



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.09.005

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201309896.pdf>

星状神经节阻滞对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡与 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

陈永权¹, 胡光祥², 付群¹, 金孝岷¹

(1. 安徽省皖南医学院第一附属医院麻醉科, 安徽 芜湖 241001; 2. 东莞市中医院麻醉科, 广东 东莞 523000)

[摘要] 目的: 研究自发性高血压大鼠 (SHR) 心肌细胞凋亡与 Bcl-1/Bax 蛋白表达的关系, 探讨星状神经节阻滞对 SHR 心肌细胞凋亡的保护作用。方法: 将 32 只 10 周龄雄性 SHR 随机分为 4 组 ($n=8$): 左侧星状神经节阻滞组 (LS 组)、右侧星状神经节阻滞组 (RS 组)、药物卡托普利组 (D 组)、手术对照组 (C 组)。用 ALC-NIBP 无创血压测量系统测定大鼠血压, 第 10 周实验结束后用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射 (45 mg/kg) 麻醉 SHR, 取出心脏用 TUNEL 法测定左室心肌细胞凋亡指数, 免疫组织化学检测心肌 Bcl-2 和 Bax 表达的含量。结果: 与 C 组和 LS 组比较, RS 组 SHR 凋亡指数明显降低 ($P<0.05$); 心肌 Bcl-2 表达明显增强 ($P<0.05$), Bax 表达明显减弱 ($P<0.05$), Bcl-2/Bax 比值增高 ($P<0.05$)。结论: Bcl-2 抗凋亡及 Bax 促凋亡蛋白表达参与 SHR 心肌细胞凋亡; 右侧星状神经节阻滞能够影响凋亡相关基因蛋白的表达, 降低心肌细胞凋亡指数, 减轻左心室肥厚。

[关键词] 神经阻滞; 星状神经节; 自发性高血压大鼠; 心肌细胞; 凋亡; Bcl-2; Bax

Effect of stellate ganglion block on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax protein in spontaneously hypertensive rats

CHEN Yongquan¹, HU Guangxiang², FU Qun¹, JIN Xiaoju¹(1. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241001;
2. Department of Anesthesiology, Dongguan Hospital of Chinese Medicine, Dongguan Guangdong 523000, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the relationship between apoptosis of myocardial cells in spontaneously hypertensive rats (SHRs) and the expressions of Bcl-2 and Bax protein, and the protective effect of stellate ganglion block on apoptosis of myocardial cells.

Methods: A total of 32 ten-week-old male SHRs were assigned randomly into 4 groups: a left stellate ganglion block group (group LS), a right stellate ganglion block group (group RS), a captopril group (group D) and a control group (group C). The arterial systolic blood pressure was

收稿日期 (Date of reception): 2012-10-17

作者简介 (Biography): 陈永权, 硕士, 主任医师, 副教授, 主要从事麻醉与应激方向的研究。

通信作者 (Corresponding author): 陈永权, Email: chenyc263@163.com

基金项目 (Foundation item): 安徽省教育厅自然科学基金项目 (KJ2009B041Z)。This work was supported by the foundation of Education Department of Anhui, P. R. China (KJ2009B041Z).

measured by ALC-NIBP system. After 10 weeks, all rats were anaesthetized by 3% pentobarbital sodium, cardiomyocyte apoptosis index of left ventricle was assessed by TUNEL, and the localization of myocardium Bcl-2, Bax was investigated by immunohistochemistry.

Results: Compared with group LS and C, the apoptotic index decreased ($P<0.05$). SHR myocardial expression of Bcl-2 significantly increased ($P<0.05$), Bax expression significantly decreased ($P<0.05$) and Bcl-2/Bax was significantly higher ($P<0.05$) in group RS.

Conclusion: Bcl-2 and Bax play an important role in the apoptosis of myocardial cells in SHRs. Right stellate ganglion block can reduce the apoptosis of myocardial cells and reverse the reconstruction of the left ventricle in SHRs via regulation of apoptosis-related gene proteins.

