

色甘酸钠对大鼠心肌梗死后心肌凋亡及凋亡蛋白的影响

李 寰, 郭 伟, 梁远红, 胡良巧, 靳立军

(广东省心血管病研究所 广东省人民医院 广东省医学科学院, 广东省广州市 510080)

[关键词] 心脏肥大细胞; 心肌梗死; 心肌凋亡

[摘 要] 目的 研究肥大细胞脱颗粒程度对心肌梗死后的心肌凋亡及心肌纤维化的影响,探讨细胞凋亡机制在心肌梗死后心室重构中的作用。方法 建立雄性SD大鼠心肌梗死模型,分成假手术组($n=6$)、模型组($n=8$)、色甘酸钠组($n=7$)。术后4周,留取心肌标本行TUNEL染色观察心肌细胞凋亡指数(AI),Masson染色检测心肌胶原容积分数(CVF),Western blot法检测Caspase-3、Bcl-2和Bax蛋白表达。结果 与假手术组相比,模型组、色甘酸钠组在AI、CVF、Caspase-3及Bax蛋白表达量等方面均显著升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达明显下降;色甘酸钠组与模型组相比,AI、CVF、Caspase-3及Bax蛋白表达量均有所下降($P<0.05$),Bcl-2蛋白有所升高,但两者差异无统计学意义($P=0.127$)。AI与CVF呈正相关($r=0.769, P<0.01$)。结论 心肌梗死后心肌凋亡显著增加,抑制肥大细胞脱颗粒可明显减少心肌凋亡,减轻左室心肌纤维化程度。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

The Effects of Cromolyn Sodium on Myocardial Apoptosis and Apoptosis Protein after Myocardial Infarction

LI Huan, GUO Wei, LIANG Yuan-Hong, HU Liang-Qiao, and JIN Li-Jun
(Guangdong Cardiovascular Diseases Institute, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[KEY WORDS] Cardiac Mast Cell; Myocardial Infarction; Myocardial Apoptosis

[ABSTRACT] Aim To clarify the effects of myocardial apoptosis on ventricular remodeling after myocardial infarction, and to study the effects of mast cell degranulation on myocardial apoptosis and fibrosis. Methods Myocardial infarction (MI) model was established in male Sprague-Dawley (SD) rats by ligation of left anterior descending coronary artery. The rats were randomly divided into three groups: sham-operated group ($n=6$), MI model group ($n=8$) and cromolyn sodium group ($n=7$). Four weeks after ligation, myocardial apoptosis index (AI), collagen volume fraction (CVF) and expression level of caspase-3, Bcl-2 and Bax were obtained. Results Compared with sham-operated group, AI, CVF and expression level of caspase-3 and Bax in MI model group and cromolyn sodium group increased ($P<0.05$), but decreased in Bcl-2 ($P<0.05$). Cromolyn sodium group was decreased in these factors ($P<0.05$) compared with MI model group. Bcl-2 level in cromolyn sodium group was higher than MI model group, but there is no significant difference among these two groups ($P=0.127$). The AI was positive correlation with CVF ($r=0.769, P<0.01$). Conclusions Myocardial apoptosis increased after myocardial infarction. Mast cell degranulation inhibition can decrease apoptosis and reduced myocardial fibrosis.

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是心力衰竭最重要的致病原因,心肌梗死后,心肌细胞坏死、凋亡造成心肌数目减少,细胞外基质胶原网络系统重塑和心室重构导致心力衰竭的发生。细胞凋亡是细胞在正常生理或病理状态下发生的一种自发的、程序化的死亡过程。细胞凋亡发生时呈现独特的形态学和生物化学特征,表现为细胞膜完整,细胞器形态改变较轻,细胞核固缩、断裂,最终形成凋

