

血红素氧合酶-1 基因转染对大鼠心肌缺血/再灌注损伤诱导心肌细胞凋亡的影响

李娜 王焱林 王成天 何祥虎 代乐

【摘要】 目的 探讨重组腺相关病毒(rAAV)介导大鼠血红素氧合酶-1(rHO-1)基因转染对心肌缺血/再灌注(I/R)损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法 95 只体重 225~250 g 的雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(SO 组, $n=8$)、生理盐水组(NS 组, $n=29$)、rAAV-荧光蛋白组(rAAV-EGFP 组, $n=29$)及 rAAV-rHO-1 组($n=29$)。NS 组、rAAV-EGFP 组和 rAAV-rHO-1 组分别于大鼠左心室前后壁共取 4 点分别注入生理盐水、rAAV-EGFP 或 rAAV-rHO-1 病毒液共 600 μ l。在基因转染后 3 个月, 各组处死 3 只大鼠, 取注射部位心肌, 荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达并计算转染率; 用免疫组化染色和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HO-1 的蛋白和 mRNA 表达。采用结扎左冠状动脉前降支 30 min、再灌注 120 min 建立心肌 I/R 模型; 成模后处死大鼠测定其心肌梗死面积及心肌细胞凋亡指数(AI), 光镜下观察心肌组织病理学改变。结果 荧光显微镜下仅 rAAV-EGFP 组可见心肌有荧光蛋白表达, 转染率为 $(53.5 \pm 2.0)\%$ 。与 SO 组比较, NS 组、rAAV-EGFP 组和 rAAV-rHO-1 组 AI 增加(P 均 < 0.01); 与 NS 组和 rAAV-EGFP 组比较, rAAV-rHO-1 组 HO-1 的蛋白及 mRNA 表达增加, 心肌梗死面积减小, AI 减少(P 均 < 0.01); NS 组及 rAAV-EGFP 组心肌组织病理学损伤较 SO 组和 rAAV-rHO-1 组为重。NS 组与 rAAV-EGFP 组间上述指标比较无统计学意义。结论 rAAV 介导的 rHO-1 基因转染大鼠心肌细胞后, 能够显著减少心肌细胞凋亡, 从而减轻心肌 I/R 损伤。

【关键词】 血红素氧合酶; 缺血/再灌注损伤; 心肌; 基因转染; 腺病毒科

Effects of transfection of rat hemeoxygenase-1 on cardiomyocyte apoptosis induced by myocardial ischemia/reperfusion injury in rats LI Na, WANG Yan-lin, WANG Cheng-yao, HE Xiang-hu, DAI Yue. Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China
Corresponding author: WANG Yan-lin, Email: WYL0342@sina.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of rat hemeoxygenase-1 (rHO-1) gene carried by recombinant adeno-associated virus (rAAV) on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. **Methods** Ninety-five healthy male Sprague-Dawley (SD) rats weighing 225~250 g were randomly divided into four groups: sham operation group (I, $n=8$); normal saline group (II, $n=29$); rAAV-EGFP (enhanced green fluorescent protein) group (III, $n=29$) and rAAV-rHO-1 group (IV, $n=29$). In I, II and IV groups, 600 μ l of normal saline, rAAV-EGFP or rAAV-rHO-1 was injected intramyocardially at four sites on the anterior and posterior walls of left ventricle. After 3 months, 3 animals in each group were sacrificed. EGFP-expression in heart sections was observed under fluorescence microscope. The expression of HO-1 in the injected myocardium was detected by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The remaining animals in the four groups were anesthetized, tracheostomized and mechanically ventilated. I/R of myocardium was producing by blocking the left anterior descending branch of coronary artery (LAD) for 30 minutes followed by 120 minutes reperfusion. After the successful reproduction of the model, the animals were killed and their hearts were harvested for determination of myocardial infarct size, apoptotic index (AI), and pathology changes in myocardial tissue. **Results** The expression of EGFP was detected in group III only, and transfection efficiency was $(53.5 \pm 2.0)\%$. AI was significantly higher in group II, group III and group IV than in group I (all $P < 0.01$). The expression of HO-1 mRNA and protein was significantly higher, and the infarct size and AI were significantly lower in group IV than in group II and group III (all $P < 0.01$). The degree of damage to myocardial tissue was significantly severer in group II and group III than in group I and group IV. There was no significant difference between group II and group III. **Conclusion** rAAV-mediated rHO-1 gene transfection may attenuate myocardium I/R injury by inhibiting apoptosis of cardiomyocyte in rats.

