基础研究 文章编号：0253-3626(2009)06-0694-04

Ghrelin 对缺氧/复氧心肌细胞凋亡的影响及其机制的研究

傅 航，王 华，黄德嘉
（重庆医科大学附属第一医院心内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：本实验研究 Ghrelin 对缺氧/复氧干预下心肌细胞凋亡的影响以及其具体的作用机制。方法：用体外培养的 SD 乳大鼠心肌细胞，建立缺氧(4 h)/复氧(1h)模型。实验分 4 组：①对照组；②缺氧/复氧组(H/R)；③H/R＋Ghrelin 干预组；④H/R＋Ghrelin＋沃曼青霉素干预组。分别检测各组培养液中 LDH 浓度，Tunel 法测定各组细胞凋亡率，免疫印迹法检测细胞内激酶磷酸化 Akt 的表达。结果：实验发现，与 H/R 组和 H/R＋Ghrelin＋沃曼青霉素干预组相比 H/R+Ghrelin 组能明显减轻缺氧/复氧损伤所导致的 LDH 的漏出(30.00 ± 6.60 与 78.00 ± 4.20 U/L；30.00 ± 6.60 与 61.67 ± 7.22 U/L)，以及明显减低心肌细胞的凋亡率(0.0859 ± 0.0303 与 0.3516 ± 0.06329；0.0859 ± 0.0303 与 0.3255 ± 0.02258)($P<0.05$)。同时 H/R＋Ghrelin 干预组磷酸化 Akt 的表达明显增强。结论：Ghrelin 具有减轻缺氧/复氧所引起的心肌细胞损伤，抑制心肌细胞凋亡的作用。与 Ghrelin 激活细胞内信号传递途径 PI3K/Akt（磷脂酰肌醇 3 激酶/丝－苏氨酸激酶）有关。

【关键词】心肌细胞；Ghrelin；缺氧/复氧；凋亡；PI3K/Akt
【中国图书分类法分类号】R246.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-11

Anti-apoptotic actions and mechanisms of ghrelin in cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation injury

FU Hang, et al
(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the anti-apoptostic effect of Ghrelin in cardiomyocytes after Hypoxia/Reoxygenation injury and manifest the specific cellular singaling transduction pathway. *Methods*: Newborn SD rats' hearts were isolated and cardiomyocytes were separated by trypsin digestion method .The primary cardiomyocytes were collected and incubated in vitro and randomly alloted to 4 groups (①Control; ②H/R group; ③H/R ＋Ghrelin group; ④H/R＋Ghrelin＋Wortmannin group) after 5 days of cultivation.Hypoxia/ Reoxygenation injury was established by 4 hours of hyopxia and subsquently 1 hour of reoxygenation. Lactic dehydrogenase concentration, cell apoptotic rate and the expression of phosph-Akt were detected by Automatic Biochemistry Analytic Instrument , Tunel method and Western blotting method respectively. *Results*: Compared with H/R group and H/R＋Ghrelin＋Wortmannin group, the LDH concentration in media was significantly reduced and the myocardium apoptotic rate was pretty low in H/R＋Ghrelin group. Ghrelin also increased phosph-Akt activity but this effect was abolished by applying Wortmannin simultaneously. *Conclusions*: Ghrelin provides concrete protection against Hypoxia/ Reoxygenation injury in the primary cultivated rat cardiomyocytes, which manifest dereasing LDH leaking, inhibitting cell apoptosis. Theantiapoptotic effect is partly mediated by the activation of the PI3K /Akt (Phosphatidylinositol-3 kinase/ Akt) pathway.

