DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.019
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
1450 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)16-1450-04

Caspase-3抑制剂对大鼠心肌缺血再灌注损伤后梗死范围的影响

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

提 要:目的 探讨天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抑制剂Ac-DEVD-CHO对大鼠心肌缺血再灌注(MIR)后心肌梗死范围的影响机制。方法 Wistar大鼠132只,设立MIR组,DEVD组和假手术组并分设缺血30 min后再灌注1、3、6、12及24 h 5个时相点。分别检测caspase-3活性、心肌细胞凋亡指数(AI)、ICAM-1表达、PMNs浸润数和心肌梗死范围。结果 Caspase-3活性、心肌细胞AI随再灌注时间延长而增加,心肌细胞AI与caspase-3活性于再灌注12 h最高,其后基本维持在平台状态;ICAM-1表达、PMNs浸润数和心肌梗死范围随再灌注时间延长而增加,至24 h仍未见下降趋势。DEVD组上述指标虽也有相似增高趋势,但比MIR组明显减小($P<0.05$)。结论 Caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO通过抑制凋亡和PMNs浸润减少心肌再灌注后的心肌梗死范围。

关键词:再灌注损伤;caspase-3;凋亡;细胞粘附分子;中性粒细胞
中图法分类号:R322.1^{+}1;R345.6^{+}9;R654.1 文献标识码:A

Effects of caspase-3 inhibitor on infarct size of rats with myocardial reperfusion injury

XU Qiang, SI Liang-yi, ZHAO Xiao-lan, ZHANG Hong, TANG Wei-ping (Department of Gerontology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO on infarct size of rat with myocardial reperfusion injury. Methods A total of 132 Wistar rats were divided into 3 groups, myocardial ischemia reperfusion (MIR), DEVD and sham. The activity of caspase-3, myocardial apoptosis index (AI), expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), count of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) infiltration, and myocardial infarct size in each group were detected at 1, 3, 6, 12 and 24 h. Results Activity of caspase-3 and AI increased in a time-dependent manner and reached the peak value at 12 h and then maintained at a stable level. Expression of ICAM-1, count of PMN infiltration, and myocardial infarct size also increased in a time-dependent manner, but no decrement was found even at 24 h following reperfusion. Those indices mentioned above in DEVD group were significantly lower than those in MIR group ($P<0.05$) though similar increasing tendency was found in both groups. Conclusion Caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO reduces myocardial infarct size by means of inhibiting myocardial apoptosis and infiltration of PMNs.

Key words: reperfusion injury; caspase-3; apoptosis; intercellular adhesion molecule; neutrophil

心肌缺血再灌注(Myocardial ischemia reperfusion, MIR)时,通过抑制凋亡减轻心肌缺血再灌注(MIR)后梗死范围已有报道[1]。但其机制是否仅仅是减少心肌细胞凋亡,目前还不清楚。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[2]。凋亡过程中激活的caspases,包括caspase-3可以诱导实验动物缺血再灌注组织的炎症反应,如炎性细胞因子的产生和中性粒细胞(PMNs)浸润[3]。因此,我们假设凋亡抑制剂通过抑制再灌注心肌组织的PMNs浸润而减少再灌注后心肌梗死范围。本实验应用大鼠MIR模型,观察MIR时心肌细胞凋亡和细胞间粘附分子-1(Intercellular adhesion molecule, ICAM-1)蛋白质表达、PMNs浸润的规律及与心肌梗死范围的关系,探讨caspase-3抑制剂Ac-DEVD-CHO减少MIR后心肌梗死范围的效果及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型制备及分组

Wistar大鼠132只,由第三军医大学实验动物中心提供,体质量250~300 g,雌雄不拘,随机分设MIR组,MIR+Ac-DEVD-CHO(DEVD)组和假手术对照(Sham)组;MIR组和DEVD组均先

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)68754151
收稿日期:2003-05-15;修回日期:2003-07-12

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

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 一个时相点作总体对照。每组各 6 只大鼠, 结扎左冠状动脉前降支, 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。DEVD 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 60 只大鼠按以上分组, 每组 6 只, 测定心肌梗死范围。

