文章编号:1000-5404(2010)03-0261-04

论著

扩张型心肌病大鼠心肌 ErbB4 蛋白表达和细胞凋亡及 neuregulin-1β 的干预作用

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

[摘要] **目的** 观察阿霉素所致心衰大鼠心肌 ErbB4 蛋白表达和细胞凋亡及 NRG-1β 的干预作用。**方法** 用 60 只 SD 雄性大鼠随机分为 4 组:阿霉素心肌病 8 周组(ADR1,$n=10$),阿霉素 2 mg/kg,尾静脉注射,每周 1 次,连续注射 8 周;阿霉素心肌病 12 周组(ADR2,$n=20$),阿霉素 2 mg/kg,尾静脉注射,每周 1 次,连续注射 8 周,之后普通喂养到 12 周;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 neuregulin-1β 10 μg/(kg·d)尾静脉注射,连续 5 d,之后喂养到 12 周;正常对照组(CON,$n=10$)。免疫印迹法(Western blot)检测 ErbB4 受体蛋白的表达;HE 染色病理观察评分;TUNEL 法观察心肌细胞凋亡。**结果** 心肌细胞凋亡指数:与模型组相比,NRG 治疗组凋亡指数显著降低($P<0.05$);ErbB4 蛋白表达:模型组第 8 周时表达明显高于正常组,模型组 12 周时表达较正常组明显减少;与模型组比较,NRG 干预组 ErbB4 蛋白表达明显上调($P<0.05$)。**结论** ErbB4 蛋白表达在扩张型心肌病大鼠心肌中表达早期增强,随着病程延长明显下降;NRG-1β 能够抑制扩张型心肌病大鼠心肌细胞凋亡并增加其受体 ErbB4 的表达。

[关键词] neuregulin-1β;扩张型心肌病;心肌细胞凋亡;ErbB4
[中图法分类号] R542.202; R329.25; R-332 **[文献标志码]** A

Expression of ErbB4 in and apoptosis of cardiac muscle cells of rats with dilated cardiomyopathy and their intervention with neuregulin-1β

Liu Qiliang, Song Yaoming, Liu Chao (Institute of Cardiovascular Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To study the adriamycin (ADR)-induced expression of ErbB4 in and apoptosis of cardiac muscle cells of rats with dilated cardiomyopathy and their intervention with neuregulin-1β. **Methods** Sixty male SD rats, weighing 200 – 250 g, were randomly divided into ADR 1 group ($n=10$), ADR 2 group ($n=20$), ADR + neuregulin-1β group ($n=20$), and normal control (NC) group ($n=10$). Rats in ADR1 and ADR2 groups were injected with 2.0 mg/kg of ADR through the tail vein, once a week for 8 and 12 weeks, respectively. Rats in ADR + neuregulin-1β group were injected with 2.0mg/kg of ADR through the tail vein, once a week for 8 weeks, followed by neuregulin-1β [10 μg/(kg·d)], once a day for 5 d. Rats in NC group received normal saline [2 ml/(kg·d)], once a week for 8 weeks. Expression of ErbB4 was detected by Western blotting. Lesions of cardiac muscle were scored with HE staining. Apoptosis of cardiac muscle cells was detected with the TUNEL method. **Results** The apoptotic index of cardiac muscle cells was significantly lower in ADR + neuregulin-1β group than in ADR 1 group ($P<0.05$). The expression level of ErbB4 was significantly higher in ADR 1 group than in NC group and obviously lower in ADR 2 group than in NC group, and significantly higher in ADR + neuregulin-1β group than in ADR2 group ($P<0.05$). **Conclusion** Early ErbB4 expression increases in cardiac muscle cells of rats with dilated cardiomyopathy and decreases with the prolonged disease course. Neuregulin-1β can inhibit the apoptosis of and increase the ErbB expression in cardiac muscle cells.