KEY WORDS

nerve block; stellate ganglion; spontaneously hypertensive rats; myocardial cell; apoptosis; Bcl-2; Bax

星状神经节阻滞(stellate ganglion block, SGB)对自发性高血压大鼠(SHR)高血压治疗除有效降压外,更重要的是逆转左心室肥厚和改善心肌间质纤维化^[1]。近年内发现心肌细胞凋亡在高血压心脏靶器官的不良重构中起重要作用。细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是由基因决定的生理性死亡。Bcl-2和bax基因是调节心肌细胞凋亡最为重要的基因^[2]。本研究拟通过星状神经节阻滞对SHR的血压进行干预,从细胞分子生物学水平来阐明对左心室重构的影响,旨在为临床应用提供理论依据。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

实验动物选用的32只10周龄雄性SPF级SHR(北京维通利华实验动物技术有限公司),分笼饲养,均食用高血压大鼠标准饲料,饲养温度控制在18~22℃,环境符合12 h昼夜循环。随机分为4组:左侧星状神经节阻滞组(LS组)、右侧星状神经节阻滞组(RS组)、卡托普利组(D组),手术对照组(C组),每组8只,用苦味酸按头、四肢等部位标记。

1.2 星状神经节阻滞模型建立

以3%戊巴比妥钠45 mg/kg腹腔内注射麻醉动物后,沿颈部正中纵行切开皮肤,钝性分开左右胸头肌,于食管旁暴露右侧颈动脉鞘,可见颈总动脉及伴行的迷走神经、交感神经及减压神经。沿食管旁向尾端方向寻找,于锁骨下动脉及椎动脉起始部,即可见1~2 mm大小,梭形或星形的淡黄色神经团,即星状神经节。

取硬膜外导管剪去头端侧孔,将其开口置于星状神经节处。并用硬膜外穿刺针将硬膜外导管的另一端自颈前向后引出。分别于硬膜外导管2, 1, 0.5 cm刻度处用1#丝线将其固定于头长肌和颈长肌上,用稀碘冲洗伤口,缝合切开,并用无菌纱布包扎。将动物置腹卧位,用1#丝线缝皮固定后颈部硬膜外导管,自硬膜外导管推注少量生理盐水试通畅后,硬膜外导管残端封闭。手术对照组仅手术暴露星状神经节,未埋置硬膜外导管。手术完毕,待动物苏醒,放回笼中,自由进食。术后3 d内用庆大霉素进行预防感染治疗。

饲养3 d后,硬膜外导管注射0.25%的布比卡因0.15 mL,每天2次,连续2周。去除硬膜外导管,卡托普利组:通过灌胃法,每天灌药1次,依据人和动物间接体表面积折算的等效剂量比率表,计算SHR给药量为2.68 mg/(200 g·d),大鼠每周称重1次,根据体质量调整用药量,卡托普利用药4周。

1.3 观察指标

1.3.1 心肌细胞凋亡率检测

采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)技术检测SHR左心室细胞凋亡。光镜下观察凋亡的心肌细胞核呈棕黄色。200倍镜下每张切片分别取5个不同视野计数凋亡心肌细胞与心肌细胞总数。心肌细胞凋亡指数(myocardial apoptosis index, MAI)按公式计算:MAI=凋亡心肌细胞核数/心肌细胞核总数×100%。

1.3.2 免疫组织化学检测心肌组织 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

严格按照试剂盒操作,以PBS代替一抗,染色结果阴性,作为阴性对照;用已知的阳性切片作阳性对照,心肌细胞膜与胞浆中Bcl-2及Bax染成棕黄色。应用彩色病理图文分析系统,分别测定

Bcl-2及Bax光密度值, 并计算Bcl-2/Bax比值。

1.4 统计学处理

采用SPSS11.0统计学软件进行分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 原位末端标记

TUNEL法检测4组SHR心肌组织细胞凋亡(图1)。心肌凋亡指数RS组和D组的凋亡指数明显低于

C组($P<0.05$), 其中RS组凋亡指数最低, RS组与LS组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。

2.2 心肌 Bcl-2 和 Bax 的表达

Bax 的吸光度值在RS组最低, 为0.194; LS组最高, 为0.269。Bcl-2的吸光度值在RS组最高, 为0.370; C组最低, 为0.307。LS组和C组的Bcl-2, Bax与RS组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); RS组Bcl-2/Bax的比值最高, LS组和C组的Bcl-2/Bax与RS组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$; 表1, 图2, 3)。

