

Apelin-13 对急性缺血诱导的大鼠心肌细胞凋亡的影响

张 志^{1,2}, 于 波¹

(1. 中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001;

2. 辽宁医学院附属第一医院心内科, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 病理学与病理生理学; Apelin-13; 心肌缺血; 细胞凋亡; 大鼠

[摘要] 目的 研究 Apelin 在大鼠急性心肌缺血时的变化及外源性给予 Apelin-13 对大鼠急性心肌缺血损伤的保护机制。方法 采用酶联免疫吸附法测定大鼠前降支结扎 30、60 和 120 min 时心肌组织及血浆 Apelin 含量; 并通过结扎大鼠前降支 120 min 建立急性心肌缺血模型, 于缺血前 5 min 经尾静脉分别注射 10、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Apelin-13, 观察 Apelin-13 对心脏功能、心肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响。结果 心肌缺血 30~60 min 时, 大鼠心肌组织 Apelin 含量逐渐增高, 而缺血 120 min 时 Apelin 含量降至正常水平以下, 血浆中 Apelin 含量在缺血 120 min 内呈逐渐增高趋势。缺血前给予 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Apelin-13 能改善心脏功能, 减少心肌细胞凋亡, 抑制促凋亡基因 Bax 和 Caspase-3 的表达, 并提高抗凋亡基因 Bcl-2 的表达。结论 在心肌缺血早期心肌组织 Apelin 含量代偿性增高, 长时间缺血时含量下降; 外源性 Apelin-13 在急性心肌缺血中的保护作用与抑制心肌细胞凋亡有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Apelin-13 on Ischemia-Induced Cardiomyocyte Apoptosis in Acute Myocardial Ischemia Rats

ZHANG Zhi^{1,2}, and YU Bo¹

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

[KEY WORDS] Apelin-13; Myocardial Ischemia; Apoptosis; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To determine the content of apelin in acute myocardial ischemia and probe the protective mechanism of exogenous apelin-13 on myocardium ischemic injury in rats. **Methods** The content of apelin in myocardium and plasma was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in SD rats suffered from myocardial ischemia by ligating the left anterior descending coronary artery (LAD) for 30, 60 and 120 min respectively. Then the rats were randomly divided into sham operated group, model control group and two apelin-13 groups, to which apelin-13 of 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was infused via caudal vein 5 min before a 120 min myocardial ischemia. The cardiac function was measured by electrophysiograph. Cardiomyocyte apoptosis was detected with TUNEL and Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein expression of myocardium with Western blotting. **Results** The content of apelin in myocardium was markedly increased during myocardial ischemia 30 to 60 min and decreased to below basal level on ischemia 120 min ($P < 0.01$). The content of apelin in plasma increased gradually during myocardial ischemia 30 to 120 min ($P < 0.01$). In myocardial ischemia models induced by ligating LAD for 120 min, apelin-13 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) infused pre-ischemia can significantly improve cardiac function, inhibit the cardiomyocyte apoptosis ($P < 0.01$), increase Bcl-2 protein expression and decrease Bax and Caspase-3 protein expression. **Conclusion** The content of apelin in myocardium was increased in a compensatory role in early myocardial ischemia and decreased in sustained myocardial ischemia. The protective mechanism of exogenous apelin-13 on ischemic myocardium may be related to inhibition of cardiomyocyte apoptosis.

Apelin 是血管紧张素受体样蛋白 J (angiotensin AT_1 receptor-like receptor, AT_1RLR) 的内源性配体, 在心血管系统高度表达, 具有降低血压、增强心肌收缩力、保护心肌缺血及再灌注损伤等多种生物学效应^[1,2]。在动脉粥样硬化及心功能衰竭、心肌损伤或心肌组织缺氧的不同阶段, 血浆及心肌组织 Apelin 含量也随之变

化^[3]。然而在急性心肌缺血过程中血浆及心肌组织 Apelin 的含量变化, 以及 Apelin 对急性心肌缺血的保护机制尚不清楚。本研究通过建立大鼠急性心肌缺血模型观察 Apelin 在急性心肌缺血时的变化, 并探讨外源性 Apelin 对急性心肌缺血的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠, 体重 220~270 g, 平均 250 ± 30 g, 由辽宁医学院动物实验室提供。Apelin-13 (Sigma 公

[收稿日期] 2008-07-21

[修回日期] 2008-09-12

[作者简介] 张志, 博士研究生, 副教授, 主要从事冠心病介入治疗, E-mail 为 ningcheng631@163.com。通讯作者于波, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病及心律失常研究, E-mail 为 yb-dy@hotmail.com。

