

## 雌激素对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌损伤及心肌细胞凋亡的影响\*

张 洋<sup>1</sup>, 武 煜<sup>2</sup>, 王红军<sup>1</sup>, 孟 晶<sup>1</sup>, 刘功俭<sup>1△</sup>

(1. 徐州医学院麻醉学院, 江苏徐州 221002; 2. 江苏省徐州市第一人民医院内科 221000)

**摘要:**目的 通过建立大鼠双侧卵巢切除及异丙肾上腺素诱导的心肌损伤模型, 研究雌激素对异丙肾上腺素致大鼠心肌损伤及心肌细胞凋亡的影响。方法 50 只雌性 SD 大鼠行双侧卵巢切除术和假手术后分为 5 组(每组 10 只): 假手术组(Sham 组); 双侧卵巢切除组(OVX 组); 心肌损伤组(OVX+ISO+Vehi 组), 雌激素  $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  治疗组(OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组), 雌激素  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  治疗组(OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组)。分别测量大鼠大体指标, 颈总动脉置管监测心脏血流动力学参数, 分离培养单个心肌细胞观察形态与收缩功能改变, 以及蛋白免疫印迹法检测心肌细胞凋亡蛋白的表达。结果 异丙肾上腺素明显降低心肌功能, 增加心肌细胞肥大与凋亡, 降低单个心肌细胞收缩功能( $P < 0.05$ )。高剂量雌激素( $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )替代治疗显著改善异丙肾上腺素引起的心肌损伤与心肌功能下降( $P < 0.05$ ), 并通过增加 Bcl-2 蛋白表达, 减少 Bax 蛋白表达与 Caspase-3 的激活, 降低心肌细胞肥大与凋亡( $P < 0.05$ )。而低剂量雌激素( $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )只表现出轻度抗异丙肾上腺素心肌损伤的作用, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 适宜剂量的雌激素替代治疗通过降低心肌细胞凋亡, 提高心肌细胞收缩功能, 从而对异丙肾上腺素诱导的心肌损伤发挥保护作用。

关键词: 雌激素类; 异丙肾上腺素; 心肌损伤; 凋亡

中图分类号: R541

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)34-4566-04

## Effect of estrogen on cardiac injury and cardiomyocyte apoptosis of rat induced by isoproterenol\*

Zhang Yang<sup>1</sup>, Wu Yu<sup>2</sup>, Wang Hongjun<sup>1</sup>, Meng Jing<sup>1</sup>, Liu Gongjian<sup>1△</sup>

(1. Department of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Department of Medicine, the First People's Hospital of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

**Abstract:** Objective To study the effect of estrogen on cardiac injury and cardiomyocyte apoptosis of rat induced by isoproterenol by modeling cardiac injury induced by bilateral ovariectomized (OVX) and isoproterenol (ISO). **Methods** Fifty female SD rats with bilateral ovariectomy and sham operation (Sham) were randomly divided into 5 groups: sham operation group (Sham group), bilateral ovariectomy group (OVX group), cardiac injury group (OVX+ISO+Vehi group), low dose estrogen treatment group (OVX+ISO+E<sub>2</sub>a group,  $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), high dose estrogen treatment group (OVX+ISO+E<sub>2</sub>b group,  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). these status were separately measured; rats' general features, hemodynamics parameters monitored of carotid artery, morphological observation and cardiomyocyte contraction change of single-cardiomyocyte separate cultured, cardiomyocyte apoptosis protein expression were detected by immunoblotting. **Results** ISO significantly reduced myocardial pump function, increased hypertrophy and apoptosis of cardiomyocytes, reduced contractility of single cardiomyocytes ( $P < 0.05$ ). High-dose estrogen ( $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) replacement therapy significantly improved ISO induced cardio injury and cardio functions decreasing, also inhibited Bax expression and caspas-3 activation and decreased myocardial hypertrophy and cardiomyocytes apoptosis through increasing Bcl-2 expression ( $P < 0.05$ ), significantly. while low dose estrogen ( $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) treatment showed marginally protection effects on ISO induced cardio injury with no statistically significance. **Conclusion** Appropriate dose estrogen replacement therapy can decrease cardiomyocyte apoptosis, improve cardiomyocytes contractility, so as to protect ISO-induced cardiomyocyte apoptosis.

