

· 基础研究 ·

阈下电刺激对大鼠缺血心肌细胞凋亡
及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 表达的影响

魏芳 刘兴德

【摘要】 目的 探讨阈下电刺激对大鼠缺血心肌细胞凋亡及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 表达的影响。**方法** 将 Wistar 大鼠 32 只分为假手术组、心肌梗死组、电刺激缺血心肌组、电刺激非缺血心肌组, 每组 8 只。用结扎大鼠左冠状动脉前降支的方法制备心肌梗死模型, 在心外膜安置刺激电极, 2 个电刺激组均在心肌梗死第 2 天开始给予 25 Hz、0.3 V 电刺激, 每天连续 6 h, 刺激 5 d。运用原位缺口末端标记 (TUNEL) 法检测心肌细胞凋亡, 免疫组化和逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测 caspase-3 的表达。**结果** ①与假手术组比较, 心肌梗死组及 2 个电刺激组心肌细胞凋亡指数均增加 ($P < 0.05$); 与心肌梗死组比较, 2 个电刺激组心肌细胞凋亡指数减少 ($P < 0.05$); 2 个电刺激组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。②与假手术组比较, 心肌梗死组及 2 个电刺激组心肌细胞 caspase-3 表达增高 ($P < 0.05$); 与心肌梗死组比较, 2 个电刺激组心肌细胞凋亡指数降低 ($P < 0.05$); 2 个电刺激组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 25 Hz 阈下电刺激能降低大鼠缺血心肌细胞凋亡, 其机制可能与下调 caspase-3 的表达有关; 在心肌缺血区和非缺血区进行阈下电刺激均可减少大鼠缺血心肌细胞凋亡。

【关键词】 电刺激; 心肌梗死; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

The effects of subthreshold electrical stimulation on apoptosis and caspase-3 expression of ischemic cardiomyocytes WEI Fang, LIU Xing-de. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Corresponding author: LIU Xing-de, Email: lxd@gmc.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of electrical stimulation below the contraction threshold on apoptosis and the expression of caspase-3 in cardiomyocytes after myocardial infarction in rats. **Methods** Thirty-two rats were randomly divided into 4 groups: a sham-operated group, a myocardial infarction group, an ischemic electrical stimulation group and a non-ischemic electrical stimulation group. TdT-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to investigate apoptosis of cardiomyocytes. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical techniques were used to detect the expression of caspase-3. **Results** ①Compared with the sham-operated group, the amount of apoptotic cardiomyocytes increased significantly in the two electrical stimulation groups and the ischemic myocardium group. Compared with the ischemic myocardium group, apoptotic cardiomyocytes decreased significantly in the two electrical stimulation groups. There was no significant difference between the two electrical stimulation groups. ②Compared with the sham-operated group, in the ischemic myocardium group and the two electrical stimulation groups, expression of caspase-3 increased significantly. Compared with the ischemic myocardium group, expression of caspase-3 decreased significantly in the two electrical stimulation groups. There was again no significant difference between the two electrical stimulation groups. **Conclusions** Electrical stimulation below the contraction threshold can reduce ischemic cardiomyocyte apoptosis in rats. The mechanisms may be associated with down-regulation of the expression of caspase-3. Electrical stimulation below the contraction threshold of the myocardium can also reduce cardiomyocyte apoptosis in rats.

【Key words】 Electrical stimulation; Myocardial infarction; Apoptosis; Caspase-3

冠心病严重危害人类健康。治疗冠心病的手段有药物治疗、介入治疗和外科治疗, 最新治疗手段有基因治疗和细胞治疗等。有研究发现, 急性心肌梗死后存

在心肌细胞凋亡, 而且是心肌细胞坏死之外引起早期和晚期心室重塑的重要因素^[1]。阻止缺血心肌细胞凋亡, 可减轻心室重塑进而改善心功能^[2]。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase) 在凋亡过程中起着必不可少的作用。有研究发现, 25 Hz 频率的阈下电刺激可促使缺血心肌中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达上调, 导致毛细血管新