[收稿日期] 2012-11-13
[基金项目] 广东省自然科学基金(9151601501000007)
[作者简介] 李寰,硕士研究生,主要从事心血管疾病防治研究,E-mail 为 sercre@qq.com。郭伟,硕士研究生,主要从事冠心病相关研究,E-mail 为 guowei2004@163.com。通讯作者靳立军,主任医师,硕士研究生导师,主要从事冠心病的相关研究,E-mail 为 lijun-jin@163.com。

亡小体并被巨噬细胞等清除。近年的研究显示,细胞凋亡参与 MI 心肌细胞的死亡,并在心室重构、心功能改变过程中起关键作用^[1,2]。而在心肌凋亡的过程中,肥大细胞扮演的角色还不明确,肥大细胞脱颗粒的长期抑制对心肌梗死后心肌凋亡的影响尚待确定。本研究以心脏肥大细胞(cardiac mast cell,CMC)为切入点,以肥大细胞稳定剂色甘酸钠诱导 SD 大鼠为研究对象,探讨色甘酸钠对心肌凋亡的影响及可能的临床应用。

1 材料和方法

1.1 动物分组及构建动物模型

健康雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,由中山医科大学动物实验中心提供。随机分为假手术组($n=6$)、模型组($n=8$)、色甘酸钠组($n=7$)。5 天后制作心肌梗死模型^[3]:模型组、色甘酸钠组在肺动脉圆锥与左心耳根部交界处下 2 ~ 3 mm 处结扎左冠状动脉前降支,制作大鼠急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)模型。以 II 导联 ST 段弓背向上抬高为结扎成功的标志,同时术后 2 周测量心脏 B 超,以心功能减退[射血分数(ejection fraction,EF) < 50%]提示建模成功。假手术组不结扎前降支,其他步骤同模型组。色甘酸钠组腹腔注射色甘酸钠 25 mg/(kg · d),假手术组、模型组腹腔注射等剂量的生理盐水,时间为术前 5 天至术后 4 周。

1.2 心脏标本处理

术后 4 周,称量大鼠体重后常规处死。取大鼠心脏,在左心室结扎点以下,垂直左心室心肌长轴横切左心室 4 等分,从心尖部向心底部依次取第 2 和第 4 块心肌组织。这两块心肌用中性甲醛固定后,常规石蜡包埋。取第 1 及第 3 块心肌组织保存于 -70℃ 冰箱保存。

1.3 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

取石蜡包埋组织作心肌横切片(厚 4 μm)。Tunel 法原位标记凋亡细胞核[试剂盒购于美国 Promega(北京)生物技术有限公司]。切片样本常规脱蜡入水。4% 甲醛溶液室温固定 15 min。20 mg/L 蛋白酶 K 室温下消化 15 min。加 100 μL 平衡缓冲液室温平衡 10 min。加入 50 μL TdT 工作液 37℃ 湿盒孵育 60 min。2 × SSC 溶液洗涤 15 min 终止反应。Streptavidin HRP 工作液室温孵育 30 min。DAB 显色。水洗残液,苏木素复染。分化,返蓝。切片脱水,二甲苯透明,树脂封片。阳性细胞可见胞核裂解,胞质中充满棕黄色物质,正常细胞核染为蓝色。每只大鼠观察 2 张切片,每张切片人工记数 4 个梗死边缘区高倍视野(放大 400 倍)中的凋亡细胞数,计算凋亡指数(apoptosis index,AI) =

(凋亡细胞/心肌细胞) × 100%。

1.4 Masson 染色检测心肌纤维化

切片脱蜡至水,Weigert 铁苏木素染 5 ~ 10 min,流水稍洗,1% 盐酸酒精分化,流水冲洗数分钟,丽春红酸性品红染液染 5 ~ 10 min,流水稍冲洗,磷钼酸溶液处理约 5 min,不用水洗,直接用甲苯胺蓝染液复染 5 min,1% 冰醋酸处理 1 min,95% 酒精脱水多次,无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。镜下观察,胶原纤维染成蓝色,肌纤维染成红色,细胞核为黑色。每个样本观察 2 个切片,拍照后应用 Image-pro Plus 6.0 医学图像分析软件计算心肌胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF) = (胶原面积/心肌总面积) × 100%,CVF 代表心肌纤维化程度。

