维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)03-0331-03

预处理对心肌缺血-再灌注损伤保护作用及其部分保护机制的探讨

王悦喜，董 莉，刘元生，陈运贞
（重庆医科大学临床学院心血管内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：用结扎冠状动脉制造心肌梗塞模型的方法观察预处理对大鼠心肌坏死范围和细胞凋亡及其调控基因bcl-2 mRNA等的影响。方法：在90min缺血/180 min再灌注，结扎冠状动脉前5 min注射给心肌3次、每次5 min缺血间隔5 min再灌注为心肌缺血预处理组（IPC）；结扎股动脉15 min松开10 min再结扎冠状动脉为结扎股动脉组（FAO）；结扎肠系膜动脉15 min松开10 min再结扎冠状动脉为结扎肠系膜动脉组（MAO）；结扎冠状动脉前不做任何干预的为对照组（I/R.）。结果：3组预处理组测得的心肌坏死范围（%）分别为23.5±1.5、24.3±1.7、23.8±1.2、24.2±4.1、17.6±1.7与I/R组35.9±2.1相比 $P<0.01$；经RT-PCR测得的 bcl-2 mRNA为 0.900±0.04、0.891±0.04、0.875±0.02与I/R. 0.817±0.02相比。结论：（1）预处理对心肌坏死范围有保护作用；（2）预处理保护心肌的部分机制是通过上调细胞凋亡基因Bcl-2 mRNA，减少心肌梗塞区域细胞凋亡数量等而实现的。

【关键词】预处理；心肌；梗塞；保护；凋亡；基因
【中国图书分类法分类号】R542.2+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-06-01

The protective role of ischemic preconditioning in ischemia/reperfusion and its partly protective mechanism

WANG Yuexi, et al
(Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: We observed the changes of myocardiocytes apoptosis and the expression of bcl-2mRNA after the intervention by myocardial ischemic preconditioning(IPC), brief occlusion of anterior mesenteric artery (MAO) and femoral artery(FAO), in order to obtain the partial cardial myoctes protective mechanism of them. *Methods*: 56 Wistar rats divided into I/R., IPC, FAO, and MAO groups were tested, using in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL), and RT-PCR methods. *Results*: We obtained these ischemic preconditionings which reduced the rats` infarction size(35.9%±2.1%vs17.6%±1.7%, 24.3%±1.7%, 23.5±1.7%) by reducing the myocardiocyts apoptosis(24.67%±4.18vs9.56%±2.43%, 13%±4.29%, 15%±5.09%) through the upregulation of bcl-2 mRNA(0.82±0.02VS0.91 ±0.04, 0.89±0.04, 0.88±0.02). *Conclusion*: The trial results can be summarized as follows: IPC, FAO, and MAO can reduce the rats' ventricular myocardial infarction size; the partial myocardial protective mechanisms of IPC, FAO, and MAO can be obtained by the upregulation of bcl-2 mRNA. The preventive effect of bax mRNA by these interventions is under research.

【Key words】Preconditioning; Myocardium; Infarction; Protection; Apoptosis; Bcl-2mRNA.

冠状动脉供血不能满足心肌对能量的需要时就发生心肌缺血、细胞死亡。近年来，普遍承认细胞死亡有两种机制，即死亡和凋亡[1,2]。心肌细胞同样存在凋亡，而且细胞凋亡是缺血性心肌细胞死亡的主要方式之一[2,3]。越来越多的临床资料表明心肌细胞凋亡参与人类心肌梗死的病理过程[3]。

在已观察到的ipc、fao、mao通过激活心肌细胞内共同信息通路pkc（protein kinase c）而保护心肌外[4,5]，进一步研究它们对心肌细胞的凋亡有没有影响？如果有，其作用机制是否通过影响位于细胞死亡信号转导共同途径上的bcl-2家族基因而调控心肌细胞凋亡的。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠，体重200～250g，雌雄不拘，4个月龄，由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

作者介绍：王悦喜（1963- ），男，教授，博士后，
主要研究方向：冠心病心肌保护。

维普资讯 http://www.cqvip.com

蛋白酶K（德国Boehinger Mannheim），bcl-2蛋白抗体（Santa Cruz公司），链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化染色试剂盒（中国武汉博德公司），bcl-2基因检测试剂盒（美国GIBCO CRL公司）。根据文献报道的特异性引物序列[6]，由中科院上海生理研所DNA合成仪合成，以GAPD(Glyceraldehyde-3-phophate dehydrogenase)作为内参校正bcl-2/bax mRNA所测的光密度值。详细序列如下：

Bcl-2((385bp),

上游5`-ACTTGTGGCCCAGATAGGCACCCAG-3`、

下游5`-CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG-3`;