[Key words] neuregulin-1β; dilated cardiomyopathy; apoptosis; ErbB4

Corresponding author: Song Yaoming, Tel: 86-23-68755196, E-mail: ymsong@mail.xqhospital.com.cn

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种以心室腔扩大、心肌收缩功能障碍为主要特征的原因不明的心肌疾病,预后极差。ErbBs(ErbB1-4)属于酪氨酸激酶受体,可以传递表皮生长因子家族的信号。目前已知有 4 种亚型:ErbB1、ErbB2、ErbB3 及 ErbB4[1]。近年来的研究表明,ErbB4 受体在心脏的发育和心脏功能维持方面有重要的作用。其主要是通过

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

与 ErbB2 形成异源二聚体后与其配体 NRG-1 结合发挥生物学效应[2]。本课题组前期研究证实,NRG-1β 可有效减轻扩张型心肌病大鼠心肌损伤、改善心功能,部分纠正心衰[3,4]。本研究旨在检测 ErbB4 受体和细胞凋亡在 NRG-1β 干预的扩张型心肌病大鼠心肌中的变化,以探索 ErbB4 及其配体 NRG-1β 治疗扩张型心肌病的分子机制,以供临床使用。

1 材料与方法

1.1 实验动物,主要试剂和仪器

成年雄性 Sprague-Dawley(SD)大白鼠 60 只,体质量 200 ~ 250 g,由第三军医大学实验动物中心提供;市售阿霉素(浙江海正药业股份有限公司生产);neuregulin-1β 由上海泽生公司提供;β-actin 兔多抗 IgG、ErbB4 鼠单抗 IgG、辣根酶标记山羊抗鼠 IgG 购于上海关翔升生物科技有限公司;;原位末端标记技术(TUNEL)检测试剂盒由 Roche 公司生产;BNP-ELISA 试剂盒购于碧云天生物科技有限公司;其余试剂为市售分析纯。

1.2 方法和主要测定项目

1.2.1 动物分组和实验模型的制备及实验动物取材 成年雄性 SD 大鼠分 4 组:①正常对照组(CON, $n=10$),用相同容量的生理盐水代替 ADR 尾静脉注射,每周 1 次,连续 8 周。②阿霉素心肌病 + NRG-1 治疗组(NRG, $n=20$),在首次注射 ADR 后 8 周开始给予 neuregulin-1β 10 μg/(kg · d)尾静脉注射,连续 5d,之后普通喂养到 12 周。③阿霉素心肌病 8 周组(ADR1,$n=10$),阿霉素 2.0 mg/kg,尾静脉注射,每周 1 次,连续注射 8 周。④阿霉素心肌病 12 周组(ADR2,$n=20$),阿霉素 2.0 mg/kg,尾静脉注射,每周 1 次,连续注射 8 周,之后普通喂养到 12 周。按实验方案分别取各组大鼠行超声检查之后处死动物,留取标本,置于 -70 ℃ 液氮罐中冷冻保存,以检测其他指标。

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,进行病理学观察并行心肌病理评分,评分标准:0 级为无心肌损害;1 级为 1 或 2 个小病灶;2 级为数个小病灶;3 级为多个小病灶或严重的大病灶;4 级为多个大病灶,弥漫性浸润或坏死。

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,荧光素显色,用光线显微镜观察结果。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 大鼠血浆 BNP 及生化指标血钾、血肌酐测定 药物干预 1 周后,所有大鼠均经内眦取全血 1.5 ml,乙二胺四乙酸二钠抗凝。全血静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆置 -70 ℃冰箱保存;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)水平。血钾和血肌酐按常规方法检测。

1.2.5 蛋白印迹(Western blot)分析 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 ErbB4 (1∶4 000) 或 actin (1∶2 000) 一抗室温孵育 2 h 后 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 ECL 发光液,X 光片显影、定影。Quantity One 软件分析显影强度,以 actin 为内参值,每组分别重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 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 各组大鼠心功能比较

与正常对照组(CON 组)相比,模型组(ADR1 组和 ADR2 组)LVEDD, LVESD 均显著增加($P<0.05$),LVEF 均较正常对照组显著降低;而 NRG 治疗组 LVEDD, LVESD 均较同病程的 ADR2 组显著降低($P<0.05$),LVEF 较 ADR2 组显著增加($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠心脏超声改变($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVEF(%)
正常对照组	10	5.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2	85.0 ± 1.8
ADR1 组	10	6.7 ± 0.1	40.0 ± 0.2	69.5 ± 2.5
ADR2 组	20	7.0 ± 0.2[a]	4.2 ± 0.2[a]	60.5 ± 2.5[a]
NRG 治疗组	20	6.0 ± 0.4[b]	3.2 ± 0.1[b]	80.1 ± 1.4[b]

