基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1187-04

Urocortin 后处理抑制线粒体凋亡通路保护心肌缺血再灌注损伤

欧 袁,杨双强,辛 东
(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 Urocortin(UCN)后处理对缺血大鼠心肌线粒体凋亡通路的影响,探讨其心肌保护的可能机制。方法:24 只 Wistar 大鼠随机分为 3 组,每组 8 只,分为对照组(CON),缺血再灌注组(I/R),Urocortin(UCN)组。CON 组大鼠麻醉后直接开胸取左心室肌作缺血前对照。I/R 组,建立离体心脏 Langendorff—Neely 模型,灌注 K-H 缓冲液 30 min 后,主动脉根部灌注 4℃ St.Thomas-2 心脏停搏液,低温下心脏停跳 30 min,复灌 K-H 缓冲液 90 min 后,取左心室肌备检。UCN 组,低温下心脏停跳 30 min 后,复灌含 Urocortin 浓度为 10^{-8} mol/L 的 K-H 缓冲液 90 min,取左心室肌备检。蛋白免疫印迹(Western blot)法检测各组心肌细胞线粒体凋亡通路的标志性蛋白 CytoC 从线粒体的释放,免疫组化法检测各组心肌细胞 Caspase-3 蛋白的表达。原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡。结果:Western blot 检测显示 CON 组,I/R 组,UCN 组胞浆中 CytoC 量分别为 0.56 ± 0.05,1.29 ± 0.02,0.88 ± 0.07,I/R 组,UCN 组高于 CON 组($P<0.05$),UCN 组低于 I/R 组($P<0.05$);免疫组化显示 CON 组,I/R 组,UCN 组 Caspase-3 蛋白表达量分别为 0.15 ± 0.22, 0.36 ± 0.15,0.24 ± 0.20,I/R 组,UCN 组高于 CON 组($P<0.05$),UCN 组低于 I/R 组($P<0.05$);各组心肌细胞凋亡指数分别为 2.29 ± 0.67, 12.81 ± 0.62, 6.77 ± 1.12,I/R 组,UCN 组高于 CON 组($P<0.05$),UCN 组低于 I/R 组($P<0.05$)。Caspase-3 蛋白表达与胞浆中 CytoC 含量呈正相关($r=0.775$, $P<0.05$);心肌组织中心肌细胞凋亡指数与胞浆中 CytoC 含量呈正相关($r=0.865$, $P<0.05$)。结论:Urocortin 后处理能够抑制细胞凋亡,其机制可能与抑制线粒体释放 CytoC 和随后的 Caspase-3 的激活,抑制线粒体通路的细胞凋亡有关。

【关键词】Urocortin;心肌保护;细胞凋亡;半光氨酸基天冬氨酸特异性蛋白酶 -3;细胞色素 C
【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-30

Urocortin-postconditioning protects heart from ischemia-reperfusion injury through interfering mitochondria-dependent apoptotic pathway

OU Yuan, et al
(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Urocortin-postconditioning on mitochondria-dependent apoptotic pathway. *Methods*: 24 Wistar rats were randomly divided into 3 groups ($n=8$): Control group (CON), I/R group (I/R), Urocortin group (UCN). The left ventricular samples in the Control group were collected as pre-ischemia controls through thoracotomy. After isolated heart Langendoff and Neely models were established, the rat hearts in the I/R group and the UCN group were continuously perfused with Krebs-Henseleit (K-H) buffer solution for 30 min, then the rat hearts were arrested by cardioplegia, St.Thomas-2 solution (STH-2) for 30min. After that, the rat hearts in the I/R group were reperfused with K-H buffer solution for 90 min. The rat hearts in the UCN group were reperfused with K-H buffer solution containing 10^{-8} mol/L Urocortin for 90 min. The releasing of Cyto C protein into cytosol was detected by Western blot. The expression of Caspase-3 protein in cardiomyocyte was detected by immunohistochemical assay. The apoptosis index (AI) of cardiomyocyte was detected by TUNEL. *Results*: Compared with Control group, the expression of Caspase-3 and Cyto C protein in the I/R group and the UCN group were significantly increased ($P<0.05$). Caspase-3 and Cyto C protein in the UCN group were lowly expressed than those in the I/R group (0.24 ± 0.70 vs 0.36 ± 0.15, $P<0.05$, 0.88 ± 0.07 vs 1.29 ± 0.02, $P<0.05$). After reperfusion, apoptosis index (AI) in the I/R group and UCN group were significantly higher than that in the Control group ($P<0.05$); Compared with I/R group group, AI in UCN group was decreased increased (6.77 ± 1.12 vs 12.81 ± 0.62, $P<0.05$). The expression of Caspase-3 protein had a positive correlation with Cyto C protein in cytosol ($r=0.775$, $P<0.05$), and the apoptosis index (AI) of cardiomyocyte had a positive correlation with Cyto C protein in cytosol ($r=0.865$, $P<0.05$). *Conclusion*: Urocortin protect hearts from ischemic-reperfusion injury through interfering mitochondria-dependent apoptotic pathway.