司,美国),大鼠 Apelin 酶联免疫(ELISA)试剂盒(RapidBio Lab,美国),原位凋亡检测(terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end-labeling, TUNEL)试剂盒(Roche 公司,德国),Bcl-2 一抗、Bax 一抗和 Caspase-3 一抗(Santa Cruz 公司,美国),即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG(天津 TBD 生物技术有限公司),PVDF 膜(BBI 公司,加拿大),ECL 发光试剂盒(Santa Cruz 公司,美国)。

1.2 动物模型复制

戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉大鼠,标准肢体导联心电图记录心率、ST 段变化及各种心律失常。气管切开,用呼吸机进行机械通气,通气频率 60 次/min,潮气量 12~15 mL/min。取左胸第 3 肋间进胸,暴露心脏,于左心耳根部下方 1 mm 处进针,5-0 丝线(结扎线)穿过心肌表层在肺动脉圆锥处稍下方穿线,结扎左冠状动脉前降支血管造成缺血,心电图出现 ST 段抬高为模型复制成功。

1.3 不同缺血时间大鼠心肌组织和血浆 Apelin 含量变化

取雄性 SD 大鼠 24 只,随机分四组,按上述方法使冠状动脉分别缺血 0、30、60 和 120 min,于缺血结束时取颈动脉血与 10% EDTA 和抑肽酶(600 TIU/L)混匀,离心分离血浆,并摘取心脏立即-80℃保存。取冻存心肌标本约 100 mg,置入 2 mL 0.1 mol/L 醋酸中,100℃煮沸 10 min,匀浆后 3 000 r/min 离心 15 min,取组织提取液。按 Apelin ELISA 试剂盒说明书测定组织提取液和血浆 Apelin 的含量。

1.4 外源性 Apelin-13 注射对急性心肌梗死大鼠的血流动力学影响

另取雄性 SD 大鼠 40 只,随机分四组(每组 10 只),按上述方法结扎前降支血管造成缺血,以缺血 120 min 为实验终点。低、高剂量 Apelin-13 组分别于缺血前 5 min 经尾静脉缓慢注射 Apelin-13 10 和 100 μg/kg。模型组心肌缺血前输注生理盐水,假手术组丝线穿过前降支下方而不结扎。实验结束前分别经右颈总动脉插入心导管,用生理仪(PowerLab)测定左心室收缩期末压(left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左心室舒张期末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)及左心室内压最大升降速度(maximal rise/maximal fall in left ventricular pressure, $\pm dp/dt_{max}$)。并迅速处死动物,摘取心脏,取心尖组织 4% 甲醛固定,石蜡包埋用做心肌细胞凋亡检测,剩余组织-80℃保存以用于检测心肌细胞凋亡相关蛋白表达。

1.5 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

取心肌标本作 5 μm 厚切片,每个标本取 3 张不连续的切片。按照 TUNEL 试剂盒说明书操作,显微镜(×400)观察每个视野中凋亡细胞(细胞核中有棕黄色颗粒者)数,每张切片共数 5 个视野,以平均阳性细胞数占细胞总数的百分比作为凋亡指数。

1.6 Western blotting 检测心肌细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达

取-80℃冻存的心肌标本 100 mg 加入三去垢裂解液中碾磨后移入 1.5 mL EP 管中,4℃12 000 r/min 离心 20 min,取上清液进行蛋白定量。各取等量的标本进行 SDS-PAGE 电泳分离后将蛋白质电转移到 PVDF 膜上,封闭后加 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 一抗 37℃孵育 2 h,加辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG,37℃孵育 1 h,ECL 发光试剂孵育 1 min,在暗室将膜在感光胶片上曝光并用相纸显影洗像。结果用凝胶图像处理系统进行扫描,以假手术组的吸光度值(A)为 100% 与实验各组进行比较和半定量分析。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同心肌缺血时间对心肌组织及血浆 Apelin 含量的影响

缺血 0、30、60 和 120 min 时,心肌组织 Apelin 含量分别为 136 ± 23 、 150 ± 16 、 201 ± 19 和 67 ± 16 ng/L,显示缺血一定时间时心肌组织 Apelin 含量呈逐渐增加趋势,而随着缺血时间延长,Apelin 含量逐渐降至正常水平以下;而血浆中 Apelin 含量在缺血 120 min 内随缺血时间延长呈逐渐增加趋势(缺血 0、30、60 和 120 min 时分别为 170 ± 11 、 254 ± 22 、 317 ± 28 和 390 ± 22 ng/L,图 1)。

