

• 基础研究 •

解耦联蛋白-2与压力超负荷大鼠心肌肥厚中的细胞凋亡

杭涛 江时森 宫剑滨 张启高 汪春晖 谢渡江 任海玲 邹英

【摘要】 目的 探讨心肌解耦联蛋白-2(UCP2)与压力超负荷心肌肥厚中心肌细胞凋亡的关系。方法 采用腹主动脉缩窄法建立大鼠压力超负荷模型,假手术大鼠作为对照组。术后1,2,4,7,14,21,30d,RT-PCR法测定UCP2 mRNA含量,TUNEL法检测心肌细胞凋亡水平。结果 (1)与对照组比较,压力超负荷组在术后4d UCP2 mRNA含量上调,并持续增高至30d。(2)压力超负荷组心肌细胞凋亡在术后1d即升高,在4d时进入高峰期并持续至7d,其后低水平持续存在,直至实验结束。而对照组未发现凋亡细胞。结论 UCP2可能参与了压力超负荷心肌肥厚中细胞凋亡的调控,但其确切机制有待进一步研究。

【关键词】 解耦联蛋白-2;细胞凋亡;心肌病,肥大性;大鼠

Uncoupling protein-2 and apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats

HANG Tao, JIANG Shisen, GONG Jianbin, et al

Department of Cardiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command/Clinical School, Medical College of Nanjing University, Nanjing 210002, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between uncoupling protein-2 (UCP2) and apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. Methods The pressure overload animal model was established in rats by abdominal aorta coarctation and an equal number of sham-operated rats served as controls. The time course was 1, 2, 4, 7, 14, 21 and 30 days after operation. The UCP2 mRNA expression was evaluated by RT-PCR. The TUNEL method was applied to detect the myocardial apoptosis. Results (1) Compared with control group, the expression of UCP2 mRNA was upregulated at 4 days, and developed progressively to 30 days. (2) The apoptosis increased significantly at d 1, and reached a plateau between d 4-d 7; afterwards, it decreased continuously to low level. However, the apoptosis was so rare that it was undetectable in control group. Conclusion Although the precise role for UCP2 need to be clarified in the future works, it may participate in the regulation of apoptosis during the pressure overload-induced cardiac hypertrophy.

【Key words】 uncoupling protein-2; apoptosis; cardiac hypertrophy; rats

心脏工作负荷增加致心肌肥厚的机制目前仍未完全明了,但细胞凋亡可能在这一过程中起了重要作用^[1]。大多数研究表明,线粒体在凋亡的信号传导中扮演了重要的角色^[2],尤其是位于线粒体内膜的解耦联蛋白(uncoupling protein, UCP)-2。

UCP是线粒体内膜上参与机体能量代谢的一个重要的转运蛋白。UCP被激活时,形成质子通道,使得ATP合成所依赖的线粒体内膜上的电化学梯度改变,氧化磷酸化解耦联,合成ATP减少,使产能转化为产热^[3]。目前的研究表明,在哺乳动物中的组织细胞中UCP有4种同型异构体(UCP1-

4)^[4],UCP1主要在棕色脂肪组织中表达,UCP2在人类和啮齿类动物的各组织中均有发现。UCP3主要在骨骼肌和棕色脂肪组织中表达,而UCP4则仅在大脑组织中表达。

线粒体作为细胞的能量工厂,它通过将ATP水解为ADP和Pi,进而调控ATP和ADP的比例,但这一过程的副产品是活性氧簇(ROS)。有研究表明,ROS参与了凋亡信号转导通路的不同阶段,例如线粒体渗透性转运的诱导,细胞内胱冬肽酶(caspase)和DNA损伤的激活等^[5]。体外研究表明,UCP2可以通过降低线粒体跨膜电压,从而减少

收稿日期:2008-03-17

基金项目:全军“十五”卫生科研基金资助项目(批准号:01MB022)

作者单位:210002南京市,南京军区南京总医院/南京大学医学院临床学院心脏内科

通讯作者:江时森,Tel:025-80860022

ROS 的生成^[6],同时,UCP2 过表达能够抑制由过氧化氢所诱导的细胞凋亡^[7],上述发现提示 UCP2 是一个重要的凋亡调节基因。在压力超负荷致心肌肥厚中心肌细胞凋亡的存在已被证实^[8]。但关于 UCP2 与这一过程中心肌细胞凋亡调控的关系则尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料 本实验中所用总 RNA 抽提试剂盒 Tripur 为瑞士 Roche 公司产品, TUNEL 检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品;其余分子生物学试剂均为美国 Promega 生物有限公司产品。