1.5 Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bcl-2、Bax

取 -70℃ 冰箱保存的心肌组织块 100 mg 置于匀浆器中剪碎,加 500 μL RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,4℃ 下 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 BCA 法定量。将提取好样品的蛋白溶液和上样缓冲液按 5:1 混合,煮沸 5 min。80 V 恒压电泳 50 min,120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止。取出凝胶,将其放置滤纸上,形成凝胶转印堆积层。取出杂交膜,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,加入稀释后的相应一抗(Caspase-3、Bcl-2、Bax 一抗均购于美国 Anbo 生物科技有限公司)37℃ 孵育 2 h,加入二抗(1:8 000)孵育 1 h,将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面,并使反应持续 5 min。用凝胶成像仪拍摄条带。结果分析以磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase,GAPDH)为内参对目标蛋白上样量进行校正,计算相对表达量 = (目的条带灰度值/GAPDH 条带灰度值)。

1.6 统计学分析

所得结果用医学图像系统分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 对数据进行处理,多组间比较采用单因素方差分析及 LSD 法。对心肌凋亡指数与心肌胶原容积分数进行相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 色甘酸钠对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响

3 组大鼠心肌组织切片 TUNEL 染色后,梗死边缘区均可见细胞核碎裂、胞质充满深棕色颗粒的细胞,表明这些细胞发生了凋亡。模型组大鼠心肌细胞凋亡指数为 28.50% ± 3.45%,较假手术组(5.33% ± 0.54%)

明显升高($P < 0.01$)。色甘酸钠组大鼠心肌细胞凋亡指数为 $21.96\% \pm 1.78\%$, 较模型组明显降低($P < 0.01$), 但仍较假手术组明显升高($P < 0.01$)(图 1)。

2.2 色甘酸钠对心肌纤维化的影响

Masson 染色切片镜下观察, 模型组、色甘酸钠

组均明显可见染成蓝色的胶原纤维, 主要分布于梗死区, 而假手术组胶原纤维少见。色甘酸钠组大鼠心肌 CVF 为 $10.54\% \pm 3.73\%$, 较模型组($14.64\% \pm 3.78\%$)明显降低($P < 0.05$), 但仍较假手术组($0.40\% \pm 0.12\%$)明显升高($P < 0.01$)(图 2)。

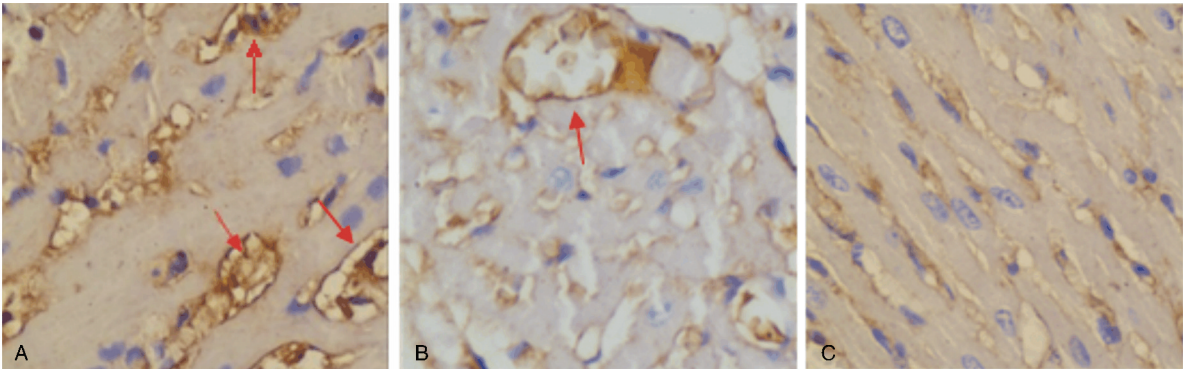


图 1. TUNEL 染色检测心肌凋亡(×400) A 为模型组, B 为色甘酸钠组, C 为假手术组; 箭头所指为凋亡细胞。

Figure 1. TUNEL staining of myocardial apoptosis(×400)