【Key words】Urocortin; Myocardial protection; Apoptosis; Caspase-3; Cyto C

作者介绍:欧 袁(1981-),硕士,
研究方向:心肌保护。现工作单位:重钢总医院。
通讯作者:杨双强,男,教授,E-mail:yysq@163.com。

细胞凋亡是心肌缺血/再灌注损伤(Myocardial ischemia/reperfusion injury,MI/RI)后心肌细胞死亡的最主要形式。随着研究的深入,线粒体被认为是缺血再灌注损伤和各种保护机制(IPC,I-postC 等)的终末效应器。目前认为,线粒体通过释放细胞色素 C(Cytochrome C,CytoC)等促凋亡因子至胞浆,再激活其下游的半胱氨酸基天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)介导细胞的凋亡[1],此过程被称作线粒体凋亡通路。

目前已在多种属动物模型上证实缺血后处理(Ischemic postconditioning, I-postC),具有心肌保护作用[2]。近来有在再灌注时或再灌注前不久用药观察其保护作用的研究,即所谓的药物后处理。因药物使用方便,若能证实其与缺血后处理发挥同样的保护效应,在临床上将具有更为广泛的前景。

研究发现,Urocortin(UCN)在在体和离体试验中发挥多种生物学效应,如增强心肌收缩力,提高心率及增加心输出量等心血管应激机制,并通过增加冠脉血流及对抗心肌缺血再灌注损伤,而产生心脏保护作用。UCN 后处理对线粒体凋亡通路的影响目前未知。本实验通过建立离体大鼠缺血再灌注模型,观察 UCN 后处理对线粒体凋亡通路的影响,探讨其发挥心肌保护作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

成年 Wistar 大鼠 24 只,雌雄不拘,体重 200～250 g(第三军医大学大坪医院实验动物中心);Urocortin(美国,GenScript Ccorporation);细胞色素 C(CytoC)一抗(北京博奥森生物技术有限公司);Caspase-3 一抗,DAB 显色试剂盒,SP 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);TUNEL 凋亡试剂盒(Roche 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,SDS-Page 凝胶配制试剂盒,彩色预染蛋白分子量标准,PVDF 膜(江苏碧云天公司);ML870B2 Langendorff 离体心脏灌流系统(澳大利亚 AD Instruments 公司)。Krebs-Henseleit 液(K-H 液)(mmol/L)成分:NaCl 119,$NaHCO_3$ 25,KCl 4.75,$MgSO_4$ 1.2,KH_2PO_4 1.18,$CaCl_2$ 1.4,Glucose 11,95 ml/L O_2+5 ml/L CO_2 混合气持续氧合,维持 pH7.8;St.Thomas-2 心脏停搏液成份(mmol/L):NaCl 110.0,KCl 16.0,$MgCl_2$ 16.0,$CaCl_2$ 2.0,Glucose 11.0,维持pH7.8。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型建立及分组 将 24 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组:对照组(CON),缺血再灌注组(I/R),Urocortin 组(UCN),每组 8 只大鼠。CON 组大鼠麻醉后直接开胸取左心室肌作缺血前对照;I/R 组和 UCN 组大鼠腹腔注射肝素盐水 1 000 IU/kg,15 min 后腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg,10 min 后开胸,迅速取出心脏,建立离体鼠心 Langendorff 灌注模型,用 37℃,95 ml/L O_2+5 ml/L CO_2 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液经主动脉根部逆行灌注,压力 60 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),稳定 20 min。经左心耳插管,灌流液转流建立 Neely 左心室工作灌注模型,灌注压 15 mmHg,后负荷 50～60 mmHg。稳定30 min 后,主动脉根部按 2 ml/100 g 质量注入 4℃ St.Thomas-2 心脏停搏液使心脏停搏,停搏后用冰盐水纱布包裹心脏,维持低温状态。停搏 30 min 后复温,I/R 组大鼠复灌 37℃,950 ml/L O_2+5 ml/L CO_2 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液,心脏复跳,工作 90 min 后停止实验;UCN 组大鼠复灌 Urocortin 浓度为 10^{-8} mol/L,37℃,950 ml/L O_2+5 ml/L CO_2 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液体 90 min。复灌结束后停止实验,取左心室肌 80 mg,-80℃保存,用于免疫组化,Western blot 和 TUNEL 的检测。