1.2　心肌组织 caspase-3 活性测定

取待测心肌组织 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(DTT10 μl, 2× 反应缓冲液 1 ml)50 μl, 再加 caspase-3 底物 DEVD-AFC 5 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 孵育前后荧光值。按试剂盒说明绘制标准曲线, 测得其斜率为 133, 并通过公式计算其活性, caspase-3=(Δ 荧光值/h) × 1/133。

1.3　凋亡细胞原位标记与凋亡指数(AI)计算

取待测心肌石蜡切片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)。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　ICAM-1 蛋白质表达水平测定

取待测心肌石蜡切片用 S-P 免疫组织化学染色法进行, DAB 显色(试剂购自 R&D 公司); 结果采用 Tiger 920 图像分析软件, 测定 ICAM-1 蛋白阳性心肌细胞平均光密度值(*A* 值)。

1.5　心肌中性粒细胞浸润数测定

用髓过氧化物酶(MPO)法测定心肌中中性粒细胞浸润数量。

1.6　心肌梗死范围测定

实验结束前结扎左冠脉, 1% 伊文蓝注入左室内, 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。测定伊文蓝未染区心肌组织重量, 代表心肌缺血危险区重量; 同时测定 TTC 未染区心肌组织重量, 代表梗死区重量。以梗死区心肌与心肌缺血危险区心肌重量的百分比表示梗死范围。

1.7　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。

2　结果

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

两实验组于 MIR 1 h 时 caspase-3 活性升高, 再灌注 12 h 达到高峰, 至再灌注 24 h 仍然维持较高活性水平。与 Sham 组比较($P<0.05$); 虽然 DEVD 组的 caspase-3 活性再灌注后也有增加, 但较 MIR 组显著减小, 两组间各相应时相点比较($P<0.05$), 见表 1。

表 1　各组动物的 caspase-3 活性、AI、ICAM-1 表达、PMNs 浸润及梗死范围的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Activity of caspase-3, AI, expression of ICAM-1, count of PMNs infiltration, and myocardial infarct size in different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	*n*	Caspase-3 activity	AI of myocardial cells	Expression of ICAM-1	Infiltration of PMNs	Infarction size
MIR						
MIR 1 h	6	0.43±0.08 *	7.45±2.43 *	1.04±0.12 **	2.19±0.44 **	8.52±1.95
MIR 3 h	6	0.64±0.12 **	12.52±4.71 **	1.12±0.14 **	5.55±0.51 **	22.12±4.62
MIR 6 h	6	0.86±0.14 **	23.75±6.26 **	1.51±0.16 **	8.15±0.88 **	34.67±4.94
MIR 12 h	6	1.34±0.27 **	34.83±9.35 **	1.81±0.15 **	12.02±1.67 **	42.89±5.70
MIR 24 h	6	1.26±0.23 **	33.78±9.36 **	1.86±0.16 **	14.11±1.39 **	49.88±6.95
DEVD						
MIR 1 h	6	0.25±0.06 *▲	3.98±1.05 *▲	0.81±0.10 *▲	1.85±0.16 **	7.84±2.01
MIR 3 h	6	0.34±0.09 *▲▲	6.52±1.41 **▲	1.03±0.13 **▲	4.45±0.51 **▲	18.34±3.07▲
MIR 6 h	6	0.43±0.11 **▲▲	7.18±1.83 **▲▲	1.09±0.09 **▲	6.60±0.55 **▲	27.70±5.17▲
MIR 12 h	6	0.40±0.09 **▲▲	12.25±3.76 **▲▲	1.23±0.15 **▲▲	9.89±0.57 **▲	35.88±5.37▲
MIR 24 h	6	0.33±0.06 **▲▲	15.68±4.36 **▲▲	1.27±0.14 **▲▲	11.78±0.97 **▲	39.25±6.67▲▲
Sham	6	0.19±0.06	1.12±0.43	0.22±0.05	1.04±0.14	

