

• 论 著 •

人线粒体肌酸激酶广泛型亚型的原核表达、抗体制备及其临床应用意义

张 建,王爱华,顾鹏飞,于嘉屏*

(第二军医大学长征医院实验诊断科,上海 200003)

[摘要] **目的:**在大肠杆菌中克隆表达人线粒体肌酸激酶广泛型亚型(uMtCK)的蛋白,免疫家兔制备抗 uMtCK 的多克隆抗体,检测胃肠肿瘤组织中 uMtCK 的表达。**方法:**采用 RT-PCR 从培养的肿瘤细胞(HeLa 细胞)中成功扩增出 1 062 bp 的 uMtCK 基因片段,构建重组质粒 pQE30-uMtCK,转化大肠杆菌表达酶融合蛋白,对表达产物进行 SDS-PAGE、Western 印迹鉴定及酶活性测定。纯化的 uMtCK 蛋白免疫家兔制备了抗 uMtCK 多抗。免疫组化法检测 59 例胃及直肠肿瘤组织切片中 uMtCK 的表达。**结果:**RT-PCR 扩增出的片段经酶切鉴定和测序证实为 uMtCK 的基因;在大肠杆菌 M15 中实现了高效、可溶性的融合表达。免疫家兔制备的抗 uMtCK 多抗经 Western 免疫印迹分析适合作 uMtCK 的进一步分析。免疫组化检测临床病理标本结果显示,59 例胃及直肠肿瘤标本 uMtCK 的阳性率为 76.5%。**结论:**成功克隆了人 uMtCK 的编码基因,并将其在大肠杆菌中成功表达;制备了抗 uMtCK 多抗,免疫组化检测临床病理标本的结果提示 uMtCK 有助于胃肠肿瘤的诊断。

[关键词] 线粒体肌酸激酶;基因表达;胃肠肿瘤**[中图分类号]** R 735.2; R 735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1320-05**Prokaryotic expression of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase, preparation of its antiserum and clinical application**

ZHANG Jian, WANG Ai-Hua, GU Peng-Fei, YU Jia-Ping* (Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To clone the full-length cDNA of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase (uMtCK) and express its protein in *E. coli*. The protein was used to immunize rabbit to prepare anti-uMtCK polyclonal antibody which was then used to detect the expression of uMtCK in gastrointestinal carcinoma. **Methods:** A 1 062 bp segment was amplified from human HaLa cell by RT-PCR, which was then inserted into pMD18-T plasmid and proved to be the coding sequence of uMtCK by endonuclease digestion and sequencing. The coding sequence of uMtCK was inserted into pQE30 plasmid and recombinant plasmid pQE30-uMtCK was transformed into *E. coli*. The expressed protein was purified with a His. Bind column and was analyzed with SDS-PAGE and Western blot and the activity of uMtCK was tested. An antiserum against uMtCK was prepared by immunizing rabbit with purified uMtCK. The expression of uMtCK in 59 patients with gastric and colonic cancer was detected by immunohistochemistry. **Results:** The coding sequence of uMtCK was successfully obtained by RT-PCR and the product was successfully inserted into pQE30 to construct a recombinant vector pQE30-uMtCK. The expression of uMtCK was effective and soluble. A good specific antiserum against uMtCK was proved by Western blot. The expression of uMtCK of gastric and colonic cancer was 76.5%. **Conclusion:** The coding sequence of uMtCK is cloned and expressed in *E. coli*. uMtCK is a prospective marker for the diagnosis of gastric and colonic cancer.

