文章编号:1000-5404(2008)17-1611-04

论著

乳化异氟醚对缺氧复氧乳鼠心肌细胞的保护作用及 *bcl*-2、*bax* 表达的影响

谭兴琴[1],陈玉培[1],张文胜[2],刘 进[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院麻醉科 重庆 400010;[2]四川大学华西医院麻醉与危重急救学教研室,成都 610041)

摘 要:**目的** 观察乳化异氟醚(8% 体积分数)对培养乳鼠心肌细胞模拟缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡及凋亡相关基因 *bcl*-2、*bax* 的 mRNA 与蛋白水平表达的影响。**方法** 利用原代培养的 Wistar 乳鼠心肌细胞建立模拟心肌缺血再灌注模型,分正常培养组、模型组、脂肪乳组、乳化异氟醚(终浓度 0.28 mmol/L)。各组心肌细胞做相应分组处理后,利用倒置显微镜观察心肌细胞的生长状态和搏动频率,并用透射电镜观察细胞超微结构改变;流式细胞仪检测心肌细胞凋亡率;RT-PCR 检测心肌细胞凋亡基因 *bcl*-2 mRNA、*bax* mRNA 的表达。Western blot 定量检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果** 乳化异氟醚组和脂肪乳组均可显著降低细胞凋亡率($P<0.05$),但乳化异氟醚组与脂肪乳组比较降低更明显($P<0.05$)。乳化异氟醚可显著上调 Bcl-2 表达($P<0.05$)、下调 Bax 表达($P<0.05$);脂肪乳对 Bcl-2 和 Bax 表达无影响($P>0.05$)。**结论** 乳化异氟醚及其其中的成分之一脂肪乳可抑制模拟缺血再灌注损伤心肌细胞的凋亡,乳化异氟醚对缺氧复氧损伤的抗凋亡作用与其心肌细胞 Bcl-2 表达上调和 Bax 表达下调有关。

关键词:乳化异氟醚;再灌注损伤;心肌细胞培养;心肌保护;凋亡;*bcl*-2;*bax*
中图法分类号:R322.11;R364.4;R971.2 **文献标识码**:A

Effect of emulsified isoflurane on myocardial apoptosis and expressions of *bcl*-2 and *bax* induced by hypoxia-reoxygenation

TAN Xing-qin[1], CHEN Yu-pei[1], ZHANG Wen-sheng[2], LIU Jin[2] ([1]Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, [2]Laboratory of Anesthesiology & Critical Care Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of emulsified isoflurane on myocardial apoptosis, and the expressions of Bcl-2 and Bax after hypoxia/reoxygenation in cultured myocardial cells of neonatal rats. **Methods** Myocardial hypoxia/reoxygenation model was established on cultured primary myocardial cells of neonatal rat. The myocardial cells were divided into four groups: the normal group, model group, fat milk group, and emulsified isoflurane group. The cellular morphologic changes and pulsatile frequency of each group were observed under inverted microscope and the ultrastructure of myocardial cells was observed under transmission electron microscope. The apoptotic rate of myocardial cells was determined by flow cytometry, the expression of *bcl*-2 mRNA and *bax* mRNA were detected by RT-PCR and the protein expressions of Bcl-2/Bax were observed by Western blot. **Results** The apoptotic rate were significantly decreased in both emulsified isoflurane and fat milk groups ($P<0.05$), especially in emulsified isoflurane group. Bcl-2 expressions was significantly up-regulated and Bax expressions was down-regulated in emulsified isoflurane group ($P<0.05$), while those showed no significant changes in fat milk group ($P>0.05$). **Conclusion** Emulsified isoflurane and one of its components, fat milk, can inhibit myocardial apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation in cultured myocardial cells. Emulsified isoflurane exerts its anti-apoptosis effect maybe through up-regulating Bcl-2 expressions and down-regulating Bax expressions.