【Keywords】Cardiomyocyte; Ghrelin; Hypoxia/Reoxygenation injury ; Apoptosis; PI3K/Akt

促生长激素释放多肽(Ghrelin)是一种可以刺激生长激素分泌的物质，主要由胃肠分泌[1]，在心血管系统也存在 Ghrelin 的受体[2]，临床及动物实验表明 Ghrelin 对心血管系统有保护作用[3,4]。PI3K/Akt 信号途径的激活可有效地抑制低氧诱导的心肌细胞凋亡的发生[5]。Ghrelin 是否通过激活 PI3K/Akt 发挥缺血/再灌注心肌的保护作用目前尚不清楚。本研究利用体外原代培养的 SD 大鼠心肌细胞建立缺氧/复氧的模型，模拟缺血/再灌注条件下的心肌细胞，同时用 PI3K 特异性抑制剂 Wortmannin（沃曼青霉素）抑制 Akt 的活化[6]，观察各实验组心肌细胞损伤指标，心肌细胞凋亡率以及磷酸化 Akt 的表达情况。研究 Ghrelin 对缺氧/复氧心肌细胞的保护作用，对心肌细胞凋亡的抑制作用，以及 Ghrelin 抑制凋亡的细胞信号机制。以期对 Ghrelin 对缺血/再灌注损伤的保护机制有进一步的了解。

作者介绍：傅 航(1974-)，男，医师，硕士，
研究方向：冠心病、心律失常。

1 材料和方法

1.1 材料

Ghrelin(Phonenix Pharmaceuticals)；小鼠抗横纹肌肌动蛋白单克隆抗体、过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG、免疫印迹增强化学法光法试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)；兔抗鼠磷酸化 Akt(S473)抗体(R&D Systems, Inc.)；Tunel 试剂盒、蛋白酶抑制剂、NP-40(Roche)；Wortmannin(MP 公司)；考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)；SDS-PAGE 低分子量标准蛋白、PVDF 膜(上海生物研究所)；TEMED(N,N,N',N'- 四甲基已二胺)(Sigma 公司)；DMEM 高糖培养基(GIBCO 公司)；新生小牛血清、胰蛋白酶（蓉海生物)；1~3 d 龄的 Sprague-Dawley 大鼠。

1.2 实验步骤和方法

1.2.1 体外培养 SD 乳鼠心肌细胞 10 只幼鼠心脏，胰酶消化法分离心肌细胞，差速贴壁法纯化细胞，培养 7 d 后进行实验。

1.2.2 实验分组 标本随机分配成 4 组：①对照组；②缺氧/复氧组(H/R)；③缺氧/复氧 +Ghrelin（浓度为 1 μmol/L）组(H/R+G)；④缺氧/复氧 + Ghrelin(终浓度为 1 μmol/L)+Wortmannin(终浓度为 100 nmol/L)组(H/R+G+W)。每个小组含 6 个样本，Ghrelin 和 Wortmannin 于进行缺氧/复氧干预前 1 h 加入。

1.2.3 建立缺氧复氧模型 三气培养箱参数(1%氧气，94%氮气，5%二氧化碳)，37℃下处理 4 h，然后转换到常氧条件下复氧处理 1 h。对照组在常氧条件下培养。

1.2.4 免疫组化法鉴定心肌细胞 1.4%多聚甲醛固定 20 min，3%H_2O_2 浸泡 25 min；37℃山羊血清封闭孵育 20 min，加入一抗(小鼠抗横纹肌肌动蛋白单克隆抗体，1:200)100 μl，37℃孵育 40 min 后加入二抗(过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG，1:500)100 μl，37℃孵育 30 min；加入底物显色剂 DAB。

1.2.5 乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase LDH)的检测 取细胞培养上清液 500 μl，送至临床生化检验室用自动生化分析仪测定。

1.2.6 细胞凋亡的 TUNEL 分析 室温下依次浸泡于 4%的多聚甲醛液中 1 h、3%的 H_2O_2 浸泡 10 min、0.1%TritonX-100 中浸泡 2 min。TUNEL 反应液 5 μl 的 TUNEL 酶加 45 μl-TUNEL 标记溶液比例组成。每张片滴加 50 μlTUNEL 反应液，避光反应 60 min 后再加 50 μl 过氧化物酶标记的羊抗地高辛抗体避光反应 30 min。PBS 洗涤后滴加 50 μl 过氧化物酶的底物 DAB，反应 20 min 后封片。