【Key words】 hemeoxygenase; myocardial ischemia/reperfusion injury; gene transfection; adenoviridae

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.06.003

基金项目:国家自然科学基金项目(30471658);湖北省自然科学基金项目(2004ABA162)

作者单位:430071 湖北武汉,武汉大学中南医院麻醉科(李娜现于湖北省妇幼保健院麻醉科工作)

通信作者:王焱林, Email: WYL0342@sina.com.cn

研究发现,心肌缺血/再灌注(I/R)损伤产生的应激反应在导致心肌细胞损伤和死亡的同时,也可诱导多种特殊基因表达并合成相关的应激蛋白,其中血红素氧合酶-1(HO-1)高表达在减轻心肌 I/R 损伤等应激反应中起重要的保护作用^[1],而 HO-1 基因敲除动物对 I/R 损伤更敏感^[2]。重组腺相关病毒(rAAV)介导大鼠 HO-1(rHO-1)基因转染心肌细胞后,是否能通过抑制心肌细胞凋亡保护 I/R 心肌尚有待于进一步研究。本研究拟探讨 rAAV 介导的 rHO-1 基因转染对心肌 I/R 损伤诱导大鼠心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组:健康雄性 SD 大鼠 95 只,体重 225~250 g,购自武汉大学动物实验中心,按随机数字表法分成假手术组(SO 组, $n=8$)、生理盐水组(NS 组, $n=29$)、rAAV-荧光蛋白组(rAAV-EGFP 组, $n=29$)和 rAAV-rHO-1 组($n=29$)。

1.2 rHO-1 基因转染实验

1.2.1 心肌内基因转染:腹腔注射乌拉坦麻醉大鼠,直视下经口行气管插管,接 DW-2000 型动物呼吸机(呼吸频率 60 次/min,潮气量 20~25 ml/kg)。分离左侧第 3、4 肋骨暴露心脏,沿左冠状动脉(冠脉)前降支供血区在左心室壁前后选择 4 个位点,将总量为 1.5×10^{11} v.g/ml 的 rAAV-rHO-1(自配)或 rAAV-EGFP(北京本元正阳基因技术股份有限公司)溶于 600 μ l 病毒液中,经 4 点缓慢注入心肌壁内,每点注射 150 μ l;NS 组注射生理盐水 600 μ l。使肺充分膨胀后逐层缝合切口,待大鼠自主呼吸恢复后拔出气管导管,装笼饲养,并连续 3 d 肌肉注射青霉素 10 kU/d 预防感染。

1.2.2 荧光蛋白检测及转染率计算:基因转染后 3 个月,从 NS 组、rAAV-EGFP 组和 rAAV-rHO-1 组各随机选择 3 只大鼠处死,取注射点附近心肌组织制作冰冻切片,在荧光显微镜下观察心肌细胞荧光蛋白的表达。每张切片随机选取 5 个视野计数荧光细胞,并计算转染率。

1.2.3 HO-1 表达的检测:在基因转染后 3 个月检测 HO-1 的表达。

1.2.3.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HO-1 mRNA 表达:NS 组、rAAV-EGFP 组和 rAAV-rHO-1 组各处死 6 只大鼠,取注射点附近的心肌组织约 100 mg,提取总 RNA 进行反转录。扩增 HO-1 的引物(产物 354 bp)由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。反应体系 50 μ l,PCR 扩增条

件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 下 1 min,扩增 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。RT-PCR 产物 10 μ l 与 6 $\times$ 上样缓冲液混合后在琼脂糖凝胶中电泳,采用半定量分析法检测 HO-1 表达,以灰度值表示其表达量。

1.2.3.2 免疫组化染色法检测 HO-1 蛋白表达:NS 组、rAAV-EGFP 组和 rAAV-rHO-1 组各处死 6 只大鼠,取注射点附近的心肌组织约 100 mg,制作石蜡切片,常规免疫组化过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP)染色。阳性细胞胞质呈棕黄色,以细胞中无棕黄色颗粒出现为阴性,高倍镜下对标本随机进行计数,计算其阳性率。

