

梗死相关血管晚期再灌注对实验性心肌梗死心肌细胞凋亡的影响

马礼坤^{1,2}, 屈朝法², 徐少东², 吴学平³, 汪道文¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030;

2. 安徽省立医院心内科, 安徽省合肥市 230001; 3. 安徽医科大学形态学中心实验室, 安徽省合肥市 230032)

[关键词] 病理学与病理生理学; 晚期再灌注对心肌细胞凋亡的影响; 逆转录聚合酶链反应; 晚期再灌注; 急性心肌梗死; 凋亡相关基因; 心肌细胞凋亡

[摘要] **目的** 探讨犬急性心肌梗死后梗死相关血管晚期再灌注对梗死周边缺血区心肌细胞凋亡以及凋亡相关基因 bcl-2、bax 及其相关蛋白表达的影响。**方法** 健康成年杂交犬 28 只, 全身麻醉下常规开胸暴露冠状动脉后随机分为三组: 假手术组 ($n=8$)、急性心肌梗死组 ($n=10$) 和晚期再灌注组 ($n=10$)。假手术组仅行左冠状动脉前降支下穿过丝线而不结扎冠状动脉, 急性心肌梗死组行左冠状动脉前降支高位永久结扎, 晚期再灌注组在高位结扎左冠状动脉前降支 6 h 后松解结扎线予以 6 h 的再灌注处理。共有 23 只犬模型制作成功。各组犬均于术后 12 h 处死, 采集心肌标本。使用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法检测心肌细胞凋亡, 逆转录聚合酶链反应法检测心肌细胞 bcl-2 和 bax mRNA 表达水平, 免疫组织化学染色和蛋白印迹法分析 bcl-2、bax 在心肌细胞中的表达情况。**结果** 晚期再灌注组心肌细胞凋亡指数较急性心肌梗死组明显减少 ($P<0.05$), 且两组心肌细胞凋亡指数均高于假手术组 ($P<0.01$)。急性心肌梗死组和晚期再灌注组 bcl-2 和 bax mRNA 的表达均明显高于假手术组 ($P<0.01$), 且晚期再灌注组 bax mRNA 的表达明显低于急性心肌梗死组 ($P<0.05$), 而 bcl-2 mRNA 两组间差异无显著性。与假手术组相比, 急性心肌梗死组和晚期再灌注组 bcl-2 蛋白的表达均明显升高 ($P<0.01$), 其中在晚期再灌注组的表达略高于急性心肌梗死组, 但差异无显著性; 晚期再灌注组 bax 蛋白的表达明显高于假手术组 ($P<0.01$), 但明显低于急性心肌梗死组 ($P<0.05$)。**结论** 急性心肌梗死后晚期再灌注可以减少梗死周边缺血区心肌细胞凋亡, 其机制可能与心肌细胞 bax 基因及其相应的蛋白表达减少有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Late Reperfusion of Infarct-Related Coronary Artery on Cardiocyte Apoptosis After Acute Myocardial Infarction in Dogs

MA Li-Kun^{1,2}, QU Chao-Fa², XU Shao-Dong², WU Xue-Ping³, and WANG Dao-Wen¹

(1. Department of Cardiology, Tongji Hospital, the Middle China Science and Technology University, Wuhan 430030, China; 2. Department of Cardiology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China; 3. Central Laboratory of Morphology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

[KEY WORDS] Late Reperfusion; Acute Myocardial Infarction; Cardiocyte Apoptosis; Apoptotic Gene; Bcl-2 Gene; Bax Gene

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of late reperfusion on cardiocyte apoptosis and the expression of bcl-2 and bax mRNA and related proteins in the risk areas after acute myocardial infarction in dogs. **Methods** After chest was opened and the coronary artery was exposed, twenty eight dogs were randomly divided into three groups: sham operation group ($n=8$), acute myocardial infarction group ($n=10$), and late reperfusion group ($n=10$). Apart from sham operation group, the left anterior descending arteries were occluded for 12 h in acute myocardial infarction group and 6 h occlusion followed by 6 h of reperfusion in late reperfusion group. The cardiocyte apoptosis was measured by TUNEL assay, the expression of bcl-2 and bax gene mRNA by RT-PCR. Immunohistochemistry and Western blot analysis were used to detect the expression of bcl-2 and bax protein. **Results** The apoptotic index of cardiocyte in late reperfusion group was much higher than that of sham operation group ($P<0.01$), but less than that of acute myocardial infarction group ($P<0.05$). Compared with sham operation group, the expression of bcl-2 mRNA and protein were significantly increased in acute myocardial infarction group and late reperfusion group ($P<0.01$), and there were no significant difference between acute myocardial infarction group and late reperfusion group ($P>0.05$). The expression of bax mRNA and its protein in late reperfusion group was much higher than that of sham operation group ($P<0.01$),

