

大鼠心肌急性缺血再灌注 Fos 蛋白表达及其意义

马孟云¹ 徐小虎² 陈玉川¹ 罗斌¹ 陈建国¹ 赵连旭¹ 祝家镇¹

(1 中山医科大学法医病理学教研室; 广州, 510089 2 汕头大学医学院法医研究所; 汕头, 515031)

摘要 目的:探讨急性心肌缺血再灌注早期不同时间心肌细胞内 Fos 蛋白表达的变化, 为心肌早期缺血再灌注损伤致死死后诊断提供新方法。**方法:**在 32 只 SD 大鼠建立心肌早期缺血再灌注损伤模型, 另外 40 只大鼠分为正常与缺血对照组。用免疫组化 SABC 法结合图象分析研究心肌细胞核 Fos 蛋白的累积情况。**结果:**缺血 30 min 再灌注 30 min 后, 再灌注区有部分心肌细胞核呈弱阳性着色, 以后随缺血时间延长核阳性增强。缺血 90 min 再灌注 30 min 后核棕褐色染色最强, 180 min 后又开始减弱。正常和单纯缺血组心肌细胞核未见有阳性反应。HE 染色无明显病理改变。**结论:**Fos 蛋白表达高峰在缺血 90~180 min 之间, Fos-SABC 染色法可诊断缺血 30 min 再灌注 30 min 或更长时间的损伤。免疫组化染色法检测心肌细胞核 Fos 蛋白的表达有望成为急性心肌缺血再灌注死后诊断的一种有意义的手段。

关键词 心肌再灌注损伤; 原癌基因蛋白质 c-fos 类; 免疫组织化学; 大鼠

中图分类号 R 541.1; R 89

Expression and Significance of Fos Protein on Myocardial Acute Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

Ma Mengyun¹ Xu Xiaohu² Chen Yuchuan¹ Luo Bin¹ Chen Jianguo¹ Zhao Lianxu¹ Zhu Jiazhen¹

(1 Department of Forensic Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089

2 Institute of Forensic Medicine, Shantou University Medical College, Shantou, 515031)

Abstract Objective: To investigate the changes of Fos protein induced by myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) during acute period, and provide a new method for postmortem diagnosis of acute ischemia/reperfusion. **Methods:** It was established that the model of MI/R successfully in 32 anaesthetized SD rats. Parallely, the other 40 rats were used as normal and ischemic control. Immunohistochemical SABC method and computerized image analysis were used to observe alterations of Fos protein in nuclei of cardiac myocytes. **Results:** After 30 min ischemia followed by 30 min reperfusion, the area of MI/R showed a part of nuclei of cardiac myocytes weak staining, and became stronger with the elongation of ischemia. But after 90 min ischemia followed by 30 min reperfusion, staining of nuclei of cardiac myocytes was strongest, it began to attenuate after 180 min. The myocardium in normal and ischemic control animals showed negative staining. No changes were seen with HE staining in all groups. **Conclusion:** There is a high point of Fos protein expression during the period of 90 to 180 min. SABC immunohistochemical method may reveal injury of myocardial 30 min ischemia/30 min reperfusion or longer time. Immunohistochemical detection of Fos protein in nuclei of cardiomyocytes would be a meaningful tool for the postmortem diagnosis of myocardial acute ischemia/reperfusion.

Subject headings myocardial reperfusion injury; proto-oncogene proteins c-fos; immunohistochemistry; rats

心肌急性缺血再灌注损伤是心脏性猝死的主要原因之一, 在心性猝死中占有重要的地位^[1]。多年来已引起许多学者的重视并且对其死后诊断进行了大量的研究, 但准确诊断仍然没有彻底解决。大鼠心肌早期缺血再灌注后引起心肌局部的应激

反应蛋白 Fos 蛋白发生了变化, 本文对其进行免疫组化研究, 旨在为法医实践中怀疑为急性缺血再灌注死亡案例的死因鉴定探索一种灵敏、特异且实用的形态学指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

中山医科大学动物中心提供的 SD 大鼠 72 只,雌雄不限,体重 180~250 g。设立正常对照、缺血和缺血再灌注组。将 72 只 SD 大鼠随机分为 9 组,每小组 8 只。另外,正常对照组(A 组)设立一小组 8 只大鼠;缺血组(B 组)分为 4 小组共 32 只;缺血再灌注组(C 组)根据缺血时间不同也分为 4 小组。A 组:为麻醉开胸不结扎组。B 组:B₁ 组为缺血 30 min 组;B₂ 组缺血 60 min 组;B₃ 组为 90 min 组;B₄ 组缺血 180 min。C 组:C₁ 组缺血 30 min 再灌注 30 min;C₂ 组缺血 60 min 再灌注 30 min;C₃ 组缺血 90 min 再灌注 30 min;C₄ 组缺血 180 min 再灌注 30 min。

