

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.06.002
文章编号: 1005-8982(2020)06-0009-05

星状神经节阻滞对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响*

郑建滨¹, 黄娟珍¹, 吴加富¹, 冯小玲¹, 陈鹭²

(1. 福建医科大学附属宁德市医院 麻醉科, 福建 宁德 352100; 2. 福建医科大学附属第一医院 麻醉科, 福建 福州 350000)

摘要: 目的 探讨星状神经节阻滞(SGB)对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡、PI3K/Akt信号通路表达的影响及其相关机制的研究。**方法** 复制心力衰竭雄性大鼠, 8周龄, 共18只, 随机分为SGB组、对照组和假手术组。其中SGB组予以0.1%利多卡因阻滞右侧星状神经节, 对照组予以0.9%生理盐水注射至右侧星状神经节部位, 假手术组仅切开皮肤至星状神经节暴露而不予阻滞, 神经阻滞2周后处死大鼠, 取出心脏, 酶联免疫吸附试验检测各组心肌组织内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平, Western blotting检测各组心肌组织中PI3K、Akt和Caspase-3蛋白的表达, TUNEL检测各组大鼠心肌组织中细胞凋亡情况。**结果** SGB组TNF- α 、IL-1 β 水平较对照组和假手术组低($P < 0.05$); SGB组PI3K、Akt蛋白相对表达量较对照组和假手术组高($P < 0.05$), Caspase-3蛋白相对表达量较对照组和假手术组低($P < 0.05$); SGB组高倍镜视野下TUNEL染色平均阳性数较对照组和假手术组少($P < 0.05$)。**结论** SGB能显著抑制心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡, 其主要机制在于增强PI3K/Akt信号通路表达, 从而保护心脏功能。

关键词: 自主神经传导阻滞; 星状神经节; 心力衰竭

中图分类号: R745

文献标识码: A

Effect of stellate ganglion block on cardiomyocyte apoptosis and expression of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac failure rats*

Jian-bin Zheng¹, Juan-zhen Huang¹, Jia-fu Wu¹, Xiao-ling Feng¹, Lu Chen²

(1. Department of Anesthesiology, Ningde Hospital, Fujian Medical University, Ningde, Fujian 352100, China; 2. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between apoptosis of myocardial cells in cardiac failure rats and the expressions of PI3K/Akt signaling pathway, and to discuss the relevant mechanism. **Methods** A total of 18 eight-week-old male cardiac failure rats were randomly divided into stellate ganglion block group, control group and sham operation group, 6 rats in each group. Rats in the stellate ganglion block group were given the right stellate ganglion blocking by 0.1% lidocaine intraperitoneal injection, the control group was given the right stellate ganglion blocking by 0.9% normal saline injection and the sham operation group were just only exposed the stellate ganglion without treatment. After 2 weeks of stellate ganglion blocking, all the animals were killed and heart tissue was been retrieved. The level of TNF- α and IL-1 β in the myocardial tissue were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The critical protein PI3K, Akt and Caspase-3 in apoptotic signaling pathway were analyzed by

收稿日期: 2019-09-28

* 基金项目: 福建省卫生和计划生育委员会青年科研课题(No: 2016431); 福建医科大学苗圃科研基金(No: 2015MP028)

[通信作者] 黄娟珍, E-mail: 248237681@qq.com; Tel: 0593-2058556

Western blotting, and cell apoptosis in myocardial tissue were detected by TUNEL staining. **Results** Compared with the control group and sham operation group, stellate ganglion block can significantly reduce the concentration of TNF- α and IL-1 β in the myocardial tissue ($P < 0.05$); compared with the control group and sham operation group, the relative expression levels of PI3K and Akt proteins of myocardial tissue were obviously increased in stellate ganglion block group ($P < 0.05$), and the relative expression levels of Caspase-3 were decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group and sham operation group, myocardium cell apoptosis was significantly decreased in the stellate ganglion block group ($P < 0.05$). **Conclusions** Stellate ganglion block can significantly inhibit the myocardium cell apoptosis in cardiac failure rats. This anti-apoptosis effect is related to the up-regulation of the PI3K/Akt signaling pathway, that help to protect the cardiac function.