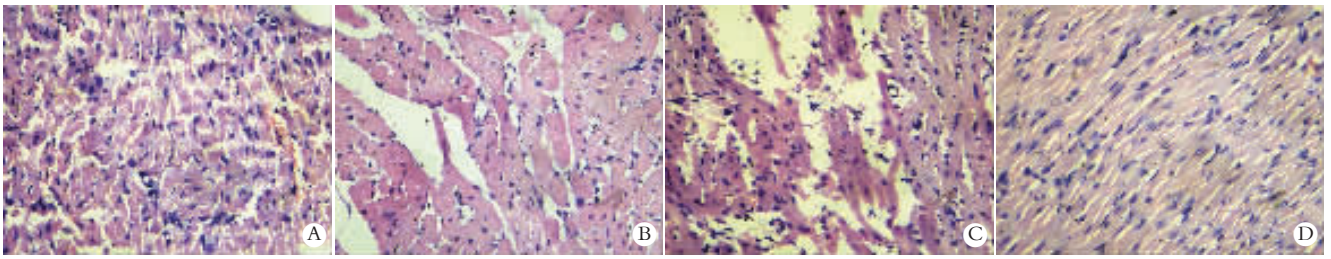
a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与 ADR2 组比较

2.2 病理改变和凋亡情况

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;2 个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 组较 ADR-DCM 组有显著改善(图 1),病理评分 NRG 治疗组(16.7)明显低于 ADR2 组(23.2)$P<0.01$。正常对照组心肌可见散在 TUNEL 阳性细胞,ADR1、ADR2 组与 NRG 处理组均出现 TUNEL 阳性细胞,分别为(16.4 ± 3.32)%、(20.80 ± 2.48)%、(10.80 ± 1.78)%,NRG 组显著低于 ADR2(12 周)组(图 2)。

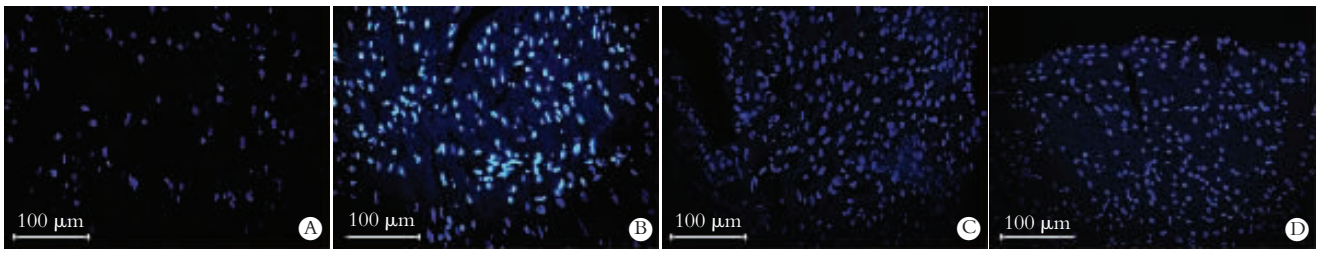
2.3 血浆 BNP、血钾和血肌酐水平

与正常对照组比较,模型组及 NRG 治疗组的 BNP 水平都明显升高($P<0.05$),与模型组比较,NRG 治疗组的 BNP 水平有明显降低($P<0.05$);各组血钾及血肌酐水平差异无统计学意义($P>0.05$)。



A:正常对照组; B:ADR1(8 周)组;C:ADR2(12 周)组;D:NRG 组

图 1　光镜观察各组大鼠心肌病理改变　(HE ×200)



A:正常对照组; B:ADR1(8 周)组; C: ADR2(12 周)组;D: NRG 组

图 2　各组大鼠心肌细胞凋亡改变　(TUNEL)