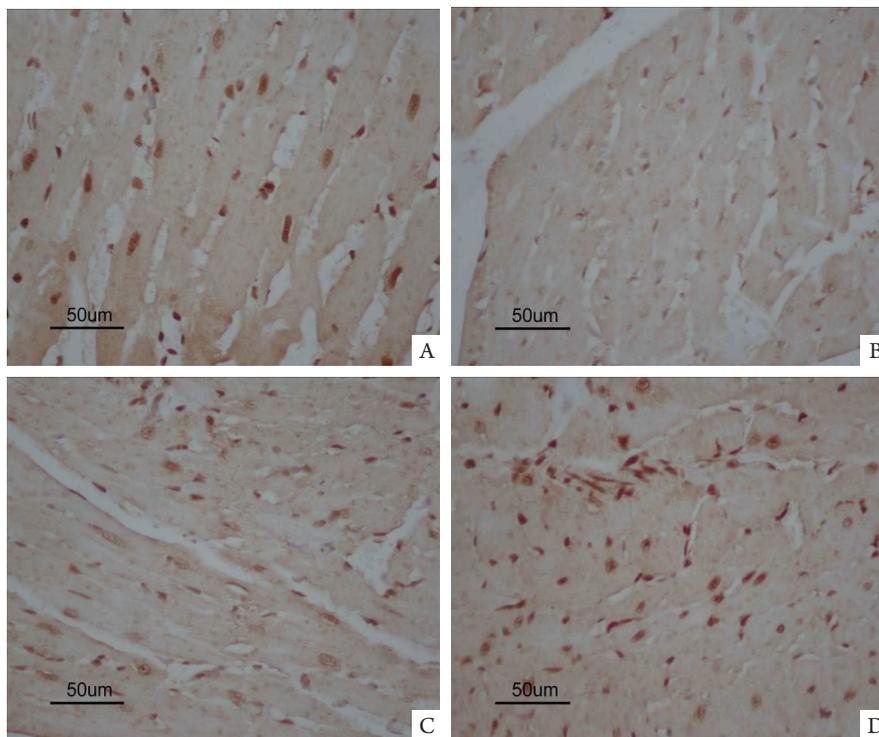


图1 心肌细胞凋亡结果(TUNEL, $\times 400$)。A: LS组; B: RS组; C: D组; D: C组。经TUNEL染色后凋亡细胞核呈棕褐色颗粒。C组和LS组凋亡细胞数明显增加, RS组和D组凋亡细胞数明显下降, 其中RS组下降更明显。

Figure 1 Results of cardiomyocyte apoptosis (TUNEL, $\times 400$). A: Group LS; B: Group RS; C: Group D; D: Group C. Apoptotic nuclei after TUNEL staining are brown particles. The number of apoptotic cells significantly increase in group C and LS, and significantly decrease in group RS and D, especially in group RS.

表1 四组 Bax, Bcl-2, Bcl-2/Bax及凋亡指数比较($n=8, \bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of Bax, Bcl-2, Bcl-2/Bax and apoptotic index in the 4 groups ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	凋亡指数/%
LS组	0.314 ± 0.047	0.269 ± 0.072	1.167 ± 0.042	6.375 ± 1.505
RS组	$0.370 \pm 0.098^{\Delta}$	$0.194 \pm 0.026^{\Delta}$	$1.907 \pm 0.084^{\Delta}$	$4.125 \pm 1.256^{\Delta}$
D组	0.323 ± 0.026	0.236 ± 0.054	1.369 ± 0.110	$5.125 \pm 2.100^*$
C组	0.307 ± 0.048	0.251 ± 0.061	1.223 ± 0.091	8.875 ± 2.232

