

· 论著 ·

应激性心肌损伤发病机制的实验研究

林靖 周丽华 陈欣 黄志民 阿斯楞

【摘要】 目的 探讨应激性心肌损伤的发病机制。**方法** 30 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分成正常对照组、制动后冰泳应激组(每日制动 6 h, 第 13 日开始制动后冰泳 5 min)、内毒素组〔腹腔注射脂多糖(LPS)10 mg/kg〕3 组, 每组 10 只。取心肌组织, 光镜下观察心肌组织病理变化; 电镜下观察心肌超微结构; 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清心肌钙蛋白 I(cTnI)含量; 用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡并计算凋亡指数; 用免疫组化法检测心肌组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase-8 和 caspase-3)的表达; 并分析 caspase 与细胞凋亡指数的相关性。**结果** 与正常对照组相比, 制动冰泳应激组和内毒素应激组在光镜和电镜下均有不同程度的心肌细胞损伤表现, 血清 cTnI 含量($\mu\text{g/L}$)均明显增加(0.63 ± 0.12 、 0.74 ± 0.08 比 0.53 ± 0.03 , $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); 心肌细胞凋亡指数有不同程度增加[(7.91 ± 1.71)%、(12.94 ± 2.00)% 比 0], 心肌组织中 caspase-8 和 caspase-3 表达增加(caspase-8 灰度值: 126.65 ± 3.13 、 114.82 ± 8.67 比 156.99 ± 9.66 ; caspase-3 灰度值: 130.20 ± 2.96 、 108.58 ± 5.72 比 160.51 ± 5.25 , 均 $P < 0.01$), 且内毒素应激组各指标均明显高于制动冰泳应激组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相关分析显示, 制动冰泳应激组中 caspase-8、caspase-3 与细胞凋亡指数呈显著正相关($r_1 = 0.914$, $P_1 = 0.002$; $r_2 = 0.929$, $P_2 = 0.001$); 内毒素应激组中 caspase-8、caspase-3 与细胞凋亡指数呈显著正相关($r_1 = 0.956$, $P_1 = 0.000$; $r_2 = 0.916$, $P_2 = 0.001$)。**结论** 应激可能通过增加 caspase-8 和 caspase-3 蛋白的表达诱导大鼠心肌细胞凋亡, 从而导致心肌损伤。

【关键词】 应激; 心肌损伤; 发病机制

Study on the pathogenesis of stress myocardial injury LIN Jing*, ZHOU Li-hua, CHEN Xin, HUANG Zhi-min, Asileng. *Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhehot 010050, Neimenggu, China

Corresponding author: ZHOU Li-hua, Email: xiulika@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the pathogenesis of stress myocardial injury. **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups, with 10 rats in each group: normal control group, movement restriction and ice swimming stress group (rat movement was restricted 6 hours per day; beginning from 13th day rats were allowed to swim in ice water for 5 minutes, ice stress group), and endotoxin stress group [intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) 10 mg/kg, LPS group]. The myocardial tissue was harvested, the pathological changes in myocardial was observed with light microscopy, and the changes in myocardial ultrastructure were observed with electron microscope. The levels of serum cardiac troponin I (cTnI) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), apoptosis of myocardial cells was detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), and the apoptotic index was calculated. The caspase-8 and caspase-3 expression in myocardial tissue were assessed by immunohistochemistry. The correlation between caspase and apoptotic index was analyzed. **Results** Compared with normal control group, in ice stress group and LPS group, myocardial tissue was found to be injured seriously in different degrees under light microscopy and electron microscopy; the content of cTnI ($\mu\text{g/L}$) in serum was significantly increased (0.63 ± 0.12 , 0.74 ± 0.08 vs. 0.53 ± 0.03 , $P < 0.05$ and $P < 0.01$); apoptosis index of myocardial tissue was significantly increased in different degrees [(7.91 ± 1.71)%, (12.94 ± 2.00)% vs. 0]; caspase-8 and caspase-3 expressions in the myocardium were increased (caspase-8 gray scale: 126.65 ± 3.13 , 114.82 ± 8.67 vs. 156.99 ± 9.66 ; caspase-3 gray scale: 130.20 ± 2.96 , 108.58 ± 5.72 vs. 160.51 ± 5.25 , all $P < 0.01$). However, the above indexes in LPS group were significantly higher than those in ice stress group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The correlation analysis showed that in ice stress group, positive correlation was found between caspase-8, caspase-3 and apoptotic index ($r_1 = 0.914$, $P_1 = 0.002$; $r_2 = 0.929$, $P_2 = 0.001$); in LPS group, the positive correlation also exist between caspase-8, caspase-3 and apoptotic index ($r_1 = 0.956$, $P_1 = 0.000$; $r_2 = 0.916$, $P_2 = 0.001$). **Conclusion** Severe stress may produce stress injury of myocardium via increasing expression of caspase-8 and caspase-3 protein.

