

压力超负荷致心肌细胞增殖细胞核抗原和周期素 D1 的表达变化及其与心肌肥大的关系

刘进军¹, 王晓虹², 苏兴利³, 周娟¹, 刘瑞¹, 林元喜¹, 高广道¹

(1. 西安交通大学医学院病理生理教研室; 2. 西安交通大学附属第一医院干 2 病区, 陕西省西安市 710061;

3. 陕西医学高等专科学校病理生理教研室, 陕西省西安市 710068)

[关键词] 病理学与病理生理学; 心肌细胞增殖; 免疫组织化学方法; 压力负荷; 增殖细胞核抗原; 周期素 D1; 心肌肥大

[摘要] 目的 观察压力超负荷所致肥大心肌中增殖细胞核抗原和周期素 D1 的表达变化, 探讨其与心肌肥大的相互关系。方法 采用腹主动脉缩窄法建立大鼠心肌肥大模型, 在术后不同时间点用颈总动脉插管法动态测定心功能并观察左心室/体重比及心肌细胞横径的变化, 用免疫组织化学方法检测心肌细胞增殖细胞核抗原和周期素 D1 表达变化, 分别计算其阳性细胞占总心肌细胞数的比率。结果 腹主动脉缩窄术后各时间点左心室/体重比及心肌细胞横径进行性增高 ($P < 0.05$), 同时心功能也进行性增强 ($P < 0.05$)。增殖细胞核抗原和周期素 D1 阳性率术后 1 周时显著增高 ($P < 0.01$), 随后逐步回降, 6 周时同对照组相比差异无显著性。结论 心肌肥大中不仅有心肌细胞体积的增大而且早期伴有增殖指标高表达, 这种增殖指标的高表达随着心脏对负荷的适应逐步回降至正常水平, 而心肌细胞体积仍进行性增大。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expressional Changes of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Cyclin D1 in Cardiomyocytes Induced by Pressure Overload and the Relationship between these Changes and Myocardial Hypertrophy

LIU Jin Jun¹, WANG Xiao Hong², SU Xing Li³, ZHOU Juan¹, LIU Rui¹, LIN Yuan Xi¹, and GAO Guang Dao¹

(1. Department of Pathophysiology, Medical College of Xi'an Jiaotong University; 2. Ward of 2nd Cadre, First Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; 3. Department of Pathophysiology, Shanxi Medical College, Xi'an 710068, China)

[KEY WORDS] Pressure Overload; Aorta Constriction; Cell Cycle; Myocardial Hypertrophy; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Cyclin D1

[ABSTRACT] **Aim** To observe expressional change of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and cyclin D1 of cardiomyocytes in hypertrophic myocardium induced by pressure overload and investigate the relationship between cardiomyocytes hyperplasia and myocardial hypertrophy. **Methods** Rat models of pressure overload were produced by aorta constriction(AC). Myocardial mechanics were measured by carotid artery canal connected with pressure transducer and the changes of LV/Bwt and myocardium transverse diameter(TDM) were determined. The expressions of PCNA and cyclin D1 were detected by immunohistochemical method and the ratio of positive cardiomyocytes nuclear and total cardiomyocytes nuclear were then calculated. **Result** Myocardial mechanics and left ventricular mass index of AC group were significantly higher than that of matchable SO group ($P < 0.05$), and progressively increased in 1, 3, 6 weeks after AC. A significant increase of positive ratios of PCNA and cyclin D1 followed by a gradual decline from it peak in the 1st week to normal in 6th week after AC were observed. **Conclusion** There were not only the enlarging of cellular size but also the higher expression of proliferation marker in early stage of myocardial hypertrophy. This expression of proliferation marker gradually fall to normal level along with the adaption of heart to pressure overload, while the cardiomyocytes size remained progressive enlargement.

大多数研究认为, 出生后很快心肌细胞即退出细胞周期(cell cycle), 成熟心肌细胞就是终末分化

细胞, 肥大被认为是心脏中成熟心肌细胞生长的唯一方式。最近一些来自相关动物模型的研究为成熟心肌细胞分裂提供了证据^[1-3], 这些研究表明心肌梗死发生后非梗死区心肌细胞立即表达细胞周期早期和晚期的生长相关基因, 细胞周期素 E、A 和 B 的表达量增加; 通过组织切片和心肌细胞分离技术已测定出其他心力衰竭模型心肌细胞有丝分裂指数^[4]。本实验通过压力超负荷大鼠模型, 测定术后不同时

