

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-06-0420-03

## p38 丝裂素活化蛋白激酶对冠心病患者冬眠心肌细胞凋亡的影响

钱文浩<sup>1</sup>, 李东野<sup>1</sup>, 於江泉<sup>1</sup>, 张中明<sup>2</sup>, 孙全胜<sup>2</sup>, 董红燕<sup>3</sup>

(徐州医学院 1. 附属医院心内科, 2. 胸心外科, 3. 电镜室, 江苏省徐州市 221000)

[关键词] 内科学; p38 丝裂素活化蛋白激酶; 冬眠心肌; 细胞凋亡; 冠心病

[摘要] 目的 探讨冬眠心肌细胞内活化的 p38 丝裂素活化蛋白激酶对冬眠心肌细胞凋亡的影响。方法 行冠状动脉搭桥术的冠心病患者 10 例, 术前一周内用多巴酚丁胺超声负荷试验结合多普勒组织成像确定冬眠心肌及正常心肌的存在部位, 冠状动脉搭桥术中根据检测结果进行取材(分别取正常心肌和冬眠心肌), 并经电镜证实。取材心肌用 Tunel 法检测心肌细胞凋亡情况, 免疫印迹法检测磷酸化 p38 的表达情况。分析冬眠心肌与正常心肌磷酸化 p38 及心肌细胞凋亡数是否存在差异; 分析 p38 与心肌细胞凋亡之间的相关性。结果 冬眠心肌细胞内磷酸化 p38、心肌细胞凋亡数较正常心肌高; p38 与心肌细胞凋亡数相关( $r = 0.816, P < 0.05$ )。结论 心肌慢性缺血缺氧时, 心肌细胞内 p38 丝裂素活化蛋白激酶信号活化, 活化的 p38 丝裂素活化蛋白激酶介导冬眠心肌细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Influences of p38-Mitogen Activated Protein Kinase on Cardiomyocyte Apoptosis in Hibernating Myocardium of Patients with Coronary Artery Disease

QIAN Wen-Hao, LI Dong-Ye, YU Jiang-Quan, ZHANG Zhong-Ming, SUN Quan-Sheng, and DONG Hong-Yan

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China)

[KEY WORDS] p38-Mitogen Activated Protein Kinase; Hibernating Myocardium; Cell Apoptosis; Coronary Artery Disease

[ABSTRACT] **Aim** To observe the relationship of p38-mitogen activated protein kinase (p38MAPK) and cardiomyocyte apoptosis in hibernating myocardium (HM). **Methods** Ten coronary artery disease (CAD) patients scheduled for bypass surgery were underwent preoperative dobutamine stress echocardiography (DSE), doppler tissue image (DTI) to check the position of HM and intraoperative myocardial biopsies. The normal myocardium and the HM were obtained in operation. They were conformed by electron microscope. Cardiomyocyte apoptosis were detected by Tunel, phosphorylation of p38 was detected by Western blot. It was analyzed that phosphorylation of p38 and positive cardiomyocyte nuclei (PCN) of apoptosis of CHM were different or not in hibernating myocardium and normal myocardium. It was analyzed for the relationship of p38MAPK and PCN of apoptosis. **Results** Phosphorylation of p38 and PCN of apoptosis were significantly increased in CHM compared with normal myocardium. Phosphorylation of p38 and PCN of apoptosis were positive correlation in hibernating myocardium ( $r = 0.816, P < 0.05$ ). **Conclusion** p38MAPK can be triggered by ischemia, and active p38MAPK intervene cardiomyocyte apoptosis.

冬眠心肌(hibernating myocardium, HM)是指长期的心肌低灌注状态导致能量减少而引起心肌收缩功能适应性下降的一种现象。冬眠心肌已成为近年来冠心病研究领域的热点之一,但目前国内外的研究主要集中在检测方法上,而对其形成的分子生物学机制研究较少。有关冬眠心肌动物模型的建立已相当成熟<sup>[1]</sup>,最常用的实验动物为犬和猪。动物研究发现冬眠心肌中存在凋亡的心肌细胞,丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)可

能参与了冬眠心肌的形成。国内还没有 p38MAPK 与冠心病患者冬眠心肌凋亡细胞的相关性报道,本研究对此进行初步探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 和细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物公司,兔抗磷酸化 p38 购自美国 Santa Cruz 公司。10 例心肌标本均来自本院心胸外科行冠状动脉搭桥的冠心病患者,冠状动脉造影至少有一支冠状动脉狭窄程度大于 85%,其中男 7 例,女 3 例,年龄  $58.3 \pm 4.2$ ,病史均超过 18 个月。征得患者及其家属同意于搭桥术中取冬眠心肌

[收稿日期] 2007-01-25 [修回日期] 2007-06-01

[基金项目] 江苏省卫生厅资助(H200329)

