DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.012
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)14-1255-03

论著

肝细胞生长因子对兔心肌梗死后心肌细胞的影响

宋明宝,黄 岚,李爱民,蒋世忠,张 坡,于世勇,晋 军,赵 刚,武晓静 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨外源性肝细胞生长因子对心肌梗死后心肌细胞的影响。方法 36只新西兰兔随机分为3组:假手术组、对照组和干预组。结扎左冠状动脉前降支复制急性心肌梗死模型。干预组静脉注射给予肝细胞生长因子2 mg·kg^{-1}·12 h^{-1},48 h后测心功能,梗死区/缺血区质量比代表梗死范围。TUNEL法染色检测细胞凋亡,确定心肌细胞凋亡指数。Western blot法测定凋亡蛋白bcl-2、ERK1及pERK1的表达。结果 ①干预组心肌梗死范围显著小于对照组($P<0.01$)左室功能得以改善;②干预组心肌细胞凋亡指数显著低于对照组($P<0.05$);③干预组梗死心肌周围bcl-2表达显著高于对照组($P<0.05$);④实验组ERK1的表达不明显,但pERK1的表达显著升高。结论 外源性肝细胞生长因子能显著减少急性心肌梗死后的梗死范围、抑制心肌细胞凋亡及改善左室功能,作用途径可能与促进抗凋亡蛋白bcl-2表达有关。ERK1/2磷酸化可能作为外源性肝细胞生长因子的信号通路参与了心肌保护作用。

关键词:肝细胞生长因子;ERK;心功能;心肌梗死;凋亡;兔
中图法分类号:R322.11;R542.22;R973.2 文献标识码:A

Effects of hepatocyte growth factor on cardiomyocytes in AMI rabbits

SONG Ming-bao, HUANG Lan, LI Ai-min, JIANG Shi-zhong, ZHANG Po, YU Shi-yong, JIN Jun, ZHAO Gang, WU Xiao-jing (Cardiovascular Disease Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effects of exogenous hepatocyte growth factor (HGF) on cardiomyocytes in acute myocardial infarction (AMI) rabbits. **Methods** Rabbit model of ligated proximal left anterior descending coronary artery (LAD) was used. Thirty-six rabbits were randomly divided into three groups: sham-operation (SO), control (CG) and intervention (IG) groups. The animals in sham-operation and control groups were intravenously infused with normal saline, but those in the intervention group were intravenously administered with HGF (2 mg·kg^{-1}·h^{-1}). At 48 h after ligated LAD, the hemodynamic studies were performed in each group, and ischemic area and the infarct size were also measured. Cell apoptosis was detected by TUNEL straining, and the expressions of bcl-2, ERK1 and pERK1 proteins were analyzed by Western blotting. **Results** ① The infarct size in the intervention group was significantly smaller than that in the control group ($P=0.002$), and the left ventricular function was improved. ② The myocardial apoptotic index in the intervention group was significantly lower than that in the control group ($P=0.02$). ③ The expression of bcl-2 proteins in the intervention group was significantly higher than that in the control group. Exogenous HGF could promote the expression of bcl-2 proteins. No significant difference in the expression of ERK1 was not found between the groups, but the expression of pERK1 in the intervention group increased significantly as compared with that in the control group. **Conclusion** Exogenous HGF can decrease infarct area, inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve left ventricular function. The mechanism may probably be associated with the promotion of the expression of antiapoptotic bcl-2 proteins. As one of signal transduction pathways, phosphorylation of ERK1 is associated with the HGF cardioprotection.

