维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1047-04

两种心脏停搏液对缺血心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响

綦 俊,杨双强,刘胜中

(重庆医科大学附属第一医院心胸外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察 St.Thomas 和河豚毒素(Tetrodotoxin,TTX)两种心脏停搏液对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响。方法:Wistar 大鼠 24 只,建立 Langendorff-Neely 离体心脏灌注模型,分为 3 组(n=8):对照组、STH-2 组、TTX 组。用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数(Apoptosis index,AI),免疫组化测定凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、p53 的表达,Western blot 检测 Bcl-2 蛋白表达。结果:STH-2 组 AI (11.20±0.79)%高于 TTX 组(6.92±1.10)%和对照组(1.34±0.23)%(P<0.01)。TTX 组 Bcl-2 的 PEI 为 (22.63±1.10)%高于 STH-2 组 (13.51±0.67)%和对照组 (2.52±0.58)%(P<0.01);STH-2 组 Bax 的 PEI 为 (8.04±0.57)%高于 TTX 组(6.05±0.46)%和对照组(2.14±0.57)%(P<0.01)。TTX 组 Bcl-2/Bax 为 3.78±0.41 高于 STH-2 组 1.75±0.15(P<0.01)。TTX 组 Bcl-2 的相对蛋白含量为(86.1±0.98)%高于 STH-2 组(53.2±1.76)%和对照组(23.7±2.61)%(P<0.01)。p53 蛋白在各组均未见明显阳性表达。结论:与 STH-2 比较,TTX 能减少缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡数,其抗凋亡的机制可能与上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达,提高 Bcl-2/Bax 比值有关。

【关键词】河豚毒素;心肌缺血再灌注损伤;心肌细胞凋亡;Bcl-2 蛋白;Bax 蛋白

【中国图书分类法分类号】R654.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-03

Effect of two kinds of cardioplegia on cardiomyocyte apoptosis and related protein expressions in rat hearts

QI Jun, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of two kinds of cardioplegia on cardiomyocyte apoptosis and the related protein expressions in rat hearts. *Methods*: 24 Wistar rats were randomly divided into 3 groups (n=8): Control group, STH-2 group and TTX group. Isolated rat Langendorff and Neely working heart models were estabished. The changes in cardiomyocyte apoptosis were detected by TUNEL. The expression of Bcl-2 and Bax protein were detected by immunohistochemical assay in cardiomyocyte. The expression of Bcl-2 protein in cardiomyocyte was detected by Western blot. *Results*: Apoptosis index(AI) in STH-2 group (11.20±0.79)% was significantly higher than that in TTX group (6.92±1.10)% and Control group (1.34±0.23)%(P<0.01). Bcl-2 protein expression index(PEI) in TTX group(22.63±1.10)% increased as compared with STH-2 group (13.51±0.67)% and Control group (2.52±0.58)%(P<0.01). Bax PEI in STH-2 group (8.04±0.57)% increased as compared with TTX group (6.05±0.46)% and Control group (2.14±0.57)%(P<0.01). Bcl-2/Bax was 3.78±0.41 in TTX group, 1.75±0.15 in STH-2 group. Bcl-2 protein expression in TTX group (86.1±0.98)% increased as compared with STH-2 group (53.2±1.76)% and Control group (23.7±2.61)%(P<0.01). There was no sign of p53 protein expression in all groups. *Conclusion*: Compared with STH-2, TTX cardioplegia alleviates the apoptosis of rat cardiomyocytes. The mechanism is probably up-regulating expression of Bcl-2 protein, down-regulating expression of bax protein and increasing Bcl-2/Bax.

