

## 细胞周期蛋白 A2 在大鼠急性心肌梗死后心肌细胞的表达

胡圣大, 李拥军\*, 马根山, 鄢高亮, 姚玉宇

(东南大学附属中大医院心内科, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的:探讨急性心肌梗死后梗死区周围心肌细胞内细胞周期蛋白 A2(cyclin A2)的表达。方法:制作 SD 大鼠急性心肌梗死模型,分别于梗死后 3d、1 周、2 周、3 周、4 周各处死 5 只大鼠,5 只假手术大鼠为对照,取出心脏组织,进行 Masson 染色,同时使用免疫组织化学法检测心脏组织中 cyclin A2 及磷酸化组蛋白 H3(phospho-histone H3, H3P)的表达。结果:Masson 染色从病理上证明心肌梗死模型构建成功;梗死区周围心肌细胞 cyclin A2 的表达在梗死后 1 周时最高,阳性细胞染色百分比为  $(7.72 \pm 1.16)\%$ ,2 周后逐渐下降,梗死后 4 周时,与假手术组相似,几乎无阳性表达。梗死后第 3 天、1 周、2 周和 3 周均可见少量心肌细胞核表达 H3P,其阳性率为 1.56%~3.12%。结论:心肌细胞 cyclin A2 的阳性表达提示急性心肌梗死后梗死区周围少部分心肌细胞能重新进入有丝分裂周期。

**[关键词]** 细胞周期蛋白 A2; 急性心肌梗死

**[中图分类号]** R329.25

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-918-05

## The expression of cyclin A2 in rat cardiac myocytes after acute myocardial infarction

HU Sheng-da, LI Yong-jun\*, MA Gen-shan, YAN Gao-liang, YAO Yu-yu

(Department of Cardiology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of cyclin A2 in rat cardiac myocytes after acute myocardial infarction (AMI). **Methods:** The total 30 adult male SD rats were randomly divided into 6 groups averagely, sham-operated group and other 5 AMI groups, 3d, 1w, 2w, 3w and 4w after AMI. The expressions of cyclin A2 and phospho-histone H3 (H3P) were detected by immunohistochemistry in each group. **Results:** Compared with sham-operated group, the number of cyclin A2 positive myocytes increased remarkably after AMI, but decreased 2 weeks later gradually. And after 4 weeks after AMI, there was no difference in cyclin A2 expression in heart tissue between AMI group and the sham-operated group. In each group H3P expression increased remarkably at 3d, 1w, 2w, 3w after AMI in nucleus of some myocytes. The positive expression rate of H3P was 1.56% to 3.12% in heart tissue after AMI. **Conclusion:** The expression of cyclin A2 and H3P indicates that some adult cardiac myocytes can reenter cell cycle after AMI.

**[Key words]** cyclin A2; acute myocardial infarction

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 918-922]

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是临床常见的心血管急症。AMI 后绝大多数患者会逐渐出现慢性心力衰竭症状,严重影响生活质量,并缩短寿命。其根本原因是 AMI 导致大量心肌细胞坏死,并逐渐为纤维结缔组织所代替,并发生心肌重构。若心肌梗死后能够及时补充足够的心肌细胞以代偿坏死的心肌细胞,则有可能避免梗死后心衰的发生。目前心肌梗死后心肌细胞的替代治疗成为

研究的热点之一<sup>[1-7]</sup>,主要有骨髓间充质干细胞、心肌干细胞等干细胞替代治疗,但仍存在宿主对外源细胞产生免疫反应、移植细胞向心肌细胞转化不明或与宿主心肌细胞电偶联的建立尚未明确、或自体干细胞数量不足等缺陷。因此,有学者将研究的目光聚集于梗死区周围的心肌细胞,设想使其实现自身增殖来避免前述缺陷。