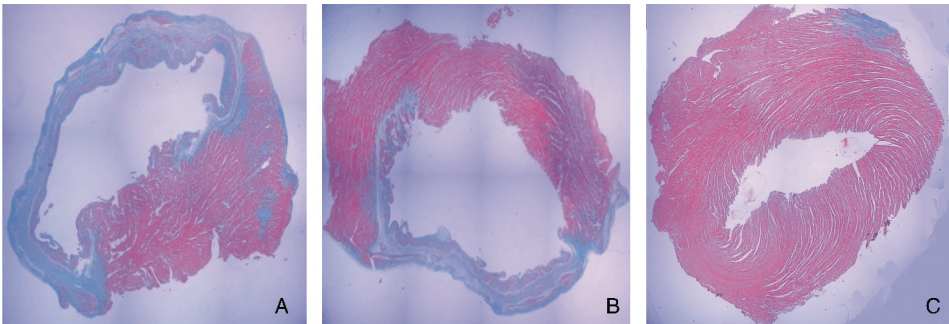


图 2. Masson 染色显示心肌胶原纤维(×40) A 为模型组, B 为色甘酸钠组, C 为假手术组; 呈蓝色的为胶原纤维。

Figure 2. Massion staining of myocardial collagen fiber(×40)

2.3 心肌凋亡指数与心肌胶原容积分数相关性分析

相关分析表明, 心肌凋亡指数与心肌胶原容积分数呈正相关($r = 0.769, P < 0.01$; 图 3)。

2.4 色甘酸钠对心肌组织 Caspase-3 表达的影响

Western blot 结果可见, 各组在 36 kDa 处均有显色的 GAPDH 条带, 各泳道显色基本均一, 说明各泳道上样量基本一致。可见两条 Caspase-3 蛋白特异条带, 分别为 Caspase-3 前体及活性裂解体 (Cleaved Caspase-3)。Caspase-3 前体及裂解体在模型组及色甘酸钠组均比假手术组显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 色甘酸钠组的相对表达量显著降低($P < 0.01$)(表 1、图 4)。

2.5 色甘酸钠对心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Bax 蛋白在模型组(0.83 ± 0.26)与色甘酸钠组

(0.45 ± 0.21)中的相对表达量均比假手术组(0.12 ± 0.09)明显升高($P < 0.05$), 色甘酸钠组的 Bax 蛋白相对表达量比模型组显著下降($P < 0.01$)。Bcl-2 蛋白在模型组(0.59 ± 0.20)与色甘酸钠组(0.86 ± 0.35)中的相对表达量均低于假手术组(1.26 ± 0.43)($P < 0.05$); 与模型组相比, 色甘酸钠组 Bcl-2 蛋白相对表达量有升高的趋势, 但差异无统计学意义($P = 0.127$)(图 5)。

表 1. Caspase-3 及其活性裂解体在各组的相对表达量
Table 1. Expression of caspase-3 and cleaved caspase-3 in each group

分 组	Caspase-3	Cleaved Caspase-3
模型组($n = 8$)	0.50 ± 0.09^a	0.82 ± 0.10^a
色甘酸钠组($n = 7$)	0.39 ± 0.09^{ab}	0.57 ± 0.13^{ab}
假手术组($n = 6$)	0.21 ± 0.04	0.34 ± 0.03