Keywords: autonomic nerve block; stellate ganglion; cardiac failure

心力衰竭是由于心脏结构或功能异常导致心室充盈或射血能力受损的临床综合征,属于心血管疾病的终末阶段。随着中国居民平均寿命增加,心力衰竭发病率也逐年提高,统计资料显示,我国心力衰竭患病率为 0.9%,患者已达 1 000 万,居世界首位^[1]。几乎所有的心血管疾病最终都会导致心力衰竭,心肌梗死、心肌病、血流动力学负荷过重及炎症等原因引起的心肌损伤,均可造成心肌结构和功能的变化,最后导致心室泵血和/或充盈功能低下^[2]。细胞凋亡是基因调控下的一种自发性程序化细胞死亡,细胞凋亡可能是心力衰竭发病机制的重要环节之一。心力衰竭患者存在明显的心肌细胞凋亡过度,伴微血管稀少,小血管平滑肌重塑,血管细胞凋亡现象^[3]。如何终止或扭转心力衰竭细胞凋亡进程已成为改善患者预后的关键。星状神经节阻滞(stellate ganglion block, SGB)是将局部麻醉药物注射在星状神经节组织内从而阻滞交感神经,进而维持机体内环境的稳定,纠正植物神经失调^[4]。本研究探索 SGB 对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响,旨在研究 SGB 对心力衰竭细胞凋亡的影响及其作用机制,为临床治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 18 只,8 周龄,体重 200 ~ 250 g,动物许可证号:SCXK(沪)2008-0016,购自上海斯莱克实验动物技术有限公司,60 只大鼠分为 SGB 组、假手术组和对照组,每组 6 只。

1.2 试剂与仪器

酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒和蛋白提取试剂盒均购自南京凯基生物科技有限公司,兔抗大鼠多克隆 PI3K、Akt 及

Caspase-3 抗体均购自英国 Abcom 公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 Sigma 公司,兔抗大鼠 β -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,ELISA 检测试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司,蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 心力衰竭大鼠模型复制

参考国外文献[5],采用腹主动脉狭窄法复制心力衰竭大鼠模型。腹腔内注射 50 mg/kg 戊巴比妥麻醉成功后,取正中切口逐层开腹,打开后腹膜,探及腹主动脉,取右肾动脉上方的腹主动脉一段,钝性分离后与 7 号针头合并结扎,取出针头,制造 0.7 mm 直径的残腔,逐层缝合关闭切口,继续饲养。腹主动脉结扎可造成心脏后负荷过重,从而导致慢性心力衰竭,实验至少需 8 周才能观察到心室重构。

1.4 实验动物分组

心力衰竭大鼠模型复制成功后,SGB 组腹腔内注射戊巴比妥 50 mg/kg 以麻醉大鼠,选择右侧食管旁入路,消毒,切开皮肤组织暴露右侧颈动脉鞘,探及颈总动脉、迷走神经和伴行的交感神经,沿食管向下游离,于锁骨下动脉及椎动脉起始部,可见淡黄色星状神经节,约 1 ~ 2 mm 大小,呈梭形或星形分布。植入硬膜外穿刺针至星状神经节分布处,牵引硬膜外导管的另一端自颈前向后引出,逐层关闭切口,固定硬膜外导管至皮肤,处理 3 d 后经硬膜外导管注入 1% 利多卡因 0.2 ml,2 次/d,连续 2 周;假手术组仅切开皮肤暴露至星状神经节,然后直接缝合切口;对照组未予以任何处理。

1.5 ELISA 检测心肌组织内 TNF- α 和 IL-1 β 的表达

连续给药 2 周后,处死动物,取出各组心肌组

织,组织匀浆,稀释待测样品和标准品至合适浓度,按 $100\mu\text{l}$ /孔加入到酶标板中, 4°C 过夜。TNF- α 和IL-1 β 抗体用稀释液稀释至工作浓度后,加入每孔中, $100\mu\text{l}$ /孔,于 37°C 环境下放置于湿盒45 min。洗板3次。加入亲和素过氧化物酶复合物工作液 $100\mu\text{l}$, 37°C 反应30 min,依次加入TMB显色液, 37°C 避光反应30 min,加入 $50\mu\text{l}$ 终止液,用ELISA检测仪于450 nm波长处测定吸光度值。

1.6 Western blotting 检测凋亡蛋白PI3K、Akt及Caspase-3的表达

SGB处理2周后,获取大鼠心肌组织,蛋白提取试剂盒收集细胞蛋白,测定蛋白浓度,取样品蛋白对靶蛋白PI3K、Akt及Caspase-3表达水平进行检测。每个样品蛋白提取物为 $20\mu\text{g}$,120 V恒流电源下利用10% SDS-PAGE分离胶分离样品蛋白1 h,80 V直流电转硝酸纤维素膜2 h,2%牛血清蛋白封闭1 h,剪膜,于 4°C 环境下加入1:100~1:500稀释兔抗大鼠PI3K、Akt、Bcl-2、Bax及Caspase-9多克隆抗体孵育过夜,加入1:1000稀释HRP标记羊抗兔IgG抗体,室温孵育30 min,显色系统中显色定影,分析杂交条带。

