

抑郁对心肌梗死大鼠缺血心肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 表达的影响*

尤 鑫¹, 刘兴德^{2**}

(贵阳医学院附院 心血管科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨抑郁对心肌梗死大鼠缺血心肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的影响。方法: 大鼠随机分为四组, 各组 8 只, A 组为假手术组, B 组为抑郁大鼠假手术组, C 组为心肌梗死组, D 组为抑郁大鼠心肌梗死组。用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡, 用免疫组织化学法和逆转录-聚合酶链反应方法检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的基因表达。结果: 各组大鼠心肌细胞凋亡指数以及心肌细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达和心肌细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 表达的差异有统计学意义 ($P < 0.01$), C、D 组大鼠心肌细胞凋亡指数以及心肌细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达和心肌细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA 表达均高于 A 组和 B 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), D 组大鼠心肌细胞凋亡指数以及心肌细胞 Bax、Caspase-3 蛋白表达和心肌细胞 Bax、Caspase-3 mRNA 表达高于 C 组, 而心肌细胞 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达低于 C 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 抑郁可以加重心肌梗死大鼠缺血心肌细胞凋亡, 其机制可能与上调促凋亡基因 Bax 及 Caspase-3 表达、下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达有关。

[关键词] 抑郁; 心肌梗死; 细胞凋亡; 基因

[中图分类号] R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)01-0020-04

Effect of Depression on Cardiac Myocyte Apoptosis and the Expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in Rats with Myocardial Infarction

YOU Xin, LIU Xingde

(Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 50004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of depression on cardiac myocyte apoptosis and the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods:** Rats were randomly divided into four groups with 8 in each group. Group A: sham operation group; group B: sham operation rats with depression group; group C: rats with AMI; group D: rats with depression and AMI. Apoptosis of cardiac myocyte was detected with TUNEL method, and the expression of bcl-2, bax and caspase-3 were examined with immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** Statistical differences were found in apoptosis indexes of cardiac myocyte, the expression levels of bcl-2, bax and caspase-3 mRNA and protein among each group ($P < 0.01$). These indexes in groups C and D were significantly higher than those in groups A and B ($P < 0.01$). Apoptosis index of cardiac myocyte, expression levels of bax and caspase-3 mRNA and protein in group D were significantly higher than those in group C, while the mRNA and protein expression levels of bcl-2 were significantly lower than those in group C ($P < 0.05$). **Conclusions:** Depression could increase cardiac myocyte apoptosis in rats with AMI, and the mechanism may be associated with up-regulating expression of bax and caspase-3 and down-regulating expression of bcl-2.

[Key words] depression; myocardial infarction; apoptosis; gene

* [基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目, 合同编号: (2005)306

** 通讯作者 E-mail: lxd@gmc.edu.cn

冠心病是一种慢性终身性疾病,也是严重威胁人们生命的常见心血管疾病。在其发生发展过程中,病人常出现不同程度的焦虑、抑郁等负性情绪,其中抑郁的发生率最高,对病人的影响也最突出。有文献报道,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后,患者抑郁障碍发生率可达到 35%~45%^[1]。而抑郁是影响冠心病发生、发展和预后的重要因素之一。Frasure-Smith 等^[2]对 804 位急性冠脉综合征患者随访 2 年后发现,抑郁可使患者发生猝死、心肌梗死或心脏停搏的危险性增加 2 倍,可加重心肌梗死后心肌损伤,但在细胞凋亡方面的研究尚少^[3]。本研究就抑郁对心肌梗死大鼠缺血心肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 基因表达的影响进行探讨,为临床合并抑郁的 AMI 患者的科学防治提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 材料

健康 Wistar 大鼠,雌雄不拘,共 32 只,体重 200~250 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。TUNEL 细胞凋亡试剂盒、即用型免疫组织化学试剂盒及 Bax、Bcl-2、Caspase-3 兔多克隆抗体均为武汉博士德公司产品, RNA prep pure Tissue Kit 动物组织总 RNA 提取试剂盒、TIANScript RT Kit 逆转录试剂盒、2×Tap Plus PCR MasterMix PCR 试剂盒均由天根生化公司提供, DH-150 型小动物呼吸机(浙江大学仪器厂)、UVP 8000 型凝胶成像系统、WD-9403c 紫外仪、DYY-6c 型电泳仪(北京市六一仪器厂)、Eppendorff centrifuge 5810 R 高速离心、Amersham 核酸蛋白分析仪、PCR 仪(德国 Eppendorff)。