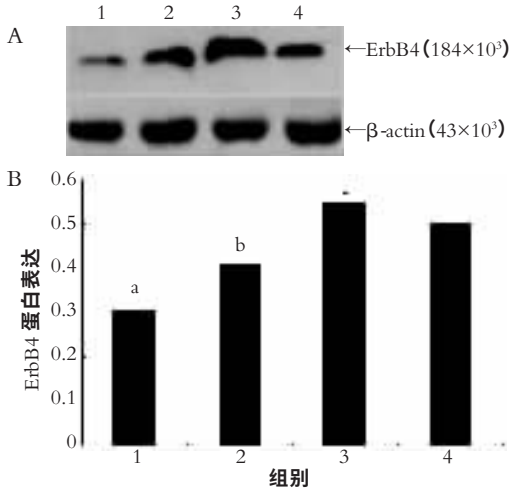
表 2　各组大鼠血浆 BNP 及血钾、血肌酐改变($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BNP	血钾	血肌酐
正常对照组	10	0.23 ±0.02	4.64 ±0.04	49 ±5
ADR1(8 周)组	10	0.38 ±0.05	4.58 ±0.01	49 ±2
ADR2(12 周)组	20	0.40 ±0.05[a]	4.48 ±0.04	47 ±8
NRG 治疗组	20	0.31 ±0.06[b]	4.49 ±0.06	48 ±6

a: $P<0.05$,与正常对照组比较, b: $P<0.05$,与 ADR2(12 周)组比较

2.4　Western blot 蛋白印迹分析结果

Western blot 检测结果显示: ErbB4 蛋白表达 ADR2(12 周)组与 NRG 治疗组均较正常组的表达降低($P<0.05$),NRG 组较 ADR2(12 周)组表达较增加($P<0.05$),ADR1(8 周)组较正常组表达增加($P<0.05$)(图 3)。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:ADR2(12 周) 组; 2:NRG 组;3:ADR1(8 周)组;4:正常对照组　a: $P<0.05$, 与正常对照组比较; b: $P<0.05$, 与 ADR2(12 周)组比较

图 3　Western blot 测定各组大鼠心肌 ErbB4 蛋白表达

3　讨论

DCM 是一种以左心室或左右心室扩张和收缩功能减退为特征的心肌疾病, 原因不明,为慢性充血性心衰代表性疾病,病死率极高,有必要对其治疗措施进行研究。近年研究发现,细胞凋亡和 neuregulin/ErbB 信号系统对心脏功能的影响极为重要,neuregulin 和其相应受体 ErbBs 在出生后和成年心肌中持续表达,提示在心肌中 neuregulin 对病理生理负荷或损伤的适应机制中发挥持续的作用。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[4,5]。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[6]。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。

ErbB4 蛋白为 ErbB4 基因编码的膜受体蛋白,为 ErbB 家族受体成员,通过介导胞外生长因子的信号而促进细胞的生长和分裂。对 ErbB 家族受体的组织分布研究发现,正常生理条件下,ErbB 受体广泛分布于 3 个胚系的各个组织器官。心肌细胞中 ErbB4 表达强于 ErbB3, 而 ErbB2 是 ErbB3 或者 ErbB4 的共受体,

ErbB2/ErbB3,ErbB2/ErbB4 异源二聚体是 ErbB3 或者 ErbB4 发挥作用的结构基础,但目前为止未发现与 ErbB2 结合的配体分子[7]。有研究表明在心肌细胞中选择性剔除 ErbB4 也可发生心肌症,提示在成体心脏中 ErbB2 的功能是作为 ErbB4 的辅助受体存在[5]。neuregulin-1β 与 ErbBs 受体结合,可以激活 ErbBs 酪氨酸激酶受体而诱导广泛的生物学效应,如细胞的增殖、分化、迁移、黏附、存活等[8]。有研究表明,动物心衰模型中发现心肌 ErbB2/ErbB4 表达水平下降,予以左室辅助治疗(LVAD)后,ErbB2/ErbB4 表达上调,本研究结果与此有一致性[9]。有研究报道 neuregulin 静脉注射可以改善心肌梗死后心力衰竭大鼠的心功能,根据细胞水平实验的结果可以推测,neuregulin/ErbB 信号系统通过促进心肌生长,促进血管形成,可以延缓心力衰竭进展[10-14]。