传统观念认为成年心肌细胞已丧失分裂增殖能力,然而 Beltrami 等<sup>[8]</sup>观察 AMI 致死患者的心肌组织,发现梗死周围有相当数量的心肌细胞处于核分裂的中期阶段,表现出活跃的细胞分裂增殖现象。Hina 等<sup>[9]</sup>将含有细胞周期蛋白 A2(cyclin A2)基

**[基金项目]** 中华医学会临床医学科研专项资金(09010140169)

\*通讯作者, E-mail: leeyongj@gmail.com

因的质粒转染大鼠,发现 cyclin A2 基因可使“沉默”的心肌细胞重新进行有丝分裂。随后 Woo 等<sup>[10]</sup>通过转基因技术使在体心肌细胞高表达 cyclin A2 后,梗死区周围的心肌细胞出现了显著的增殖活动,心功能也得到明显改善。

本研究观察大鼠 AMI 后心肌细胞 cyclin A2 的表达,以探讨梗死区周围心肌细胞是否能够重新进行有丝分裂。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物选用 180~230 g 雄性 SD 大鼠,购自浙江省实验动物中心。一抗兔抗大鼠 cyclin A2 抗体(ab-7956,美国 Abcam 公司)和兔抗大鼠磷酸化组蛋白 H3(phospho-histone H3, H3P)抗体(sc-8656,美国 Santa Cruz 公司),二抗为羊抗兔抗体(武汉博士德),DAB 显色试剂盒(武汉博士德),Masson 染色试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 建立大鼠心肌梗死模型

开胸结扎大鼠前降支制作前壁心肌梗死模型。腹腔注射 8%的水合氯醛,每 100 g 体重注 0.4 ml,麻醉起效后,大鼠仰卧位固定,备皮及消毒皮肤,颈部正中切开皮肤分离出气管,然后气管插管接小动物呼吸机,呼吸频率 60 bpm,潮气量每 100 g 体重 3~4 ml。于左侧 4、5 肋间作切口,打开胸腔并撕开心包膜,暴露心脏,左心耳偏右下方 2~3 mm 以 6-0 丝线结扎前降支,关闭胸腔缝合肌肉皮肤,术后小动物心超(vevo770,加拿大 Visual Sonics 公司)证实心肌梗死建模成功,假手术组暴露心脏后仅以 6-0 丝线在上述部位穿过 1 次,并不结扎。术后继续喂养。

#### 1.2.2 实验动物分组

30 只雄性 SD 大鼠,5 只作为假手术组,其余 25 只均为心肌梗死组,按梗死后 3 d、1 周、2 周、3 周、4 周 5 个时间点分为 5 组,每组 5 只梗死大鼠。

#### 1.2.3 心肌组织切片与染色

建模后 3 d 处死梗死组 5 只及假手术组 5 只,再分别于术后 1 周、2 周、3 周、4 周各处死 5 只梗死组大鼠。采用断头法处死,取出心脏标本置于中性福尔马林中固定,制作 5  $\mu$ m 厚石蜡切片,用于 Masson 染色及免疫组化染色。

Masson 染色用于区分胶原纤维(蓝色)和心肌纤维(红色),可以从病理上进一步证明心肌梗死。

切片脱蜡后按说明书步骤染色。

免疫组化染色检测 cyclin A2 和 H3P 的表达,切片脱蜡后高压热修复,然后按说明书滴加抗体及着色剂,并用苏木素复染细胞核。另用一张切片以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗制作空白对照片,细胞核显黄褐色为阳性结果,即表达 cyclin A2 或 H3P。

#### 1.2.4 心肌细胞 cyclin A2 和 H3P 表达的计数

心肌细胞 cyclin A2 和 H3P 的表达情况以每计数 100 个细胞核,其阳性染色的百分比表示。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析及 LSD-*t* 法进行两两比较, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 超声心动图及 Masson 染色均证明心肌梗死模型建立