1.2 造模及分组

1.2.1 大鼠抑郁模型复制

根据文献^[4],敞箱实验水平运动和垂直运动总得分低于 30 分和高于 120 分的动物予以剔除(本研究大鼠抑郁模型复制前为 80~120 分)。每日随机选择以下 1 种不可预知性应激刺激:冷水游泳(4℃, 5 min),倾斜鼠笼 24 h,潮湿垫料 24 h,昼夜环境颠倒,热环境(40℃, 5 min),2 h 行为限制,夹尾(1 min),悬尾摇晃(持续 15 min),连续 21 d 并孤养。第 22 天行敞箱实验和液体消耗试验,若大鼠自发性探究行为明显减弱,运动能力降低,天生偏好糖水的兴趣下降,表示抑郁模型复制

造模成功。

1.2.2 大鼠心肌梗死模型的制作

用 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉 Wistar 大鼠,仰卧固定于手术台上,行气管插管,连接小型动物呼吸机,按潮气量 50 ml/kg、频率 60~80 次/min、呼吸比为 2:1 予以机械通气。开胸,暴露心脏。在肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支后关闭胸腔,大鼠恢复自主呼吸。以结扎冠状动脉后心电图肢导联 ST 段弓背向上抬高持续 30 min 以上作为梗死模型复制成功的标志。术后予以肌内注射青霉素钠 10 万单位预防感染。

1.2.3 实验分组

Wistar 大鼠 32 只,随机分为四组。假手术组(A组):非抑郁大鼠开胸后于心脏肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 2 mm(冠状动脉左前降支下方)处穿线,不结扎,群养(每笼 4 只);抑郁假手术组(B组):抑郁大鼠行开胸假手术(同 A 组),孤养(每笼 1 只);心肌梗死组(C组):非抑郁大鼠开胸后于肺动脉圆锥与左心耳交界处下方 2 mm(冠状动脉左前降支下方)处穿线结扎,群养(每笼 4 只);抑郁大鼠心肌梗死组(D组):结扎抑郁大鼠冠状动脉左前降支(同 C 组),孤养(每笼 1 只)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 心肌凋亡细胞的检测

用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,严格按照试剂盒说明书进行。正常的心肌细胞核被染成蓝色,凋亡阳性心肌细胞核被染成棕褐色,每张切片显微镜下(×400)随机采集不重叠的 10 个视野,计数凋亡细胞以及总的心肌细胞核数。心肌细胞凋亡指数(AI) = 视野内凋亡心肌细胞核数/视野内所有细胞核数 × 100%。

1.3.2 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白的检测

用 SABC 免疫组织化学方法,按 SABC 试剂盒的说明进行。镜下观察 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 蛋白阳性反应呈黄色或棕黄色颗粒,弥漫性分布,定位于胞浆。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,统一参数设定保持基线一致,测定平均光密度值(IOD/area),作半定量分析。

1.3.3 bcl-2、bax 及 Caspase-3 mRNA 的检测

所用引物均用 Primer 5.0 软件设计,由上海生工生物工程有限公司合成。Bcl-2:上游引物:5'-GGCATCTTCTCCTCCAG-3';下游引物:5'-

CATCCC AGCCTCCGTTAT -3';产物长度:442 bp。Bax:上游引物序列:5'-TTTGTTAC AGGGTTTCATC-CAGG-3';下游引物序列:5'-TTCCAGATGGT-GAGCG AGGC-3';产物长度:492 bp。Caspase-3:上游引物:5'-GTCTGACTGGAA AGCCGAAACTCT-3';下游引物:5'-GAGAAGGACTC AAATTCCGTG-GC -3';产物长度:304 bp。 β -actin:上游引物:5'-GATTACTGCCCTGGCTCC TAGC-3';下游引物:5'-CTCC TGCTTGCTGATCCACATC-3';产物长度:136 bp。组织总 RNA 提取、逆转录、PCR 扩增反应均按试剂盒说明操作,5 μ l PCR 扩增产物、5 μ l Marker 混合点样,2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统测量光密度值。bcl-2、bax 及 caspase-3 的相对含量 = 同一泳道目的片段 bcl-2、bax 及 caspase-3 积分光密度值/内参 β -actin 积分光密度值。

1.4 统计学分析

所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,资料符合正态分布且方差齐用方差分析比较,两两比较用 SNK 法,检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 抑郁对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响