本研究观察了阿霉素诱导的扩张型心肌病大鼠,发现其心肌 ErbB4 蛋白表达下降,心肌细胞凋亡增加,推测除炎症细胞凋亡等原因外,ErbB4 受体表达的下调引起的 neuregulin/ErbB 信号系统功能的下降也是可能原因之一。予以外源性 neuregulin-1β 干预后可以上调 ErbB4 表达,表明 neuregulin-1β 可以增强 neuregulin/ErbB 信号传导并对血浆钠钾水平较少产生影响,从而引起其促心肌存活,抑制心肌细胞凋亡,改善心功能,提高动物生存率的多种作用,另外,在本研究中发现,在扩张型心肌病的早期,即第 8 周时,在 BNP 水平相较于正常对照组大鼠升高,心脏超声结果 LVEF 下降,ErbB4 表达较正常组织还略高,当心功能出现严重失代偿时,ErbB4 表达出现降低的表现,其具体机制猜测可能与机体的代偿功能有关,有待进一步研究。心力衰竭早期心室肌 neuregulin/ErbB 的激活可能为对心肌组织整体、生长、抗衡肾上腺素能过度激活的适应性变化,但在泵衰竭过程中增加对肾上腺素能系统的代偿反应的适应性变化,随着心衰进展该信号表达明显受到抑制[15]。

扩张型心肌病的发展伴随着 ErbB4 蛋白增高,并伴随着病程延长而出现的下调,使我们对该病有了更全面的理解,使用外源性 neuregulin-1β 后能使 ErbB4 表达上调并明显改善大鼠心功能,减少心肌细胞凋亡,预示着可以通过增强 neuregulin/ErbB 减少阿霉素的心脏毒性,有可能作为治疗扩张型心肌病一个新的方向。

参考文献:

[1] Fuller S J, Sivarajah K, Sugden P H. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium [J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44(5): 831-854.

[2] Pentassuglia L, Timolati F, Seifriz F, *et al*. Inhibition of ErbB2/neuregulin signaling augments paclitaxel-induced cardiotoxicity in adult ventricular myocytes [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(8): 1588-1601.

[3] 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.

[4] 刘启亮,宋耀明,刘超. 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[J]. 第三军医大学学报,2009,31(24):2448-2451.

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

[6] 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.

[7] 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.

[8] Russell K S, Stern D F, Polverini P J, *et al*. Neuregulin activation of ErbB receptors in vascular endothelium leads to angiogenesis[J]. Am J Physiol, 1999, 277(6 Pt 2): H2205-H2211.

[9] 彭健豪,张连峰. ErbBs 受体在心脏发育和心肌病中的作用[J]. 中国比较医学杂志,2006, 16(6): 376-378.

[10] 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.

[11] 李江, 顾兴华, 段嘉川, 等. 重组人 Neureguline 对快速起搏所致猴心衰心肌收缩能力的影响及其机制研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2007, 38(1): 105-108.

[12] 李江, 陈又南, 段嘉川, 等. ErbB 信号与蛋白激酶 B 在快速起搏所致猴心衰心肌细胞损伤中的作用[J]. 药学学报, 2007, 42(5): 470-474.

[13] 刘超, 宋耀明, 何作云. Neuregulin-1/ErbBs 信号系统与慢性心力衰竭的研究进展[J]. 中国微循环, 2009, 13(2): 138-140.

[14] Kelly H, Kimmick G, Dees E C, *et al*. Response and cardiac toxicity of trastuzumab given in conjunction with weekly Paclitaxel after doxorubicin/cyclophosphamide[J]. Clin Breast Cancer, 2006,7(3): 237-243.

[15] Cote G M, Miller T A, Lebrasseur N K, *et al*. Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes *in vitro*[J]. Exp Cell Res, 2005, 311(1): 135-146.

(**收稿**:2009-11-05;**修回**:2009-11-26)

(编辑 王 红)