Key words: emulsified isoflurane; reperfusion injury; cultured myocardial cells; myocardial protection; apoptosis; *bcl*-2; *bax*

基金项目:国家自然科学基金(30271259)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271259)
作者简介:谭兴琴,女,重庆市梁平县人,硕士,医师,主要从事临床麻醉和心肌保护方面的研究。E-mail:tanxingqin@yahoo.com.cn
通信作者:陈玉培,E-mail:cypgxhcj@tom.com
收稿日期:2008-03-31 **修回日期**:2008-06-03

研究表明,吸入异氟醚能抑制缺氧复氧损伤后所致的心肌细胞凋亡而产生心肌保护效应[1-3]。以脂肪乳为载体静脉注射的乳化异氟醚(8% 体积分数)不仅具有良好的麻醉作用[4,5],且对在体兔缺血再灌注心肌具有明显的保护作用[5]。但乳化异氟醚能否抑制心肌细胞的凋亡,目前少见报道。本研究采用离体培养乳鼠心肌细胞建立缺氧复氧损伤模型,观察乳化异氟醚对缺氧复氧乳鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关基因 *bcl*-2 与 *bax* 的 mRNA 及蛋白水平表达的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

乳化异氟醚:华瑞制药有限公司,规格 120 mg/ml;脂肪乳(30% 英脱利匹特):华瑞制药有限公司,规格 500 ml/瓶;DMEM 培养基:GIBCO 公司(美国);胎牛血清(FBS):杭州四季青公司;Brdu:Sigma 公司(美国);Propidium iodide(PI):Becton Dickinson 公司(美国);RNA 抽提试剂盒:上海华舜生物工程有限公司;PT-PCR 试剂盒:宝生物工程大连有限公司;Bcl-2 及 Bax 抗体(美国 Newmarkers 公司)。

1.2 动物与实验仪器

健康新生 1~3 d Wistar 乳鼠 200 只,雌雄不拘,由重庆医科大学实验动物中心提供;HERA cell CO_2 培养箱和 D-37520 型高速冷冻离心机(GmbH 公司,德国);SW-CJ-IF 型净化工作台(苏州安泰技术有限公司);BH-NIC-B 型倒置显微镜(Olypus Optical 公司,日本);HH-60 型快速恒温数显水域箱(常州国华电器有限公司);EPICS Elite 型流式细胞仪(Beckman coulter 公司,美国);DY-1 电泳仪(上海医用分析仪器厂);752 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂);LNG-T83 真空干燥箱(江苏太仓医疗器械厂);PE9600 基因扩增仪(美国 ABI 公司)。

1.3 原代心肌细胞培养

按照文献[6]所建立的方法结合实际改进。取出生 1~3 d 的 Wistar 乳鼠,75% 酒精浸泡后,在无菌条件下开胸取出心脏置于预先盛有 D-Hank 液的无菌平皿内,用含抗生素的 D-Hank 灌冲洗两遍。在无菌操作台内去包膜和大血管,剪成碎泥状,移入 50 ml 离心管中,用 0.25% 胰酶和 0.125% 二型胶原酶等量混合液 37 ℃水浴消化 5 min,自然沉淀后弃上清液再加入双酶液,37 ℃水浴消化 15 min,再自然沉淀后取上清液至含等量终止液(15% 胎牛血清,85% DMEM)的离心管中终止消化。如此重复 5~7 次,使组织块消化完全。收集以后的细胞悬液经 200 钼尼龙网过滤,离心 10 min(1 000 r/min)后弃上清液,加入培养液(85% DMEM、15% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 和 0.1 mmol/L Brdu)混悬,台盼蓝染色计数,调整细胞数至 5×10^6/L。移至培养瓶中,置 37℃,5% CO_2 培养箱中培养 2 h 以纯化心肌细胞(差速贴壁法),然后接种到培养板或者培养瓶中培养。48 h 后换液。其中 Brdu 在细胞培养 72 h 内加入。

1.4 心肌细胞缺氧复氧损伤模型的建立

参照文献[7]方法,并结合本实验室条件改造。实验用经混合气体 A(95% N_2 和 5% CO_2)预先饱和 1 h 的模拟缺血溶液[(mmol/L):NaCl 98.5,KCl 10,NaH_2PO_4 0.9,$NaHCO_3$ 6.0,$CaCl_2$ 1.8,$MgSO_4$ 1.2 乳酸钠 40,HEPES 20;pH=6.8]置换正常培养溶液,将原代培养心肌细胞放入自制缺氧装置中,充入混合气体 A 后密封,将原代心肌细胞放入培养箱中培养 3 h,即为缺氧(缺血)模型。3 h 后倾弃模拟缺血液,换以用混合气体 B(95% O_2 和 5% CO_2)预先饱和 1 h 的模拟再灌注溶液[(mmol/L):NaCl 129.5,KCl 5.0,NaH_2PO_4 0.9,$NaHCO_3$ 20,$CaCl_2$ 1.8,$MgSO_4$ 1.2,葡萄糖 5.5,HEPES 20;pH=7.4;用时加 10 ml 胎牛血清],放入培养箱(95% 空气,5% CO_2,37 ℃)中,于常氧环境中继续培养 3 h,即为复氧(再灌注)模型。