1.2.7 Western Blotting 检测磷酸化 Akt 的表达 动物细胞蛋白质的提取，细胞裂解液的配方：Tris-HCl(0.5 mol/L, pH8.0) 2 ml；NaCl (1 mol/L)1 ml；NP-40 (10%)1 ml；H_2O 3.45 ml；NaF (0.2 mol/L)2.5ml；Na_3VO_4(0.2 mol/L)0.05 ml；Complete，Mini Cocktail Tablet1 片。细胞裂解液蛋白质浓度的测定：本试验采用 Bradford 法对蛋白质定量，用已知浓度的 BSA(牛血清白蛋白)制作标准曲线。分离胶浓度 10%；玻璃板间距 0.75 mm；样本在成层胶中泳动时，电压为 80 V，条带进入分离胶，电压增至 100 V。溴酚蓝指示剂移至距凝胶底部 1 cm 时，终止电泳。转膜电压及时间：100 V 恒压转移 60 ~ 90 min；加入 5 ml 封闭液稀释的一抗(兔抗鼠磷酸化 Akt 抗体)，一抗的浓度为 0.5 μl/ml，置于在 4 摄氏度下孵育过夜；按 1:2 000 的比例用封闭液稀释二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体)；准备 ECM 液(免疫印迹增强化学发光法反应液)：每 cm^2 PVDF膜需要 0.125 ml 工作液，每 ml 水中加入 ECM A 液和 B 液各 1 滴；PVDF 膜移入 X 线胶片盒中，曝光 1~2 min 后冲洗出负片。

1.2.8 结果判定 用横纹肌肌动蛋白单克隆抗体(Mouse anti-α-Sarcomeric actin)对所分离得到的心肌细胞进行鉴定，心肌细胞的胞浆中有棕黄色致密颗粒，而对照细胞未见棕黄色颗粒，结果显示心肌细胞分离效果好。

凋亡的判定：每 1 张病理片在 100× 光学显微镜下随机选取 10 个视野，每个视野分别计数凋亡细胞数和该视野下的细胞总数，计数完毕计算凋亡率 = $\frac{\text{凋亡细胞总数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$。凋亡阳性的细胞，其细胞核被染成黄色或棕黄色。

Image Pro. Plus 5.0 图像分析软件检测胶片上免疫印迹条带的光密度值(IOD，Integrated Optical Density)进行定量分析，以反映免疫印迹条带颜色的深浅及面积的大小，间接反映心肌细胞产生磷酸化 Akt 蛋白的量。

1.3 统计分析

数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS(ver.10.0)统计软件进行单因素方差分析以及各组均数的多重比较(S-N-K 法)，取 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结 果

2.1 原代培养心肌细胞形态及生长情况

心肌细胞呈梭形，继而向四周伸展形成不规则的星型；核较小，圆而致密，细胞中可见 1 个细胞核并在最初的 7 ~ 10 d 内可以观察到细胞自律性的搏动，频率平均为 50~70 次/min。相邻心肌细胞搏动同步化。

2.2 心肌细胞免疫组化鉴定

心肌细胞的胞浆中有棕黄色致密颗粒，而对照细胞未见棕黄色颗粒。结果显示心肌细胞分离效果好。

2.3 各组培养液中 LDH 含量的比较

缺氧/复氧后心肌细胞培养液中 LDH 的含量，在 H/R 组较对照组明显增加($P<0.05$)；Ghrelin 干预组与 H/R 组比较，LDH 浓度明显较低($P<0.05$)；而加入 Wortmannin 干预的实验组，LDH 的含量较 Ghrelin 组和对照组都明显增高($P<0.05$)。

2.4 各实验组心肌细胞凋亡率的比较

H/R 组细胞的凋亡率明显高于对照组($P<0.05$)；而 H/R+G 组细胞凋亡率明显较 H/R 组低($P<0.05$)；而在 H/R+G+W 组中凋亡率与对照组和 H/R+Ghrelin 组的凋亡率比较明显增高

