文章编号:1000-5404(2012)11-1071-04

论著

低 pH 液复灌对兔心肌缺血再灌注的保护作用与 Bcl-2、Bax 表达的关系

刘 柳,杨海燕,刘新伟,王群英 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院麻醉科)

[摘要] **目的** 探讨低 pH 液复灌对体外循环(extracorporeal circulation, ECC)下兔缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)心肌的保护作用与 Bcl-2、Bax 表达的关系。**方法** 成年新西兰大白兔 30 只,完全随机分为 5 组($n=6$):对照组(C 组)不停跳,体外循环 180 min;缺血再灌注组(I/R 组)全心缺血 40 min,再灌注 120 min;pH=7.4 组与 pH=6.9 组于再灌注前 2 min 予 37 ℃的 95% O_2 +5% CO_2 饱和的 pH 值为 7.4 或 6.9 的 K-H 液灌注;缺血后处理组(P 组)再灌注的前 2 min 给予缺血后处理。体外循环结束后,光镜观察心肌形态学变化;ELISA 测定血清肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)浓度; RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax mRNA 的表达;免疫组化检测 Bcl-2、Bax 蛋白的表达。**结果** 与 I/R 组比较,pH=6.9 组和 P 组心肌组织损伤较轻,cTnI 浓度较低($P<0.05$),pH=6.9 组 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平明显增高[(1.058 1±0.165 7) *vs* (0.648 2±0.070 8),(0.233 1±0.022 5) *vs* (0.156 5±0.019 2),$P<0.05$],Bax mRNA 和蛋白表达水平明显降低[(1.353 3±0.138 1) *vs* (1.901 7±0.198 1),(0.173 5±0.015 1) *vs* (0.247 1±0.021 3),$P<0.05$];pH=6.9 组和 P 组之间 Bcl-2、Bax 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 体外循环下再灌注初短暂低 pH(pH=6.9)液复灌可以模拟缺血后处理的心肌保护作用,其保护机制与调节 Bcl-2、Bax 的表达有关。

[关键词] 体外循环;再灌注损伤;bcl-2 基因;bcl 相关 X 蛋白质;兔
[中图法分类号] R322.11; R654.1; R973.5 [文献标志码] A

Correlation between protective effect of low pH solution reperfusion on myocardial ischemia/reperfusion and expression of Bcl-2 and Bax in rabbits

Liu Liu, Yang Haiyan, Liu Xinwei, Wang Qunying (Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between protective effect of low pH solution reperfusion on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) and expression of Bcl-2 and Bax in rabbits undergoing extracorporeal circulation. **Methods** Thirty adult New Zealand white rabbits were randomly divided into control group, I/R group, pH 7.4 group, pH 6.9 group, and post-ischemia conditioning group (6 in each group). Rabbits in control group underwent extracorporeal circulation for 180 min, those in I/R group underwent reperfusion for 120 min after 40 min of myocardial ischemia, those in pH 7.4 group and pH 6.9 group received a K-H solution at 37 ℃ containing 95% O_2 +5% CO_2 at pH 7.4 or pH 6.9 in 2 min before they underwent reperfusion, and those in post-ischemia conditioning group were conditioned 2 min before they underwent reperfusion. Changes in their myocardial morphology were observed under light microscope, their serum cardiac troponin I (cTnI) level was measured by ELISA, expressions of Bcl-2 and Bax mRNA and protein were detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results** The myocardial tissue injury was milder and the cTnI level was lower in pH6.9 group and post-ischemia conditioning group than in I/R group (0.648 2±0.070 8 *vs* 1.058 1±0.165 7, 0.156 5±0.019 2 *vs* 0.233 1±0.022 5, $P<0.05$). The expression level of Bcl-2 mRNA and protein was significantly higher and the expression level of Bax mRNA and protein was significantly lower in pH 6.9 group than in I/R group and post-ischemia conditioning group (1.058 1±0.165 7 *vs* 0.648 2±0.070 8 and 0.233 1±0.022 5 *vs* 0.156 5±0.019 2, 1.353 3±0.138 1 *vs* 1.901 7±0.198 1 and 0.173 5±0.015 1 *vs* 0.247 1±0.021 3, $P<0.05$). No significant difference was found in expression level of Bcl-2 and Bax mRNA and protein between pH6.9 group and post-ischemia conditioning group ($P>0.05$). **Conclusion** Transient low pH solution reperfusion can protect heart against I/R injury in rabbits undergoing extracorporeal circulation by mimicking the post-ischemic conditioning and

