

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0289-05

• 实验研究 •

自发性高血压大鼠左心室重构中的细胞凋亡

陈卫兵, 蒲红, 秦永文¹, 殷明²

(解放军第 85 医院心内科, 上海, 200052; 1. 长海医院心内科; 2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海, 200433)

[关键词] 细胞凋亡; 心肌重构; 高血压/自发性; 内皮, 血管

[摘要] 为探讨细胞凋亡在高血压大鼠左心室重构中的变化及其作用, 以 16 周龄雄性自发性高血压大鼠和正常血压对照大鼠为研究对象, 左心室中轴切片, 应用 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法检测心肌组织细胞凋亡, 透射电镜观察凋亡细胞的超微结构和细胞类型, LSAB 免疫组织化学法检测细胞膜死亡受体分子 Fas 蛋白的细胞定位。结果发现, 与同龄正常血压对照大鼠相比较, 16 周龄自发性高血压大鼠左心室肥厚指数显著增高; 光镜观察发现, 心肌细胞凋亡指数显著增加[以 10^4 个核为计算单位(下同), 自发性高血压组为 19.54 ± 7.27 , 正常血压对照组为 6.92 ± 4.35 , $P < 0.05$], 并可见小血管内皮细胞和浸润心肌的白细胞凋亡, 但纤维细胞凋亡指数显著下降(自发性高血压组为 5.88 ± 2.15 , 正常血压对照组为 14.34 ± 9.56 , $P < 0.05$)。电镜观察发现, 自发性高血压大鼠可见凋亡的内皮细胞和心肌细胞, 内皮细胞凋亡多发生于萎缩的毛细血管, 血管周围有纤维组织增生; 正常血压对照大鼠可见凋亡的纤维细胞。Fas 蛋白在自发性高血压大鼠主要定位于心肌细胞, 在正常血压对照大鼠主要定位于纤维细胞。实验提示高血压左心室重构中细胞凋亡类型发生了改变, Fas 受体途径可能与此改变有关。寻找靶细胞特异的细胞凋亡调节剂可能具有重要的临床意义。

[中图分类号] R544.1

[文献标识码] A

Apoptosis in Left Ventricular Remodeling of Spontaneously Hypertensive Rats

CHEN Wei-Bing, PU Hong, QIN Yong-Wen, and YIN Ming

(Department of Cardiology, The 85th Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

MeSH Apoptosis; Remodeling, Myocardium; Hypertension/spontaneous; Endothelium, Vascular

ABSTRACT **Aim** In order to study the change and role of apoptosis in hypertensive left ventricular remodeling. **Methods** Hearts from 16-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and age-matched normotensive Wistar-Kyoto rats (WKY) were investigated. Apoptosis in left ventricle sections was assessed by an in situ end labeling technique (TUNEL), the feature and type of cells undergoing apoptosis were identified ultrastructurally by transmission electron microscope (ECM). Additionally, localization of Fas protein a mediator of apoptotic cell death was examined by immunohistochemistry. **Results** Compared with 16-week-old WKY, 16-week-old SHR exhibited increased hypertrophic index, the apoptotic frequency of myocytes was also increased (19.54 ± 7.27 vs $6.92 \pm 4.35/10^4$ nucleus, $P < 0.05$), whereas the apoptotic frequency of fibroblasts was significantly decreased (5.88 ± 2.15 vs $14.34 \pm 9.56/10^4$ nucleus, $P < 0.05$). Moreover, apoptotic endothelial cells and leukocytes infiltrated into myocardium were also identified in SHR. Features of apoptotic myocytes and endothelial cells were observed by ECM in SHR. The latter often occurred in shrunken capillaries surrounded by collagen fragments. The distribution of Fas antigen protein was mainly confined to myocytes in SHR, but limited to interstitial fibroblasts in WKY, consistently with the type of cells undergoing apoptosis in these two strains. **Conclusion** This study first suggest that apoptosis of different cell type may work synthetically in hypertensive myocardial remodeling, and Fas antigen may be associated with the mechanisms of these apoptotic process. Our findings also have important significance in searching new avenues for treatment with appropriate site-specific physiological or pharmacological regulators of apoptosis.