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

2.2　MIR 时心肌细胞凋亡指数变化规律及 Ac-DEVD-CHO 的影响

两实验组在 MIR 1 h 时出现凋亡的心肌细胞, 并逐渐增多, AI 在再灌注 12 h 达到高峰, 至再灌注 24 h 仍然维持较高水平。与 Sham 组比较($P<0.05$); 虽然 DEVD 组的 AI 也有增加, 但较 MIR 组显著减小, 两组间各相应时相点比较($P<0.05$), 见表 1。

2.3　MIR 时心肌 ICAM-1 蛋白表达变化规律及 Ac-DEVD-CHO 的影响

两实验组于 IR1 h 后 ICAM-1 蛋白质的表达均呈进行性增加, 再灌注 3 h 后其表达速度明显加快, 于再灌注 12 h 后又有所减慢, 至 24 h 仍未见有下降趋势, 与 Sham 组比较($P<0.01$); DEVD 组于再灌注 3 h 后与 MIR 组比较, 其增加的程度显著减低($P<0.05$), 见表 1, 图 1, 2。

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



图 1 再灌注 24 h ICAM-1 蛋白表达达到高峰 (S-P× 400)

Fig 1 Expression of ICAM-1 reaches the peak value at 24 h after reperfusion (S-P× 400)

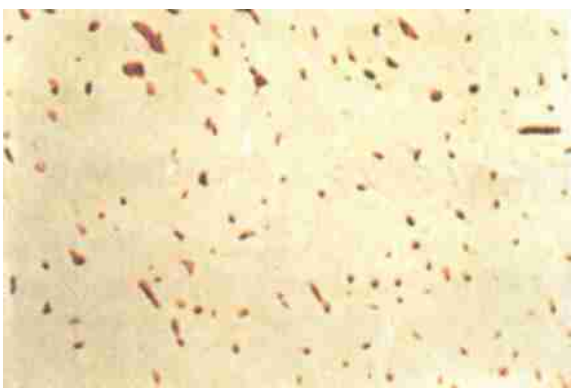


图 2 再灌注 24 h Ac-DEVD-CHO 显著减少 ICAM-1 蛋白表达 (S-P× 400)

Fig 2 Significantly decreased expression of ICAM-1 is found after the treatment with Ac-DEVD-CHO at 24 h after reperfusion (S-P× 400)

2.4 缺血再灌注时心肌 PMNs 浸润数变化规律及 Ac-DEVD-CHO 的影响

MIR 组在再灌注 1 h, PMNs 浸润数量即已明显增加, 以后呈进行性增高, 再灌注 12 h 达峰值, 至 24 h 仍无下降趋势。DEVD 组的变化规律类似 MIR 组, 但增高程度则明显低于 MIR 组, 再灌注 3 h 后各时相点比较均有显著差异($P< 0.05$), 见表 1。

2.5 Ac-DEVD-CHO 对缺血再灌注心肌梗死范围的影响

两实验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, DEVD 组梗死范围较 IR 组明显较少, 相应时相点比较, 均有显著差异($P< 0.05$)。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤导致细胞死亡的方式不仅是坏死, 细胞凋亡也是机制之一[4]。Scarabelli 等[5] 发现再灌注早期小血管的内皮细胞首先出现凋亡, 内皮细胞凋亡高峰出现在再灌注后 1 h, 此时在血管周围的心肌细胞开始出现凋亡, 其数量距小血管的距离越远越少, 呈辐射状分布。提示可能再灌注诱导了内皮细胞释放可溶性凋亡诱导物质导致心肌细胞凋亡, 心肌梗死范围的扩大。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[6]。本研究结果显示: 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。凋亡参与了心肌 IRI, 凋亡和坏死是构成 MIR 后细胞死亡的基本形式。