[基金项目] 重庆市卫生局医学科学技术研究项目(2009-2-344)
[通信作者] 刘新伟,E-mail:xxwwliu@yahoo.com.cn

regulating the expression of Bcl-2 and Bax.

[**Key words**] extracorporeal circulation; reperfusion injury; genes, bcl-2; bcl-2-associated protein; rabbits

Supported by the Project of Medical Sci & Tech Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-344). Corresponding author: Liu Xinwei, E-mail: xxwwliu@yahoo.com.cn

心肌缺血再灌注损伤是心血管外科中常见的并发症,其造成的心功能不全,也是心血管外科术后患者死亡的一项重要原因。缺血后处理(ischemic postconditioning)已有较多的研究[1-2]证实其具有明确减轻心肌缺血再灌注损伤的作用,但其机制尚不完全清楚,且缺血后处理操作的复杂性及其阻断主动脉血流可能对患者造成的潜在风险,都限制了其在心血管外科临床中的应用。近年来研究[3-4]显示缺血后处理可通过短暂的延长缺血再灌注初心肌的酸中毒状态,并进而激活心肌内源性的保护机制,产生心肌保护作用,这就是缺血后处理的pH假说。研究[5-6]表明缺血再灌注初给予酸性复灌具有与缺血后处理相似的心肌保护作用,有效减轻心肌缺血再灌注损伤。本实验拟研究体外循环下再灌注初短暂低pH液复灌对兔缺血再灌注心肌的保护作用与Bcl-2、Bax表达的关系,探讨酸性复灌心肌保护的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年健康新西兰大白兔30只,雌雄不拘,体质量2.5~3.0 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 兔肌钙蛋白I ELISA试剂盒(RD公司,美国),PCR试剂盒(北京天根公司),抗Bcl-2和抗Bax单克隆抗体(Santa Cruz公司,美国),免疫组化二抗试剂盒和DAB试剂盒(北京中杉公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 新西兰大白兔30只,完全随机分为5组($n=6$):对照组(C组)、缺血再灌注组(I/R组)、pH=7.4组、pH=6.9组、缺血后处理组(P组)。C组仅建立体外循环,不停跳,体外循环180 min;其余各组建立体外循环后并行循环20 min,再全心缺血40 min,I/R组全心缺血40 min后直接开放主动脉,再持续体外循环灌注120 min;pH=7.4组、pH=6.9组于复灌初2 min经主动脉分别持续灌注pH值为7.4和6.9的37 ℃由95% O_2 +5% CO_2的混合气体平衡30 min的K-H缓冲液(mmol/L:118.5 NaCl、4.7 KCl、1.2 $MgSO_4$、1.2 KH_2PO_4、2.5 $CaCl_2$、25.0 $NaHCO_3$、11.1葡萄糖)4.5 ml/kg,P组于复灌初2 min给予开放主动脉10 s再阻断10 s,共重复6次的缺血后处理。