1.2 压力负荷大鼠模型的建立 42 只成年 SD 大鼠,体重(200±30)g,购自南京军区动物实验中心,大鼠被随机分为 2 组。(1)手术组:戊巴比妥钠(40mg/kg,腹腔注射)麻醉,开腹后在左右肾动脉分支间以 0.45mm 注射针头与腹主动脉一起结扎,随后抽出注射针头,造成腹主动脉缩窄。观察周期 30d,7 个时间点,分别为术后 1,2,4,7,14,21,30d,每个时间点 3 只大鼠,共 21 只大鼠。(2)对照组:不结扎腹主动脉,余处理同手术组,每个时间点 3 只大鼠,共 21 只大鼠。实验过程中,大鼠生活和手术环境温度均控制在 18~22℃,饲料成分不予限制,不控制每日摄入量。

1.3 取样方法 各组大鼠在预定时间点称量体重(body weight, BW),随后以戊巴比妥钠(35mg/kg,腹腔注射)麻醉,开腹后在腹主动脉结扎点上方穿刺,利用 SIMENS SIRCUST 960 生理记录仪(西门子公司,德国)记录压力曲线,得到收缩压(SBP)和舒张压(DBP),并计算平均动脉压(MAP),计算公式为:MAP=DBP+1/3(SBP-DBP),随后开胸取出心脏,4℃预冷生理盐水冲洗,称心脏重量(cardiac weight, CW),计算心重指数(cardiac weight index, CWI),计算公式为:CWI=CW/BW。随后将左、右心房及右心室去除,留取左心室,于左心室心尖部切取心肌 100mg,保存于-80℃液氮中,用于总 RNA 的抽提;剩余的左室心肌,以 10%甲醛液浸泡固定,并制成石蜡切片,用于心肌细胞凋亡的检测。

1.4 组织总 RNA 的抽提 按照 Roche 公司总 RNA 抽提试剂盒(Tripure)的操作步骤,从 100mg 心肌组织中提取并纯化总 RNA 约 100μg,其 A_{260nm}/A_{280nm}为 1.9 左右。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析,18S,28S 条带清晰,总 RNA 片段完整未降解。

1.5 PCR 引物的设计及 RT-PCR 的操作步骤 UCP2,β-肌动蛋白(β-actin)的 PCR 引物参考 GeneBank 所报道的各自的 cDNA 序列(GeneBank index: 9507230,13592132),计算机辅助设计引物,所用软件为 DNA Club。各目的基因的引物序列见表 1。

逆转录反应以提取的总 RNA 10μg 为模板, Oligo(dT)15 primer 为逆转录引物,70℃水浴 5min 后快速冰块降温,再依次加入 RNAsin, dNTP mix, M-MLV 5×Buffer, DEPC 处理的双蒸水,最后按 100U/μg mRNA 加入 M-MLV 逆转录酶,反应总体积为 50μl,42℃水浴 2h,合成第一条 cDNA 链。PCR 反应以逆转录产物 10μl 为模板,目的基因及内参 β-肌动蛋白引物 200nmol/L,加入 Taq DNA 聚合酶 2.5U,总反应体积为 25μl,PCR 条件为 92℃变性 45s,58℃退火 50s,72℃延伸 70s,30 个循环,最后 72℃延伸 7min。

1.6 凝胶成像分析系统检测各目的基因的表达水平 PCR 产物 10μl 于 2%琼脂糖凝胶上电泳,50V,电泳 1.5h 后,用 KODAK EDAS290 凝胶成像分析系统成像,图像分析使用 KODAK 1D 图像分析软件,分别得到目的基因及内参 β-肌动蛋白的灰度值,随后计算目的基因的表达水平,计算公式为:目的基因表达水平=目的基因灰度值/β-肌幼蛋白灰度值。