与C组比较, $^*P<0.05$; 与LS组比较, $^{\Delta}P<0.05$ 。

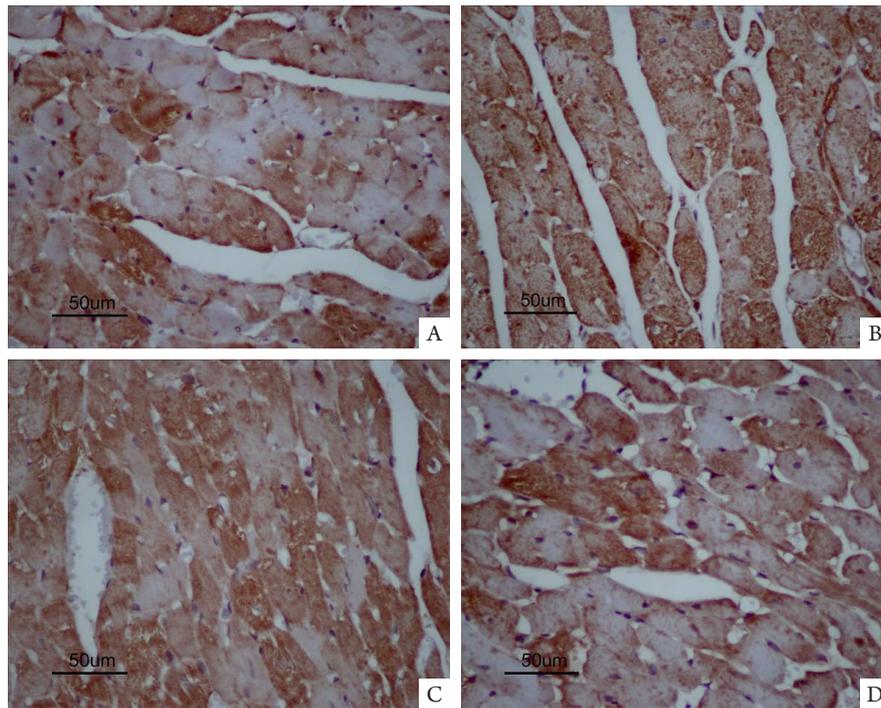


图2 心肌Bcl-2蛋白的表达(免疫组织化学, $\times 400$)。A: LS组; B: RS组; C: D组; D: C组。Bcl-2蛋白的表达主要聚集于细胞的胞浆中(呈棕黄色颗粒, 成片状或簇状分布)。RS组和D组阳性染色的胞质明显增多, 其中RS组增多更加明显。

Figure 2 Expression of Bcl-2 protein of myocardium (Immunohistochemistry, $\times 400$). A: Group LS; B: Group RS; C: Group D; D: Group C. Bcl-2 protein expression is mainly accumulated in the cytoplasm of cells (brown particles, a sheet or cluster distribution). The positive staining cytoplasm significantly increases in group RS and D, especially in group RS.