Key words: estrogen; isoproterenol; cardiomyocyte injury; apoptosis

研究显示心肌收缩功能降低是各种心血管疾病造成心脏泵血能力降低的主要原因。流行病学调查发现, 男性和女性的心血管疾病发病率和严重程度存在明显差异, 且绝经前妇女心血管疾病的发生率明显低于同年龄男性<sup>[1-2]</sup>, 这表明雌激素对于维持心血管健康起重要作用<sup>[3-4]</sup>。然而, 这种心肌保护作用的机制尚不清楚。

心血管疾病致病因素当中, 交感肾上腺髓质系统活动增强在中老年患者当中尤为重要, 过度增加的儿茶酚胺分泌会造成急性或慢性心肌损伤, 对于绝经后妇女儿茶酚胺的作用更为明

显<sup>[5]</sup>。有实验证据表明, 细胞凋亡是心肌损伤的重要原因<sup>[6]</sup>, 损伤后的心肌收缩功能明显下降。已有研究发现, 凋亡相关蛋白 Bax 的高表达和 Bcl-2 的低表达与凋亡的活化有关<sup>[7-8]</sup>, 而儿茶酚胺过多会造成心肌细胞凋亡, 心肌损伤, 心功能下降<sup>[9]</sup>。因此, 药物方法抑制心肌细胞凋亡可能是保护因儿茶酚胺过多造成心肌损伤的治疗靶点<sup>[10]</sup>。因此, 本研究旨在阐明雌激素替代治疗对异丙肾上腺素造成心肌损伤的保护作用, 并证明雌激素保护心肌的机制为抑制异丙肾上腺素造成的心肌细胞凋亡。

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(30901402); 江苏省高校自然科学基金资助项目(09KJD320008)。 作者简介: 张洋(1976—), 硕士, 讲师, 主要从事重要脏器衰竭与保护方面的研究工作。 △ 通讯作者: Tel: (0516) 83262663; E-mail: liugongjian61@hotmail.com。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与动物分组 正常健康 SD 雌性成年大鼠 50 只,体质量 200~250 g,由徐州医学院实验动物中心提供(使用许可号:SYXK[su]2002-0038)。实验主要试剂:异丙肾上腺素购自 Sigma 公司(美国),17β 雌二醇购自 ABCR 公司(德国),一抗 Caspase-3、Bcl-2、Bax、GAPDH 与二抗均购自 Santa Cruz 公司(美国)。实验动物由戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉,切除双侧卵巢。3 d 后皮下注射异丙肾上腺素 100 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,连续 5 d<sup>[5]</sup>。参照本实验室既往研究<sup>[11]</sup>,实验动物分组为假手术组(Sham 组)、双侧卵巢切除组(OVX 组)、心肌损伤组(OVX+ISO+Vehi 组)、雌激素 4 μg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 治疗组(OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组)、雌激素 40 μg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 治疗组(OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组)。OVX+ISO+Vehiz 组和 OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组分别皮下注射 17β 雌二醇与溶剂连续 4 周。

1.2 方法

1.2.1 大鼠血流动力学测定 雌激素替代治疗 4 周后,测量身长,大鼠戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉后,左侧颈总动脉置入微压力传感导管,检测平均动脉血压(MABP)、左心室舒张末期压力(LVEDP)、左心室压力变化速率(±dp/dt)<sup>[12]</sup>。

1.2.2 成年大鼠心肌细胞分离和培养 分离和培养成年大鼠心肌细胞的方法如作者之前的研究<sup>[13]</sup>,简而言之,SD 大鼠,麻醉后迅速开胸取心脏,称体质量,Langendorff 主动脉逆行灌流无钙酶液(含 0.04% 胶原酶),循环灌流 20~30 min,将心室组织剪成约 1 mm×1 mm×1 mm 碎块,然后用 200 目尼龙网过滤,室温下静置 20 min,弃上清,反复 3 次,最后将细胞置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中。