1.3 rHO-1 基因转染对心肌 I/R 损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响

1.3.1 心肌 I/R 模型制备:将各组剩余大鼠麻醉后行气管切开,机械通气(呼吸频率 60 次/min,潮气量 20~25 ml/kg),开胸,结扎左冠脉前降支造成心肌缺血(SO 组只穿线、不接扎),30 min 后解开结扎线进行再灌注 120 min。以结扎血管后短时间内心尖部心肌变成苍白色、心肌收缩减弱、心电图 ST 段明显抬高和(或)T 波高耸作为模型成功标准。结扎前心电图不正常、或未到观察终点而死亡以及模型制备不成功的大鼠被剔除。

1.3.2 心肌梗死面积的测定:制模后各组随机取 6 只大鼠,将左冠脉前降支重新结扎,经舌静脉注射伊文思蓝 1.5 ml,待缺血区清楚显示后迅速取出心脏,用冰冻生理盐水冲洗后制成 1 mm 厚的冰冻薄片,氯化三苯四唑(TTC)染色,用图像分析系统测定缺血区和坏死区面积,分别计算缺血区面积、梗死区面积占左心室面积的百分比。

1.3.3 心肌组织苏木素-伊红(HE)染色及凋亡细胞的原位标记检测:制模后各组处死 8 只大鼠,取心室壁及室间隔心肌组织,多聚甲醛水溶液固定、脱水、石蜡包埋,制成 4 μ m 切片,HE 染色,光镜下观察病理学改变。用原位末端缺刻标记法(TUNEL)^[3]标记心肌凋亡细胞核中的 DNA 3'-OH 末端(试剂盒购自德国宝灵曼公司)。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡阳性细胞核呈深浅不一的棕褐色。随机选择 5 个视野,计数凋亡阳性细胞并用计算机图像分析进行半定量测定,以心肌凋亡阳性细胞计数占总心肌细胞数的百分比作为心肌细胞凋亡指数(AI)。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 11.0 统计软件分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因转染的表达: 荧光显微镜下只有 rAAV-EGFP 组可见心肌组织中有荧光蛋白表达, 转染率为 $(53.5 \pm 2.0)\%$ 。

2.2 各组 HO-1 表达及心肌梗死面积(表 1): NS 组和 rAAV-EGFP 组各指标比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05); 与 NS 组和 rAAV-EGFP 组比较, rAAV-rHO-1 组 HO-1 蛋白及 HO-1 mRNA 表达增加, 心肌梗死面积减少(P 均 < 0.01); 而心肌缺血面积差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

表 1 3 组大鼠 HO-1 蛋白和 mRNA 表达及心肌缺血面积、梗死面积比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HO-1 蛋白(%)	HO-1 mRNA	缺血面积(%)	梗死面积
NS 组	8.13 ± 2.08	0.82 ± 0.09	49.4 ± 8.9	47.7 ± 9.8
rAAV-rHO-1 组	34.93 ± 7.74^a	1.67 ± 0.32^a	47.4 ± 8.7	32.3 ± 10.4^a
rAAV-EGFP 组	9.20 ± 2.58^b	0.84 ± 0.19^b	49.8 ± 9.8	49.1 ± 7.7^b

注: 与 NS 组比较, $^aP < 0.01$; 与 rAAV-rHO-1 组比较, $^bP < 0.01$

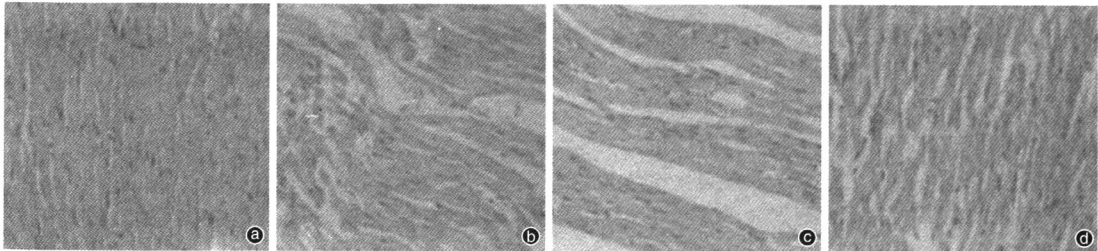
2.3 各组心肌组织病理学改变(图 1): SO 组心肌细胞排列整齐、紧密, 细胞间隙很小。NS 组可见多处散在坏死灶, 大片心肌细胞坏死, 坏死处原有心肌结构消失, 未见原结构残影, 有散在少许强嗜伊红颗粒, 未见细胞核; 周围有大量的炎性细胞浸润, 心肌水肿明显, 胶原纤维肿胀, 心肌细胞间隙增宽。rAAV-EGFP 组与 NS 组相似。rAAV-rHO-1 组可见散在一些小坏死灶, 未见大片心肌坏死, 周围心肌