细胞凋亡 (apoptosis) 是一种基因控制的、机体主动清除损伤或无用细胞的过程^[1]。在正常组织, 细

[基金项目] 国家教委回国人员科研基金资助

[作者简介] 陈卫兵, 男, 1967 年 3 月出生, 博士, 主治医师, 研究方向为高血压病理生理。蒲红, 女, 1962 年 5 月出生, 副主任医师, 上海市心脏电生理学会会员。秦永文, 男, 1950 年 10 月出生, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病诊疗的基础与临床研究。殷明, 男, 1951 年 2 月出生, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心脑血管药理机制研究。

胞凋亡和细胞增殖共同调节细胞数量和组织结构。有关心肌细胞凋亡的证据最先由 Bing 于 1994 年提出,运用 Masson's 三重染色法观察到一例老龄自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)肥厚左心室中的心肌细胞凋亡现象,为心肌细胞凋亡提供了间接的形态学证据^[2]。此后,有许多研究报告,SHR 心肌细胞凋亡指数较其正常血压对照大鼠(Wistar-Kyoto rats, WKY)增加,并被认为是心肌代偿性肥厚向心力衰竭过渡的重要机制之一^[3-6]。但近来也有人认为细胞凋亡在高血压心肌重构和心力衰竭发生中无重要意义^[7]。为进一步探讨高血压左心室重构中细胞凋亡的变化及其作用,本实验采用脱氧核苷酸末端转移酶介导的脱氧三磷酸尿苷缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测 16 周龄 SHR 和 WKY 大鼠心肌组织中的细胞凋亡,以透射电镜观察凋亡细胞的超微结构和细胞类型。同时应用免疫组织化学方法检测凋亡相关基因 Fas 的蛋白表达。

1 材料和方法

1.1 动物取材

雄性 SHR ($n=8$) 和 WKY ($n=10$) 由第二军医大学药理学教研室提供。每笼 2 只,标准饲养,光照 12 h/日。取材前 3 日用尾套法测量动脉收缩压。动物经戊巴比妥钠麻醉后迅速分离左心室称重,以左心室质量/体重比代表左心室肥厚指数。由左心室中部垂直于长轴切取 4 mm 厚组织块,4℃固定 24 h, PBS 冲洗,石蜡包埋。所有标本制作条件严格相同以避免人工误差。

1.2 TUNEL 原位末端标记

检测方法参照 Boehringer Mannheim 公司试剂盒加以改进。微波加热打开交联的 DNA 缺口。正常羊血清封闭非特异性 IgG 结合位点。TUNEL 反应液和碱性磷酸酶偶联的抗荧光素抗体稀释成适当浓度。NBT/BCIP 显色。阴性对照片不加 TdT 或 dUTP。在高倍显微镜下观察,根据原位末端标记的判断标准及细胞形态,确定凋亡细胞及细胞起源^[8]。用 DIPAS-200 生物组织图像分析仪(上海定诚生物工程公司)分别计算心肌细胞核和纤维细胞核占总细胞核的凋亡指数(apoptotic index, AI; 以每 10^4 个核中凋亡细胞核个数表示)。

1.3 透射电镜观察

取左心室中部心肌中层 1 mm^3 组织块,迅速固定于 2% 多聚甲醛-1% 戊二醛缓冲液(pH 7.2)中。四氧化锇固定后,醋酸铀、枸橼酸铅双重染色, H-600 透射电镜观察。

1.4 免疫组织化学检测 Fas 蛋白表达

抗 Fas 单克隆抗体和 LSAB 免疫试剂盒为 DAKO 公司产品。实验步骤参照 Liu 等^[9]方法和说明书进行。简述如下:切片脱腊至水, 2% H_2O_2 甲醇液阻断内源性过氧化物酶,梯度酒精脱水,微波 98℃ 于柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中加热 10 min 修复抗原。正常羊血清室温封闭 45 min,加抗 Fas 单克隆抗体(1:100) 4℃过夜,生物素化桥联抗体(1:200)室温孵育 1 h, streptavidin-HRP (1:400) 室温 1 h, 0.04% DAB-0.1% H_2O_2 显色,苏木素衬染。计算心肌细胞和纤维细胞的阳性率。

1.5 资料分析

数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采用非配对 t 检验。

2 结果

2.1 血压和左心室肥厚指数

16 周龄 SHR 与同龄 WKY 相比较,动脉收缩压明显升高(前者 186 ± 19 mm Hg, 后者 123 ± 9 mm Hg, $P < 0.01$)。尽管两株大鼠体重相似(前者 335 ± 12 g, 后者 321 ± 7 g, $P > 0.05$),但左心室肥厚指数仍显著增加(前者 2.95 ± 0.12 mg/g, 后者 2.41 ± 0.09 mg/g, $P < 0.05$),表明 16 周龄 SHR 存在左心室肥厚。

