

• 基础研究 •

压力超负荷致左室肥厚大鼠心肌细胞凋亡的动态变化 与腺嘌呤核苷酸转运体-1 的表达

杭涛 江时森 宫剑滨 汪春晖 谢波江 任海玲 诸葛海鸿

【摘要】 目的 探讨心肌线粒体腺嘌呤核苷酸转运体-1(ANT1)对压力超负荷致左心室肥厚中心肌细胞凋亡的影响。方法 利用腹主动脉缩窄法建立大鼠压力超负荷模型,观察时间点为术后 1,2,4,7,14,21,30d。ANT1 mRNA 含量的测定采用 RT-PCR 法,利用 TUNEL 法检测心肌细胞的凋亡。结果 (1)与对照组比较,缩窄后 4d ANT1 mRNA 的含量上调,并于第 7 天达到峰值,术后 14d 其含量回落至对照组水平,并保持至 30d。(2)手术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的存在。结论 (1)心肌细胞凋亡是心肌适应后负荷增加的一个重要的参与机制;(2)ANT1 部分介导了压力超负荷致左室肥厚中心肌细胞的凋亡。

【关键词】 凋亡;肥大,左心室;大鼠

Expression of adenine nucleotide translocator-1 and cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in rats

HANG Tao, JIANG Shisen, GONG Jianbin, et al

Department of Cardiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of adenine nucleotide translocator-1 (ANT1) on cardiomyocyte apoptosis in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. Methods The pressure overload rat model was established by abdominal aorta coarctation. The observation time points were 1, 2, 4, 7, 14, 21 and 30 days after operation. The ANT1 mRNA expression was evaluated by RT-PCR. The TUNEL method was applied to detect the cardiomyocyte apoptosis. Results 1. Compared with control group, the expression of ANT1 mRNA was upregulated on 4th day after coarctation, and peaked on 7th day, then it returned to control level on 14th day and persisted until 30th day. 2. The apoptosis increased significantly 1 day after operation, and reached a plateau between 4 and 7 day. Afterwards, it decreased continuously to a low level. However, the apoptosis was so rare that it was undetectable in control group. Conclusion Apoptosis is an important regulatory mechanism involved in cardiac adaptive response to pressure overload, and it may be mediated, in part, by ANT1.

【Key words】 apoptosis; hypertrophy, left ventricular; rat

心脏工作负荷的增加致心肌重塑的机制目前仍未完全明了,但心肌细胞的凋亡及能量代谢的紊乱无疑在这一过程中起了重要的作用^[1,2]。大多数研究表明,线粒体不仅是细胞的能量工厂,其在凋亡的信号传导中同样扮演了重要的角色^[3],特别是位于线粒体

内膜的腺嘌呤核苷酸转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)。ANT 是一种载体蛋白,也是线粒体内膜含量最多的蛋白(约占线粒体内膜总蛋白含量的 10%),其基本功能是负责线粒体基质和细胞质之间 ATP/ADP 的转运;同时 ANT 还是线粒体渗透性转运孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的核心成分,当某些促凋亡刺激作用于细胞时,ANT 可以转变为一种非特异性孔道,使细胞色素 C,凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)等释放至细胞质中,并激活凋亡通路下游的级联反应^[4]。人类 ANT 有 3 种同型异构体,分别是 ANT1,ANT2,

收稿日期:2006-12-14

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心脏内科

作者简介:杭涛,男,1976年3月生,江苏省姜堰市人,医学博士,主治医师。E-mail:njht1976@yahoo.com.cn

通讯作者:江时森,Tel:025-80860122,Fax:025-80860122

ANT3,而大鼠和小鼠的 ANT 则仅有两种同型异构体,即 ANT1和 ANT2;这些同型异构体的表达具有严格的组织特异性,在心肌中表达占优势的主要为 ANT1^[5]。体外的研究表明 ANT1 的过表达可诱导细胞凋亡^[6],在体研究则表明敲除 ANT1 基因的小鼠其心肌肥厚发展较正常对照组更为迅速^[7],但关于 ANT1 在压力超负荷致左心室肥厚中的动态表达情况及对这一过程中心肌细胞凋亡的影响则尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料 本实验中所用 TUNEL 检测试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司;其余分子生物学试剂均购自美国 Promega 生物有限公司。

1.2 压力超负荷大鼠模型的建立 42 只成年 SD 大鼠,体重(200±30)g,被随机分为两组:(1)手术组:戊巴比妥钠(40mg/kg, ip)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(20±2)℃,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, ip)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(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),并计算平均动脉压(mean aortic pressure, 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,用于心肌细胞凋亡及心肌纤维化的病理形态学检测。

