供心缺血再灌注损伤与心肌细胞凋亡

张晓慎，吴若彬*
（广东省心血管病研究所心外科，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】研究供心长时间低温保存后缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡，明确抗调亡因子在心脏移植供心缺血再灌注损伤中的保护作用，为心脏保护液药物研究提供帮助。【方法】24只实验SD大鼠分2组，建立大鼠心脏异位移植模型，在围手术期、供心保存过程中使用天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3抑制剂(Ac-DEVD-CHO)干预，使用HTK保存液低温保存供心9 h，监测模型前后，检测凋亡相关因子和病理学指标。【结果】在异位移植开放后60 min，①实验组的心率恢复率[(71.9 ± 6.9)%]高于对照组[(59.6 ± 10.5)%；$P < 0.05$]。②实验组的心肌Caspase-3活性(0.695 ± 0.040)低于对照组(3.438 ± 0.035；$P < 0.01$)。③实验组的心肌梗死面积(5.29 ± 2.33)低于对照组(22.10 ± 3.00；$P < 0.01$)。④实验组的凋亡指数(5.09 ± 2.31)低于对照组(13.4 ± 2.5；$P < 0.01$)。⑤心肌组织HE染色：对照组的心肌组织损伤较实验组严重。【结论】①供心长时间低温保存再灌注后细胞出现明显凋亡，心肌细胞凋亡是心脏移植供心长时间保存缺血再灌注后心功能下降的主要机制之一。②使用半胱天冬酶抑制剂能明显抑制心肌细胞凋亡，减轻供心缺血再灌注损伤，改善供心心功能，是提高供心保存时效的良好方法。③半胱天冬酶抑制剂Ac-DEVD-CHO对供心保存的时-效和量-效关系仍有待进一步探讨。

关键词：凋亡；供心；缺血-再灌注损伤
中图分类号：R617 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-3554(2009)04-0390-05

Apoptosis and Donor Heart on Ischemie-reprefusion Injury

ZHANG Xiao-shen, WU Ruo-bin*
(Department of Cardiovascular Surgery, Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To study the apoptosis after long time of heart preservation, and the barrier of caspase (Ac-DEVD-CHO) in prolonged heart transplantation. To improve the techniques on the preservation of donor heart. 【Methods】 Donor rat hearts were subjected to group A (non-Ac-DEVD-CHO-treated), group B (Ac-DEVD-CHO-treated) of hypothermic storage, after 9 hours of heart preservation, then performed heterotopic heart transplantation, followed by 60 min of normothermic reperfusion (n = 6 in each group). 【Results】 After 60 min reperfusion, compared with group A, ① a significant improvement in the percent recovery of HR was observed in group B ($P < 0.05$); ② Caspase-3 activity was decreased in group B ($P < 0.01$); ③ an apparent decline in the expression of infarct area was observed in group B ($P < 0.01$); ④ an apparent decline in the expression of TUNEL-positive cardiomyocyte was observed in group B ($P < 0.01$); ⑤ Group B shows the least disease. 【Conclusion】 ① After preservation and reperfusion, cardiomyocyte apoptosis was observe evidently, which led to irreversible heart dysfunction. ② The administration of caspase-3 inhibition after reperfusion attenuates ischemia-reperfusion injury by suppressing apoptosis in heart transplantation. Furthermore, the use of caspase inhibition was investigated as a strategy for the preservation donor heart in transplantation. ③ The relationship of dose-response and time-effect is still unknown.