（$P<0.05$）；也与这一组相对 H/R 组的凋亡率没有统计学上的差异（$P>0.05$）。

2.5 各实验组磷酸化 Akt 表达量的比较

Western Blotting（免疫印迹）实验检测磷酸化 Akt 表达的图像。图中高密度条带为磷酸化 Akt 的免疫印迹。磷酸化 Akt 为该蛋白的活化形式。

从上述实验结果和统计数据表明，H/R+G 组的磷酸化 Akt 水平明显高于其它各组（均 $P<0.05$）；H/R+G+W 组的磷酸化 Akt 水平明显低于除对照组外的其它各组（均 $P<0.05$）；心肌细胞在单纯的 H/R 干预后其磷酸化 Akt 的表达相与对照组相比也是增高的（$P<0.05$）。

3 讨 论

本研究探讨了 Ghrelin 这种心血管胃肠多肽对缺氧/复氧干预下的心肌细胞损伤及凋亡的阻断作用。研究结果表明，在给予体外培养的心肌细胞长达 4 h 的缺氧，继以 1 h 的复氧后



图 1 倒置相差显微镜下的原代心肌细胞（×100）

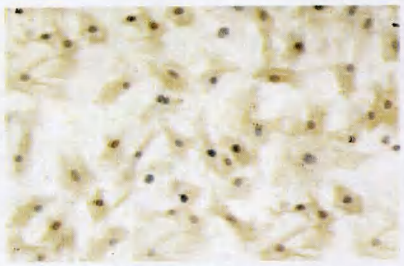


图 2 肌动蛋白单克隆抗体免疫组化鉴定心肌细胞（×200）

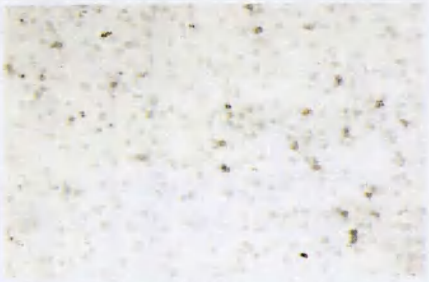


图 3 对照组心肌细胞 Tunel 染色（×100）

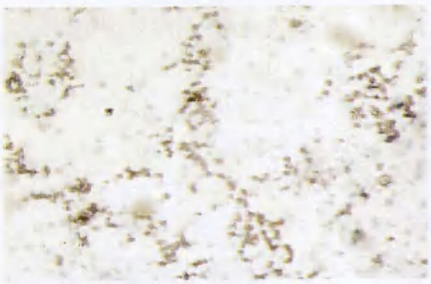


图 4 H/R 组心肌细胞 Tunel 染色（×100）

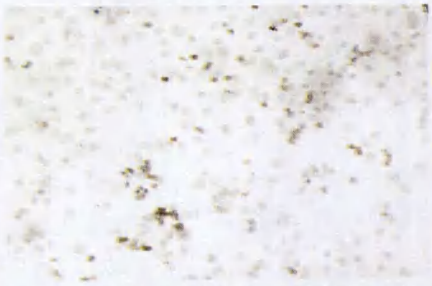


图 5 H/R+G 组心肌细胞 Tunel 染色（×100）

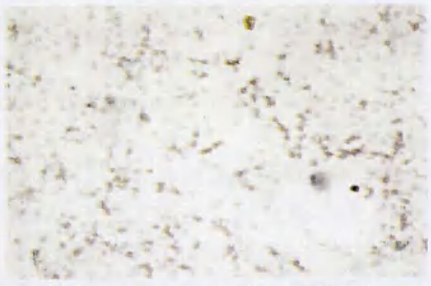


图 6 H/R+G+W 组心肌细胞 Tunel 染色（×100）

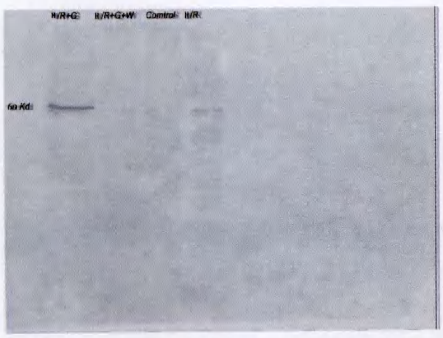


图 7 Western Blotting 检测到的磷酸化 Akt 的表达

表 1 各干预组心肌细胞 LDH 漏出量的比较

组别	LDH 含量（U/L）
正常对照组	25.67 ± 7.14*§
H/R 组	78.00 ± 4.20
H/R＋Ghrelin 组	30.00 ± 6.60*§
H/R＋Ghrelin＋Wortmannin 组	61.67 ± 7.22

* 代表与 H/R 组相比（$P<0.05$）；§ 表示与 H/R+G+W 组相比（$P<0.05$

表 2 各实验组细胞凋亡率的比较

组别	凋亡率
对照组	0.0344 ± 0.0141§
H/R 组	0.3516 ± 0.06329*
H/R＋G 组	0.0859 ± 0.0303§
H/R＋G+W 组	0.3255 ± 0.02258*

* 代表与对照组相比有统计学差异（$P<0.05$）；§ 代表与 H/R 组和 H/R＋G＋W 组相比有统计学差异（$P<0.05$）

表 3 Ghrelin 对缺氧/复氧心肌细胞磷酸化 Akt 表达量的影响

组别	免疫印迹条带 IOD 值
对照组	97.8414 ± 4.7146
H/R 组	118.5502 ± 1.5257*
H/R＋G 组	188.4834 ± 8.2527§
H/R＋G+W 组	82.7563 ± 6.6608