1.4 组织总 RNA 的抽提 按照 Promega 公司总 RNA 抽提试剂盒(TripureTM Isolation Reagent)的操作步骤,从 100mg 新鲜大鼠的心肌组织中提取并纯化总 RNA 约 100μg,其 A260/A280 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 ANT1,β-actin 的 PCR 引物参考 Gene bank 所报道的各自的 cDNA 序列(Gene bank index: 398592, 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-actin 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%的琼脂糖凝胶上电泳,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-actin 的灰度值,随后计算目的基因的相对表达水平,计算公式为:目的基因的相对表达水平 = 目的基因灰度值 / β-actin 的灰度值。

1.7 心肌细胞凋亡的检测(TUNEL 法) 按照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,每张切片选 5 个视野,光镜下 40 倍,分别记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)。

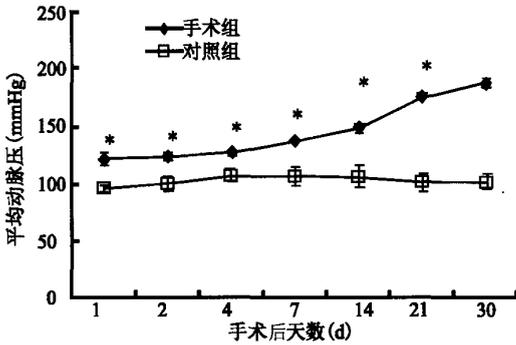
表 1 ANT1 及 β-actin PCR 引物序列

名称	类型	引物序列	PCR 产物长度
ANT1	正义链	5'-TAGGCAATAGCATAAGAGCGGC-3'	459bp
	反义链	5'-GTCCAGTGGGTAGACGAAGC-3'	
β-actin	正义链	5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3'	751bp
	反义链	5'-GATCTTGATCTTCATGGTGTAGG-3'	

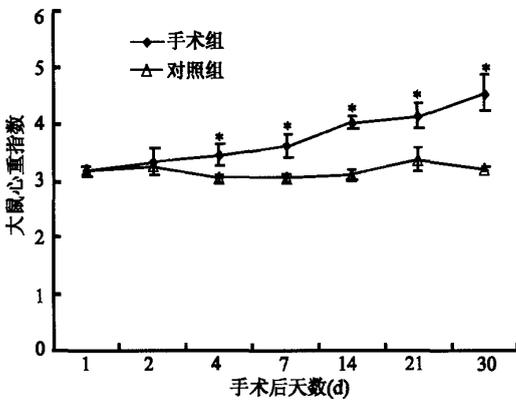
1.8 统计学分析 本实验所有涉及数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学检验采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 MAP 和 CWI 从图 1 可见,与对照组相比较,手术组大鼠 MAP 在术后 1d 即开始增高 ($122 \pm 6/95 \pm 3$, $P < 0.05$),并持续增加,直至 30d 达最大值 ($188 \pm 4/102 \pm 6$, $P < 0.05$)。由图 2 可知,与对照组比较,CWI 于手术后 4d 方开始增加 ($3.45 \pm 0.20/3.06 \pm 0.07$, $P < 0.05$),随后持续增长直至本实验结束 ($4.55 \pm 0.32/3.22 \pm 0.03$, $P < 0.05$)。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 1 压力超负荷大鼠平均动脉压

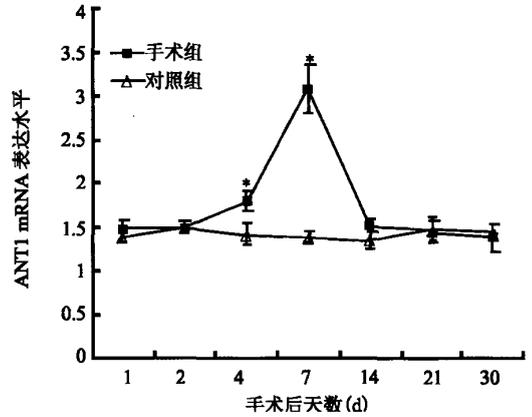


与对照组比较, * $P < 0.05$
图 2 压力超负荷大鼠心重指数

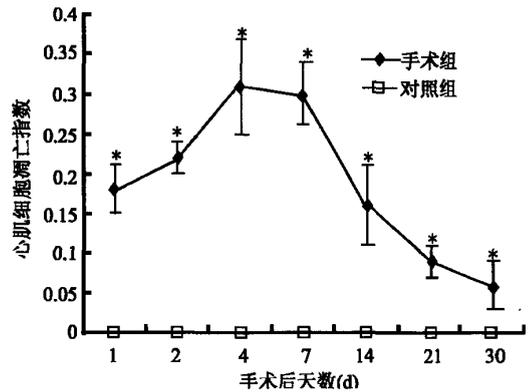
2.2 压力超负荷大鼠心肌 ANT1 mRNA 的相对含量 与对照组比较,ANT1 mRNA 的表达水平在术后 4d 上调 ($1.78 \pm 0.11/1.41 \pm 0.12$, $P < 0.05$),7d 时达到峰值水平 ($3.07 \pm 0.28/1.38 \pm 0.07$, $P < 0.05$),随后快速下降,于 14d 时回复至对照组水平并持续至实验结束(图 3)