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.011.003

基金项目: 贵州省科学技术基金项目[黔科合丁字(2007)2089]

作者单位: 550004 贵阳, 贵阳医学院附属医院心血管科

通信作者: 刘兴德, Email: lxd@gmc.edu.cn

生^[3],但阈下电刺激能否对缺血心肌细胞凋亡产生影响还不清楚。本实验旨在探讨阈下电刺激对大鼠缺血心肌细胞凋亡及 caspase-3 表达的影响,为临床治疗缺血性心肌病提供基础研究资料。

材料与方法

一、实验动物

Wistar 大鼠 32 只,雌雄不限,体重 190 ~ 250 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。

二、主要试剂和仪器

原位缺口末端标记 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 细胞凋亡试剂盒 (武汉博士德);浓缩型免疫组化试剂盒 (武汉博士德);caspase-3 一抗 (兔抗 IgG, 武汉博士德);RNA prep pure Tissue Kit (天根生化);TIANScript RT Kit (天根生化);2 × Tap Plus PCR MasterMix (天根生化);5745 台式冷冻离心机 (德国 Eppendorff);0754-紫外线分光光度仪;Amersham 核酸蛋白分析仪;UVP 8000 型凝胶成像系统;DYU-6c 型电泳仪 (北京市六一仪器厂);聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (德国 Eppendorff);DH-150 型小动物呼吸机 (浙江大学仪器厂);PES-4 型电生理诊疗仪 (中国 太平电信设备厂 苏州);caspase-3 引物由上海生工合成,上游引物序列:5'-GTCTGACTG-GAAAGCCGAAACTCT-3',下游引物序列:5'-GAGAAG-GACTCAAATTCCGTGGC-3';产物长度:304 bp;β-actin 上游引物序列:5'-GATTACTGCCCTGGCTCCTAGC-3',下游引物序列:5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3',产物长度:136 bp。

三、大鼠心肌梗死模型制作及电极植入

用 10% 水合氯醛 (3 ml/kg 体重) 腹腔注射麻醉大鼠。行气管切开及气管插管,采用动物人工呼吸机控制呼吸,呼吸频率 55 ~ 60 次/min,潮气量 10 ml,呼吸比为 2:1。沿着左锁骨中线纵行切开皮肤约 2 cm,逐层游离皮下组织、肌肉,剪断第 3 ~ 4 肋骨,打开胸腔,暴露心脏,用 6/0 线在动脉圆锥与左心耳之间于左心耳下缘处结扎左冠状动脉前降支,将电极缝置在左心室前壁的心肌缺血区表面,2 个电极间间隔约 0.5 cm,然后在大鼠的皮下打一隧道,将电极丝从其背部引出体外。排出胸腔气体,关闭胸腔。待大鼠自主呼吸恢复后,拔出气管内插管,并缝合气管。以上手术均在严格无菌条件下进行,术后腹腔内注射青霉素钠预防感染。以大鼠心电图 II 导联 ST 段弓背向上抬高作为模型复制成功的标志。

四、实验分组及电刺激

将 32 只大鼠分为假手术组、心肌梗死组、电刺激缺血心肌组及电刺激非缺血心肌组,每组 8 只。假手

术组开胸后于冠脉前降支处穿线,但不结扎,仅植入电极,不给予电刺激;心肌梗死组结扎冠脉前降支后,仅植入电极,不给予电刺激;电刺激缺血心肌组结扎冠脉前降支后,将电极安置在心肌左室前壁缺血区;电刺激非缺血心肌组结扎冠脉前降支后,将电极安置在右心室非缺血心肌。2 个电刺激组大鼠均在心肌梗死后第 2 天开始给予 25 Hz、0.3 V 电刺激 (本实验所测得大鼠心室肌电压阈值在 1 ~ 3 V,该电压刺激远低于阈电压,不会引起心肌动作电位,亦不影响心肌的收缩和正常搏动;而且有研究提示,采用多种频率进行阈下电刺激,其中以 25 Hz 刺激条件表现差异有统计学意义^[3],故选用该刺激条件)。每天连续 6 h,刺激 5 d,每次电刺激前均测量阈电压并记录刺激信号以确保电刺激的成功发放。