【Key words】 Stress; Myocardial injury; Pathogenesis

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.04.005

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2010BS1108)

作者单位: 010050 呼和浩特, 内蒙古医学院附属医院重症医学科(林靖、周丽华、陈欣、黄志民), 普外科(阿斯楞)

通信作者: 周丽华, Email: xiulika@yahoo.com.cn

心脏是应激的主要损伤靶器官之一^[1]。应激性心肌病在 1990 年首先报告于日本, 大部分患者发病时出现类似急性冠脉综合征(ACS)的临床表现^[2], 近年来其发病机制的研究主要集中在: ①交感神经系

统功能紊乱及儿茶酚胺介导的心肌顿抑和血管痉挛^[3-4];②冠状动脉(冠脉)结构异常^[5-6];③病毒感染;④雌激素水平减低^[7];⑤脂肪酸代谢障碍^[8]等,但其确切的发病机制尚未完全明确,特别是有关细胞及分子水平方面的机制报道少见。本实验中通过复制应激性心肌损伤动物模型,从分子水平探讨天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 和 3(caspase-8 和 caspase-3)及细胞凋亡在应激性心肌损伤中的作用机制,为进一步研究应激性心肌损伤的发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:大肠杆菌脂多糖(LPS,O55:B5)为美国 Sigma 公司产品;大鼠心肌肌钙蛋白 I(cTnI)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒为美国 R&D 公司产品;caspase-8 和 caspase-3 多克隆抗体(兔/鼠通用型)为北京博奥森生物技术有限公司产品;原位末端缺刻标记试验(TUNEL)试剂盒为南京凯基物生物有限公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记链霉亲和素试剂盒为北京康为世纪生物科技有限公司产品。

1.2 动物分组及模型复制:健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 30 只,体重(180 ± 20) g,由内蒙古大学动物中心提供,动物许可证号:SCXK(蒙)2002-0001。将实验动物按随机数字表法分为 3 组,每组 10 只。①正常对照组:自由摄食水;②制动冰泳应激组:每日将大鼠放入高 15~19 cm、直径约 5 cm 的透气铁质圆桶内制动 6 h,从第 13 日开始于制动后冰泳 5 min,第 14 日冰泳后按实验要求取材;③内毒素应激组:腹腔注射 LPS 10 mg/kg,24 h 后按实验要求取材。

本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 观察指标及方法:①动物一般状态;②光镜及电镜下观察心肌组织病理形态;③ELISA 法测定血清 cTnI 含量;④TUNEL 法检测心肌细胞凋亡;⑤免疫组化法检测 caspase-8 和 caspase-3 的蛋白表达(其灰度值与蛋白表达成反比)。

1.4 统计学处理:用 SPSS 13.0 统计软件分析处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料为正态分布且方差齐时用方差分析,否则应用秩和检验,相关分析采用直线相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物的一般状态:正常对照组大鼠食欲好,进食多,活泼好动。制动冰泳应激组大鼠进食减少,精神差,不易激惹。内毒素应激组大鼠进食明显减少,

