

钙离子拮抗剂对大鼠心肌梗死后心肌细胞凋亡的影响

冯全洲 李天德 王兆霞 易军 王莉 杨庭树

【摘要】 目的 探索钙离子拮抗剂对缺血后心肌细胞凋亡的影响。**方法** 结扎大鼠冠状动脉(冠脉)造成心肌梗死;实验组动物冠脉结扎前和术后 3 h 分别经口腔内滴注和腹腔注射钙离子拮抗剂 Adalat 1 mg/kg 和 0.4 mg/kg,缺血对照组给安慰剂;正常对照组行假手术不结扎冠脉,给安慰剂。术后 6 h 测定左室功能,并取心脏标本作原位缺口末端标记法(TUNEL)原位细胞凋亡和 Fas、Bcl-2 蛋白免疫组织化学(组化)染色,高倍镜下计算细胞凋亡指数。**结果** 实验组和缺血对照组的左室收缩压、左室舒张末压和压力改变速度(dp/dt)无显著差异,3 个指标分别为 $76.7 \pm 7.5/8.0 \pm 6.1$ mm Hg 比 $74.9 \pm 11.1/11.6 \pm 8.3$ mm Hg, $P > 0.05$; (777.3 ± 128.6) mm Hg/s 比 (761.8 ± 136.4) mm Hg/s, $P > 0.05$;但均低于正常对照组 $[94.9 \pm 7.5/2.8 \pm 3.2$ mm Hg, $P < 0.001$; $(1\ 131.5 \pm 112.8)$ mm Hg/s, $P < 0.001$];实验组和缺血对照组心肌缺血区 TUNEL 染色阳性,实验组心肌细胞凋亡指数显著低于缺血对照组 $(0.201 \pm 0.053$ 比 0.261 ± 0.045 , $P < 0.05$),在缺血周边的心肌区 Fas 和 Bcl-2 蛋白免疫组化染色阳性,而正常对照组 3 种染色均阴性。**结论** 缺血可诱导心肌细胞凋亡及 Fas 和 Bcl-2 基因的表达;钙离子拮抗剂具有抑制心肌细胞凋亡的作用。

【关键词】 细胞凋亡; 心肌缺血; 心肌梗死; 钙离子拮抗剂

中图分类号:Q255;R542.22 文献标识码:A 文章编号:1003-0603(2004)03-0133-04

Effects of Ca^{2+} antagonist on cardiomyocytic apoptosis after experimental myocardial infarction FENG Quan-zhou*, LI Tian-de, WANG Zhao-xia, YI Jun, WANG Li, YANG Ting-shu. * Department of Cardiology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of Ca^{2+} antagonist on apoptosis of cardiomyocytes after myocardial ischemia. **Methods** The model of myocardial infarction was made by ligating left coronary artery in SD rats. In experimental group, the rats were administrated with Adalat through oral cavity (1 mg/kg) before operation, and through peritoneal cavity (0.4 mg/kg) 3 hours after operation. In ischemic control group the rats were injected with placebo and in normal control group the rats were treated with sham operation (no ligating left coronary artery) and placebo. The rats were killed 6 hours after operation, with their left ventricular function had been measured. Apoptotic myocardial cells were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) method, Fas and Bcl-2 proteins by the ABC immunohistochemistry method. Apoptosis indexes were calculated under high magnification field of microscopy. **Results** The systolic pressure, end-diastolic pressure and dp/dt of left ventricle in experiment group were not significant different from those in the ischemic control group, they were $76.7 \pm 7.5/8.0 \pm 6.1$ mm Hg vs. $74.9 \pm 11.1/11.6 \pm 8.3$ mm Hg ($P > 0.05$) and (777.3 ± 128.6) mm Hg/s vs. (761.8 ± 136.4) mm Hg/s ($P > 0.05$) respectively; but those in both the experimental group and the ischemic control group were lower than those in the normal control group, they were $94.9 \pm 7.5/2.8 \pm 3.2$ mm Hg ($P < 0.001$) and $(1\ 131.5 \pm 112.8)$ mm Hg/s ($P < 0.001$). There were a lot of positive myocytes with TUNEL stain in the ischemic region of left ventricle in both the experimental and the ischemic control group, apoptosis index in the experimental group was lower than that in the ischemic control group $(0.201 \pm 0.053$ vs. 0.261 ± 0.045 , $P < 0.05$). The positive myocytes of Fas and Bcl-2 protein appeared in the region surrounding ischemic myocytes. There were no positive myocytes with the three types of stain in normal control group. **Conclusion** Ischemia could induce apoptosis of myocytes and expression of Fas and Bcl-2 gene; Ca^{2+} antagonist could protect myocytes from apoptosis.