术后 3 d 超声心动图显示假手术组心脏室壁活动无异常,而梗死组大鼠心室前壁几乎不运动(图 1A、B),梗死组射血分数(ejection fraction, EF)值为(36.36  $\pm$  6.61)%,较假手术组(77.66  $\pm$  8.73)%显著下降( $P < 0.001$ ),心肌梗死组梗死区与非梗死区交界组织 Masson 染色结果见图 1C。

### 2.2 心肌细胞 cyclin A2 的表达

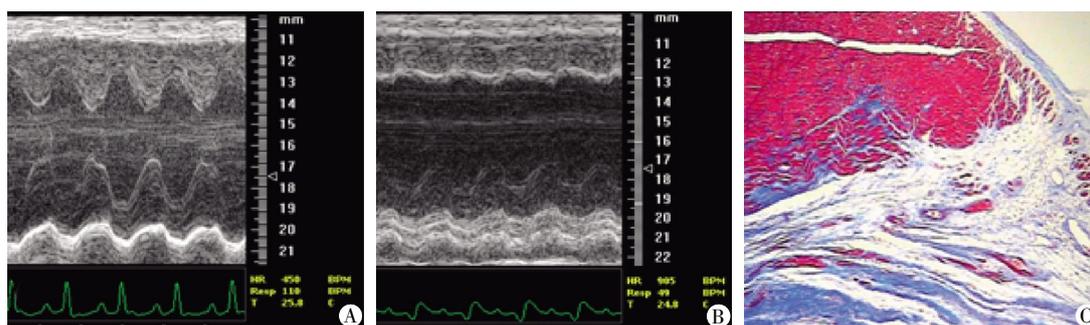
AMI 后 3 d、1 周、2 周时 cyclin A2 的表达显著增高,1 周时达峰,3 组间相比较无显著性差异,但与 AMI 后 3 周、4 周以及假手术组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 1,图 2),AMI 2 周后 cyclin A2 表达水平迅速下降,至第 4 周时,其表达水平与假手术组相比较已无统计学差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 心肌细胞 H3P 的表达

各组心肌细胞 H3P 的表达(图 3),其趋势与 cyclin A2 相似。心肌梗死后 3 d、1 周、2 周和 3 周均可见少量心肌细胞核表达 H3P,其阳性率 1.56%至 3.12%,至梗死后 4 周时已与假手术组相似,难以发现 H3P 的阳性表达。

## 3 讨论

cyclin A2 在哺乳动物细胞的有丝分裂过程中发挥着重要作用:首先它与周期蛋白依赖激酶 2(cdk2)结合调控细胞从 G<sub>1</sub>/S 期进入 DNA 合成期(S 期);然后与 cdk1 和 cdk2 结合控制细胞从 G<sub>2</sub>/M 期



A:假手术组超声心动图; B:梗死组超声心动图,梗死组较假手术组心脏前壁活动明显减弱(梗死 3 d 后);C:Masson 染色,红色为心肌纤维,蓝色为梗死区胶原纤维染色(梗死 2 周后)。

图 1 超声心动图和 Masson 染色鉴定心肌梗死模型的建立

Figure 1 The rat model of myocardial infarction identified by echocardiogram and Masson staining of heart tissue