五、缺血心肌组织中细胞凋亡的检测

用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,严格按照试剂盒说明书进行。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。在 400 倍视野下,每例标本完全随机选取 10 个视野,按下列公式计算细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI), AI = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%。

六、缺血心肌组织中 caspase-3 蛋白表达的测定

用免疫组织化学方法,按 SABC (Strept Avidin-Biotin-enzyme Complex) 试剂盒说明进行。心肌细胞浆中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。采用 Miaspro 图像分析系统,在 400 倍视野下,通过数码显微照相采集图像,应用 Image Pro Plus 图像分析系统进行计算机图像分析,测定平均光密度值 (IOD/面积)。

七、缺血心肌组织中 caspase-3 mRNA 表达的测定

提取组织总核糖核酸,总 RNA 含量测定,凝胶电泳鉴定,逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 引物设计,cDNA 第一链逆转录合成,多聚合酶反应,扩增结束后在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,30 min 后在紫外灯下观察结果。用凝胶成像分析系统测量光密度值。

八、统计学分析

所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,均在 SPSS 11.5 版软件上处理,组间差异用方差分析进行统计学检验,组间比较采用最小显著差法 (LSD 法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、阈下电刺激对大鼠缺血心肌细胞凋亡的影响

与假手术组比较,心肌梗死组及 2 个电刺激组心肌细胞凋亡指数增高,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与心肌梗死组比较,2 个电刺激组心肌细胞凋亡指数降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);2 个电

刺激组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 阈下电刺激对大鼠缺血心肌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	凋亡指数(%)
假手术组	8	4.84 ± 1.87
心肌梗死组	8	35.63 ± 3.48^a
电刺激缺血心肌组	8	31.78 ± 4.18^{ab}
电刺激非缺血心肌组	8	31.12 ± 4.16^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与心肌梗死组比较,^b $P < 0.05$

二、阈下电刺激对大鼠缺血心肌凋亡基因 caspase-3 蛋白表达的影响

与假手术组比较,心肌梗死组及 2 个电刺激组心肌 caspase-3 蛋白表达增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与心肌梗死组比较,2 个电刺激组心肌细胞 caspase-3 蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);2 个电刺激组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 阈下电刺激对大鼠缺血心肌细胞 caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	caspase-3 (平均光密度)
假手术组	8	0.082 ± 0.016
心肌梗死组	8	0.251 ± 0.027^a
电刺激缺血心肌组	8	0.223 ± 0.025^{ab}
电刺激非缺血心肌组	8	0.216 ± 0.027^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与心肌梗死组比较,^b $P < 0.05$

三、阈下电刺激对大鼠缺血心肌凋亡基因 caspase-3 mRNA 表达的影响

与假手术组比较,心肌梗死组及 2 个电刺激组心肌 caspase-3 mRNA 表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与心肌梗死组比较,2 个电刺激组心肌细胞 caspase-3 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);2 个电刺激组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 阈下电刺激对大鼠缺血心肌细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	caspase-3 mRNA
假手术组	8	0.119 ± 0.024
心肌梗死组	8	0.300 ± 0.035^a
电刺激缺血心肌组	8	0.257 ± 0.027^{ab}
电刺激非缺血心肌组	8	0.252 ± 0.026^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与心肌梗死组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