1.2.2 心肌细胞 Caspase-3 的免疫组化检测 取 3 mm × 3 mm × 3 mm 大小心肌组织,制作石蜡切片。采用 SP 法行免疫组化染色,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,Caspase-3 一抗稀释浓度为 1:200。光学显微镜观察各组心肌组织 Caspase-3 的表达情况并采集图像。Caspase-3 以胞浆染成棕黄色或棕褐色为阳性。每张切片取随机取 10 个具有代表性的高倍视野(×400),运用 image- pro plus 6.0 图像分析系统进行半定量检测,用平均光密度值(OD)表示 Caspase-3 的相对含量。

1.2.3 心肌细胞胞浆 CytoC 的蛋白免疫印迹(Western blot)检测 运用差速离心分离线粒体与胞浆,BCA 法定量胞浆蛋白。取 50 μg 蛋白量的胞浆蛋白液样品加入适量的上样缓冲液,100℃煮沸 5 min 使蛋白变性,将样品加入制备好的 12% SDS-PAGE 凝胶电泳上分离各蛋白,然后转移蛋白印迹至 PVDF 膜上,将膜浸于含 5%脱脂奶粉的 TBST 液中室温摇动封闭 1 h,用含脱脂奶粉的 TBST 液稀释一抗(最终浓度为 1:200),4℃孵育过夜,HRP 标记的二抗 37℃孵育 1 h,增强化学发光法显色(ECL),采用 quantity one 图像分析系统采集图像并行半定量分析。

1.2.4 心肌细胞凋亡的测定 取心肌石蜡切片,采用脱氧核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)原位检测凋亡心肌细胞,操作步骤按说明书进行。不加 TdT 酶者为阴性对照,加入 Dnase 者为阳性对照。光学显微镜观察各组心肌组织凋亡情况。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色,凋亡的心肌细胞核呈褐黄色或棕黄色。每只大鼠观察 3 张切片,每张切片随机计数 5 个高倍视野(×400)中凋亡细胞核数,计算出凋亡指数(Apoptosis index,AI)。AI= 视野内凋亡细胞核数/视野内所有细胞核数。

1.3 统计学处理

结果均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS12.0 统计软件进行方差分析,组间比较用 q 检验,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组心肌组织中胞浆 CytoC 的 Western blot 结果

正常心肌细胞 CytoC 存在于线粒体内,胞浆中表达极少。Western blot 分析,CON 组心肌细胞浆中 CytoC 呈弱阳性条带,I/R 组和 UCN 组心肌细胞胞浆中 CytoC 条带比 CON 组深。对其进行半定量分析,CON 组胞浆 CytoC 表达明显少于 I/R 组和 UCN 组($P<0.05$),UCN 组胞浆中 CytoC 表达明显低于 I/R 组($P<0.05$)(表 1)(图 1)。

2.2 各组心肌组织中 Caspase-3 表达情况

免疫组化提示 CON 组大鼠心肌细 Caspase-3 表达较少，I/R 组和 UCN 组大鼠心肌细胞 Caspase-3 表达明显增多，对其进行半定量分析，CON 组 Caspase-3 表达明显少于 I/R 组和 UCN 组（$P<0.05$），UCN 组 Caspase-3 阳性表达明显低于 I/R 组（$P<0.05$）（表 1）（图 2）。