Key words: hepatocyte growth factor; apoptosis; acute myocardial infarction; ERK; rabbit

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是间质细胞衍生的一种促细胞有丝分裂的多功能因子,它具有调节细胞生长和运动,促进多种细胞组织形态的发生,在胚胎生长、组织形成、肝肾脏再生、肿瘤转移及损伤修复中起着重要作用[1]。近来研究显示,它还是一种心肌保护因子,但其心肌保护作用的机制目前还不十分清楚。细胞外信号调节酶作为一个重要的细胞内信号传导酶超家族-丝裂素原激活的蛋白激酶

作者简介:宋明宝(1973-),男,山东省泰安市人,硕士,医师,主要从事冠心病的防治方面的研究。电话:(023)66799986
通信作者:黄 岚,电话:(023)68755601
收稿日期:2003-09-25;修回日期:2003-11-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)的成员酶,是一个与细胞生长、增殖、分化甚至保护机制有关的重要信号分子[2]。本研究采用兔急性心肌梗死动物模型以探讨 ERK 在 HGF 心肌保护中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型

新西兰兔(第三军医大学实验动物中心提供)36只,雌雄不分,平均体质量(2.02±0.62) kg,经速眠新 0.2 ml/kg 肌肉注射麻醉后,左冠状动脉前降支结扎术或假手术,于前降支中点处用3-0丝线结扎之,记录心电图,若有 ST 段显著弓背向上示手术成功。假手术组只在同样部位穿一 3-0 丝线,但不结扎。

1.2 实验分组及给药方法

将 36 只兔分成 3 组,每组 12 只:对照组(CG)、假手术(SO)、干预组(IG)。各组中用以心肌梗死范围和细胞凋亡检测的心脏各半。干预组在手术后即刻给予肝细胞生长因子(购于北京邦定公司)2 mg/kg 静脉注射,其余2组给于生理盐水 2 ml/kg,以后每 12 h 1 次。

1.3 组织学检测

1.3.1 心肌细胞凋亡测定 术后 48 h 处死兔,取出心脏,剪去心房及右心室,用 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定 2 h,20%多聚甲醛蔗糖液 4 ℃过夜,在冠脉结扎点下 5 mm 处横切左室,常规脱水、蜡块包埋。取连续切片依次作 HE 染色及 TUNEL 染色。细胞核中有紫蓝色颗粒者为阳性细胞即凋亡细胞。在高倍镜(× 400)以心肌凋亡阳性细胞数占总心肌细胞数的千分比作为心肌细胞凋亡指数。

1.3.2 Westem blot 检测心肌细胞 Bcl-2、ERK1 及 pERK1 蛋白的表达 取缺血区组织,用 PBS 缓冲液洗净后,在凝胶加样缓冲液(含苯甲酰磺酰氟)中用超声波处理仪匀浆组织,提取蛋白,将提取的蛋白用 12%的 SDS 聚丙烯酰胺按常规方法电泳后将电泳凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,用封闭液封闭后,分别加入小鼠抗人 bcl-2 单克隆抗体、ERK1、p-ERK1 单克隆抗体(购于 Santa Cruz 美国)检测 bcl-2、ERK1 及 pERK1 蛋白的表达,加入二抗、DAB 显色后。将滤膜用光密度扫描仪输入电脑进行分析,蛋白区带用积分灰度值表示。

1.4 心肌梗死范围测定[3]

48 h 后静脉注射 1%伊文斯蓝 3 ml,区分心脏的缺血和非缺血区。立即取出心脏,剪下左室称体质。每隔 2 mm 将心肌切成横片,剪下缺血区,放入 0.1%N-BT 磷酸盐缓冲液(pH= 7.4)37 ℃水浴 20 min,梗死心肌细胞中脱氢酶因细胞膜损伤而完全释放丢失,不能使 N-BT 还原染色,梗死心肌不被染色,损伤残存心肌尚存在部分脱氢酶可象正常心肌被染色为蓝色。剪下梗死心肌,余下部分为存活心肌,称体质。以缺血心肌/左室质量比代替缺血范围,以梗死心肌/缺血心肌质量比为梗死范围。

