DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.026
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
434 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0434-03

心肌梗死后心衰大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关基因表达的变化

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

提 要:目的 探讨心肌细胞凋亡在充血性心力衰竭(CHF)发生、发展中的作用,Bcl-2和Fas及其配体(FasL)对心肌细胞凋亡的调控机制。方法 采用心肌梗死(MI)大鼠模型,观察雄性Wistar大鼠MI后2、4及8周的血流动力学参数、心室重塑指标、心肌细胞凋亡、Fas、FasL和Bcl-2的mRNA和蛋白表达的改变。结果 MI后4周大鼠出现平均动脉压、$\pm dp/dt_{max}$下降,左室舒张末压、右室/体重比增高,MI后8周上述改变更为明显;MI后心肌细胞凋亡指数、Fas及FasL的mRNA和蛋白表达逐渐升高,Bcl-2的mRNA和蛋白表达下调。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,Fas和FasL表达上调、Bcl-2表达下降介导MI后心肌细胞凋亡的发生。

关键词:凋亡;心肌梗死;充血性心力衰竭;基因
中图法分类号:R322.11;R329.28;R542.22 文献标识码:A

Changes of cardiomyocyte apoptosis and expression of apoptosis-associated gene during heart failure following 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 cardiomyocyte apoptosis, and the mechanisms of Fas, Fas ligant (FasL) and Bcl-2 regulating apoptosis in the process of congestive heart failure (CHF). Methods Animal model of myocardial infarction (MI) was inflicted by ligating the left coronary artery of male Wistar rats for 2, 4, and 8 weeks respectively, and the rats with sham operation served as control. Hemodynamics, ventricular remodeling parameters, cardiac myocyte apoptosis, and expressions of Fas, FasL and Bcl-2 mRNAs and proteins were investigated in the experimental and control animals. Results In the rats with ligation for 4 and 8 weeks, their mean arterial pressure and $\pm dp/dtmax$ were in a progressive falling, and left ventricular end-diastolic pressure and the ratio of right ventricular weight/body increased. After MI, apoptosis index was increased, expressions of mRNA and protein of Fas and FasL were gradually up-regulated, and expression of Bcl-2 were decreased. Conclusion Myocyte apoptosis may play a pivotal role in the incidence and progression of CHF. The over-expression of Fas and FasL, and the suppression of Bcl-2 induce signaling pathways of cardiomyocyte apoptosis.

Key words: apoptosis; myocardial infarction; congestive heart failure; gene

细胞凋亡是生物体以一种与细胞坏死截然不同的自杀程序,调节细胞群体数量相对恒定的主动耗能过程。近年研究表明[1],心肌梗死(MI)、充血性心力衰竭(CHF)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、以及Fas受体、Fas配体(FasL)和Bcl-2的表达,旨在探讨心肌细胞凋亡在大鼠MI后CHF发生、发展中的规律、作用及其调控机制。

1 材料与方法

1.1 大鼠MI模型和假手术对照

MI组:雄性Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),体重(192.8±24.4) g,结扎左冠状动脉前降支,随机分为2周组(MI 2周组,n=7)、4周组(MI 4周组,n=10)、8周组(MI 8周组,n=10)。分别以假手术2周组(SH 2周组,n=9)、假手术4周组(SH 4周组,n=8)和假手术8周组(SH 8周组,n=10)为相应对照组。

1.2 测定血流动力学指标及留取心肌组织标本

分别于术后观察期满,将各组大鼠应用10%氨基甲酸乙酯溶液(0.1 ml/kg)腹腔注射麻醉,插管记录主动脉、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$\pm dp/dt_{max}$。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),分别作为左、右心室重塑指标。

1.3 检测心肌细胞凋亡

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)标记大鼠左心室肌的凋亡细胞核(MI组取MI边缘区心肌组织切片),DAB显色。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。

1.4 心肌Fas、FasL和Bcl-2蛋白表达的检测

免疫组化法测定大鼠左心室肌Fas、FasL和Bcl-2蛋白表达(抗体、通用型S-P试剂盒购于北京中山生物技术有限公司),以PBS替代一抗为阴性对照,DAB显色。采用Tiger细胞图像分析系统进行半定量分析,每张切片选择10个视野(×200),测定其积分光密度(IOD)。