[收稿日期] 2004-10-11 [修回日期] 2005-05-16

[作者简介] 刘进军, 硕士研究生, 研究方向为心力衰竭的发生机制, 联系电话为 13609159912, E-mail 为 jupet@163.com。王晓虹, 副教授, 硕士研究生, 研究方向为高血压发病机制, 联系电话为 029-85324042, E-mail 为 bigdragon315@yahoo.com.cn。通讯作者高广道, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心力衰竭的机制研究, 联系电话为 029-82655164, E-mail 为 gaogd@mail.xjtu.edu.cn。

间点心肌细胞肥大变化及心肌细胞增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和周期素 D1 (cyclinD1) 的表达, 进而探讨心肌细胞增殖指标表达的持续时间及其与心肌细胞肥大的关系。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

健康成年雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 230~270 g (由西安交通大学实验动物中心提供)。随机分为 2 组, 每组 30 只。腹主动脉缩窄 (aortic constriction, AC) 组: 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 于左肾动脉上方小心分离约 3 mm 长腹主动脉, 套以内径为 0.8 mm 的银夹缩窄腹主动脉。④假手术 (sham operation, SO) 组: 除不以银夹缩窄腹主动脉外, 其余操作同 AC 组。每组又分为 1 周、3 周和 6 周 3 个亚组。

1.2 心功能及心肌肥大指数测定

采用颈总动脉插管法, 在监视器观察下将插管送入左心室, 稳定约 2 min, 记录左心室最大收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP) 及左心室内压最大变化率 ($\pm dp/dt_{max}$)。最后处死大鼠, 测取左心室重 (包括左心室游离壁和室间隔), 计算左心室重与体重比值 (LV/Bwt) 作为心肌肥大指数。

1.3 形态学测量

在 HE 染色切片上使用目镜测微尺测量心肌细胞横径 (transection diameter, TDM)。高倍镜下 (10×40) 在心肌纵断面, 随机选取 30 个胞浆横纹清晰、胞核完整、形状规则的心肌细胞, 测量有核处横径, 取其均值为该例左心室心肌细胞横径 (left ventricular cardiomyocytes TDM, LVTDM)。

1.4 免疫组织化学法

按 Elivision 法进行免疫组织化学染色。小鼠抗大鼠 PCNA 和周期素 D1 单克隆抗体于 4℃ 冰箱中过夜。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗于 37℃ 孵育 30 min。以 PBS 替代一抗作阴性对照。分别计算左心室 PCNA 增殖指数 (left ventricular PCNA proliferation index, LVPI) 和左心室周期素 D1 增殖指数 (left ventricular cyclin D1 proliferation index, LVCI)。

1.5 统计学处理

运用 SPSS10.0 统计软件对所得数据进行分析。各数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据处理采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 左心室肥厚指数及心肌细胞横径的变化

大鼠腹主动脉缩窄术后 1 周、3 周和 6 周时,

LV/Bwt 与其对照组相比均显著增高 ($P < 0.01$), 且 3 组间有明显的递增关系 ($P < 0.05$)。腹主动脉缩窄术后 LVTDM 在 1 周、3 周和 6 周时与各自对照组相比均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且各组间呈现进行性递增现象 ($P < 0.05$) (表 1, Table 1)。

表 1. 各组心体重比和心肌细胞横径的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The changes of LV/Bwt and LVTDM in various group

分 组	<i>n</i>	LV/Bwt (mg/100 g)	LVTDM (μm)
SO _{1w}	9	205 \pm 10	11.90 \pm 1.79
SO _{3w}	8	218 \pm 9	13.65 \pm 1.26
SO _{6w}	9	207 \pm 8	14.13 \pm 1.98
AC _{1w}	6	256 \pm 10 ^a	14.24 \pm 1.26 ^a
AC _{3w}	7	269 \pm 11 ^a	16.22 \pm 1.45 ^{ab}
AC _{6w}	6	296 \pm 22 ^{ab}	20.05 \pm 2.56 ^{abc}

a: $P < 0.05$, 与对应 SO 组比较; b: $P < 0.05$, 与 AC_{1w} 组比较; c: $P < 0.05$, 与 AC_{3w} 组比较。

