DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.024
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0295-03

论著

心衰大鼠心肌细胞凋亡的变化及卡维地洛对其干预的作用

吴 强,李隆贵,耿召华 (第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037)

提 要:目的 了解心肌细胞凋亡在充血性心力衰竭(Congestive heart failure, CHF)发生、发展中的作用,探讨卡维地洛(Carvedilol, CAR)治疗CHF的作用机制。方法 观察雄性Wistar大鼠心肌梗塞(Myocardial infarction, MI)后的血流动力学参数、心室重塑指标、心肌细胞凋亡、心肌总抗氧化能力和丙二醛的改变,并于MI后1周对大鼠进行7周的CAR和美托洛尔(MET)干预,观察CAR和MET对上述指标的影响。结果 MI后4周大鼠动脉压、±dp/dt$_{max}$和心肌总抗氧化能力下降,左室舒张末压、右室/体重比及丙二醛增高,MI后8周上述改变更为明显;MI后心肌细胞凋亡指数逐渐升高;CAR和MET可不同程度地改善心功能指标,CAR降低心肌细胞凋亡指数、丙二醛及升高总抗氧化能力的效果优于MET。结论 心肌细胞凋亡在MI后CHF发生、发展过程中起着重要的作用,氧化应激是介导心肌细胞凋亡的主要刺激因素。CAR可有效地减少MI后心肌细胞凋亡、防治CHF,这与其强大的抗氧化作用有关。

关键词:充血性心力衰竭;细胞凋亡;心肌梗塞;氧化应激;卡维地洛
中图法分类号:R329.24;R541.6;R971.93 文献标识码:A

Changes of cardiac myocyte apoptosis and effects of Carvedilol during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats

WU Qiang, LI Long-gui, GENG Zhao-hua (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the role of cardiac myocyte apoptosis in the progression of congestive heart failure (CHF), to explore the mechanisms of carvedilol (CAR) in therapies for CHF. Methods Using the myocardial infarction (MI) animal model induced by the left coronary artery ligation in male Waistar rats, hemodyanmics, ventricular remodeling parameters, cardiac myocyte apoptosis, the myocardial concentration of total antioxidation capacity (TAOC) and malondialdehyde (MDA) were investigated in the untreated experimental groups at 2-, 4-, 8-week after operation and treated experimental groups in which rats were treated with CAR and metoprolol (MET) for 7 weeks since 1 week after operation. Results In the 4-, 8-week rats with MI, there were progressive drops in mean arterial pressure, ±dp/dt$_{max}$, and TAOC, and increases in left ventricular end— diastolic pressure, the ratio of right ventricular weight/body and MDA. Apoptosis index increased after MI. Both of CAR and MET can improve heart function in rats with MI. The apoptosis index and MDA were significantly lower and the myocardial concentration of TAOC was markedly higher in CAR group than those in MET group. Conclusion Myocardiocyte apoptosis may play a key role in the occurrence and progression of CHF. Oxidative stress is one of major factors inducing myocardiocyte apoptosis. The effects of CAR on effectively decreasing myocardiocyte apoptosis, protecting and treating CHF associate with its strong antioxidative feature.

Key words: congestive heart failure; apoptosis; myocardial infarction; oxidative stress; carvedilol

细胞凋亡是生物体内一种与细胞坏死截然不同的自杀程序,是在基因控制下的主动死亡。近年研究表明,心肌梗塞(Myocardial infarction, MI)[1]、充血性心力衰竭(Congestive heart failure, CHF)[2]及高血压[3]等心血管疾病均存在病理性心肌细胞凋亡增加。本研究通过观察MI后不同时相的大鼠左心功能、心室重塑、心肌细胞凋亡、心肌总抗氧化能力(TAOC)及丙二醛(MDA)浓度的变化及卡维地洛(Carvedilol, CAR)的干预效果,旨在探讨心肌细胞凋亡与CHF发生、发展的关系及CAR的作用机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠MI模型和对照

MI组:纯种雄性Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),体重(195.7±21.1)g,麻醉后,仰卧固定,开胸暴露心脏,于左心耳下缘约1 mm处结扎左冠状动脉前降支。假手术组(SH组):纯种雄性Wistar大鼠,体重(196.3±25.2)g。在心脏相同部位穿线但不结扎前降支,余同上。