1.2.3 培养心肌细胞存活率的计算 倒置显微镜采集横纹清晰、胞膜完整、长杆状的心肌细胞(放大 200 倍)测算心肌细胞杆状存活率,心肌细胞肝状存活率=(杆状细胞数量/全部细胞数量)×100%。

1.2.4 单个心肌细胞收缩功能的测定 倒置显微镜(Nikon E400)视频记录心肌细胞收缩功能的方法如作者之前的研究<sup>[13]</sup>,把培养的心肌细胞置于收缩功能分析装置的细胞浴槽内,2 mmol/L 钙和 10<sup>-7</sup> mmol/L 异丙肾上腺素的 KH 液灌流,0.5 Hz 电刺激。采集横纹清晰、胞膜完整、长杆状的心肌细胞(放大 200 倍)分析其收缩的状况,以及收缩时间(TTP)、舒张 90% 时间(R90),心肌细胞收缩幅度(%)=(心肌细胞舒张末长度-收缩末长度)/心肌细胞静息长度×100%。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 Annexin V-PI 双染色法标记分离培养的心肌细胞,经流式细胞仪检测细胞凋亡率。每样本细胞数控制为(1~5)×10<sup>6</sup>/mL,500~1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。加入荧光(SA-FLOUS)溶液 4℃ 下孵育 20 min,流式细胞仪检测。在双变量流式细胞仪的散点图上,左下象限显示活细胞;右上象限是非活细胞,即坏死及凋亡细胞。

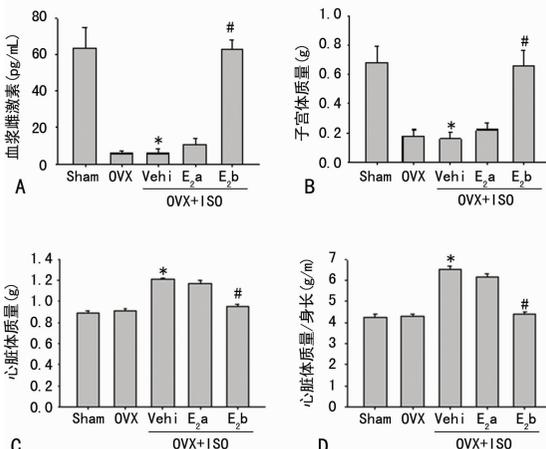
1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 凋亡相关蛋白 Caspase 3、Bcl-2 和 Bax 蛋白通过 Western blot 方法检测。等量蛋白样品(20 μg)加入 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,转膜后加入一抗(1:1 000)4℃ 过夜,二抗(1:3 000)室温孵育 2 h。Image J3.0 软件分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间的比较采用 *t* 检验,多组间的比较采用方差分析(ANOVA),以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