1.5 心功能测定

术后 48 h 再次开胸,分离出降主动脉,4 mm 电磁流量计探头测每分钟心输出量,于左心室未梗死部位插入 9F 针头,后接 5F 心导管,8 导生理仪(RM-6000 型,日本光电公司产)同步测定左室收缩压(LVSP)、左室舒张末期压(LVEDP)、等容收缩期最大瞬间压力升高速率(+ dp/dt_{max}),同时行右颈动脉插管测动脉收缩压(ASP)和动脉舒张压(ADP),记录心率(HR),计算心脏指数(CI)。

1.6 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS10.0 统计软件行单因素方差分析,t 检验。

2 结果

2.1 HGF 对梗死范围和心肌细胞凋亡数的影响

假手术组未见心肌梗死及细胞凋亡,干预组梗死范围显著小于对照组,正常及梗死心肌中心均无凋亡心肌细胞发现,而梗死周围缺血带心肌中有散在的凋亡心肌细胞,干预组心肌细胞凋亡指数显著低于对照组(表 1)。

表 1 HGF 对缺血范围、梗死范围、凋亡指数及 bcl-2 表达的影响($n=6$)

Tab 1 Effects of HGF on ischemic area, infarct area, apoptotic index, and bcl-2-positive cardiomyocytes ($n=6$)

Group	Ischemic area ($\bar{x}\pm s$) %	Infarct area ($\bar{x}\pm s$) %	Apoptotic index ($\bar{x}\pm s$) ‰
CG	29.4±2.16	31.72±6.62	267.67±49.23
IG	28.1±1.34	14.08±4.63**	115.00±34.89*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* CG

2.2 HGF 对心肌梗死后左室功能的影响

心肌梗死后给予肝细胞生长因子治疗,能够明显改善左室功能。干预组 LVSP、+ dp/dt_{max} 明显高于对照组($t=2.72, 3.12$; $P<0.05$);LVEDP 显著低于对照组,但仍显著高于假手术组(表 2)。

表 2 HGF 对心肌梗死后心功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 2 Effects of HGF on cardiac functions after AMI($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

	SO	CG	IG	F	P
HR(bpm)	211±5.02	225±4.08	153±6.36	2.89	>0.05
LVSP (mmHg)	104.84±11.97	68.52±10.50	84.69±10.55**	31.73	<0.01
LVEDP(mmHg)	2.35±0.46	6.74±1.03	4.64±1.28**	67.31	<0.01
+dp/dmax (mmHg/s)	3 525.00±327.00	1 822.67±256.33	2 538.00±700.60**	51.71	<0.01
CI ($ml\cdot min^{-1}\cdot m^{-2}$)	78.82±6.74	64.78±3.29	65.41±4.91	9.57	<0.01

**: $P<0.01$, *vs* CG

2.3 HGF 对 bcl-2、ERK1 及 pERK1 表达的影响

Western blot 检测结果显示:干预组 bcl-2 蛋白的表达显著高于对照组($t=2.54$, $P<0.01$);ERK1 蛋白的表达量在两组之间未见显著性差异($t=0.29$, $P>0.05$);对照组 pERK1 无明显表达,但实验组给予 HGF 干预后 pERK1 表达显著增加,与对照组相比有显著性差异($t=3.62$, $P<0.01$)。见表 3、图 1~3。

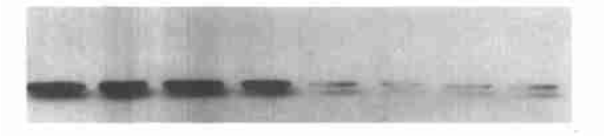
表 3 HGF 对 ERK1、pERK1 及 bcl-2 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of HGF on the expressions of ERK1, pERK1, and bcl-2 ($\bar{x}\pm s$)

Group	Bcl-2	pERK1	ERK1
CG	0.17±0.08	0.26±0.13**	1.79±0.10
IG	1.37±0.14**	1.52±0.12	1.81±0.08