1.7 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 按照 TUNEL 检测试剂盒标准操作步骤对切片染色,应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统(同济千屏影像公司,中国天津)进行半定量分析,每张切片随机选取 5 个视野,光镜下 40 倍,分别计数阳性细胞数和细胞总数,其比值即为心肌细胞凋亡指数(myocardial apoptosis index, MAI)。

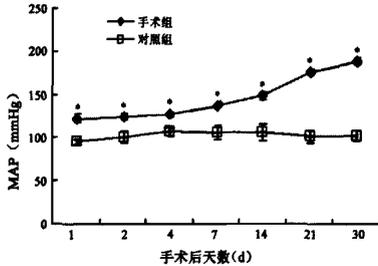
1.8 统计学分析 结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学检验采用成组 t 检验,P<0.05 认为差异有统计学意义。

表 1 UCP2,β-肌动蛋白 PCR 引物序列

名称	类型	引物序列	PCR 产物长度
UCP2	正义链	5'-AACAGTTCTACACCAAGGGC-3'	479bp
	反义链	5'-AGCATGGTAAGGGCACAGTG-3'	
β-肌动蛋白	正义链	5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3'	751bp
	反义链	5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'	

2 结果

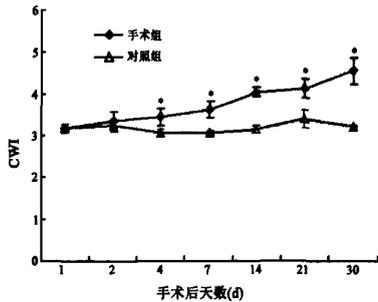
2.1 各组大鼠平均动脉压和心重指数 从图1可见,与对照组相比较,手术组大鼠腹主动脉MAP在术后1d即开始增高[(122±6)mmHg vs (95±3)mmHg, P<0.05],并持续增加,直至30d达最大值[(188±4)mmHg vs (102±6)mmHg, P<0.05]。



与对照组比较, * P<0.05

图1 压力超负荷大鼠平均动脉压(MAP)

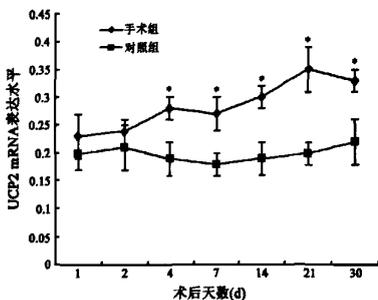
由图2可知,与对照组比较,CWI于手术后4d方开始增加(3.45±0.20 vs 3.06±0.07, P<0.05),随后持续增长直至本实验结束(4.55±0.32 vs 3.22±0.03, P<0.05)。综合上述改变证实了压力超负荷模型的有效性。



与对照组比较, * P<0.05

图2 压力超负荷大鼠心重指数(CWI)

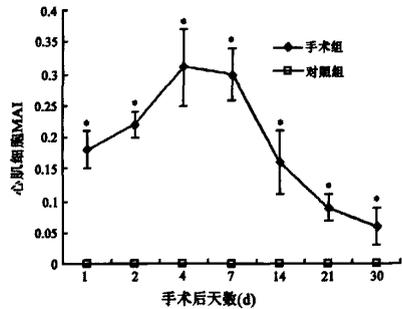
2.2 压力超负荷大鼠心肌UCP2 mRNA的相对含量 从图3可见,与对照组比较,UCP2 mRNA的表达水平在术后4d上调(0.28±0.02 vs 0.19±0.03, P<0.05),随后持续增高直至30d(0.33±0.02 vs 0.22±0.04, P<0.05)。



与对照组比较, * P<0.05

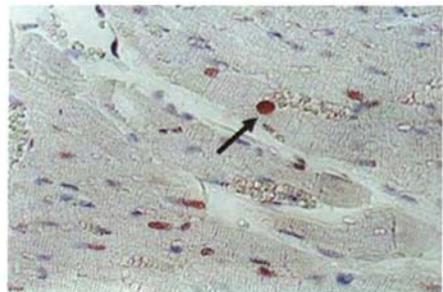
图3 压力超负荷大鼠心肌线粒体UCP2 mRNA表达水平

2.3 压力负荷模型大鼠心肌细胞凋亡指数 从图4中可知,手术组大鼠MAI在术后1d即有升高(0.18±0.03),在4d时进入高峰期(0.31±0.06),并持续至7d(0.30±0.04),其后低水平持续存在,直至实验结束。而对照组的凋亡水平极低以至无法测及(MAI=0)。手术组和对照组大鼠的TUNEL染色分别见图5和图6。