[KEY WORDS] ubiquitous mitochondrial creatine kinase; gene expression; gastrointestinal neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1320-1324]

肌酸激酶(CK; EC 2.7.3.2)是一个与细胞内能量转运、肌肉收缩、ATP 的再生有关的能量代谢的关键酶^[1], 现已知存在 4 种组织和亚细胞定位特异的 CK 同工酶, 即胞质型的脑型肌酸激酶同工酶(CK-BB)、肌型肌酸激酶同工酶(CK-MM)、杂合型肌酸激酶同工酶(CK-MB)以及存在于线粒体的线粒体肌酸激酶(mitochondrial creatine kinase, MtCK), 而 MtCK 又存在 2 种组织特异的 MtCK 同工酶亚型^[2], 即 MtCK 的广泛型亚型(ubiquitous MtCK, uMtCK)和 MtCK 的肌膜型亚型(sarcomer-

ic MtCK, sMtCK)。

MtCK 与胞质型的肌酸激酶同工酶一样催化 ATP 和磷酸肌酸(PCr)之间高能磷酸键的可逆转移, 但 MtCK 的一级结构、亚细胞定位、动力学性质均与胞质型的肌酸激酶同工酶不同^[1], 特别是其在某些肿瘤患者血清中的高检出率和近年来发现的其

[基金项目] 上海市科委基金(034119939)。**[作者简介]** 张建(1970-), 男(侗族), 硕士生, 现在解放军第 149 医院检验科, 连云港 222042。

* Corresponding author. Tel: 021-63260930-2176

在线粒体膜上的与某些通道蛋白的相互作用^[3]的新功能引起了许多学者的广泛关注。为深入研究 MtCK 的生物学功能和可能的临床诊断价值, 本研究克隆了人的 MtCK 的广泛型亚型的基因, 实现了其在大肠杆菌中的高效、可溶性的表达, 通过亲和层析获得了具有生物学活性的 uMtCK, 并以纯化的 uMtCK 蛋白免疫家兔获得了针对 uMtCK 的多克隆抗体, 并用该抗体检测了部分消化道肿瘤标本 uMtCK 的表达水平, 以期了解 uMtCK 的可能的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 HeLa 细胞、pQE30 质粒、M15、DH5 α 菌株为本室保存, pMD18-T (TaKaRa 公司); 工具酶 *Bam*H I、*Kpn* I、*T*₄ DNA 连接酶、RT-PCR 试剂合为 TaKaRa 公司产品; 镍金属离子亲和层析柱购自 Qiagen 公司; CK-MM、CK-MB、CK-BB 同工酶标准品为海伦那公司产品; EnVision 试剂 (丹麦 DAKO 公司); BECKMAN DU640 微量核酸蛋白检测仪 (BECKMAN 公司)、PE9600 型 PCR 扩增仪 (美国 PE 公司)、1650 型全自动生化分析仪 (德国拜耳)。常用化学试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 标本选取 本研究所有肿瘤标本均选自 1998 年 3 月至 2002 年 10 月期间第二军医大学长海医院手术切除并经病理诊断证实的病例蜡块。胃癌 30 例、结肠癌 29 例, 所有标本均取自病变典型部位。所有病例中男性 29 例, 女性 22 例; 年龄 22~82 岁, 平均 (55.50 $\pm$ 14.39) 岁。正常胃组织 2 例, 为胃癌手术所切除的正常胃组织; 正常结肠组织 3 例, 为结肠癌手术所切除的正常结肠组织, 均为男性, 年龄 32~67 岁, 平均 (48.25 $\pm$ 17.69) 岁。

1.3 人 uMtCK 基因的克隆及 pQE30-uMtCK 重组质粒的构建 根据发表的人 uMtCK 基因序列及 GenBank 同源检索结果, 进行了 PCR 引物设计。共设计引物 2 条, 它们分别是: 正向引物 P1: 5'-ACA ACG GAT CCG CCA GTC ACC TGA C-3', 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点; 反向引物 P2: 5'-TAG GTA CCT TAA TGC TTG GTG TGG ATG-3', 5'端引入 *Kpn* I 酶切位点, 交上海基康生物技术有限公司合成。抽提 HeLa 细胞总 RNA, 以 HeLa 细胞的总 RNA 为模板, RT-PCR 的方法扩增出大小为 1 062 bp 的 DNA 序列, 行胶回收纯化。扩增产物与 pMD18-T 载体质粒连接构建 pMD18-T-uMtCK 重组质粒, 转化入受体菌 DH5 α , 用含氨苄抗性的 LB-琼脂平板培养基上筛选阳性菌落, *Bam*H I 和