[收稿日期] 2005-10-09 [修回日期] 2006-04-01

[基金项目] 安徽省自然科学基金(03043710)和安徽省优秀青年基金(04043054)资助

[作者简介] 马礼坤, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事冠心病基础和临床方面的研究, E-mail 为 Malk2002cn@yahoo.com.cn。汪道文, 教授, 博士研究生导师。屈朝法, 硕士研究生, 住院医师。

but lower than that of acute myocardial infarction group ($P < 0.05$). **Conclusions** Late reperfusion of infarct-related artery can decrease cardiocyte apoptosis in the risk area of acute myocardial infarction, which may be related to the reduction of the expression of bax mRNA and protein.

研究表明,急性心肌梗死后晚期开通梗死相关血管有利于减少梗死后心室重构,改善患者远期心功能^[1,2]。其确切机制尚有待进一步研究。心肌梗死后心肌细胞死亡包括坏死和凋亡两种方式。心肌细胞凋亡是一种受基因控制的程序性细胞死亡过程,可在急性心肌梗死发生后持续相当长的时间,且主要发生于缺血较轻的梗死周边缺血区^[3]。本研究采用犬在体急性心肌梗死/晚期再灌注(late reperfusion, LR)模型,探讨晚期再灌注对梗死周边缺血区心肌细胞凋亡以及凋亡相关基因 bcl-2、bax 及其相关蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年实验用犬 28 只,雌雄不拘,体重 10~15 kg,由安徽医科大学实验动物中心提供。细胞凋亡检测试剂盒、即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);bcl-2 一抗、bax 一抗、ECL 发光试剂盒(美国 Santa Cruz 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(加拿大 BBI 公司);Trizol 试剂(美国 MRC 公司);RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司);PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 动物模型制备和分组

健康成年犬以 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)后肢浅静脉注射麻醉后,以 5 mg/(kg·h)维持麻醉并固定于实验台上。针形电极刺入犬四肢皮下,记录标准肢体导联心电图。常规消毒铺巾,颈正中切开行气管插管,连接动物呼吸机维持呼吸。经胸骨左缘第四、五肋间开胸,剪开心包缝制心包吊床,充分暴露左心室前壁。在动脉圆锥与左心耳交界处分离左冠状动脉前降支,穿 4 号丝线备结扎。急性心肌梗死模型建立成功标志:心电监护示有病理性 Q 波形成和 ST 段弓背抬高, R 波振幅减低;④结扎区心肌发绀,由红色变为紫色。④心肌节段性运动异常。再灌注成功标志:心电监护示 2 h 内出现再灌注性心律失常和抬高的 ST 段回落大于 50%,发绀区心肌转为红色。

应用随机排列表,将开胸手术结束后的 28 只犬随机分为 3 组:假手术组 8 只,丝线只穿过左冠状动脉前降支下方旷置而不结扎,8 只均获成功;④急

性心肌梗死组 10 只,丝线结扎左冠状动脉前降支 12 h,术中死亡 2 只,计 8 只模型制作成功;④晚期再灌注组 10 只,丝线结扎左冠状动脉前降支 6 h 后剪断丝线予以再灌注 6 h,术中死亡 1 只,未发生典型再灌注 2 只,计 7 只模型制作成功。各组经相应的处理于 12 h 后处死,参照 Zhao 等^[4]报道的方法在实验终点从主动脉根部注射 0.2% 伊文氏蓝 10 mL,染成蓝色部分为有血供区,未染色部分为缺血区。取出心脏置冰盐水中洗涤至无血迹,沿左心室长轴在左心室中部缺血区切取 0.5 cm × 1.0 cm 心肌标本两块。每块再均分为两小块,标记后其中一块置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 12 h,常规石蜡包埋备形态学研究;另一块置于液氮罐中保存备用。

