

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.19.016

胶原纤维、NCAM1 和 RUNX1 在心肌桥供血心肌的表达*

马英¹, 刘云^{2△}, 唐任宽³

(1. 川北医学院附属医院神经内科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院法医学系, 四川南充 637000; 3. 重庆医科大学法医学教研室 400016)

摘要:目的 探讨胶原纤维、神经细胞黏附分子 1(NCAM1)和 Runt 相关转录因子 1(RUNX1)在心肌桥(MB)供血心肌的表达情况。**方法** 用 Massion's 染色检测胶原纤维在主动脉粥样硬化 MB 供血心肌(A 组)、动脉粥样硬化 MB 供血心肌(B 组)、冠状动脉粥样硬化心脏病心肌(C 组)、非心源性即刻死亡心肌中的(作为对照组, D 组)分布;免疫组化检测 NCAM1 在上述心肌的表达情况;Western bolt 检测其转录因子 RUNX1 的表达水平。**结果** Massion's 染色显示 B、C 组心肌间质有较多胶原纤维,部分心肌坏死,形成纤维瘢痕;A、D 组心肌间质几乎无胶原纤维。NCAM1 在 B 组心肌表达呈阳性,呈棕黄或棕褐色,主要在细胞质及细胞膜表达;C 组瘢痕灶附近心肌细胞膜及细胞质中呈阳性;A 组和 D 组心肌表达呈弱阳性或阴性。NCAM1 在 A、D 组供血心肌表达与 B、C 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western bolt 检测 RUNX1 亦有相似的表达。**结论** MB 存在动脉粥样硬化将导致慢性心肌缺血。

关键词:心肌桥;供血心肌;胶原纤维;神经细胞黏附分子 1;Runt 相关转录因子 1

中图分类号:R541.4

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)19-2443-03

The expression of collagen fibers, NCAM1 and RUNX1 in blood-supply myocardium of myocardial bridge*

Ma Ying¹, Liu Yun^{2△}, Tang Renkuan³

(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 3. Department of Forensic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the express of collagen fibers, NCAM1 and RUNX1 in blood-supply myocardium of myocardial bridge(MB). **Methods** The Massion's staining were conducted to reveal the morphology of collagen fibers in blood-supply myocardium among MB without atherosclerosis(group A), MB with atherosclerosis(group B), coronary artery disease(group C), and non-cardiogenic instantly death(group D). The expression level of NCAM1 and RUNX1 were detected among four groups using immunohistochemistry(IHC) and Western bolt, respectively. **Results** There were a lot of collagen fibers in myocardium interstitial substance and/or heart muscle necrosis between group B and C, but not almost collagen fibers between group A and D. The expression of NCAM1 was positive in group B, and mainly expressed on the cytoplasm and membranes of cardiac myocytes by IHC. group C was similar to results in vicinal myocardium with myocardial scar. However, there was quite lowness or negative expression of NCAM1 in group A and D. Significant difference was found between group B as well as C and group A as well as D($P < 0.05$). The expression level of RUNX1 in blood-supply myocardium was almost like to the results of NCAM1. **Conclusion** MB with atherosclerosis might be lead to chronic myocardial ischemia.

Key words: myocardial bridging; blood-supply myocardium; collagen fibers; NCAM1; RUNX1

心肌桥(myocardial bridge, MB)是指覆盖在冠状动脉表面心肌束(冠状动脉及其分支通常位于心外膜的脂肪组织内,有时冠状动脉的一部分被心肌纤维所覆盖)。MB 是否引起慢性心肌缺血(chronic myocardial ischemia, CMI)目前存在很大争议;MB 对冠状动脉血流动力学影响不大,尸检 MB 高检出率与冠状动脉造影 MB 低检出率提示,MB 与 CMI 的相关性不大^[1-2];有研究认为,MB 可以引起心肌缺血和临床症状,甚至导致急性心肌梗死和心脏性猝死^[3-4]。CMI(如风湿性心脏病)的心肌间质及小血管周围可见胶原纤维呈弥漫性增生,呈透明变性及淀粉样变, I、III 型胶原抗原在心肌细胞呈阳性表达^[5]。神经细胞黏附分子 1(neural cell adhesion molecule 1, NCAM1)及其转录因子 Runt 相关转录因子 1(Runt-related transcription factor 1, RUNX1)在心肌梗死的瘢痕灶及附近心肌细胞呈特征阳性表达,说明 NCAM1 和 RUNX1 可以作为 CMI 的指标之一^[6]。本实验拟采用 Massion's 染色、免疫组化