1.2.2 兔体外循环(extracorporeal circulation, ECC)模型的建立 实验兔经静脉注射3%戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉,气管切开插管,小动物呼吸机辅助呼吸,监测心电图、肛温,右股动脉置20G套管针监测连续动脉血压。全身肝素化(680 U/kg),左颈总动脉逆行置入18G套管针行动脉灌注,内径4 mm的静脉引流管经右颈总静脉插入右心房,停跳液灌注针经右颈总动脉处插入至主动脉根部。BT-300E型蠕动泵(重庆杰恒蠕动泵有限公司)进行转流,D901婴儿膜肺(Dideco公司,意大利)进行氧合,灌注流量为70~100 ml/(kg·min),维持CPB中平均动脉压在55~60 mmHg以上,并行循环15 min,开始降温,肛温降至28~30 ℃后阻断主动脉,主动脉根部灌注15~20 ml/kg 4 ℃ St. Thomas Ⅱ停搏液(mmol/L:110.0 NaCl、1.2 $CaCl_2$、10.0 $NaHCO_3$、16.0 KCl、16.0 $MgCl_2$),全心缺血40 min,复灌前10 min开始复温,到34 ℃开始复灌,使心脏复跳。复灌120 min停体外循环,采集标本。

1.3 观察指标

1.3.1 心肌组织形态学观察 各组取左室同一部位心肌组织,4%多聚甲醛固定12 h,石蜡包埋,切片HE染色后,光学显微镜下观察心肌组织形态学改变。

1.3.2 血清心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)浓度测定 停体外循环时经股动脉采集动脉血,静置、离心、取上清,根据cTnI ELISA试剂盒说明书用测定各组cTnI浓度。

1.3.3 RT-PCR检测心肌组织Bcl-2、Bax mRNA的表达 Bcl-2、内参β-actin引物由上海生物工程技术服务有限公司设计、合成,Bcl-2上下游引物序列分别为:5′-CAAGCCGGGAGAACAGGGTATGATA-3′, 5′-ACGGTAGCGACGAGAGAAGTCATCC-3′,产物长度312 bp;β-actin:5′-TGGCATCCACGAGACCACCTTCA-3′, 5′-GACTGCTGTCACCTTCACCGTTCC-3′, 产物长度496 bp; Bax引物参考文献[7]中的序列由上海生物工程技术服务有限公司合成:上游5′-AAGCTGAGCGAGTGTCTCCGGCG-3′,下游5′-GCCACAAAGATGGTCACTGTCTGCC-3′,产物长度284 bp。使用Quantity One软件对扩增产物电泳图片行半定量分析,目的基因相对光密度=目的基因光密度值/内参β-actin光密度值。

1.3.4 免疫组化检测心肌组织Bcl-2、Bax表达 各组取左室同一部位心肌组织,石蜡切片,煮沸法抗原修复,血清封闭,一抗(1∶100)、4 ℃过夜;二抗37 ℃孵育30 min;辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液37 ℃孵育30 min;DAB显色,显微镜下控制染色深度;苏木精复染,脱水,晾干,透明,中性树胶封片,光镜下阳性产物呈棕黄色。每张切片随机选取5个视野,Image-Pro Plus软件测定心肌组织中阳性产物平均光密度值,通过光密度值的大小来反映目的蛋白的表达情况。

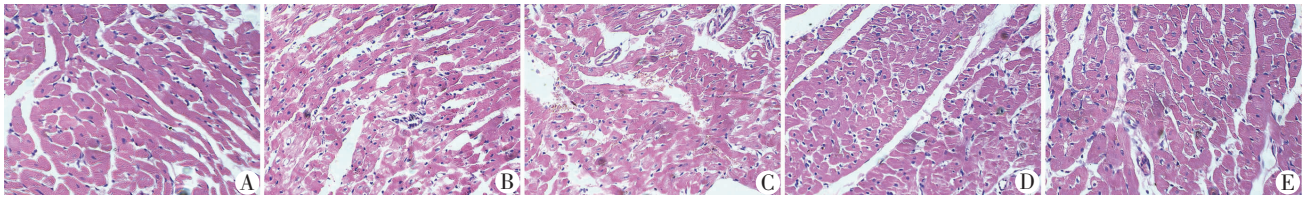
1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用多组间单因素方差分析,两两比较采用SNK-q检验。