1.5 实验分组

取培养 5 d(120 h)整孔搏动细胞,随机分为 4 组。正常培养组:不加药物处理,常氧条件下培养 6 h;模型组(模型建立如上述):不加药物处理,缺氧(缺氧模型)3 h 后复氧(复氧模型)3 h;脂肪乳组(浓度同乳化异氟醚中脂肪乳的浓度):用脂肪乳进行 2 h 干预后,余同模型组;乳化异氟醚组:用 8% 乳化异氟醚(终浓度 0.28 mmol/L)提前 2 h 干预后,余同模型组。

1.6 心肌细胞形态结构观察

用倒置显微镜观察心肌细胞各时期形态学变化及搏动情况;分别取各组细胞离心沉淀结块,经超薄切片和双羟染色后以透射电镜观察其超微结构变化。

1.7 心肌细胞凋亡率测定

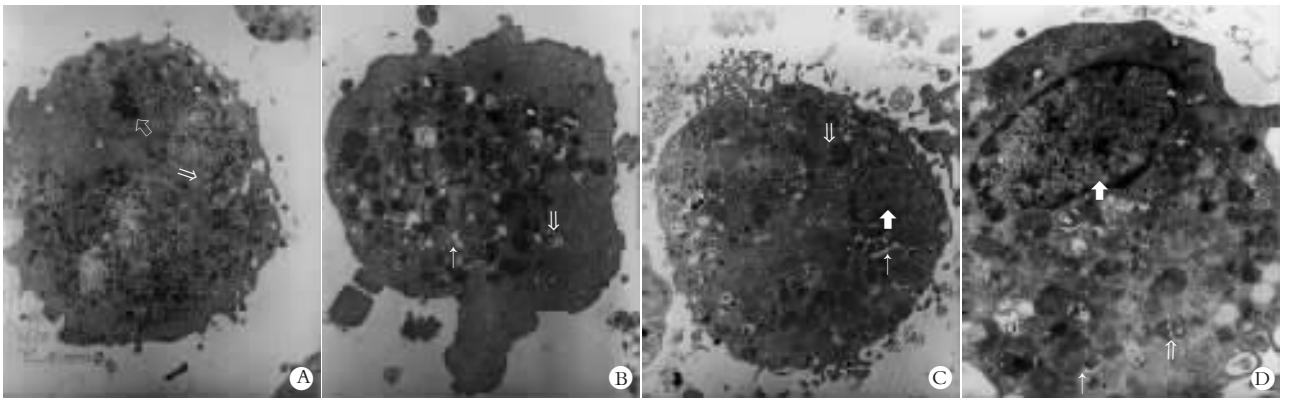
采用流式细胞仪检测。用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁心肌细胞,消化分离后收集到试管中离心 10 min(1 000 r/min),将细胞悬液用 1 ml 空针抽吸两遍制成单细胞悬液,悬于 70% 冷乙醇(4 ℃)过夜。检测时离心 10 min(1 000 r/min),PBS 洗去乙醇。细胞沉淀用 PI4℃避光染色 30 min,上机检测。G 期前的亚二倍体峰即代表凋亡峰,反映凋亡细胞的百分比。

1.8 心肌细胞 *bcl*-2 mRNA 与 *bax* mRNA 表达水平的测定

采用 RT-PCR 法测定。用 Trizol(Gibco-BCL)提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 含量,将 RNA 反转录成 cDNA,再进行 PCR 扩增。目的基因 *bcl*-2 引物序列上游为 5′-GGGATACT-GGAGATGAAGA CT-3′,下游为 3′-CCACCGAACTCAAAGAAGG-5′,预计扩增片段长度为 367 bp;目的基因 *bax* 引物序列上游:5′-AAACTGGTGCTCAAGGCCCT-3′ 下游为 5′-AGCAGCCGCT-CACGGAG-3′,预计扩增片段长度为 259 bp;β-actin 为内参,引物序列上游为 5′-CCGTAAAGACCTCTATG CCAACA-3′,下游为 5′-CGGACTCATCGTACTCCTGCT-3′,预计扩增片段长度为 230 bp。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 3 min,94 ℃ 40 s,57 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 30 个循环,72 ℃ 5 min→4℃保存。扩增片断通过琼脂糖凝胶电泳成像。采用 Image-proplus(Version 4.1,MediaCybernetics LP, USA)软件,分析条带平均光密度值(Mean density),以 *bcl*-2/β-actin、*bax*/β-actin 的比值分别表示 *bcl*-2 mRNA 和 *bax* mRNA 相对水平。