2.2 TUNEL 原位末端标记

阳性信号定位于细胞核,随阳性强度的不同呈蓝或蓝黑色。WKY 心肌大多数凋亡细胞为纤维细胞,散在分布于心肌各层,其 AI 为 14.34 ± 9.56 ,心肌细胞 AI 为 6.92 ± 4.35 ,未见血管内皮细胞凋亡。在 SHR, TUNEL 阳性细胞主要为心肌细胞和小血管内皮细胞,并可见少量的纤维细胞和浸润心肌的白细胞凋亡(图 1, Figure 1)。凋亡的心肌细胞呈单个或 2~4 个小灶性散在分布于心肌各层,尤以邻近心内膜处明显,其 AI 为 19.54 ± 7.27 ,显著高于 WKY ($P < 0.05$)。SHR 纤维细胞 AI 为 5.88 ± 2.15 ,显著低于 WKY ($P < 0.05$)。阴性对照片未见着色的阳性细胞核。

2.3 透射电镜

电镜下 WKY 心肌细胞核染色质分布均匀,细

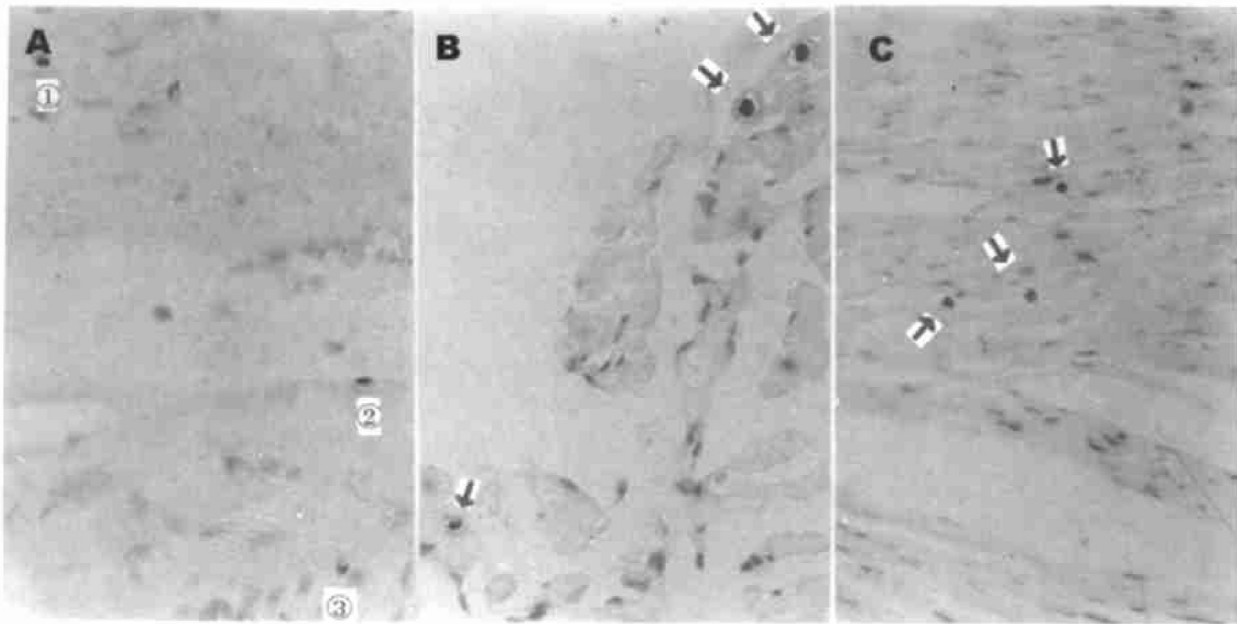


图 1. TUNEL 法检测自发性高血压大鼠心肌组织细胞凋亡

Figure 1. Photomicrographs showing apoptotic cells identified by TUNEL method in the LV from SHR (TUNEL). A: Apoptotic cells of different cell type in a field ($\times 400$). ① myocyte; ② fibroblast; ③ endothelial cell. B: Apoptotic myocytes are more likely to be localized in the subendocardial layer of left ventricle ($\times 400$). C: Apoptotic leukocytes infiltrated into the LV of SHR ($\times 200$).