Kpn I 双酶切鉴定阳性菌落, 进行 DNA 序列测定, 证实所获得的片段为 uMtCK 基因的编码序列。再将该目的片段插入质粒 pQE30 构建重组表达质粒 pQE30-uMtCK, 转化受体菌 M15, 接种于含氨苄和卡那霉素双抗性的 LB 平板培养基中筛选阳性菌落, 用含以上 2 种抗生素的 LB 液体培养基增菌, SDS-PAGE 电泳筛选阳性转化子。

1.4 uMtCK 的原核表达及蛋白纯化 大量表达含 pQE30-uMtCK 质粒的重组菌 M15, 按 Qiagen 公司提供的 Ni-螯合亲和层析琼脂糖凝胶纯化融合蛋白的方案在非变性的条件下纯化 MtCK 融合蛋白, SDS-PAGE 电泳鉴定纯化蛋白。常规 1% 琼脂糖电泳测定 CK 同工酶的方法测定 uMtCK 融合蛋白的酶活性, NBT-PMS 显色显示反应结果。Western 免疫印迹分析融合蛋白的抗原性。

1.5 抗人 uMtCK 抗体制备 将纯化的 uMtCK 蛋白与弗氏完全佐剂充分混匀, 按每只 0.5 mg/kg 背部多点肌肉注射免疫家兔, 分别于 7、14、28 d 用相同剂量的抗原与弗氏不完全佐剂混合加强免疫 3 次; 7 d 后耳缘静脉采血、试血, 兔心脏采血, 分离抗血清置 -70℃ 保存备用。

1.6 抗人 uMtCK 抗体特异性及抗体效价检测 用 Western 免疫印迹法检测抗 uMtCK 抗体与重组工程菌的总蛋白中 uMtCK 反应的特异性, 用化学发光法 ECL kit 显色。将纯化的 uMtCK 稀释至 10 μ g/ml, 包被聚乙烯微孔板, ELISA 法检测抗体效价。

1.7 免疫组化检测胃肠肿瘤组织 uMtCK 表达 uMtCK 免疫组化检测采用 EnVision 二步法; 用 PBS 替代一抗作阴性对照。结果判断, uMtCK 阳性染色为棕黄色或棕褐色, 定位于细胞核内, 采用二级计分法, 阳性细胞计数: <5%, 0 分; 5%~25%, 1 分; 25%~50%, 2 分; 50%~75%, 3 分; >75%, 4 分。染色强度分类: 淡黄色, 1 分; 黄或深黄色, 2 分; 褐或棕褐色, 3 分。两者计分乘积大于 1 者为阳性^[4]。

2 结果

2.1 人 uMtCK 基因的克隆及 pQE30-uMtCK 重组质粒的构建 以自行设计的引物对人 HeLa 细胞的总 RNA 进行 RT-PCR 获得了 1 062 bp 大小的单一片段。将其克隆到 pMD18-T 质粒, 转化受体菌 DH5 α , 经抗性筛选和酶切鉴定 (图 1) 获得了正确克隆。核苷酸序列测定结果与 GenBank 登录的 uMtCK 基因编码序列一致。构建的重组表达质粒 pQE30-uMtCK, 转化受体菌 M15, 在氨苄和卡那霉

素双抗性的 LB 液体培养基中用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4~5 h 后,产物的 SDS-PAGE 分析显示:在相对分子质量为 40 000 处出现 1 条浓染的蛋白表达条带(图 2)。