【Key words】TTX; Myocardial ischemia reperfusion injury; Cardiomytocyte apoptosis; Bcl-2 protein; Bax protein

作者介绍:綦 俊(1975-),男,硕士,主治医师,研究方向:心肌保护,胸部肿瘤。

通讯作者:杨双强,男,教授,E-mail:yysqiang@163.com。

基金项目:重庆市科委课题(CSTC,2005AC0068)。

心肌缺血/再灌注损伤主要引起心肌细胞凋亡,继而导致心肌代谢及心功能变化。减少细胞凋亡能有效保护心肌。TTX 是一种高特异性快速可逆的细胞膜钠离子(Na^+)通道阻滞剂。与传

维普资讯 http://www.cqvip.com

统的 St.Thomas 液比较,利用 TTX 心脏停搏液使离体大鼠心脏停搏,能明显减轻大鼠心肌细胞内 Na^+ 超载和 Ca^{2+} 超载,使心肌缺血/再灌注损伤减轻,心肌细胞活力更强[1,2]。TTX 的心肌保护机制尚未完全阐明。本实验拟从心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白的角度对 St.Thomas 液和 TTX 两种心脏停搏液的心肌保护作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及主要试剂 成年健康雄性 Wistar 大鼠 24 只(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供),体重250~300g。TTX:美国 Sigma 公司。兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗大鼠 Bax 单克隆抗体、兔抗大鼠 p53 单克隆抗体、兔抗大鼠 β-actin 单克隆抗体:Santa Cruz 公司。PVDF 膜:美国 DUPONT 公司。TENUL 试剂盒:南京凯基生物科技发展有限公司。SP-9001 免疫组化试剂盒:北京中杉生物公司。RIPA 细胞裂解液:上海申能博彩生物科技有限公司。

1.1.2 灌注液及停搏液配方 参照文献[1]配制 K-H 灌注液、STH-2 心脏停搏液和 TTX 心脏停搏液。

1.1.3 主要仪器和设备 LE12306 离体心脏灌流系统:澳大利亚 ADInstruments 公司,PAGE 凝胶电泳仪、TRANS-BLOT SD 半干电转移系统:美国 Bio-Rad 公司,可见光/紫外凝胶扫描分析系统:美国 UVP 公司,扫描分析软件系统:美国 Labworks™ Analysis Software 公司,GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统:成都金盘电子科大多媒体技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠离体心脏灌注模型的建立 参照文献[1]建立 Langendorff-Neely 离体心脏灌注模型。

1.2.2 动物分组及实验步骤 随机均分为 3 组,每组 8 只。对照组为缺血前对照;STH-2 组和 TTX 组为缺血再灌注实验组。对照组:离体鼠心持续用 K-H 液灌注工作 60min 后取左心室标本备检。TTX 组和 STH-2 组待离体鼠心持续用 K-H 液灌注工作 60min 后,分别用 4℃ STH-2 和 TTX 心脏停搏液从主动脉根部缓慢灌注(2min,压力 60mmHg)使心脏停搏;低温保存 60min(其间 30min 时分别追加灌注 STH-2 和 TTX 心脏停搏液 1 次);停搏 60min 后复温,复灌 37℃,95%O_2+5%CO_2 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液,复跳,工作 60min 后停止实验。三组鼠心取左心室前壁全层心肌组织分为两份,一份分别行 Bcl-2、Bax、p53 蛋白表达免疫组化染色及 TUNEL 检测;另一份用作 Western blot 检测组织中 Bcl-2 蛋白的表达。

1.2.3 TUNEL 检测心肌细胞凋亡 按试剂盒说明操作。正常心肌细胞核呈蓝色,而凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。每只大鼠观察 4 张切片,每张切片在光学显微镜下计数 5 个高倍镜视野(×400)中的凋亡阳性细胞核数/总细胞核数,取其平均值为心肌细胞凋亡率即 AI。

1.2.4 免疫组化检测心肌组织中 Bcl-2、Bax、p53 的蛋白表达 按试剂盒说明操作。每张切片随机计数 5 个高倍镜视野(×400),应用 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统进行图像分析,测定阳性细胞胞核或胞浆的平均光密度(Optical density,OD 值)与阳性细胞百分比,计算蛋白阳性表达指数(Protein expression index,PEI)。PEI=OD 值×(阳性细胞数/总心肌细胞数)×100%。

