

· 实验研究 ·

## 钙信号因子在缺氧缺水缺食致心脏损伤中作用\*

冯新星<sup>1,2</sup>, 王丽峰<sup>1</sup>, 林仲武<sup>1</sup>, 高亚兵<sup>1</sup>, 左红艳<sup>1</sup>, 徐新萍<sup>1</sup>, 李杨<sup>1</sup>, 王水明<sup>1</sup>, 彭瑞云<sup>1</sup>, 王德文<sup>1</sup>

**摘要:**目的 在观察 10% 缺氧复合缺水缺食对心脏结构和功能影响的基础上, 探讨  $Ca^{2+}$  信号传导相关因子在其中的作用。方法 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、缺氧组、缺水组、缺食组、缺氧缺水组、缺氧缺水缺食组[置于常压低氧舱(10% 氧浓度)并禁食水], 于第 1、3、5、7 天, 采用全自动血生化仪检测血清代谢酶改变, 透射电镜观察心脏超微结构改变, 采用免疫组化检测心肌钙调素和磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)表达变化。结果 10% 缺氧缺水缺食后 7 d, 大鼠血清乳酸脱氢酶[(1628.40 ± 460.8) U/L]和谷草转氨酶[(394.60 ± 187.18) U/L]活性明显高于对照组[分别为(578.40 ± 135.04)、(136.40 ± 14.59) U/L]; 心肌细胞核型不整, 染色质边集, 核周间隙增宽, 线粒体肿胀空化或代偿性增加, Z 线紊乱甚至溶解, 肌浆网轻度扩张; 心肌肌膜肿胀, 呈指状突起; 间质细胞和血管内皮细胞退变或凋亡; 心肌细胞胞浆钙调素(4.22 ± 0.84)与心肌细胞核磷酸化 CREB 表达(3.57 ± 0.55)明显高于对照组[分别为(0.73 ± 0.41)、(0.90 ± 0.41)]。结论 10% 缺氧复合缺水缺食可引起大鼠心脏结构和功能损伤, 其机制可能与  $Ca^{2+}$  信号通路激活(钙调素和磷酸化 CREB 表达增加)有关。

**关键词:** 缺氧缺水缺食; 大鼠; 心肌; 钙调素; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)

中图分类号: R 541 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2014)06-0740-03 DOI: 10.11847/zgggws2014-30-06-13

## Role of $Ca^{2+}$ cell signaling molecules in cardiac injury induced by hypoxia combined with water and dietary depletion in rats

FENG Xin-xing\*, WANG Li-feng, LIN Zhong-wu, et al (\* Department of Experimental Pathology, Institute of Radiation and Radiation Medicine, Chinese Academy of Military Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of  $Ca^{2+}$  cell signaling molecules in cardiac injury caused by 10% hypoxia combined with water and dietary depletion in rats. **Methods** Eighty Wistar rats were randomly divided into a control group, hypoxia group, food and water depletion group, and hypoxia combined with water and food depletion group. The rats with hypoxia were placed in a normbaric chamber with the air containing 10% oxygen. Biochemical methods were adopted to observe the changes of serum metabolic enzymes and transmission electron microscope was used to detect the change of cardiac ultrastructure and immunohistochemistry to detect the expressions of calmodulin (CaM) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein (CREB) at 1st, 3rd, 5th and 7th day of the experiment in the rats. **Results** At 7th day of the experiment, the serum lactic dehydrogenase (LDH) (1628.40 ± 460.8 U/L) and aspartate aminotransferase (AST) (394.60 ± 187.18 U/L) increased in the rats of hypoxia combined with water and food depletion compared to those of the control group (578.40 ± 135.04 and 136.40 ± 14.59 U/L); the myocardial cells presented irregular shape nucleus, marginated chromatin, increased perinuclear space, swelled mitochondria, increased empty or compensatory mitochondria, Z lines derangement even dissolution, sarcoplasmic reticulum mild dilation and sarcolemma swelling with finger-like processes; in addition, degeneration or apoptosis of interstitial cells and vascular endothelial cells were also observed. The expressions of CaM (4.22 ± 0.84) in the cytoplasm of myocardial cells were increased and those of phosphorylated CREB (3.57 ± 0.55) in the nucleus were increased at 7th day in the rats of hypoxia combined with water and food depletion group compared to those of the control group (CaM: 0.73 ± 0.41, CREB: 0.90 ± 0.41). **Conclusion** Hypoxia (10% oxygen) combined with water and food depletion might result in damages of structure and function of cardiac cells and the activation of  $Ca^{2+}$  cell signaling transduction (increased expression of CaM and phosphorylated CREB) may play an important role in the damages.