细胞凋亡是指细胞为维持内环境稳定而主动有序的死亡,细胞凋亡过程与周期调控、衰老等生理过程密切相关^[4],主要有外源性和内源性 2 种作用方式诱导

细胞凋亡^[5]。目前认为,心肌缺血造成的心肌细胞死亡存在 2 种形式:坏死和凋亡。急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI),尤其是大面积的透壁性心肌梗死可导致包括梗死区和非梗死区在内的心室结构和功能发生复杂变化,即心室重塑。心室重塑可以导致心室扩张、心力衰竭和心律失常恶化,是决定心肌梗死患者心功能及其预后的主要因素之一,预防 AMI 后的心室重塑是预防心力衰竭发生的一个不容忽视的重要环节。心室重塑的一个重要特征即是细胞死亡,越来越多的研究表明,心肌梗死后心肌细胞死亡的主要形式是细胞凋亡而非细胞坏死,AMI 后心肌细胞凋亡不仅影响心肌梗死面积,而且促成心室重塑^[6]。有研究发现,无论是梗死区还是非梗死区,其心肌细胞凋亡都与进行性的左室重塑参数呈正相关^[7]。

研究发现,通过预处理或后处理策略减少再灌注心肌细胞的凋亡有助于心肌功能恢复^[8],合理使用某些药物亦可减少心肌细胞凋亡。有研究提示,50 Hz 低电压电刺激可促进缺血心肌血管新生^[9],但阈下电刺激能否减少缺血心肌细胞凋亡,目前罕见报道。本研究显示,阈下电刺激可使大鼠缺血区心肌细胞凋亡显著减少,提示阈下电刺激具有减轻缺血心肌损伤效能。目前其机制尚不详,推测可能与电刺激对大鼠心肌细胞生物膜离子通道状态的改变或凋亡相关基因的调节等有关。本研究同时显示,对大鼠非缺血区正常心肌进行阈下电刺激亦能使缺血区心肌细胞凋亡显著减少,考虑可能与心肌细胞间的电传递有关。此为临床 AMI 后缺血心肌保护的方法学研究提供了新思路。

细胞凋亡是一种受基因调控的主动性细胞死亡,表现为凋亡信号通路的启动及相关基因的表达。一般认为,细胞凋亡的过程实际上是 caspase 家族成员介导的不可逆有限水解底物的级联放大反应过程。caspase-3 是最主要的成员之一,可激活特定信号系统,使细胞出现核皱缩、DNA 片段形成等凋亡现象,最终控制着细胞凋亡的发生和发展^[10],在细胞凋亡早期启动和执行过程中起着重要作用,是细胞凋亡发生的关键酶^[11]。本研究刺激缺血区和非缺血区的阈下电刺激均能显著下调 caspase-3 的表达,提示 caspase-3 也可能参与阈下电刺激减少大鼠缺血心肌细胞凋亡的机制。

本研究提示,25 Hz 阈下电刺激能减少大鼠缺血心肌细胞凋亡,其机制可能与下调 caspase-3 的表达有关;在心肌缺血区和非缺血区进行阈下电刺激均可减少大鼠缺血心肌细胞凋亡。

参 考 文 献

- [1] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte

- cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 1996, 74:86-107.
- [2] Li Q, Li B, Wang X, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 1997, 100:1991-1999.
- [3] 舍强,陈运真. 阈下电刺激促大鼠缺血心肌毛细血管新生的研究. *重庆医科大学学报*, 2003, 3:296-299.
- [4] 姜俏,林琳,汪天虹. 研究细胞凋亡的新模式生物-酵母. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35:361-367.
- [5] 李世军,陈明环,赵欣,等. 钩端螺旋体脂多糖诱导 J774A. 1 细胞凋亡及相关信号通路调控作用的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30:1014-1019.
- [6] Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280:H2726-2731.
- [7] Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Bussani R, et al. Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41:753-760.
- [8] 李军昌. 芪丹通脉片对急性缺血/再灌注大鼠心肌一氧化氮合酶系统的影响. *中国中医药信息杂志*, 2008, 15:30-32.
- [9] 刘兴德,龙宇飞. 50 Hz 低电压电刺激对大鼠缺血心肌血管新生及血管内皮生长因子表达的影响. *中华物理医学与康复杂志*, 2008, 30:378-380.
- [10] Hurst PR, Mora JM, Ferwick MA. Caspase-3, TUNEL and ultrastructural studies of small follicles in adult human ovarian biopsies. *Hum Reprod*, 2006, 21:1974-1980.
- [11] 吴思荣,惠国桢,李向东,等. 大鼠创伤性脑损伤后神经细胞凋亡的动态变化及其与 caspase-3 基因表达的关系. *中华急诊医学杂志*, 2009, 18:361-366.