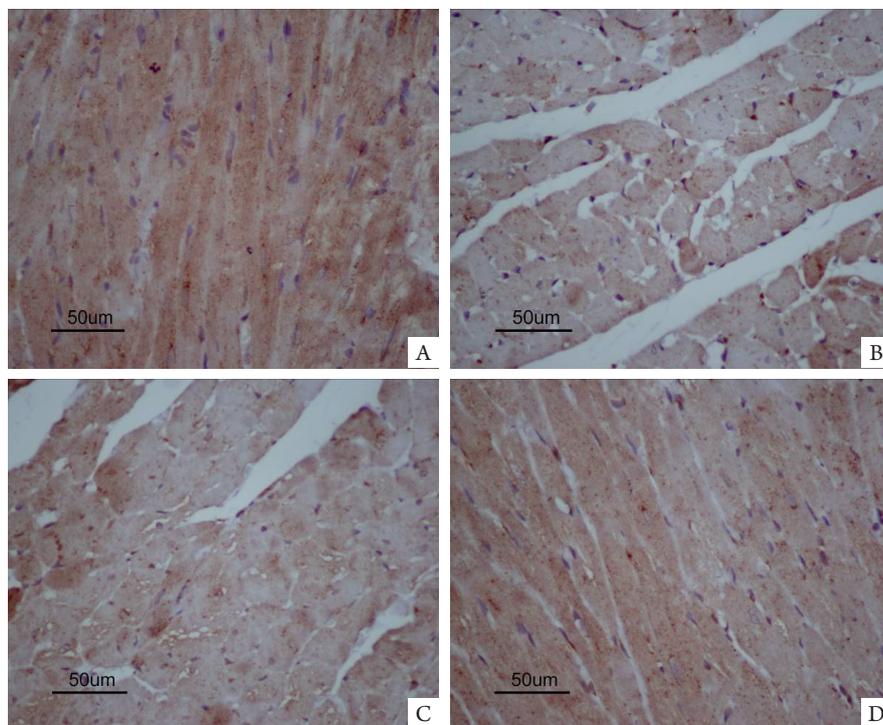


图3 心肌Bax蛋白的表达(免疫组织化学, $\times 400$)。A: LS组; B: RS组; C: D组; D: C组。Bax蛋白的表达主要聚集于细胞的胞浆中(呈棕黄色颗粒, 成片状或簇状分布)。RS组和D组阳性染色的胞质数明显减少, 其中RS组减少更明显。

Figure 3 Expression of Bax protein of myocardium (Immunohistochemistry, $\times 400$). A: Group LS; B: Group RS; C: Group D; D: Group C. Bax protein expression is mainly accumulated in the cytoplasm of cells (brown particles, a sheet or cluster distribution). The positive staining cytoplasm significantly decreases in group RS and D, especially in group RS.

3 讨论

细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育和维护内环境稳定, 由基因控制的细胞主动死亡过程, 是细胞衰老自然死亡的主要方式之一, 由于细胞凋亡受到严格的由遗传机制决定的程序性调控, 所以又称为程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)^[3]。在形态学上具有特殊表现, 细胞先收缩变圆, 核染色质浓缩聚集于核仁周围, 之后核仁碎裂, 细胞膜内陷将细胞分割成多个凋亡小体, 呈现独特的有别于细胞坏死的形态学和生物化学特点。细胞凋亡多发生于生理情况下, 部分病理刺激也可诱导凋亡^[4]。

Jeunemaitre等^[5]研究表明: 原发性高血压病的大鼠左心室细胞凋亡增加, 平滑肌细胞增生异常, 这是由于细胞增生和程序性细胞死亡失去平衡的结果。在某种程度上, 应用抗高血压药物正是通过加速细胞凋亡、抑制血管壁的过度增生来达到治疗的目的。对细胞凋亡的研究为治疗高血压病提出了新的思路, 即通过对细胞凋亡的调控, 使血管平滑肌细胞生长正常化和血管重构, 以达到治疗目的^[6]。国内外资料^[7-8]显示: 细胞凋亡所致心肌细胞丢失为高血压病心肌重构中的重要因素, 并有实验证明8~16周SHR细胞凋亡与心肌肥厚的严重程度平行。故本研究选择10周龄SHR大鼠, 来探讨星状神经节阻滞对其心肌凋亡及Bcl-2/Bax蛋白表达的影响。

细胞凋亡是广泛存在于生理和病理状态下的一个严格控制的有序的主动过程, 有一系列基因参与和调控及蛋白质合成, 是级联式基因表达的结果。已知有许多基因及无机离子等参与凋亡调控, 除bcl-2和Ced基因家族、p53抑癌基因及死亡受体家族外, 兴奋性氨基酸、自由基、血小板凝集因子(PAF)及Ca²⁺等亦参与凋亡过程^[9], 其中bcl-2是对凋亡起极重要调节作用的家族^[10-11]。Bcl-2和bax基因作为bcl-2家族的两个重要代表, 其作用相互拮抗, bcl-2抑制细胞凋亡, bax则促进细胞凋亡。Bcl-2和bax共同决定细胞是否进入凋亡程序, 两者表达的变化对细胞的命运起决定作用^[11-12]。

本实验研究显示: 心肌凋亡指数右侧星状神经节阻滞组和卡托普利组的凋亡指数明显低与对照组($P<0.05$), 其中右侧星状神经节阻滞组凋亡指数最低, 右侧星状神经节阻滞组与左侧星状神经节阻滞组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。Bax的吸光度值在右侧星状神经节阻滞组最低, 左侧星状神经节阻滞组最高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 右侧星状神经节阻滞组与对照组比较,