各组大鼠心肌细胞凋亡指数差异有统计学意义 ($P < 0.01$),C、D 组大鼠心肌细胞凋亡指数均高于 A 组和 B 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),D 组大鼠心肌细胞凋亡指数高于 C 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 抑郁对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.1 The effect of depression on cardiac myocyte apoptosis in rats with AMI

组别	细胞凋亡指数 (%)	F	P
A	3.08 \pm 1.14		
B	3.82 \pm 0.90		
C	33.13 \pm 0.92 ⁽¹⁾	2 304.197	0.000
D	35.46 \pm 1.23 ⁽¹⁾⁽²⁾		

⁽¹⁾与 A、B 组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾与 C 组比较, $P < 0.05$

2.2 抑郁对心肌梗死大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

各组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),C、D 组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达均高

于 A 组和 B 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),D 组大鼠心肌细胞 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达高于 C 组,而 Bcl-2 蛋白表达低于 C 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 抑郁对心肌梗死大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.2 The effects of depression on the expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein in rats with AMI

组别	Bcl-2	Bax	Caspase-3
A	0.065 \pm 0.015	0.073 \pm 0.019	0.150 \pm 0.031
B	0.053 \pm 0.014	0.074 \pm 0.018	0.160 \pm 0.035
C	0.131 \pm 0.023 ⁽¹⁾	0.140 \pm 0.016 ⁽¹⁾	0.258 \pm 0.049 ⁽¹⁾
D	0.109 \pm 0.019 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.167 \pm 0.025 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.316 \pm 0.060 ⁽¹⁾⁽²⁾
F	32.514	44.854	151.606
P	0.000	0.000	0.000

⁽¹⁾与 A、B 组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾与 C 组比较, $P < 0.05$

2.3 抑郁对心肌梗死大鼠心肌细胞 bcl-2、bax 和 caspase-3 mRNA 表达的影响

各组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),C、D 组大鼠心肌细胞 Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达均高于 A 组和 B 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),D 组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达高于 C 组,而 Bcl-2 mRNA 表达低于 C 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 抑郁对心肌梗死大鼠心肌细胞 bcl-2、bax 和 caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab.3 The effects of depression on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 mRNA in rats with AMI

组别	mRNA bcl-2	mRNA bax	mRNA caspase-3
A	0.289 \pm 0.070	0.326 \pm 0.102	0.118 \pm 0.022
B	0.262 \pm 0.062	0.373 \pm 0.114	0.127 \pm 0.026
C	0.510 \pm 0.110 ⁽¹⁾	0.537 \pm 0.174 ⁽¹⁾	0.350 \pm 0.047 ⁽¹⁾
D	0.394 \pm 0.106 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.685 \pm 0.122 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.396 \pm 0.032 ⁽¹⁾⁽²⁾
F	59.269	12.532	24.947
P	0.000	0.000	0.000

⁽¹⁾与 A、B 组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾与 C 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是一种主动性基因控制的细胞死亡形式,正常情况下,生物个体

成熟后心肌细胞凋亡非常少见。但当心脏处于某种病理状态下,如心脏负荷过重或心肌缺血时,心肌细胞凋亡大量发生^[5]。目前研究证实细胞凋亡是 AMI 后心肌细胞死亡的一种重要形式,并对梗死心肌演变、预后和转归具有重要意义^[6]。

抑郁被认为是 AMI 后 6~8 个月心血管疾病死亡率的独立危险因素,且它的存在和心血管疾病事件有关,分析发现,严重的抑郁患者 AMI 后的死亡率可增加 2 倍以上^[7,8]。夏静等^[9]研究发现,抑郁大鼠心肌超微结构发生改变,表现为局部肌丝分离和溶解、线粒体外膜破损、心肌纤维细胞核浓缩、核内异染色质边集等。但抑郁是否通过增加心肌梗死后心肌细胞凋亡而影响患者预后,目前研究尚少。

本研究显示,抑郁大鼠心肌梗死组缺血心肌细胞凋亡数量显著高于心肌梗死组和对照组,提示抑郁可能通过促进大鼠缺血心肌细胞凋亡而扩大心肌梗死面积。因此,在临床上对 AMI 的高危患者应重视抑郁障碍诊断和治疗。