水肿较轻, 间质水肿较轻。

2.4 各组心肌细胞凋亡改变(图 2): 用 TUNEL 法染色的阳性心肌细胞具有形态变圆或不规则, 与周围组织脱离, 核固缩, 染色质浓聚, 主要位于心肌梗死区与非梗死区交界处。rAAV-rHO-1 组偶见少数阳性细胞; NS 组和 rAAV-EGFP 组阳性细胞明显增多; SO 组未见阳性细胞。与 SO 组比较, NS 组、rAAV-rHO-1 组和 rAAV-EGFP 组 AI 均明显升高 [$(1.81 \pm 1.04)\%$ 、 $(1.16 \pm 0.61)\%$ 、 $(1.95 \pm 0.49)\%$ 比 $(0.60 \pm 0.82)\%$, P 均 < 0.01]; rAAV-rHO-1 组 AI 明显低于 NS 组和 rAAV-EGFP 组 (P 均 < 0.01); NS 组与 rAAV-EGFP 组 AI 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

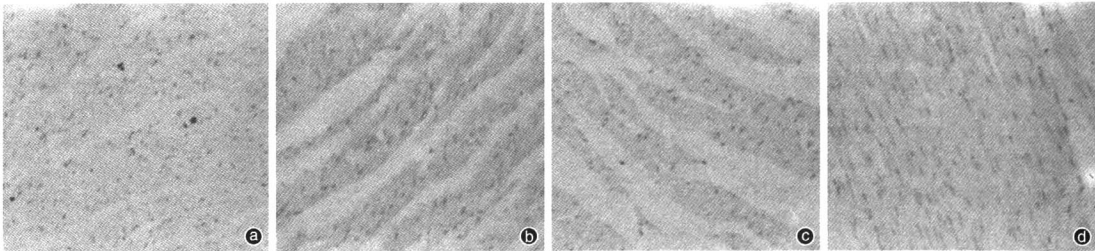
3 讨论

基因治疗的关键是能够将外源基因有效地导入靶细胞并适量的表达。因此, 合适的基因导入系统是基因治疗的核心技术。AAV 具有安全、宿主范围广、可以长期表达转基因产物的特点, 使其在基因治疗领域得到广泛的应用^[3-4]。本实验中选择 rAAV 作为载体, 携带 HO-1 基因(rAAV-rHO-1), EGFP 为报告基因, 于荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况。结果表明, 左心室心肌壁直接注射病毒, 3 个月可达满意的转染效果。以此剂量及时间点为标准, 向大鼠心肌内直接注射 rAAV-rHO-1 3 个月后, 通过 RT-PCR 及免疫组化染色法测定 HO-1 表达, 结果



(a): SO 组; (b): NS 组; (c): rAAV-rHO-1 组; (d): rAAV-EGFP 组

图 1 各组大鼠心肌组织病理学改变 HE $\times 200$



(a): SO 组; (b): NS 组; (c): rAAV-rHO-1 组; (d): rAAV-EGFP 组

图 2 各组大鼠心肌细胞凋亡检测结果 TUNEL $\times 200$

表明 HO-1 表达量较 NS 组及 rAAV-EGFP 组明显升高,提示 rAAV-rHO-1 能有效转染大鼠心肌细胞,并可在心肌细胞内持续稳定表达 HO-1。

心肌 I/R 损伤是一种常见的复杂病理生理变化,涉及多个环节,目前已证实再灌注损伤与细胞内钙超载、氧自由基及炎症介质有关^[6]。HO-1 是一种应激蛋白基因,是血红素降解过程中的限速酶。迄今为止,已发现 3 种 HO 同工酶,其中 HO-1 为诱导型,广泛分布于肝脏、脾脏、网状内皮系统和骨髓等组织,在有害刺激和疾病条件下对机体具有保护作用^[6]。心肌 I/R 时缺氧诱导因子-1(HIF-1)活化,能诱导 HO-1 表达,并减弱促炎症因子表达^[7]。HO-1 在心肌中高表达能减弱在转基因大鼠 I/R 后的心肌损伤,在 I/R 前用外源性亚铁血红素诱导该酶表达能显著减小 I/R 发生后的心肌梗死面积^[3]。此外,研究发现 HO-1 过表达对心脏、肝脏、小肠和肌肉皮瓣等移植模型中的 I/R 损伤具有细胞保护作用,可维持组织结构,保持器官功能,并能延长移植存活时间^[8]。本研究结果表明,与 NS 组比较,rAAV-EGFP 组心肌梗死面积增大,心肌组织病理学损伤严重;采用 rAAV 介导 HO-1 基因转染心肌细胞后,心肌梗死面积较 NS 组及 rAAV-EGFP 组明显减小,心肌组织病理学损伤较轻,表明 HO-1 的高表达对心肌 I/R 损伤有保护作用。