2.3 各组心肌组织中心肌细胞凋亡的变化

光镜下，正常心肌细胞核呈蓝色，凋亡的心肌细胞核呈褐黄色或棕黄色。CON 组心肌未见明显细胞凋亡，UCN 组有散在凋亡心肌细胞分布，I/R 组凋亡心肌细胞呈弥漫分布。计数 AI，I/R 组和 UCN 组凋亡心肌细胞明显高于 CON 组（$P<0.05$），UCN 组凋亡心肌细胞明显低于 I/R 组（$P<0.05$）（表 1、图 3）。

2.4 心肌组织中凋亡指数与 CytoC 的相关性分析

心脏停跳 30 min 后，I/R 组心肌细胞胞浆中 CytoC 表达量明显增加，AI 也明显增加（$P<0.05$）。而 UCN 组心肌细胞胞浆中 CytoC 表达量比 I/R 组减少，AI 也相应减少（$P<0.05$）。结果发现，CytoC 表达量增加，AI 也相应增加；CytoC 表达量减少，AI 也相应减少。二者呈正相关（$r=0.865$，$P<0.05$），提示胞浆中 CytoC 的增加，导致了细胞的凋亡（图 4）。

2.5 心肌组织中 Caspase-3 与 CytoC 与的相关性分析

心脏停跳 30 min 后，I/R 组心肌细胞胞浆中 CytoC 表达量明显增加，Caspase-3 也明显增加（$P<0.05$）。而 UCN 组心肌细胞胞浆中 CytoC 表达量比 I/R 组减少，Caspase-3 也相应减少（$P<0.05$）。结果发现，CytoC 表达量增加，Caspase-3 也相应增加；CytoC 表达量减少，Caspase-3 也相应减少。二者呈正相关（$r=0.775$，$P<0.05$），提示胞浆中 CytoC 的增加，导致了 Caspase-3 的活化（图 5）。

表 1 各组心肌细胞指标变化

组别	Caspase-3	Cyto C	AI
CON 组	0.15 ± 0.22	0.56 ± 0.05	2.29 ± 0.67
I/R 组	0.36 ± 0.15*	1.29 ± 0.02*	12.81 ± 0.62*
UCN 组	0.24 ± 0.20 *△	0.88 ± 0.07*△	6.77 ± 1.12*△

与对照组比较，*$P<0.05$；与 I/R 组比较△$P<0.05$

3 讨 论

缺血后处理（Ischemic postconditioning，I-postC），是指在缺血之后于长时间的再灌注之前进行数次短暂的再灌注/缺血的循环，能提高心肌对之前发生的较长时间缺血的耐受性。这个概念是 2003 年 Zhao 等[3]首先提出的。研究证实其具

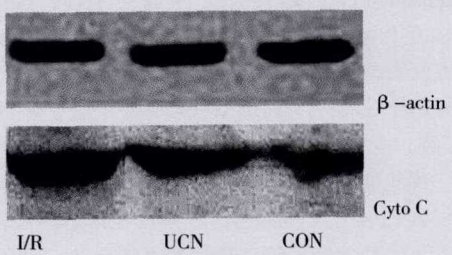


图 1 WB 胞浆中 Cyto C 的表达



A. CON 组　B. I/R 组　C. UCN 组

图 2 Caspase-3 的表达(免疫组化 × 400)



A. CON 组　B. I/R 组　C. UCN 组

图 3 各组心肌凋亡情况(TUNEL × 400)