与对照组比较, * P<0.05

图4 压力超负荷大鼠心肌细胞凋亡指数(MAI)



箭头所示为凋亡细胞

图5 手术组大鼠心肌细胞TUNEL染色

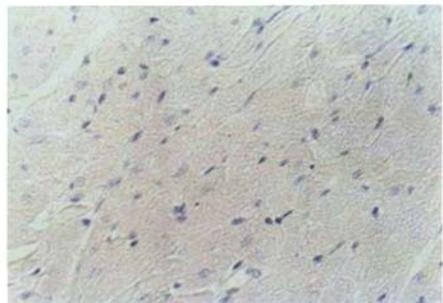


图6 对照组大鼠心肌细胞TUNEL染色

3 讨论

本实验发现,与对照组比较,心肌细胞的凋亡于术后1d即升高,并于4~7d达峰值水平,随后即迅速下降至较低水平。离体研究发现,过度牵张成年大鼠心肌细胞可诱导心肌细胞凋亡,且凋亡的发生率与心肌细胞所承载的张力强度相关^[9,10]。在体的研究中,升主动脉结扎造成左室压力超负荷已被证

实可诱导心肌细胞凋亡^[8]。由于血压的升高可致室壁张力增加,进而使心肌细胞受到牵拉,因此,上述发现提示压力超负荷可能在心肌细胞的凋亡中起了重要的作用。但本研究中 MAP 在术后 1d 即开始升高,并持续增加至研究结束,结合心肌细胞凋亡的变化,可见血压水平与心肌细胞凋亡的变化似乎并不完全直接相关。实际上已有研究表明,自发性高血压大鼠左室心肌细胞凋亡与血压的即刻变化并无相关性^[11];同时,经氯沙坦处理的自发性高血压大鼠,即使其血压仍然增高,但心肌细胞的凋亡已明显降低^[12]。因此,尽管不能排除压力超负荷作为诱导心肌细胞凋亡的一个因素,但某些其他的机制可能起到了更为重要的作用。

本研究中,心肌 UCP2 表达的上调滞后于心肌细胞凋亡的增长。Pecqueur 等^[13]发现,氧化应激可以诱导 UCP2 的表达,同时,研究已经证实压力超负荷可诱导心肌细胞产生氧化应激,这就意味着 ROS 含量的急剧增加。此外,有研究者发现 ROS 参与了线粒体途径的凋亡信号转导通路的不同阶段^[5]。将上述发现结合本研究的结果,提示 UCP2 的上调可能是对氧化应激及其诱导的早期心肌细胞凋亡的一种保护性反应,而具体的机制仍需进一步阐明。

本研究中最为重要的发现是凋亡在术后 7d 急剧降至低水平,而 UCP2 却持续增高。Arsenijevic 等^[6]发现,UCP2 可以通过降低线粒体的跨膜电压从而限制 ROS 的生成。还有研究者发现,UCP2 通过诱导一氧化氮合酶的表达在大鼠缺血适应中对心肌产生保护作用^[14]。此外,离体研究表明,UCP2 的过表达能够抑制由过氧化氢所诱导的心肌细胞凋亡^[7]。上述发现进一步提示,本研究中凋亡的回落可能是由 UCP2 的上调所介导。即 UCP2 可能通过抑制压力超负荷致左室肥厚中的心肌细胞凋亡,进而对心肌细胞产生保护效应。然而,在 HeLa 细胞中,UCP2 的过表达却能够通过显著降低线粒体跨膜电压促进细胞的死亡^[15]。此外,在大鼠原始心肌细胞中 UCP2 的过表达对细胞的存活未产生影响,但在 UCP2 过表达的成年大鼠心肌细胞进行缺氧-再氧合后,细胞存活数较对照组明显减少^[16]。尽管不能解释这种差异的原因,但在不同类型的细胞及病理生理状况下,UCP2 的过表达可能导致不同的继发效应。实际上,在成纤维细胞中,UCP2 的过表达对细胞生长及存活未产生影响,但在 HeLa 细胞中却产生了致命性反应^[15]。此外,在神经细胞