1.2.5 Western-blot 检测心肌组织中 Bcl-2 的蛋白表达

1.2.5.1 操作步骤 组织蛋白质提取→总蛋白定量→聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳)→蛋白质的电转印蛋白质的 Western 印迹杂交→化学发光试剂检测。

1.2.5.2 积分光密度值的测定 Westernblot 结果用 Bio-Rad 图象分析系统照相,美国 Labworks™ Analysis Software 公司的扫描分析软件系统行软件分析,以 Bcl-2 蛋白条带的积分光密度值/β-actin 蛋白条带的积分光密度值表示 Bcl-2 蛋白的相对蛋白含量。

1.3 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)或中位数±四分位数间距(M±Q)表示,采用 SAS8.0 进行统计分析,使用方差分析、q 检验和非参数检验(秩和检验)。

2 结 果

2.1 TUNEL 检测心肌组织中心肌细胞凋亡的改变

与对照组比较,TTX 组和 STH-2 组心肌细胞凋亡指数均升高($P<0.01$);与 TTX 组相比较,STH-2 组心肌细胞凋亡指数升高($P<0.01$),见表 1。

2.2 免疫组织化学检测心肌细胞凋亡相关蛋白表达

2.2.1 Bcl-2 蛋白 Bcl-2 蛋白的 PEI 对照组为(2.52±0.58)%,STH-2 组为(13.51±0.67)%,TTX 组为(22.63±1.10)%。与对照组比较,TTX 组和 STH-2 组 Bcl-2 蛋白的 PEI 均升高($P<0.01$);与 STH-2 组比较,TTX 组 Bcl-2 蛋白的 PEI 升高($P<0.01$)。

2.2.2 Bax 蛋白 Bax 蛋白的 PEI 对照组为(2.14±0.57)%,STH-2 组为(8.04±0.57)%,TTX 组为(6.05±0.46)%。分别与对照组比较,TTX 组和 STH-2 组 Bax

表 1 各组心肌组织中心肌细胞凋亡指数($\bar{x}\pm s$,n=8)

组 数	AI(%)
对照组	1.34±0.23
STH-2 组	11.20±0.79*
TTX 组	6.92±1.10*△

注:*与对照组相比 $P<0.01$;△与 STH-2 组相比 $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

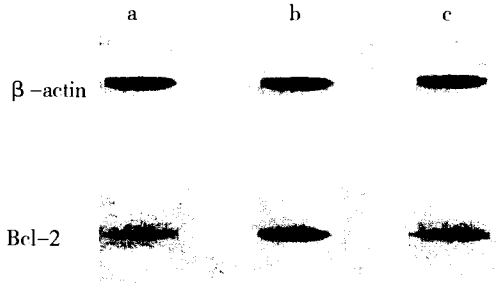
蛋白的 PEI 均升高($P<0.01$);与 TTX 组比较,STH-2 组 Bax 蛋白的 PEI 升高($P<0.01$)。

2.2.3 Bcl-2/Bax 比值 Bcl-2/Bax 蛋白表达的比值对照组为 1.19 ± 0.08,STH-2 组为 1.75 ± 0.15,TTX 组为 3.78 ± 0.41。TTX 组和 STH-2 组与对照组比较,均有显著差异($P<0.01$);TTX 组与 STH-2 组比较亦有显著差异($P<0.01$)。

2.2.4 p53 蛋白 所有组别的切片经免疫组织化学染色后均未见 p53 蛋白的阳性表达。

2.3 Western blot 检测心肌细胞中 Bcl-2 蛋白表达结果

TTX 组和 STH-2 组中 Bcl-2 蛋白的相对蛋白含量分别为(86.1 ± 0.98)%、(53.2 ± 1.76)%均比对照组(23.7 ± 2.61)%高,差异有显著性($P<0.01$);与 STH-2 组比较,TTX 组 Bcl-2 蛋白表达更多($P<0.01$),差异有显著性(见图 1)。



a. 对照组; b. TTX 组; c. STH-2 组

图 1 心肌细胞中 Bcl-2 蛋白表达(Western blot)