近年已有不少通过抑制凋亡来减轻缺血再灌注损伤的报道[1,7]。Holly 等[8] 发现应用 caspase 抑制剂 YVAD-cmk 可以降低 caspases 活性使细胞凋亡减少, 最终缩小心肌梗死面积达 31%。虽然凋亡是缺血再灌注后心肌细胞死亡的机制之一, 但坏死才是心肌细胞死亡的主要原因。抑制凋亡显著地减少心肌梗死的范围的机制可能还不仅仅在于减少凋亡细胞, 还可能存在其他机制。有研究表明, 抑制组织缺血再灌注后细胞凋亡的过程中还可能抑制了凋亡诱导的炎症反应[9]。近年有学者发现 caspase 抑制剂可以显著减少肾缺血再灌注后的细胞凋亡, 局部炎性因子活化、PMNs 浸润以及肾功能损害, 认为凋亡过程中 caspase 激活诱导的炎性因子活化、PMNs 浸润是肾缺血再灌注损伤重要原因[10]。目前, 已证实心肌缺血再灌注时, ICAM-1 参与介导了 PMNs 对组织细胞的粘附、浸润和 IRI 的发生、发展[11]。本研究结果显示: 在大鼠心肌缺血再灌注过程中 ICAM-1 蛋白表达、PMNs 浸润和 caspase-3 活性、心肌细胞 AI 均进行性增高, 再灌注 24 h 仍未下降; 再灌注各时相点, 用 caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 干预, 发现其 caspase-3 活性、心肌细胞 AI、ICAM-1 蛋白表达、PMNs 浸润和心肌梗死范围均有不同程度的减少。表明 Ac-DEVD-CHO 不仅在于减少心肌细胞凋亡数目, 还可能通过降低 ICAM-1 介导 PMNs 浸润等炎症反应来减轻再灌注后心肌梗死范围。

Caspase-3 抑制剂 Ac-DEVD-CHO 通过抑制凋亡和 PMNs 浸润减少 MIR 后的梗死范围, 提示通过抑制 caspase-3 的激活可能会成为有效防治 MIRI 的新途径。

参考文献:

[1] Justin G, William P, Hans A, *et al*. A Novel nonpeptidic caspase-3/7 inhibitor, (S)-(+)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl] isatin reduces myocardial ischemic injury[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 456(1): 59-68.

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

[3] Daemen M A, Vries B, Buurman W A, *et al*. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury[J]. Transplantation, 2002, 73(11): 1693-1700.

[4] Zhu Y Z, Zhu Y C, Wang Z J, *et al*. Time-depedent apoptotic development and pro-apoptotic gene expression in rat heart after myocardial infarction[J]. Jpn J Pharmacol, 2001, 86(3): 355-358.

[5] Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, *et al*. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury[J].

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

Circulation, 2001, 104(3): 253—256.
[6] 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.
[7] 徐 强, 司良毅, 赵小兰, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(15): 1355—1357.
[8] Holly T A, Drincic A, Byun Y, *et al*. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion *in vivo*[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(9): 1709—1715.
[9] Daemen M A, Veer C, Denecker G, *et al*. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation[J]. J Clin Invest, 1999, 104(5): 541—549.
[10] Daemen M A, de Vries B, van't Veer C, *et al*. Apoptosis and chemokine induction after renal ischemia-reperfusion[J]. Transplantation, 2001, 71(7): 1007—1011.
[11] 司良毅, 陈运贞, 何国祥, 等. ICAM-1 表达水平对心肌再灌注损伤的影响及 NAC 的保护作用[J]. 中华心血管病杂志, 2000, 28(1): 65—68.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2003)16-1453-01

个案与短篇

子宫多发性平滑肌瘤合并上皮样平滑肌瘤 1 例

A case report of multiple leiomyoma accorpanied by epithelioid leiomyoma originated from the uterus

李 娴, 段光杰, 柳凤轩, 于冬梅 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所, 重庆 400038)

患者, 女, 42 岁, 发现子宫肌瘤 8 年。定期随访, 肌瘤渐大。入院查体: 一般情况尚可。妇科检查: 外阴已婚经产式, 宫颈中度糜烂, 无举痛; 子宫前位, 前壁扪及 8 cm× 8 cm 包块, 质硬, 活动度差, 无压痛。双侧附件未扪及异常。B 超发现子宫前壁 7.2 cm× 7.3 cm× 7.6 cm 不均质回声, 子宫底见 4.8 cm× 4.7 cm ×5.2 cm 不均质回声, 其内见 1.4 cm× 1.5 cm 增强回声, 提示多发性子宫肌瘤伴钙化。术中见子宫增大如 3 月孕大, 形态欠规则, 前壁突起, 子宫底部见直径约 6 cm 肌瘤, 切面呈漩涡状, 后壁见 2 个小肌瘤, 行子宫次全切及宫颈锥切术。