和 Western bolt 等方法分别检测胶原纤维、NCAM1 和 RUNX1 在 MB 供血心肌的表达情况,探讨 MB 是否引起 CMI 及 MB 是否属正常的解剖变异。

1 资料与方法

1.1 心脏标本分组 60 份心脏标本来自重庆医科大学法医学教研室 2003~2006 年的尸体解剖档案,死者年龄 40~69 岁。选取主动脉粥样硬化 MB 供血心肌为 A 组,年龄(50.8±9.8)岁;动脉粥样硬化 MB 供血心肌为 B 组,年龄(53.4±6.3)岁;冠状动脉粥样硬化心脏病心肌为 C 组,年龄(54.7±7.8)岁;尸检及常规病理学检查证实死者生前均由非心源性原因(如车祸)引起即刻死亡、主动脉粥样硬化、冠状动脉管腔狭窄程度均在 II 级以下的心肌作为对照为 D 组,年龄(49.9±8.4)岁;每组 15 例。年龄在各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 组织处理 死者均在死后短时间内冷冻保存,24 h 内解剖取出心脏等脏器,用 10% 的中性甲醛常规固定取材,以做

Massion's 染色和免疫组化。其中,各组均选择 5 例在尸体解剖现场肉眼大体检查冠状动脉有无 MB 及 MB 桥前段、桥下段和桥后段有无动脉粥样硬化,并取其供血心肌保存于液氮以做 Western bolt 备用,其余脏器包括心脏用 10% 的中性甲醛常规固定、取材后做常规 HE 染色确定有无动脉粥样硬化、及冠状动脉粥样硬化心脏病,然后选取符合上述分组标准的供血心肌做 Western bolt。

1.3 方法

1.3.1 切片 A、B 组分别取离 MB 桥后段 1~2 cm 处供血心肌, C、D 组分别取与 A、B 组相对应心肌。常规石蜡切片,连续切片 2 张,切片的厚度约为 4~5 μm ,贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烘干后染色。

1.3.2 心肌总蛋白提取 液氮中取 100 mg 心肌组织剪切成细小的碎片,加入含有 1 mmol/L PMSF 混匀的 RIPA 裂解液蛋白裂解液(P0013B,碧云天公司)800 μL ,匀浆器在冰上匀浆至心肌组织充分裂解后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,取上清液 50 μL 分装于干净 EP 管内,在蛋白样品 EP 管内加入 1/5 体积的十二烷基硫酸钠(SDS)电泳缓冲液(5 倍稀释),沸水煮浴 5 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3.3 Massion's 染色 试剂及步骤均参照《实用病理特殊染色和组化技术》。结果判断:蓝色为胶原纤维,棕色为弹力纤维,红色为肌纤维、纤维素等,黑蓝色为细胞核。

1.3.4 免疫组化染色 NCAM1 免疫组化染色:小鼠抗人 NCAM1 单克隆抗体(#3576, Cell Signaling Technology)、SP 试剂盒及 DAB 底物显色试剂盒(基因公司);步骤按照 SP 试剂盒内说明书进行(一抗的工作浓度 1:200),滴加封闭血清和一抗前进行微波抗原修复,PBS 作阴性对照,苏木素核复染。以细胞质/膜出现棕黄色颗粒为阳性。