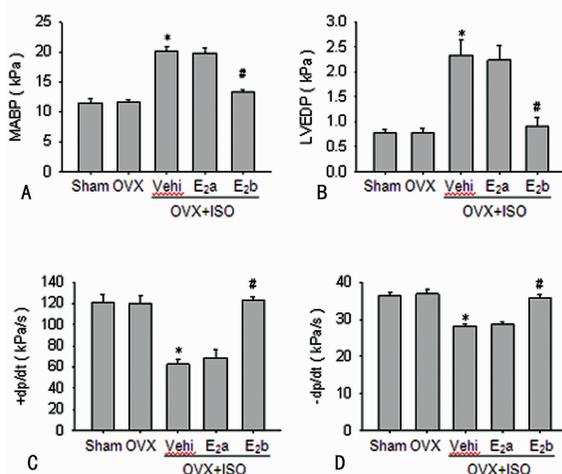
2.1 外源性雌激素替代治疗对大鼠一般指标的影响 为了检

测雌激素在心泵功能中的作用,将雌性大鼠双侧卵巢切除,该模型可以明显降低血中雌激素水平,随后注射异丙肾上腺素,子宫切除后的雌性大鼠,血浆中雌激素水平(图 1A)、子宫体质量(图 1B)显著降低,但是大鼠身长没有改变(本文没有显示该数据)。与 Sham 组和 OVX 组比较,OVX+ISO+Vehi 组心脏质量与心脏质量/身长比率增加(图 1C、D)。而 OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组较 OVX+ISO+Vehi 组血浆雌激素水平与子宫质量显著增加(图 1A、B),并且降低了由于 ISO 刺激而引起的心脏质量与心脏质量/身长比率(图 1C、D)。但是较低剂量的雌激素(4 μg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)对血浆雌激素水平升高不明显(图 1A),而且对恢复子宫质量的作用非常有限(图 1B)。在实验中,还发现较低剂量的雌激素(4 μg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)对于异丙肾上腺素所导致的心脏质量和心脏质量/身长比率的增加几乎没有作用(图 1C、D)。



A: 血浆雌激素水平; B: 子宫质量; C: 心脏质量; D: 心脏质量/身长。\* :*P*<0.05, 与 Sham 组比较; # :*P*<0.05, 与 OVX+ISO+Vehi 组比较。

图 1 各组大鼠一般指标检测( $\bar{x} \pm s, n=10$ )



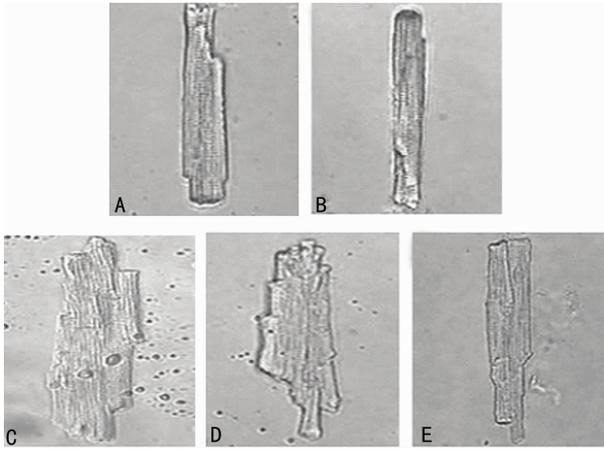
A: MABP 水平; B: LVEDP 水平; C: ±dp/dt 水平; D: -dp/dt 水平。\* :*P*<0.05, 与 sham 组比较; # :*P*<0.05, 与 OVX+ISO+Vehi 组比较。

图 2 各组大鼠心脏功能监测( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

2.2 外源性雌激素替代治疗改善异丙肾上腺素造成的心肌收缩功能降低 经大鼠左侧颈总动脉置管,并逆行进入左心室记录各组大鼠的血流动力学指标。与 Sham 组和 OVX 组比较,OVX+ISO+Vehi 组平均动脉血压(MABP)与左室舒张末压

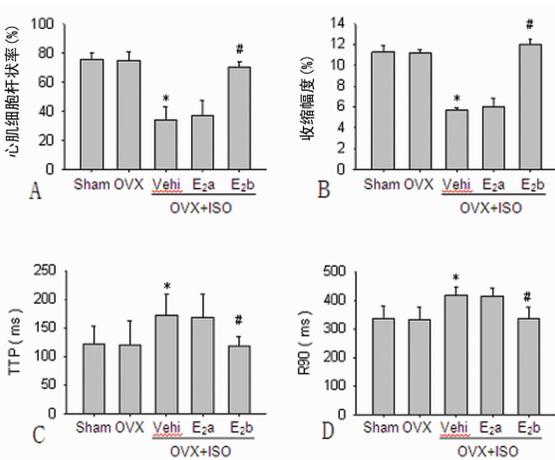
(LVEDP)明显升高(图 2A、B),但是 $\pm dp/dt$ 显著降低(图 2C、D)。而 OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组较 OVX+ISO+Vehi 组 MABP 与 LVEDP 明显降低(图 2A、B), $\pm dp/dt$  升高(图 2C、D)。但是 OVX+ISO+Vehi 组对于 ISO 所导致的 MABP、LVEDP 升高, $\pm dp/dt$  降低几乎无作用(图 2A~D)。