毛发直立,精神极差,萎靡不振。

2.2 组织病理学改变

2.2.1 光镜下观察心肌组织病理变化:苏木素-伊红(HE)染色显示,正常对照组大鼠心肌组织未见异常(图 1a)。制动冰泳应激组大鼠心肌组织可见炎性细胞浸润、充血、出血,肌纤维萎缩(图 1b)。内毒素应激组大鼠心肌纤维断裂,结构破坏,血管渗出明显,可见大量炎性细胞浸润(图 1c)。

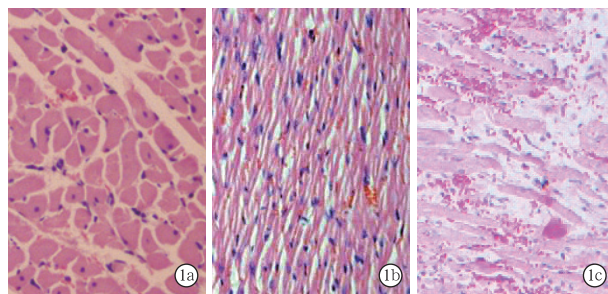


图 1 光镜下观察各组大鼠心肌组织病理改变 正常对照组(a)心肌排列整齐,胞膜完整;制动冰泳应激组(b)心肌组织有散在出血,并有较多炎性细胞浸润;内毒素应激组(c)心肌细胞结构明显破坏,散在出血,有较多炎性细胞浸润 HE 高倍放大

2.2.2 电镜下观察心肌超微结构变化:正常对照组心肌组织未见异常(图 2a)。制动冰泳应激组可见心肌细胞内肌纤维断裂、崩解;细胞核畸形,染色质边集;线粒体大小不等,线粒体内可见空泡及嵴断裂(图 2b)。内毒素应激组可见心肌细胞线粒体大小不等、排列紊乱,空泡变性(图 2c)。

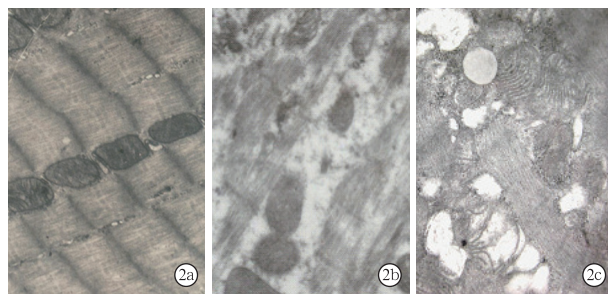


图 2 电镜下观察各组大鼠心肌组织超微结构改变 正常对照组(a)心肌纤维排列整齐;制动冰泳应激组(b)心肌纤维断裂,线粒体大小不等;内毒素应激组(c)心肌细胞线粒体大小不等,空泡变性 醋酸双氧铀-柠檬酸铅染色 高倍放大

2.3 血清 cTnI 测定结果(表 1):与正常对照组比较,制动冰泳应激组和内毒素应激组血清 cTnI 含量均明显增加($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);且内毒素应激组明显高于制动冰泳应激组($P < 0.05$)。由此可知,制动加冰泳应激及内毒素应激均可造成心肌损伤。

2.4 心肌细胞凋亡检测结果(表 1):正常对照组未见凋亡心肌细胞;制动冰泳应激组及内毒素应激组

均可见到凋亡的心肌细胞,且内毒素应激组多于制动冰泳应激组($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 cTnI 含量、心肌细胞凋亡指数、心肌组织 caspase-8 和 caspase-3 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	cTnI 含量($\mu\text{g/L}$)	凋亡指数(%)
正常对照组	$0.53 \pm 0.03(10)$	0 (8)
制动冰泳应激组	$0.63 \pm 0.12(10)^a$	$7.91 \pm 1.71(8)$
内毒素应激组	$0.74 \pm 0.08(10)^{bc}$	$12.94 \pm 2.00(8)^d$