Key words: apoptosis; donor heart; ischemie-reprefusion injury
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(4): 390-394]

心脏移植现在已是治疗终末期心脏衰竭的一种有效手段。但它的应用受到供心的保护和术后心脏功能的恢复的限制。供心保护的不完善所造成的心肌缺血-再灌注损伤是造成心脏移植早期

收稿日期：2008-11-27
基金项目：广东省自然科学基金(7001109)
作者简介：张晓慎，硕士，主治医师；*通讯作者：吴若彬，博士生导师，E-mail：wuruob@yahoo.com.cn

功能衰竭的主要原因。因此，心脏移植时减少心肌缺血-再灌注损伤是提高心脏移植成功率的主要策略之一。对于供心的保护，目前主要是采用 4 ℃的含钾停搏液进行冠状动脉灌注及供心保存，但是临床安全保存时限局限在 4 ~ 6 h。如何提高保存时效是目前研究的热点。研究表明，目前对供心脏的保护研究在减少氧耗和能耗、减少氧自由基生成、稳定细胞膜和防止细胞及组织间隙水肿、减少 Ca^{2+}内流、抑制白细胞、血小板聚集及内皮细胞功能的保护方面取得了一定的成果，发明了一批有代表性的保护液应用于临床[1]。而细胞的凋亡、坏死对于在常温和低温条件下的心肌缺血-再灌注损伤所起的作用日益受到重视。研究表明细胞凋亡是心脏缺血-再灌注损伤的早期事件。缺血-再灌注损伤过程中出现的心肌及血管内皮细胞的凋亡，最终造成了心肌功能的损害及微血管的损伤，是导致非特异性移植物衰竭、移植物失功能、排斥反应和移植后冠状血管病变的重要原因[2-5]。细胞凋亡的一个关键性因子是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase，半胱天冬酶)。Caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路，也是凋亡的关键酶和执行者。基因剔除实验和动物模型显示，阻断 Caspase 活性即阻滞了体外和体内的细胞凋亡[6]。在大鼠动物模型，对急性缺血再灌注后的心肌进行免疫组化分析，心肌细胞的 caspase-3 水平明显升高，同时 TUNEL 染色显示心肌细胞 DNA 损伤增加[7-8]。Ac-DEVD-CHO 为不可逆特异性 Caspase-3 抑制剂，能够在细胞水平抑制细胞凋亡蛋白酶级联反应关键性因子 Caspase-3 的活性，由此抑制细胞凋亡而达到减少心肌缺血-再灌注损伤。本实验在供心长时间保存过程中及围手术期使用 Ac-DEVD-CHO 干预，探讨在供心长时间低温保存后缺血再灌注损伤导致的心肌细胞凋亡，明确半胱天冬酶抑制剂能否在低温下进一步延长供心有效保存时效，减少细胞凋亡，提高对心脏缺血-再灌注损伤的保护作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物

健康实验 SD 雄性大鼠 24 只，体质量(350 ± 15.7) g，由中山大学实验动物中心提供。随机分为两组：实验组、对照组各 12 只，每组供体鼠和受体鼠各 6 只，建立异位心脏移植模型，对照组试剂：40%DMSO + PBS，实验组试剂：40%DMSO + PBS + Ac-DEVD-CHO (0.4 mg/mL)。

1.2　主要试剂及仪器

HTK 心肌保存液及 Caspase-3 Inhibitor Ac-DEVD-CHO 分别购于德国克勒化学制药和德国 BD Pharmingen 公司。Caspase-3 分光光度法检测试剂盒和 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒均购于南京凯基生物科技发展有限公司。TTC 染色试剂购于 Sigma 公司。

全自动微粒子化学发光免疫分析仪(Beckman Coulter，USA)，生化培养箱(广州医疗器械厂)，显微镜(日本 OLYMPUS 公司)，生物信号采集处理系统(北京微信斯达科技发展有限责任公司)，手术显微镜(上海医用光学仪器厂)。