3 讨 论

细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种特殊的细胞死亡形式,受细胞内基因的精确调控。心肌细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤 (Myocardial ischemia reperfusion injury,MIRI)的主要形式。Raphael 等[3]证实降低凋亡指数,减少心肌细胞凋亡是减轻 MIRI 的重要机制之一。凋亡相关蛋白在 MIRI 所致细胞凋亡中发挥重要的调节作用。

TTX 能直接阻断心肌细胞 Na^+ 通道,使心肌细胞不能形成动作电位而导致心脏停搏时心肌细胞处于极化状态,较以往高 K^+ 去极化的停搏液(St.Thomas液为代表)更接近生理,Chambers 等将此种停搏方式称作"极化停搏"。实验可见,同样经过缺血再灌注,TTX 组凋亡指数明显低于 STH-2 组,表明 TTX 能减少缺血再灌注损伤中心肌细胞的凋亡数量,抑制心肌细胞凋亡,从而有效减轻 MIRI。

本实验中通过免疫组化染色和 Western blot 法都检测到 TTX 组心肌组织中 Bcl-2 蛋白的表达比 STH-2 组明显增多。Bcl-2 蛋白可以通过直接的抗氧化作用,阻止细胞色素 C(Cytc)的释放[4],抑制凋亡蛋白酶(Caspases)的激活,维持细胞钙稳态,干扰某些细胞周期蛋白的细胞转运和抑制促凋亡蛋白 Bax、Bak 的细胞毒作用来抑制凋亡。实验中在 Bcl-2 蛋白增加的同时还观察到凋亡的心肌细胞减少、MIRI 减轻,提示 Bcl-2 蛋白可能参与 TTX 心脏停搏液缺血再灌注模型中鼠心肌细胞凋亡的调控,TTX 的心肌保护作用可能是通过上调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 从而抑制心肌细胞凋亡来实现的。

Hochhauser 等[5]采用转基因技术,发现 Bax 基因敲除小鼠的离体心脏缺血再灌注后,凋亡阳性细胞较对照组显著减少。本实验中,TTX 组和 STH-2 组的 Bax 蛋白表达指数均高于对照组,表明心肌缺血再灌注损伤时 Bax 蛋白表达的增多可能是促进 MIRI 过程中心肌细胞凋亡的机制之一。实验中还观察到TTX 组的 Bax 蛋白表达明显低于STH-2 组,提示 TTX 可以抑制 Bax 蛋白表达,其保护心肌细胞的作用可能与下调 Bax 蛋白有关。

实验中我们发现与 STH-2 组比较,TTX 组 Bcl-2/Bax 的比值增高,心肌细胞凋亡减少。与 Diep 等[6]的实验结果类似。其机制可能为:当 Bcl-2 高表达时与 Bax 形成异源二聚体,使 Bax 失活,抑制凋亡发生;当 Bax 表达增高时,Bcl-2 被磷酸化与 Bad相结合,Bax 就从异源二聚体中释放出来,游离的 Bax 可以形成诱导细胞死亡的同源二聚体,当其易位到线粒体后破坏线粒体的功能,进而导致 Cytc 及凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)释放入胞浆,启动Caspase 酶系级联反应从而导致细胞凋亡。本研究再次证实凋亡终点事件的发生不仅与促进凋亡蛋白或抑制凋亡蛋白的表达密切相关,更重要的是依赖于抑制凋亡蛋白与促进凋亡蛋白的比值;同时表明 TTX 的心肌保护作用可能与提高 Bcl-2/Bax 比值从而减轻心肌细胞凋亡密切相关。

有报道 p53 蛋白在急性缺血或缺血再灌注的心肌细胞凋亡中起着重要作用[7]。Venkatapuram 等联合应用异氟醚与 p53 的抑制剂 α-pifithrin 明显减小缺血再灌注后兔心的心肌梗塞面积[8]。本实验中各组心肌组织运用免疫组化染色均未检测到 p53 蛋