1.3 原位检测心肌细胞凋亡

取石蜡包埋的心肌标本制成 5 μm 厚切片,每个标本取 3 张不连续的切片。按照细胞凋亡检测试剂盒说明书介绍的方法操作,用显微镜(×400)观察每个视野中的凋亡细胞数,每组共数 100 个视野,取其均值。并计算心肌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测 bcl-2 和 bax mRNA 的表达

参照 Genbank 报道的犬 bcl-2、bax 和内参照 β-actin 基因序列,应用 Primer Premier 软件设计引物, bcl-2 引物序列:正义 5'-CCC CAC CCC TGG CAT CTT CT-3', 反义 5'-GGC GTC AGG TGC AGC TGG CTG GAC ATC-3', 产物为 427 bp。bax 引物序列:正义 5'-CGG CGG GAG CGG CGG TGA TGG A-3', 反义 5'-CAG CCC AGC AGC CGC TCT CGA AGG AAG-3', 产物为 469 bp。β-actin 引物序列:正义 5'-CCC CGG GCC GTC TTC CCC TCC AT-3', 反义 5'-CGG CCA GCC AGG TCC AGA CGC AAG AT-3', 产物为 470 bp。取 50 mg 心肌组织,按 Trizol 试剂盒要求抽提心肌细胞总 RNA,紫外分光光度仪测其纯度和浓度,并逆转录合成 cDNA。在 Taq DNA 聚合酶作用下进行 PCR 扩增,总反应体积 25 μL,其中 cDNA 5 μL, 10 mmol/L dNTP 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 10 × buffer 2.5 μL,上下游引物各 1 μL, Taq 酶 1 μL,加双蒸水至 25 μL,混匀并离心,每个 PCR 管加两滴石蜡油,放入 PCR 仪中进行反应,首先 94 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 变性 40 s → 60 °C 复性 40 s → 72 °C 延伸 1 min,计 35 个循环,72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存反应

产物。每个标本取 5 μ L PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察并照相。使用凝胶图像分析软件测定各条带的灰度值,以 bcl-2 或 bax 和 β -actin 产物各条带的灰度值之比反映 bcl-2 和 bax mRNA 的表达程度。

1.5 免疫组织化学检测心肌细胞 bcl-2 和 bax 蛋白的表达

取 5 μ m 厚心肌标本的石蜡切片,用 SABC 法染色。石蜡切片常规脱蜡入水,3% H_2O_2 灭活内源性酶 15 min,0.01 mol/L 枸橼酸钠行抗原热修复,5% BSA 室温封闭非特异位点 20 min,滴加 bcl-2 或 bax 一抗(1:100)后将湿盒置于 4℃ 中过夜,以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。二抗和三抗分别为生物素化羊抗兔 IgG 和链霉亲和素-生物素复合物,DAB 显色,镜下控制显色时间,然后干燥、透明、封片。

1.6 Western blot 蛋白印迹分析

参考文献[3],取液氮冻存的心肌标本 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 g 离心 20 min,取上清液进行蛋白定量。各取等量的心肌标本进行 SDS-PAGE 电泳,分离后将蛋白质电转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2 h,将膜与 bcl-2 一抗(1:400)或 bax 一抗(1:300)37℃ 孵育 2 h,加辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG(1:1 000),37℃ 孵育 1 h,加 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。用凝胶图像处理系统进行扫描,以假手术组的光密度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较用方差分析,两组比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 心肌细胞凋亡情况

凋亡的心肌细胞核内分布有棕褐色颗粒,体积等于或小于正常细胞核。假手术组心肌细胞凋亡数很少,AI 为 $4.53\% \pm 1.09\%$;急性心肌梗死组有明显的心肌细胞凋亡,AI 为 $28.94\% \pm 1.82\%$,两组比较有显著性差异($P < 0.01$)。晚期再灌注组 AI 为 $22.11\% \pm 1.75\%$,明显高于假手术组($P < 0.01$),但明显低于急性心肌梗死组($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 心肌细胞 bcl-2 和 bax mRNA 的表达