2 结果

2.1 光镜检查心肌组织形态学

C组心肌细胞胞膜完整,界限清楚,无明显变性坏死;I/R组及pH=7.4组心肌细胞界限不清,胞浆嗜酸性增强,部分细胞可见空泡变性、溶解坏死及散在核固缩,心肌间质水肿明显;pH=6.9组和P组心肌细胞胞膜相对完整,变性坏死范围较小,间质水肿不明显,见图1。

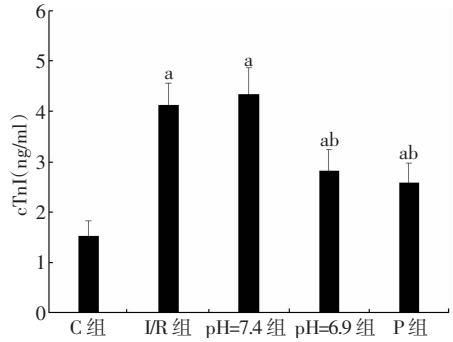


A：C 组；B：I/R 组；C：pH=7.4 组；D：pH=6.9 组；E：P 组

图 1　光镜观察各组心肌组织损伤程度（HE ×400）

2.2　各组兔血清心肌 cTnI 浓度测定结果

与 C 组比较，各组血清 cTnI 浓度均增加（$P<0.05$）；与 I/R 组比较，pH=6.9 组和 P 组 cTnI 浓度均降低（$P<0.05$），pH=7.4 组 cTnI 浓度差异无统计学意义（$P>0.05$）；pH=6.9 组和 P 组之间比较，cTnI 浓度差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 2。



a：$P<0.05$，与 C 组比较；b：$P<0.05$，与 I/R 组比较

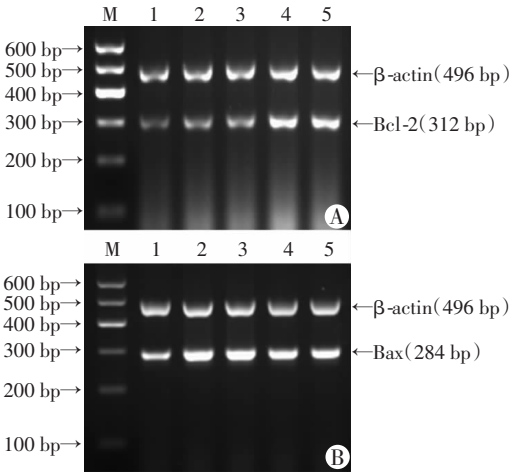
图 2　各组血清心肌肌钙蛋白 I 浓度的比较

2.3　RT-PCR 测定 Bcl-2、Bax mRNA 水平

与 C 组比较，各组 Bcl-2 与 Bax mRNA 表达水平均增高（$P<0.05$）；与 I/R 组比较，pH=6.9 组和 P 组 Bcl-2 mRNA 表达水平明显升高（$P<0.05$），Bax mRNA 表达均降低（$P<0.05$）；pH=6.9 组和 P 组之间比较、I/R 组和 pH=7.4 组之间比较，Bcl-2、Bax mRNA 表达水平差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 3，表 1。

2.4　各组兔心肌 Bcl-2、Bax 表达的免疫组化检测结果

各组心肌细胞质中均有 Bcl-2、Bax 蛋白表达，与 C 组比较，各组 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达均增加（$P<0.05$）；与 I/R 组比较，pH=6.9 组和 P 组 Bcl-2 表达明显增加（$P<0.05$），Bax 表达均降低（$P<0.05$）；pH=6.9 组和 P 组之间比较、I/R 组和 pH=7.4 组之间比较，Bcl-2、Bax mRNA 表达水平差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 4、5，表 1。