1.5 心肌Fas、FasL和Bcl-2的mRNA检测

应用TRIZOL抽提组织总RNA,逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测mRNA的表达(通用RT-PCR试剂盒购于北京博大泰克生物基因技术服务有限公司),PCR扩增35循环,2%琼脂糖

作者简介:吴 强(1969-),男,广东省雷州市人,博士研究生,主要从事心血管疾病临床与基础研究。电话:(023)68755000-74661

收稿日期:2001-09-24;修回日期:2001-11-05

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

电泳, 采用四星 Bio Image 凝胶成像系统记录、计算 Fas/β-actin、FasL/β-actin 和 Bcl-2/β-actin 的 IOD 比值。引物详见表 1。

表 1　Fas、FasL、Bcl-2 及 β-actin 的引物序列

Tab 1　Primers of Fas　FasL　Bcl-2 and β-actin

Primer	Fragment length	Primer sequence	Annealing temperature(℃)
Fas	799	5′-ATG CTG TGG ATC ATG GCT GTC-3′ 5′-ATC TTG GGG GCT GTT GTG C—3′	58
FasL	238	5′—GGA ATG GGA AGA CAC ATA TGG AAC TGC—3′ 5′-CAT ATC TGG CCA GTA GTG CAG TAA TTC-3′	65
Bcl-2	474	5′-GCA ACC GAA CGC CCG CTG TG-3′ 5′-GTG ATG CAG GCC CCC ACC AG-3′	58
β-actin	389	5′-AGG CAT CCT GAC CCT GAA GTA C-3′ 5′-TCT TCA TGA GGT AGT CTG TCA G-3′	

1.6　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　大鼠心室重塑指标和血流动力学的改变

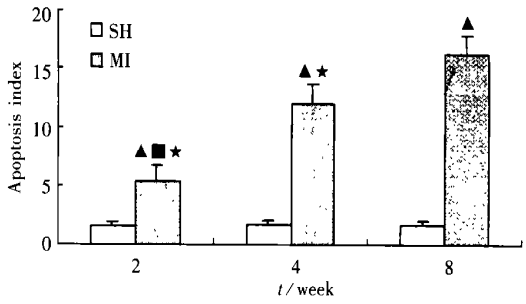
MI 8 周组的 LVW/BW 大于 SH 2 周组, MI 4 周组和 MI 8 周组 RVW/BW 大于同期 SH 组和 MI 2 周组。与相应的 SH 组比较, MI 后 4 周开始 LVEDP 明显增高, MAP 和 + dp/dt$_{max}$ 显著降低, 而 MI 2 周组 − dp/dt$_{max}$ 则低于 SH 2 周组, 见表 2。

2.2　大鼠心肌细胞凋亡的变化

MI 2 周组、MI 4 周组和 MI 8 周组的心肌细胞凋亡指数均高于相应 SH 组, 且呈进行性增高, 见图 1。

2.3　大鼠心肌 Fas、FasL 和 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达的变化

各时相 MI 组 Fas、FasL 的 mRNA 和蛋白表达均高于 SH 组, 且 MI 8 周组明显高于 MI 2 周组和 MI 4 周组。各时相 MI 组 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达均低于 SH 组, 见表 3、图 2。



▲: $P<0.05$ *vs* respective SH group; ■: $P<0.05$ *vs* MI 4 weeks group; ★: $P<0.05$ *vs* MI 8 weeks 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

表 2　大鼠血流动力学和心室重塑指标的改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of hemodyanmics and ventricular remodeling parameters in rats($\bar{x}\pm s$)

Group	LVW/BW(mg/g)	RVW/BW(mg/g)	HR(beat/min)	LVEDP(mmHg)	LVSP(mmHg)	+dp/dtmax(mmHg/s)	−dp/dtmax(mmHg/s)	MAP(mmHg)
SH 2 weeks(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 2 weeks(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 4 weeks(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 4 weeks(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 8 weeks(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 8 weeks(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 ▲

