantly lower in ADR + NRG group ($P<0.05$); compared with ADR-DCM group, the expressions of bcl-2 protein was increased significantly ($P<0.05$), and the expression of bax protein was induced significantly decreased in ADR + NRG group ($P<0.05$). **Conclusion** NRG-1β suppresses cardiomyocyte apoptosis induced by ADR by upregulating the expression of bcl-2 and downregulating the expression of bax.

Key words: Neuregulin-1β; heart failure; apoptosis; bax; bcl-2

作者简介:刘启亮,男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事心血管疾病基础与临床方面的研究。E-mail: liuqiliangzy@sina.com

通信作者:宋耀明,电话:(023)68755196,E-mail: ymsong@mail.xqhospital.com.cn

收稿日期:2009-07-16;**修回日期**:2009-08-13

阿霉素(adriamycin, ADR)是一种高效、广谱抗肿瘤药物,其最严重的副作用是扩张性心肌病,预后很差[1,2],引起的机制可能与其加剧心肌细胞凋亡有关。阿霉素心脏毒性心肌细胞凋亡与其他类型的细胞凋亡一样,可能受到许多细胞凋亡相关基因的调控。细胞凋亡的发生受多种基因表达的调控,其中 bcl-2、bax 蛋白表达变化与凋亡的关系备受关注。

Neuregulin (NRG) 是上皮生长因子酪氨酸激酶受体家族的配体。研究发现的 Neuregulin (NRG-1、NRG-2、NRG-3) 均能与 ErbB3 或 ErbB4 结合,之后可以与 ErbB1 或 ErbB4) 结合形成同种或异种二聚体,影响细胞增殖、迁移、分化和存活、抵制细胞凋亡[3,4]。本课题组前期研究证实外源性的 NRG 可有效减轻阿霉素心肌病大鼠心肌损伤,改善心功能,纠正心衰[5]。本研究通过观察静脉注射重组人 NRG 对阿霉素所致大鼠心力衰竭心肌细胞凋亡指数和 bcl-2、bax 蛋白水平的变化,以探讨 NRG-1 能否减少阿霉素所致心衰大鼠心肌细胞凋亡,并探进一步讨其作用机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物、主要试剂和仪器

雄性 Sprague-Dawley(SD)大白鼠 60 只,体质量 200 ~ 250 g,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供;阿霉素(Pharmacia,意大利);Neuregulin-1β 由上海泽生公司提供;β-actin 兔多抗 IgG、bcl-2 鼠单抗 IgG、bax 鼠单抗 IgG、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG 购于美国 Santa Cruz 公司;原位末端标记技术(TUNEL)检测试剂盒由 Roche 公司生产;其余试剂为市售分析纯。

1.2　方法

1.2.1　动物分组和实验模型的制备及实验动物取材　　雄性 SD 大鼠分 3 组:①模型组,即阿霉素心肌病组(ADR-DCM 组,$n=20$),阿霉素 2.0 mg/kg,尾静脉注射,每周 1 次,连续注射 8 周,注射完成后再观察 1 周;②阿霉素心肌病 + NRG-1 治疗组(NRG 治疗组,$n=20$),在首次注射 ADR 后 8 周开始给予 Neuregulin-1β 10 μg/(kg·d)(根据药品提供单位前期试验的推荐用量,增加剂量后疗效并未增加,故选择此剂量)尾静脉注射,连续 5 d;③正常对照组($n=20$),用相同容量的生理盐水代替模型,给药方法同模型组。阿霉素注射完毕后,超声测量心功能确定造模成功,1 周后行超声检查并处死动物,留取标本,置于 -70 ℃ 液氮罐中冷冻保存,以检测血流动力学指标。

1.2.2　心肌组织病理学观察　　取左心室心肌,10% 福尔马林固定,常规组织切片,HE 染色,进行病理学观察。

1.2.3　检测心肌细胞凋亡(TUNEL 法)　　应用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL, POD Kit 购自德国罗氏诊断有限公司)标记大鼠左心室肌的凋亡细胞核,DAB 显色。在计算机图像分析仪上,在 400 倍视野下,每张切片拍摄 5 个阳性视野,每个视野计数 200 个细胞核,根据阳性细胞所占细胞总数的百分比作为凋亡细胞阳性指数(AI)。AI = 凋亡阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