(修回日期:2011-09-01)

(本文编辑:松 明)

· 外刊文献题录 ·

国外言语障碍最新文献题录(一)

- [1] Gaber TA, Parsons F, Gautam V. Validation of the language component of the Addenbrooke's Cognitive Examination-Revised (ACE-R) as a screening tool for aphasia in stroke patients. *Australas J Ageing*, 2011, 30:156-158.
- [2] Kakuda W, Abo M, Momosaki R, et al. Therapeutic application of 6-Hz-primed low-frequency rTMS combined with intensive speech therapy for post-stroke aphasia. *Brain Inj*, 2011, 25:1242-1248.
- [3] Pavol M, Goldberg E, Mohr JP, et al. Severe aphasia following infarction in the territory of the left anterior choroidal artery. *Cerebrovasc Dis*, 2011, 32:197-198.
- [4] Berthier ML, Pulvermüller F, Dávila G, et al. Drug therapy of post-stroke aphasia: a review of current evidence. *Neuropsychol Rev*, 2011, 21:302-317.
- [5] Brady MC, Clark AM, Dickson S, et al. Dysarthria following stroke: the patient's perspective on management and rehabilitation. *Clin Rehabil*, 2011, 25:935-952.
- [6] Fatemi Y, Boeve BF, Duffy J, et al. Neuropsychiatric aspects of primary progressive aphasia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2011, 23:168-172.
- [7] Kurland J, Falcon M. Effects of cognate status and language of therapy during intensive semantic naming treatment in a case of severe nonfluent bilingual aphasia. *Clin Linguist Phon*, 2011, 25:584-600.
- [8] Tsegaye MT, De Bleser R, Iribarren C. The effect of literacy on oral language processing: implications for aphasia tests. *Clin Linguist Phon*, 2011, 25:628-39.
- [9] Kiran S, Iakupova R. Understanding the relationship between language proficiency, language impairment and rehabilitation: evidence from a case study. *Clin Linguist Phon*, 2011, 25:565-583.
- [10] Fridriksson J. Measuring and inducing brain plasticity in chronic aphasia. *J Commun Disord*, 2011, 44:557-563.
- [11] Levy ES, Goral M, Castelluccio DD, et al. Stronger accent following a stroke: the case of a trilingual with aphasia. *Clin Linguist Phon*, 2011, 25:815-830.
- [12] Kang EK, Kim YK, Sohn HM, et al. Improved picture naming in aphasia patients treated with cathodal tDCS to inhibit the right Broca's homologue area. *Restor Neurol Neurosci*, 2011, 29:141-152.
- [13] Turkeltaub PE, Messing S, Norise C, et al. Are networks for residual language function and recovery consistent across aphasic patients. *Neurology*, 2011, 76:1726-1734.
- [14] Dickerson BC. Quantitating severity and progression in primary progressive aphasia. *J Mol Neurosci*, 2011, 45:618-628.
- [15] Laures GJ, Marshall RS, Verner E. Performance of individuals with left-hemisphere stroke and aphasia and individuals with right brain damage on forward and backward digit span tasks. *Aphasiology*, 2011, 25:43-56.
- [16] Meinzer M, Harnish S, Conway T, et al. Recent developments in functional and structural imaging of aphasia recovery after stroke. *Aphasiology*, 2011, 25:271-290.
- [17] Hamilton RH, Chrysikou EG, Coslett B. Mechanisms of aphasia recovery after stroke and the role of noninvasive brain stimulation. *Brain Lang*, 2011, 118:40-50.