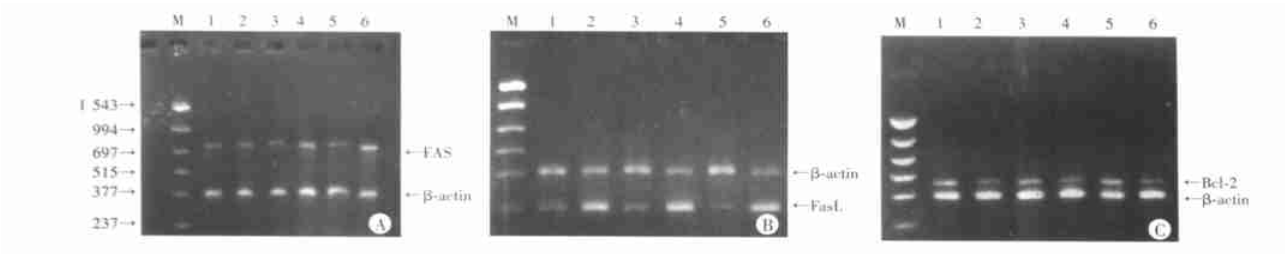
▲: $P<0.05$ *vs* respective SH group; ■: $P<0.05$ *vs* MI 4 weeks group; ★: $P<0.05$ *vs* MI 8 weeks group

表 3　大鼠心肌 Fas、FasL 及 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of the myocardial expression of Fas　FasL and Bcl-2 in rats($\bar{x}\pm s$)

Group	Fas		FasL		Bd-2	
	mRNA(%)	Protein(/μm^2)	mRNA(%)	Protein(/μm^2)	mRNA(%)	Protein(/μm^2)
SH 2 周(n=9)	37.6±4.0	0.093±0.01	54.6±6.1	0.058±0.09	64.6±7.0	0.158±0.04
MI 2 weeks(n=7)	51.4±7.4 ▲■★	0.385±0.05 ▲■★	89.9±15.1 ▲■★	0.192±0.03 ▲■★	42.6±9.1 ▲	0.403±0.06 ▲
SH 4 weeks(n=8)	33.6±5.3	0.089±0.02	62.1±7.2	0.052±0.06	70.0±9.0	0.161±0.02
MI 4 weeks(n=10)	67.7±6.5 ▲★	0.612±0.08 ▲★	106.3±12.7 ▲★	0.383±0.05 ▲★	36.3±10.9 ▲	0.373±0.07 ▲
SH 8 weeks(n=10)	40.3±4.3	0.105±0.02	59.6±8.6	0.065±0.05	72.0±4.9	0.111±0.02
MI 8 weeks(n=10)	89.6±16.2 ▲■	0.746±0.08 ▲■	126.6±16.3 ▲■	0.460±0.06 ▲■	41.4±8.8 ▲	0.359±0.04 ▲

▲: $P<0.05$ *vs* respective SH group; ■: $P<0.05$ *vs* MI 4 weeks group; ★: $P<0.05$ *vs* MI 8 weeks group



A: Fas mRNA expression; B: Fasl mKNA expression; C: Bd mKNA expression M: Makers; Lane 1~6: Sh 2 weeks, MI 2 weeks, SH 4 weeks, MI 4 weeks, SH 8 weeks and MI 8 weeks respectively

图 2　大鼠心肌 Fas、Fasl 及 Bcl-2 的 mRNA 的表达

Fig 2　The expression of Fas, FasL and Bcl-2 in rats

?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提出了许多学说，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[1]，心肌细胞凋亡可能参与了 MI 后 CHF 的基本病理生理进程。细胞凋亡又称程序性细胞死亡，是一个有机体内的细胞的生理性调节机制，与细胞有丝分裂的功能相反，对控制细胞增殖和分化、调节细胞群体数量相对恒定起着重要的作用。

本研究结果显示，MI 后 2 周大鼠即出现 $-dp/dt_{max}$ 下降，MI 4 周后心功能下降进行性加重，据此可分别将大鼠 MI 后 2、4 及 8 周划分为心功能代偿期、轻度 CHF 及中重度 CHF。MI 后大鼠心肌细胞凋亡明显增加，且与 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、发展过程中非梗死区心肌收缩单元不断丧失的主要原因，与心功能进行性减退有关。本研究发现，LVW/BW 于 MI 后 8 周方略有增高，而 RVW/BW 于 MI 后 2 周即明显增高，表明 MI 后左、右心室重塑各具特点：左心室以扩张、梗死区心肌细胞坏死及非梗死区细胞凋亡等为主，右心室则以心肌肥厚为主。MI 组 LVW/BW 无进行性增加与 MI 后大量左心室心肌细胞坏死、凋亡有关，而 RVW/BW 增高的原因可能为 MI 后 LVEDP 增高导致肺动脉压反射性增高，进而引起右心室负荷加重所致。