1.3　实验方法

术前 15 min 实验鼠予氯胺酮 (150 mg/kg)和安定(3 mg/kg)腹腔内注射麻醉，称重，经尾部静脉注射试剂 0.4 mL，腹腔内注射肝素钠 200 U。接 Pclab 生物信号采集处理系统，持续记录心电图。由剑突沿双侧季肋剪开腹腔，剪开膈肌，由剑突两侧分别向双腋下剪开胸廓，快速摘取心脏、肺及周围组织，放于 4 ℃ 含 0.4%肝素钠的生理盐水，用手指轻轻挤压心肺，使心肺内剩余血液排出，然后修剪游离升主动脉并横断主动脉，进行主动脉插管。使用 4 ℃ HTK 液 6 mL 灌注心脏使之停跳(灌注压 60 ~ 70 mmHg)，横断肺动脉，用 0 号丝线经横窦、上下腔静脉、肺静脉根部远端结扎。使用 4 ℃ HTK 保存液 5 mL + 试剂 0.25 mL 灌洗冠脉(灌注压 60 ~ 70 mmHg)，距主动脉根部 5 mm 处横断主动脉，将心脏置入 4 ℃ HTK 保存液 6 mL + 试剂 0.5 mL，保存 9 h。受体鼠术前 15 min 实验鼠予氯胺酮(150 mg/kg)和安定(3 mg/kg)腹腔内注射麻醉后，称重，腹腔内注射肝素钠 200 U。

受体鼠采用腹腔异位心脏移植术[9-10]：消毒腹部皮肤，正中开腹，显露肾动静脉水平以下的腹主动脉和下腔静脉，结扎其间的血管分支。先后阻断尾、头侧大血管，显微镜下进行供心移植：先做升主动脉-腹主动脉端侧吻合，后行肺动脉-下腔静脉端侧吻合。在供心心尖、受体鼠腹壁分别用 9-0 无损伤缝线固定心外膜起搏导线两条接 Pclab 生物信号采集处理系统，持续记录复跳后供心心电

图。血管吻合完成前 10 min 经尾部静脉注射试剂 0.4 mL,开放阻断。术后 60 min 切下供心,快速冷冻 5 min,距心尖 6 ~ 7 mm 冠状面横切心脏,切取 1 mm 薄片行心肌 TTC 染色、下段标本置于 40 mol/L 甲醛液体中固定,并常规组织学处理、石蜡包埋后切片行 TUNEL 染色、HE 染色;上段标本放在-80 ℃冰箱内冰冻保存检测心肌 Caspase-3 活性。

1.4 统计分析

本实验结果均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SAS for Windows 8.0 社会科学统计软件包处理数据,采用重复测量资料的方差分析进行组内比较和组间交差比较,采用单因素方差分析和 LSD-t 进行组间比较。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异的标准。

2 结 果

2.1 心率恢复率变化

本实验共完成异位心脏移植模型 12 例。各组在恢复灌注后均自动复跳,为窦性心率。在恢复灌注复跳后 60 min,实验组心率(71.9 ± 6.9)%恢复率高于对照组(59.6 ± 10.5)%,($P<0.01$)。

2.2 心肌 TTC 染色

TTC 染色标本使用平板扫描仪扫描,图像使用软件 Image-Pro Plus V6.0 计算缺血区面积百分比。异位移植开放后 60 min 取心肌行 TTC 染色,实验组的心肌梗死面积(5.29 ± 2.33)%低于对照组(22.10 ± 3.00)%($P<0.01$)。

2.3 心肌 Caspase-3 活性

在异位移植开放后 60 min,实验组的心肌 Caspase-3 活性 (0.695 ± 0.040)%低于对照组(3.438 ± 0.035)%($P<0.01$)。

2.4 心肌 TUNEL 染色

异位移植开放后 60 min 取心肌行 TUNEL 染色,实验组的凋亡指数(5.1 ± 2.3)%低于对照组(13.4 ± 2.5)%($P<0.01$;图 1)。

2.5 心肌组织 HE 染色

对照组:光镜下见心肌纤维排列紊乱,横纹模糊,间质肿胀,毛细血管明显充血,较多红细胞漏出(图 2A)。实验组:光镜下见:组织水肿,心肌纤维排列尚整齐,毛细血管轻度充血,少量红细胞漏出,内皮细胞轻微损伤(图 2B)。