**Key words:** hypoxia combined with water and food depletion; rat; myocardium; CaM; CREB

近年地震、海啸等自然灾害的频繁发生造成人员掩埋, 尤其深埋条件下, 可能面临缺氧缺水缺食等情况。在缺氧缺水缺食情况下, 心脏结构和功能的改变是影响甚至决定其生命耐受力的关键因素之一。研究表明, 10% 缺氧复合缺水缺食可引起心肌

细胞凋亡, 血清激素和细胞因子的异常改变以及凋亡相关因子 bax、bcl-2、细胞色素 C 和 caspase-3 参与其损伤过程<sup>[1-3]</sup>。为进一步明确缺氧缺水缺食损伤效应及其机制, 本研究通过观察 10% 缺氧复合缺水缺食对大鼠心脏结构和功能影响, 探讨  $Ca^{2+}$  信号

\* 基金项目: 国家“709”科技专项(2006FK130006)

作者单位: 1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所实验病理学研究室, 北京 100850; 2. 中国医学科学院北京协和医学院阜外心血管病医院

作者简介: 冯新星(1979-), 男, 山西方山人, 主治医师, 硕士, 主要从事心血管和内分泌疾病研究。

通讯作者: 王德文, E-mail: wangdewen1938@126.com; 彭瑞云, E-mail: pengry@nic.cmi.ac.cn

数字出版日期: 2014-4-16 16:36

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140416.1636.007.html>

转导相关因子在其中的作用,结果报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 Leica 显微镜(德国 Leica 公司),透射电镜(日本 Hitachi 公司)。鼠抗钙调素 IgG 和兔抗磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB) IgG(美国 Santa cruz 公司),生物素化羊抗鼠或羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(horseradish peroxidase-streptavidin, HRP-SA)(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验动物与分组 清洁级 Wistar 大鼠 80 只,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,由军事医学科学院实验动物中心提供并统一饲养,许可证号:SCXK-(军)2007-004。将大鼠随机分为 4 组,即对照组、缺氧组、缺水组、缺氧缺水组,每组 20 只。低氧模拟装置由本课题组设计并研制,为常压低氧,调整舱内氧浓度,使成 10% 氧含量,将缺氧组、缺水组、缺氧缺水组动物置于该常压低氧舱内,其中缺氧组常规饮食和饮水,缺水组大鼠同时禁食和水,对照组和缺水组置舱外正常环境中,对照组常规饮食和饮水,缺水组动物禁食和水。

### 1.3 指标与方法

1.3.1 心脏功能指标检测 各组动物于分组处理后第 1、3、5、7 天,各时间点每组随机取 5 只动物,经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,抽取静脉血 5 mL,采用全自动生化分析仪检测血清中谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST),乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)和肌酸激酶(creatine kinase, CK)活性。

1.3.2 心脏超微结构观察 取分组处理后第 1、7 天心脏组织乳头肌 1 mm × 1 mm × 1 mm, 2.5% 戊二醛固定,1% 锇酸固定,梯度乙醇和丙酮脱水,包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察。

1.3.3 大鼠心脏 Ca<sup>2+</sup> 信号转导相关因子检测 采用免疫组织化学法,分别于分组处理后第 1、3、5、7 天取心脏组织(n = 5),用 10% 福尔马林固定 1 周后,常规梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋和切片,脱蜡至水,加入鼠抗钙调素(CaM)或兔抗磷酸化 CREB IgG(1:200),37 °C 1 h,4 °C 过夜;再分别加入生物素化羊抗鼠或羊抗兔 IgG 和 HRP-SA,37 °C 1 h;加抗体前均用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 5 min × 3 次;二氨基联苯胺显色;苏木素复染核,脱水,透明,中性树脂封固。阳性结果呈棕黄色,位于细胞浆或细胞核,苏木素复染胞核呈淡蓝色。

1.4 统计分析 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用统计软件 SPSS 11.0 进行 2 × 2 析因设计的方差分析,P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 缺氧缺水缺食条件下大鼠血清生化指标改变(表 1) 与对照组比较,第 1 天,缺氧组、缺氧缺水组大鼠血清 LDH 浓度降低(P < 0.05),第 7 天,缺水组、缺氧缺水组大鼠血清 LDH 浓度升高(P < 0.01)。第 1 天,缺氧缺水组大鼠血清 AST 和 CK 浓度明显下降(P < 0.01),第 7 天,缺氧缺水组血清 AST 浓度升高(P < 0.05)。

表 1 10% 缺氧缺水缺食后大鼠血清生化指标变化(U/L,  $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