1.3.5 Western bolt 配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,每泳道加 20 μg 上述沸水煮浴的蛋白样品行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,半干式转膜法转移至硝酸纤维素(PVDF)膜,用含 5% BSA 的 TBST 液 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 PVDF 膜 1 h,将 PVDF 膜置于杂交袋中,加 2 mL 兔抗人 RUNX1 多克隆抗体(#4334, Cell Signaling Technology)的一抗(5% BSA:RUNX1 比例为 1 000:1)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,再加入辣根过氧

化物酶(HRP)标记二抗(TBST:二抗比例为 5 000:1)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,每次孵育完毕后用 TBST 漂洗 3 \times 5 min,ECL 化学发光试剂盒(WBLUC0100, Millipore, 德国)显色,凝胶成像图像处理系统分析目标条带的分子量和净光密度值。用 β -actin 和 5% BSA 分别作为内参和阴性对照。实验重复两次。

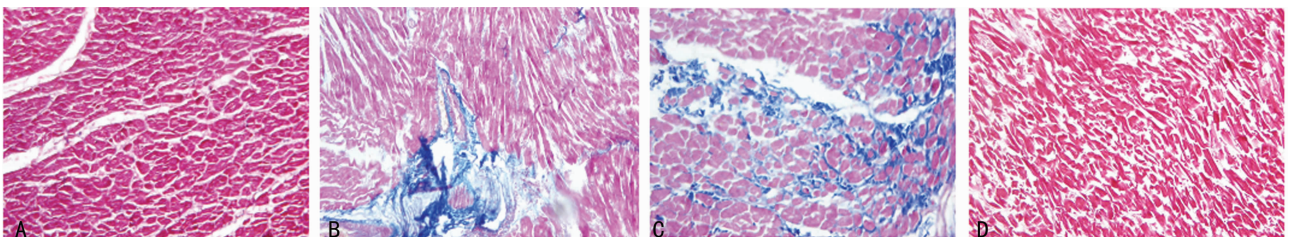
1.3.6 图像处理 胶原纤维染色和免疫组化染色通过重庆远程医疗显微摄影系统放大采图,胶原纤维染色采用定性观察的方法,观察心肌间质有无胶原纤维;免疫组化染色随机选择 5 个视野/张,以测量窗口为固定面积,对染色阳性及背景的灰度级和面积进行测试,计算光线透过物体前后的损失量与入射光的比值,再经过数学变换计算出积分光密度(IOD),然后得到平均光密度值(AOD)。Western bolt 用凝胶成像仪图像分析软件 Quantity one 计算测量每一个样本的目的蛋白条带和内参蛋白条带的光密度值,同时测量每张 PVDF 膜的背景光密度值。RUNX1 蛋白的相对表达量=(样本目的蛋白光密度值-背景光密度值)/(同一样本内参蛋白光密度值-背景光密度值)。

1.4 统计学处理 所有试验数据均采用统计学软件 SPSS 10.0 进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析及显著性检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

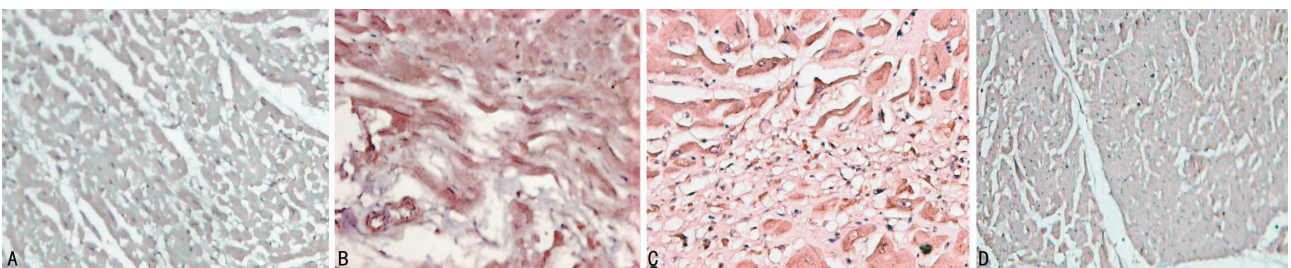
2.1 Massion's 染色 A 组和 D 组心肌间质几乎无胶原纤维;B 组和 C 组心肌间质有较多胶原纤维,部分心肌坏死,形成纤维瘢痕。见图 1。