2.2 压力超负荷大鼠心肌力学的变化

与对照组相比, LVSP 在腹主动脉缩窄后 1 周时即显著升高 ($P < 0.05$), 3 周和 6 周时持续升高 ($P < 0.01$), 且 3 组间有明显的递增关系 ($P < 0.05$)。 $\pm dp/dt_{max}$ 在腹主动脉缩窄术后 1 周与对照组相比均略有降低但差异无显著性, 随后呈现进行性增高, 至 6 周时显著高于 AC_{1w} 组 ($P < 0.05$), 其中 + dp/dt_{max} 在术后 6 周时显著高于其对照组 ($P < 0.05$) (表 2, Table 2)。

表 2. 各组大鼠心肌力学指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The changes of myocardial mechanics in rats in various group

分 组	<i>n</i>	LVSP (mm Hg)	+ dp/dt_{max} (mm Hg/s)	- dp/dt_{max} (mm Hg/s)
SO _{1w}	9	121 \pm 9	7 615 \pm 551	6 486 \pm 487
SO _{3w}	8	124 \pm 18	7 726 \pm 983	6 434 \pm 536
SO _{6w}	9	123 \pm 18	7 361 \pm 638	6 965 \pm 1 116
AC _{1w}	6	146 \pm 17 ^a	7 826 \pm 1 018	6 239 \pm 572
AC _{3w}	7	169 \pm 19 ^a	8 408 \pm 653	6 869 \pm 606
AC _{6w}	6	185 \pm 30 ^{ab}	9 881 \pm 1 269 ^{ab}	7 556 \pm 809 ^b

a: $P < 0.05$, 与对应 SO 组比较; b: $P < 0.05$, 与 AC_{1w} 组比较。

2.3 心肌细胞增殖细胞核抗原和周期素 D1 阳性率的变化

各对照组间心肌细胞 PCNA 和周期素 D1 均有低水平表达, 且相互间差异无显著性 (图 1, Figure

1)。AC 术后 1 周 LVPI 和 LVCI 与对照组相比显著增大 ($P < 0.01$), 随着左心室负荷的持续逐步回降,

3 周时仍显著高于对照组 ($P < 0.01$), 6 周时与对照组相比差异已无显著性 (表 3, Table 3)。

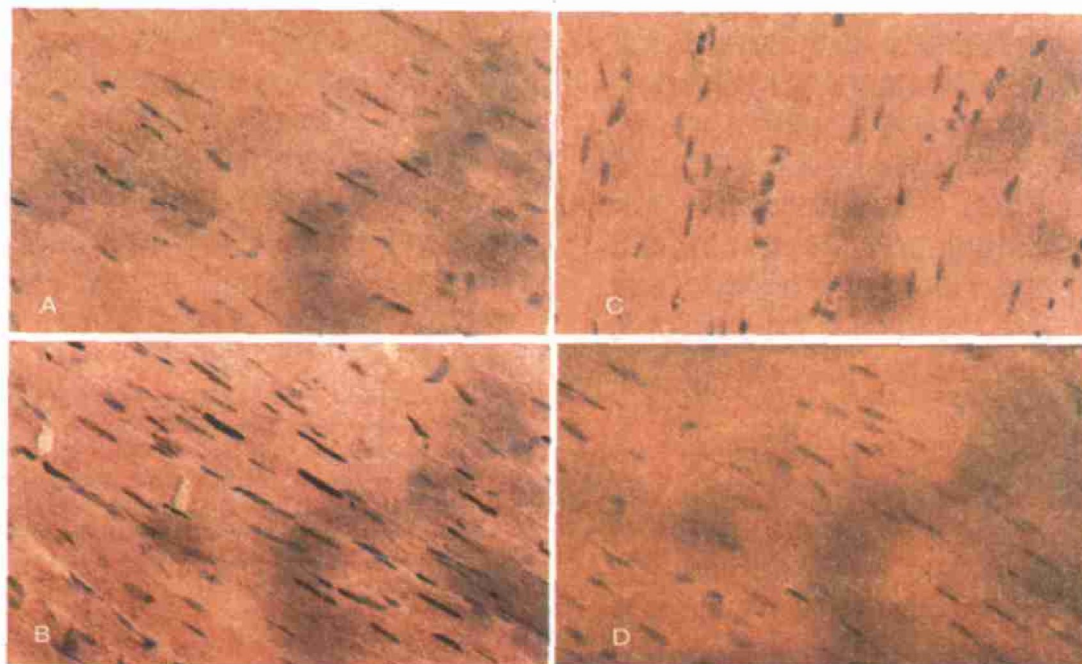


图 1. 各组心肌细胞增殖细胞核抗原和周期素 D1 的表达 ($\times 100$) A 为腹主动脉缩窄术后 6 周增殖细胞核抗原的表达; B 为腹主动脉缩窄术后 1 周时增殖细胞核抗原的表达; C 为腹主动脉缩窄术后 6 周期素 D1 的表达; D 为腹主动脉缩窄术后 1 周时周期素 D1 的表达。