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

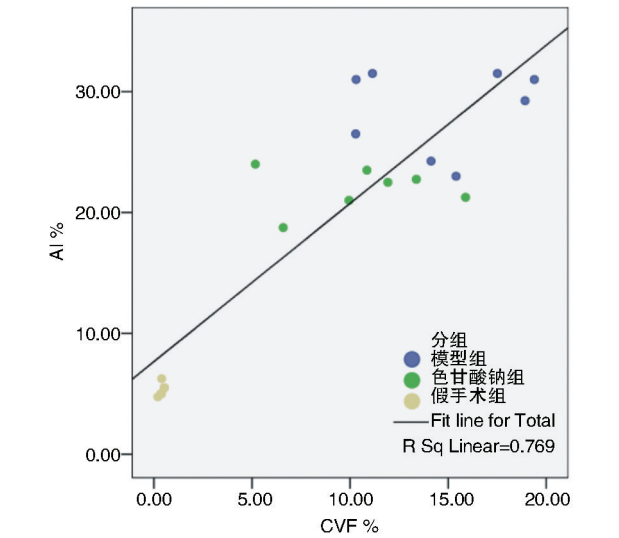


图 3. 心肌凋亡指数与心肌胶原容积分数的相关性分析

Figure 3. Correlation analysis of apoptosis index and collagen volume fraction

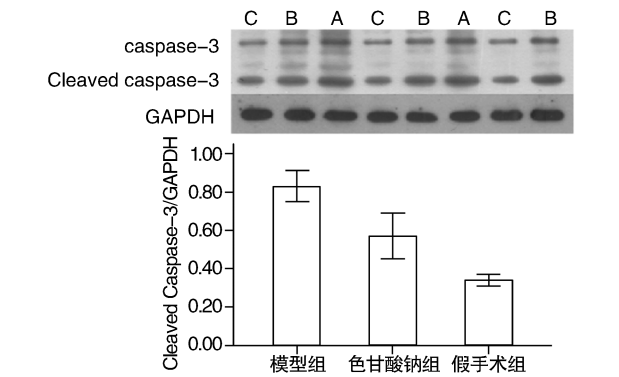


图 4. Caspase-3 在各组的相对表达量 A 为模型组,B 为色甘酸钠组,C 为假手术组。

Figure 4. Expression of caspase-3 in each group

3 讨论

心脏中含有大量的 CMC,CMC 通过释放 5 羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)、组胺、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)等炎症介质^[4],启动炎症级联反应,损害心肌收缩功能、组织完整性和电生理活动^[5]。色甘酸钠是一种抗变态反应药,它通过抑制细胞内环磷酸腺苷磷酸二酯酶,使细胞内环磷酸腺苷的水平升高,阻止肥大细胞的钙离子内流,从而稳定肥大细胞,减少肥大细胞脱颗粒作用导致的细胞损伤^[6]。本课题采用色甘酸钠处理急性心肌梗死后的大鼠,通过对肥大细胞脱颗粒作用的长期抑制,研究其对心肌梗死后晚期心室重构的影响。

