

心肌梗死大鼠非梗死区心肌细胞凋亡与间质纤维化的关系

贾志梅, 高 远, 周 瀛, 张利群, 王洪涛, 齐国先

(中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 心肌梗死; 肾素-血管紧张素-醛固酮系统; 胶原; 凋亡; 大鼠

[摘要] 目的 探讨心肌梗死后非梗死区心肌细胞凋亡与间质纤维化的关系及其机制。方法 雌性 Wistar 大鼠, 通过结扎左冠状动脉前降支制备心肌梗死模型。术后 24 h、1 周、2 周及 4 周随机从各组中各取 10~12 只大鼠, 分别行病理组织学检查及非梗死区心肌组织的胶原容积分数、凋亡细胞、血管紧张素 E 、醛固酮及 iv、 III 型胶原的 mRNA 检测。结果 大鼠梗死范围为 24%~33%。术后 1~4 周心肌梗死组大鼠心肌组织均分布有原位末端标记法染色阳性心肌细胞, 且凋亡细胞指数逐渐升高; 血管紧张素 E 水平逐渐升高; III 型胶原 mRNA 升高。2~4 周时心肌梗死组间质亮绿色胶原明显增多, 胶原容积分数随着梗死后时间的延长而增加; 醛固酮开始升高; iv 型胶原 mRNA 明显上升。结论 大鼠心肌梗死 2 周后非梗死区心肌发生细胞凋亡。大鼠心肌梗死 2 周后非梗死区心肌出现间质纤维化。非梗死区间质纤维化可能与局部肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活有关。细胞凋亡可能与间质胶原过度沉积有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relation of Myocardial Apoptosis and Interstitial Fibrosis in Rats with Myocardial Infarction in Non-infarct Zone

JIA Zhi-Mei, GAO Yuan, ZHOU Ying, ZHANG Li-Qun, ZHOU Ying, WANG Hong-Tao, and QI Guo-Xian

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110001, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Renin Angiotensin Aldosterone System; Collagen; Apoptosis; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To study the relation of myocardial apoptosis and interstitial fibrosis in non-infarct zone during the subsequent stages after infarction and its mechanisms by setting up an infarcted model of rat. **Methods** 10~12 female rats underwent sham operation or left coronary artery ligation, were killed after 24 h, 1 week, 2 weeks and 4 weeks of operation respectively. Left ventricular structure was observed by HE staining, Masson staining was used for the determination of collagen volume fraction (CVF), TUNEL was used for detection of apoptotic cells, radioimmunoassay was used for cardiac Ang E and Ald contents and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for genes expression of collagen type 1 and collagen type 3.

Results The infarction sizes were 24%-33%. From 7 days to 28 days after operation, the apoptotic cells and the apoptotic index increased, the Ang E level increased gradually ($P < 0.05 \sim 0.001$), collagen type 3 mRNA grey level was significantly higher in MI group ($P < 0.05$). From 14 days to 28 days after operation, the CVF increased gradually along with the course of infarction ($P < 0.05 \sim 0.01$), ALD level increased gradually and collagen type 1 mRNA grey level was markedly higher in MI group ($P < 0.05 \sim 0.01$).

Conclusions Apoptosis happened in non-infarct zone 14 days after MI in rats. There was interstitial fibrosis in non-infarct zone 14 days after MI in rats. The interstitial fibrosis might be associated with activation of cardiac RAAS. The apoptosis of cardiocytes in non-infarct zone might be related with the excess deposition of interstitial collagen.