Figure 1. The expression of PCNA and cyclin D1 in cardiomyocytes in various groups (Elivision staining $\times 100$)

表 3. 各组心肌细胞增殖细胞核抗原和周期素 D1 阳性率的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The changes of PCNA and cyclin D1 positive ratio in various group

分 组	n	LVPI (%)	LVCI (%)
SO _{1w}	9	12.90% \pm 2.61%	1.47% \pm 0.28%
SO _{3w}	8	12.31% \pm 1.25%	1.33% \pm 0.70%
SO _{6w}	9	12.62% \pm 1.20%	1.27% \pm 0.27%
AC _{1w}	6	48.45% \pm 9.55% ^a	32.76% \pm 5.72% ^a
AC _{3w}	7	34.68% \pm 5.36% ^{ab}	20.62% \pm 2.31% ^{ab}
AC _{6w}	6	11.40% \pm 1.81% ^{bc}	1.56% \pm 0.31% ^{bc}

a: $P < 0.05$, 与对应 SO 组比较; b: $P < 0.05$, 与 AC_{1w} 组比较; c: $P < 0.05$, 与 AC_{3w} 组比较。

3 讨论

传统观念认为心肌细胞是终末分化细胞在出生后很快即退出细胞周期, 但是最近不少相关研究表明成熟心肌细胞具有分裂增殖能力, 可以重回细胞周期, 分裂产生新细胞以适应负荷改变^[1,2]。本实验采用银夹缩窄大鼠腹主动脉, 复制压力超负荷动物

模型^[5], 结果显示大鼠在 AC 术后 1 周时心室后负荷即明显增高, 同时出现明显的心肌肥大, 并且随着左心室压力负荷增高持续时间延长, 心肌肥大程度进行性加重。

增殖细胞核抗原在 DNA 复制和细胞周期过程中具有重要调控作用。一般认为 PCNA 阳性细胞是处于增殖期的细胞, 是目前比较常用的判断细胞增殖的标志物。不足之处是由于 PCNA 参与 DNA 的修复, 故假阳性率较高^[6]。周期素 D1 可诱导细胞进入 S 期, 是 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白, 可作为各种细胞, 包括心肌细胞重回细胞周期的标志物^[7]。Elledge 等^[8]在研究中发现, 通常当细胞通过细胞周期 G1 期的“R”点时将最终分裂成两个子细胞。周期素 D1 和 PCNA 的阳性表达分别代表着细胞通过“R”点进入 S 期和 DNA 的大量复制, 从本实验结果可以看出两者的变化趋势完全一致, 共同印证压力负荷持续增大使心肌细胞重回细胞周期。关于心肌细胞增殖指标的表达, 不同文献报道差异较大, Quaini 等^[9]在研究中发现患者左心室心肌细胞 PCNA 阳性率高达 49% \pm 19%, 而其他相关报道多在

10% 以下。本实验中 PCNA 和周期素 D1 阳性率与其他一些文献相比偏高, 分析可能的原因是: 刺激强度的差异: 本实验采用的银夹内径为 0.8 mm, 术后有近三分之一的大鼠死于急性左心力衰竭, 与其他致心室负荷增加方法的死亡率相比偏高, 提示可能缩窄程度偏大。同时其增殖阳性率也较其他资料明显偏高, 提示增殖表达可能与刺激的强度有关。这也可能是同样动物模型、不同报道的心肌细胞增殖率相差较大的原因之一。④测时间点不同: 本实验结果显示出心肌细胞增殖能力有随着对负荷的适应而逐渐降低的趋势, 如果检测时间比较靠后, 检测到的阳性率自然偏低。而国内外关于心肌细胞是否具有增殖能力的研究大多集中在心力衰竭终末阶段。

结合相关文献报道和本实验结果分析可知, 心肌细胞增殖受生长因子^[10]、细胞周期负性调节分子^[11]和细胞周期正性调节分子^[12]等多因素形成的复杂网络调控机制协同调控, 在负荷增高初期(适应期)激活心肌细胞生长调控机制, 使较多心肌细胞重回细胞周期, 分化增殖产生新的心肌细胞, 以适应心脏负荷增大的需求。至于当心脏压力负荷增高时, 心肌细胞增殖启动及退出的具体机制还有待于进一步研究。推测可能与机械负荷增大使心肌中多种细胞因子表达变化有密切关系^[13]。

