DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.019
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol.25, No.15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1355-03

论著

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

徐 强,司良毅,赵小兰,王 璋 (第三军医大学附属西南医院老年病科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠心肌缺血再灌注(Ischemia reperfusion, IR)不同时相的心肌细胞凋亡、caspase-3活性变化规律及caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO的影响。方法 Wistar大鼠122只,设立IR组,IR+Ac-DEVD-CHO组和假手术对照组并分设缺血30 min后再灌注1、3、6、12、24 h 5个时相点;以缺口末端标记法(TUNEL)标记凋亡细胞,用荧光分析法检测caspase-3活性,行TTC染色测定心肌梗死范围。结果 心肌细胞凋亡与caspase-3活性随心肌再灌注不同时相而变化,心肌细胞凋亡指数(Apoptosis index, AI)与caspase-3活性于再灌注12 h最高[AI:(34.83±9.35)%;caspase-3活性:(1.34±0.2)],其后基本维持在平台状态;心肌梗死范围随IR时间逐渐增加,至24 h仍未见下降趋势,三者间呈显著正相关($P<0.05$)。IR+Ac-DEVD-CHO组上述指标虽也明显增高,但比IR组明显减小($P<0.05$)。结论 Caspase-3激活及心肌细胞凋亡参与了心肌缺血再灌注损伤过程,Ac-DEVD-CHO减轻心肌缺血再灌注损伤可能部分与其抑制心肌细胞凋亡有关。

关键词:心肌缺血再灌注损伤;caspase-3;凋亡
中图法分类号:R322.1+1;R345.6+9;R654.1 文献标识码:A

Changes of apoptosis and caspase-3 activity and the effects of Ac-DEVD-CHO in cardiomyocytes of rats with myocardial reperfusion injury

XU Qiang, SI Liang-yi, ZHAO Xiao-lan, WANG Zhang (Department of Gerontology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the changes of apoptosis and caspase-3 activity in cardiomyocytes of rats at different time points after transient ischemia and the effects of caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO on reperfusion injury. **Methods** A total of 122 rats were divided randomly into 3 groups: IR group, IR+Ac-DEVD-CHO group and sham group. The ischemic samples were observed at 30 min after ischemia followed by reperfusion at 1, 3, 6, 12 and 24 h. The apoptotic cardiomyocytes, the activity of caspase-3 and the myocardial infarction area were determined by TUNEL method, fluorescent assay and TTC dyeing method, respectively. **Results** Apoptosis index (AI) of cardiomyocyte and caspase-3 activity changed in a time-dependent manner. Highest AI and caspase-3 were found after reperfusion at 12 h. The myocardial infarction area in group IR kept increasing during the period of reperfusion. AI and caspase-3 activity were positively correlated with the myocardial infarction area ($P<0.05$). In IR+Ac-DEVD-CHO group, all indexes increased after IR but were significantly lower than those in group IR ($P<0.05$). **Conclusion** Apoptosis and activation of caspase-3 may be involved in the process of myocardial ischemia/reperfusion injury. Ac-DEVD-CHO is effective in attenuating myocardial reperfusion injury, which partially attributes to the inhibition of cardiomyocyte apoptosis.

Key words: myocardial reperfusion injury; apoptosis; caspase-3

心肌缺血再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury, IRI)所致的心肌细胞死亡以往认为是坏死,近来研究提示尚有凋亡参与IRI的形成[1,2]。凋亡发生是一个复杂的,由蛋白酶介导的级联反应过程,天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)是参与调节和执行凋亡最重要的蛋白酶之一,抑制其活性可以减少凋亡发生[3]。Caspase-3激活是IRI形成和发展的重要因素[1,4]。再灌注期间开始给予caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO能否减少心肌细胞凋亡及心肌梗死范围目前还不清楚。本实验应用大鼠IRI模型,观察IRI时心肌细胞凋亡和caspase-3活性变化规律及与IRI的关系,从细胞水平探讨心肌IRI的发生机制并观察caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO对IRI的保护效果。

作者简介:徐 强(1971-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事心肌缺血再灌注损伤的基础与临床方面的研究。电话:(023)65460834

收稿日期:2003-01-06;修回日期:2003-06-04

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

1 材料与方法

1.1 实验动物模型制备及分组

Wistar大鼠122只，体质量250~300 g，雌雄不拘，随机分设缺血再灌注(IR)组，IR后Ac-DEVD-CHO治疗组和假手术对照(Sham)组；IR组和IR+Ac-DEVD-CHO组均先缺血30 min，然后设再灌注1、3、6、12和24 h共5个时相点；Sham组只设12 h 1个时相点作总体对照。每组各6只大鼠，心肌IRI模型参照方喜业[5]方法加以改进，以收紧结扎线后心电图Ⅰ或左前胸导联融合的ST-T抬高，放松后抬高的ST-T下降1/2以上为模型成功。治疗组于再灌注开始时通过尾静脉注射Ac-DEVD-CHO 3.0 mg/kg。Sham组只埋线不结扎。于各相应时相点活杀动物取心脏缺血区心肌待测。另用50只大鼠按以上分组，每组5只，测定心肌梗死范围。