**2.3 外源性雌激素替代治疗对单个心肌细胞的影响** 通过倒置显微镜观察记录各组分离培养的单个成年大鼠心肌细胞,在体外经电刺激收缩搏动的影像。Sham 组与 OVX 组单个心肌细胞横纹清晰,包膜完整,细胞长度与直径正常,而 OVX+ISO+Vehi 组心肌细胞明显肥大,不规则,细胞长度与直径明显增加,而 OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组心肌细胞形态明显改善,但 OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组心肌细胞形态恢复的极为有限。见图 3。



A: Sham 组; B: OVX 组; C: OVX+ISO+Vehi 组; D: OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组; E: OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组。A、B、E 放大倍数为 400 倍; C、D 放大倍数为 200 倍。

图 3 各组大鼠单个心肌细胞光学显微镜观察

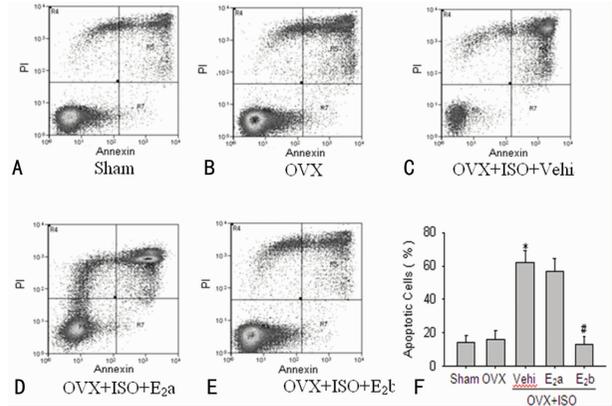


A: 心肌细胞杆状率; B: 收缩幅度; C: TTP; D: R90。\* :  $P < 0.05$ , 与 sham 组间比较; # :  $P < 0.05$ , 与 OVX+ISO+Vehi 组间比较。

图 4 各组大鼠左心室单个心肌细胞收缩功能测定 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

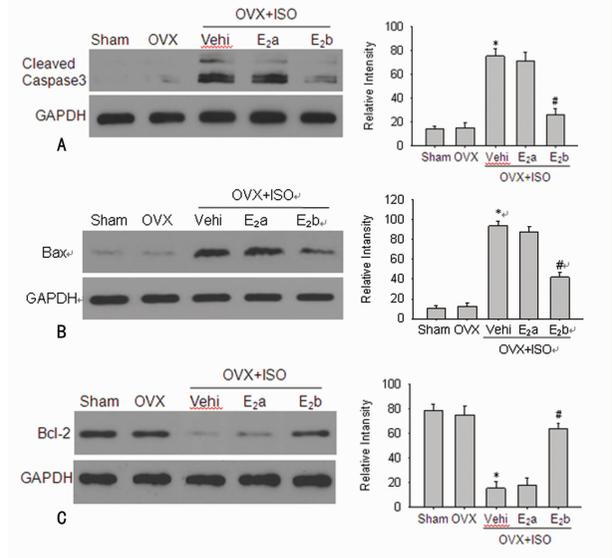
同时也发现,与 Sham 组或 OVX 组相比,OVX+ISO+Vehi 组心肌细胞杆状率、收缩幅度明显降低(图 4A、B),TTP 及 R90 明显延长(图 4C、D)。而 OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组相对于 OVX+ISO+Vehi 组心肌细胞的杆状率、收缩幅度显著增加(图 4A、B),而 TTP 与 R90 则明显下降(图 4C、D)。但是 OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组心肌细胞的这种恢复作用几乎没有(图 4A~D)。

**2.4 外源性雌激素替代治疗对心肌细胞凋亡的影响** 分离培养的心肌细胞经 Annexin V-PI 双染色法标记,流式细胞仪检测细胞凋亡率(图 5A~E),与 Sham 组或 OVX 组相比,OVX+ISO+Vehi 组心肌细胞凋亡率显著增加(图 5F),而 OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组相对于 OVX+ISO+Vehi 组心肌细胞凋亡率显著下降,但是 OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组心肌细胞凋亡率下降没有 OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组明显,且与 OVX+ISO+Vehi 组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 5F)。