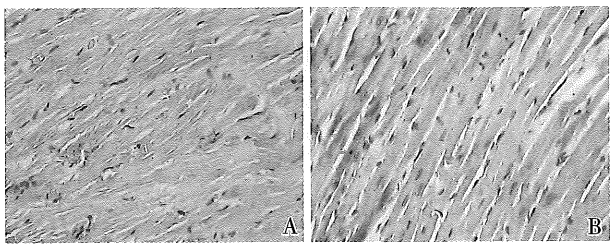


图 1 心肌 TUNEL 染色

Fig.1 TUNEL staining of cardiac tissue

TUNEL staining using an apoptosis detection kit showed an apparent decline in the expression of TUNEL-positive cardiomyocytes in the hearts after 60 min of reperfusion in Control group for A compared with those from Caspase-treated group for B, 40×

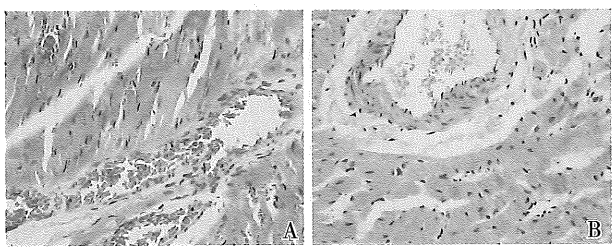


图 2 心肌 HE 染色

Fig.2 HE staining of cardiac tissue

The Caspase 3-treated group for A shows the least disease, compared with the Control group for B after 60 min of reperfusion, 40×

3 讨 论

心脏移植中提高供心的保存时效,减轻缺血-再灌注损伤,是移植成功的先决条件。对于提高供心的保存水平采取的措施是多方面的,对灌注液药物成分的研究是其中一方面,这一研究贯穿心脏移植的始终,取得了相当的进展,但距临床的要求仍有相当的差距,这就促使我们在心脏移植灌注液及移植过程中药物使用方面进行进一步深入研究。细胞的凋亡对于在常温和低温条件下的心肌缺血再灌注损伤所起的作用日益受到重视。

3.1 心肺缺血再灌注损伤机制

目前认为造成心脏缺血-再灌注损伤的原因是多方面的[11-15]:其中自由基、钙超载、中性粒细胞、能量缺乏、游离脂肪酸及脂代谢中间产物等的损伤作用。最近研究表明心肌缺血-再灌注损伤的发生与细胞凋亡密切相关,再灌注是心肌细胞凋亡的因素之一。持续缺血的心肌和缺血后再灌注

的心肌均有细胞凋亡发生，再灌注可减少凋亡的心肌细胞数，但却使不可挽救的心肌细胞加速发生凋亡。心肌磷脂(Cardiolipin,CL)的合成和分解过程在维持线粒体结构、功能及细胞存活方面起关键作用,CL 与细胞色素 C 之间的相互作用是凋亡的起始步骤。同时细胞色素氧化酶和腺嘌呤核苷酸移位酶均在凋亡中起关键作用。缺血心肌再灌注后心肌细胞凋亡明显增加，且随缺血及再灌注时间延长显著增多，提示心肌缺血或再灌注过程有促进或加速心肌细胞凋亡的作用。这可能是由于再灌注后虽然心肌得到了血供，但增加了自由基的形成,也加重了钙超载,从而触发了心肌细胞的凋亡[16]。研究显示抑制心肌细胞凋亡,可以减轻心肌缺血-再灌注损伤。

3.2　半胱天冬酶抑制剂对心脏移植供心缺血-再灌注损伤保护作用

细胞凋亡的一个关键性因子是一类独特的天冬氨酸-半胱氨酸特异的蛋白酶，统称为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase,半胱天冬酶)。目前这一蛋白酶至少已确认 14 个亚型。这些酶以休眠的酶原状态存在,在特定的条件下经过处理变为有催化活性的成熟酶。Caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,也是凋亡的关键酶和执行者。Ac-DEVD-CHO 为不可逆特异性 Caspase-3 抑制剂,能够在细胞水平抑制其的活性,由此抑制细胞凋亡而达到保护心肌缺血再灌注损伤。