1.7 心肌组织学观察

获取大鼠心肌组织行HE染色。 95% 乙醇固定20 min,PBS洗涤2次,1 min/次。苏木精染色2 min,自来水洗涤。镜下观察,若细胞核染色过深,用1%盐酸酒精溶液分色数秒,自来水洗涤。浸入伊红染液染色1 min,自来水洗涤。自然晾干细胞爬片后,中性树脂封片,放置显微镜下观察。

1.8 TUNEL 检测心肌细胞凋亡

连续给药2周后,处死大鼠,取出各组心脏组织,4%多聚甲醛固定、包埋,石蜡切片脱蜡,含0.2% Triton X-100的PBS缓冲液破膜10 min,生理盐水清洗3次,加入 $50\mu\text{l}$ TUNEL检测液,室温避光孵育1 h,PBS清洗3次,1% DAPI染核60 s,PBS清洗3次。基因组DNA断裂时,在脱氧核苷酸转移酶催化下,将荧光素标记的脱氧三磷酸尿苷标记到3'-OH末端,从而可通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测,本研究使用异硫氰酸荧光素对阳性凋亡细胞进行标记,荧光显微镜下观察。

1.9 统计学方法

数据分析采用SPSS 19.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用方差分析,进一

步的两两比较用LSD- t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心肌组织内炎症因子水平比较

各组TNF- α 、IL-1 β 水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$),SGB组较对照组和假手术组低($P<0.05$)。见表1。

表1 各组TNF- α 、IL-1 β 水平比较
($n=6$, pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β
SGB组	73.1 \pm 9.75	55.8 \pm 13.07
对照组	189.2 \pm 21.38	142.8 \pm 36.55
假手术组	178.6 \pm 19.54	155.4 \pm 30.47
F值	40.001	11.250
P值	0.000	0.009

2.2 各组PI3K、Akt及Caspase-3蛋白相对表达量比较

各组PI3K、Akt及Caspase-3蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$),SGB组PI3K、Akt蛋白相对表达量较对照组和假手术组高($P<0.05$),Caspase-3蛋白相对表达量较对照组和假手术组低($P<0.05$)。见图1和表2。

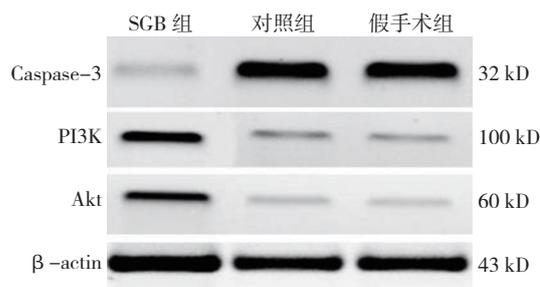


图1 各组PI3K、Akt及Caspase-3蛋白的表达

表2 各组PI3K、Akt及Caspase-3蛋白相对表达量比较
($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	PI3K	Akt	Caspase-3
SGB组	0.398 \pm 0.086	0.277 \pm 0.079	0.039 \pm 0.009
对照组	0.065 \pm 0.007	0.036 \pm 0.005	0.945 \pm 0.105
假手术组	0.051 \pm 0.007	0.026 \pm 0.004	0.931 \pm 0.112
F值	34.890	28.092	121.042
P值	0.000	0.001	0.000

2.3 各组心肌细胞形态及凋亡细胞比较

各组 HE 染色结果显示, SGB 组心肌细胞排列规则整齐, 而对照组和假手术组心肌细胞空泡化, 细胞间隙明显, 部分细胞溶解。见图 2。

在荧光显微镜下凋亡细胞呈绿色荧光散在分布,

连续给药 2 周后, SGB 组、对照组和假手术组高倍镜视野下 TUNEL 染色平均阳性数分别为 (17 ± 2) 、 (65 ± 5) 和 (63 ± 4) 个, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=147.467, P=0.000$), SGB 组较对照组和假手术组少 ($P<0.05$)。见图 2。