1.2 分组给药

取MI大鼠54只,随机分成2周组(MI_{2W}组,n=7)、4周组(MI_{4W}组,n=10)、8周组(MI_{8W}组,n=10)、CAR治疗组(CAR组,n=10)、美托洛尔(MET)治疗组(MET组,n=10)及特拉唑嗪(TER)治疗组(TER组,n=7)。于术后1周开始予MI_{2W}组、MI_{2W}组和MI_{2W}组生理盐水(2 ml/d)灌胃分别至术后2、4和8周;于术后1周开始予CAR组大鼠CAR(北京巨能制药有限责任公司产,批号:991001)水溶液(60 mg·kg^{-1}·d^{-1})灌胃,予MET组大鼠MET(无锡阿斯特拉制药有限公司产,批号:2000005027)水溶液(100 mg·kg^{-1}·d^{-1})灌胃、予TER组TER(海南绿岛制药有限公司产,批号:991206)水溶液(10 mg·kg^{-1}·d^{-1})灌胃直至术后8周。取SH组大鼠27只,随机分成假手术2周组(SH_{2W}组,n=9)、假手术4周组(SH_{4W}组,n=8)和假手术8周组(SH_{8W}组,n=10),给药方法分别同MI_{2W}组、MI_{4W}组和MI_{8W}组。

1.3 测定血流动力学指标及留取心肌组织标本

于术后2、4、8周,分别将各组大鼠用10%氨基甲酸乙酯溶

作者简介:吴 强(1969—),男,广东省雷州市人,博士研究生,主治医师,主要从事血管病临床与基础方面的研究。电话:(023)68775000-7460l

收稿日期:2001-07-15;修回日期:2001-09-21

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

液(0.1 ml/kg)腹腔注射麻醉,予右颈动脉、静脉插管,应用 RM-6000 型 8 道生理记录仪(日本 Nihon Kohden 公司产)记录主动脉、左心室压力曲线。测量心率(HR)、主动脉收缩压(SAP)、主动脉舒张压(DAP)、左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)及 $\pm dp/dt_{max}$。完成压力曲线记录后立即开胸取出心脏,分别称取左心室(包括室间隔)、右心室(不包括室间隔)湿重。计算左心室湿重/体重(LVW/BW, mg/g)和右心室湿重/体重(RVW/BW, mg/g),分别为左心室心肌肥厚指数和右心室心肌肥厚指数。留取左心室肌(MI_{2W}组、MI_{4W}组、MI_{8W}组、CAR 组、MET 组和 TER 组取非梗塞区心肌)。

1.4 检测心肌细胞凋亡

取 10% 甲醛溶液固定的 MI 组 MI 边缘区左心室肌和 SH 组左心室肌,常规石蜡包埋,作心肌纵向切片(5 μm)。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)原位标记凋亡细胞核。以不加 TdT 酶者为阴性对照,分别以用 Dnase Ⅰ(10 μg/ml)消化的 SH_{2W}组、SH_{4W}组和 SH_{8W}组左心室肌切片为阳性对照。每只大鼠观察 4 张切片,每张切片计数 5 个高倍镜视野(400×)中的凋亡阳性细胞核数/总细胞核数,取其平均值为心肌细胞凋亡指数。

1.5 制备 10% 心肌组织匀浆液

取液氮冻存的左心室肌称重后,于冰浴中剪碎,加入 9 倍重量的预冷生理盐水,应用内切式组织匀浆器制成匀浆,将匀浆离心(4 000 r/min, 15 min)后取上清液备测心肌组织蛋白含量、TAOC 和 MDA 浓度。

1.6 测定心肌组织蛋白含量和 TAOC

Lowry 法测定心肌组织的蛋白含量,660 nm 比色。比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所)测定心肌组织的 TAOC。

1.7 测定心肌组织 MDA 含量

比色法(试剂盒购于南京建成生物工程研究所)测定心肌组织的 MDA。

1.8 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较用方差分析,两两比较用 Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 大鼠心室重塑和血流动力学指标的改变,见表 1