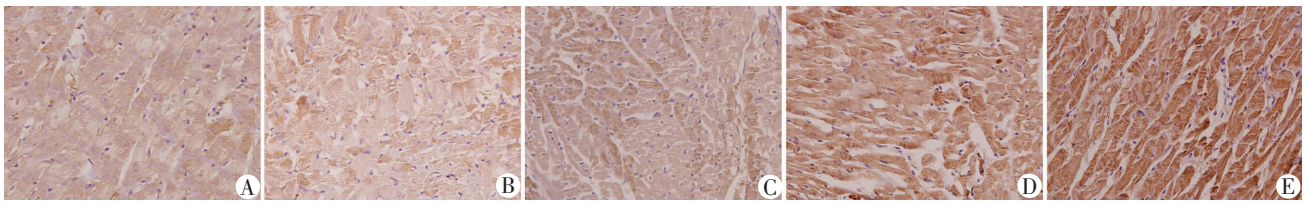
M：DNA 标准；1：C 组；2：I/R 组；3：pH=7.4 组；4：pH=6.9 组；5：P 组
A：Bcl-2；B：Bax

图 3　各组兔心肌组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达

表 1　各组兔心肌 Bcl-2、Bax 相对表达的比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

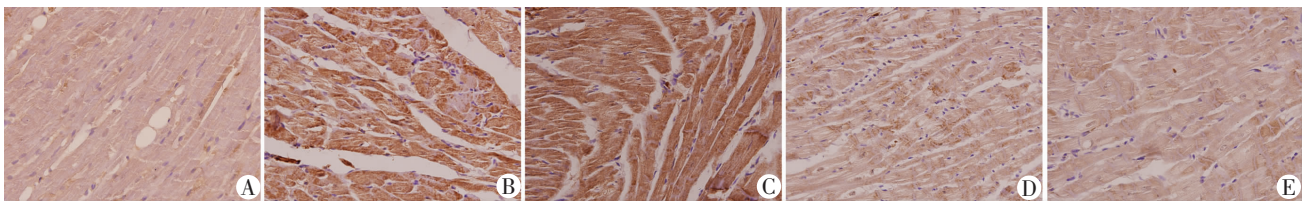
组别	Bcl-2		Bax	
	RT-PCR	免疫组化	RT-PCR	免疫组化
C 组	0.535 7±0.069 1	0.135 2±0.020 3	0.945 0±0.190 9	0.125 1±0.011 7
I/R 组	0.648 2±0.070 8^{a}	0.156 5±0.019 2^{a}	1.901 7±0.198 1^{a}	0.247 1±0.021 3^{a}
PH=7.4 组	0.660 9±0.067 2^{a}	0.151 3±0.021 7^{a}	1.838 3±0.129 7^{a}	0.245 7±0.023 6^{a}
PH=6.9 组	1.058 1±0.165 7^{ab}	0.233 1±0.022 5^{ab}	1.353 3±0.138 1^{ab}	0.173 5±0.015 1^{ab}
P 组	1.062 9±0.132 6^{ab}	0.221 9±0.024 6^{ab}	1.323 1±0.131 9^{ab}	0.178 6±0.017 2^{ab}

a：$P<0.05$，与 C 组比较；b：$P<0.05$，与 I/R 组比较



A：C 组；B：I/R 组；C：pH=7.4 组；D：pH=6.9 组；E：P 组

图 4　各组兔心肌 Bcl-2 表达　（S-P ×400）



A：C 组；B：I/R 组；C：pH=7.4 组；D：pH=6.9 组；E：P 组

图 5　各组兔心肌 Bax 表达　（S-P ×400）

3 讨论

近年来研究发现缺血后处理能激活心肌内源性的保护机制,减轻缺血再灌注损伤,产生心肌保护作用,而对再灌注心肌 Bcl-2 和 Bax 基因表达的调控是其重要的保护机制之一。Bcl-2 基因家族是调控细胞线粒体凋亡途径的关键[8],Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 基因家族中最重要的一对基因,其表达产物 Bcl-2 蛋白具有抑制细胞凋亡的作用;Bax 蛋白则能促进细胞凋亡,而 Bcl-2 和 Bax 的表达比例是决定细胞是否存活的关键,缺血后处理通过上调 Bcl-2 和下调 Bax 的表达促进再灌注心肌生存,产生心肌保护作用[9-11]。

