维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)02-0181-04

氧化应激对心衰大鼠心肌细胞凋亡的影响及卡维地洛的干预作用

胡咏梅[1], 李法琦[2], 余江恒[2]

(1.成都市第二人民医院心内科,成都 610017;2.重庆医科大学临床学院内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究氧化应激对心衰心肌细胞凋亡的影响及卡维地洛的疗效。方法:构建心衰大鼠模型,随机分为心衰组,卡维地洛组。药物干预4周,测心功能指标、氧化代谢指标、心肌细胞凋亡率(AI)。结果:心衰氧化应激与AI相关,AI与心功能恶化和度平行并与左心室质量指数(LVMI)有关,(P均<0.05);卡维地洛改善心功能,纠正氧化失恒,降低LVMI、右心室质量指数(RVMI),AI下降(P均<0.05)。结论:氧化应激促进心肌细胞凋亡,细胞凋亡参与心室重构并提示心衰预后。卡维地洛改善心功能,机制可能与其抗氧化应激,抗细胞凋亡,逆转心室重构有关。

【关键词】氧化应激;心室重构;细胞凋亡;卡维地洛

【中国图书分类法分类号】R541.4;R329.24 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-03-26

The influence of oxygen stress on cardiac apoptosis in heart failure rats and the interference of carvedilol

HU Yongmei, et al

(*Department of Cardiology, the Second People's Hospital of Chendu*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of oxygen stress on the level of cardiac apoptosis index(AI) in chronic congestive heart failure rats, and to intervene with the third-generation blocker-carvedilol to elucidate its mechanism. *Methods*: 8 weeks after partially banding abdominal aortic artery, 20 Wister rats were randomly assigned into two groups: ①heart failure group($n=10$); ②carvedilol group($n=10$). Meanwhile, sham-operated rats($n=10$) were established as a control group. After 4 weeks of remedy, hemodynamic parameters, ventricular mass index(LVMI and RVMI), oxygen stress including superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), and myocardiac apoptosis were studied. *Results*: ①Compared with sham-operated rats, all the hemodynamics were deteriorated, and LVMI and RVMI were increased significantly ($P<0.01\sim0.05$). Plasma MDA was on rise while SOD decreased ($P<0.01$), and cardiac apoptosis index was risen to 48.89% in heart failure rats ($P<0.001$). ②LVMI was positively related to the index of apoptosis, $r=0.767$ ($P<0.01$). In addition, myocardial apoptosis level was positively associated with plasma MDA but negatively with SOD activity, $r=0.701$, -0.636 ($P<0.05$), respectively. Apoptosis was paralleled with worsening heart function ($P<0.001\sim0.05$). ③After carvedilol therapy, LVMI and RVMI decreased and SOD and MDA improved($P<0.01\sim0.05$). Heart function was also ameliorated, including systolic and diastolic function($P<0.01\sim0.05$). Moreover, cardiac apoptosis decreased significantly($P<0.01$). *Conclusion*: Oxygen stress may be critical for activation of cardiac apoptosis in the over-loaded heart. Apoptosis involves in ventricular remodeling, predicting the prognosis of heart failure. Carvedilol can ameliorate heart function, whose mechanism may be in its improvement of oxygen stress, and inhibition of cardiac apoptosis and reversion of ventricular remodeling.

【Key words】Oxygen stress; Ventricular remodeling; Apoptosis; Carvedilol

近年的研究表明,慢性心力衰竭(Chronic heart failure, CHF)心肌细胞的死亡不但有坏死,还有凋亡的参与[1]。细胞凋亡导致心肌实质细胞流失、心室及血管重构和心功能下降等改变最终诱发心衰[2]。心衰时由于Ca^{2+}分布改变,线粒体功能障碍,大量的超氧阴离子、过氧化氢等氧化应激产物增加[3],参与心衰的诸多病理生理改变。本实验应用腹主动脉缩窄术造成后负荷增高型心力衰竭大鼠模型,研究心衰氧化应激对心肌细胞凋亡的影响,并用

作者介绍:胡咏梅(1970-),女,硕士,主治医生,
主要研究方向:临床冠心病、心力衰竭研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

具有抗氧化作用的第三代 β-受体阻滞剂卡维地洛干预,以期探明卡维地洛对心衰细胞凋亡、心室重构及心功能的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