1.2 心肌组织caspase-3活性测定

取心肌组织100 mg匀浆、离心，样本蛋白0.5 ml，加入caspase-3检测试剂盒(试剂购自Clontech公司)中DTT和2×反应缓冲液的混合液(1 mol/L DTT 10 μl，2×反应缓冲液1 ml)50 μl，再加1 mmol caspase-3底物DEVD-AFC5 μl，37 ℃孵育60 min，以激发光波长400 nm，发射光波长505 nm测定caspase-3孵育前后荧光单位。按试剂盒说明绘制标准曲线，测得其斜率为133(Δ荧光单位/Δ μmol/L AFC)，并通过公式计算其活性。

1.3 凋亡细胞原位标记与凋亡指数(AI)计算

心肌组织常规石蜡包埋，每一标本取3个不同部位的切片各一张，采用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT酶)介导的带荧光的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)标记凋亡细胞核中DNA3′-OH末端(试剂盒购自Roche公司)。在10×20倍的光镜下观察心肌细胞凋亡情况，正常心肌细胞核呈蓝色；凋亡心肌细胞核呈深浅不一的棕褐色，核膜、胞膜完整。每张切片在缺血区取5个视野，每个视野计数300个心肌细胞中阳性细胞数，以平均计算阳性细胞数所占的百分比作为AI。

1.4 心肌梗死范围测定

实验结束前结扎左冠脉，1%伊文思蓝注入左室内，取出心脏，PBS冲洗，冰冻后将其横断面切成1 mm的切片，1%TTC染色10 min。测定伊文思蓝未染区心肌组织质量，代表心肌缺血危险区质量；同时测定TTC未染区心肌组织质量，代表梗死区质量。以梗死区心肌与心肌缺血危险区心肌质量的百分比表示梗死范围。

1.5 统计学方法

数据资料以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS/pc+软件作统计学处理，两组资料用t检验，两变量间关系用直线相关分析。

2 结果

2.1 IR时心肌细胞caspase-3活性变化及Ac-DEVD-CHO的影响

IR组和IR+Ac-DEVD-CHO组在心肌IR 1 h时caspase-3活性升高，IR 12 h达到高峰，至IR 24 h仍然维持较高活性水平。与假手术组比较差异显著($P<0.05$，$P<0.01$)；虽然IR+Ac-DEVD-CHO组的caspase-3活性IR后也有增加，但较IR组显著减小，两组间各相应时相点比较差异显著($P<0.05$，$P<0.01$)，见表1。

表1 IR时心肌细胞caspase-3酶活性变化及Ac-DEVD-CHO的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of caspase-3 activity after myocardial ischemia reperfusion and effects of Ac-DEVD-CHO($\bar{x}\pm s$)

Time point	n	IR	IR+Ac-DEVD-CHO
Sham	6	0.19±0.06	0.19±0.06
IR 1 h	6	0.43±0.08 *	0.25±0.06 *▲
IR 3 h	6	0.64±0.12 **	0.34±0.09 *▲▲
IR 6 h	6	0.86±0.14 **	0.43±0.11 **▲▲
IR 12 h	6	1.34±0.27 **	0.40±0.09 **▲▲
IR 24 h	6	1.26±0.23 **	0.33±0.06 **▲▲

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* sham group；▲：$P<0.05$，▲▲：$P<0.01$ *vs* IR group

2.2 IR时心肌细胞凋亡指数变化规律及Ac-DEVD-CHO的影响

IR组和IR+Ac-DEVD-CHO组在心肌IR 1 h时出现凋亡的心肌细胞，并逐渐增多，AI在IR 12 h达到高峰，至IR 24 h仍然维持较高水平。与假手术组比较，$P<0.05$；虽然IR+Ac-DEVD-CHO组的AI也有增加，但较IR组显著减小，两组间各相应时相点比较，$P<0.05$~0.01，见图1、2。



图1 再灌注12 h，心肌细胞凋亡达到高峰 (TUNEL×400)

Fig 1 Cardiomyocyte apoptosis reaches the highest point at 12 h after reperfusion (TUNEL×400)



图2 再灌注12 h，Ac-DEVD-CHO显著减少心肌细胞凋亡 (TUNEL×400)

Fig 2 Cardiomyocyte apoptosis is reduced by Ac-DEVD-CHO at 12 h after reperfusion (TUNEL×400)