1.2 试剂

Fos 一抗、DAB 显色试剂盒与 SABC 试剂盒均购于武汉博士德公司。

1.3 鼠心肌缺血再灌注模型的制作^[2,3]

大鼠用戊巴比妥钠(20 g/L)腹腔注射麻醉(45 mg/kg)后,按文献^[2,3]复制早期缺血再灌注模型及心律失常评分。

1.4 心脏组织处理过程

分别在各组大鼠相应的时间点完整剪取心脏,以体积分数为 0.1 的福尔马林固定 24 h 后,在左心室尖部至底部中间作心脏横切取材,常规脱水、石蜡包埋及制片。

1.5 Fos-SABC 免疫组化及常规染色方法

SABC 是链酶亲和素-生物素-酶复合物(Strept avidin-biotin complex)的英文缩写,此方法操作程序同 S-P 和 LSAB 法,但更为敏感特异。各组心脏标本切片,按照 SABC 试剂盒内说明书进行 Fos-SABC 免疫组化染色操作。以正常大鼠、单纯缺血组大鼠作对照。PSB 取代一抗、二抗作阴性对照。各组切片进行常规 HE 染色。

1.6 图像分析与统计学处理

各组玻片均应用英国 Quantimet⁻⁵²⁰ 图像分析仪对免疫组化染色的阳性反应产物进行定量检测分析,具体操作为低倍镜找视野,调至 400×,自动控制装置随即机选 10 个位点测量阳性细胞率与灰度值,然后取平均值。灰度从最大到最小共分为 255 个层次,其中灰度值愈大则阳性反应物的强度

愈小。所有数据应用 SPSS for Windows 软件包进行方差分析, *t* 检验等统计学处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 心电图指标观察

B 组与 C 组大鼠均有心律失常发生,程度不一。心律失常评分结果与文献^[2]结果类似。

2.2 常规 HE 染色

各组心肌细胞染色清晰,横纹清楚,细胞核致密清晰。除心肌嗜伊红性增强及肌纤维肿胀,轻度心肌水肿外,未见明显病变。

2.3 SABC-Fos 免疫组化染色

正常对照组:大鼠心肌组织未见阳性反应。缺血对照组:与正常对照组结果相似(图 1)。缺血再灌注组:缺血 30 min 再灌注 30 min(C₁ 组)后心肌细胞核淡棕色着色散在分布;缺血 60 min 再灌注 30 min 组(C₂ 组)核阳性增强,C₃ 组核阳性最强(图 2),而 C₄ 组核阳性又开始减弱,形成鲜明的对比。

2.4 图像分析处理

各组心脏标本 Fos 免疫组化染色图像分析结果见表 1。

表 1 各组 Fos 蛋白免疫组化染色阳性细胞率

Table 1 Rate of Fos protein positive staining in cardiac myocytes of each group ($\bar{x} \pm s, \%$)

<i>t</i> (Reperfusion)/min	<i>t</i> (Ischemia)/min				
	0	30	60	90	180
0	1.3±0.6	2.3±1.5	2.3±1.5	2.3±1.5	2.3±1.5
30	1.3±0.6	17.8±9.7 ¹⁾	20.3±3.3 ¹⁾	65.4±10.8 ^{1),2)}	41.5±7.1 ¹⁾

1) Compared with normal and ischemic control groups, $P < 0.01$; 2) compared with C₁, C₂ and C₄ groups, $P < 0.05$

结果说明,在 C₁~C₃ 组之间,心肌细胞核阳性率与染色强度随缺血时间的延长而增强,缺血 90 min 再灌注 30 min 时核阳性最多,最强。

3 讨论

3.1 Fos-SABC 染色法对显示心肌缺血再灌的意义

Fos 蛋白是原癌基因 C-fos 的蛋白产物。它们不仅参与正常心肌的生长和发育,是心肌生长的一

个触发因素和调节因素。并且也是心血管系统应激反应基因和蛋白。可是在成年心肌细胞很少表达或不表达^[4]。近年有些学者的研究成果表明,不但在脑^[5]、肝^[6]与肾脏^[7]等早期缺血再灌注模型上观察到有 *c-fos* 基因和 Fos 蛋白的表达,而且在心肌缺血再灌注模型上发现缺血 5 min 再灌注 10 min, *c-fos* mRNA 开始有少量表达。且表达增加是时间依赖性的,而正常与单纯缺血组未见阳性表达^[8,9]。