【Key words】 apoptosis; myocardial ischemia; myocardial infarction; Ca^{2+} antagonist

CLC number:Q255;R542.22 Document code:A Article ID:1003-0603(2004)03-0133-04

基金项目:全军医药卫生科研基金资助项目(96Z052)

作者单位:100853 北京,解放军总医院心内科(冯全洲,李天德,易军,王莉,杨庭树);肾内科(王兆霞)。

作者简介:冯全洲(1963-),男(汉族),河南省武陟县人,医学博士,副主任医师,主要从事冠心病防治研究,已发表论文 20 余篇 (Email: fqz301@tom.com)。

近年来研究发现,缺血后心肌细胞除了通过坏死外,还可以通过凋亡途径大量丧失,并且凋亡是缺血早期心肌细胞丧失的主要途径^[1-4],抑制细胞凋亡可以挽救缺血的心肌^[5,6],缩小梗死面积^[2]。心肌缺血或梗死后大量心肌细胞通过凋亡而丧失,严重影响了冠心病患者的心功能和预后。在细胞凋亡过程

中细胞内核酸内切酶水解 DNA 起着主要作用,而核酸内切酶的激活需要钙离子的参与^[7,8]。体外心肌细胞研究表明,增加细胞内钙离子浓度可引起细胞凋亡,降低细胞内钙离子浓度可以抑制心肌细胞的凋亡^[9]。但在活体用钙离子拮抗剂能否抑制缺血心肌细胞的凋亡尚不清楚,为此,我们给实验性心肌梗死大鼠应用临床上常用的钙离子拮抗剂,以了解其对缺血后心肌凋亡的影响。

1 材料及方法

1.1 动物模型及方案:用体质量 220~300 g 的雄性 SD 大鼠,乙醚吸入麻醉后开胸,结扎左冠状动脉(冠脉)造成心肌梗死模型,在术后 6 h 取心脏标本,在取心脏标本前,用体积分数为 10%的水合氯醛按 300 mg/kg 腹腔注射麻醉后,右侧颈部切口,经右颈动脉插管测左室压和压力改变速度(dp/dt)。心脏标本用体积分数为 4%的中性甲醛固定 24 h,制备成 5 μm 厚的石蜡切片,分别进行苏木素-伊红(HE)、原位细胞凋亡(末端脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记法, TUNEL)和免疫组织化学(组化)染色。

1.2 动物分组:实验动物随机分组:实验组 10 只,体质量 250~290 g,平均(260±10) g;结扎动物冠脉前 5 min,按 1 mg/kg 口腔内滴注 Adalat(德国拜耳公司生产硝苯地平滴剂),术后 3 h 腹腔内注射 Adalat 0.4 mg/kg。缺血对照组 10 只,体质量 250~300 g,平均(258±31)g;心肌缺血方法同实验组,但在相应的时间内分别口腔内滴注和腹腔注射等量生理盐水。正常对照组 10 只,体质量 220~270 g,平均(247±22) g,仅在冠脉下穿线,但不结扎冠脉,其余同缺血对照组。

1.3 原位细胞凋亡检测:采用 TUNEL 法^[10]进行改良,其中缓冲液改为 Promega 公司的末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)缓冲液。阳性对照:在切片置 TdT 酶/Bio-dUTP(生物素标记的脱氧三磷酸尿嘧啶核苷酸)反应前,在 200 μg/L 的 DNase I 溶液中 37℃下反应 15 min;阴性对照:不加 TdT 酶,其余染色步骤相同。

1.4 DNA 裂解片段的检测:梗死区部分心肌组织

直接匀浆用体积分数为 70%的乙醇-20℃下固定后,按 Gong 氏^[11]法提取低分子量核苷酸碎片,用琼脂糖凝胶电泳检测凋亡细胞特有的梯形电泳(DNA laddering)改变。