三组均扩增出 427 bp 的 bcl-2 目的片段和 469 bp 的 bax 目的片段,同时扩增出 470 bp 的 β -actin 目

的片段(图 2)。急性心肌梗死组和晚期再灌注组 bcl-2 和 bax mRNA 的表达均明显高于假手术组($P < 0.01$),但晚期再灌注组 bax mRNA 的表达明显低于急性心肌梗死组($P < 0.05$),而 bcl-2 mRNA 在两组间的表达无显著性差异(表 1)。相关性分析显示,心肌细胞 AI 与 bax mRNA 表达具有强相关性($r = 0.911, P < 0.05$)。



图 1. 光镜下观察心肌细胞凋亡 ($\times 400$) A 为急性心肌梗死组, B 为晚期再灌注组。

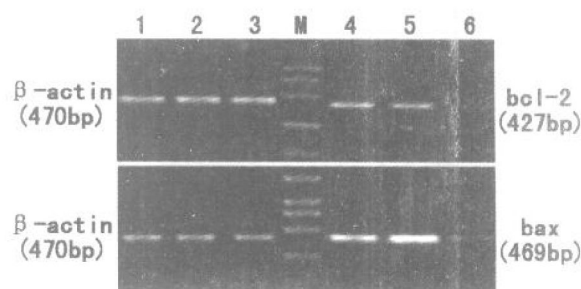


图 2. 逆转录聚合酶链反应检测心肌细胞 bcl-2 和 bax mRNA 的表达

表 1. 心肌细胞 bcl-2 和 bax mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	bcl-2/ β -actin	bax/ β -actin
假手术组	8	0.28 ± 0.01	0.32 ± 0.25
急性心肌梗死组	8	0.76 ± 0.19^a	1.30 ± 0.17^a
晚期再灌注组	7	0.78 ± 0.24^a	1.05 ± 0.36^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与急性心肌梗死组比较。

2.3 心肌细胞 bcl-2 和 bax 蛋白的表达

bcl-2 阳性率在急性心肌梗死组和晚期再灌注组相近,但都高于假手术组。而 bax 的阳性率在急性心肌梗死组显著高于晚期再灌注组,在假手术组 bax 蛋白仅有低水平表达(图 3)。

2.4 Western blot 蛋白印迹分析结果

急性心肌梗死组和晚期再灌注组 bcl-2 和 bax 蛋白的表达均明显高于假手术组($P < 0.01$);晚期再灌注组 bcl-2 蛋白的表达略高于急性心肌梗死组,但差异无显著性;晚期再灌注组 bax 蛋白的表达明显低于急性心肌梗死组($P < 0.05$)。见表 2 和图 4。

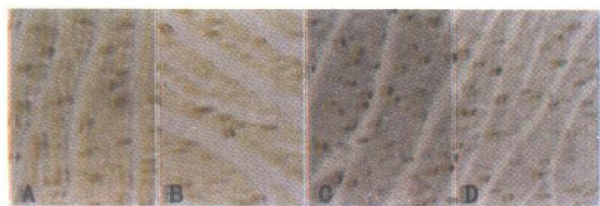


图3. 心肌细胞 bcl-2 和 bax 蛋白的表达 ($\times 200$) A 为急性心肌梗死组 bcl-2 的表达, B 为晚期再灌注组 bcl-2 的表达, C 为急性心肌梗死组 bax 的表达, D 为晚期再灌注组 bax 的表达。

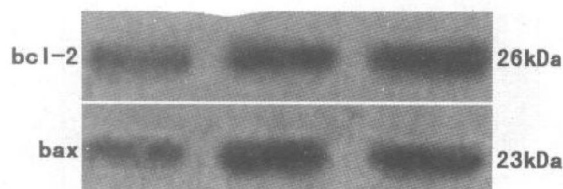


图4. Western blot 蛋白印迹分析结果 1 为假手术组, 2 为急性心肌梗死组, 3 为晚期再灌注组。

表2. 心肌细胞 bcl-2 和 bax 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	bcl-2	bax
假手术组	8	100% \pm 9%	100% \pm 11%
急性心肌梗死组	8	270% \pm 13% ^a	360% \pm 24% ^a
晚期再灌注组	7	290% \pm 19% ^a	280% \pm 17% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与急性心肌梗死组比较。