细胞凋亡是由细胞内的凋亡相关基因直接控制，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。凋亡相关基因包括死亡受体和死亡受体配体基因家族、Bcl-2 基因家族、p53 及 ICE 基因家族等，根据基因表达产物对细胞凋亡过程的影响，可将其分为促凋亡基因（如 Fas、FasL、Bax 等）和抑制凋亡基因（如 Bcl-2、Bcl-XL 等）。

Fas 抗原是一种属于肿瘤坏死因子受体超家族的Ⅰ型跨膜糖蛋白，其分子量为（40×10^3）～（50×10^3）；FasL 是一种分子量约为 40×10^3 的Ⅱ型跨膜糖蛋白，属于肿瘤坏死因子/神经生长因子超家族的成员，主要表达于活化的 T 细胞和 B 细胞。FasL 以三聚体形式与 Fas 结合可诱导神经鞘磷脂酶活化，分解神经鞘磷脂生成神经酰胺，后者通过丝/苏氨酸蛋白激酶等激活第二信使途径，从而引发一系列生化反应介导心肌细胞凋亡的发生[2]。本研究免疫组化结果显示，在大鼠心肌细胞均存在 Fas 和 FasL 的表达，表明心肌细胞也是 FasL 细胞毒作用的重要靶点之一[3]，MI 后大鼠心肌细胞 Fas 和 FasL 的 mRNA 和蛋白表达进行性增高，并与心肌细胞凋亡指数呈一致性变化趋势，提示 Fas 和 FasL 表达上调启动 MI 后大鼠心肌细胞凋亡的重要信号转导途径。Bcl-2 是第一个被发现与凋亡有关的基因，随着近年对其研究的不断深入，目前已发现很多 Bcl-2 的同源基因/蛋白，其中包括具抑制细胞凋亡作用的 Bcl-2、Bcl-XL、McLl、Al 及 Bfel 等，以及具促进细胞凋亡作用的 Bax、Bad、Bcl-XS、Bak 及 Bik 等。Bcl-2 家族成员有自身或相互结成二聚体/多聚体的能力，以蛋白-蛋白相互作用的方式调节细胞存活或凋亡。Bcl-2 抑制细胞凋亡的机制可能包括：①直接抗氧化作用；②抑制线粒体释放细胞色素 C 等促凋亡蛋白；③抑制 Bax、FasL 的细胞毒作用；④抑制 caspase 的激活；⑤维持细胞内钙平衡；⑥抑制核酸内切酶对 DNA 的降解。本研究结果显示，MI 后大鼠心肌细胞 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达下降，表明 Bcl-2 表达下降参与对大鼠 MI 后心肌细胞凋亡的调控[4,5]。

综上所述，心肌细胞凋亡是大鼠 MI 后 CHF 发生、发展的重要病理生理机制之一，Fas 和 FasL 的表达上调是 MI 后 CHF 大鼠心肌细胞凋亡的重要启动、介导因素，Bcl-2 表达水平下降参与心肌细胞凋亡的调控执行。通过药物和/或基因治疗抑制 Fas 和 FasL 的表达、促进 Bcl-2 的表达，以减少心肌细胞凋亡，可望成为今后治疗 CHF 的手段之一。

参考文献：

[1] Sam F, Sawyer D B, Chang D L, *et al*. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 48 (1): H422－H428.

[2] Yamaoka M, Yamaguchi S, Suzuki T, *et al*. Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin [J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(6): 881－889.

[3] Wollert K C, Heineke J, Westermann J, *et al*. The cardiac Fas(APO－1/CD95) receptor/Fas ligand system relation to diastolic wall stress in volume-overload hypertrophy in vivo and activation of the transcription factor AP-1in cardiac myocytes [J]. Circulation, 2000, 101(3): 1 172－1 178.

[4] Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281(5 381): 1 322－1 326.

[5] Condorelli G, Morisco C, Stassi G, *et al*. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat [J]. Circulation, 1999, 99 (23): 3 071－3 078.

（编辑 郭建秀）

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