A~E: 双染色标记法; F: 流式细胞仪检测细胞凋亡率。\* :  $P < 0.05$ , 与 sham 组间比较; # :  $P < 0.05$ , 与 OVX+ISO+Vehi 组间比较。

图 5 各组大鼠心肌细胞凋亡率测定 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )



A: Caspase 3 表达; B: Bax 表达; C: Bcl-2 表达。\* :  $P < 0.05$ , 与 sham 组间比较; # :  $P < 0.05$ , 与 OVX+ISO+Vehi 组间比较。

图 6 Western blot 检测各组大鼠凋亡蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

**2.5 外源性雌激素替代治疗对心肌细胞 Caspase 3、Bcl-2、Bax 表达的影响** 利用 Western blot 分析心肌细胞中凋亡相关蛋白 Caspase 3、Bcl-2、Bax 的表达情况。与 Sham 组或 OVX 组相比,OVX+ISO+Vehi 组心肌细胞 Caspase 3、Bax 表达显著增加(图 6A、B),而 Bcl-2 表达降低(图 6C)。与 OVX+ISO+Vehi 组比较,OVX+ISO+E<sub>2</sub>b 组心肌细胞 Caspase 3、Bax 表达明显降低(图 6A、B),而 Bcl-2 表达增高(图 6C)。但是 OVX+ISO+E<sub>2</sub>a 组心肌细胞 Caspase 3、Bcl-2、Bax 的表达与 OVX+ISO+Vehi 组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 6A~C)。

### 3 讨 论

绝经前女性心血管疾病的发病率较低,但更年期后这种优势明显降低,这表明雌性激素,尤其是雌激素在减少心血管疾病风险中起到举足轻重的作用<sup>[14]</sup>。而且,随着绝经后女性年龄的增长,其心血管疾病的发病风险也逐步增加,这与逐渐减少的血浆雌激素水平直接相关。而无论女性还是男性,雌激素均可改善血管舒张反应,降低缺血造成的心肌损伤<sup>[15]</sup>。所以,雌激素也许对心肌具有直接的保护作用。

在心肌损伤大鼠的离体心脏中,没有太多的证据可以表明心肌收缩功能的改变与细胞凋亡间的关系。而目前的研究表明,雌激素环境对心脏非常重要,在异丙肾上腺素刺激造成心肌损伤之后进行雌激素替代治疗,通过测量在体心脏 MABP、LVEDP 和  $\pm dp/dt$ ,发现心脏收缩功能明显改善。而且通过维持卵巢切除后雌性大鼠的血浆雌激素水平,可以增加单个心室肌细胞收缩功能,减少心肌细胞凋亡蛋白的表达。同时验证了雌性大鼠卵巢切除动物模型血浆雌激素水平和子宫质量降低,是可以通过雌激素连续替代治疗得以恢复的。通过视频记录了分离培养的成年大鼠单个心室肌细胞受电刺激而收缩的动态图像,从中截取了照片观察心肌细胞形态改变,结果发现异丙肾上腺素连续大剂量刺激可引起心肌细胞肥大,长度与直径均有不同程度的增加,而收缩幅度与速率则明显降低。通过连续皮下注射雌激素后,心肌细胞的形态与功能均有不同程度的改善,尤以高剂量雌激素( $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )替代治疗改善显著,而低剂量雌激素( $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )的恢复效果不甚明显。这表明雌激素在  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量可以明显改善异丙肾上腺素引起的心肌受损。