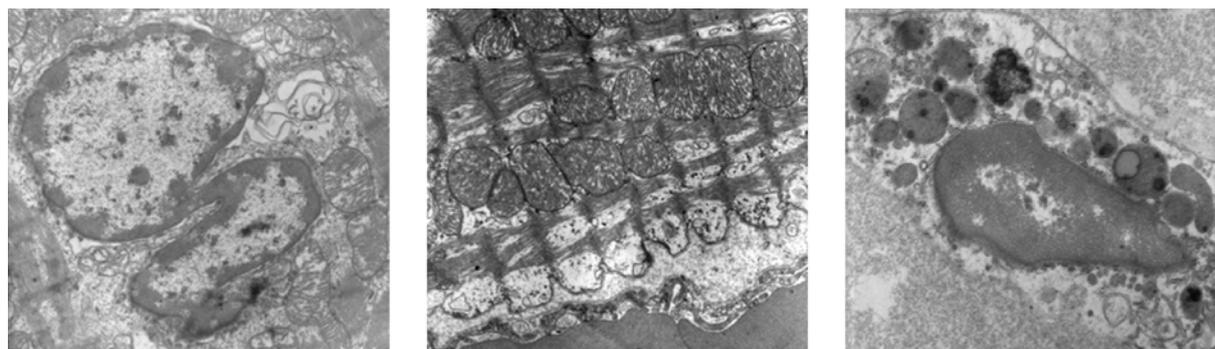
组别	LDH		AST		CK	
	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天
对照组	2 006.20 ± 68.01	578.40 ± 135.04	169.40 ± 5.32	136.40 ± 14.59	689.40 ± 54.15	578.40 ± 135.04
缺氧组	1 143.80 ± 378.01 <sup>a</sup>	809.40 ± 282.75	116.40 ± 17.52 <sup>b</sup>	158.60 ± 20.48	489.60 ± 194.59	809.40 ± 282.75
缺水组	1 968.80 ± 205.30 <sup>c</sup>	1 473.00 ± 409.46 <sup>ac</sup>	170.20 ± 15.64 <sup>d</sup>	224.20 ± 83.42	679.80 ± 85.33	509.60 ± 173.80
缺氧缺水组	608.40 ± 157.38 <sup>ade</sup>	1 628.40 ± 460.80 <sup>ac</sup>	93.60 ± 4.56 <sup>ae</sup>	394.60 ± 187.18 <sup>acc</sup>	276.00 ± 43.40 <sup>ae</sup>	666.20 ± 189.64

注:与对照组比较,a P < 0.01, b P < 0.05;与缺氧组比较,c P < 0.01, d P < 0.05;与缺水组比较,e P < 0.01。

2.2 缺氧缺水缺食条件下大鼠心脏超微结构改变(图 1) 电镜观察结果显示,缺氧缺水缺食 7 天时,大鼠心肌细胞核型不整,染色质边集,核周间隙增宽(图 1A);线粒体肿胀空化或代偿性增加,Z 线紊乱甚至溶解,肌浆网轻度扩张;心肌肌膜肿胀,呈指状突起(图 1B);间质细胞和血管内皮细胞退变或凋亡(图 1C)。与缺氧缺水缺食组比较,缺氧组和缺水组大鼠心肌病变程度明显较轻。

2.3 缺氧缺水缺食条件下大鼠心肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 信号转导相关因子改变(表 2) 对照组心肌细胞胞浆中

CaM 呈棕黄色弱阳性表达,胞核中磷酸化 CREB 呈棕黄色弱阳性表达。第 1~7 天,缺氧缺水缺食组大鼠心肌细胞中 CaM 表达增加(P < 0.05),于第 3 天达高峰,此时缺氧缺水缺食组 CaM 表达明显高于缺氧组;第 7 天时,缺氧组和缺氧缺水缺食组 CaM 表达明显高于缺水组。第 3~7 天,缺氧缺水缺食组大鼠心肌细胞中磷酸化 CREB 表达明显增加(P < 0.01);第 3 天时,缺氧缺水缺食组 CREB 表达明显高于缺氧组和缺水组;第 7 天时,缺水缺食组和缺氧缺水缺食组 CREB 表达高于缺氧组。



注:A:核染色质边集、心肌细胞双核;B:肌膜肿胀,呈指状突起,肌原纤维溶解;C:间质细胞退变、凋亡,次级溶酶体增多。

图 1 缺氧缺水缺血 7 d 大鼠心脏结构改变(×15000)

表 2 10% 缺氧缺水缺血后大鼠心肌细胞 CaM 和磷酸化 CREB 表达变化( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

分组	CaM		磷酸化 CREB	
	第 1 天	第 7 天	第 1 天	第 7 天
对照组	0.73 ± 0.41	0.73 ± 0.41	0.90 ± 0.41	0.90 ± 0.41
缺氧组	6.93 ± 2.69 <sup>a</sup>	4.68 ± 0.72 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.74 <sup>a</sup>	2.23 ± 1.00 <sup>a</sup>
缺水缺血组	5.88 ± 0.72 <sup>a</sup>	2.97 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.96 ± 0.15 <sup>b</sup>	3.22 ± 0.54 <sup>ac</sup>
缺氧缺水缺血组	4.45 ± 0.64 <sup>a</sup>	4.22 ± 0.84 <sup>ad</sup>	1.39 ± 0.61 <sup>b</sup>	3.57 ± 0.55 <sup>ac</sup>