中,UCP2 的表达水平与细胞凋亡的一个重要标志物,胱冬肽酶-3 的活力成反比^[17]。上述发现提示,UCP2 在大脑和心脏中对细胞凋亡的调控作用可能是相似的。

综上所述,心肌线粒体 UCP2 可能参与了压力超负荷心肌肥厚中细胞凋亡的调控,但其确切的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, et al. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res*, 2005, 67: 21-29.
- [2] Schulze K, Dorner A, Schulthei HP. Mitochondrial function in heart failure. *Circ Res*, 1999, 4: 229-244.
- [3] Paradies G, Thibault J, Bouillaud F, et al. Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue. Cell-free translation of mRNA and characterization of the mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem*, 1988, 258: 6675-6677.
- [4] Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues; UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, 2000, 345:161-179.
- [5] Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, et al. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*, 2005, 20: 205-219.
- [6] Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*, 2000, 26: 435-439.
- [7] Teshima Y, Akao M, Jones SP, et al. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res*, 2003, 93: 192-200.
- [8] Teiger E, Than VD, Richard L, et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest*, 1996, 97: 2891-2897.
- [9] Cheng W, Li B, Kajstura J, et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*, 1995, 96: 2247-2259.
- [10] Liao XD, Wang XH, Jin HJ, et al. Mechanical stretch induces mitochondrial-dependent apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes and G₂/M accumulation in cardiac fibroblasts. *Cell Res*, 2004, 14: 16-26.
- [11] Diez J, Panizo A, Hernandez M, et al. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hyperten-*

- sion. 1997, 30; 1029-1034.
- [12] Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, et al. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension*, 1998, 32; 280-286.
- [13] Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, et al. Uncoupling protein 2, *in vivo* distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem*, 2001, 276; 8705-8712.
- [14] 黄兆琦, 江时森, 吕磊, 等. 解耦联蛋白-2与诱导型一氧化氮合酶在大鼠缺血预适应保护机制中的作用. *医学研究生学报*, 2007, 20; 1159-1162.
- [15] Mills EM, Xu D, Fergusson MM, et al. Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem*, 2002, 277; 27385-27392.
- [16] Bodyak N, Rigor DL, Chen YS, et al. Uncoupling protein 2 modulates cell viability in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293; 829-835.
- [17] Bechmann I, Diano S, Warden CH, et al. Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64; 363-367.

(上接第 358 页)

要的角色,如何阻止或延缓这一过程的发生为今后的研究工作提出了新的问题和思路。

参 考 文 献

- [1] Hayashi M, Fujimoto K, Urushibata K, et al. Nocturnal oxygen desaturation correlates with the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *Chest*, 2003, 124; 936-941.
- [2] Nachtmann A, Stang A, Wang YM, et al. Association of obstructive sleep apnea and stenotic artery disease in ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*, 2003, 169; 301-307.
- [3] Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287; R1014-R1030.
- [4] 张文莉, 王士雯, 徐斌, 等. 中国小型猪阻塞型睡眠呼吸暂停模型的建立. *中国比较医学杂志*, 2004, 14; 286-289.
- [5] Dean RT, Wilcox I. Possible atherogenic effects of hypoxia during obstructive sleep apnea. *Sleep*, 1993, 16; S15-S22.
- [6] Schultz R, Mahmoudi S, Hattar K, et al. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162; 566-570.
- [7] Ip MSM, Lam B, Chan LY, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162; 2166-2171.
- [8] Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165; 934-939.
- [9] 李延忠, 张万荣, 王廷础, 等. 黏附分子在阻塞型睡眠呼吸暂停低通气综合征全并高血压发病中的作用. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27; 511-514.
- [10] Collins P, Fox K. The pathogenesis of atheroma and the rationale for its treatment. *Eur Heart J*, 1992, 13; 560-566.
- [11] 黎建. 氧化应激在周围动脉硬化疾病发生过程中的作用. *中华老年医学杂志*, 2007, 26; 328.
- [12] Mittel CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanidine 3, 5-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74; 4360-4364.
- [13] Steinbrecher UP, Zhang H, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 1990, 9; 155-168.
- [14] 周玫, 陈瑗. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化. *中华心血管病杂志*, 1990, 18; 248-252.
- [15] Fukui T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*, 2000, 105; 1631-1639.