MI_{8W}组的 LVW/BW 大于 SH_{8W}组,而 MI_{2W}组和 MI_{4W}组与同期 SH 组比较无统计学差异,MI_{4W}组和 MI_{8W}组 RVW/BW 大于同期 SH 组和 MI_{2W}组。与相应的 SH 组比较,MI 后 4 周开始 LVEDP 明显增高,MAP 和 $+dp/dt_{max}$ 显著降低,而 MI_{2W}组 $-dp/dt_{max}$ 则低于 SH_{2W}组。CAR 组、MET 组和 TER 组 RVW/BW 均小于 MI_{8W}组,其中 CAR 降低 RVW/BW 效果优于 MET 和 TER;各治疗组间及与 MI_{8W}组的 LVW/BW 差异无显著性。CAR 组和 MET 组的 HR 和 LVEDP 低于 TER 组和 MI_{8W}组,而 $\pm dp/dt_{max}$ 高于 MI_{8W}组。

表 1 大鼠心室重塑指标和血流动力学的改变($\bar{x}\pm s$)

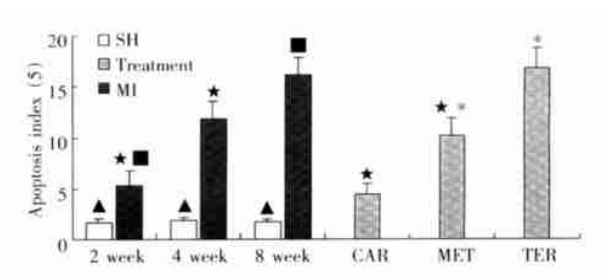
Tab 1 Changes of ventricular remodeling parameters and hemodyanmics in rats($\bar{x}\pm s$)

	LVW/BW(mg/g)	RVW/BW(mg/g)	HR(bpm)	LVEDP(mmHg)	LVSP(mmHg)	+dp/dt(mmHg/s)	−dp/dt(mmHg/s)	MAP(mmHg)
SH_{2W}(n=9)	2.54±1.36	0.60±0.07	433±24	4.0±0.9	139.2±15.2	5914±597	4261±476▲	119.8±11.9
MI_{2W}(n=7)	2.52±0.20	0.68±0.07■★	436±24	4.3±1.1■★	133.6±12.2★	5253±527■★	3584±311■★	112.3±9.9
SH_{4W}(n=8)	2.58±0.23	0.58±0.09▲	429±26	4.6±0.7▲	137.5±15.0	5755±538▲	4388±391▲	116.0±15.4▲
MI_{4W}(n=10)	2.63±0.11	0.84±0.10★	440±19	9.5±1.8★	123.3±12.5	4494±522★	3160±312	99.2±10.9
SH_{8W}(n=10)	2.47±0.08▲	0.59±0.06▲	426±17	4.6±1.2▲	142.0±11.9▲	5848±609▲	4289±298▲	125.9±11.4▲
MI_{8W}(n=10)	2.64±0.11	1.04±0.08	432±21	20.6±3.1	118.3±10.8	3861±363	2836±295	102.0±9.5
CAR (n=10)	2.59±0.15	0.68±0.08★	351±18★	10.1±2.5★	106.6±16.0	5224±304★	3951±317★	94.3±15.5
MET (n=10)	2.63±0.09	0.96±0.08★*	348±16★	9.4±2.7★	104.4±10.8	4697±454★	3365±463★*	92.4±12.5
TER (n=7)	2.64±0.14	0.91±0.05★*	439±16*	18.9±3.3*	102.9±14.1	4000±419*	2979±289*	89.7±12.4

▲: $P<0.05$, *vs* respective MI groups; ■: $P<0.05$, *vs* MI_{4W} group; ★: $P<0.05$, *vs* MI_{8W} group; *: $P<0.05$, *vs* CAR group; 1 mmHg=0.133 kPa

2.2 大鼠心肌细胞凋亡的变化,见图 1

MI_{2W}组、MI_{4W}组和 MI_{8W}组的心肌细胞凋亡指数均高于相应的 SH 组,且呈进行性增高。CAR 组心肌细胞凋亡指数明显低于 MI_{8W}组、TER 组和 MET 组。