本课题前期研究结果表明,梗死区心外膜肥大细胞密度,与假手术组相比,模型组明显增加($P <$

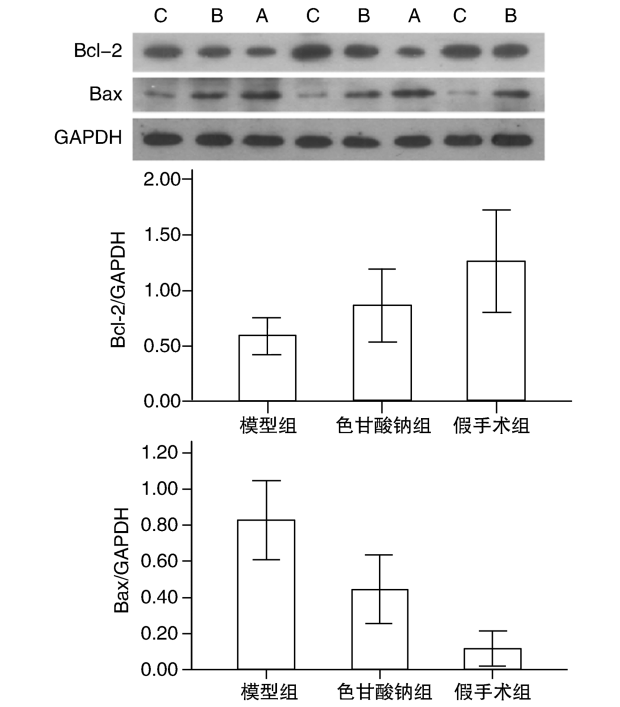


图 5. Bcl-2 与 Bax 在各组的相对表达量 A 为模型组,B 为色甘酸钠组,C 为假手术组。

Figure 5. Expression of Bcl-2 and Bax in each group

0.01);与模型组相比,色甘酸钠组明显下降($P < 0.01$)。非梗死区心外膜肥大细胞密度,与假手术相比,模型组明显增加($P < 0.05$);而与模型组相比,色甘酸钠组虽然呈下降的趋势,但差异没有统计学意义。说明心外膜肥大细胞参与了大鼠心肌梗死后心室重构的过程。本文进一步探讨 3 组间心肌纤维化程度及心肌凋亡的差异。

心肌纤维化是心肌坏死及凋亡导致左心室不良重构的关键环节。心肌纤维化主要是心肌 I 型和 II 型胶原蛋白的非正常增多,心肌坏死或凋亡后某些炎症介质和细胞因子过度激活,促使成纤维细胞及心肌细胞胶原表达合成增多,同时也使基质金属蛋白酶活性降低,胶原降解减少^[7]。近期 Elnakish 等^[8]的研究提示心肌凋亡与心肌纤维化之间有显著的相关性。本研究显示,与假手术组相比,无论是模型组还是色甘酸钠组,心肌凋亡程度及纤维化程度均显著升高,在所有样本中,心肌凋亡程度与纤维化程度表现出明显的正相关性。说明心肌凋亡及纤维化参与了心肌梗死后心室重构的过程。其中的机制可能是:急性心肌梗死后非梗死区由于缺氧及心室壁压力负荷增高,心肌细胞可发生凋亡,使存活心肌细胞产生侧向滑移,从而导致心室进行性扩张,发生心力衰竭,心功能的下降导致心室内压力负荷增加,从而诱发心肌纤维化;而心肌

纤维化,特别是血管周围纤维化,一方面加重了心肌细胞的缺氧,另一方面降低了心室壁弹性,增加了心肌细胞压力负荷。以上因素的共同作用导致心室重构往不可逆的方向进行性发展^[9]。随着肥大细胞脱颗粒程度的抑制,色甘酸钠组对比模型组,在凋亡和纤维化程度上均表现出明显下降。这说明肥大细胞可能通过脱颗粒作用,直接参与心肌凋亡的信号传导过程,从而影响了心室重构的进程。

细胞凋亡的发生受到细胞内凋亡调节蛋白的调控,目前已知的凋亡调节蛋白中,Caspase 家族与 Bcl-2 家族两大类最为关键^[10]。Caspase 蛋白家族激活的级联反应在凋亡调控中起执行作用,Caspase-3 合成后通常以非活化的前体形式存在于细胞质中,在多种凋亡信号刺激下经蛋白水解作用被激活成活化形式,可切断核内板(核内板是位于核内膜下的参与染色质组织的坚硬结构),引起核内板裂解和染色质凝聚,从而在细胞凋亡过程中起关键作用。在 Bcl-2 家族中,Bcl-2 蛋白通过干扰细胞色素 C 的释放而阻断下游 Caspase 蛋白的激活,抑制细胞的凋亡^[11]。Bax 蛋白作为线粒体膜上的离子通道的组成成分,使细胞色素 C 得以穿过线粒体膜,激活 Caspase-9,并进一步激活 Caspase-3,导致细胞凋亡^[12]。