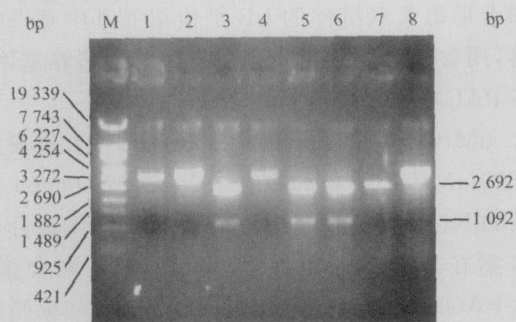


图 1 质粒 pMD18-T-uMtCK 的酶切鉴定

Fig 1 Endonuclease digestion of pMD18-T-uMtCK plasmid

M: PCR marker; 1,2,4,7,8: pMD18-T plasmid without inserting coding sequence; 3,5,6: pMD18-T-uMtCK plasmid inserted coding sequence

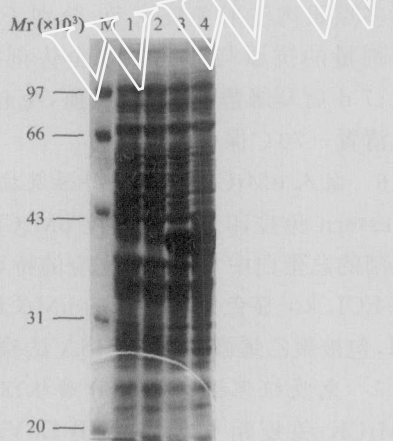


图 2 质粒 pQE30-uMtCK 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig 2 SDS-PAGE analysis of expressing products of pQE30-uMtCK

M: Protein marker; 1,2: M15 unexpressed uMtCK; 3,4: M15 expressed uMtCK

2.2 人 uMtCK 的原核表达及蛋白纯化 大量表达带有 pQE30-uMtCK 质粒的工程菌 M15,带有 His. tag 序列(含 6 个连续的组氨酸)的重组蛋白采用镍金属离子亲和层析的方法纯化。表达工程菌经诱导产生的 uMtCK 重组蛋白经扫描显示占细菌总蛋白的 17%。SDS-PAGE 电泳显示,该法纯化后的蛋白纯度可达 95%以上(图 3)。1%琼脂糖凝胶电泳测定细菌裂解上清及纯化后所得的 uMtCK 酶活性的结果如图 4 所示。Western 免疫印迹分析显示,纯化的 uMtCK 融合蛋白能够与购买的抗人 uMtCK 发生良好的抗原抗体反应(图 5)。

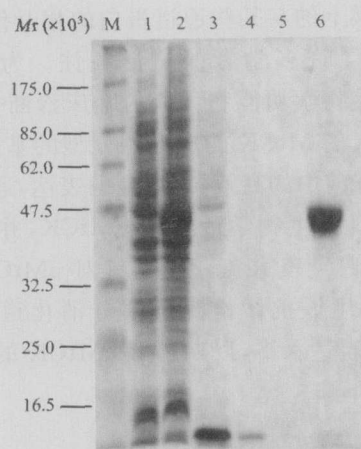


图 3 Ni-螯合亲和层析法纯化 uMtCK 融合蛋白

Fig 3 Ni-NTA purification of fusion protein uMtCK

M: Protein marker; 1: flow-through of M15 lysate; 2: induced M15; 3-5: Wash buffer; 6: Eluates

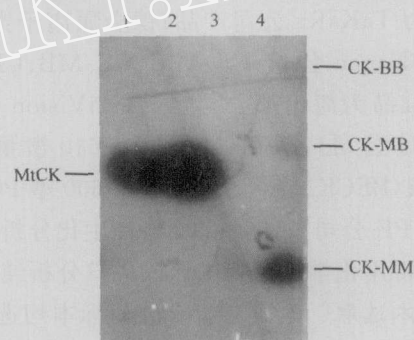


图 4 uMtCK 融合蛋白酶活性电泳测定

Fig 4 Enzyme activity assay of fusion protein uMtCK

1: CK controls; 2: Total protein of M15 not induced; 3: Total protein of M15 induced; 4: Purified uMtCK protein