组别	蛋白表达(灰度值)	
	caspase-8	caspase-3
正常对照组	$156.99 \pm 9.66(10)$	$160.51 \pm 5.25(10)$
制动冰泳应激组	$126.65 \pm 3.13(10)^b$	$130.20 \pm 2.96(10)^b$
内毒素应激组	$114.82 \pm 8.67(10)^{bd}$	$108.58 \pm 5.72(10)^{bd}$

注:cTnI:心肌肌钙蛋白 I, caspase-8、-3:天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8、3;与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与制动冰泳应激组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;括号内为动物数

2.5 心肌组织 caspase-8 和 caspase-3 蛋白表达(表 1;图 3~4):正常对照组 caspase-8 和 caspase-3 蛋白弱表达。与正常对照组比较,制动冰泳应激组及内毒素应激组 caspase-8 和 caspase-3 蛋白表达水平明显增加(均 $P<0.01$);且内毒素应激组高于制动冰泳应激组(均 $P<0.01$)。

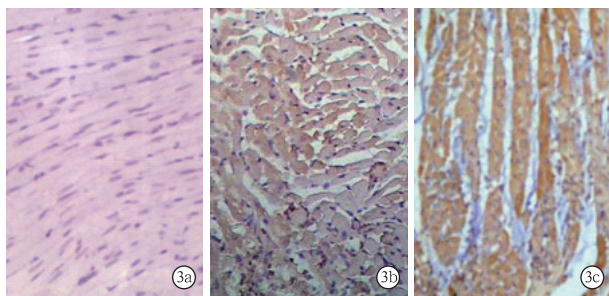


图 3 光镜下观察各组大鼠心肌组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8(caspase-8)蛋白表达 正常对照组(a)胞质中无明显 caspase-8 蛋白表达;制动冰泳应激组(b)胞质中散在 caspase-8 蛋白表达的棕色颗粒沉着;内毒素应激组(c)胞质中 caspase-8 蛋白表达的棕色颗粒沉着较多 免疫组化 中倍放大

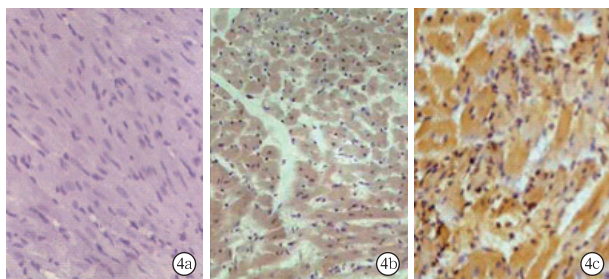


图 4 光镜下观察各组大鼠心肌组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)蛋白表达 正常对照组(a)胞质中无明显 caspase-3 蛋白表达;制动冰泳应激组(b)胞质中散在 caspase-3 蛋白表达的棕色颗粒沉着;内毒素应激组(c)胞质中 caspase-3 蛋白表达的棕色颗粒沉着较多 免疫组化 中倍放大

2.6 相关性分析:制动冰泳应激组中 caspase-8、caspase-3 与细胞凋亡指数呈显著正相关($r_1=0.914$, $P_1=0.002$; $r_2=0.929$, $P_2=0.001$);内毒素应激组中 caspase-8、caspase-3 与细胞凋亡指数呈显著正相关($r_1=0.956$, $P_1=0.000$; $r_2=0.916$, $P_2=0.001$)。

3 讨论

应激是指机体在受到各种内外强烈因素(即应激原)刺激时所出现的非特异性全身反应^[9]。应激对机体的损害目前主要表现在 4 个系统,即心血管系统、消化系统、免疫系统和神经精神系统^[1],心脏是应激主要损伤的靶器官之一。本实验中通过制动加冰泳及腹腔内注射内毒素的方法复制了大鼠应激性心肌损伤动物模型,结果显示,两个应激组大鼠心肌组织光镜下可见炎性细胞浸润,肌纤维萎缩,断裂,结构破坏,充血,出血等;电镜下可见肌纤维断裂、崩解,细胞核畸形,染色质边集,线粒体大小不等,线粒体内可见空泡及嵴断裂,且血清中 cTnI 含量高于正常对照组。说明不论是物理因素还是生物学因素的应激,的确可以导致心肌细胞损伤。