活性心肌细胞的持续性缺失可能是进行性心衰的重要机制之一^[1], 而凋亡在心肌梗死(myocardial infarction, MI)后的持续性细胞缺失中具有重要作用。本研究通过建立心肌梗死大鼠模型, 观察不同阶段非梗死区心肌细胞凋亡及与间质胶原变化的关系。

1 材料与方法

1.1 大鼠心梗模型的制备及随机分组

体重 250~300 g 雌性 Wistar 大鼠(中国医科大学实验动物部提供), 随机分为心肌梗死组(100 只)及假手术组(50 只)。10%水合氯醛 3 mL/kg 腹腔内注射麻醉后仰卧固定, 胸部备皮。于左侧胸腔第四肋间逐层开胸, 迅速打开心包后用左手拇指、食指和中指轻轻挤压右侧胸壁, 使心脏暴露于胸腔外, 用 6~0 号丝线弯针在左心耳和肺动脉圆锥之间, 距主动脉根部约 2~3 mm 处穿线, 结扎左冠状动脉前降支, 观察到供血区域心肌变白、运动减弱, 并以标准

[收稿日期] 2006-12-30 [修回日期] 2007-03-10

[基金项目] 辽宁省教育基金项目(2004D177)

[作者简介] 贾志梅, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 中国心力衰竭学会委员, 主要从事心力衰竭基础及临床研究。高远, 博士, 医师, 主要从事心力衰竭基础及临床研究。齐国先, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病、心力衰竭的基础及临床研究, 辽宁省心血管病学会副主任委员。

肢体导联 Ⅱ导(纸速 25 mm/s)心电图 ST 段抬高,即为入选模型。迅速将心脏放回正常位置,并逐层缝合胸腔,同时在切口处放置一胶管并与 20 mL 注射器相连接,以抽吸胸腔积气和积液,直至大鼠恢复自主呼吸后缝合皮肤。假手术组只挂线而不结扎冠状动脉,余同前。保温待大鼠清醒后,给予水和标准饲料分笼饲养。术后 3 h 二组存活的大鼠为心肌梗死组 53 只;假手术组 48 只。

1.2 实验动物处死和心脏标本的保存

术后 24 h、1 周、2 周及 4 周随机从各组中各取 10~12 只大鼠,称量体重后经股静脉注入 2~3 mL 10% 氯化钾,使心室停搏于舒张期,迅速开胸切取心脏,用预冷生理盐水冲洗,去除心房、大血管及心脏外结缔组织等,留取左心室(包括室间隔)。在长轴中点处垂直于长轴将左心室一分为二,心尖侧一半心肌组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定保存 24 h 后,经石蜡包埋,连续行 5 μ m 厚的切片行病理组织学检查、心肌胶原容积密度分数(collagen volume fraction, CVF)测定和凋亡细胞的原位末端标记(TUNEL)法标记检测。切取左心室近心底部非梗死区心肌组织分别用于血管紧张素 Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)、醛固酮及 iv、Ⅲ型胶原的 mRNA 检测(心肌组织用锡纸包存,立即液氮速冻后-70℃冻存)。取梗死范围大于 20% 标本进入研究队列。

1.3 原位末端标记法标记凋亡心肌细胞,并行凋亡细胞半定量分析,每张切片在放大 400 倍下从非梗死区获取切片图象,记数每张切片凋亡阳性细胞数目占总心肌细胞数目的比例,计算凋亡细胞指数。

1.4 Messon 三色法行胶原容积密度分数测定,并行半定量分析,每张 Messon 染色切片在放大 400 倍下从非梗死区获取切片图象,随机选取 4 个视野,通过测量选定区域染色组织的面积,将测量的面积与观察下的整个面积的比例来作为每个视野中胶原组织占百分比。富含胶原的血管边界区域不包括在测量范围内。最后取均数 CVF。

1.5 放射免疫法行血管紧张素 Ⅱ及醛固酮含量的检测,严格按试剂盒说明书操作。

1.6 逆转录聚合酶链反应测定 iv 型和 Ⅲ型胶原的 mRNA 表达

采用 Trizol 一步法提取心肌标本中的总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒步骤完成逆转录 PCR 反应。iv 型胶原上游引物为 5'-CAG ATT GAG AAC ATC CGC AGC,下游引物为 TCT AGC TCG AGT CCC CGG-5',扩增条件为 50℃预变性 30 min 后,84℃30 s \rightarrow 55℃30 s \rightarrow 72℃5 min;30 个循环,产物为 481 bp。Ⅲ型胶