表 1 心肌细胞 cyclin A2 的表达情况

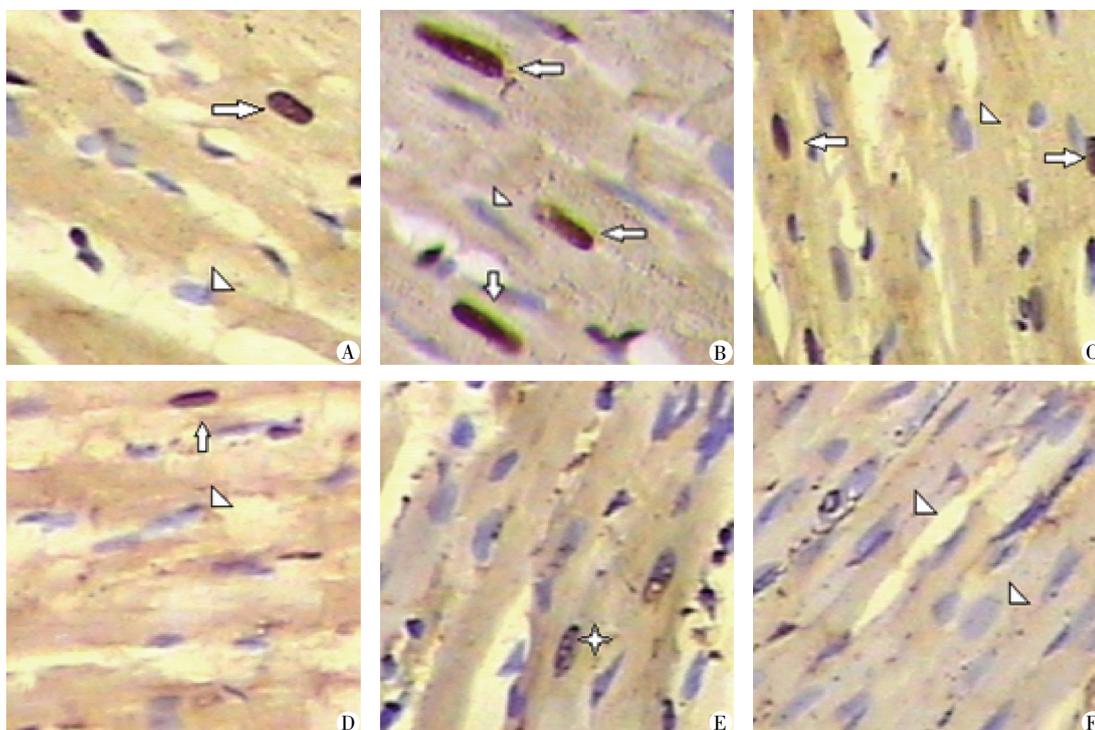
Table 1 The expression of cyclin A2 in cardiac myocytes (%)

组别	cyclin A2 阳性细胞
梗死组	
梗死后 3 d	6.88 ± 1.61 <sup>*#Δ</sup>
梗死后 1 周	7.72 ± 1.16 <sup>*#Δ</sup>
梗死后 2 周	7.20 ± 1.18 <sup>*#Δ</sup>
梗死后 3 周	3.50 ± 1.29 <sup>*Δ</sup>
梗死后 4 周	0.50 ± 0.20 <sup>#</sup>
假手术组	0.49 ± 0.01

与假手术组比较,<sup>\*</sup>*P* < 0.01;与梗死后 3 周比较,<sup>#</sup>*P* < 0.05;与梗死后 4 周比较,<sup>Δ</sup>*P* < 0.01。

进入有丝分裂期<sup>[11]</sup>。cyclin A2 也是唯一同时调节 G<sub>1</sub>/S 和 G<sub>2</sub>/M 两个时期转变的关键周期蛋白,同时促进 DNA 的合成<sup>[11]</sup>。在大鼠和人的心脏中,它是唯一出生后不久即完全沉默的周期蛋白<sup>[12]</sup>,cyclin A2 的出现被认为是细胞重新进入有丝分裂周期的主要标志之一。已有研究表明成年哺乳动物心肌细胞并非完全不可分裂,在心肌梗死后,梗死灶周围的少数心肌细胞仍可以重新分裂增殖<sup>[6,13]</sup>。