注:与对照组比较, a  $P < 0.01$ ; 与缺氧组比较, b  $P < 0.01$ , c  $P < 0.05$ ; 与缺水缺血组比较, d  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

研究表明,10% 缺氧复合缺水缺血可引起心肌纤维排列紊乱、心肌细胞结构损伤、间质细胞水肿、毛细血管淤血<sup>[1-3]</sup>。心肌损伤后心肌酶释放入血,因此心肌酶谱是观察心肌损伤的重要指标,其中包括 LDH、AST、CK 及其同工酶<sup>[4]</sup>。本研究结果表明,缺氧复合缺水缺血后,大鼠心肌酶谱异常,表现为血清中 LDH、AST 明显高于对照组,且随缺氧缺水缺血时间延长而增加,提示大鼠心脏功能出现损伤,并呈进行性加重,其损伤程度明显重于缺氧和缺水缺血组。

钙调素(CaM)是一种钙依赖性调节蛋白,在钙离子存在下,形成 Ca<sup>2+</sup> - CaM 复合物而发挥生理作用<sup>[5]</sup>。CREB 作为 DNA 结合转录因子,可被蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和 Ca<sup>2+</sup> - 钙调素激酶家族等磷酸化,磷酸化 CREB 激活相关基因的转录,调节 c - fos、jun - b、bcl - 2 等的表达<sup>[6-8]</sup>。已有研究表明,在缺氧、心肌肥厚、心律失常、房颤等疾病模型中,大鼠心肌细胞 CaM 蛋白和 mRNA 表达增加,且随着房颤时间延长,其表达增多<sup>[9-10]</sup>。研究发现,在心肌肥厚模型中,压力超负荷时心肌细胞内 CaM 被激活,核转录因子 CREB 磷酸化增加,抗凋亡基因 bcl - 2 表达下调<sup>[11]</sup>。但关于缺氧复合缺水缺血后心肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 信号转导相关因子改变研究较少。本研究结果显示,缺氧缺水缺血 1 ~ 7 d 时,大鼠心肌细胞 CaM 表达增加,3 ~ 7 d 时磷酸化 CREB 表达明显增加。提示,缺氧缺水缺血后大鼠心肌肌浆网

扩张、钙超载,进一步激活 Ca<sup>2+</sup> 信号转导通路,促使 CREB 磷酸化,影响下游基因(bcl - 2)转录,最终促进心肌细胞损伤。

### 参考文献

- [1] 王丽峰,林仲武,高亚兵,等. 缺氧缺水缺血后大鼠心脏结构及血液激素和细胞因子的变化[J]. 解放军预防医学杂志, 2012,30(6):412 - 415.
- [2] 林仲武,王丽峰,高亚兵,等. 凋亡因子在缺氧缺水缺血致心脏损伤中作用[J]. 中国公共卫生,2011,27(10):1259 - 1262.
- [3] 于瑜,左红艳,王德文,等. 失血复合缺氧缺水缺血诱导心肌细胞凋亡及其调控机制研究[J]. 中国体视学与图像分析, 2011,16(3):275 - 281.
- [4] 周知子. 心肌酶谱水平与新生儿缺氧缺血性脑病及窒息后脑损伤相关性研究[J]. 中外医学研究,2012,10(34):5 - 6.
- [5] Rosa AO, Movafagh S, Cleemann L, et al. Hypoxic regulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channel: possible role of haem oxygenase [J]. J Physiol, 2012, 590 (Pt17): 4223 - 4237.
- [6] Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, et al. Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation [J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(3): 445 - 453.
- [7] Morimoto D, Yoshida D, Noha M, et al. Phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) as a marker of hypoxia in pituitary adenoma [J]. J Neurooncol, 2006, 79(2): 143 - 150.
- [8] Li C, Tian J, Li G, et al. Asperosaponin VI protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt and CREB pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1 - 3): 100 - 107.
- [9] 周琪,肖颖彬,刘健,等. 心肌细胞钙调素 I 介导的 bcl - 2 转录调节在大鼠心肌肥厚中的作用 [J]. 生理学报, 2005, 57(6): 731 - 736.
- [10] 赵鹏军,潘骏,李奋,等. 慢性缺氧对幼鼠心肌 CaM、CaMK II 及细胞内 Ca<sup>2+</sup> 活动的影响 [J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(3): 381 - 385.
- [11] 周琪,肖颖彬,刘健,等. 心肌细胞钙调素 I 和 CREB 磷酸化在压力负荷大鼠心肌肥厚中的作用 [J]. 高血压杂志, 2006, 14(1): 52 - 56.