2.2 NCAM1 在供血心肌表达 免疫组化结果显示:NCAM1 在 A、D 组心肌表达呈弱阳性或阴性;B 组心肌表达呈阳性,主要在细胞质及细胞膜表达,呈棕黄或棕褐色,偶见细胞核表达;C 组心肌瘢痕灶内和瘢痕灶附近心肌细胞膜及细胞质中呈阳性,见图 2。经图像分析及数据统计分析结果显示:NCAM1 在 A 组 AOD 为 0.06 ± 0.03 ,B 组 0.67 ± 0.08 ,C 组 0.63 ± 0.09 ,D 组 0.05 ± 0.04 ;NCAM1 在 B、C 组的表达与 A、D 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);NCAM1 在 B 组和 C 组的表达差异无统计学意义($P>0.05$),在 A 组和 D 组的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

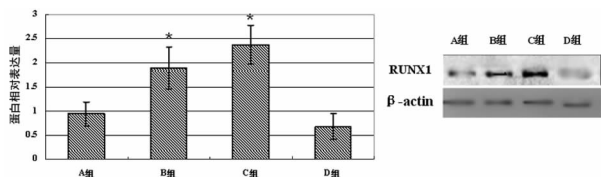
图 1 各组心肌 Massion's 染色($\times 200$)



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 2 NCAM1 在各组供血心肌免疫组化染色($\times 200$)

2.3 Western bolt 检测 RUNX1 在供血心肌表达 RUNX1 在 A 组和 D 组心肌表达量低, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 B 组和 C 组心肌表达量较 A 组或 D 组明显增高 ($P < 0.05$), 但 B 组和 C 组表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。



*: $P < 0.05$, 与 A 组、D 组比较。

图 3 RUNX1 在各组供血心肌表达情况

3 讨 论

NCAM1 属于免疫球蛋白超家族 (IgSF) 成员, 是一种膜结合糖蛋白, 主要参与调节神经系统和骨骼肌细胞间及细胞-基质的黏附作用, NCAM1 在正常心肌呈弱或无表达, 在心肌梗死后的心肌瘢痕灶及附近心肌细胞膜及细胞质中特征阳性表达, 而在充血性心脏病、肥厚梗阻性心脏病、心肌炎以及结节病的心肌呈弱阳性表达, 其转录因子 RUNX1 存在类似结果^[6-7]。心脏在慢性缺血缺氧的情况下, 如风湿性心脏病的心肌间质及小血管周围可见胶原纤维呈弥漫性增生, 呈透明变性及淀粉样变^[5]。故用胶原纤维、NCAM1 和 RUNX1 指标来检测 MB 供血心肌是否存在 CMI。

本研究选择心脏样本时, 排除了年龄对实验结果的影响。实验结果显示, 胶原纤维染色 B 组及 C 组心肌间质有较多胶原纤维, 部分心肌坏死, 形成纤维瘢痕; 而 A 组和 D 组心肌间质几乎无胶原纤维。说明 MB 是一种良性、先天性解剖变异^[8]; MB 在无动脉粥样硬化时不会引起 CMI; 当 MB 存在动脉粥样硬化时, 引起 MB 供血心肌慢性缺血缺氧, 刺激炎症因子增多, 导致胶原纤维增生、心肌坏死等。