细胞凋亡机制在 I/R 过程中起重要作用,I/R 诱发凋亡的机制可能与自由基、胞内钙超载、线粒体损伤有关^[9]。研究证实,I/R 心肌中 HO-1 基因转移后白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平和 Bax 蛋白减少,抗细胞凋亡 Bcl-2 蛋白增加^[10];HO-1 在心肌损伤中具有保护作用,HO-1 在培养内皮细胞中的抗凋亡作用是通过一氧化碳(CO)激活 p38 丝裂素活化蛋白激酶途径来介导的^[11]。大量证据显示,HO-1 高表达对 I/R 损伤的保护作用都伴有凋亡的降低。Tang 等^[12]利用转基因技术构建了“警卫载体系统”,使心肌细胞在受到 I/R 损伤后及时表达过量的 HO-1 蛋白,该方法能显著减小心肌梗死面积,降低脂质过氧化物酶活性,减少炎症细胞浸润,减少促凋亡蛋白表达,因而能够减少细胞损伤、保护心肌。本研究,与 SO 组比较,NS 组及 rAAV-EGFP 组 I/R 后心肌凋亡细胞显著增多;用 rAAV 介导 HO-1 基因转染大鼠心肌细胞后,心肌细胞凋亡则明显减少。说明 rAAV 介导的 HO-1 基因转染大鼠心肌细胞后可减轻心肌 I/R 损伤,可能是通过抗心肌细胞凋亡而产生的,提示 HO-1 对 I/R 损伤保护作用的可能机制

与调节细胞周期有关。

综上所述,rAAV 介导的大鼠 HO-1 基因能有效转染大鼠心肌细胞,可在心肌细胞内持续稳定表达 HO-1,减少心肌细胞凋亡,从而减轻大鼠心肌 I/R 损伤,产生持续有效的心肌保护作用。

参考文献

- [1] Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, et al. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia reperfusion injury. *J Surg Res*, 2004, 118(1):53-57.
- [2] Yoshida T, Maulik N, Ho YS, et al. H(mox-1) constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: a study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the heme oxygenase-1 gene. *Circulation*, 2001, 103(12):1695-1701.
- [3] Chu D, Sullivan CC, Weitzman MD, et al. Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart using adeno-associated virus versus adenovirus vectors. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126(3):671-679.
- [4] Vassalli G, Büeler H, Dudler J, et al. Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo; a comparative study with adenovirus vectors. *Int J Cardiol*, 2003, 90(2-3):229-238.
- [5] 符香怡,李培杰,张正义,等.阿片受体拮抗剂对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护效应. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(11):693-694.
- [6] 柯庆宏,郑树森,梁廷波,等.高渗盐水对缺血/再灌注损伤肝脏血红素加氧酶-1 表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(1):5-8.
- [7] Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, et al. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury; role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(2):H542-H548.
- [8] Shen XD, Ke B, Zhai Y, et al. Start 4 and Start 6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice; HO-1 dependence of start 4 disruption-mediated cytoprotection. *Hepatology*, 2003, 37(2):296-303.
- [9] Hoffman JW Jr, Gilbert TB, Poston RS, et al. Myocardial reperfusion injury; etiology, mechanisms, and therapies. *J Extra Corpor Technol*, 2004, 36(4):391-411.
- [10] Melo LG, Agrawal R, Zhang L, et al. Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation*, 2002, 105(5):602-607.
- [11] Kim KM, Pae HO, Zheng M, et al. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ Res*, 2007, 101(9):919-927.
- [12] Tang YL, Qian K, Zhang YC, et al. A vigilant, hypoxia-regulated heme oxygenase-1 gene vector in the heart limits cardiac injury after ischemia-reperfusion in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2005, 10(4):251-263.

(收稿日期:2008-04-26 修回日期:2008-12-05)

(本文编辑:李银平)