§ 代表 H/R+G 组与其它各组 IOD 值相比有统计学差异（$P<0.05$）；* 代表 H/R 组与对照组相比 IOD 值有统计学差异（$P<0.05$）

H/R+G 组心肌细胞 LDH 的漏出量明显减少，而经 H/R+G+W 干预后 Ghrelin 减少 LDH 漏出的作用受到明显的抑制。在以 Langendorff 灌流的离体大鼠心脏为研究对象的试验中，给予 30 min 的缺血，继以 120 min 的再灌注干预后，Ghrelin 干预组心肌梗塞面积显著地缩小[7]，LDH 的释放也是相应减少。临床上再灌注多发生在缺血后数小时，所以研究较长时间的缺血/再灌注损伤是有临床意义的。本实验证实对于长时间的缺氧心肌 Ghrelin 也具有明显的保护作用。LDH 浓度可反映心肌细胞损伤的程度。缺血/再灌注损伤的另一个机制是氧自由基的产生，细胞膜磷脂的氧化，蛋白质的变性，导致细胞膜完整性的破坏[8]。既往有研究发现早期给予 Ghrelin 可以减轻中毒性休克的大鼠体内 ATP 的耗竭[9]。本实验提示 Ghrelin 对维持细胞膜结构的完整性有作用，并能是通过抑制 ROS 的生成，以及减轻 ATP 的消耗达到的，但还需进一步研究证实。缺氧/复氧诱导下心肌细胞发生明显的凋亡，其凋亡率可达到 35%。而在缺氧/复氧之前加入 Ghrelin 干预可明显降低心肌细胞的凋亡率。但是在加入 Ghrelin 的同时，加入 PI3K 抑制剂 Wortmannin 则不会出现降低凋亡率的作用。说明 Ghrelin 可明显降低缺氧/复氧诱导的心肌细胞凋亡率，而这一作用可被 Wortmannin 所阻断，提示 Ghrelin的细胞保护作用与 PI3K 有关。缺血/再灌注损伤除了与细胞能量代谢障碍、氧自由基产生、炎性反应等因素有关外，近来越来越多的研究证实与细胞凋亡有密切的关系[10]。本研究表明 Ghrelin 减轻心脏缺血/再灌注损伤与抑制心肌细胞凋亡作用有关。本实验采用免疫印迹试验检测到在缺氧/复氧实验组以及缺氧/复氧 +Ghrelin 组有磷酸化 Akt 的表达。但是以缺氧/复氧 +Ghrelin 组心肌细胞内的磷酸化 Akt 表达最明显并且细胞凋亡率是所有组别中最低的。而加入 Wortmannin 的实验组磷酸化 Akt 表达量明显低于上述两组，同时心肌细胞凋亡率明显增加。Akt 位于 PI3K 的下游，PI3K 可使 Akt 发生磷酸化转变为活性形式，当加入 PI3K 抑制剂 Wortmannin后 PI3K 受到抑制，Akt 将不能被激活，当用特异性抗体进行免疫印迹试验不能检测到该组磷酸化 Akt 的表达。而单独以 Ghrelin 进行干预的缺氧/复氧组磷酸化 Akt 表达很明显。表明 Ghrelin 通过激活 PI3K/Akt 途径抑制缺氧/复氧所诱导的细胞凋亡的发生。本研究结果表明单纯缺氧/复氧组有磷酸化Akt 的表达，但量很低，对细胞的凋亡影响不大。已有的研究表明心脏短暂的缺血[11]或是缺血预适应[12]可以保护心功能，减轻因缺血、缺氧所致的心肌细胞损伤，同时伴有 Akt 的激活。与本实验不同的是既往研究所采用的缺血时间较短分别为 30min 和 5min，明显低于本实验长达 4 h 的缺氧。本实验中 Ghrelin 干预组磷酸化 Akt 的表达明显高于单纯 H/R 组，说明 Ghrelin 具有较强的激活磷酸化 Akt 的作用，而且这一作用是独立于 H/R 作用的。这种激活 PI3K/Akt 能力的不同可以解释这两组间细胞凋亡率的差异。同时也提示 Ghrelin 抑制心肌细胞凋亡可能还有其它的机制：如抗 ROS 的作用以及保护线粒体的作用。本研究结果说明 Ghrelin 对心肌缺氧/复氧损伤的保护作用是多途径的，其中涉及对细胞凋亡的抑制，以及对细胞膜结构的保护作用。结合本研究与其他研究的结果可以推测在病人缺血/再灌注损伤发生期间激活 PI3K/Akt 信号传递途径具有心脏保护作用，PI3K/Akt 信号传递途径可能是治疗缺血/再灌注损伤的靶点。

参 考 文 献

[1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402(6762): 656-660.