▲: $P<0.05$, *vs* respective MI groups; ■: $P<0.05$, *vs* MI_{4W} group; ★: $P<0.05$, *vs* MI_{8W} group; *: $P<0.05$, *vs* CAR group

图 1 大鼠心肌细胞凋亡指数的变化

Fig 1 The changes of cardiomyocyte apoptosis index in rats

2.3 大鼠心肌 TAOC 和 MDA 浓度的变化,见表 2

MI_{4W}组和 MI_{8W}组的 TAOC 低于 SH_{4W}组和 SH_{8W}组;MI_{2W}组、MI_{4W}组和 MI_{8W}组的 MDA 均高于相应的 SH 组,且 MI_{4W}组和 MI_{8W}组高于 MI_{2W}组。与 MI_{8W}组比较,CAR 组 TAOC 增高、MDA 降低,MET 组 MDA 下降。

表 2 大鼠心肌 TAOC 和 MDA 浓度的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of the myocardial concentration of TAOC and MDA in rats($\bar{x}\pm s$)

	TAOC(U/mg)	MDA(nmol/g heart wet wt)
SH_{2W}(n=9)	1.83±0.15	53.7±5.6▲
MI_{2W}(n=7)	1.97±0.11■★	66.5±9.7■★
SH_{4W}(n=8)	1.79±0.13▲	58.9±11.3▲
MI_{4W}(n=10)	1.22±0.15★	78.0±8.5
SH_{8W}(n=10)	1.88±.009▲	58.3±8.3▲
MI_{8W}(n=10)	1.06±0.12	88.0±9.7
CAR (n=10)	1.92±0.20★	53.2±10.0★
MET (n=10)	1.17±0.11*	75.4±12.4★*
TER (n=7)	1.04±0.11*	86.1±8.1*

▲: $P<0.05$, *vs* respective MI groups; ■: $P<0.05$, *vs* MI_{4W} group; ★: $P<0.05$, *vs* MI_{8W} group; *: $P<0.05$, *vs* CAR group

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

3　讨论

CHF 是各种严重心血管疾病的恶性归宿之一, 尽管已有大量研究对心力衰竭的病理生理机制出了许多学说, 但其确切的细胞及分子生物学机制尚不十分清楚。近年研究表明[4], CHF 发生、发展的基本机制是心室重塑, 它是一系列复杂的分子和细胞机制引起的心肌细胞结构、功能及表型的改变, 包括心肌细胞凋亡、心肌细胞肥大、胚胎基因再表达及心肌细胞外基质变化等。

Kajstura 等[1]研究发现, 在 MI 急性期心肌细胞凋亡决定了 MI 面积的大小, 在 MI 边缘区也是细胞凋亡占主导地位。本研究结果显示, 大鼠 MI 后 2 周大鼠即出现心功能下降, MI4 周后则 CHF 和心室重塑进行性加重, 同时 MI 后心肌细胞凋亡明显增加, 且与心室重塑和 CHF 进程同步, 提示在 MI 后的心室重塑期, 心肌细胞凋亡是 CHF 发生、发展过程中心肌收缩单元不断丧失的主要原因, 与心功能进行性降低有关, 参与了 CHF 的基本病理生理进程。

细胞凋亡是由细胞内的基因直接控制, 而细胞外部因素可通过信号转导通路影响这些基因的表达, 从而实现对细胞凋亡的调控作用。近年研究表明, CHF 患者[5]和动物模型[6]都存在氧自由基过量生成和细胞内抗氧化防御系统受损的氧化应激状态。本研究观察到 MI 后大鼠心肌 MDA 浓度进行性增高, 而 TAOC 则于 MI4 周后逐渐下降, 表明 MI 后大鼠心肌出现氧化-抗氧化失衡, 且这种异常与心肌细胞凋亡呈一致性变化, 提示心肌细胞凋亡与氧自由基及其相关代谢产物过量聚集关系密切。CHF 时发生氧化应激可能与心肌氧耗增加有关, 目前已发现大量生成的活性氧分子可损伤脂质、蛋白质及核酸等生物大分子, 造成心肌细胞的结构破坏和功能障碍。活性氧作为细胞应激刺激, 可激活 SAPK[7]、JNK 及 p38[8]通路, 介导心肌细胞凋亡。此外, 氧化应激还可损伤线粒体膜, 引起线粒体内 Cytc 释放进入胞浆, 从而激活 Caspase 启动细胞凋亡信号传导的通路[9]。故氧化应激介导心肌细胞凋亡是 CHF 发生、发展的重要病理生理机制之一。