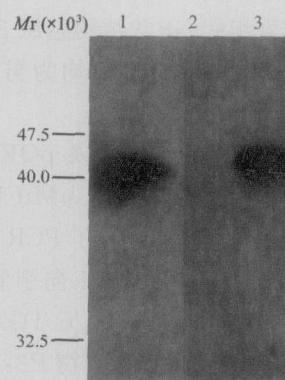


图 5 Western 印迹检测 uMtCK 融合蛋白

Fig 5 Western blotting of uMtCK

1: Purified protein of uMtCK; 2: Total protein of M15 without expression of uMtCK; 3: Total protein of M15 with expression of uMtCK

2.3 抗人 uMtCK 抗体制备和抗体特异性及抗体效价检测 对重组表达工程菌的总蛋白进行 West-

ern 印迹分析,抗 uMtCK 的多克隆抗体只与目的分子量的蛋白发生反应,没有明显的杂带出现,说明抗体具有较好的特异性(图 5)。抗血清按 1:10、1:100、1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000 的比例稀释,ELISA 法结果显示抗体的效价为 1:4 000。

2.4 胃肠肿瘤组织 uMtCK 表达 抗人 uMtCK 抗体检测 59 例胃及直肠癌肿瘤的阳性率分别为 80.0%(24/30)和 72.4%(21/29),总的阳性率为 76.5%。正常胃组织 2 例和正常结肠组织 3 例均为阴性,癌旁的正常黏膜和腺体为阴性。uMtCK 抗体免疫组化实验阳性结果如图 6 显示。

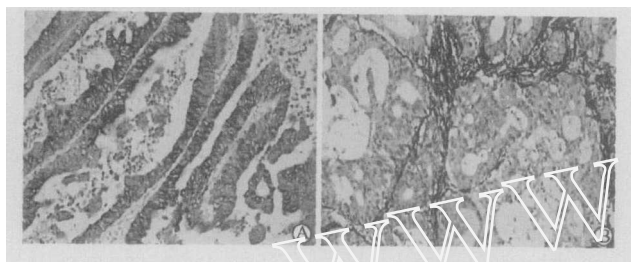


图 6 uMtCK 抗体免疫组化检测阳性结果

Fig 6 Positive result of immunohistochemistry($\times 200$)

A:Gastric cancer; B:Colonic cancer

3 讨论

MtCK 属肌酸激酶同工酶家族成员,存在于细胞内线粒体内膜和外膜间隙,是细胞能量代谢的关键酶之一。在细胞内,MtCK、胞质型的 CK、肌酸及 PCr 共同组成了细胞内的能量缓冲和转移系统,即 CK/PCr 循环,对维持细胞内的 ATP 池的稳定、调节细胞和组织的能量代谢起关键的作用^[3]。MtCK 同工酶有 2 种不同组织分布的亚型,sMtCK 严格定位于心肌和骨骼肌,而 uMtCK 与 CK-BB 共表达于脑、胎盘、肾、上皮细胞和其他组织。编码 uMtCK 的基因位于 15 号染色体,克隆的 cDNA 全长 1 527 bp,包括编码 N 末端的信号肽和全长 355 氨基酸的基因序列^[5]。

本实验以培养的肿瘤细胞 HeLa 细胞的总 RNA 为模板,成功的获得了约 1 062 bp 的单一扩增片段。通过 TA 克隆将其克隆入 pMD18-T 质粒中经酶切和 DNA 序列分析,证实所获得的片段为 uMtCK 的编码序列。用连接后的 pMD18-T 质粒载体进行 DNA 测序,是由于 RT-PCR 获得的目的 DNA 片段量较低,而用连接后的 pMD18-T 质粒载体进行 DNA 测序,只用摇菌抽提质粒就可以得到大量的目的基因。为得到具有酶活性的融合蛋白,本实验采用在非变性的条件下纯化目的蛋白。在非变