[作者简介] 钱文浩,硕士,副教授,研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 xzqwhao@yahoo.com.cn。李东野,博士,教授,研究方向为分子心脏病学。於江泉,硕士,医师。

及正常心肌。

## 1.2 冬眠心肌定位

采用多巴酚丁胺超声负荷试验结合组织多普勒成像技术。将左心室按美国超声心动图协会方法分为相对应的 16 个节段。多巴酚丁胺超声负荷试验分为静息、多巴酚丁胺 10  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  和 30  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  3 个级别, 每级负荷维持 5 min, 于每级负荷时记录超声图像, 并记录常规 12 导联心电图和血压, 终止指标: ①出现心绞痛; ②收缩压  $< 80 \text{ mmHg}$  或  $\geq 220 \text{ mmHg}$ ; ③出现严重心律失常; ④心率达到该患者年龄估算最高心率的 85%; 同一节段运动出现双相反应。组织多普勒成像技术测量心肌收缩期峰值平均运动速度, 如静息时平均运动速度低于正常速度, 负荷 10  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  多巴酚丁胺时心肌运动速度较静息时明显增高, 负荷 30  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$  多巴酚丁胺时心肌运动速度反而减低, 此时定义心肌运动呈双相反应, 判定为冬眠心肌。

## 1.3 心肌处理

取材心肌分别用液氮、4% 戊二醛、福尔马林固定, 分别进行 Western blot、电子显微镜观察及 TUNEL 检测。电镜证实为冬眠心肌后 Western blot 检测磷酸化 p38 的表达。心肌组织在冰浴的匀浆缓冲液中研碎成匀浆, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1000 r/min 离心 15 min, 取上清。考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度, 根据蛋白浓度取所需量的组织蛋白, 加入 1/3 体积的 4 倍蛋白处理液, 96  $^{\circ}\text{C}$ ~ 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 3~ 5 min, 经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳结束, 以半干电转移法电转至孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  的硝酸纤维素膜上, 转移完成后, 加入封闭液, 室温封闭 5 h; 然后加入用封闭液稀释的一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  温育过夜; Washing buffer 洗膜 5 min  $\times$  3 次, 加入相应的碱性磷酸酶标记的二抗, 室温孵育 2 h; Washing buffer、双蒸水洗膜后, 以 NBT/BCIP 显色, 显色反应达到要求后, 水洗终止反应。用图像分析软件测定条带平均灰度值。

## 1.4 统计学分析

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 组间比较采用方差分析法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 冬眠心肌的特点

心肌纤维数量减少、稀疏, 主要集中在细胞核周围, 细胞容量无明显变化; 心肌细胞内出现糖原积淀; 心肌细胞内线粒体体积变小, 散在分布于细胞质

内; 细胞核扭曲, 可见散在的异染色质; 心肌细胞内没有发生小泡、水肿、染色体肿胀、细胞核崩解、脂质沉积等细胞坏死和萎缩时常见的变化(图 1)。

### 2.2 凋亡心肌细胞计数

正常心肌细胞核呈蓝色, 而冬眠心肌中凋亡心肌细胞核呈棕黄色(图 2)。在光学显微镜下计数 5 个高倍视野中凋亡阳性心肌细胞核数目, 冬眠心肌和正常心肌分别为  $85.9 \pm 4.4$  和  $3.0 \pm 1.5$ , 两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 磷酸化 p38 蛋白的表达

冬眠心肌和正常心肌蛋白条带的平均灰度值分别为  $10164.9 \pm 536.3$  和  $9589.5 \pm 586.3$ , 冬眠心肌磷酸化 p38 蛋白的表达明显高于正常心肌( $P < 0.05$ ; 图 3)。

### 2.4 相关性分析

冬眠心肌磷酸化 p38 蛋白平均灰度值与心肌细胞凋亡数成正相关( $r = 0.816$ ,  $P < 0.05$ ), 正常心肌磷酸化 p38 蛋白平均灰度值与心肌细胞凋亡数无明显相关。

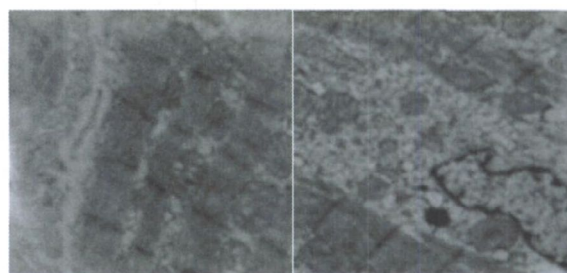


图 1. 冬眠心肌和正常心肌电镜结构特点 ( $\times 12000$ ) 左为正常心肌, 右为冬眠心肌。

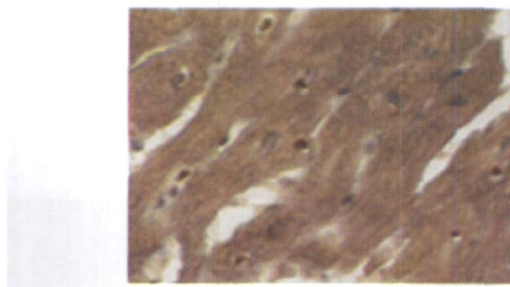


图 2. TUNEL 法检测细胞凋亡 ( $10 \times 40$ )