原上游引物为 5'-AGG ATC TGA GGG CTC GCC,下游引物为 AGT TCT CGC CTC TTA TGA CCC-5',扩增条件为 50℃预变性 30 min 后,84℃30 s \rightarrow 54℃30 s \rightarrow 72℃5 min;30 个循环,产物为 314 bp。 β -actin 上游引物为 5'-TGT GCT ATG TTG CCC TAG ACT TC,下游引物为 TCG TCC TCA TGC TAC TCA GGC-5',产物为 450 bp。取 8 μ L PCR 反应产物,于 2% 琼脂糖凝胶电泳后经凝胶成像系统分析处理,分别计算 iv 型和 Ⅲ型胶原 mRNA 与 β -actin mRNA 的灰度比值。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据比较用 t 检验,两组以上数据应用 SPSS 11.5 软件包单因素方差分析方法进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

术后存活 101 只大鼠,在随后 4 周的干预期内共死亡 16 只,死亡率为 15.8%。最终假手术组存活 47 只,心肌梗死组存活 32 只。

2.2 心肌组织病理学改变

心肌梗死组 32 只大鼠,经左冠状动脉永久性结扎后形成左心室前壁透壁性心肌梗死(图 1),梗死范围为 24%~33%。心肌组织 24 h HE 染色显示梗死区心肌纤维溶解断裂,细胞淡染,可见大量白细胞浸润(图 2);假手术组表现为心肌细胞排列整齐,无炎性细胞浸润。

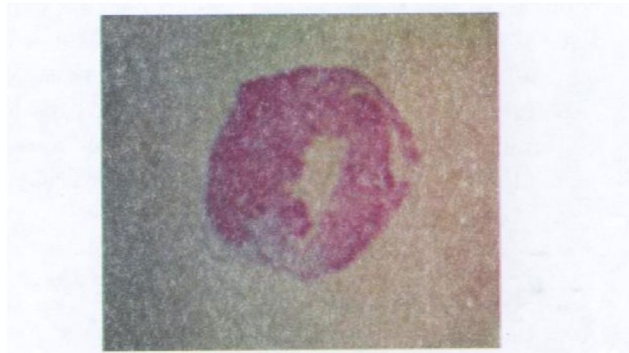


图 1 大鼠术后 1 周左心室透壁性心肌梗死 (HE \times 10)

2.3 非梗死区心肌胶原容积密度分数的变化

心肌组织 Messon 染色显示,假手术组间质只可见散在亮绿色胶原;术后 24 h~1 周,心肌梗死组间质亮绿色胶原与假手术组基本相似;2 周时心肌梗死组间质亮绿色胶原增多;4 周时心肌梗死组间质亮绿色胶原明显增多(图 3)。半定量分析发现,心肌梗死组非梗死区 CVF 随着梗死后时间的延长而

增加, 2~4 周最明显 ($P < 0.05$; 表 1)。

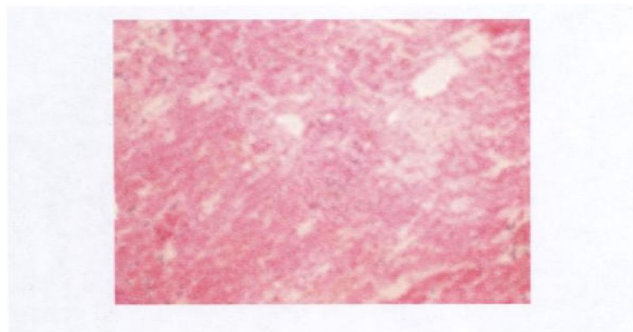


图 2. 心肌梗死组大鼠 24 h 左室心肌 (HE × 10)