健康 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 200~220g,10% 乌拉坦(0.7g/kg)腹腔麻醉,左上腹切口,暴露腹主动脉,在双肾动脉上方 0.5cm 处缩窄腹主动脉。假手术组仅分离腹主动脉。术后 8 周,手术组出现呼吸急促,进食量减少,少动,血液动力学检测左室舒张末期压力(LVEDP)≥15mmHg 判断心衰模型成功[4]。手术大鼠随机分为心衰组、卡维地洛组。卡维地洛(北京巨能制药有限责任公司,批号 000302)3.5mg/(kg·d)起步,每周递增药量 1 倍,最后达 28mg/(kg·d),疗程 4 周。

1.2 血液动力学检测

乌拉坦麻醉,导管内充满肝素,右颈总动脉逆行插管至左心室,另一端连接压力换能器多导生物信号记录仪,记录左室收缩压(LVSP)、LVEDP、左室峰压上升、下降最大速率(±dp/dt)、心率(HR)、外周平均动脉压(MBP)。

1.3 外周血 SOD、MDA 含量测定

取大鼠外周血 3ml,离心得血清,SOD-I 放免试剂盒(PR 法)测定 SOD 活性,硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量。

1.4 心室质量指数检测

将麻醉大鼠迅速开胸取出心脏,冰生理盐水洗净,滤纸吸干,沿房间沟剪掉两心房,紧贴室间隔分离左右心室,分别称重。左、右心室质量除以体重及左、右心室质量指数(LVMI、RVMI)。

1.5 心肌细胞凋亡检测

用改良的 TUNEL 法[1]原位标记心肌凋亡细胞核中的脱氧核糖核苷酸片段 3'-OH 末端显示心肌凋亡细胞的存在。正常细胞核呈蓝色,而凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。半定量分析:在光镜下计数 5 个高倍视野中凋亡阳性心肌细胞核数目及其占总细胞核数目的比例,求其均值得细胞凋亡阳性指数 AI。(TUNEL 试剂盒购自 POD 公司)

1.6 统计学处理

计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较用 q 检验,双变量关系分析用直线回归分析。

2 结 果

2.1 血液动力学检测

心衰组血流动力学指标较假手术组明显恶化($P<0.01\sim0.05$);卡维地洛治疗后平均动脉压下降,心功能指标改善($P<0.01,0.05$)。见表 1。

2.2 心室质量指数

心衰组 LVMI、RVMI 分别较假手术组升高 19.8% 和 40.7%($P<0.01\sim0.05$);卡维地洛组 LVMI 和 RVMI 较心衰组分别下降 15.8%,26.3%($P<0.01\sim0.05$)。3 组间体重无差异($P>0.05$)。见表 2。

表 1 各组血液动力学指标的比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

指标	假手术组	心衰组	卡维地洛组
HR(beat/min)	463.95±33.15	384.69±35.80*	359.31±104.98*
MBP(mmHg)	110.52±8.82	93.18±8.29**	81.57±7.88**▲
LVSP(mmHg)	139.25±6.57	119.13±12.40**	129.64±7.67▲
LVEDP(mmHg)	4.66±1.68	20.95±10.34**	5.16±1.23▲▲
+dp/dt(mmHg/s)	6554.42±376.57	4876.31±718.24**	5900.88±782.30▲
-dp/dt(mmHg/s)	4382.31±210.30	2979.32±399.74**	4035.62±681.25▲

注:与假手术组相比,*$P<0.05$,**$P<0.01$;与心衰组比较,▲$P<0.05$,▲▲$P<0.01$;

表 2 各组心室质量指数的比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

指标	假手术组	心衰组	卡维地洛组
weitht(g)	275.70±20.73	260.36±28.55	262.94±16.59
LVMI(mg/g)	2.27±0.13	2.72±0.14**	2.29±0.16▲▲
RVMI(mg/g)	0.54±0.04	0.76±0.15*	0.56±0.08▲

注:与假手术组相比,*$P<0.05$,**$P<0.01$;与心衰组比较,▲$P<0.05$,▲▲$P<0.01$

表 3 各组血清 SOD 和 MDA 的比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

指标	假手术组	心衰组	卡维地洛组
SOD(ng/ml)	6.02±2.13	2.19±1.11**	5.65±1.36▲▲
MDA(nmol/ml)	20.56±6.46	37.2±11.09**	23.53±5.40▲

注:与假手术组相比,**$P<0.01$;与心衰组比较,▲$P<0.05$,▲▲$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 外周血 SOD、MDA 测定