此外,本研究利用 Annexin V-PI 双染法标记分离培养的成年大鼠心肌细胞,经流式细胞仪分析发现,大剂量异丙肾上腺素连续刺激明显增加心肌细胞凋亡数量,但经雌激素  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  替代治疗 4 周后凋亡数量明显减少,而  $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  作用不明显。心肌细胞凋亡是心肌损伤的主要原因之一<sup>[16]</sup>。有研究表明,Bcl-2 家族蛋白在调节生理和病理性细胞凋亡中发挥关键作用,这些蛋白质包括促进细胞死亡的 Bax、Bad 和抑制细胞死亡的 Bcl-2、Bcl-x 等<sup>[17]</sup>。诱导和抑制细胞凋亡的蛋白相互作用,形成一个复杂的调控网络,而细胞的存活或者死亡的调控基于这个网络中促凋亡和抗凋亡蛋白的比率<sup>[18]</sup>。已经明确的是 Bax/Bcl-2 蛋白比率增高可以明显促进细胞凋亡<sup>[19]</sup>。本研究证实经雌激素  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量持续 4 周的替代治疗可以上调 Bcl-2,同时下调 Bax 的表达,而  $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的治疗剂量并没有明显作用。这些结果显示,雌激素替代治疗可以防治儿茶酚胺类激素过多而引起的心肌细胞凋亡,从而保护受损的心肌细胞。因此,作者认为补充雌激素可能是通过上调抗凋亡蛋白,下调促凋亡蛋白的表达而发挥心肌保护作用的。雌激素替代治疗调节 Bcl-2 和 Bax 蛋白的机制尚不清楚,雌激素调节细胞凋亡相关基因的机制亦不明确。但是雌激素替代治疗会引起许多抗氧化剂影响细胞凋亡基因的表达,所以,雌激素的抗氧化与抗脂质过氧化的作用可能是其主要机制<sup>[20]</sup>。

综上所述,雌激素替代治疗,尤其是  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量,可以明显改善由于异丙肾上腺素刺激增加心肌细胞凋亡而造成的心肌损伤、心肌收缩功能下降。而且此浓度的雌激素替代治疗可能对卵巢功能不足而引起的心肌收缩功能降低起到

保护作用。本研究还表明,增加 Bcl-2 蛋白、减少 Bax 蛋白的表达在雌激素心脏保护作用中起到了至关重要的作用。所以,适宜剂量的雌激素替代治疗对于儿茶酚胺类激素异丙肾上腺素增加造成的心肌细胞凋亡、心肌收缩功能降低具有明显的保护作用。

### 参考文献:

- [1] Dubey RK, Imthurn B, Zacharia LC, et al. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: what went wrong and where do we go from here[J]. *Hypertension*, 2004,44(6):789-795.
- [2] Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006,5(5):425-438.
- [3] Khalil RA. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013,86(12):1627-1642.
- [4] Le TY, Ashton AW, Mardini M, et al. Role of androgens in sex differences in cardiac damage during myocardial infarction[J]. *Endocrinology*, 2014,155(2):568-575.
- [5] Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates[J]. *Comp Med*, 2009,59(4):339-343.
- [6] Zhuo XZ, Wu Y, Ni YJ, et al. Isoproterenol instigates cardiomyocyte apoptosis and heart failure via AMPK inactivation-mediated endoplasmic reticulum stress[J]. *Apoptosis*, 2013,18(7):800-810.
- [7] Sun H, Zhou F, Wang Y, et al. Effects of beta-adrenoceptors overexpression on cell survival are mediated by Bax/Bcl-2 pathway in rat cardiac myocytes[J]. *Pharmacology*, 2006,78(2):98-104.
- [8] Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, et al. Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression[J]. *Cell Res*, 2003,13(5):385-391.
- [9] Sahu BD, Anubolu H, Koneru M, et al. Cardioprotective effect of embelin on isoproterenol-induced myocardial injury in rats: possible involvement of mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. *Life Sci*, 2014,107(1/2):59-67.
- [10] Fan Y, Wang C, Zhang Y, et al. Genistein ameliorates adverse cardiac effects induced by Arsenic trioxide through preventing cardiomyocytes apoptosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013,31(1):80-91.
- [11] Wu Q, Zhao Z, Sun H, et al. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion [J]. *Exp Physiol*, 2008,93(9):1034-1043.
- [12] Jiang X, Gao L, Zhang Y, et al. A comparison of the effects of ketamine, chloral hydrate and pentobarbital Sodium anesthesia on isolated rat hearts and cardiomyocytes [J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, (下转第 4573 页)