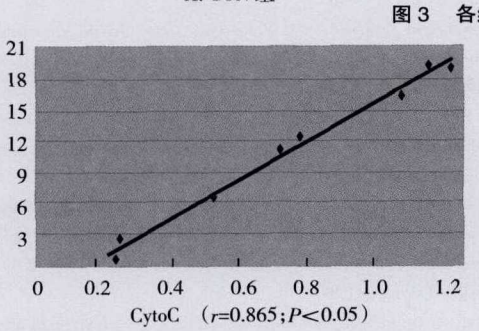


图 4 CytoC 含量与 AI 的散点图

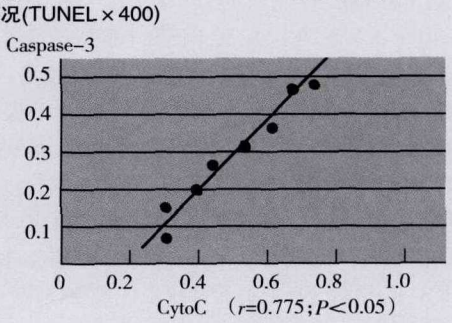


图 5 CytoC 含量与 Caspase-3 的散点图

有缩小心肌梗死范围,减轻内皮功能损伤,抗再灌注心律失常,改善心肌代谢及其收缩和舒张功能,减轻心肌顿抑及减轻超微结构的破坏等心肌保护作用。由于临床上心肌缺血发生的不可预料性,真正能对 MIRI 干预的是在缺血之后。因此与预处理相比,I-postC 是更具可操作性,临床运用前景更为广泛的心肌保护机制。随着研究 I-postC 的不断深入,如何建立有效的药物后处理途径已成为目前研究的热点。

MIRI 中的细胞凋亡现象已在动物和人的心肌上得到证实[4]。心肌细胞凋亡使得在再灌注过程中一些原本可以得到修复的心肌细胞最终走向死亡过程,导致有功能的心肌细胞数目减少和心功能的降低,加重了缺血再灌注损伤[5],因此研究细胞凋亡为防治 MIRI 开辟了新的途径。本实验观察到 I/R 组大鼠心肌细胞 AI 明显高于 CON 组,证实了凋亡在 MIRI 中的重要作用。细胞凋亡与 MIRI 后心功能的恢复有关,心肌细胞凋亡的程度是评价心脏保护效果的重要指标。

目前认为线粒体凋亡途径是 MIRI 后心肌细胞凋亡的主要途径[6],其分子基础是线粒体通透性转换孔道(Mitochondrial permeability transition pore,mPTP),mPTP 是位于线粒体内外膜上的多蛋白复合体,其在维持线粒体膜电位,保护线粒体结构和功能方面发挥了重要作用[7]。MIRI 中,氧化应激,细胞内 Ca^{2+} 超载等诱导 mPTP 开放,导致线粒体膜电位崩解,基质水肿、外膜破裂,一些位于线粒体膜间隙的促凋亡因子释放到胞浆,激活一系列凋亡的酶促反应导致细胞凋亡[8]。其中CytoC 是最重要的促凋亡因子,CytoC 的释放是线粒体通路激活的标志[9]。CytoC 是线粒体电子传递链的重要成分,位于线粒体内膜的外表面,CytoC 被释放后与凋亡蛋白酶激活因子 1(Apoptotic protease activating factors-1,Apafs-1),半胱氨酸基天冬氨酸特异性蛋白酶 9 前蛋白(Procaspase-9)结合形成凋亡复合体(Apoptosome),在 ATP、dATP 存在的情况下,这个复合体激活 procaspase-9 为 Caspase-9,活化的 Caspase-9 再以级联放大的形式激活 procaspase-3 为 Caspase-3,执行一系列酶切细胞结构和蛋白的程序导致细胞凋亡。Caspase-3 全称叫半胱氨酸基天冬氨酸特异性蛋白酶,其具有在天冬氨酸(Aspartic acid)之后切割蛋白的能力。因此,通过检测胞浆中 CytoC 含量,可以间接证明线粒体通路的活化。我们利用 Western blot 检测各组心肌细胞胞浆中 CytoC,免疫组化检测 Caspase-3 在 MIRI 中的变化发现,随着 I/R 组和 UCN 组胞浆中 CytoC 的增多,Caspase-3 和 AI 也增多,亦证实了 CytoC 在 MIRI 细胞凋亡的重要作用,MIRI 有线粒体凋亡通路的活化。