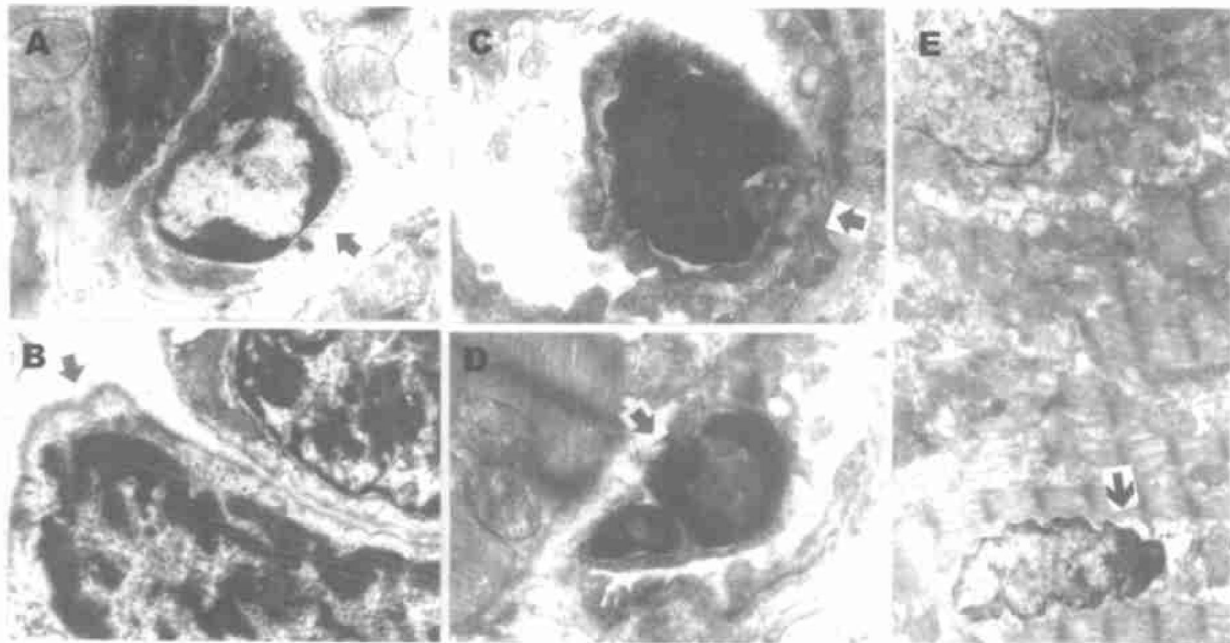


图 2. 细胞凋亡的透射电镜观察

Figure 2. Electron microscope of the heart from 16-week-old WKY (Figure 2A) and SHR (Figure 2B-2E). A: An apoptotic fibroblast showing fragmentation of the nuclear, condensation of the nuclear chromatin against the nuclear envelope, $\times 12\,000$. B: Normal endothelial cell showing close connection with basement membrane and with scattered distribution of chromatin, $\times 12\,000$. C and D: Apoptosis of endothelial cells occurred in shrunken capillaries which were often surrounded by collagen. C: in the early stage of apoptosis, cell became small with shrunken membrane and condensed chromatin against the nuclear envelope. The vessel basement membrane was broken down, indicating abnormal protrusion of the cells toward the vessel lumen. D: in the late stage of apoptosis, the cell showing fragmentation of nuclear with integrated membrane, $\times 15\,000$. E: Dense and compacted chromatin in the nuclear of a myocyte, such a change is indicative of apoptotic cell death in the early stage, $\times 8\,000$.

胞器完整,未见凋亡和坏死的形态改变;相反,部分间质纤维细胞呈现典型的核染色质凝集附边,或核碎裂的凋亡改变(图 2A, Figure 2A)。在 SHR,心肌细胞旁的毛细血管内皮细胞凋亡较多见,并有心肌细胞凋亡的核改变。图 2B(Figure 2B)显示正常的毛细血管内皮细胞,与基底膜结合紧密,核染色质分布均匀;图 2C(Figure 2C)显示凋亡早期的内皮细胞体积缩小、胞膜皱缩、染色质呈周边凝集,细胞基底膜破坏,有脱离内皮突入管腔的趋势;中晚期则见核碎裂但胞膜完整(图 2D, Figure 2D)。内皮细胞凋亡多