线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是位于线粒体内外膜上,由多种蛋白构成的复合蛋白孔道,正常情况下 MPTP 处于关闭或低通透性状态,缺血再灌注导致的细胞内 Ca^{2+} 增加、活性氧(ROS)堆积、pH 变化均能促使 MPTP 开放。MPTP 开放一方面导致线粒体释放前凋亡因子细胞色素 C、AIF 等进入胞质,继而激活细胞线粒体凋亡途径,诱导细胞发生凋亡;另一方面当 MPTP 大量开放时,线粒体通透性转换引起的不可逆性的线粒体内膜电位去极化,能量生成减少可以导致细胞坏死[12];凋亡和坏死是缺血再灌注导致心肌细胞死亡的两种主要形式。Bcl-2 家族是调控 MPTP 的开闭状态的重要因素,Bax 能促进 MPTP 开放,释放细胞色素 C,诱导细胞凋亡[13],Wang 等[11]发现缺血后处理通过 Bcl-2 间接抑制 MPTP 开放,减少缺血再灌注心肌梗死面积,发挥心肌保护作用。

本研究选用体外循环实验动物全心缺血再灌注模型,模拟心脏外科手术中心脏缺血再灌注过程,实验中 pH=6.9 的 K-H 液复灌具有与缺血后处理相近的减轻缺血再灌注心肌组织形态变化和抑制血清 cTnI 浓度升高的作用,提示低 pH 液复灌能模拟缺血后处理的心肌保护作用。与 I/R 组和 pH=7.4 组比较,pH=6.9 组 Bcl-2 的蛋白及 mRNA 表达水平明显升高,Bax 表达水平明显降低,其变化与缺血后处理组相似,提示低 pH 液复灌对缺血再灌注心肌保护作用,与通过调节 Bcl-2 与 Bax 基因相应的表达的变化,激活心肌内源性保护机制有关。而低 pH 液复灌通过怎样的细胞内信号转导激活心肌内源性保护机制,调控 Bcl-2 基因家族仍不清楚,仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Philipp S, Yang X M, Cui L, *et al*. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade[J]. Cardiovasc Res, 2006, 70(2): 308-314.

[2] Lim S Y, Davidson S M, Hausenloy D J, *et al*. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore[J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(3): 530-535.

[3] Cohen M V, Yang X M, Downey J M. The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis[J]. Circulation, 2007, 115(14): 1895-1903.

[4] Fujita M, Asanuma H, Hirata A, *et al*. Prolonged transient acidosis during early reperfusion contributes to the cardioprotective effects of postconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(4): H2004-H2008. 13

[5] 乔欣, 刘新伟. 酸处理对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的影响及PI3K/Akt信号通路在其中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2009, 29(3): 272-275.

[6] 杨海燕, 刘新伟, 马亚飞, 等. 低pH液复灌对兔缺血再灌注心肌内质网应激与细胞凋亡的影响研究[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(1): 31-34.

[7] 秦怀洲, 高国栋, 赵振伟, 等. 实验性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛兔海马组织中Bcl-2和Bax mRNA的表达[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(9): 776-778.

[8] Lindsay J, Esposti M D, Gilmore A P. Bcl-2 proteins and mitochondria: specificity in membrane targeting for death[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4): 532-539.

[9] He B, Xiao J, Ren A J, *et al*. Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning [J]. J Biomed Sci, 2011, 18: 22.

[10] Sun H Y, Wang N P, Halkos M, *et al*. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis *via* inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways[J]. Apoptosis, 2006, 11(9): 1583-1593.

[11] 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.

[12] Weiss J N, Korge P, Honda H M, *et al*. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease[J]. Circ Res, 2003, 93(4): 292-301.

[13] Perrelli M G, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species[J]. World J Cardiol, 2011, 3(6): 186-200.

(**收稿**:2011-10-28;**修回**:2012-01-20)

(编辑 吴培红)