1.9 Western blot 检测心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达

取各组细胞裂解液蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳并转膜。蛋白转膜结束后,以 5% 脱脂奶粉 PBS 配制液封闭后膜置于含小鼠抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体或小鼠抗大鼠 Bax 单克隆抗



A :正常组(EM ×3 000);B :模型组(EM ×5 000);C :脂肪乳组(EM ×4 000);D :乳化异氟醚组(EM ×10 000)　↑ :内质网扩张或者轻度扩张;⇑ :线粒体;⇧ :核仁;⬆ :核

图 1　各组心肌细胞超微结构观察

体溶液中,室温摇床反应 2 h,TBS[154 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris(pH = 9.5),0.05% Tween-20]洗膜,并将膜置于含有辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体溶液中室温摇床反应 2 h 后再将膜置于 DAB 显色液中,避光反应 30 min,蒸馏水冲洗终止显色,凝胶成像系统分析结果并照相。

1.10　统计学处理

采用 SAS 9.0 统计软件对实验数据进行统计学分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析方法。

2　结果

2.1　正常心肌细胞形态变化

心肌细胞培养 24 h 出现自发性搏动,72 h 后聚集成簇,呈现频率为 80 ~ 100 次/min 的同步节律性搏动。细胞形态呈梭形或不规则三角形,伪足明显,可发生相互融合。

2.2　各组心肌细胞超微结构

正常组细胞基本结构正常,细胞表面有少量突起,胞核较小,部分细胞可见核仁,细胞质内可见散在的线粒体、内质网等细胞器;模型组可见部分线粒体出现明显肿胀,内质网扩张等超微病理改变,部分细胞还可见少量线粒体溶解坏死、核固缩、异染色质边集等改变;脂肪乳组和乳化异氟醚组细胞结构同模型组相比较,损伤程度明显减轻,可见部分细胞线粒体轻度肿胀,内质网扩张程度较轻,其中乳化异氟醚组改善更明显。见图 1。

2.2　乳化异氟醚对心肌细胞凋亡率的影响

各组心肌细胞均存在细胞凋亡。与正常组比较,模型组、脂肪乳组和乳化异氟醚组各组的心肌细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,脂肪乳组和乳化异氟醚组的心肌细胞凋亡率均显著下降($P < 0.05$)。与脂肪乳组比较,乳化异氟醚组显著下降($P < 0.05$)。见表 1。

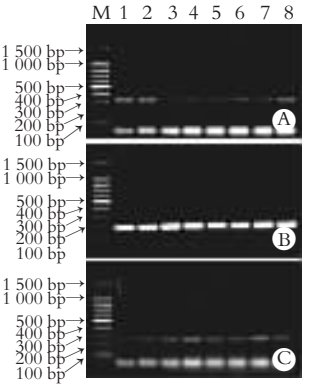
2.3　乳化异氟醚对心肌细胞 *bcl*-2 和 *bax* 基因的 mRNA 及蛋白水平表达的影响

各组心肌细胞均有表达。与正常组比较,模型组、脂肪乳组和乳化异氟醚组各组的 *bcl*-2 mRNA、Bcl-2 蛋白表达均显著下降,*bax* mRNA、Bax 蛋白表达均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,乳化异氟醚组心肌细胞 *bcl*-2 mRNA、Bcl-2 蛋白的表达显著升高,*bax* mRNA、Bax 蛋白的表达显著下降($P < 0.05$);而脂肪乳组心肌细胞 *bcl*-2 mRNA、Bcl-2 蛋白与 *bax* mRNA、Bax 蛋白的表达均无统计学差异($P > 0.05$)。各组心肌细胞内 *bcl*-2、*bax* mRNA 见表 1、图 2;各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达检测结果(光密度值)。见表 1、图 3。