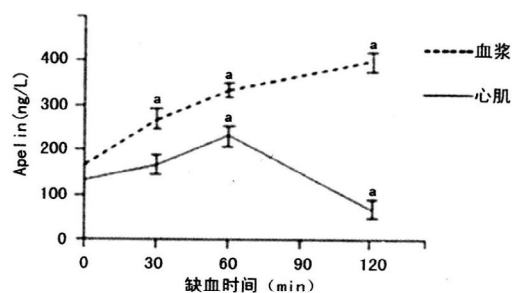


图 1. 不同心肌缺血时间心肌组织及血浆 Apelin 含量变化($n = 6$) a 为 $P < 0.01$, 与 0 min 比较。

2.2 缺血前给予外源性 Apelin-13 预处理对心脏血流动力学的影响

与假手术组相比, 实验各组心率、 $\pm dp/dt_{\max}$ 和 LVESP 明显降低, LVEDP 明显增高 ($P < 0.01$)。与

模型组相比, 低剂量 Apelin-13 组 LVEDP 降低 ($P < 0.05$), 而其他血流动力学指标无明显改善 ($P > 0.05$); 高剂量 Apelin-13 组 $\pm dp/dt_{\max}$ 和 LVESP 明显增高, LVEDP 明显降低 ($P < 0.05$ 或 0.01 , 表 1)。

表 1. 外源性 Apelin-13 对急性心肌梗死大鼠血流动力学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	心率 (次/min)	+ dp/dt_{\max} (mmHg/s)	- dp/dt_{\max} (mmHg/s)	LVESP (mmHg)	LVEDP (mmHg)
假手术组	322 ± 12	3 078 ± 190	2 680 ± 158	121 ± 17	3.4 ± 1.6
模型组	264 ± 11 ^a	1 550 ± 344 ^a	1 366 ± 200 ^a	81 ± 10 ^a	15.7 ± 4.4 ^a
低剂量 Apelin 组	277 ± 11 ^a	1 592 ± 225 ^a	1 400 ± 211 ^a	84 ± 20 ^a	11.6 ± 2.5 ^{ab}
高剂量 Apelin 组	282 ± 9 ^a	2 360 ± 196 ^{ac}	1 998 ± 272 ^{ac}	98 ± 22 ^{ab}	8.0 ± 2.4 ^{ac}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.3 Apelin-13 对缺血性心肌细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果表明, 假手术组偶见心肌细胞凋亡, 提示正常心肌细胞也存在凋亡现象; 模型组可见大量心肌细胞凋亡, 凋亡细胞主要集中于梗死周围区域, 凋亡指数达 $45.1\% \pm 0.7\%$; 低剂量 Apelin-13 组与高剂量 Apelin-13 组心肌细胞凋亡指数(分别为 $40.7\% \pm 4.4\%$ 和 $33.3\% \pm 2.9\%$) 与对照组相比明显减少 ($P < 0.05$ 和 0.01), 且高剂量 Apelin-13 组心肌细胞凋亡指数低于低剂量组 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.4 Apelin-13 对凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果表明, Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 在假手术组微弱表达; 高剂量 Apelin-13 组 Bcl-2 的表达明显高于模型组和低剂量 Apelin-13 组 ($P <$

0.01), 低剂量 Apelin-13 组 Bcl-2 表达略高于模型组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。高剂量 Apelin-13 组 Bax 和 Caspase-3 表达明显低于模型组和低剂量组 ($P < 0.01$), 低剂量 Apelin-13 组 Bax 和 Caspase-3 表达与模型组相比差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2 和图 3)。

表 2. 各组凋亡相关蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	Bcl-2	Bax	Caspase-3
模型组	1.07 ± 0.14	2.36 ± 0.26	2.11 ± 0.24
低剂量 Apelin-13 组	1.12 ± 0.13	2.24 ± 0.27	1.66 ± 0.15
高剂量 Apelin-13 组	3.13 ± 0.22 ^a	1.60 ± 0.17 ^a	1.05 ± 0.16 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与模型组及低剂量 Apelin-13 组比较。

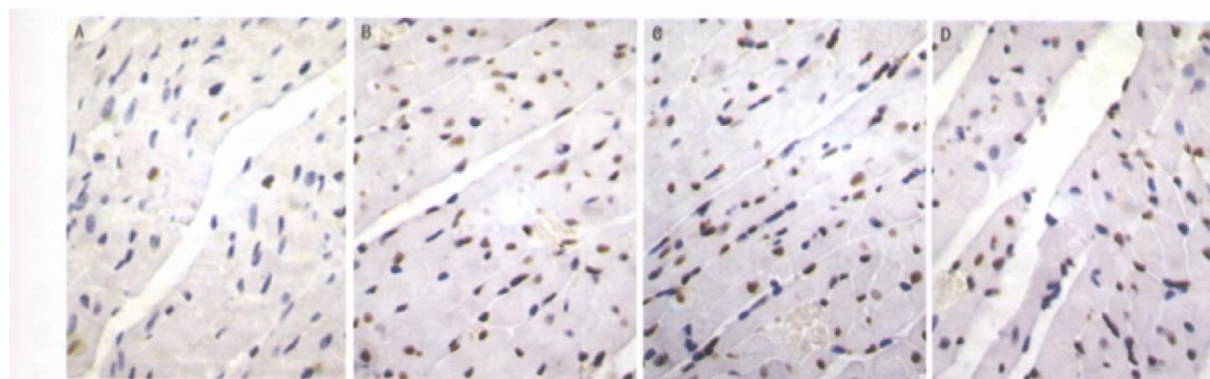


图 2. Apelin-13 对心肌细胞凋亡的影响 ($\times 400$) A 为假手术组, B 为模型组, C 为低剂量 Apelin-13 组, D 为高剂量 Apelin-13 组。