心肌细胞过度凋亡是心肌细胞损伤的方式之一,参与心肺复苏后心肌功能障碍、心肌梗死后心室重构等多种类型的心脏病中^[10-12],是导致多种心血管疾病发生的重要细胞学基础^[13]。本实验中两个应激组大鼠心肌细胞凋亡指数明显高于正常对照组,证实了应激导致的心肌细胞损伤与诱导心肌细胞过度凋亡有关。

细胞凋亡的过程大致可分为以下几个阶段:接受凋亡信号—凋亡调控分子间的相互作用—蛋白水解酶的活化(caspase)—进入连续反应过程。细胞凋亡过程中信号转导通路主要有细胞色素 C 释放和 caspase 激活的生物化学途径以及细胞凋亡的膜受体通路等。细胞凋亡的膜受体通路可以通过不同的信号传递系统传递凋亡信号,引起细胞凋亡,其中 Fas 又称 CD95,作为一种普遍表达的受体分子,可存在于多种细胞表面,Fas 一旦与配体 FasL 结合,则可以启动凋亡信号的转导引起细胞凋亡。Caspase 蛋白酶是参与凋亡发生的核心酶。本课题组前期的研究显示,在大鼠急性心肌损伤中 caspase 蛋白表达增加^[14]。Caspase 家族可以通过下列方式在细胞凋亡中起重要作用:①Caspase 能裂解 Bcl-2 蛋白,从而减少 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用;②Caspase 能够灭活并降解半胱氨酸天冬酶激活的核酸内切酶抑制剂 ICDA,使核酸内切酶释放并被激活从而导致 DNA 降解;③Caspase 还能裂解核纤

层的主要成分核层素,导致染色质浓缩;④Caspase 可灭活或下调 DNA 修复酶, RNA 拼接蛋白 U1-70KD 和 DNA 复制的复制因子,从而导致细胞凋亡的发生;⑤Caspase 可裂解几种参与细胞骨架调节的蛋白,如凝胶蛋白、局部黏附激酶、P21 激活激酶等。在 Fas 引发的凋亡过程中一系列 caspase 呈级联式活化,其中 caspase-8 活化是第一步反应,进一步会引发包括 caspase-9 在内的下游 caspase 活化,从而诱导细胞凋亡^[15]。还有研究证实, caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,也是细胞毒性 T 淋巴细胞细胞杀伤机制的重要组成部分^[16]。

本实验中, 应激组大鼠心肌组织 caspase-8 和 caspase-3 的蛋白表达高于正常对照组,说明应激可能通过使 caspase-8 和 caspase-3 表达增加从而诱导大鼠心肌细胞凋亡增加,这可能是应激导致心肌损伤的途径之一。