2.3 压力超负荷模型大鼠 MAI 从图 4 中可知,万方数据

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,而在对照组的凋亡水平极低以至无法测及 (MAI=0)。



与对照组比较, * $P < 0.05$
图 3 压力超负荷大鼠心肌线粒体 ANT1 mRNA 表达水平



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

3 讨论

该实验发现,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,随后即迅速下降至对照组水平,而 ANT1 mRNA 的表达于术后 4d 方明显上调,其可能的原因是:(1)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,利用结扎肺动脉的方法致右室压力超负荷,术后 1d 右室心肌细胞凋亡即开始增加,并与促凋亡基因 p53 及 Bax 的含量升高有关^[11];而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^[12];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。但该研究中 MAP 在术后 1d 即开始升高,并持续增加至本研究结束,结合心肌细胞凋亡的变化,可见血压的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^[13];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^[14]。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。(2)ANT1 是线粒体内膜含量最高的蛋白,此外,ANT1 对于由促凋亡基因 Bax 所诱导的细胞凋亡是必需成分^[15];生理情况下,其凋亡诱导的活力被另一个 mPTP 的组成成分, cyclophilin D 所抑制,而当促凋亡刺激作用于细胞时,特别是 Bax 基因,通过其与 ANT1 的相互作用,上述 cyclophilin D 的抑制作用减弱或消失^[6]。由于多数研究表明 Bax 在压力超负荷致心肌肥厚过程中其表达是上调的^[14,16,17],因此,在该研究中,尽管术后短时间内 ANT1 的表达与对照组相比无显著差异,其在这一时期凋亡调控中的作用仍不能被完全排除,并有待于将来的工作进一步探讨。

该研究中最为重要的发现是在术后 4~7d,即心肌肥厚的指标 CWI 于第 4 天始与对照组比较有显著差异;ANT1 的表达于术后 4d 开始上调,并于第 7 天达到峰值;而凋亡则在 4~7d 时达到一个较高的平台期。其可能的原因:(1)能量需求和供应的平衡对于维持心功能的稳定非常重要,生理情况下,血压存在一定的波动,这就导致了心肌对能量的需求也是处于波动之中。(2)ANT1 是已知的惟一负责 ATP/ADP 转运的载体,也是线粒体内膜含量最高的蛋白之一;此外,利用离体的自发性高血压大鼠心肌线粒体进行研究后发现,ANT1 可以决定 ATP 合成的速率^[18]。因此,在该实验中血压上升的最初时期,虽然能量需求增高了,但 ANT1 的高表达水平可能使其在一定的范围内仍能满足心肌能量需求的增加并维持心功能,这从本实验中 ANT1 的表达及 CWI 并没有在术后立即升高也间接地印证了这一点。(3)该实验中,血压是持续升高的,当血压升高所致的心肌能量需求的增加打破了原先生理状态下最大平衡时,ANT1 的表达上调,从而增加能量的供应,同时,心肌发生肥厚,二者共同代偿了由于压力超负荷所引起的心肌病理生理变化,以维持心功能。(4)体外研究表明,ANT1 的过表达可以

诱导细胞的凋亡^[6]。而对肥厚性心肌病的研究表明,心肌细胞 ANT1 的表达异常增高,并伴随心肌细胞凋亡的大量增加^[19,20]。将以上发现结合该实验的结果,提示 4~7d 这一时间段凋亡的峰值变化可能主要是由于 ANT1 的表达增高所引起。