本文用 SABC 免疫组化染色法观察了 Fos 蛋白在心肌局部的变化情况,并对观察结果进行图像分析与统计学处理。结果观察到:缺血 30 min 再灌注 30 min 后,在缺血再灌注区散在心肌细胞核 Fos 蛋白免疫组化阳性,而缺血 90 min 再灌注 30 min 后 Fos 蛋白阳性反应增强,180 min 后有所减弱。而对照组及非缺血区细胞核呈阴性。说明 Fos 蛋白随缺血时间延长而在核内累积增加,且在 90~180 min 之间可能有一高峰期。由此可见,Fos-SABC 法可诊断心肌缺血 30 min 再灌注 30 min 或更长时间的缺血再灌注。而 Webster 等人^[10](1993)在培养乳鼠心肌细胞缺氧后 1~4 h 内, *c-fos* 基因表达达高峰,是对照组 5~10 倍。在细胞发生不可逆损伤之前,用抗 Fos 抗体免疫染色揭示了缺氧细胞核中蛋白的积累。两者结果不一致可能是由于缺血再灌注与缺氧诱导 *c-fos* 表达的时程与机制不同,且可能受鼠龄的影响。

3.2 心肌缺血再灌 *c-fos* 表达的机理与作用探讨

值得注意的是,原癌基因 *c-fos* 的诱导仅仅在缺血后的再灌注期间被检测到。目前公认的机理是^[9,10]:再灌注介导的自由基大量生成;与再灌注有关的钙离子超载;缺血介导的蛋白质合成抑制,同时缺血后,PKC 和 *raf* 等细胞激酶的激活等,这些因素均可诱导原癌基因 *c-fos* 的表达。在此种情况下 *c-fos* 基因与蛋白作为应激反应基因与蛋白出现,作为第三信使,使某些基因的表达发生改变,并转而调控其它基因,结果是激活细胞增殖并启动了细胞修复过程,有助于可逆性损伤的修复^[10]。但若过度表达可致心肌细胞凋亡^[11]。鉴于此,大部分学者认为原癌基因 *c-fos* 及蛋白是再灌注的特征性指标。

3.3 Fos-SABC 法诊断法医学心性猝死的价值

冠心病猝死及青壮年猝死综合症,由其他器质性病变所致除外,尚有很多情况是由冠状动脉痉挛突然缓解和血栓溶解后的再灌注损伤触发的,而此

类猝死者多发生在早期,有时仅是心脏电生理功能的改变,细胞及组织结构无明显的改变,此种情况用法医病理学常规方法检查找不到或仅见轻微病变,给判断死因带来困难。近几十年来国内外学者已从不同角度和水平对缺血再灌注进行了大量的研究。在形态学观察中,已有酶组织化学、荧光技术、电镜及免疫组织化学研究报道^[3]。其中酶学、荧光及电镜技术虽然灵敏但是因缺乏特异性,且易受自溶影响,在法医实际检案中的作用受到限制。免疫组化染色以其高度特异性、灵敏性和实用性集一身,已得到普遍接受。虽然各国学者用免疫组织化学方法已对缺血再灌注后的心肌肌动蛋白,结蛋白,波形蛋白和补体 *c5b-9* 等进行了研究,但仍没有获得满意的结果。资料表明^[10], *c-fos* 的过度表达似乎是细胞终末分化的标志及死亡先兆,且先于细胞出现生化和死亡形态学改变数小时至数天。本文研究也发现 Fos 蛋白阳性表达在心肌细胞发生不可逆性损伤之前。在此情况下尽管心肌细胞结构未发生明显的改变,但是心肌细胞功能一定是发生了变化。由此可见,在法医实践中怀疑为心肌缺血再灌注猝死者可根据细胞核 Fos 阳性程度,不仅可以明确心肌急性缺血再灌注损伤,而且结合组织学等改变可估计缺血再灌注的时间及损伤程度。本方法已应用于 63 例人体心性猝死的检测,均于死后 12~72 h 取材,石蜡包埋切片,取得有意义的结果(另文报道)。因此,本方法对诊断心肌缺血再灌注损伤具有法医检案的实用价值。尽管如此,但是要能达到完善地在实践中应用的程度,却仍然有待于研究工作的进一步深入。