肥大细胞对心肌凋亡的影响,主要是通过脱颗粒作用分泌大量炎症介质,如 TNF- α 、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等,与细胞膜上的受体结合,通过细胞内信号转导机制改变各种凋亡蛋白的表达量,从而影响心肌凋亡。本实验中应用 Western blot 法检测大鼠心肌组织中的 Caspase-3、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达量。Caspase-3 的活性裂解体在模型组、色甘酸钠组均较假手术组明显升高 ($P < 0.01$),而色甘酸钠组较模型组显著降低 ($P < 0.01$),Caspase-3 前体也表现出同样的趋势。这可能由于本研究获取心脏组织标本的时间点为心肌梗死后 4 周,心肌细胞在炎症介质长时间的的作用下,通过信号转导机制诱导 Caspase-3 前体的合成及活化均增加所致;而色甘酸钠组的这一过程则受到了抑制。

与假手术组相比,模型组、色甘酸钠组的 Bax 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$),Bcl-2 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05$);色甘酸钠组与模型组相比,Bax 蛋白表达量明显下降 ($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白虽然有所升高,但两者差异无统计学意义 ($P = 1.27$)。这提示色甘酸钠减少心肌凋亡的机制可能是抑制肥大细胞脱颗粒作用,减少炎症介质的释放,从而减少细胞内促凋亡蛋白 Bax 及 Caspase-3 的表达,而其对

Bcl-2 蛋白的影响可能为细胞继发性的改变。

本课题前期研究已证实:虽然肥大细胞脱颗粒的长期抑制无法有效阻止心脏的扩大,但可明显提高心脏的心搏量,减轻左心室心肌肥厚,进而改善心功能^[13]。本实验进一步研究了心肌梗死后心肌凋亡与心肌纤维化的关系,并以此为切入点,探讨了肥大细胞稳定剂色甘酸钠对心肌梗死后的心脏保护作用,这种作用可能是通过抑制肥大细胞脱颗粒作用,从而下调细胞内促凋亡蛋白 Bax 及 Caspase-3 的表达而实现。这为心肌梗死后阻止心室重构进程的药物治疗提供了新思路。

[参考文献]

[1] Ruixing Y, Dezhai Y, Jiaquan L. Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and cardiomyocyte apoptosis in rats with acute myocardial infarction[J]. J Med Invest, 2004, 51(1-2): 29-37.

[2] Gill C, Mestrl R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target? [J]. FASEB J, 2002, 16(2): 135-146.

[3] 尹 倪, 陈胜喜, 罗万俊, 等. 冠状动脉前降支结扎法制作大鼠急性心肌梗死模型[J]. 中国医师杂志, 2006, 8(9): 1 193-195.

[4] 江一峰, 殷莲华, 金惠铭. 肥大细胞和类胰蛋白酶与心血管疾病[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(1): 80-82.

[5] Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, et al. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation[J]. Immunol Rev, 2007, 217(1): 65-78.

[6] Ramos L, Pena G, Cai B, et al. Mast cell stabilization improves survival by preventing apoptosis in sepsis[J]. J Immunol, 2010, 185(1): 709-716.

[7] Levick SP, Gardner JD, Holland M, et al. Protection from adverse myocardial remodeling secondary to chronic volume overload in mast cell deficient rats[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 45(1): 56-61.

[8] Elnakish MT, Hassona MD, Alhaj MA, et al. Rac-induced left ventricular dilation in thyroxine-treated ZmRacD transgenic mice: role of cardiomyocyte apoptosis and myocardial fibrosis [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42 500.

[9] Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, et al. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications [J]. Arq Bras Cardiol, 2009, 92(2): 150-164.

[10] Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction[J]. Pharmacol Ther, 2004, 104(1): 1-16.

[11] 马礼坤, 屈朝法, 徐少东, 等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(4): 289-292.

[12] Hojo Y, Saito T, Kondo H. Role of apoptosis in left ventricular remodeling after acute myocardial infarction[J]. J Cardiol, 2012, 60(2): 91-92.

[13] 郭 伟, 梁远红, 靳立军, 等. 肥大细胞脱颗粒稳定剂对 SD 大鼠心肌梗死后不良心室重构的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(5): 407-411.

(此文编辑 曾学清)