GAPD(626bp),

上游5`-AGCGCGATCCCGCTAACATC-3`、

下游5`-TGTTGAAGTCACAGGAGACA-3`;

1.3 动物模型制作和坏死心肌测量方法

参考以前报道的大鼠各预处理组、冠状动脉阻塞和再灌注模型[7~10]，56只Wistar大鼠，随机分成4组。用1%TTC液染色。以称重法分别称出心肌梗塞范围的大小，以梗死区重量/左心室心肌重量的百分比表示。

1.4 心肌凋亡细胞的检测及半定量分析（每组6只）

实验大鼠达设定的时间后迅速取出左心室肌行常规石蜡包埋。切片经过常规脱腊等处理后，应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的带荧光的dUTP缺口末端标记（Tdt-mediated dutp nick end labeling, tunel）法[6]标记心肌凋亡细胞核中dna3'-oh的末端，并以此法显示凋亡细胞的存在。

光镜下：心肌细胞核呈兰色，凋亡心肌细胞核呈深浅不一的棕黄色颗粒。取5个阳性视野，每个阳性视野数300个心肌细胞，求平均阳性细胞数作为凋亡细胞阳性指数（ai）。

1.5 心肌细胞内bcl-2 mRNA的检测

用PT-PCR法检测心肌细胞内bcl-2mRNA的表达量，PCR反应条件：变性温度及时间94℃（40s）、退火温度及时间55℃（40s）、复性温度及时间72℃（70s）、循环次数30次。20μl扩增物上样，150v(10v/m)稳压，2%琼脂糖电泳2h，紫外灯下观察结果并测定其光密度值，用GAPD光密度值进行标准校正。

1.6 统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 标准差，利用SPSS8.0统计软件，多组间用方差分析，两组间比较用 t 检验，$P<0.05$为有显著性差异。

2 结 果

2.1 预处理对心肌坏死范围的影响

四组鼠心肌坏死范围百分比详见表1。与I/R相比，IPC、FAO、MAO均可减小坏死心肌的范围，$P<0.01$。

2.2 预处理对心肌细胞凋亡的影响

四组实验心肌经90 min缺血和180min再灌注后，检测坏死区心肌细胞凋亡的数量和凋亡细胞阳性指数（AI），详细结果见表2。与I/R.组相比，其它三组均对坏死区心肌细胞的凋亡有抑制作用。

2.3 预处理对调节心肌细胞凋亡基因bcl-2 mRNA的影响

IPC、FAO、MAO组心肌细胞内bcl-2 mRNA表达明显，用GAPD内参校正后，其光密度值分别为0.900±0.04、0.891±0.04、0.875±0.02与I/R. 0.817±0.02相比，P均<0.01。见图1。

表1 六组实验测得心肌坏死范围

组别	坏死心肌重量 (g)	左室心肌重量 (g)	心肌坏死范围 (%)
I/R	0.25 ± 0.01	0.70 ± 0.02	35.9 ± 2.1
IPC	0.13 ± 0.01	0.69 ± 0.02	17.6 ± 1.7*
FAO	0.17 ± 0.02	0.70 ± 0.04	24.3 ± 1.7*
MAO	0.17 ± 0.02	0.69 ± 0.02	23.5 ± 1.5*

注：*与I/R 组相比$P<0.01$

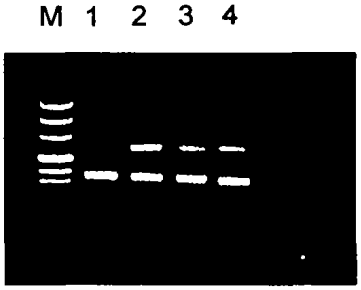


图1 四组大鼠心肌细胞内bcl-2 mRNA/GAPD表达量
（M-marker, 1-I/R., 2-ipc,3-FAO, 4-MAO）

表2 四组实验大鼠心肌坏死区心肌细胞凋亡的改变

组别	动物数	阳性细胞核数/HPF	阳性细胞核数/心肌细胞总数（%）
I/R	6	145. ± 15.5	24.67 ± 4.18
IPC	6	55.83 ± 9.6	9.50 ± 2.43*
FAO	6	80.67 ± 7.5	13.00 ± 4.29*
MAO	6	86.00 ± 9.1	15.50 ± 5.09*

注：*与I/R 组相比$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

近年来，有关细胞凋亡的研究突飞猛进，获得了重大突破，并受到生物学、医学等各个领域的普遍关注，特别是进入90年代后，相继证实人类血管内皮细胞、心肌细胞等同样存在凋亡现象，并认为细胞凋亡是多种心血管疾病发生、发展的细胞学基础[8]。目前，人们正致力于寻求某些促进或抑制细胞凋亡调控基因的方法，以促进或抑制细胞凋亡使其朝着有利于治疗疾病的方向发展。