见于萎缩的毛细血管,血管旁有纤维组织增生样变。凋亡的心肌细胞核染色质呈块状积聚在核膜下,胞浆浓缩(图 2E, Figure 2E)。

2.4 免疫组织化学

Fas 阳性颗粒定位于胞膜和胞浆。纤维细胞阳性率较 AI 偏高, WKY 为 0.29 ± 0.11 , SHR 为 0.11 ± 0.04 , 两组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。心肌细胞阳性率稍低于其 AI 值, WKY 为 0.05 ± 0.02 , SHR 为 0.14 ± 0.09 , 两组亦有显著差异($P < 0.05$)。阴性对照片未见阳性表达(图 3, Figure 3)。

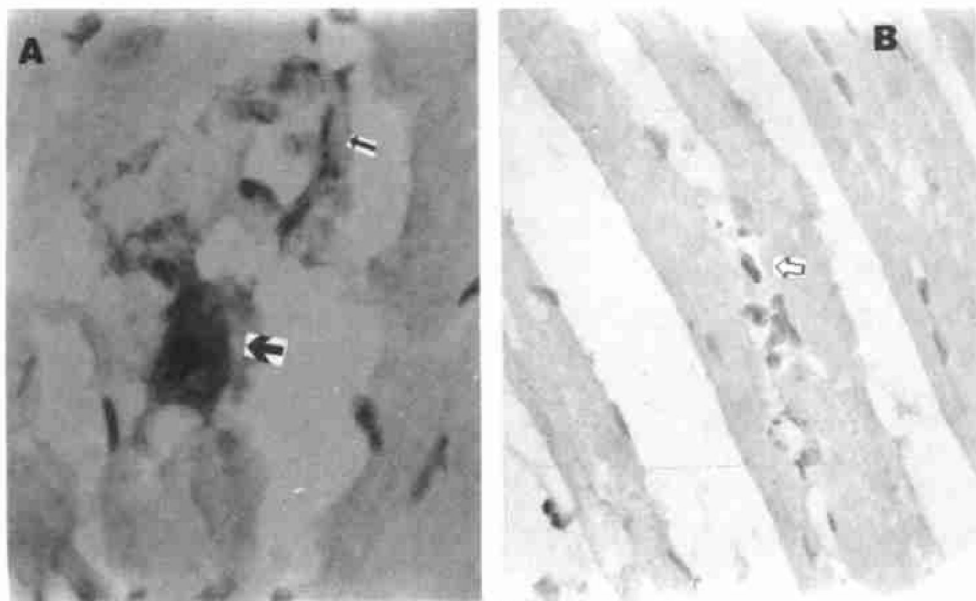


图 3. Fas 免疫组织化学染色 (LSAB 法) $\times 600$

Figure 3. Photomicrographs illustrating Fas monoclonal anti-body labeling of the LV in SHR (A) and WKY (B), LSAB $\times 600$. A: Fas positive signals were located at myocytes and endothelial cells. B: Fas positive signals were located at fibroblasts.

3 讨论

在体研究表明心肌细胞凋亡可发生于心肌梗死、扩张型心肌病、心力衰竭等心脏疾病^[10]。Hamet 等运用同位素原位末端标记法发现, SHR 心、脑、肾靶器官中细胞凋亡程度较 WKY 高但表现为一定时相性(8~16 周龄), 在高血压小鼠心肌, 凋亡细胞为心肌细胞^[3,4]。本实验发现 16 周龄 SHR 表现为过度的心肌细胞和毛细血管内皮细胞凋亡, 而纤维细胞的凋亡指数反而较 WKY 显著下降。表明在遗传性高血压大鼠模型, 心肌组织的凋亡细胞类型发生了改变。提示不同类型的细胞凋亡在高血压左心室重构中起协同作用。

现已明确, 肥厚心肌存在毛细血管网的稀疏和减少, 但其发生机制不很明确。Gobe 等^[11]在一肾钳夹型高血压大鼠骨骼肌中发现小血管内皮细胞凋

亡。作者通过 TUNEL 标记发现 SHR 心肌组织中小血管内皮细胞发生凋亡, 透射电镜观察表明内皮细胞凋亡更多见于供应单个心肌细胞的毛细血管, 而 WKY 内皮细胞无凋亡样改变。提示内皮细胞凋亡是高血压毛细血管网减少的重要机制, 其发生进一步加剧了心肌病理性重构过程。