差异有统计学意义($P<0.05$)。Bcl-2的吸光度值在右侧星状神经节阻滞组最高, 对照组最低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 右侧星状神经节阻滞组与左侧星状神经节阻滞组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。同时右侧星状神经节阻滞组Bcl-2/Bax的比值最高。显示右侧星状神经节阻滞能够降低Bax, 升高Bcl-2, 升高Bcl-2/Bax的比值。右侧星状神经节引起心肌细胞凋亡减少, 其主要作用机制为降压, 减轻左心室肥厚, 从而保护心脏, 其次可能与其能明显增加心肌血流速度及血流量, 抑制交感神经系统活性, 降低血浆儿茶酚胺浓度有关。

综上所述, 右侧星状神经节阻滞能够降低SHR血压, 减轻左心室肥厚, 可能与降低心肌细胞凋亡, 升高心肌细胞Bcl-2, 降低Bax蛋白的表达有关, 但如何引起凋亡相关基因Bcl-2和Bax蛋白表达的变化, 尚有待进一步的深入研究。

参考文献

1. 陈永权, 胡光祥, 付群, 等. 星状神经节阻滞对自发性高血压大鼠左心室重构的影响[J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(1): 43-47. CHEN Yongquan, HU Guangxiang, FU Qun, et al. Effects of stellate ganglion block on the left ventricular reconstruction in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2013, 38(1): 43-47.
2. Abbate A, Narula J. Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling[J]. Heart Fail Clin, 2012, 8(1): 79-86.
3. Yi CH, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Integration of apoptosis and metabolism[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011, 76(11): 375-387.
4. Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, et al. The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942(1): 157-183.
5. Jeunemaitre X. Genetics of the human renin angiotensin system[J]. J Mol Med, 2008, 86(6): 637-641.
6. Tian B, Liu J, Bitterman PB, et al. Mechanisms of cytokine induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(5): 1958-1967.
7. 高利霞, 夏军, 王立平. 细胞凋亡与原发性高血压关系的研究进展[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(13): 3036-3037. GAO Lixia, XIA Jun, WANG Liping. Progress in research of essential hypertension and apoptosis[J]. Chinese Journal of Misdiagnostics, 2009, 9(13): 3036-3037.
8. Cuspidi C, Vaccarella A, Negri F, et al. Resistant hypertension and left ventricular hypertrophy: an overview[J]. J Am Soc Hypertens, 2010, 4(6): 319-324.

9. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8): 1378-1386.
10. Hardwick JM, Chen YB, Jonas EA. Multipolar functions of Bcl-2 proteins link energetics to apoptosis[J]. Trends Cell Biol, 2012, 22(6): 318-328.
11. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. Dev Cell, 2011, 21(1): 92-101.
12. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8): 1378-1386.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 陈永权, 胡光祥, 付群, 金孝炬. 星状神经节阻滞对自发性高血压大鼠心肌细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, 38(9): 896-901. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.09.005

Cite this article as: CHEN Yongquan, HU Guangxiang, FU Qun, JIN Xiaojie. Effect of stellate ganglion block on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax protein in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2013, 38(9): 896-901. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.09.005

本刊常用词汇英文缩写表

从2012年第1期开始, 本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用缩写, 即首次出现时可不标注中文。

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	纤连蛋白	FN
Toll 样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心电图	ECG
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	心脏监护病房	CCU
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC 法	血管紧张素 II	Ang II
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管内皮生长因子	VEGF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC 法	血管性血友病因子	vWF
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血红蛋白	Hb
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP 法	绿色荧光蛋白	GFP	血肌酐	Scr
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血尿素氮	BUN
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血小板	PLT
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血压	BP
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素 / 脂多糖	LPS	血氧饱和度	SO ₂
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	严重急性呼吸综合征	SARS
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮	NO
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	一氧化氮合酶	NOS
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙酰胆碱	ACh
二甲亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒	HBV
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	异硫氰酸荧光素	FLTC
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MIT	原位末端标记法	TUNEL
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	杂合性缺失	LOH
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	增强化学发光法	ECL
环氧化酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	肿瘤坏死因子	TNF
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	重症监护病房	ICU
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	转化生长因子	TGF
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	自然杀伤细胞	NK 细胞
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	Tbil
计算机 X 线断层照相技术	CT				