表 1　各组心肌细胞的凋亡率和 *bcl*-2、*bax* 基因的 mRNA 及蛋白水平表达的比较($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率(%)	*bcl*-2/β-actin	*bax*/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin
正常组	4.82 ± 0.31	1.90 ± 0.25	0.30 ± 0.07	1.14 ± 0.12	0.24 ± 0.21
模型组	45.70 ± 6.22^{a}	0.57 ± 0.19^{a}	1.89 ± 0.19^{a}	0.21 ± 0.15a	0.97 ± 0.09^{a}
脂肪乳组	30.26 ± 7.19^{ab}	0.75 ± 0.19^{a}	1.60 ± 0.19^{a}	0.64 ± 0.13^{a}	0.76 ± 0.11^{a}
乳化异氟醚组	22.78 ± 3.56^{abc}	1.39 ± 0.24^{abc}	0.88 ± 0.24^{abc}	0.83 ± 0.11^{abc}	0.48 ± 0.18^{abc}

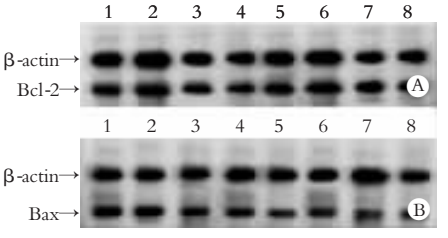
a:$P < 0.05$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与模型组比较;c:$P < 0.05$,与脂肪乳组比较



A:*bcl*-2;B:β-actin;C:*bax*

M 标准;1,2 正常组;3,5 脂肪乳组;4,7 模型组;6,8 乳化异氟醚组

图 2　各组心肌细胞 *bcl*-2 mRNA 与 *bax* mRNA 的表达



A:Bcl-2　1,2 正常组;3,4 模型组;5,6 乳化异氟醚组;7,8:脂肪乳组;B:Bax　1,2 模型组;3,4 脂肪乳组;5,6 乳化异氟醚组;7,8 正常组

图 3　各组心肌细胞 Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白的表达

3 讨论

缺血、缺氧不仅能导致心肌细胞的坏死,也可以诱导心肌细胞凋亡。细胞凋亡增多可加重心肌缺血再灌注损伤,抑制细胞凋亡则有防止心肌缺血再灌注损伤的作用。吸入麻醉药异氟醚对细胞凋亡的影响目前还存在争议。有些研究认为异氟醚可以抑制细胞凋亡,Tyther 等[8] 发现,异氟醚有抑制中性粒细胞等炎性细胞凋亡的作用,且抑制凋亡程度与异氟醚浓度呈剂量依赖关系;异氟醚还能够抑制因缺氧缺糖而引起的凋亡[9];也有的研究认为异氟醚能够增加所接触细胞的凋亡[10]。异氟醚诱导预处理对缺血再灌注心肌可以抑制心肌细胞的凋亡,且其抑制心肌细胞凋亡与上调抗凋亡基因 *bcl-2* 家族、下调促凋亡基因 *bax* 等的表达有关[2]。

8% 乳化异氟醚是正在研发的一个新药,它是异氟醚以脂肪乳为载体在一定条件下制成的。本实验研究通过电镜观察显示在缺氧复氧损伤时心肌细胞损伤严重,细胞线粒体明显肿胀,甚至部分坏死,内质网空泡化,存在凋亡前及凋亡期的典型形态学变化;且其心肌细胞凋亡率显著升高。与以往的结论相符,即缺氧复氧可诱导心肌细胞凋亡,且凋亡越重,心肌细胞损伤越重。而加入乳化异氟醚和脂肪乳的两组,其形态结构明显改善,凋亡率显著下降,其中 8% 乳化异氟醚的抑制凋亡的作用更显著。提示乳化异氟醚对缺血再灌注损伤心肌细胞有保护作用其保护作用可能与其抗凋亡有关,缺血再灌注心肌细胞凋亡的发生是在多种凋亡相关基因的调控下进行的,其中 *bcl-2*、*bax* 凋亡基因被认为是最重要的细胞凋亡基因。目前认为,定位于核膜、内质网膜及线粒体膜上的 Bcl-2 蛋白对许多因素引发的细胞凋亡有抑制或延缓作用[11],被认为是心肌缺血再灌注损伤的自救基因[12]。现已明确 *bcl-2* 表达产物可阻断 *bax*、*fas* 等基因产物激活细胞凋亡信号传递系统的最后通路,从而促进细胞成活。Bax 是与 Bcl-2 结构相似的一种蛋白,但它的作用与 Bcl-2 蛋白完全相反,有促进细胞凋亡的作用。Hochhauser 等[13] 用转基因鼠实验证实,*bax* 基因高表达可促进心肌细胞凋亡,表达的程度与心肌凋亡的程度呈正相关。Bax 蛋白通过与线粒体上 Bcl-2 蛋白形成二聚体发挥作用,当 Bax 高表达时,形成同源二聚体 Bax/Bax 促进凋亡;Bcl-2 高表达时,形成异源二聚体 Bcl-2/Bax 抑制凋亡发生。Bcl-2 和 Bax 两者的比例决定细胞是生存还是凋亡。Bcl-2 表达升高,则细胞生存;Bax 表达上调,则细胞发生凋亡。本实验的研究结果显示,正常心肌细胞中的 Bcl-2 的表达较高、Bax 的表达较少,此时心肌细胞的凋亡也很少;缺氧复氧损伤组 Bcl-2 的表达明显减少,Bax 的表达明显增多,此时心肌细胞的凋亡显著增多;8% 乳化异氟醚给药组可以提高 Bcl-2 的表达,降低 Bax 的表达,Bcl-2/Bax 的比值也得到显著的提高,使心肌细胞的凋亡减少。脂肪乳作为乳化异氟醚的其中一个成分,对 Bcl-2 和 Bax 的表达无影响,其 *bcl-2/bax* 的比值和缺氧复氧损伤模型组比较也没有统计学意义,所以其抗凋亡的作用较弱。