已有研究发现,Ac-DEVD-CHO 能明显抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡，其作用机制与抑制 caspase-3 蛋白酶活性密切相关[17],在常温急性心肌缺血模型,Ac-DEVD-CHO 通过抑制心肌及血管内皮细胞凋亡而减少心肌缺血-再灌注损伤[18]。

因此,我们在大鼠心脏异位移植模型上,使用 Ac-DEVD-CHO 作为心肌细胞凋亡阻断因子,对心脏移植供心低温长时间保存后在体的缺血-再灌注损伤进行了研究。本实验研究观察到:①在恢复灌注复跳后 60 min，实验组的心率的恢复百分比均高于对照组。②在恢复灌注复跳后 60 min 取左室心肌 TTC 染色,实验组的心肌梗死面积低于对照组，提示 Ac-DEVD-CHO 可能从减少微血管损伤及心肌凋亡两方面减少了实验组的心肌细胞梗死。③实验结果发现缺血再灌注后对照组的心肌结构损伤较实验组严重。④在恢复灌注复跳后 60 min 取左室心肌 TUNEL 染色,实验组及对照组均发现凋亡细胞，证实在供心长时间低温保存再灌注后,心肌细胞出现凋亡现象,实验组的凋亡指数低于对照组,提示实验组的细胞凋亡减少。⑤在恢复灌注复跳后 60 min,实验组的心肌 Caspase-3 活性低于对照组，提示实验组 Ac-DEVD-CHO 有效地抑制了 Caspase-3 活性,结果和实验组的细胞凋亡减少结果一致，提示 Ac-DEVD-CHO 抑制了心脏缺血再灌注后的细胞凋亡。

综合 TUNEL 染色及 Caspase-3 活性检测结果，证实供心在长时间低温保存后出现了明显细胞凋亡。抑制了 Caspase-3 活性,可以抑制相当数量心肌细胞的凋亡，但是未能抑制全部细胞的凋亡，其可能因素包括：存在另外的凋亡通路以及和 Ac-DEVD-CHO 的药效、剂量有关。

3.3　小　结

综合上述结果,可以得出以下结论:①供心长时间低温保存再灌注后细胞出现明显凋亡，心肌细胞凋亡是心脏移植供心长时间保存缺血再灌注后心功能下降的主要机制之一。②使用半胱天冬酶抑制剂能明显抑制心肌细胞凋亡，减轻供心缺血再灌注损伤,改善供心心功能,是提高供心保存时效的良好方法。③半胱天冬酶抑制剂 3 可以抑制相当数量心肌细胞的凋亡，但是未能抑制全部细胞的凋亡,其可能因素包括:存在另外的凋亡通路以及 和 Ac-DEVD-CHO 的药效、剂量有关。综合细胞凋亡的调控机制，采用多位点的抗细胞凋亡方法可能会进一步减少因缺血再灌注损伤导致的供心细胞凋亡。

参考文献:

[1] Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway [J]. Transplantation, 2002,73(2):287-292.

[2] Beranek JT. Apoptosis is the main mechanism of cardiomyocyte death in the hyperacute rejection of heart xeno- and allografts [J]. Transplantation, 1997, 64(11):1632-1633.

[3] Miller LW, Granville DJ, Narula J, et al. Apoptosis in cardiac transplant rejection [J]. Cardiol Clin, 2001,19(1):141-154.

[4] Balsam LB, Mokhtari GK, Jones S, et al. Early inhibition of caspase-3 activity lessens the development of graft coronary artery disease [J]. J Heart Lung