1.2.4　Western blot 检测　　心脏组织液氮研磨成粉末状,加入 10 倍体积(10 ml/g)组织裂解液(含 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,150 mmol/L NaCl, 0.02% Na_2N_3, 0.1% SDS, 1 mmol/L PMSF, 1 μg/ml 胰蛋白酶肽, 1 μg/ml 亮肽素),冰上静置 30 min,超声助溶,4 ℃、14 000 × g 离心 20 min,上清液用于蛋白印迹分析。每孔上样 20 ~ 40 μg 总蛋白,SDS-PAGE 180 V 电泳,随后 100 mA 冷却条件下转膜至 PVDF 膜,丽春红 S 染液确定蛋白转膜效率。含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭3 h 或者 4 ℃ 过夜,洗膜后加入 bax (1∶500)、bcl-2 (1∶500) 或 β-actin (1∶2 000) 一抗室温孵育 2 h 或 4 ℃过夜,TBST 洗膜后加相应辣根过氧化酶标记的二抗(1∶2 000)孵育 45 min 至1 h,洗膜后用 super ECL 发光液,X 线片显影、定影。凝胶分析系统分析谱带强度。将 β-actin 值作为 100%,bax、bcl-2 蛋白表达结果以与 β-actin 的比值表示。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析,两两比较用 S-N-K 法。

2　结果

2.1　各组大鼠心脏超声及血流动力学变化

与正常对照组相比,模型组左室舒张末期内径(LVEDD)左室收缩末期内径(LVESD)和左室舒张末压(LVEDP)均显著增加($P<0.05$);左室内压(LVSP)、左室短轴缩短率(LVFS)、$+dp/dt_{max}$ 和 $-dp/dt_{max}$ 均降低($P<0.05$)。而 NRG 治疗组 LVEDD、LVESD 和 LVEDP 均较模型组组显著降低($P<0.05$),左室射血分数(LVEF)、LVSP、$+dp/dt_{max}$ 和 $-dp/dt_{max}$ 均较模型组显著增加($P<0.05$),见表 1、2。

表 1　各组大鼠心脏超声改变 ($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVFS(%)	LVEF(%)
正常对照组	5.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2	52.4 ± 1.5	85.0 ± 1.8
模型组	7.0 ± 0.2[a]	4.2 ± 0.2[a]	39.8 ± 0.9[a]	66.5 ± 2.5[a]
NRG 治疗组	6.0 ± 0.4[b]	3.2 ± 0.1[b]	48.0 ± 1.5[b]	80.1 ± 1.4[b]

a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与模型组比较

表 2　各组大鼠血流动力学改变 ($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	$+dp/dt_{max}$ (mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$ (mmHg/s)
正常对照组	129.0 ± 1.8	4.0 ± 1.4	6 005.4 ± 315.6	-5230.1 ± 208.6
模型组	105.0 ± 2.0[a]	24.0 ± 1.8[a]	3 545.5 ± 187.4[a]	-2 705.6 ± 230.8[a]
NRG 治疗组	116.0 ± 2.8[b]	13.0 ± 1.4[b]	4 506.5 ± 243.3[b]	-3 605.0 ± 189.9[b]

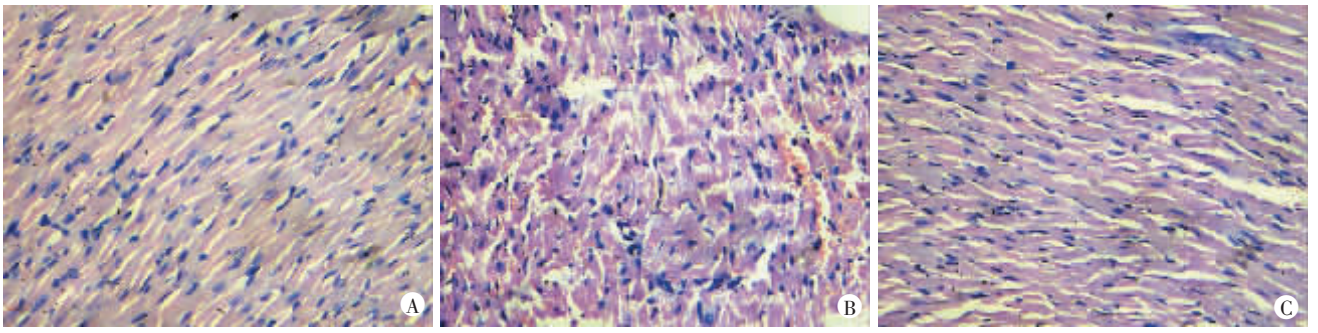
a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与模型组比较