表 1. 非梗死区心肌容积密度分数的变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	24 h	1 周	2 周	4 周
假手术组	2.16% \pm 0.67%	2.04% \pm 0.56%	2.19% \pm 0.49%	2.10% \pm 0.61%
心梗组	1.98% \pm 0.72%	3.02% \pm 0.61%	5.23% \pm 0.58% ^a	6.39% \pm 0.60% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

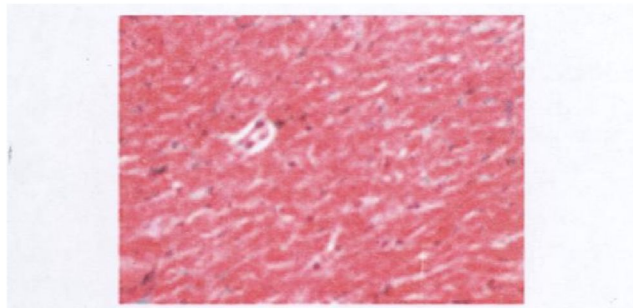


图 3. 心肌梗死组大鼠 4 周非梗死区 Masson 染色 (×100)

2.4 非梗死区心肌细胞的凋亡

TUNEL 染色可见, 假手术组及术后 24 h 心肌梗死组大鼠非梗死区未见凋亡心肌细胞; 术后 1~4 周心肌梗死组大鼠心肌组织均分布有 TUNEL 染色阳性心肌细胞, 核呈棕黄色, 染色深浅不一, 核大小不一 (图 4)。半定量分析发现, 术后 1~4 周凋亡细胞指数逐渐升高 (表 2)。

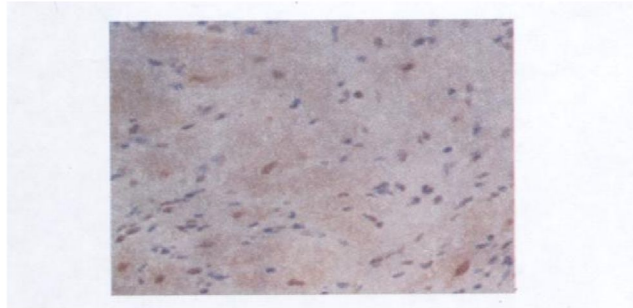


图 4. 心肌梗死组大鼠 4 周非梗死区 TUNEL 染色 (×400)

2.5 非梗死区心肌血管紧张素 Ⅱ及醛固酮的变化

术后 24 h, 除了心肌梗死组 Ang Ⅱ水平略有升高外, 二组 Ang Ⅱ及醛固酮水平相似; 术后 1~4 周,

与假手术组比较, 心肌梗死组 Ang Ⅱ水平逐渐升高 ($P < 0.05$), 术后 2 周, 心肌梗死组醛固酮也开始明显升高 ($P < 0.05$; 表 3)。

表 2. 非梗死区凋亡细胞指数变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	24 h	1 周	2 周	4 周
假手术组	0	0	0	0
心肌梗死组	0	3.50% \pm 0.56% ^a	11.83% \pm 1.78% ^a	19.57% \pm 1.49% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较。

表 3. 非梗死区心肌 Ang Ⅱ和醛固酮的变化 (ng/g, $\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组		心肌梗死组	
	Ang Ⅱ	醛固酮	Ang Ⅱ	醛固酮
24 h	42.66 \pm 10.86	4.10 \pm 1.25	55.28 \pm 13.51	4.21 \pm 1.18
1 周	43.67 \pm 11.05	4.18 \pm 1.19	68.27 \pm 13.59 ^a	4.25 \pm 1.22
2 周	40.78 \pm 11.45	4.12 \pm 1.20	98.17 \pm 12.60 ^b	8.24 \pm 1.29 ^a
4 周	42.89 \pm 12.00	4.09 \pm 1.27	87.22 \pm 13.00 ^b	12.30 \pm 1.63 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