参考文献

- [1] 蒋春雷,路长林. 应激医学. 上海:科学技术出版社,2006:181.
- [2] Dote K, Sato H, Tateishi H, et al. Myocardial stunning due to simultaneous multivessel coronary spasms: a review of 5 cases. J Cardiol, 1991, 21: 203-214.
- [3] Wittstein IS, Thiemann DR, Lima JA, et al. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. N Engl J Med, 2005, 352: 539-548.
- [4] Higashikuni Y, Sata M, Nagai R. Reversible left ventricular hypertrophy after tako-tsubo-like cardiomyopathy. Acta Cardiol, 2005, 60: 77-79.
- [5] Sadamatsu K, Tashiro H, Maehira N, et al. Coronary microvascular abnormality in the reversible systolic dysfunction observed after noncardiac disease. Jpn Circ J, 2000, 64: 789-792.
- [6] Nyui N, Yamanaka O, Nakayama R, et al. 'Tako-tsubo' transient ventricular dysfunction: a case report. Jpn Circ J, 2000, 64: 715-719.
- [7] Ueyama T, Hano T, Kasamatsu K, et al. Estrogen attenuates the emotional stress-induced cardiac responses in the animal model of Tako-tsubo (Ampulla) cardiomyopathy. J Cardiovasc Pharmacol, 2003, 42 Suppl 1: S117-119.
- [8] Kurisu S, Inoue I, Kawagoe T, et al. Myocardial perfusion and fatty acid metabolism in patients with tako-tsubo-like left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol, 2003, 41: 743-748.
- [9] 李桂源. 病理生理学. 北京:人民卫生出版社,2010:170.
- [10] 张明月,李春盛. 细胞凋亡与心肺复苏后心肌功能障碍的研究进展. 中国危重病急救医学,2010,22:638-640.
- [11] 张艳玲,周苏宁. 细胞凋亡与心肌缺血/再灌注损伤及中医药研究. 中国中西医结合急救杂志,2005,12:187-189.
- [12] 上官海娟,徐江,官洪山,等. 当归对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心室重构的影响. 中国中西医结合急救杂志,2008,15:39-44.
- [13] Shi J, Guan J, Jiang B, et al. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38 alpha MAPK pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107: 4188-4193.
- [14] 周丽华,黄志民,林靖,等. Caspase-8 和 caspase-3 在大鼠急性心肌梗死中的作用及药物预处理对其影响. 内蒙古医学院学报,2009,31:528-532.
- [15] 尚东,齐会清,王宝枝,等. 中性粒细胞凋亡调控基因表达异常在全身炎症反应综合征中的作用. 中国危重病急救医学,2007,19:11-13.
- [16] 周丽华. bFGF 预处理对 Iso 致大鼠急性心肌梗死保护作用的实验研究. 哈尔滨:哈尔滨医科大学,2004.

(收稿日期:2011-12-19) (本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

急性心肌梗死患者的早期复极与心室纤颤有关

最近有报道显示,早期复极(ER)与非器质性心脏病患者的心室纤颤(VF)和心脏性猝死的高发病率相关,但 ER 与急性心肌梗死(AMI)引起的 VF 之间的关系尚不清楚。为此,德国学者进行了相关研究。研究对象和方法:研究对象为 60 例患有 AMI 的患者,其中 30 例发生过 VF 的 AMI 患者作为试验组,30 例不伴有室性快速型心律失常的 AMI 患者作为对照组。使用 12 导联心电图记录 ER 发生情况。结果:与不伴有室性快速型心律失常的 AMI 患者相比,伴发 VF 的 AMI 患者 ER 发生率更高(47%比 13%, $P=0.005$)。因此研究人员认为,AMI 患者的 ER 与 VF 的发生有关。

杜明华,编译自《Heart Rhythm》,2012-03-06(电子版);胡森,审校

高龄患者的冠状动脉左总干支架植入治疗

冠状动脉旁路移植术是冠状动脉左总干(LMCA)疾病的标准治疗方法。然而,能否使用该方法治疗高龄患者尚有争议。为此,法国的研究人员评价了经皮冠状动脉介入术(PCI)治疗高龄 LMCA 疾病患者的安全性和有效性。研究对象为 70 例连续就诊的 LMCA 疾病患者,年龄 ≥ 80 岁且不宜进行手术治疗。住院期间 8 例患者发生心源性死亡。研究人员随后对其余 62 例出院患者进行随访,平均随访(30.5 ± 24.2)个月后,其中 10 例(16.1%)发生心源性死亡,2 例(3.2%)死于肾功能不全;1 例(1.6%)发生新发 ST 段抬高型心肌梗死,7 例(11.3%)发生非 ST 段抬高型心肌梗死,13 例(21.0%)发生心脏衰竭,2 例(3.2%)发生少量出血。随访期间,发生主要心脑血管事件(MACE,包括死亡、非致死性急性心肌梗死或卒中)的患者占 27.4%。因此,研究人员认为,支架植入对不宜手术的高龄 LMCA 疾病患者是相对安全和有效的。

杜明华,编译自《Cardiovasc Revasc Med》,2012-03-09(电子版);胡森,审校