该研究中,ANT1 的表达于术后 14d 回归至对照组水平,并保持至 30d;心肌细胞的凋亡则于 7d 后从平台期逐渐降低,但仍以低水平持续存在。对这一变化,可能与以下原因有关:(1)Kayer 等^[21]利用肾动脉钳夹法,建立压力超负荷大鼠模型,30d 后发现,与对照组比较,静息状态下的心输出量与对照组相比无明显差异,但心脏平均重量增加了 30%,心肌线粒体容积增加了 80%,由此可以推测出单位重量的心肌中线粒体容积是增加的,即线粒体增生,并提示单个心肌细胞的负荷加重。(2)心肌细胞是一种终末分化期细胞,凋亡的心肌细胞必然为纤维组织代替,而该实验中,ANT1 的表达在术后 14d 回归至对照组水平并保持至 30d,结合 Kayer 等的发现,提示单个心肌细胞中 ANT1 的含量是持续增加的,也与血压持续增高导致心肌能量需求的增加是相一致的。但 ANT1 的增高并没有伴随心肌细胞凋亡的增加,相反,该实验中心肌细胞凋亡于 7d 后从平台期逐渐回落,并以低水平持续存在。有作者^[22]在肾血管性高血压的大鼠模型的研究中发现,术后 2 周利用 TUNEL 法没有发现心肌细胞凋亡的直接证据,但抗凋亡基因 Bcl-2 的表达较对照组显著增高,并认为这可能是对于术后早期所出现的细胞凋亡的一种保护性机制;此外,有研究表明,在压力超负荷致心肌肥厚及心衰的过程中,抗凋亡基因 BCL-x1 的表达是持续增加的^[23]。因此本研究中凋亡在 7d 后逐渐降低并以低水平持续存在可能是促凋亡机制与抗凋亡机制相互综合的结果,而具体原因仍需进一步阐明。

近年,有研究将离体的小鼠肝细胞 ANT1 和 ANT2 基因同时敲除后,发现肝细胞仍能够发生凋亡,因此认为 ANT 对凋亡的调控并不是必需的基本成分^[24]。但正如笔者所述,ANT 的各同型异构体的表达具有严格的组织特异性,在心肌中表达的主要是 ANT1,而在肝脏中表达的则主要是 ANT2^[5],此外,在由 ANT1 基因突变所致的进行性外眼肌麻痹的研究中并没有发现细胞凋亡存在的证据^[25],这就提示在不同的组织中,细胞凋亡的调控机制以及 ANT1 在这一过程中所起的作用可能存在差异。

综上所述,心肌线粒体 ANT1 是压力超负荷致心肌重塑这一过程中心肌细胞凋亡的重要调控因子

之一,并可能影响了这一过程的发生和发展。虽然其确切的作用还需要进一步的研究和探讨,但ANT1极有希望成为对这一过程进行干预的一个新的靶基因。

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] Van Bilsen M. "Energenetics" of heart failure. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1015:238-249.

[3] Schulze K, Dorner A, Schulthei HP. Mitochondrial function in heart failure. *Heart Fail Rev*, 1999, 4: 229-244.

[4] Belzacq AS, Vieira HL, Perrimon M, et al. The adenine nucleotide translocator as a potential therapeutic target. *Gene Ther Mol Biol*, 2001, 6: 121-131.

[5] Dorner A, Olesch M, Giessen S, et al. Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1417: 16-24.

[6] Bauer MK, Schubert A, Rocks O, et al. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis. *J Cell Biol*, 1999, 147: 1493-1501.

[7] Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet*, 1997, 16: 226-234.

[8] Brilla CG, Weber KT. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res*, 1992, 26: 671-677.

[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] Ikeda S, Hamada M, Hiwada K. Cardiomyocyte apoptosis with enhanced expression of P53 and Bax in right ventricle after pulmonary arterial banding. *Life Sci*, 1999, 65: 925-933.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 1998, 281: 2027-2031.

[16] Condorelli G, Morisco C, Stassi G, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation*, 1999, 99: 3071-3078.

[17] Moorjani N, Catarino P, El-Sayed R, et al. A pressure overload model to track the molecular biology of heart failure. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 24: 920-925.

[18] Atlante A, Seccia TM, Pierro P, et al. ATP synthesis and export in heart left ventricle mitochondria from spontaneously hypertensive rat. *Int J Mol Med*, 1998, 1: 709-716.

[19] Doerner A, Schulze K, Rauch U, et al. Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem*, 1997, 174: 261-269.

[20] Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Apoptosis and cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*, 2000, 15: 183-188.

[21] Kayer SR, Weiss HR. Diffusion distances, total capillary length and mitochondrial volume in pressure-overload myocardial hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 1992, 24: 1155-1166.

[22] Buzello M, Boehm C, Orth S, et al. Myocyte loss in early left ventricular hypertrophy of experimental renovascular hypertension. *Virchows Arch*, 2003, 442: 364-371.

[23] Ikeda S, Hamada M, Qu P, et al. Relationship between cardiomyocyte cell death and cardiac function during hypertensive cardiac remodelling in Dahl rats. *Clin Sci*, 2002, 102: 329-335.

[24] Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 2004, 427: 461-465.

[25] Fagiolari G, Sciacco M, Chiveri L, et al. Lack of apoptosis in patients with progressive external ophthalmoplegia and mutated adenine nucleotide translocator-1 gene. *Muscle Nerve*, 2002, 26: 265-269.