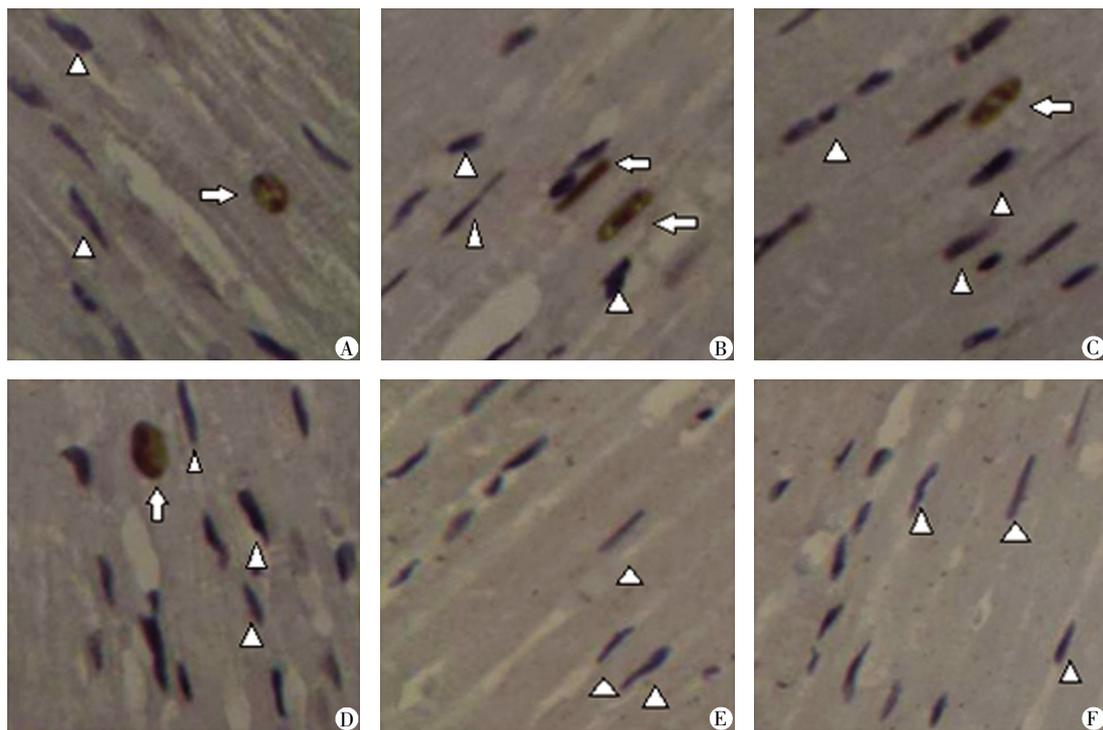
本研究发现心肌梗死后早期(2 周内),梗死区周围组织中少量心肌细胞,其细胞核内 cyclin A2 的表达有了明显的提高,并在梗死后 1 周左右表达达



白色箭头表示阳性细胞核,三角形表示阴性细胞核,浅褐色区为心肌纤维,星号为可疑阳性。A~E:分别是心肌梗死后 3 d、1 周、2 周、3 周和 4 周心肌细胞核中 cyclin A2 代表性表达;F:假手术组。E、F 组几乎无阳性表达。

图 2 心肌细胞 cyclin A2 的表达(× 200)

Figure 2 The expression of cyclin A2 in cardiac myocytes(× 200)



白色箭头表示阳性细胞核,三角形表示阴性细胞核,浅褐色区为心肌纤维。A~E:分别是心肌梗死后 3 d、1 周、2 周、3 周和 4 周代表性表达;F:假手术组。E、F 组未见阳性表达。

图 3 心肌细胞 H3P 的表达( $\times 200$ )

Figure 3 The expression of H3P in cardiac myocytes( $\times 200$ )

到峰值,虽然占心肌细胞总数的比例较小,最高也仅有 $(7.72 \pm 1.16)\%$ ,但较基础状态(无心肌梗死的假手术组)已具有显著的增加。推测急性心肌梗死后引发的一系列病理生理反应:物理方面,如细胞受力情况的改变,对细胞骨架蛋白的影响;化学方面,如梗死后释放的各种细胞因子、激素等各种因素的协同作用下,梗死区周围心肌组织较之正常心脏已出现较为活跃的细胞周期活动。