2.2　各组大鼠心肌组织病理学观察

心肌组织 HE 染色显示,正常对照组心肌细胞形态正常,细胞质纹理清晰;模型组呈现灶状变性坏死,心肌细胞明显肿胀、间隙增宽、心肌纤维局限性断裂,心内膜中胶原和弹性纤维增生,局灶性心肌被纤维组织所替代,部分心肌细胞肌浆凝聚、细胞核固缩、变形或消失、脂肪变性,细胞质内有空泡形成及淋巴细胞的浸润和成纤维细胞的增生,毛细血管扩张增生;NRG 治疗组较 ADR-DCM 组有显著改善(图 1)。

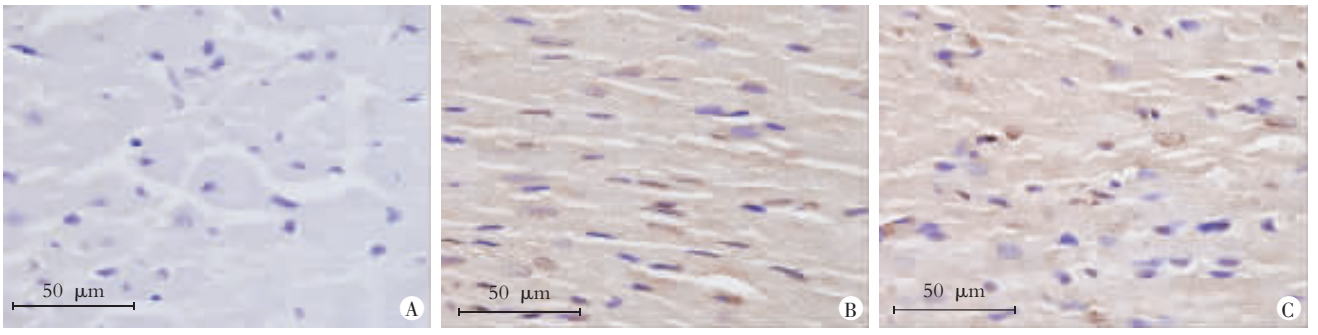
2.3　各组大鼠心肌细胞凋亡情况

正常对照组心肌偶可见散在 TUNEL 阳性细胞,模型组与 NRG 治疗组均出现 TUNEL 阳性细胞,NRG 治疗组显著低于模型组($P<0.05$,图 2、表 3)。



A:正常对照组;B:模型组; C:NRG 治疗组

图1 光镜下各组心肌病理改变 (HE×200)



A:正常对照组; B: 模型组;C: NRG 治疗组

图2 各组心肌细胞凋亡改变 (TUNEL)

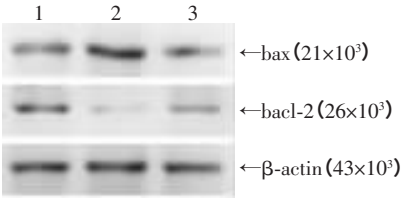
表3 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 ($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

组别	AI(%)
正常对照组	0.007±0.001
模型组	16.400±3.320[a]
NRG 治疗组	6.800±1.780[b]

a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与模型组比较

2.4 Western blot 结果

Western blot 检测结果显示: bax 蛋白在模型组和 NRG 治疗组的表达均高于正常对照组($P<0.01$),NRG 治疗组较模型组表达较低($P<0.05$);bcl-2 在 NRG 治疗组的表达高于模型组($P<0.05$),见图3,表4。