1.5 Fas、Bcl-2 蛋白的免疫组化检测:采用链霉素-生物素复合物(ABC)技术进行检测。切片常规脱蜡水化后,体积分数为 3%的过氧化氢-甲醇浸泡 10 min,蒸馏水冲洗后,进行高压抗原修复:采用家庭用高压锅将柠檬酸抗原修复液加热至沸腾后,将切片放入,盖上锅盖继续加热,在 4~5 min 内使高压锅喷气,继续加热 1~2 min,然后将锅端离热源,凉水下冷却 1~2 min,取出切片,蒸馏水和磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡后,正常山羊血清室温下封闭 15 min,接着一抗 37℃反应 1 h,一抗为 Santa Crus 抗体, Fas(M-20)-G 效价为 1:60; Bcl-2(N-19)-G 效价为 1:50;生物素标记的二抗 37℃反应 20 min,链亲和素标记的辣根过氧化物酶 37℃反应 20 min,显色剂 DAB 反应 8~10 min,以上每一步之间均用 PBS 漂洗 5×3 min。阴性对照:用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。

1.6 细胞凋亡的定量指标:采用细胞凋亡指数(高倍镜下,每个视野凋亡心肌细胞数除以心肌细胞总数)。每个标本观察 5 个凋亡明显的视野,求其凋亡指数的平均值,代表标本凋亡指数。

1.7 统计学处理:采用 SAS 软件,比较各组之间的心功能参数以及实验组和缺血对照组的凋亡指数均值的差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能的变化:3 组大鼠体质量、心率比较无显著性差异。冠脉结扎 6 h 后,实验组和缺血对照组大鼠心功能相比,实验组主动脉和左室收缩压稍高、左室舒张末压稍低, dp/dt 较高,但均无显著差异(P 均 >0.05);但实验组和缺血对照组的主动脉压、左室压和 dp/dt 均较正常对照组相应指标显著下降($P<0.001$)。见表 1。

2.2 心肌细胞的凋亡:在正常对照组和其它两组非缺血区心肌细胞 TUNEL 染色呈阴性;而在实验组

表 1 各组大鼠心功能参数比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Comparison on parameters of cardiac function of rats among different groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	心率(次/min)	主动脉压(mm Hg)	左室压(mm Hg)	dp/dt(mm Hg/s)
实验组	10	439±25	74.6±8.0/51.3±10.3 ^{#*}	76.7±7.5/8.0±6.1 ^{#*}	777.3±128.6 ^{#*}
缺血对照组	10	420±34	72.7±10.6/51.4±12.2 [#]	74.9±11.1/11.6±8.3 [#]	761.8±136.4 [#]
正常对照组	10	439±33	91.6±8.4/63.3±12.4	94.9±7.5/2.8±3.2	1131.5±112.8

注:与正常对照组比较: $^{\#}P<0.001$;与缺血对照组比较: $^*P>0.05$; 1 mm Hg=0.133 kPa

和缺血对照组心肌缺血区,显微镜下可见到细胞核被染成棕褐色的凋亡心肌细胞(图 1),实验组心肌细胞凋亡指数显著低于缺血对照组(0.201 ± 0.053 比 0.261 ± 0.045 , $P < 0.05$)。在缺血对照组心肌缺血区,取心肌提取的 DNA,经琼脂糖电泳呈明显的梯形改变(图 2)。

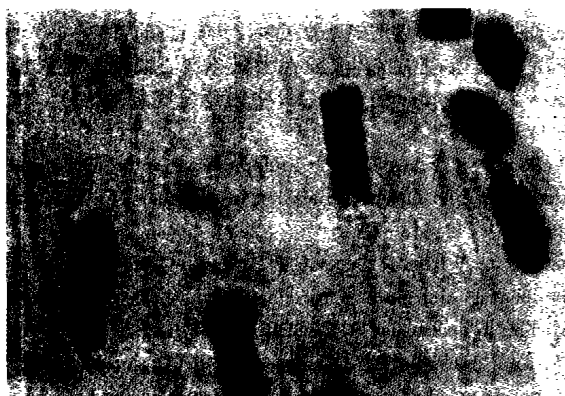
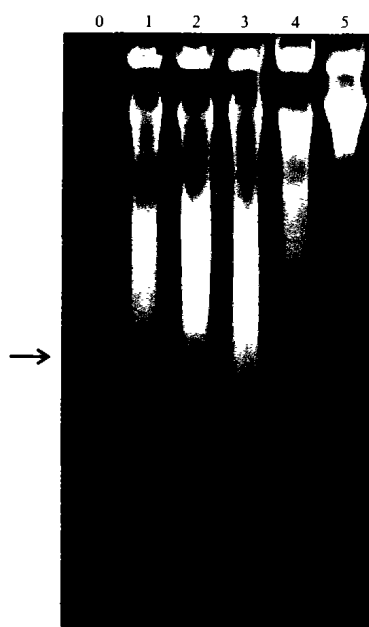