3 讨论

急性心肌梗死后梗死相关血管的早期开通可以减少梗死面积, 改善心肌梗死患者的预后。研究发现, 梗死相关动脉的闭塞时间与心肌细胞凋亡率呈显著正相关。心肌细胞凋亡可能是引起心肌梗死后晚期心功能不全和心室重构的重要因素^[5,6]。本实验通过犬在体急性心肌梗死晚期再灌注模型研究发现, 心肌梗死后梗死周围缺血区存在明显的心肌细胞凋亡, 梗死相关动脉晚期再灌注使梗死周围缺血区的心肌细胞凋亡明显减少。表明晚期再灌注具有减少心肌梗死后心肌细胞凋亡的作用。

有许多原癌基因参与细胞凋亡的发生, 其中 bcl-2 家族在心肌细胞凋亡中发挥重要的调节作用^[7]。bcl-2 和 bax 是一对凋亡调节蛋白, 参与细胞凋亡的“线粒体途径”的调节。bcl-2 主要位于线粒体膜、核膜和内质网膜, 具有抗细胞凋亡作用。bax 定位于细胞质中, 可在凋亡诱导因素作用下发生构型变化, 从细胞质移位到线粒体膜与 bcl-2 形成异源二聚体抑制 bcl-2 的活性, 增加线粒体膜的通透性,

使线粒体膜上通透性转换孔开放, 导致细胞色素 C (cytochrome C, CytC)、凋亡诱导因子等释放到细胞质中。释放到细胞质中的 CytC 与胞质中的凋亡蛋白酶激活因子 1 和 Caspase-9 酶原相结合形成凋亡酶体, 生成有活性的 Caspase-9 而触发凋亡蛋白酶的级联反应引起细胞凋亡的发生^[8]。本研究结果发现, 急性心肌梗死组和晚期再灌注组缺血区的 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达均增多, 两组间未见明显差异, 但急性心肌梗死组 bax mRNA 和蛋白的表达较晚期再灌注组明显增多。提示晚期再灌注可能通过下调 bax mRNA 及其蛋白的表达减少梗死周边缺血区心肌细胞凋亡。

心肌梗死后晚期再灌注治疗减少心肌细胞凋亡的机制原因尚不清楚, 可能与梗死相关动脉再通后缺血区的血液供应增加, 改善了局部的微循环状态, 使局部缺血时增加的 H^+ 、 Ca^{2+} 以及儿茶酚胺和氧自由基等凋亡诱导因素减少, 从而降低了 bax mRNA 的表达, 从而使缺血区存在的大量濒死心肌细胞免于死亡有关^[9]。心肌细胞属于终末期分化细胞几乎无再生能力, 设法抑制急性心肌梗死后心肌细胞凋亡, 增加存活心肌细胞数量, 无疑会有利于防治心肌梗死后的心室重构和促进心功能的恢复, 对患者的长期预后有益。

[参考文献]

- [1] Halkin A, Aymong E, Cox DA, Mehran R, Lansky AJ, Fahy M, et al. Relation between late patency of the infarct-related artery, left ventricular function, and clinical outcomes after primary percutaneous intervention for acute myocardial infarction (CADILLAC trial) [J]. *Am J Cardiol*, 2004, **93** (3): 349-353
- [2] 马礼坤, 余华, 黄向阳, 褚俊, 冯克福, 李世光, 等. 急性前壁心肌梗死后梗死相关血管延迟开通对晚期左室重构的影响[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, **33** (4): 328-331
- [3] Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats [J]. *Am J Physiol*, 2001, **280** (6): H2726-731
- [4] Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, Wang NP, Muraki S, Sun HY, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, **59** (1): 132-142
- [5] Saitoh T, Nakajima T, Kawahara K. Possible involvement of apoptotic death of myocytes in left ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. *Jpn J Physiol*, 2003, **53** (3): 247-252
- [6] Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewitt-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion [J]. *Apoptosis*, 2001, **6** (4): 279-290
- [7] 余泽洪, 邹玮, 陈林祥, 王晋明. 伊贝沙坦对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡及相关基因 Bax、Bcl-2 和 P53 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 415-418
- [8] Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, Harrison JG, Jomakka M, Valks DM. Regulation of cardiac myocyte cell death [J]. *Pharmacol Ther*, 2003, **97** (3): 223-261
- [9] Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Bussani R, Camilot D, Dobrina A, Leone AM, et al. High-risk clinical features predict increased post-infarction myocardial apoptosis and the benefits as a result of an open infarct-related artery [J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, **33** (8): 662-668

(此文编辑 文玉珊)