3 讨论

在急性心肌缺血时, 血管内皮细胞通过缺氧诱导因子途径使 Apelin 表达增加^[4]。Apelin 通过旁分泌途径作用于心肌细胞上的 APJ 受体而发挥心肌保护作用。本实验结果表明血浆中 Apelin 含量在心肌

缺血时呈逐渐增高趋势, 而心肌组织 Apelin 含量在大鼠心肌缺血 30~60 min 时逐渐增加, 在缺血达 120 min 时含量却降至基线水平以下。Kleinz 等^[5]发现在缺血再灌注模型中, 心肌 Apelin mRNA 表达水平在缺血期增高而在再灌注期却降至基线水平以

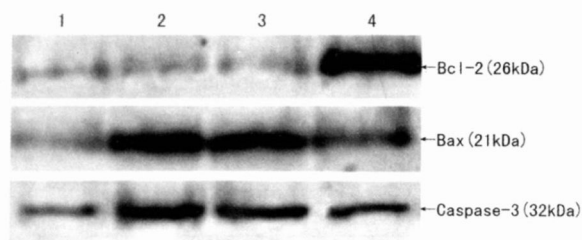


图3. 大鼠心肌组织凋亡相关蛋白的表达 1为假手术组, 2为模型组, 3为低剂量 Apelin 13 组, 4 为高剂量 Apelin 13 组。

下, 并认为与再灌注本身加重心肌损伤有关。因此可以推测 Apelin 作为一种代偿性机制心肌缺血早期含量增高, 而在长时间缺血后随着心功能的逐渐下降, 心肌组织 Apelin 含量也下降, 这是一种代偿不足的表现, 而血浆中 Apelin 含量的变化可能较心肌组织存在一定程度的滞后。

Apelin 对多种因素引起的急慢性心肌损害均具有保护作用。本实验结果表明, 与模型组相比, 外源性高剂量 Apelin 13 明显提高心肌收缩力, 降低左心室舒张期末压, 改善心脏功能。而低剂量 Apelin 13 则无明显效果。进一步的研究发现, 高剂量 Apelin 13 使心肌细胞凋亡明显较少, 同时表现为促凋亡相关基因 Bax 和 Caspase-3 表达降低, 抑制凋亡的基因 Bcl-2 表达明显上调。近来有研究发现 Apelin 作为一种脂肪激素具有抑制人和小鼠成骨细胞凋亡的作用^[6], 本实验发现 Apelin 可通过抑制心肌细胞凋亡对缺血性心肌损伤发挥保护作用, 而 Apelin 的抗凋亡作用可能是通过降低 Bax/Bcl-2 比值、抑制

Caspase-3 的激活实现的。

综上所述, Apelin 作为一种代偿性机制心肌缺血早期含量增高, 长时间缺血后心肌组织 Apelin 含量则因代偿不全及过度消耗而下降, 外源性 Apelin 13 可通过抑制心肌细胞凋亡对缺血性心肌损伤发挥保护作用。近年研究表明, 心肌细胞的凋亡不仅发生在缺血及再灌注损伤, 在缺血性心肌病、心肌炎、高血压性心脏病尤其是终末期心功能衰竭时均有明显的心肌细胞凋亡存在^[7], 因此可以期待 Apelin 将可能成为治疗与心肌细胞凋亡有关的上述疾病的重要手段。

[参考文献]

- [1] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **251** (2): 471-476.
- [2] Jupp AG, Newby DE. The apelin/APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, **75** (10): 1882-892.
- [3] 李莉, 李瑞杰, 宋丽芬, 等. 高血压患者血浆 Apelin 与左心室肥厚及颈动脉粥样硬化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (7): 556-558.
- [4] Sheikh AY, Chun HJ, Glassford AJ, et al. In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, **294** (1): H88-98.
- [5] Kleinz MJ, Baxter GF. Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase [J]. *Regul Pept*, 2008, **146** (1-3): 271-277.
- [6] Xie H, Yuan LQ, Luo XH, et al. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts [J]. *Apoptosis*, 2007, **12** (1): 247-254.
- [7] 钱文浩, 李东野, 於江泉, 等. p38 丝裂素活化蛋白激酶对冠心病患者冬眠心肌细胞凋亡的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (6): 420-422.

(此文编辑 许雪梅)