[2] Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 280(5): R1483-1487.

[3] Baessler A, Fischer M, Mayer B, et al. Epistatic interaction between haplotypes of the ghrelin ligand and receptor genes influence susceptibility to myocardial infarction and coronary artery disease[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(8): 887-899.

[4] Soeki T, Kishimoto I, Schwenke D O, et al. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(1): H426-432.

[5] Alloatti G, Montrucchio G, Lembo G, et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma: kinase-dependent and-independent activities in cardiovascular function and disease [J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32(Pt 2): 383-386.

[6] Kamata N, Kutsuna H, Hato F, et al. Activation of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha: role of phosphatidylinositol 3-kinase[J]. Int J Hematol, 2004, 80(5): 421-427.

[7] Frascarelli S, Ghelardoni S, Ronca-Testoni S, et al. Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart[J]. Basic Res Cardiol, 2003, 98(6): 401-405.

[8] Lefer D J, Scalia R, Campbell B, et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Clin Invest, 1997, 99(4): 684-691.

[9] Chang L, Zhao J, Yang J, et al. Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 473(2-3): 171-176.

[10] Vinten-Johansen J, Zhao Z Q, Corvera J S, et al. Adenosine in myocardial protection in on-pump and off-pump cardiac surgery[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 75(2): S691-699.

[11] Matsui T, Tao J, del Monte F, et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo[J]. Circulation, 2001, 104(3): 330-335.

[12] Mocanu M M, Bell R M, Yellon D M. PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(6): 661-668.

（责任编辑：冉明会）