(下转第 1070 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

力[8],死后早期创口仍有出血,含有细胞因子成分等原因,但其性质与生前伤有本质上的不同。

本研究结果表明了 MIP-1α 主要参与了创伤愈合中晚期组织修复过程并发挥了重要的作用,其在创伤后表达的时序性变化规律对于法医学检案中损伤时间的推断有重要的意义。但由于 MIP-1α 对损伤刺激反应主要在损伤修复中晚期,其并非是一个损伤敏感性指标,因此我们认为在伤后存活时间推断中,MIP-1α 表达只能作为辅助指标,应结合其他指标联合检测,并且相对于人体检案的实用性和可行性还有一定的差距,有待进一步完善。

参 考 文 献

[1] Scarpino S,Stoppacciaro A,Ballerini F,et al. Papllary carcinoma of the thyroid:hepatocyte growth factor(HGF).stimulate stumor cell store lease chemokines active in recruiting dendritic cells[J]. Am Jpathol,2000;156(3):831-837.

[2] Cowell RM,Xu H,Galasso JM,et al. Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-lalpha expression in immature rat brain[J]. Stroke,2002;33(3):795-801.

[3] Huffnagle GB,Strieter RM,McNeil LK,et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha(NIP — 1alpha) is required for the efferent phase of pulmonary cell mediated immunity to a Cryptococcus neofprmans infection[J]. J Immunol,1997;159(3):318-327.

[4] Zang YC,Samanta AK,Halder JB,et al. Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1α in patients with multiple sclerosis:overexpression of chemokine receptor CCR5[J]. Brain,2000;123(9):1874-1882.

[5] Domachowake JB,Bonville CA,Gao JL,et al. The chemokine macrophage-inflammatory ptotein-1α and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection[J]. J Immunol,2000;165(5):2677-2682.

[6] Dipietro A,Burdick M,low QE,et al. NIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair[J]. J Chn Invest,1998;101(8):1693-1698.

[7] Ohshima T. Forensic wound examination[J]. Forensic Sci Int,2000;113:153-164.

[8] 王慧君,阮海根,黄光照.PDGF-B,PDGFR-B,TGF-β1,bFG0F 在创伤愈合过程中的表达变化与损伤时间关系的研究[J]. 法医学杂志,2001;17(4):198-204.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 1049 页)

白的明确表达,具体原因尚有待于进一步探讨。但与 Kawamura 等报道[9]相符:基因改造的高表达 p300 基因的大鼠能对抗阿霉素所致心肌细胞凋亡及心衰,仅通过提高 Bcl-2 基因表达水平实现,而 p53 没有变化。

综上所述:与传统的 STH-2 心脏停搏液比较,TTX 心脏停搏液能减少大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的数量,具有更好的心肌保护作用;TTX 心脏停搏液减轻心肌细胞凋亡可能是通过上调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达,下调促进凋亡蛋白 Bax 表达,提高Bcl-2/Bax 比值来实现。

参 考 文 献

[1] 谭松涛,杨双强,杨朝坤,等.极化停博液用于离体大鼠心脏保存的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(3):448-451.

[2] 杨朝坤,杨双强,谭松涛,等.河豚毒素停搏液减轻大鼠心肌细胞内钙超载作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2005;27(3):192-195.

[3] 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]. J Pharmacol Exp Ther,2006;318(1):186-194.

[4] Wang C,Neff DA,Krolikowski JG,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.

[5] 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.

[6] Diep QN,El Mabrouk M,Yue P,et al. Effect of AT(1)receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin Ⅱ-induced hypertension [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2002;282(5):H1635-H1641.

[7] Hofseth LJ,Hussain SP,Harris CC. p53:25 years after its discovery[J]. Trends Pharmacol Sci,2004;25(4):177-181.

[8] Venkatapuram S,Wang C,Krolikowski JG. Inhibition of apoptotic protein p53 lowers the threshold of isoflurane-Induced cardioprotection during early reperfusion in rabbits [J].Anesthesia,2006;103(6):1400-1405.

[9] Kawamura T,Hasegawa K,Morimoto T,et al.Expression of p300 protects cardiac myocytes from apoptosis in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun,2004;315(3):733-738.

(责任编辑:关蕴良)