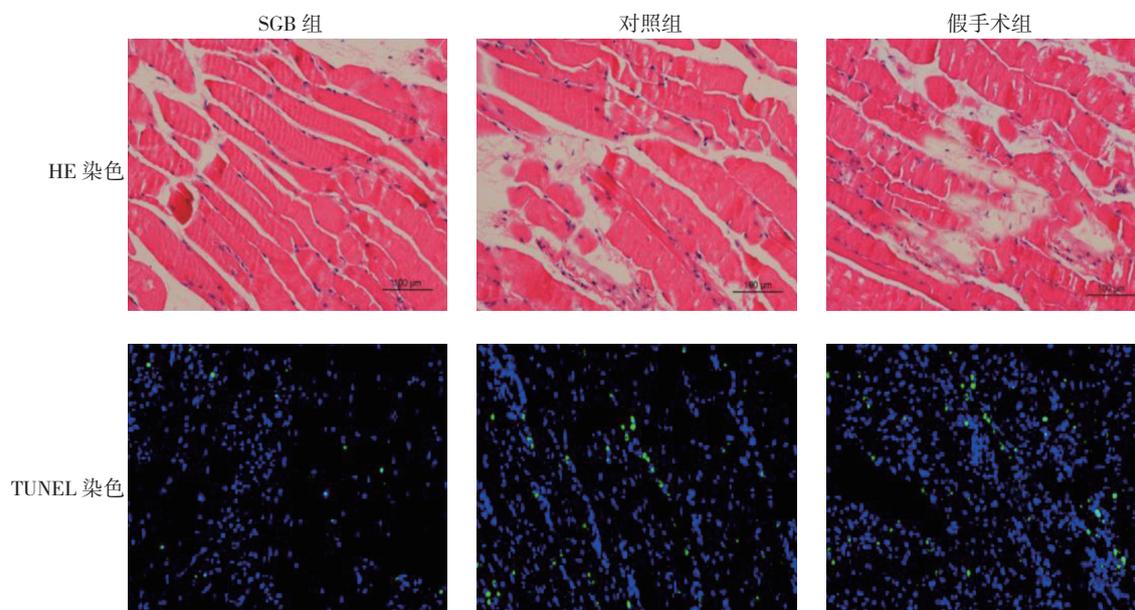


图 2 各组心肌组织 HE 和 TUNEL 染色病理切片 ($\times 100$)

3 讨论

人星状神经节主要由第 6、7 颈部节与第 1 胸神经节融合而成, 形状不规则, 呈卵圆形, 长约 2 cm, 宽约 1 cm。而本研究采用 SD 大鼠, 其星状神经节相对人类小得多, 大小 1 ~ 2 mm。节后纤维广泛分布于 $C_3 \sim T_{12}$ 节段的皮肤区域, 在功能上属于交感神经节。SGB 涉及植物神经系统、内分泌系统和免疫系统, SGB 有助于维持机体内环境的稳定性, 改善机体植物神经失调状态。值得注意的是, 心力衰竭患者交感神经兴奋性升高, 而星状神经节组织能显著降低心血管交感神经反射, 调节心血管系统植物神经功能, 从而降低心脏前后负荷, 保护心肌细胞。

心力衰竭属于心功能不全的失代偿阶段, 炎症反应和细胞凋亡是心肌细胞功能障碍的病理基础^[6]。有研究表明心力衰竭时, 心肌细胞固缩, 形成凋亡小体, 凋亡指数可达 35.5%^[7]。本研究通过对 SGB 治疗后心肌组织学观察和相关凋亡蛋白的分析, 探讨 SGB 诱导的心肌细胞保护机制。在众多炎症细胞因子中, 起主要作用的是 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 及 $IL-8$ 等。

$TNF-\alpha$ 主要由巨噬细胞和单核细胞产生, 具有强大促炎作用, 能刺激中性粒细胞、T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞的趋化, 造成器官功能损伤^[8]。 $IL-1\beta$ 是一种致炎细胞因子, 广泛参与人体组织破坏、水肿形成等多个病理损伤过程^[9-10]。本研究结果证实, 与假手术组和对照组相比, SGB 组心肌组织内炎症因子水平显著降低, 表明 SGB 具有强烈的抑制炎症反应作用, 从而有效保护心肌细胞。