1:正常对照组; 2:模型组; 3:NRG 治疗组

图3 Western blot 测定各组心肌 bcl-2 及 bax 蛋白含量

表4 各组大鼠心肌 bax、bcl-2 蛋白的表达 ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	bax	bcl-2
正常对照组	0.28±0.02	0.64±0.04
模型组	0.70±0.15[a]	0.18±0.04[a]
NRG 治疗组	0.41±0.06[b]	0.45±0.06[b]

a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与模型组比较

3 讨论

阿霉素的心脏毒性包括急性期时心肌细胞的变形、坏死、心肌的炎症反应和慢性作用引起的扩张型心肌病。已有的研究结果表明,阿霉素心脏毒性心肌细胞凋亡可能是阿霉素心脏毒性造成扩张型心肌病的重要机制之一。阿霉素心脏毒性心肌细胞凋亡与其他类型的细胞凋亡一样, 可能受到许多细胞凋亡相关基因的调控,其中以其中 bcl-2、bax 基因对凋亡的调控备受重视[6]。

NRG-1β 属于神经调节蛋白家族成员(NRG)。NRG 是上皮生长因子酪氨酸酶受体激动剂。研究发现,NRG-1β 具有促进心肌细胞存活、抑制凋亡和促进 DNA 合成等多种作用[7,8]。有研究证实,NRG-1 能有效使离体心肌细胞免受阿霉素诱导的凋亡作用[9]。但在不同的实验条件下,来源于不同时期的心肌细胞(胚胎期、新生大鼠和成体),在不同的培养条件下,表现出不同的实验结果。因此,探讨 Neuregulin-1β 对阿霉素所致大鼠心肌细胞的影响具有研究价值和一定的理论基础。

李晖等[10]研究表明阿霉素引起的心肌损伤与其所引发的心肌细胞凋亡有关,且呈一定的量效关系。本研究的结果显示,模型组的心肌病理上呈现一系列的变性、坏死、排列紊乱等表现与文献报道有一致性,

再结合心脏超声结果,证明阿霉素模型建立是成功的。本实验结果显示,应用 Neuregulin-1β 干预后,与模型组比较,大鼠心肌病理上可观察到细胞的变性、坏死和排列紊乱有明显改善,推测可能与 NRG-1 促进 DNA 合成,促进细胞生长和增加血管生成等作用有关,其具体机制有待进一步研究。

bcl-2 是一种主要在凋亡上游发挥作用的重要的抗凋亡蛋白,它可以与 bax 蛋白结合形成异二聚体,抑制 bax 的促凋亡作用。本研究发现, 静脉注射 NRG 后,凋亡抑制蛋白 bcl-2 增多, 与模型组比较,心肌细胞 bax、bcl-2 蛋白表达都有明显心改变($P < 0.05$)。研究显示在心血管系统生理功能的调节中有 PI-3K 途径参与[7]。而 PKB 是 PI-3K 信号转导途径的关键信使分子。研究证实 PI-3K 是细胞内最重要的抗凋亡信号转导途径,其机制与抑制 caspases 活性、阻止线粒体释放细胞色素 C、调节 bcl-2 家族成员的活性密切相关[11,12]。凋亡相关 bax 和 bcl-2 蛋白表达的改变可能与 NRG 与 ErbB 受体结合引起 PI-3K 信号活化有关[13]。使用 Neuregulin-1β 干预后,与模型组比较,心肌细胞凋亡阳性指数 AI 值明显下下降($P < 0.05$),提示 Neuregulin-1β 对阿霉素所致大鼠心肌细胞凋亡有一定的抑制作用,其作用机制与增强 bcl-2 蛋白的表达, 降低 bax 蛋白的表达, 明显提高 bcl-2/bax 的比值有关。

目前 Neuregulin-1β 的研究处于临床前期,其对人体抗阿霉素所致心肌细胞凋亡是否与本实验结论一样还需要进一步研究证实。

参考文献:

[1] Fujisaki G, Inokuchi C, Murashige N. Doxorubicin-induced myocardial injury[J]. N Engl J Med, 2004, 351(18): 1908 - 1909.