病理检查: 次全切子宫一个, 大小 11.5 cm× 9.0 cm× 6.0 cm, 子宫底部及后壁见直径 1.5~6 cm 灰白色结节 3 个, 表面光滑, 边界清楚。较大两个结节切面灰白色, 编织状, 质韧, 部分有小灶钙化; 镜下见瘤细胞呈梭形, 胞浆丰富红染, 核杆状, 排列呈编织状、漩涡状。最小结节切面灰红色, 质软, 镜下见瘤细胞呈圆形、多边形, 胞浆丰富, 透亮, 核圆形、卵圆形, 核仁清楚, 部分有核周空晕, 瘤细胞呈巢状、弥漫片状排列, 其间见有多少不一的胶原纤维分隔和玻璃样变性组织, 部分区域可见瘤细胞与血管壁平滑肌细胞有移行过渡。透明细胞胞浆富含 PAS 染色阳性的糖原颗粒, 粘液染色阴性, 网状纤维染色显示网状纤维丰富, 包绕每个瘤细胞。免疫组化染色: Actin 阳性, CK、CD117、CD34、S-100 蛋白均为阴性。

病理诊断: 子宫多发性平滑肌瘤合并上皮样平滑肌瘤。

讨论

子宫平滑肌瘤常见, 而上皮样平滑肌瘤则很少见, 该瘤多发生于胃肠道, 少数也可见于肠系膜、大网膜、纵隔、腹膜后等处, 二者同时发生于子宫者极罕见, 目前认为上皮样平滑肌瘤是平滑肌瘤在组织学上的一种变异形态, 可分为 3 个亚型: 上皮样细胞型、透明细胞型和丛状型。本例以空亮透明的细胞为主, 与血管平滑肌瘤细胞有移行过渡, 并合并有典型子宫平滑肌瘤, 透明细胞 Actin 标记阳性, 诊断为子宫上皮样平滑肌瘤(透明细胞型)。该型需与圆细胞脂肪肉瘤及印戒细胞癌相鉴别, 这两种肿瘤前者脂肪染色阳性, 后者角蛋白 CK 及粘液染色阳性。目前对于该肿瘤生物学行为的认识尚有争议, 新的 WHO 分类中归属恶性潜能未定的肿瘤(Smooth muscle tumor of uncertain malignant potential)[1]。可根据病程长短、瘤体大小、瘤细胞异形性及核分裂像的多少来判断其性质。一般来说, 临床症状> 6 个月, 肿瘤直径> 6 cm, 核分裂像> 5 个/10HP, 细胞有重度异型性者, 应视为恶性或低度恶性。也有报道认为该瘤虽然核分裂像少, 异型性不明显, 但常见浸润邻近子宫肌层, 临床行为可呈恶性, 部分患者术后可复发或转移[1,2]。治疗上一般行肿瘤切除和/或全子宫切除, 化疗和放疗无明确有效作用。该患者临床无明显症状, 肿瘤直径 1.5 cm, 无明显异型性及核分裂像, 按良性肿瘤行子宫次全切除, 术后无特殊处理, 病人恢复良好。但需长期密切随访, 定期复查。

关键词: 子宫肿瘤; 平滑肌瘤
中图法分类号: R737.33 文献标识码: B

参考文献:

[1] 赖日权, 王卓才. 子宫平滑肌肿瘤的病理诊断[J]. 诊断病理学杂志, 2002, 9(1): 6—8.
[2] 回允中. 子宫平滑肌肿瘤诊断中的一些问题[J]. 中华病理学杂志, 2002, 31(5): 449—451.

(编辑 汪勤俭)

作者简介: 李 娴(1977—), 女, 重庆市人, 助教, 主要从事肿瘤病理方面的研究。现在重庆医科大学应用技术学院病理学教研室, 重庆 400050. 电话: (023)68754000-73107
通信作者: 段光杰, 电话: (023)68754434
收稿日期: 2003-01-15; 修回日期: 2003-04-17

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