2.6 非梗死区心肌 iv 型和 Ⅲ型胶原的变化

以 β -actin 为内参对照, 结果以 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原 mRNA 与 β -actin mRNA 灰度比值表示 (表 4)。结果发现, 术后 24 h, 二组间 I、Ⅲ型胶原含量相似; 术后 1~4 周, 心肌梗死组 Ⅲ型胶原均明显高于假手术组 ($P < 0.05$), 但 4 周时略有下降趋势; 术后 2~4 周, 心肌梗死组 I 型胶原明显上升, 4 周更明显 ($P < 0.05$; 图 5、6)。

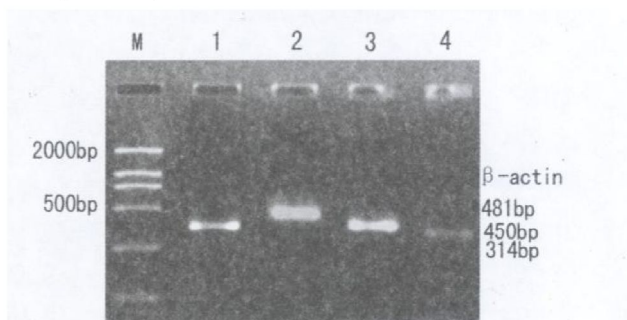


图 5. 假手术组大鼠 iv 型和 Ⅲ型胶原 mRNA 和 β -actin mRNA 的表达 (M × 100) 1、2 为 iv 型胶原, 3、4 为 Ⅲ型胶原。

表 4. 非梗死区心肌 iv 型和 Ⅲ型胶原 mRNA 与 β -actin mRNA 灰度比值的变化 ($\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组		心肌梗死组	
	iv 型胶原	Ⅲ型胶原	iv 型胶原	Ⅲ型胶原
24 h	0.54 \pm 0.05	0.33 \pm 0.04	0.58 \pm 0.01	0.36 \pm 0.03
1 周	0.57 \pm 0.06	0.35 \pm 0.09	0.64 \pm 0.09	0.79 \pm 0.02 ^a
2 周	0.60 \pm 0.03	0.32 \pm 0.06	1.03 \pm 0.04 ^a	0.87 \pm 0.07 ^a
4 周	0.55 \pm 0.01	0.38 \pm 0.07	1.42 \pm 0.00 ^b	0.68 \pm 0.03 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

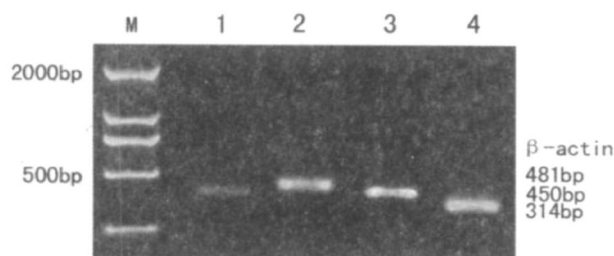


图 6. 心肌梗死组大鼠 2 周非梗死区 iv 型和 α_1 型胶原 mRNA 和 β -actin mRNA 的表达 1、2 为 iv 型胶原、3、4 为 α_1 型胶原。

3 讨论

正常和疾病状态下心肌的胶原主要由心肌间质的成纤维细胞产生和分泌的 iv、 α_1 型胶原型胶原组成^[2]。Messon 染色显示, 术后 2~4 周心肌梗死组非梗死区间质亮绿色胶原明显增多, CVF 随着梗死后时间的延长而增加, 2~4 周最明显, 该结果与某些研究是一致的^[3,4]。此外, iv、 α_1 型胶原的 RT-PCR 检测显示, 梗死 1 周后非梗死区及 iv、 α_1 型胶原 mRNA 均有增加, 但 α_1 型胶原 mRNA 增加较早, 而 iv 型胶原 mRNA 在心肌梗死后稍晚些时候明显升高。表明随着 MI 后时间的延长, 非梗死区心肌组织纤维化逐渐明显, 而 iv、 α_1 型胶原含量的变化则反映了胶原网架结构的改建。