综上所述,乳化异氟醚及其其中的成分脂肪乳对模拟缺血再灌注损伤心肌细胞有保护作用及抑制模拟缺血再灌注损伤心肌细胞的凋亡;且其抗凋亡作用可能与心肌细胞 Bcl-2 的表达上调和 Bax 的表达下调有关。

参考文献:

[1] Raphael J, Abedat S, Rivo J, *et al*. Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins [J]. Pharmacal Exp Ther, 2006, 318(1): 186 – 194.

[2] Wang C, Neff D A, Krolikowski J G, *et al*. The influence of B – cell lymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits[J]. Anesth Analg, 2006, 102(5): 1355 – 1360.

[3] Jamnicki-Abegg M, Weihrauch D, Pagel P S, *et al*. Isoflurane inhibits cardiac myocyte apoptosis during oxidative and inflammatory stress by activating Akt and enhancing Bcl-2 expression [J]. Anesthesiology, 2005, 103(5): 1006 – 1014.

[4] Chiari P C, Pagel P S, Tanaka K, *et al*. Intravenous emulsified halogenated anesthetics produce acute and delayed preconditioning against myocardial infarction in rabbits[J]. Anesthesiology, 2004, 101(5): 1160 – 1166.

[5] 陈永权, 金孝炬, 戴泽平, 等. 乳化异氟醚预处理对兔缺血再灌注心肌血流动力学的影响[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2006, 27(4): 224 – 226.

[6] 王 娜, 关 鹏, 段相林, 等. 新生大鼠心肌细胞原代培养方法的改进[J]. 河北师范大学学报:自然科学版, 2007, 31(2): 256 – 259, 263.

[7] 赵晓辉, 彭毅志, 王元元. 缺氧复氧心肌细胞中 HSP90 对 AKT 表达的调控作用[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(4): 521 – 524.

[8] Tyther R, Fanning N, Halligan M, *et al*. The effect of the anaesthetic agent isoflurane on the rate of neutrophil apoptosis *in vitro*[J]. Ir J Med Sci, 2001, 170(1): 41 – 44.

[9] Wise-Faberowski L, Raizada M K, Summners C. Oxygen and glucose deprivation-induced neuronal apoptosis is attenuated by halothane and isoflurane[J]. Anesth Analg, 2001, 93(5): 1281 – 1287.

[10] 张光明, 瞿 涤, 蒋 豪, 等. 异氟醚对人单核细胞株 THP-1 细胞凋亡的影响[J]. 中国临床医学, 2005, 12 (4): 651 – 653.

[11] Qin F, Shite J, Mao W, *et al*. Selegiline attenuates cardiac oxidative stress and apoptosis in heart failure: association with improvement of cardiac function[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 461(3): 149 – 158.

[12] Hofstaetter B, Taimor G, Inserte J, *et al*. Inhibition of apoptotic responses after ischemic stress in isolated hearts and cardiomyocytes [J]. Basic Res Cardiol, 2002, 97(6): 479 – 488.

[13] Hochhauser E, Kivity S, Offen D, *et al*. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(6): H2351 – H2359.

(编辑 王小寒)