近 20 年来通过大量的实验和临床研究, 人们已逐渐认识到长期 β-肾上腺素能受体阻滞剂治疗可改善 CHF 症状、延缓 CHF 进展, 降低病残率和死亡率。CAR 是一种兼具 α-肾上腺素能受体阻滞作用的新型非选择性 β-肾上腺素能受体阻滞剂, 在大量动物实验的基础上, 近年完成的几个 CAR 治疗心力衰竭的随机、对照、双盲大规模临床研究[10,11]发现, 该药明显改善心功能和临床预后的效果为 MET 等第一、二代 β-肾上腺素能受体阻滞剂所不及。本研究结果显示, CAR 和 MET 均可不同程度地改善 MI 大鼠的心功能、减少心肌细胞凋亡, 且 CAR 效果优于 MET, 同时 CAR 可显著降低右心室肥厚指数。Yue 等[12]亦通过观察心脏缺血再灌注兔模型发现, CAR 抑制心肌细胞凋亡作用强于普萘洛尔。CAR 除了可阻断肾上腺素能受体外, 还具有强大的抗氧化活性, 其抗氧化作用较维生素 E 强 10 倍, 在低于人体治疗血药浓度时就有抗氧化作用, 而其羟化代谢产物的抗氧化活性更是维生素 E 的 1 000 倍[13]。本研究 CAR 组心肌 TAOC 高于 MET 组, MDA 浓度低于后者, 而 TER 组相应指标和心功能参数与 MI_{8W} 组的差异无显著性, 提示 CAR 防治 CHF 的作用主要与阻断 β-肾上腺素能受体和维护体内氧化-抗氧化动态平衡有关。

综上所述, 心肌细胞凋亡是促进大鼠 MI 后 CHF 发生、发展的重要因素, 氧化应激可介导心肌细胞凋亡, 抗氧化、抗凋亡是 CAR 防治 CHF 的重要机制之一。

参考文献:

[1] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, *et al*. Apoptosis and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats[J]. Lab Invest, 1996, 74(1): 86—107.

[2] Narula J, Haider N, Virmani R, *et al*. Apoptosis in myocytes in end—stage heart failure[J]. N Engl J Med, 1996, 335(16): 1 182—1 189.

[3] 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意义[J]. 中华心血管病杂志, 1999, 27(6): 459—463.

[4] Collucci W S. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure[J]. Am J Cardiol, 1997, 80 (11A): 15L—25L.

[5] McMurray J, Chopra M, Smith N E, *et al*. Free radical activity in chronic heart failure: Evidence for transmyocardial oxidative stress[J]. Circulation, 1990, 82 (suppl 3): III—566.

[6] Hill M F, Singal P K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats[J]. Am J Pathol, 1996, 148(1): 291—300.

[7] Krown K A, Page M T, Nguyen C. Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis in cardiac myocytes[J]. J Clin Invest, 1996, 98(12): 2 854—2 865.

[8] Ma X L, Kumar S, Gao F, *et al*. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decrease cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion[J]. Circulation, 1999, 99(13): 1 685—1 691.

[9] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Sci, 1998, 281(5381): 1 309—1 312.

[10] Packer M, Bristow M R, Cohn J N, *et al*. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure[J]. N Engl J Med, 1996, 334(21): 1 349—1 355.

[11] Australia/New Zealand Heart failure Research Collaborative Group. Randomised placebo-controlled trial of carvedilol in patients with congestive heart failure due to ischaemic heart disease[J]. Lancet, 1997, 349(9049): 375—380.

[12] Yue T L, Ma X L, Wang X K, *et al*. Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol[J]. Circ Res, 1998, 82(2): 166—174.

[13] Feuerstein G, Yue T L, Ma X L, *et al*. Novel mechanisms in the treatment of heart failure: inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvediol [J]. Prog Cardiovasc Dis, 1998, 41(1 suppl 1): 17—24.

(编辑　陈聪连)

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