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

2.3　IR 时心肌梗死范围变化及 Ac-DEVD-CHO 的影响

IR 组和 IR+Ac-DEVD-CHO 组心肌梗死范围随再灌注时间延长而逐渐增加, 至 24 h 仍未见下降趋势。除再灌注 1 h 之外, IR+Ac-DEVD-CHO 组梗死范围较 IR 组明显较少, 各相应时相点比较, 均有显著差异($P<0.05$), 见表 2。

表 2　IR 时心肌梗死变化及 Ac-DEVD-CHO 的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of myocardial infarction after myocardial ischemia reperfusion and effects of Ac-DEVD-CHO($\bar{x}\pm s$)

Time point	n	IR	IR+Ac-DEVD-CHO
IR 1 h	5	8.52±1.95	7.84±2.01
IR 3 h	5	22.12±4.62	18.34±3.07▲
IR 6 h	5	34.67±4.94	27.70±5.17▲
IR 12 h	5	42.89±5.70	35.88±5.37▲
IR 24 h	5	49.88±6.95	39.25±6.67▲▲

▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* IR group

2.4　各指标间的相关分析

IR 时, 心肌细胞 AI 与 caspase-3 活性变化之间呈显著正相关($r=0.8942$, $P<0.05$); 心肌梗死范围与心肌 AI 的变化之间呈显著正相关($r=0.8673$, $P<0.05$); caspase-3 活性与心肌梗死范围变化之间呈显著正相关($r=0.8017$, $P<0.05$)。

3　讨论

凋亡是在基因控制和酶促反应下按一定程序进行的细胞的自主死亡方式, 它常在有害信号的温和刺激下或个体发育过程中发生[6]。Caspase-3 是凋亡发生过程中所需要的一种重要的蛋白酶, 同时也是凋亡发生的标志酶[7]。本实验显示: 再灌注 1 h 缺血区心肌出现 caspase-3 活性增高和 TUNEL 阳性心肌细胞, 而且随再灌注时间的延长持续增加, 提示心肌 IR 后缺血区心肌细胞出现凋亡。心肌梗死范围与心肌 AI 变化呈显著正相关, 说明凋亡参与了心肌 IRI, 凋亡和坏死是构成心肌 IR 后细胞死亡的基本形式。近来研究显示心肌 IR 早期小血管内皮细胞首先出现凋亡, 凋亡的内皮细胞可能释放一些可溶性凋亡诱导物质导致心肌细胞凋亡, 促进心肌梗死范围的扩大[8]。

近年已有不少通过抑制凋亡来减轻心肌 IRI 的报道[9,10]。本实验在大鼠心肌 IR 的各时相点, 用 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 干预, 发现其心肌梗死范围、心肌细胞 AI、caspase-3 活性均减小。其机制是缺血区域存活的心肌细胞因缺血程度较轻但仍受到氧自由基及细胞钙超载的持续作用后启动凋亡的信号传导[11], 并通过膜表面死亡受体途径和线粒体途径, 使在正常细胞中以无活性的酶原形式存在的 caspase-3 被上游的 caspase 水解激活, 激活后的 caspase-3 可裂解其底物导致细胞凋亡。Ac-DEVD-CHO 正是通过抑制 caspase-3 活性而部分阻断了凋亡的发生, 从而减少心肌梗死范围。

心肌细胞凋亡及 caspase-3 激活在 IRI 中有重要的病理生理意义。提示通过抑制 caspase-3 的激活干预凋亡发生可能会成为有效防治心肌 IRI 的新策略。

参考文献:

[1] Black S C, Huang J Q, Rezaiefar P, *et al*. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after *in vivo* myocardial ischemia and reperfusion in the rat[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(4): 733-742.

[2] 吴　强, 李隆贵, 耿昭华. 心梗肌梗死后心衰大鼠心肌细胞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.

[3] Nunez G, Benedict M A, Hu Y, *et al*. Caspases: the protease of the apoptotic pathway[J]. Oncogene, 1998, 17(25): 3237-3245.

[4] Weiland U, Haendeler J, Ihling C, *et al*. Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis *via* a caspase-3 dependent pathway[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 671-678.

[5] 方喜业. 医学实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 291-295.

[6] Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, necrosis: an overview of cell death[J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 3-15.

[7] Higuchi M, Aggarwal B B, Yeh E T. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function[J]. J Clin Invest, 1997, 99(7): 1751-1758.

[8] Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, *et al*. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury[J]. Circulation, 2001, 104(3): 253-256.

[9] Mizoguchi K, Maeta H, Yamamoto A, *et al*. Amelioration of myocardial global ischemia/reperfusion injury with volume-regulatory chloride channel inhibitors *in vivo*[J]. Transplantation, 2002, 73(8): 1185-1193.

[10] Lin K M, Lin B, Lian I Y, *et al*. Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia reoxygenation[J]. Circulation, 2001, 103(13): 1787-1792.

[11] Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease[J]. Science, 1995, 267(5203): 1456-1462.

（编辑　汪勤俭）

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