Ang II 在体内是心脏纤维过度增生以及细胞外间质胶原和纤维连接蛋白合成的主要决定因素^[5,6], 而醛固酮可刺激胶原基因表达和合成^[7]。作者的研究发现, 梗死后 24 h, Ang II 水平轻微升高, 可能与梗死最初血流动力学改变所导致的循环肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活有关。随着梗死病程的延长, 心脏局部 RAAS 的作用可能更突出, 表现为 1~4 周时 Ang II 的水平逐渐升高, 与同阶段心肌的 CVF 及 iv、 α_1 型胶原的变化是一致的。本实验中, 随着 Ang II 的升高, 醛固酮水平也在升高, 支持 Ang II 与 AT1 受体结合使醛固酮增加的理论, 阻断醛固酮受体可使胶原沉积逆转^[8]。醛固酮主要受 Ang II 调节^[9], 但心肌梗死组 4 周时 Ang II 水平的变化与其醛固酮的变化并不完全一致, 表现为醛固酮

的持续升高, 表明醛固酮可能还存在着其他未知的调控机制。

心肌梗死后细胞凋亡的机制仍不清楚, 而且细胞死亡的方式并不取决于病因的性质, 而取决于损伤的程度。Sabbah 等^[10]在通过冠状动脉内形成微血栓而产生狗的慢性心衰实验中观察到, 在心脏间质中胶原蛋白包围的心肌细胞缺氧, 这提示凋亡在心肌损伤中是伴随着间质纤维化的一个病理过程。有研究发现, 陈旧心肌梗死梗死区周边有凋亡细胞存在, 这些凋亡细胞常常被大量的胶原纤维包裹。作者的研究发现, 随着非梗死区心肌纤维化程度的加重, 凋亡细胞也在增多, 即心肌间质纤维化与凋亡细胞的出现时间基本是一致的, 提示心脏间质纤维化导致毛细血管的密度低, 因而, 在心脏间质中胶原蛋白所包围的心肌细胞处于缺氧状态, 由此可能导致细胞凋亡, 严重时可能导致细胞坏死。

[参考文献]

- [1] Chandrasekhar Y. Role of apoptosis in ventricular remodeling [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2005, 2 (1): 18-22.
- [2] Loftis MJ, Sexton D, Carver W. Effects of collagen density on cardiac fibroblast behavior and gene expression [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196 (3): 504-511.
- [3] 边素艳, 刘宏斌, 杨庭林. 厄贝沙坦对急性心肌梗死后晚期心室重构及心室功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (8): 649-652.
- [4] 谢萍, 徐义先, 祝善俊, 杨铮, 高志凌. 肿瘤坏死因子 α 介导大鼠心肌梗死后心功能变化的机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12 (6): 662-664.
- [5] ouyz RM. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2003, 5 (2): 155-164.
- [6] Chai W, Garrelts IM, Arulmani U, Schoemaker RG, Lamers JM, Danser AH. Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective [J]? *Br J Pharmacol*, 2005, 145 (5): 664-671.
- [7] Nagai Y, Miyata K, Sun GP. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts [J]. *Hypertension*, 2005, 46 (4): 1 039-045.
- [8] Gonzalez A, Lopez B, Diez J. Fibrosis in hypertensive heart disease: role of the renin-angiotensin-aldosterone system [J]. *Med Clin North Am*, 2004, 88 (1): 83-97.
- [9] Zannad F, Radauceanu A. Effect of MR blockade on collagen formation and cardiovascular disease with a specific emphasis on heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2005, 10 (1): 71-78.
- [10] Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 1995, 147 (1-2): 29-34.

(此文编辑 李玲玲)