心衰组 SOD 活性下降，MDA 含量升高（$P<0.01$）。卡维地洛组 SOD、MDA 水平与假手术组比较无明显差异（$P>0.05$）。见表 3。

2.4 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

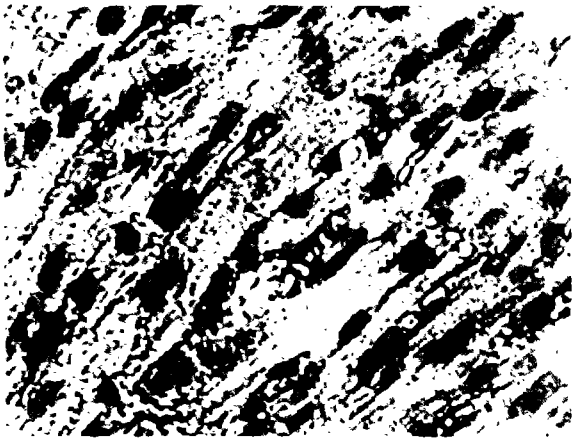


图 1 假手术组

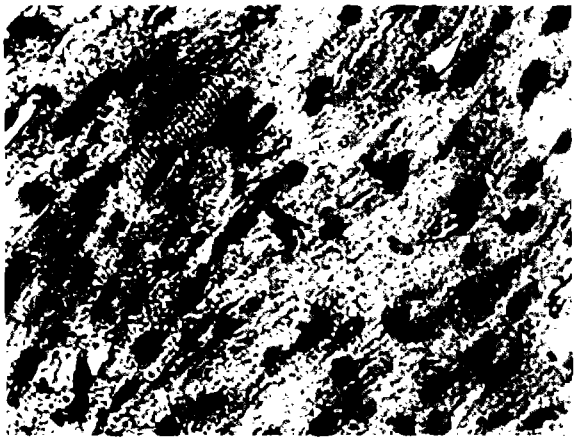


图 2 心衰组

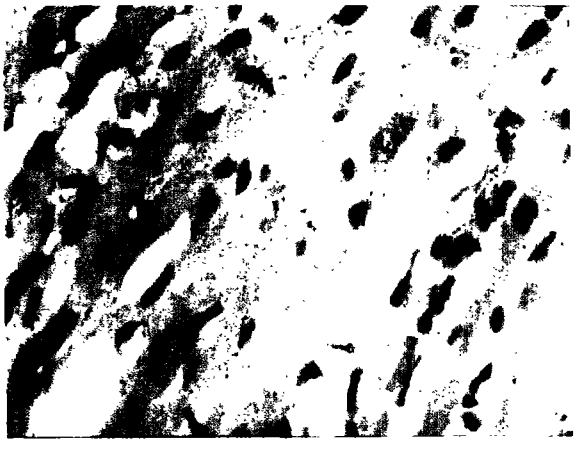


图 3 卡维地洛组心肌细胞凋亡

假手术组和心衰组 AI 分别为 1.87%，48.89%，两组间比较有非常显著的统计学差异（$P<0.001$）。卡维地洛降低心肌细胞凋亡率（$P<0.01$）。见照片 1、2、3。

2.5 心肌细胞凋亡与 LVMI、心功能的关系

心衰组细胞凋亡和 LVMI 呈显著正相关，$r=0.767$（$P<0.01$）。心肌细胞凋亡率与心功能恶化程度平行，（$P<0.001\sim0.01$）。见表 4。

表 4 心衰组 AI 与心功能指标相关性

	LVSP	LVEDP	$+dp/dt_{max}$	$-dp/dt_{max}$
r value	−0.924	0.872	−0.780	−0.919
P	<0.001	<0.001	<0.01	<0.01

2.6 SOD 和 MDA 与心肌细胞凋亡的关系

心衰组细胞凋亡与血清 SOD 呈明显负相关 $r=-0.636$（$P<0.05$），而与 MDA 呈正相关 $r=0.701$（$P<0.05$）。

3 讨 论

细胞凋亡广泛地存在于心肌病、缺血再灌注、器官移植排斥及心衰等病理生理过程[2]，其调节机制仍在深入研究中，各种抗细胞凋亡药物一直是人们关注的热点。本文选择后负荷增型心力衰竭动物模型进行研究，结果显示：CHF 存在明显的氧化应激状态，氧自由基代谢障碍是心肌细胞凋亡的重要促发因素，细胞凋亡参与心室重构，是心功能远期预后的预报因子。