Urocortin 是 Vaughan 等[10]于 1995 年从大鼠中脑中克隆出来的一种含 40 个氨基酸的多肽,属于促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin releasing hormone,CRH)家族成员,与 CRH 有 45%氨基酸同源性,UCN 在物种之间有严格的保守性,人源性的 UCN 与鼠源性的 UCN 其氨基酸序列具有 95%的同源性。目前认为,UCN 是仅存在于心脏的 CRH 家族相关肽,通过结合心肌特异表达的 $CRH\text{-}R_2$ 发挥生物学效应。研究表明,心肌细胞能够自身合成 UCN,通过旁分泌或者自分泌的形式与 $CRH\text{-}R_2$ 相结合在心血管系统发挥重要作用[11]。

Brar 等[12]在培养的心肌细胞进行缺血再灌注试验中发现,无论在缺氧期间或是缺氧之前给予 UCN,都可显著减少心肌细胞的死亡;并且在离体心脏灌流中同样发现 UCN 可减少缺血再灌注损伤造成的梗死面积。大量研究提示,UCN 可望成为具有临床应用前景有效治疗心肌缺血、心功能不全的心脏保护药。研究表明 Urocortin10^{-8} mol/L 具有确切的心肌保护作用,但其在后处理中的作用及与线粒体凋亡通路的关系报道较少,我们通过检测胞浆中 CytoC 的含量,间接判断线粒体释放 CytoC 和其下游 Caspase-3 的激活的情况,从凋亡的线粒体途径探讨 Urocortin 后处理的心肌保护机制。

我们的实验证实,UCN 后处理能够减少胞浆中 CytoC 的量,提示 UCN 减少了线粒体释放 CytoC 至胞浆。同时免疫组化及 TUNEL 提示,随着胞浆中 CytoC 量的减少,Caspase-3 表达及凋亡细胞也相应减少,表明 UCN 后处理抑制了线粒体凋亡通路的活化,这可能是其发挥心肌保护作用的机制之一。

综上所述,Urocortin 后处理能够减少 MIRI 中的细胞凋亡,其机制与抑制线粒体释放 CytoC,从而抑制凋亡的线粒体通路有关。

参 考 文 献

[1] Wang L,Kinnear C,Hammel J M,et al. Preservation of mitochondrial structure and function after cardioplegic arrest in the neonate using a selective mitochondrial KATP channel opener[J].Ann Thorac Surg,2006,81(5):1817-1823.

[2] Sun H Y,Wang N P,Faraz K,et al.Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca^{2+} overload[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2005,288(4):1900-1908.

[3] Zhao Z Q,Corvera J S,Halkos M E. et al.Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion:comparison with ischemic preconditioning[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2003,285(2):579-588.

[4] Eefting F,Rensing B,Wigman J,et al. Role of apoptosis in reperfusioninjury[J].Cardiovasc Res,2004,61(3):414-426.

[5] Scarabelli T M,Knight R,Stephanou A,et al.Clinical implications of apoptosis in ischemic myocardium [J].Curr Probl Cardiol, 2006, 31(3): 181-264.

[6] Gomez L,Chavanis N,Arqaud L,et al.Fas-independent mitochondrial damage triggers cardiomyocyte death after ischemia-reperfusion[J].AmJ Physiol Heart Circ Physiol,2005,289(5):2153-2158.

[7] Halestrap A P,Clarke S J,Javadov S A,et al. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion a target for cardioprotection [J]. Cardiovasc Res,2004,61(3):372-385.

[8] Heusch G,Boengler K,Chulz R,et al. Cardioprotection:nitric oxide, protein kinases, and mitochondria[J].Circulation,2008,118(19):1915-1919.

[9] Correa F,Soto V,Zazueta C,et al.Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart[J]. Int J Biochem Cell Biol,2007,39(4):787-798.

[10] Vaughan J,Donaldson C,Bittencourt J,et al.Urocortin,a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor[J].Nature, 1995,378(6554):287-292.

[11] Knight R A,Chen-Scarabelli C,Yuan Z,et al. Cardiac release of urocortin precedes the occurrence of irreversible myocardial damage in the rat heart exposed to ischemia/reperfusion injury [J].FEBS Lett,2008,582(6):984-990.

[12] Brar B K,Jonassen A K,Egorina E M, et al.Urocortin-Ⅱ and urocortin Ⅲ are cardioprotective against ischemia reperfusionin injury:an essential endogenous cardioprotective rolefor corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart[J].Endocrinology,2004,145(1):24 -35.

(责任编辑:冉明会)