不少学者在研究心肌肥大机制时发现, 在肥大初期周期素、CDK 等细胞周期正性调节物明显上调, CDKI 等细胞周期负性调节物明显下调^[12], 但是这些变化都看作是心肌肥大的信号机制, 把增殖指标上调归结为细胞肥大时合成蛋白的需要。本实验以增殖指标代表细胞数目的增加, 以细胞横径代表心肌细胞体积的增大, 把心肌肥大分为两个相对独立的过程。从实验结果可以看出在负荷改变初期, AC 后 1 周时, LVPI 与 LV/Bwt 正相关($r = 0.938, P < 0.05$), LVTDM 与 LV/Bwt 也显著相关($r = 0.934, P < 0.05$), 提示心肌细胞增殖和肥大同时发生, 共同促进心肌肥大发展。随着对刺激的适应, 增殖逐渐减弱, 心肌细胞肥大则继续发展, AC 后 6 周时 LVPI 与 LV/Bwt 无相关性($r = 0.319, P > 0.05$), 而此时 LVTDM 与 LV/Bwt 则呈现高度相关($r = 0.959, P < 0.01$), 提示 6 周时心肌细胞的增殖已恢复到生

理水平, 而肥大持续发展, 完成了由增殖向肥大的转变。因此心肌肥大应包括细胞增殖和细胞体积的增大两个方面。心肌肥大不但有增殖指标的显著升高, 而且有细胞横径的明显增大和心脏相对重量的增高, 但两者变化的时序存在明显差异。

研究证实压力负荷同样会激活心肌细胞的凋亡和坏死^[14, 15]。因此, 在压力负荷持续增加时, 心肌细胞的增殖与凋亡、坏死间的平衡决定了压力负荷时心肌细胞的数目, 使得心肌细胞增殖具有了一定的隐蔽性, 但可以肯定的是心肌细胞增殖在维持心肌细胞总数及心功能的稳定中发挥着重要作用。

[参考文献]

- [1] Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*, 1998, **83**(1): 1-14
- [2] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001, **344**(23): 1750-1757
- [3] Kajstura J, Leri A, Nicoletta Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in human. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 8801-8805
- [4] Setoguchi M. Activation of cyclins and cyclin-dependent kinases, DNA synthesis, and myocyte mitotic division in pacing-induced heart failure in dogs. *Lab Invest*, 1999, **79**: 1545-1558
- [5] 苏兴利, 高广道, 张润岐, 王左贤, 王新风, 刘进军. 压力超负荷性肥大大心中血管紧张素 II 和肿瘤坏死因子 α 表达的变化及其相互关系. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11**(6): 517-519
- [6] Anversa P, Leri A, Kajstura J. Myocyte Growth and Cardiac Repair. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34**: 91-105
- [7] Dynlacht BD. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature*, 1997, **389**(6647): 149-152
- [8] Elledge SJ, Happer JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol*, 1994, **6**: 847-852
- [9] Quaini F, Cigola E, Lagrasta C, Sacconi G, Quaini E, Rossi C, et al. End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ Res*, 1994, **75**: 1050-1063
- [10] 周小波, 何作云, 冯兵. 压力超负荷时大鼠心肌碱性成纤维细胞生长因子表达变化及意义. *高血压杂志*, 1999, **7**(1): 73-76
- [11] Li JM, Brooks G. Downregulation of the cyclin dependent kinase inhibitors, p21 and p27, in pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol*, 1997, **273**: H1358-1367
- [12] Brooks G, Poolman RA, Li JM. Expression and activities of cyclins and cyclin-dependent kinases in developing rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29**: 2261-2272
- [13] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocyte proliferation and ventricular remodeling. *J Card Fail*, 2002, **86**(Suppl): S518-S525
- [14] Braun MU, Szalai P, Strasser RH, Borst MM. Right ventricular hypertrophy and apoptosis after pulmonary artery banding: regulation of PKC isozymes. *Cardiovasc Res*, 2003, **59**(3): 658-667
- [15] 陈卫兵, 蒲红, 秦永文, 殷明. 自发性高血压大鼠左心室重构中的细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9**(4): 289-293

(此文编辑 朱雯霞)