慢性后负荷过度型心力衰竭时，由于组织细胞缺血缺氧，能量代谢紊乱，细胞内 Ca^{2+} 超负荷，体内酶活性改变，通过黄嘌呤氧化酶、中性粒细胞呼吸爆发等途径产生大量的氧自由基，同时体内抗氧化酶活性下降，机体处于氧化应激状态。研究用 SOD（体内主要清除氧自由基的酶）和 MDA（脂质过氧化物的降解产物）来反映心衰氧化应激水平，发现二者与心肌细胞凋亡密切相关 $r=-0.636, 0.701$（$P<0.05$）。氧化应激可以直接或通过刺激 Fas 抗原 mRNA 和其它多种细胞凋亡相关基因（如 c-myc、c-fos、hsp70、p53 和 WAF 等基因）的表达诱导心肌细胞凋亡增加[5,6]。晚近发现 Shc 家族在氧化应激促凋亡作用中有重要影响，尤其是 $p66^{shc}$，在细胞水平调节氧化应激。心衰时 $p66^{shc}$ 表达上调，氧化损伤蛋白-硝基酪氨酸增多，加强反应活性氧（ROS）对脂质、蛋白质及 DNA 的损伤，内源性核酶裂解 DNA 产生 180-200bp 的碱基片段[7]。同时实验显示，心衰心肌细胞凋亡水平影响左心室质量指数 r

维普资讯 http://www.cqvip.com

=0.767($P<0.01$),并与心功能恶化程度相平行($P<0.001$,0.01)。提示各种抗氧化应激治疗,通过抑制细胞凋亡,逆转心室肥厚,可以改善心功能预后。

实验对心衰人鼠应用为期 4 周的药物干预,卡维地洛能抑制氧化应激,表现为 SOD 活性增加,而 MDA 含量降低,LVMI 和 RVMI 均有所下降,同时衰竭心肌细胞凋亡率下调,心脏功能也得以改善($P<0.01\sim0.05$)。本研究提出卡维地洛改善心功能的机制可能为:①心衰血液动力学的改善,包括收缩和舒张功能的改善;②神经-内分泌拮抗效应;③逆转心室肥厚,防治心室重构;④抑制心衰体内氧化应激;⑤抗心肌细胞凋亡。第三代 β-肾上腺素能受体阻滞剂卡维地洛对 β_1、β_2 及 α-受体均具有阻滞作用,此外还有强大的抗氧化效应[8]。作为神经-内分泌拮抗剂,卡维地洛减少儿茶酚胺、血管紧张素Ⅱ等对细胞的毒性作用,但其对细胞凋亡的影响及其机制还需进一步研究。卡维地洛强大的抗氧化作用,促进氧自由基的清除,降低氧化应激直接介导的负性肌力作用,并减少对金属蛋白酶-2 和 caspase 上游的激活,卡维地洛可以"稳定"线粒体膜减少细胞色素 c 的释放,从而使凋亡的发生减少[9,10]。此外,卡维地洛阻滞肾上腺素能受体($\beta_{1,2}$和 α),拮抗儿茶酚胺、血管紧张素Ⅱ、内皮素等神经多肽的释放,使某些细胞因子如 TNF-α、sTNF-R1 分泌减少,也有利于细胞凋亡的降低[9]。

综上所述,心肌细胞凋亡在心衰发生、发展中有重要作用,氧化应激是细胞凋亡的促进因素,具有抗氧化机制的卡维地洛在临床有广泛的应用前景。

参 考 文 献

[1] 李法琦,陈运贞.自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡的变化及其变化[J].中华心血管病杂志,1999;27:459-463.

[2] 李法琦.细胞凋亡在心血管疾病中的研究现状[J].重庆医科大学学报,1999;24:103-105.

[3] de T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium[J]. Circ Res, 2000;86:152-157.

[4] Tonnessen T, Christensen G, Qie E, et al. Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats[J]. Cardiovasc Res, 1997;33:601-610.

[5] Li Z, Bing OH, Long X, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertension rat[J]. Am J Physiol, 1997;272 (5 Pt 2): H2312-H2319.

[6] Hare JM. Oxidative Stress and apoptosis in Heart Failure Progression[J]. Circ Res, 2001;89:198-200.

[7] Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, et al. Oxidative Stress-Mediated Cardiac Cell Death Is a Major Determinant of Ventricular Dysfunction and Failure in Dog Dilated Cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2001;89:279-286.

[8] Dandona P, Karne R, Ghanim H, et al. Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids[J]. Circulation, 2000;101:122-124.

[9] Rossig L, Haendeler JH, Mallat Z, et al. Congestive Heart Failure Induces Endothelial Cell Apoptosis: Protective Role of carvedilol[J]. J Am Coll Cardiol, 2000;36:2081-2089.

[10] Sia YT, Lapointe N, Parker TG, et al. Beneficial effects of Long-Term of the Antioxidant probucol in Heart Failure in the Rat[J]. Circulation, 2002;105:2549-2555.