心肌组织包括多种组织细胞, 心肌细胞占心脏体积的 75%, 但只占细胞总量的 1/3, 大多数细胞为纤维细胞。纤维细胞受多种机械和体液因子的调节, 在心脏的生长和重构中发挥重要的作用^[12]。最近的研究表明, 各年龄段 SHR 心脏中心肌细胞发生凋亡, 但纤维细胞数目较 WKY 增加^[13]。本研究综合应用原位末端标记法和电镜分析首次表明, 纤维细胞凋亡指数在 SHR 心肌较 WKY 明显下降, 提示纤维细胞程序性死亡的减少在高血压间质纤维化形

成中起重要作用。

实验同时发现高血压心肌组织中浸润的白细胞凋亡。这种炎症细胞的主动死亡正反映了机体通过凋亡途径清除有害细胞的一种保护性反馈调节。

Fas 蛋白是一种细胞膜表面受体分子,与其配体结合可导致 Fas 表达细胞死亡。早期的研究表明缺氧可致体外培养的心肌细胞凋亡,其 Fas mRNA 表达增高;而同样条件下心肌成纤维细胞不发生凋亡,其 Fas mRNA 表达反而下降^[14],提示不同的心肌组织细胞对凋亡诱导因素的反应性不同。在体研究也提示 Fas 蛋白表达可能介导心肌细胞凋亡^[9,15]。但 Inukai 的研究表明,在人病变的骨骼肌中, Fas mRNA 表达量增高仅是一种表象,与肌细胞凋亡无关^[16]。本研究证明,在正常血压大鼠 WKY, Fas 蛋白表达于纤维细胞,而在 SHR 主要表达于心肌细胞, Fas 蛋白表达细胞与凋亡细胞类型一致,提示此两系大鼠心肌组织的细胞凋亡可能通过 Fas 受体途径介导。

总之,本实验提示心肌细胞和毛细血管内皮细胞的过度凋亡。而纤维细胞凋亡的不足导致 SHR 心肌细胞和间质细胞生长的失衡,最终发生高血压病理性心肌重构。本研究同时提示寻找靶细胞特异的细胞凋亡调节剂抑制心肌细胞和毛细血管内皮细胞凋亡,或诱导纤维细胞凋亡,可能具有重要的基础和临床意义。

参考文献

- [1] Thatté U, Dahanukar S. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation [J]. *Drugs*, 1997, **54** (4): 511-532
- [2] Bing OH. Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, **26**: 642-648
- [3] Hamet P, Richard L, Dam TV, et al. Apoptosis in target organs of hypertension [J]. *Hypertension*, 1995, **26**: 642-648
- [4] Hamet P, Moreau P, Dam TV, et al. The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling [J]. *J Hypertens*, 1996, **14** (Suppl 5): S65-S70
- [5] Li Z, Bing OH, Long X, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat [J]. *Am J Physiol*, 1997, **272**: H2313-319
- [6] Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, et al. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT-1 blockade with losartan [J]. *Hypertension*, 1998, **32** (2): 280-286
- [7] Tamura T, Said S, Lu W, et al. Is apoptosis present in progression to chronic hypertensive heart failure [J]? *J Card Fail*, 2000, **6** (1): 37-42
- [8] Migheli A, Cavalla P, Marino S, et al. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end labeling of DNA strand breaks [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1994, **53** (6): 606-609
- [9] Liu Y, Cigola E, Cheng W, et al. Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs [J]. *Lab Invest*, 1995, **73** (6): 771-787
- [10] Haunletter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 1998, **97** (14): 375-381
- [11] Gobe G, Browning J, Howard T, et al. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction [J]. *J Struct Biol*, 1997, **118**: 63-72
- [12] Dostal DE, Booz GW, Baker KM. Angiotensin I^{II} signal pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function [J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, **157**: 15-21
- [13] Liu JJ, Peng L, Bradley LJ, et al. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **45** (3): 729-735
- [14] Tanaka M, Ito H, Adachi S, et al. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas mRNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 1994, **75**: 426-433
- [15] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarcted size in rats [J]. *Lab Invest*, 1996, **74**: 86-107
- [16] Inukai A, Kobayashi Y, Honda H, et al. Fas antigen is expressed in human diseased muscles, but not link to apoptosis [J]. *Nippon Rinsho*, 1996, **54** (7): 1992-996

(此文 2000-10-01 收到, 2001-05-08 修回)

(此文编辑 胡必利)