IPC、FAO、MAO与I/R.相比，其坏死范围明显缩小。其具体的保护机制除了它们能减轻心肌顿抑外、还与其调节凋亡基因使bcl-2/bax比值升高，减低坏死区域心肌细胞凋亡数量而缩小心肌梗塞面积等有关。

长期以来，人们认为细胞坏死是缺血性心肌死亡的唯一形式。近年来，很多研究表明细胞死亡有坏死和凋亡两种形式，人类心肌梗塞同样由这两种形式组成，并且特别强调的是凋亡是心肌梗塞的重要方式。心肌细胞凋亡的生化和形态变化过程与细胞坏死则截然不同，心肌细胞持续缺血30 min便可发生凋亡，4.5h凋亡达高峰，6h后则逐渐减少。而且细胞凋亡在体内存在时间短暂，一般只有2～3h，不伴有中性粒细胞的浸润。细胞凋亡是受基因调控的主动性细胞死亡。由于凋亡过程短暂，凋亡小体不容易被发现，凋亡晚期与细胞死亡在形态上难以区分，所以目前主要靠组织原位末端标记技术区分细胞凋亡和坏死。作者用该方法对四组实验大鼠检测发现，预处理组都能减少心肌90 min缺血/180 min再灌注后坏死范围中心肌细胞的凋亡数，凋亡指数分别为：FAO 15.50 ±5.09、MAO 13.00 ±4.29、IPC 9.50±2.43，与I/R. 24.67±4.18相比，P均＜0.01。结果提示：心肌、非心肌缺血预处理一样都能减少心肌梗塞中心肌细胞的凋亡数。

3组预处理都能增加心肌梗塞中心肌细胞内的bcl-2 mRNA表达，与I/R.相比，P均＜0.01。提示预处理保护心肌坏死面积是经过调控调节心肌细胞mRNA等凋亡基因途径后减少心肌细胞凋亡的。但其具体的调控机制非常复杂，可能的作用可概括如下：①bcl-2蛋白可以阻断Ca^{2+}从内质网释出，使依赖于Ca^{2+}的核酸内切酶活性降低，阻断细胞中dna的降解而抑制细胞凋亡的发生[8]。②bcl-2蛋白定位于线粒体等亚细胞器上，该处是氧自由基产生的地方，bcl-2蛋白能抑制氧自由基的产生或起一种抗氧化剂的作用，从而阻断细胞凋亡[9]。③bcl-2蛋白可能作用于线粒体与核孔复合体上的信号分子，控制细胞信号传导而延长细胞的寿命[9]。④bcl-2蛋白是一种膜定位蛋白质，其c-末端有一段疏水性氨基酸，该疏水端对pcd有重要的抑制作用[10]。⑤抑制bcl-2家族促凋亡基因蛋白的促凋亡作用等。

Bax是与bcl-2结合产生效应的同源分子。Bax自身能形成同源二聚体，另外，它还能和bcl-2形成异源二聚体，共同调节细胞凋亡。当Bax在细胞内过量表达，同源二聚体Bax/ Bax的比例大于异源二聚体bcl-2/ Bax时，就会促进细胞凋亡，反之，则会抑制细胞凋亡[8]。有关bax mRNA在预处理中的改变，作者正在进一步研究之中。

参 考 文 献

[1] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats[J]. Lab Invest, 1996;74:86-92.

[2] Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, et al. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulation anti-death gene bcl-2[J]. Circulation, 1999;100: Ⅱ369.

[3] Saraste A, Pullki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction[J]. Circulation, 1997;95: 320-326.

[4] 王悦喜，陈运贞，董 莉. 非心肌组织缺血预处理对心肌的保护作用[J]. 重庆医科大学学报，1999;24:113-116.

[5] 王悦喜，陈运贞，董 莉. 心肌组织缺血预处理对心肌的保护作用[J]. 重庆医科大学学报，2000;25:268-269.

[6] Wang TTY, Phang JM. Effect of estrogen on apoptotic pathway in human breast cancer cell line mcf-7[J]. Cancer Research, 1995; 55: 2487-2489.

[7] Itoh G, Tamura J, Suzuki M, et al. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis[J]. Am J Pathol, 1995;146:1325.

[8] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death [J]. J Cell Biol, 1994;124(1):1-6.

[9] Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocardial infarction[J]. Circulation, 1996;94: 1506-1509.

[10] Otavai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ, et al. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993; 609.