心力衰竭发生、发展过程中出现的一些病理因素, 如氧化应激、负荷过重、细胞因子、钙稳态失衡及线粒体功能失常等, 都可诱导心肌细胞凋亡^[11]。凋亡包括内源性线粒体细胞色素释放途径和外源性死亡受体途径, Caspase-3 是凋亡信号通路传导的最终凋亡执行分子, 而 Caspase-8 是外源性凋亡途径的执行者, Caspase-9 是内源性凋亡途径的执行者^[12]。鉴于 Caspase-3 蛋白在凋亡信号通路中守门人的角色, 笔者检测 SGB 干扰后心力衰竭心肌组织中 Caspase-3 蛋白的表达, SGB 组 Caspase-3 蛋白相对表达量较对照组和假手术组显著降低, 这表明 SGB 组细胞凋亡活

性被明显抑制。PI3K/Akt信号通路是目前研究较为透彻的一种经典细胞信号传导路径,其功能失调常见于心血管疾病等。PI3K是细胞内重要的信号传导分子,PI3K可被生长因子、细胞因子和激素等细胞外信号刺激激活^[13]。PI3K激活可使膜磷酸肌醇磷酸化,催化激活下游信号分子Akt。Akt是细胞存活的主要调节因子,通过直接抑制促凋亡蛋白或抑制转录因子产生的促凋亡信号实现调节作用^[14]。与假手术组和对照组相比,SGB组可诱导心力衰竭心肌组织中PI3K和Akt蛋白表达升高,表明SGB主要通过影响PI3K/Akt通路,导致下游凋亡信号传递受阻,从而发挥抗凋亡作用。因此,笔者推测SGB抗炎症反应和抗细胞凋亡作用可能是心力衰竭大鼠心肌细胞保护作用的关键因素。

参 考 文 献:

- [1] 杨杰孚,王华,柴珂. 2018中国心力衰竭诊断和治疗指南亮点[J]. 中国心血管病研究, 2018, 16(12): 1057-1060.
- [2] CHAPMAN B, DEVORE A D, MENTZ R J, et al. Clinical profiles in acute heart failure: an urgent need for a new approach[J]. ESC Heart Failure, 2019, 6(3): 464-474.
- [3] WANG F, JIA J, RODRIGUES B. Autophagy, metabolic disease, and pathogenesis of heart dysfunction[J]. Canadian Journal of Cardiology, 2017, 33(7): 850-859.
- [4] SUMMERS M R, NEVIN R L. Stellate ganglion block in the treatment of post-traumatic stress disorder: a review of historical and recent literature[J]. Pain Practice, 2017, 17(4): 546-553.
- [5] REYES D R A, GOMES M J, ROSA C M, et al. Exercise during transition from compensated left ventricular hypertrophy to heart failure in aortic stenosis rats[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(2): 1235-1245.
- [6] 杨杰孚,王华. 心力衰竭的过去、现在及未来[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(8): 688-692.
- [7] YAO Y, LU Q, HU Z, et al. A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 133.
- [8] MANTLE J L, LEE K H. A differentiating neural stem cell-derived astrocytic population mitigates the inflammatory effects of TNF- α and IL-6 in an iPSC-based blood-brain barrier model[J]. Neurobiology of Disease, 2018, 119: 113-120.
- [9] TAKADA Y K, YU J, FUJITA M, et al. Direct binding to integrins and loss of disulfide linkage in interleukin-1 β (IL-1 β) are involved in the agonistic action of IL-1 β [J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(49): 20067-20075.
- [10] MANGONI A A, ZINELLU A, SOTGIA S, et al. Protective effects of methotrexate against proatherosclerotic cytokines: a review of the evidence[J]. Mediators of Inflammation, 2017, 2017(9): DOI: 10.1155/2017/9632846.
- [11] GOLDSMITH S R. Arginine vasopressin antagonism in heart failure: current status and possible new directions[J]. J Cardiol, 2019, 74(1): 49-52.
- [12] MAN N, TAN Y, SUN X J, et al. Caspase-3 controls AML1-ETO-driven leukemogenesis via autophagy modulation in a ULK1-dependent manner[J]. Blood, 2017, 129(20): 2782-2792.
- [13] LIU S T, HUI G, MATHIS C, et al. The current status and future role of the phosphoinositide 3 kinase/akt signaling pathway in urothelial cancer: an old pathway in the new immunotherapy era[J]. Clinical Genitourinary Cancer, 2018, 16(2): e269.
- [14] MENG S, JIAN Z, YAN X, et al. LncRNA SNHG6 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via the PI3K/AKT/mTOR pathway in colorectal cancer[J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 20(3): 2541-2548.

(李科 编辑)

本文引用格式: 郑建滨,黄娟珍,吴加富,等. 星状神经节阻滞对心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及PI3K/Akt信号通路的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(6): 9-13.