NCAM1 和 RUNX1 不是心肌肥大和心肌收缩功能障碍的指标, 而是细胞间相互作用缺失及去神经体液调节其表达均升高^[6-7]。本实验结果显示, NCAM1 在 A 组及 D 组心肌呈弱阳性或阴性, B 组及 C 组呈阳性表达; Western bolt 检测其转录因子 RUNX1 亦有相似结果; 与 Gattenlohner 等^[6]研究 NCAM1 和 RUNX1 在缺血性心脏病表达一致, 说明 NCAM1 和 RUNX1 可作为 CMI 的一个指标。原因可能是 NCAM1 启动子区存在其转录因子 RUNX1 的潜在结合位点, RUNX1 对 NCAM1 表达起重要调节作用, 长期慢性缺血缺氧或瘢痕致细胞间相互作用缺失或去神经体液调节而使细胞间接触僵硬 (通信传导失败), 促发 RUNX1 和 NCAM1 结合而过度表达, 与压力诱导 c-JUN N-端激酶激活信号通路有关^[9]。细胞间相互作用缺失致间隙接头蛋白 connexin43 表达下降, 可引起压力诱导 c-JUN N-端激酶激活^[10-11]。在肿瘤浸润骨骼肌中也发现 NCAM1 在肿瘤细胞表达增加, 邻近骨骼肌细胞表达并不增高^[6]。

通过检测无动脉粥样硬化 MB、动脉粥样硬化 MB 供血心肌的胶原纤维染色、及 NCAM1 和 RUNX1 在供血心肌表达情况, 发现无动脉粥样硬化 MB 不会导致 CMI, 动脉粥样硬化

MB 将引起 CMI。说明 MB 是一种良性、先天性解剖变异, 一般在临床不需要特殊治疗, 如存在动脉粥样硬化时则需要做相应处理。

参考文献:

- [1] Thej MJ, Kalyani R, Kiran J. Atherosclerosis and myocardial bridging: Not a benign combination. An autopsy case report[J]. J Cardiovasc Dis Res, 2012, 3(2): 176-178.
- [2] Sun JL, Huang WM, Guo JH, et al. Relationship between myocardial bridging and coronary arteriosclerosis[J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 65(3): 485-489.
- [3] Berry JF, von Mering GO, Schmalfluss C, et al. Systolic compression of the left anterior descending coronary artery: a case series, review of the literature, and therapeutic options including stenting [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2002, 56(1): 58-63.
- [4] Ramalli EL, Braga LH, Evora PM, et al. Absence of arteriosclerosis in intramyocardial coronary arteries: a mystery to be solved[J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2011, 26(3): 440-446.
- [5] 武利军, 赵连友, 郑强荪, 等. 不同病因心脏病患者心肌纤维化间质胶原及血清指标变化对心功能的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(3): 76-77.
- [6] Gattenlohner S, Waller C, Ertl G, et al. NCAM (CD56) and RUNX1 (AML1) are up-regulated in human ischemic cardiomyopathy and a rat model of chronic cardiac ischemia [J]. Am J Pathol, 2003, 163(3): 1081-1090.
- [7] Gattenlner S, Waller C, Ertl G, et al. The overexpression of NCAM (CD56) in human hearts is specific for ischemic damage [J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 2004, 88(3): 246-251.
- [8] 刘云, 唐任宽, 李剑波. 心肌桥的形态特点与冠状动脉粥样硬化关系 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2011, 29(5): 524-526.
- [9] Ursitti JA, Petrich BG, Lee PC, et al. Role of an alternatively spliced form of alpha II-spectrin in localization of connexin 43 in cardiomyocytes and regulation by stress-activated protein kinase [J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(3): 572-581.
- [10] Kanno S, Kovacs A, Yamada KA, et al. Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice [J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(4): 681-686.
- [11] Shibuya M, Miura T, Fukagawa Y, et al. Tongue muscle-derived stem cells express connexin 43 and improve cardiac remodeling and survival after myocardial infarction in mice [J]. Circ J, 2010, 74(6): 1219-1226.

(收稿日期: 2014-02-14 修回日期: 2014-03-14)