3.4 需进一步研究的问题

①在各种不同之种属动物的研究;②增加各组动物数量和实验时间点,研究更短时间内 Fos 蛋白的变化规律;③Fos 蛋白在缺血再灌注中的确切机制与作用。结合形态学、组织学和生物化学等方法,对缺血再灌注进行实验与应用研究,比单纯应用某一方法更有价值。总之,本研究明确了心肌急性缺血再灌注损伤与心性猝死的联系,并且发现 Fos-SABC 染色可诊断缺血 30 min 再灌注 30 min 或更长时间的损伤。这就为法医学心性猝死案例的死因鉴定提供了一项快速灵敏、准确特异而且实用的新方法。

(本文图 1,2 见第Ⅲ页)

参 考 文 献

- 1 世界卫生组织科学小组报告. 心脏性猝死. 国外医学心血管分册, 1986, 2(4): 285
- 2 Liu P T, Hock C E, Nagele R, *et al*. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol*, 1997, 272(41): H2327
- 3 Fu C Z, Song Y X, Zhu J Z, *et al*. Immunocytochemical study with HHF³⁵ on myocardial ischemia and reperfusion injury in rats. *Forensic Sci Int*, 1993, 59(1): 25
- 4 Simpson P C. Proto-oncogenes and cardiac hypertrophy. *Ann Rev Physiol*, 1988, 51: 189
- 5 Liu J S. Delayed transhemispheric c-fos gene expression focal cerebral ischemia reperfusion. *J Formos Med Assoc*, 1995, 94(11): 649
- 6 Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, *et al*. Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following I/R in mouse liver. *Hepatology*, 1996, 23(6): 1546
- 7 Rosenberg M E, Paller W S. Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int*, 1991, 39(6): 1156
- 8 Wechsler A S, Entwistle J C, Yeh J Jr, *et al*. Early gene changes in myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg*, 1994, 58(4): 1282
- 9 Plumier J C, Robertson H A, Currie R W. Differential accumulation of mRNA for immediate early genes and heat shock gene in heart after ischemic injury. *J Mol Cardiol*, 1996, 28(6): 1251
- 10 Webster K A, Discher D J, Bishopric N H. Induction and nuclear accumulation of Fos and Jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Bio Chem*, 1993, 268(22): 16852
- 11 Smeyne R E, Vendrell M, Hayward M, *et al*. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature*, 1993, 363(1): 166

(1999 - 01 - 29 收稿 1999 - 09 - 16 修回)

• 简 讯 •

中山一院首次竞选重点学科

近日,中山医科大学附属第一医院首次采取“擂台赛”的竞选方式,从15个申报重点的学科中优选出生殖医学中心等5个学科作为医院重点学科。本次竞选十分激烈、精彩。经过两天的角逐,生殖医学中心、消化内科、骨科显微外科医学部、医学影像学部,泌尿外科由于其学术队伍,人才培养以及学术研究方面的综合实力较为突出而成为本次竞争的赢家。据悉,医院将每年给予他们不少于200万元的专项投入,并定期对其工作进行评估。3年后,每个学科必须通过评估总结。若3年内该学科未能产生公认的后备学科带头人,则取消重点学科待遇,缺额由其它学科再竞争择优。中山一院常务副院长詹文华指出,竞选重点学科的实质就是要力促医院主动适应现代医学高科技竞争,把握现代科技条件下的学科竞争和人才竞争的主流。

(吴金泉)

中山医附一院成功施行国内首例右位心伴三支腔静脉
异位回流入左心房的复杂性心脏病手术

6月22日,中山医科大学附属第一医院心胸外科孙培吾教授在体外循环下为一女童进行了心内畸形矫治——心房内转流手术。该手术难度相当大,手术进行了3h,修复完成后,女童心脏自动恢复跳动;手术第二天插管被拔掉开始自然进食,恢复迅速,近期已康复出院。女童来自广东罗定,今年两岁,出生后全身发绀,稍有活动则出现气促。经检查,女童心脏偏右,左上腔静脉、右上腔静脉与下腔静脉异位,并都回流入左心房;房间隔缺损;冠状窦缺如。诊断是右位心且完全性腔静脉异位回流入左心房。

(吴金泉)

大鼠心肌急性缺血再灌注 Fos 蛋白表达及其意义 (正文见第 272 页)