性的条件下,结合在 Ni-NTA 琼脂亲和柱上的融合蛋白可以通过不同浓度的咪唑洗脱下来。通过琼脂糖凝胶 CK 同工酶的电泳测定方法检测培养的表达和不表达 uMtCK 的大肠杆菌的裂解上清中 CK 活性,证实本实验中获得的表达的 uMtCK 是具有活性的,但其活性较天然蛋白为差,原因可能是表达的 uMtCK 在大肠杆菌中只能进行简单的折叠而不能进行真正的翻译后修饰。琼脂糖凝胶电泳中表达的 uMtCK 的电泳条带的位置在 CK-MB 和 CK-MM 之间,而不是如天然的多聚体蛋白一样泳动在 CK-MM 条带之后,可能是表达的 uMtCK 没有在大肠杆菌中组装成多聚体,其原因可能是连接在 N 末端的 6 个组氨酸阻碍了 uMtCK 在大肠杆菌中组装多聚体,因为据文献报道^[6],MtCK 的 N 末端的 7 肽对其形成二聚体和八聚体十分重要。是否能通过去除这 6 个组氨酸来更多的恢复其酶蛋白的活性尚需进一步的实验证实。

不同的国外学者报道 MtCK 在肿瘤患者中的高检出率,过量表达的 MtCK 见于乳腺癌、肺癌及淋巴瘤等各种恶性肿瘤^[7~9]、肿瘤的细胞系^[10,11]及肿瘤患者和化疗患者的血清中^[9,12]。过量表达的 MtCK 常见于各种恶性肿瘤中的原因有可能是:肿瘤组织的快速增生使其需要充足的能量供应,因而肿瘤细胞的 MtCK 的基因表达高调,同时肿瘤细胞的增生和坏死的加剧使 MtCK 漏入循环,致使血清中的 MtCK 活性升高,另外化疗药物对肿瘤细胞的破坏也可能是使 MtCK 漏入循环,致使血清中的 MtCK 活性升高。支持这一假设的根据是某些 Cr 类似物样的抑制剂具有强烈的抑制肿瘤生长的作用^[13]。需要指出的是早期的报道大多是采用电泳的方法检测 MtCK,而 MtCK 的 2 种亚型在琼脂糖电泳中是无法区分的。根据 MtCK 的 2 种亚型的组织分布,肿瘤中出现的 MtCK 的亚型应多为 uMtCK 亚型,但由于 MtCK 的两种亚型的氨基酸序列有 85% 的同源性,用抗体检测 MtCK 可能存在交叉反应,国内的学者报道^[14],用心肌提取的 sMtCK 免疫动物而获得抗血清检测肺癌的 MtCK 的阳性率为 58%,因而要提高 uMtCK 的诊断意义需要特异的高效的抗体来建立更特异和准确的方法。本实验制备的抗 uMtCK 的抗体通过 Western 免疫印迹分析证实具有较好的特异性。应用该抗体进行免疫组化的初步分析中,59 例消化道肿瘤的 uMtCK 的阳性率达到 76.5%,癌旁的正常黏膜和腺体皆为阴性,提示 uMtCK 可有助于消化道肿瘤的诊断。