**: $P<0.01$, *vs* CG

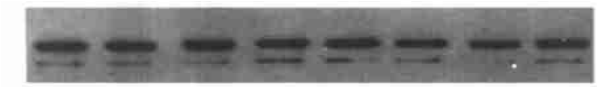
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



Left 4: Intervention group; Right 4: Control group

图 1　Western blot 检测 pERK1 的表达

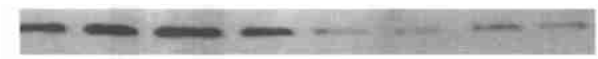
Fig 1　Expression of pERK1 detected by Western blotting



Left 4: Intervention group; Right 4: Control group

图 2　Western blot 检测 ERK1 的表达

Fig 2　Expression of ERK1 detected by Western blotting



Left 4: Intervention group; Right 4: Control group

图 3　Western blot 检测 bcl-2 的表达

Fig 3　Expression of bcl-2 detected by Western blotting

3　讨论

MAPKs 超家族是细胞内重要的信号分子。已发现该家族的成员酶有: ERK, JNK (c-junNH2-terminal kinase)和 P38MAPK(P38 mitogen-activated protein kinase)。迄今关于 MAPK 通路的激活机制及生理病理意义仍未完全清楚。初步发现 ERK 途径与细胞生长、增殖、分化和转化有关; 而 JNK 和 P38MAPK 途径可能与应激、损伤和细胞凋亡有关[2]。用 MEK 抑制剂 PD98059 阻断 ERK1/2 激活, 能加重 H_2O_2 诱导的心肌细胞凋亡。心肌缺血预处理诱导的保护作用也与 ERK1/2 的激活有关[4]。这些研究表明 ERK 对细胞的生存起着关键作用。据文献[5]报道, 心肌营养因子 IGF-1 的保护作用涉及到 ERK1/2 的激活。在离体心脏中 ERK1/2 特异性抑制剂可以阻断 ERK 磷酸化而增加心肌细胞凋亡[4]。因此, HGF 有可能通过相同的信号传导途径发挥作用。

本研究结果显示, HGF 干预后心肌细胞内的 ERK1 表达并没有增加, 而 pERK1 的表达显著高于对照组。因此, 促进 ERK 的磷酸化参与了 HGF 的信号传导。

原癌基因 bcl-2 是目前公认的促进细胞生存抑制细胞凋亡的基因[6], 正常情况下, bcl-2 在心肌中不表达, 在心肌细胞受到缺血损伤时, bcl-2 立即启动, 其基因产物的表达可抑制或逆转细胞凋亡的发生[7]。本研究显示, 给予 HGF 后能够显著增加心肌细胞原癌基因 bcl-2 的表达。因此, 可推测 HGF 是通过促进 bcl-2 的表达来减少心肌细胞凋亡, 从而挽救濒死心肌。

肝细胞生长因子作为一种心肌保护因子, 对心肌梗死后近期梗死范围缩小、心功能的改善有益处, 其详细的作用机制及是否对远期心肌重塑、心功能及生存率有明显影响, 有待深入研究。

参考文献:

[1] Dixon J M. Help from within: cardioprotective properties of hepatocyte growth factor[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(1): 4—6.

[2] Foncea R, Galvez A, Perez V, *et al*. Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(2): 736—744.

[3] Wakiyama H, Cowan D B, Toyoda Y, *et al*. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2002, 21(3): 424—433.

[4] Kitta K, Day R M, Ikeda T, *et al*. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(7): 902—910.

[5] Vogt A M, Htun P, Kluge A, *et al*. Insulin-like growth factor-II delays myocardial infarction in experimental coronary artery occlusion[J]. Cardiovasc Res, 1997, 33(2): 469—477.

[6] Oltvai Z N, Milliman C L, Korseyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74(4): 609—619.

[7] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, *et al*. Opposing effects of ERK and JNK-p38MAP kinases on apoptosis[J]. Scinence, 1995, 270(5240): 1326—1331.

（编辑　陈聪连）

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 位分一节, 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

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net