通过在线数据的深度挖掘,成功缩小胃癌中目标 miRNA 分析范围。miR-21 与胃癌的发生和转移有关,有望作为胃癌分子标志<sup>[11]</sup>,选择其进一步分析预测靶基因。经过整合常用 miR 靶基因预测软件的靶基因数据库 miRGen(v3)进行靶基因预测后,应用基因表达谱数据库有效缩小靶基因范围,获得在胃癌中相关的预测靶基因集。应用在线软件 DAVID 和 Pathway Miner 分别进行 GO 基因注释、功能富集分析和信号通路分析。结果显示在胃癌中 MiR-21 的靶基因涉及系列信号通路中,包括黏附连接、胰岛素信号转导通路、细胞凋亡、钙信号转导通路、JAK-STAT 信号转导途径等与肿瘤发生、发展及转移密切相关的信号通路<sup>[12-13]</sup>。

经过充分数据发掘,利用生物信息学分析结果所提供的重点信号转导通路为基础,可以开展针对性的实验研究,将有助于进一步理解 P53、miRNA 及下游靶基因组成的调控网络在胃癌发生、发展中的作用机制。

#### 参考文献:

- [1] Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(11):4034-4039.
- [2] Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(13):1586-1593.
- [3] Jiang Q, Wang Y, Hao Y, et al. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(Database issue): D98-104.
- [4] Alexiou P, Vergoulis T, Gleditsch M, et al. miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D137-141.
- [5] Petryszak R, Burdett T, Fiorelli B, et al. Expression Atlas update—a database of gene and transcript expression (上接第 4569 页)  
2011, 12(10):732-735.
- [13] 孙红, 常爱民, 张洋, 等. 增加  $\beta$ 1-肾上腺素受体表达对心力衰竭大鼠心肌细胞收缩功能的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2007, 27(12):1398-1402.
- [14] Renoux C, Dell'aniello S, Suissa S. Hormone replacement therapy and the risk of venous thromboembolism: a population-based study[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(5): 979-986.
- [15] Emre A, Sahin S, Erzik C, et al. Effect of hormone replacement therapy on plasma lipoproteins and apolipoproteins, endothelial function and myocardial perfusion in postmenopausal women with estrogen receptor-alpha IVS1-397 C/C genotype and established coronary artery disease[J]. *Cardiology*, 2006, 106(1):44-50.
- [16] Chen HM, Hsu JH, Liou SF, et al. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, prevents lysophosphatidylcholine-induced cardiac injury by reducing reactive oxygen species production, calcium overload and apoptosis via MAPK pathways[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14:233.
- [17] Huang C, Gu H, Zhang W, et al. Testosterone-down-regulated Akt pathway during cardiac ischemia/reperfusion: a mechanism involving BAD, Bcl-2 and FOXO3a [J]. *J Surg Res*, 2010, 164(1):e1-11.
- [18] Penna C, Pasqua T, Amelio D, et al. Catestatin increases the expression of anti-apoptotic and pro-angiogenic factors in the post-ischemic hypertrophied heart of SHR[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e102536.
- [19] Zhang Y, Li H, Zhao G, et al. Hydrogen sulfide attenuates the recruitment of CD11b+Gr-1+ myeloid cells and regulates Bax/Bcl-2 signaling in myocardial ischemia injury [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:4774.
- [20] Wang F, Xiao J, Shen Y, et al. Estrogen protects cardiomyocytes against lipopolysaccharide by inhibiting autophagy[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(3):1509-1512.
- [6] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1):44-57.
- [7] Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells [J]. *RNA*, 2003, 9(1):112-123.
- [8] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [9] Tchernitsa O, Kasajima A, Schafer R, et al. Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression [J]. *J Pathol*, 2010, 222(3):310-319.
- [10] Li X, Zhang Y, Zhang H, et al. miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3 [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(7): 824-833.
- [11] Li BS, Zhao YL, Guo G, et al. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41629.
- [12] Souma Y, Nishida T, Serada S, et al. Antiproliferative effect of SOCS-1 through the suppression of STAT3 and p38 MAPK activation in gastric cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(6):1287-1296.
- [13] Wei Q, Zhou W, Wang W, et al. Tumor-suppressive functions of leucine zipper transcription factor-like 1 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7):2942-2950.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-09-22)

(收稿日期:2014-06-18 修回日期:2014-08-15)