图 1 心肌 TUNEL 染色($\times 1\,000$)

Fig. 1 TUNEL staining of myocardium($\times 1\,000$)



0 道为 Marker, 2、3 道可见两条亮带, 4 道有多条亮带, 5 道为正常对照心肌; 1 道也有缺血区心肌组织, 但未见梯度改变, 可能与 DNA 降解有关, 箭头指示 200 bp 分子质量标准

图 2 缺血区组织 DNA 电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of the DNA isolated from the ischemic myocardium

2.3 心肌组织 Fas 和 Bcl-2 蛋白表达变化:在正常对照组,显微镜下心肌标本切片上 Fas 和 Bcl-2 蛋白免疫组化染色均呈阴性;其它两组在缺血的周边区域可见到细胞浆呈棕褐色的 Bcl-2 蛋白阳性细胞和部分细胞膜呈棕褐色的 Fas 蛋白阳性细胞(见图 3 和图 4)。

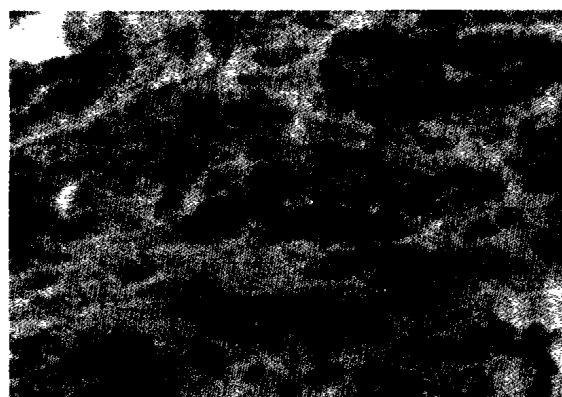


图 3 心肌 Bcl-2 免疫组化染色($\times 1\,000$)

Fig. 3 Immunostaining for myocardial Bcl-2($\times 1\,000$)



图 4 心肌 Fas 免疫组化染色($\times 1\,000$)

Fig. 4 Immunostaining for myocardial Fas($\times 1\,000$)

3 讨论

细胞凋亡是一种在一定基因调控下的细胞主动死亡,过去人们认为心肌细胞凋亡只是发生在胚胎发育期,近年来的研究表明:成熟的心肌细胞在受到一定的刺激后(如缺血、缺氧、心肌负荷的增加)后也会出现凋亡,缺血、缺氧是刺激心肌细胞凋亡的一个主要因素。参与细胞凋亡调控的基因较多,其中 Fas 和 Bcl-2 基因是调控细胞死亡和生存的两个主要基因。本研究结果提示:缺血区心肌 TUNEL 染色可见阳性细胞,且缺血区细胞 DNA 电泳呈梯形结构改变,表明缺血后心肌细胞确实存在着凋亡。缺血后心肌细胞 Fas、Bcl-2 蛋白免疫组化染色阳性,也说明了缺血也可以诱导 Fas 和 Bcl-2 表达。

钙离子是介导细胞损伤和死亡过程中的一个重要离子^[12],细胞凋亡时,促进凋亡的有关基因,如 Fas 和胱氨酸蛋白酶基因的表达,会增加细胞内的钙离子,增加的钙离子进一步激活核酸内切酶等酶,引起 DNA 的断裂,当 DNA 断裂超过自身的修复能力时导致细胞凋亡。因此,降低细胞内的钙离子,对保护细胞免于损伤起重要的作用。Kajstural 等^[9]在

体外心肌细胞凋亡的研究中,采用钙离子螯合剂 BAPTA/AM 降低心肌细胞内钙离子的浓度,抑制了 DNA 的断裂和心肌细胞的凋亡;而用 A23187 增加细胞内钙离子的浓度,可显著增加心肌细胞的凋亡。本研究给大鼠应用钙离子拮抗剂 Adalat,显著降低了缺血心肌细胞凋亡,说明活体心肌细胞缺血后的凋亡可能与细胞内钙离子增加有关,为临床应用钙离子拮抗剂保护缺血后心肌细胞提供了基础。

本实验在用 Adalat 显著降低心肌细胞凋亡指数的同时,并没有显著改善心功能指标,可能与冠脉结扎后在实验组和缺血对照组引起的缺血心肌面积并不相当,以及两组实验动物数不足有关。缺血后心功能的改变与左室心肌缺血面积有关,当手术造成的两组心肌缺血面积有差异时,会抵消由减少缺血部分细胞凋亡带来的整体心功能保护作用;当两组动物数不足时,由减少缺血区部分细胞凋亡带来的整体心功能保护作用的显著性也会被掩盖。

总之,钙离子介导着缺血引起的心肌细胞凋亡,钙离子拮抗剂在一定程度上有抑制缺血后心肌细胞凋亡的作用。

(志谢:本实验组织切片得到了病理科 关明臣 老师的大力协助,在此表示衷心的感谢!)