抑郁导致 AMI 大鼠缺血心肌细胞凋亡的机制尚不明确。已知细胞凋亡发生的原因和途径是复杂多样的,有许多基因参与细胞凋亡的基因调控,其中 Bcl-2 家族成员在细胞凋亡的基因调控过程中起着至关重要的作用,Bcl-2 家族可以分为 2 类:一类是抗细胞凋亡基因,代表基因是 Bcl-2 基因;另一类是促细胞凋亡基因,代表基因是 Bax 基因,它们通过激活一系列下游基因发挥调节凋亡作用。Bcl-2 蛋白具有促进细胞生存,对不同因素引起的细胞凋亡均有抑制作用。而 Bax 通过与线粒体上 Bcl-2 蛋白形成二聚体发挥作用,当 Bax 高表达时,形成同源二聚体 Bax/Bax 促进凋亡,Bcl-2 高表达时,形成异源二聚体 Bcl-2/Bax 以抑制凋亡的发生^[10]。

本研究显示,抑郁大鼠心肌梗死组 Bax 蛋白和 mRNA 的表达显著高于心肌梗死组和对照组,而 Bcl-2 的蛋白和 mRNA 表达显著低于心肌梗死组,提示抑郁可能通过上调 Bax 的基因表达和下调 Bcl-2 的基因表达促进了心肌梗死大鼠缺血心肌细胞凋亡。

Caspase 家族蛋白酶是一组天门冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,通过蛋白酶级联反应顺序激活,在细胞凋亡的执行过程中起关键作用,其中 Caspase-3 是 Caspase 家族中重要的凋亡执行者之一,它被合成后通常以非活化的酶原形式存在于细胞质中,在多种凋亡信号刺激下经蛋白水解作用被激活成活化形式,主要作用机制是消化破坏细胞内

多种蛋白酶复合体,激活核内核酸酶,造成 DNA 裂解,形成 DNA 片段,破坏细胞钙泵功能,导致细胞内钙超载等^[11]。但抑郁是否通过影响 Caspase-3 而促进心肌梗死大鼠缺血心肌细胞凋亡研究尚少。

本研究显示,抑郁大鼠心肌梗死组 Caspase-3 蛋白和 mRNA 的表达显著高于心肌梗死组和对照组,提示抑郁可能通过上调 Caspase-3 的基因表达促进了心肌梗死大鼠缺血心肌细胞凋亡。但其具体机制尚待进一步研究。

4 参考文献

- [1] 胡大一,刘春萍. 焦虑抑郁障碍与心血管疾病[J]. 中国医刊,2006(3):53-54.
- [2] Frasure-Smith N, Lespérance F. Depression and anxiety as predictors of 2-year cardiac events in patients with stable coronary artery disease [J]. Arch Gen Psychiatry, 2008(1): 62-71.
- [3] 周大亮,范宝晶,赵学忠,等. 抑郁对急性心肌梗死大鼠心室重构的影响[J]. 中国老年学杂志,2008(11):2105-2108.
- [4] Nezhat F, Datta MS, Hanson V, et al. The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review [J]. Fertil Steril, 2008(5): 1559-1570.
- [5] Arula J, Harder N, Virmani R, et al. Apoptosis in myocytes in endstage heart failure [J]. N Engl Med, 1996(16): 1182-1189.
- [6] 李东野,闫艳,朱红,等. HIF-1 α 基因对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心功能影响的实验研究[J]. 中国病理生理杂志,2008(2):275-278.
- [7] van Melle JP, de Jonge P, Spijkerman TA, et al. Prognostic association of depression following myocardial infarction with mortality and cardiovascular events: a meta-analysis [J]. Psychosom Med, 2004(6):814-822.
- [8] 袁永胜,袁勇贵. 抑郁症和冠心病共病的可能机制及治疗[J]. 实用临床医药杂志,2010(17):157-160.
- [9] 夏静,王旭梅,李艳辉,等. 慢性应激对大鼠心肌超微结构与热休克蛋白 70 表达的影响[J]. 中国行为医学科学,2006(4):308-310.
- [10] Brooks C, Dong Z. Regulation of mitochondrial morphological dynamics during apoptosis by Bcl-2 family proteins: a key in Bak [J]. Cell Cycle, 2007(24): 3043-3047.
- [11] Henaff M, Antoine S, Mercadier JJ, et al. The Voltage-independent type Caxhamel modulates apoptosis of cardiomyocytes [J]. FASEB J, 2002(1): 99-101.

(2011-11-14 收稿,2011-12-12 修回)

编辑:张丽君