Transplant, 2005,24(7):827-832.
[5] LinksLoor G, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion [J]. Cell Death Differ, 2008,15(4):686-690.
[6] Kuida K, Zheng TS, Na S, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice [J]. Nature, 1996,384(6607):368-372.
[7] 高思海,杨辰垣. 细胞凋亡与心脏移植 [J]. 国外医学:外科学分册,2001,28(6):331-332.
[8] 吴 龙,孙宗全. 小鼠心脏移植缺血再灌注诱导细胞凋亡的机制 [J]. 中国心血管杂志,2004,9(5):313-315,318.
[9] Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969,57(2):225-229.
[10] 王昊飞,高旭辉,王武军,等. 改进的 Ono 大鼠异位心脏移植模型 [J]. 中华实验外科杂志,2004,21(4):402-406.
[11] Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium [J]. Curr Probl Car-diol, 2006,31(3):181-264.
[12] Wang TD, Chen WJ, Su SS, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis following ischemia and reperfusion in diet-induced hypercholes-terolemia: relation to Bcl-2 and Bax proteins and capase-3 activity [J]. Lipids, 2002,37(4):385-394.
[13] Shirito K, Otani H, Yamamoto F, et al. MK2-/-gene knockout mouse hearts carry anti-apoptotic signal and are resistant to ischemia reperfusion injury [J]. J Mol Cell Cardiaol, 2005,38(1):93-97.
[14] 刘胜中,杨双强. 心肌缺血-再灌注损伤机制研究进展 [J]. 实用医院临床杂志,2007,4(1):88-90.
[15] Scarabelli TM, Knight R, Stephanou A, et al. Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium [J]. Curr Probl Cardiol, 2006,31(3):181-264.
[16] 麦炜颐,马 莉,黄裕立,等. ACE 抑制剂 Ramipril 对大鼠急性心肌梗死后心肌细胞凋亡和左室重构的影响 [J]. 中山大学学报:医学科学版,2008,29(5):550-555.
[17] 郑世营,赵 军,张晓膺,等. Caspase 抑制剂对缺氧诱导的心肌细胞凋亡影响的实验研究 [J]. 中国急救医学,2004,24(11):803-805.
[18] 刘哲林,江 涛,任素梅,等. Caspase-3 抑制剂研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2004,20(6):669-670.

(编辑 徐 杰)

·病例报告·

男性幼儿分泌型乳腺癌 1 例报告

王俊杰, 管迅行, 吴三纲, 杨 勇, 郭 君
(中山大学附属肿瘤防治中心放疗科, 广东 广州 510060)

关键词: 男性幼儿乳腺癌; 分泌型乳腺癌; 病例报告
中图分类号: R73 **文献标识码**: A **文章编号**: 1672-3554(2009)04-0394-01

男性乳腺癌发病率较低, 国内男性乳癌约占全部乳腺癌患者的 1%。而男性分泌型乳腺癌患者更为少见。我院 2008 年接收 1 例幼年男性分泌型乳腺癌, 现报告如下: 患儿男性,4 岁,2006 年 12 月因碰撞右侧胸壁后发现右乳腺外下象限肿块,约 1.0 cm × 1.0 cm,家长考虑血肿而未予治疗,但肿块渐增大,遂于 6 个月后在当地医院检查:右胸壁肿块约为 2.0 cm × 2.0 cm × 1.0 cm 大小,质中,活动度可,无压痛,右侧腋窝可触及两枚直径约 0.7 ~ 0.8 cm 肿大淋巴结, 质硬, 活动度差。2007 年 6 月 23 日在当地医院行乳腺肿块切除术,术后标本送四川华西医院病理科诊断为: 倾向幼年性乳腺癌。遂行右乳腺癌改良根治术。蜡块经我院病理科诊断为:右乳腺浸润型癌(倾向为分泌型癌/幼年性乳腺癌,男性乳腺癌),腋窝淋巴结 2/11 枚转移;免疫组化雌孕激素受体 ER(-),PR(+),原癌基因 CerbB2^{-};分期为 pT2N1MO Ⅱb 期。术后外院行 CMF 方案(环磷酰胺 400 mg,第 1 天加甲氨蝶呤 25 mg 和 5-氟尿嘧啶 400 mg) 化疗 6 周期,化疗后予他莫昔酚 5 mg(2 次/d)未行放射治疗,随访至今患儿身体健康,发育良好。

(编辑 孙慧兰)