目前国内对肌酸激酶不同亚型与肿瘤的关系的

研究的报道不多,本实验提纯的 uMtCK 有较高的纯度和很好的抗原性,为今后制备针对 uMtCK 的单克隆抗体提供了很好的抗原,为今后建立免疫法测定血清中的 uMtCK 来研究 uMtCK 与恶性肿瘤的相互关系奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, et al. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1102(2): 119-166.
- [2] Schlegel J, Wyss M, Schurch U, et al. Mitochondrial creatine kinase from cardiac muscle and brain are two distinct isoenzymes but both form octameric molecules[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(32): 16963-16969.
- [3] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death[J]. *Biochem J*, 1999, 341(Pt 2): 233-249.
- [4] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel anti-apoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1808-1812.
- [5] Haas RC, Korenfeld C, Zhang ZF, et al. Isolation and characterization of the gene and cDNA encoding human mitochondrial creatine kinase[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(5): 2890-2897.
- [6] Kaldis P, Furter R, Wallimann T. The N-terminal heptapeptide of mitochondrial creatine kinase is important for octamerization[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(4): 952-959.
- [7] Kanemitsu F, Kawanishi I, Mizushima J, et al. Mitochondrial creatine kinase as a tumor associated marker[J]. *Clin Chim Acta*, 1984, 138(2): 175-183.
- [8] Martin KJ, Chen SF, Clark GM, et al. Evaluation of creatine analogues as a new class of anticancer agents using freshly explanted human tumor cells[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(8): 608-613.
- [9] Pratt R, Vallis LM, Lim CW, et al. Mitochondrial creatine kinase in cancer patients[J]. *Pathology*, 1987, 19(2): 162-165.
- [10] Schiemann S, Schwirzke M, Brunner N, et al. Molecular analysis of two mammary carcinoma cell lines at the transcriptional level as a model system for progression of breast cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16(2): 129-139.
- [11] Kornacker M, Schlattner U, Wallimann T, et al. Hodgkin disease-derived cell lines expressing ubiquitous mitochondrial creatine kinase show growth inhibition by cyclocreatine treatment independent of apoptosis[J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(4): 513-519.
- [12] Lee YC, Cheng KJ, Lu FJ, et al. Serum macro creatine kinase type 2 as a tumor marker in lung cancer: comparison with carcinoembryonic antigen[J]. *J Formos Med Assoc*, 1990, 89(2): 104-109.
- [13] Bergnes G, Yuan W, Khandekar VS, et al. Creatine and phosphocreatine analogs: anticancer activity and enzymatic analysis[J]. *Oncol Res*, 1996, 8(3): 121-130.
- [14] 成继民, 陈兴, 贺占国, 等. 线粒体肌酸激酶在肺癌组织中的表达[J]. 中国现代医学杂志, 1999, 9(11): 34-35.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-10-13

[本文编辑] 曹静

High-level apoptosis is persistent in myocardiocytes of sinoaortic-denervated rats

Tao X, Zhang SH, Shen FM, Su DF (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Background: Arterial baroreflex plays an important part in the regulation of cardiovascular activity. Sinoaortic denervation (SAD) produces organ damage in rats. A previous study suggested that apoptosis in myocardium is involved in the organ damage induced by SAD. **Objective:** To study the time course of cardiomyocyte apoptosis in SAD rats by evaluating apoptotic cells and expression of apoptosis-related genes in the left ventricles of SAD rats, 4, 8, 16 and 32 weeks after SAD operation. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats underwent SAD or sham operation at the age of 10 weeks. Four, 8, 16 or 32 weeks after operation, blood samples and heart tissues were taken for the following studies: determination of angiotensin II in plasma and heart, pathological evaluations, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labelling and immunohistochemistry. Some observations were also made in rats 1 and 2 weeks after denervation. **Results:** Loss of body weight gain, cardiac hypertrophy, an increase in left ventricular collagen volume and an increase in cardiac angiotensin II content were observed in SAD rats from 2 to 32 weeks after SAD operation. The apoptotic myocardiocytes were increased in SAD rats compared with sham-operated rats. The expression of Bcl-2 protein, an inhibiting factor of apoptosis, was markedly decreased in the myocardiocytes of SAD rats. In contrast, the expression of Bax, Fas and Fas-L proteins, promoting factors of apoptosis, was significantly increased in the myocardiocytes of SAD rats. All these modifications were persistent from 4 to 32 weeks after SAD operation. **Conclusion:** These findings demonstrate that a high level of apoptosis is persistent in myocardiocytes in SAD rats. We propose that apoptosis may be one of the mechanisms underlying the cardiac damage induced by SAD.

[J Hypertens, 2004, 22(3): 557-563]