## 3 讨论

丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)是一组调控细胞生长、凋亡等生命活动的丝/苏氨酸蛋白激酶。MAPK 是将细胞外刺激信号转导到细胞内并引起细胞核内反应、最终影响基因转录和调控的通路, 也是真核细胞转导胞外信号到胞内引起细胞反应的 4 大

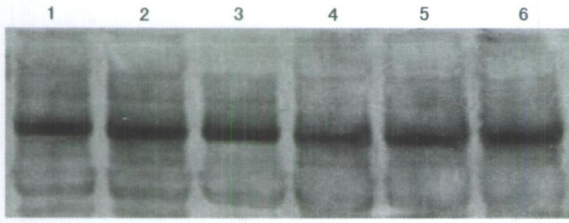


图3. Western blot 检测磷酸化 p38 蛋白的表达 1-3 为冬眠心肌, 4-6 为正常心肌。

信号系统之一<sup>[2]</sup>。MAPK 家族主要包括 3 个成员: 细胞外调节的蛋白激酶 ERK1/2、c-Jun N 末端激酶和 p38MAPK。在 MAPK 家族中 p38MAPK 主要具有诱导细胞凋亡效应。凋亡为细胞程序性死亡方式, 包括 3 个阶段, 其中凋亡执行阶段最为重要。Caspase 3 是重要的凋亡执行 Caspase, 有研究表明 p38MAPK 可调控 Caspase 3 的活化。p38MAPK 在心肌细胞凋亡研究中最广泛, 它包括 p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、p38 $\gamma$  和 p38 $\delta$  4 种亚型。研究表明, p38MAPK 与心肌细胞凋亡的开始有密切关系, 其活化可能在心肌细胞凋亡过程发挥着关键作用<sup>[3]</sup>。研究发现在大鼠心脏缺氧模型中, p38MAPK 被激活, 导致心肌细胞凋亡<sup>[4]</sup>。另有研究表明选择性 p38MAPK 抑制剂可以降低大鼠心肌损伤模型心肌凋亡所致心功能不全<sup>[5]</sup>。

本研究取材来自冠心病患者, 冠状动脉搭桥术前用多巴酚丁胺超声负荷试验结合组织多普勒成像技术对冬眠心肌进行定位, 术中成功取材, 并经电镜证实。与冬眠心肌检测的“金标准”FDG-PET 相比准确性低, 但经电镜证实也能达到“金标准”水平。

研究观察到冠心病患者冬眠心肌中 p38MAPK

的蛋白表达及心肌凋亡的数目较正常心肌明显升高, 且冬眠心肌中高表达的 p38MAPK 与心肌凋亡数成正相关。表明心肌慢性缺血缺氧可能触发心肌 p38MAPK 信号表达, 此结果与国外有关的动物研究结果相吻合。结合电镜所见, 提示 p38MAPK 的激活使得缺血心肌的结构和功能发生改变, p38MAPK 参与冬眠心肌的形成, 但其参与冬眠心肌形成的主要作用可能是促进心肌细胞凋亡。心肌细胞凋亡在血运重建术后心功能恢复差的过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。既然动物实验表明 p38MAPK 选择性抑制剂可以减少凋亡的心肌细胞, 那么临床能否应用其治疗有冬眠心肌存在的冠心病患者, 减少心肌凋亡数目改善心功能, 提高血运重建治疗的效果, 还有待进一步研究证实。

#### [参考文献]

- [1] Shen YT, Vatner SF. Mechanism of impaired myocardial function during progressive coronary stenosis in conscious pigs. Hibernation versus stunning [J]. *Circ Res*, 1995, **76** (3): 479-488.
- [2] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, **298** (5600): 1911-912.
- [3] Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH, Han J, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen activated protein kinase family [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (4): 2161-168.
- [4] Iwai Kanai E, Hasegawa K, Sawamura T, Fujita M, Yanazume T, Toyokuni S, et al. Activation of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 induces apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes [J]. *Circulation*, 2001, **104**: 2948-954.
- [5] Li Z, Ma JY, Kerr I, Chakravarty S, Dugar S, Schreiner G, et al. Selective inhibition of p38 $\alpha$ -MAPK improves cardiac function and reduces myocardial apoptosis in rat model of myocardial injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **291**: H1972-977.
- [6] Elsasser A, Vogt AM, Nef H, Kostin S, Mollmann H, Skwara W, et al. Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **43**: 2191-199.

(此文编辑 文玉珊)