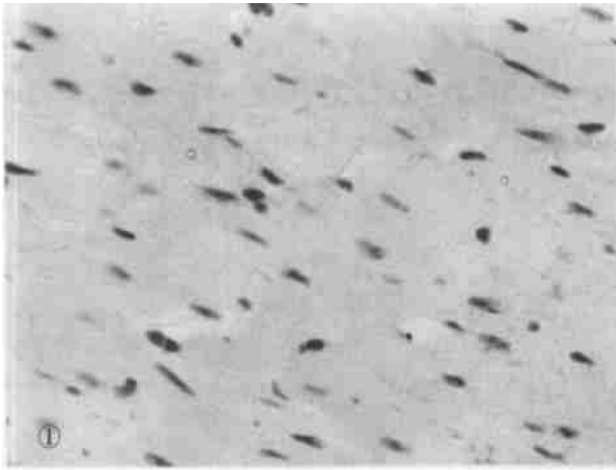


图 1 对照组心肌细胞核 Fos 阴性

Fig. 1 Fos negative nuclei of cardiac myocytes in control groups(SABC × 400)

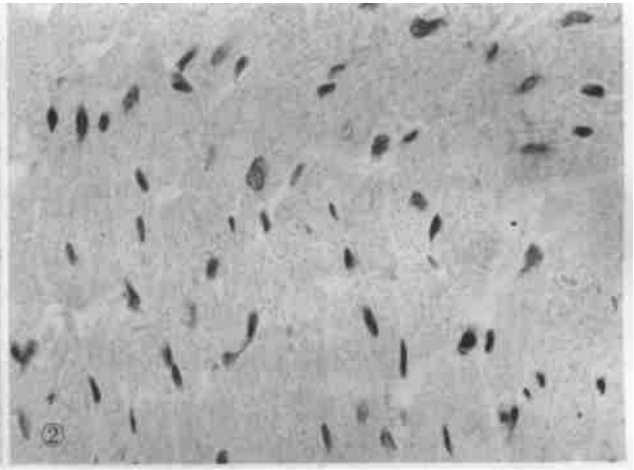


图 2 再灌注区大量的心肌细胞核 Fos 阳性

Fig. 2 A large amount of Fos positive nuclei of cardiac myocytes can be seen in reperfusion area (Group C₁, SABC × 400)

骨肉瘤保留肢体治疗术后生存分析 (正文见第 288 页)

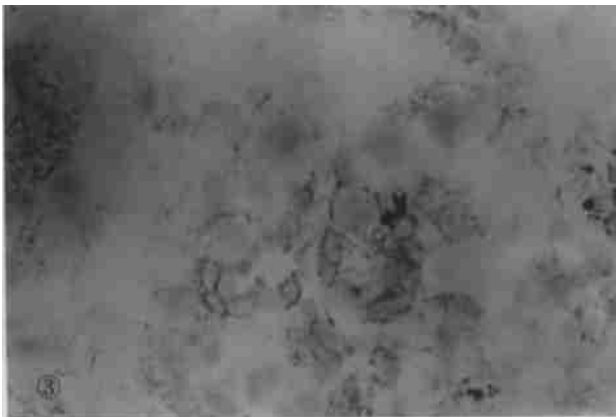


图 3 骨肉瘤 P-170 糖蛋白表达阳性

Fig. 3 Positive expression of P-170 glycoprotein in osteosarcoma

Brown granules in the cytoplasm (LSAB × 400)

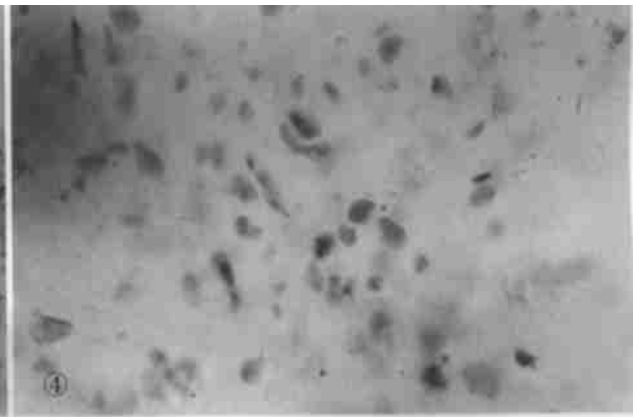


图 4 骨肉瘤 P-170 糖蛋白表达阴性

Fig. 4 Negative expression of P-170 glycoprotein in osteosarcoma

No granules in the cytoplasm (LSAB × 400)