参考文献:

- 1 Kajstura J, Cheng W, Reiss K, *et al.* Apoptosis and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats[J]. Lab Invest, 1996, 74: 86 - 107.

- 2 Bartling B, Holtz J, Darmer D. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction[J]. Basic Res Cardiol, 1998, 93: 71 - 84.
- 3 田岳凤, 易受乡, 严洁, 等. 电针内关穴对心肌缺血-再灌注损伤预防保护作用的实验研究(Ⅱ)——对超微结构及细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(1): 15 - 18.
- 4 俞坚武, 屈百鸣, 赵仲生, 等. 葛根素对儿茶酚胺诱导大鼠心肌梗死时凋亡相关蛋白的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(1): 30 - 32.
- 5 马中富, 马虹, 叶任高, 等. 急性心肌梗死猝死患者心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(3): 137 - 141.
- 6 于汉力, 陆莹, 赵德超. 实验性大鼠急性心肌梗死心肌细胞中 Bcl-2 与 C-myc 的表达[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(1): 681 - 683.
- 7 Walker P R, Sikorska M. Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis[J]. Biochem Cell Biol, 1994, 72: 615 - 623.
- 8 Duke R C, Witter R Z, Nash P B, *et al.* Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis[J]. FASEB J, 1994, 8: 237 - 246.
- 9 Kajstural J, Cigola E, Malhotra A, *et al.* Angiotensin I induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29: 859 - 870.
- 10 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119: 493 - 501.
- 11 Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry[J]. Anal Biochem, 1994, 218: 314 - 319.
- 12 Trump B F, Berezsky I K. Calcium-mediated cell injury and cell death[J]. FASEB J, 1995, 9: 219 - 228.

(收稿日期: 2004-01-21 修回日期: 2004-02-19)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

第十次全国急诊医学学术交流会和第七届亚太地区灾害急救医学学术交流会征文通知

急诊医学包括院前急救、急诊和 ICU 三个环节,危重病急救患者是急诊医学的主要服务对象。为了促进亚太地区灾害急救医学和全国急诊医学的发展和提高诊疗救治水平,中华医学会急诊分会定于 2004 年 10 月 30 日—11 月 2 日在上海世博会议大酒店(上海市虹桥路 2106 号)召开“第七届亚太地区灾害急救医学学术交流会”和“第十次全国急诊医学学术交流会”。欢迎国内外从事院前急救、急诊医学、灾害医学和危重病医学工作的医务人员和专家学者参加这次规模空前的学术交流大会并踊跃投稿,与会者授予国家级 I 类继续教育学分 8 分,项目编号:20041001012。

征文内容:急诊医学危重急救医学方面的基础理论研究、动物实验的新发现、新成果、心肺脑复苏、急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能障碍综合征(MODS)、多器官衰竭(MOF)、创伤、高危手术、重症胰腺炎、严重感染、水电解质和酸碱平衡紊乱、休克、急性冠状动脉综合征、严重心律失常、高血压危象、重症哮喘、消化道出血、各类中毒的临床研究、诊断、救治及护理的经验总结或个案报道;急危重症和 ICU 诊疗方面的新技术、新疗法及中西医结合开展的研究;灾难性事件如地震、台风、洪水、水灾、海啸、空难、战争、瘟疫等方面的急救组织与经验总结;院前急救方面的经验总结;院内急诊医学、急救医学和 ICU 一体化管理机制的经验与探讨。

征文要求:论著、评述、病历报告、讲座、综述等,文体不限,论文请寄全文及 500 字以内中文摘要各 1 份;加盖单位公章、文责自负,自留底稿、恕不退稿,按结构式摘要撰写,论文表用 A4 打印稿,请附上软盘 1 张。

截稿日期:2004 年 7 月 31 日。来稿地址:上海市医学会(上海市北京西路 1623 号),邮编:200040。联系人:史伟云,电话:021-6267790 传真:021-62533614。Email:wyshi@sy00030.com。来稿请注明:急诊会议投稿。