H3P 是检测心肌细胞进行有丝分裂的可靠指标<sup>[14-16]</sup>,本实验中发现心肌梗死后的一定时间(3 周)内梗死区周围心肌细胞核内出现 H3P 的阳性表达,表明部分心肌细胞进行了有丝分裂活动。事实上,梗死区周围心肌细胞分裂增殖活动早已有报道<sup>[6]</sup>,从而推翻了心肌细胞是终末细胞、不能再进行分裂增殖的传统观念。推测其是机体自身的一种代偿反应,但由于心肌细胞属于一种分化程度相对较高的细胞,其自身分裂能力很弱,加之梗死后各因素协同刺激及时间、空间上的局限,故仅有少量的心肌细胞成功分裂,最终并没有形成较强的代偿能力。

综上所述,本研究发现急性心肌梗死后梗死周边区部分心肌细胞 cyclin A2 出现显著的表达,表明部分心肌细胞进入了细胞分裂周期,同时 H3P 的表

达也证明了部分心肌细胞进行了有丝分裂活动。本研究的观察结果进一步证明了心肌细胞并非是完全不可分裂的终末细胞,在一定的条件下心肌细胞仍可再进入细胞周期进行分裂。这为心肌梗死的治疗及其他由于心肌细胞坏死、心肌重构所致的心脏疾病的治疗提供了新的思路。然而,心肌梗死后重新进入细胞周期进行有丝分裂的细胞是如何启动细胞分裂周期、受何种因素的影响与调控等问题仍需进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration[J]. *Cell*, 2003, 114(6):763-776
- [2] Li YX, Qu JB, Shelat H, et al. Clusterin induces CXCR4 expression and migration of cardiac progenitor cells[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(20):3435-3442
- [3] Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, et al. Myocardial regeneration therapy for heart failure hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty[J]. *Circulation*, 2002, 105(21):2556-2561
- [4] Olaf B, Ratan DB, Samuel B, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Science*, 2009, 324(3):98-102

- [5] Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury [J]. *Nat Med*, 2007, 13(8):970-974
- [6] Mias C, Lairez O, Trouche E, et al. Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction[J]. *Stem Cell*, 2009, 27(11): 2734-2743
- [7] Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO), initial results of a randomised phase 1 trial [J]. *Lancet*, 2011, 378(9806):1847-1857
- [8] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(23): 1750-1757
- [9] Hina WC, Nurin HD, Tang HY, et al. Cyclin A2 mediates cardiomyocyte mitosis in the postmitotic myocardium[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 35858-35866
- [10] Woo YJ, Panlilio CM, Cheng RK, et al. Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure[J]. *Circulation*, 2006, 114(1 Suppl): I206-I213
- [11] Li JM, Poolman RA, Brooks G. Role of G1 phase cyclins and cyclin-dependent kinases during cardiomyocyte hypertrophic growth in rats [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(3 pt 2): H814-H822
- [12] Yoshizumi M, Lee WS, Hsieh CM, et al. Disappearance of cyclin A correlates with permanent withdrawal of cardiomyocytes from the cell cycle in human and rat hearts [J]. *J Clin Invest*, 1995, 95(5): 2275-2280
- [13] Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart[J]. *Circ Res*, 1998, 83(1): 1-14
- [14] Engel FB, Schebesta M, Duong MT, et al. P38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(10): 1175-1187
- [15] Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, et al. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice [J]. *Circ Res*, 2005, 96(1): 110-118
- [16] 邸菁, 张凌志, 柏树令. 磷酸化组蛋白 H3—检测心肌细胞有丝分裂指数的可靠标志 [J]. *解剖学报*, 2008, 39(2): 272-274

[收稿日期] 2012-02-21

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
 审理情况。