[2] Simpson C, Herr H, Courville K A. Concurrent therapies that protect against doxorubicin-induced cardiomyopathy[J]. Clin J Oncol Nurs, 2004, 8(5): 497 - 501.

[3] Xu Y, Li X, Zhou M. Neuregulin-1/ErbB signaling: a druggable target for treating heart failure[J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9(2): 214 - 219.

[4] Rohrbach S, Yan X, Weinberg E O, *et al*. Neuregulin in cardiac hypertrophy in rats with aortic stenosis. Differential expression of erbB2 and erbB4 receptors[J]. Circulation, 1999, 100(4): 407 - 412.

[5] 刘　超, 宋耀明, 何作云, 等. rhNRG-1β 对阿霉素心肌病大鼠的治疗作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(5): 426 - 429.

[6] 张　卓, 礼广森, 任卫东, 等. 阿霉素致兔心脏毒性心肌细胞凋亡及相关基因 bcl-2, bax 蛋白表达变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(29): 5717 - 5720.

[7] Pentassuglia L, Sawyer D B. The role of Neuregulin-1beta/ErbB signaling in the heart[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(4): 627 - 637.

[8] Liu X, Gu X, Li Z, *et al*. Neuregulin-1/erbB-activation improves cardiac function and survival in models of ischemic, dilated, and viral cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(7): 1438 - 1447.

[9] Kuramochi Y, Guo X, Sawyer D B. Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(2): 228 - 235.

[10] 李　晖, 钱素娟, 周令望, 等. 阿霉素导致大鼠心肌细胞凋亡的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1997, 31(3): 197 - 198.

[11] Cantley L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296 (5573): 1655 - 1657.

[12] 刘剑毅, 李世荣. 结缔组织生长因子通过 PI3K/PKB 抑制人增生性瘢痕成纤维细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 921 - 923.

[13] Fukazawa R, Miller T A, Kuramochi Y, *et al*. Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis *via* erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(12): 1473 - 1479.

（编辑　王　红）

（上接 2447 页）

如:喉、气管插伤、溃疡、水肿[3]等损伤,给患者带来痛苦。特别对于咽喉部水肿、咽喉部肿瘤等特殊患者,常规胃管置入法难以成功置入胃管。

电子鼻咽喉镜是一种新型的耳鼻咽喉疾病诊断治疗工具,其具备高质素光学优点,能提供高清晰度、大画面的内部图像,使鼻咽喉部的情况在电视屏幕上直观体现出来,这是传统的间接喉镜、纤维喉镜无法达到的[4]。电子鼻咽喉镜外形细小,柔软且易弯曲,可顺利通过并窥及鼻咽部、咽部、喉部的解剖标志,甚至可以观察到前、后联合及声门下等部位,且检查时患者无痛苦,依从性好。在胃管置入时,利用电子鼻咽喉镜易弯曲、导光性、可视性对胃管前段加以引导,使其对准食道入口,达到一次性插管成功,并减轻患者痛苦。当电子鼻咽喉镜到达后鼻孔时,咽喉部解剖标志已经一目了然,无需经口腔绕过软腭至口咽部,在清楚的明视下,很轻松将胃管前端置入食道内。本组 8 例患者在电子鼻咽喉镜引导下均一次性置管成功。

因此,电子鼻咽喉镜明视下胃管置入法成功解决了患者胃管插入困难的问题,大大减轻了护士的工作量和患者的痛苦,值得临床上推广。

关键词: 电子鼻咽喉镜;胃管置入

中图法分类号: R765.041　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 师亚琴, 刘　焱, 杨永莲. 喉癌的围手术期护理[J]. 延安大学学报:医学科学版, 2008, 6(3): 137.

[2] 王　佳, 王世平. 纤维鼻咽喉镜检查的护理配合[J]. 华西医学, 2008, 23(4): 872.

[3] 田勇泉, 孙爱华. 耳鼻咽喉-头颈外科学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 229 - 230.

[4] 刘士辉. 鼻内窥镜下鼻中隔成形术[J]. 中国现代医生, 2008, 46(14): 157.

（编辑　龙　亮）