维普资讯 http://www.cqvip.com

151-153

(15)

文章编号：0253-3626(2000)02-0151-03

大鼠心肌IP第二窗对I/R心肌细胞凋亡的影响及对bcl-2、bcl-xl表达的调节

R542.2

刘兴德，陈运贞
（重庆医科大学临床学院心血管内科 400016）

摘 要 **目的**：研究缺血预适应（IP）第二保护窗对大鼠缺血再灌注（I/R）心肌细胞凋亡的影响及其对凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl蛋白表达的调节。方法：采用TUNEL法和免疫组化方法。结果：(1) IP+IR24h组TUNEL法阳性心肌细胞核数量及阳性心肌细胞核占总心肌细胞核数的百分比均明显少于IR24h组(P<0.05-0.01)；(2) IP+IR24h组表达bcl-2和bcl-xl蛋白阳性的心肌细胞数及阳性心肌细胞占心肌细胞总数的百分比均明显高于IR24h组(P<0.05-0.01)。结论：(1) 大鼠心肌IP第二保护窗能够显著减少I/R心肌细胞凋亡；(2) IP通过上调凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl蛋白表达可能是其减少I/R心肌细胞凋亡的机制之一。

关键词 缺血预适应；心肌缺血再灌注；凋亡
中国图书分类法分类号：R542.2 Q786 **文献标识码**：A **收稿日期**：1999-07-01

Effect of ischemic preconditioning on cardiac myocyte apoptosis and the regulation of IP on Bcl-2 and Bcl-xl during myocardial ischemia / reperfusion course in rat

LIU Xing-de, et al
Department of Cardiology, College of Clinical Medicine

Abstract **Objective**: To explores the effect of ischemic preconditioning on cardiac myocyte apoptosis and the regulation of which on bcl-2 and bcl-xl during myocardial ischemia/reperfusion course in rat. **Methods**: TUNEL and immunohistochemical method. **Results**: (1) The numbers of positive cardiac myocyte nuclear and the percentage of positive cardiac myocyte nuclear in IP+IR24h group decreased significantly(P<0.05) compared with that of IR24h group;(2) The numbers of protein bcl-2 and bcl-xl positive cardiomyocyte and the percentage of protein bcl-2 and bcl-xl positive cardiomyocyte in IP+IR24h group were higher(P<0.05) compared with those of IR24h group,respectively. **Conclusion**: (1) The second window of IPs protection could decrease cardiomyocyte apoptosis significantly and (2) Up-regulating the protein expression of bcl-2 and bcl-xl in cardiomyocytes during I/R course may be one of the mechanisms of second window of IPs protection.

Key Words Ischemic preconditioning; Myocardial ischemia/reperfusion; Apoptosis

缺血预适应（Ischemic Preconditioning，IP）是重要的心肌内源性保护机制，它存在两个保护窗，第一窗在IP后1～4h以内，第二保护窗发生于24h以后。对包括人在内的不同种动物的研究发现，IP均具有降低缺血/再灌注(Ischemia/Reperfusion,I/R)损伤的效能，包括减少心肌细胞死亡数量,降低恶性心律失常的发生和心肌顿抑等。第一窗保护作用短暂，研究证实腺苷、去甲肾上腺素、血管紧张素II、缓激肽等参与了第一窗的保护作用；第二窗作用时间长，可持续到IP后72h，但其机制尚不清楚，可能与NO、超氧化物歧化酶、热休克蛋白等有关。从临床角度考虑，第二窗心肌保护更具意义，因其保护时间长，可有计划地用于PTCA和冠状动脉搭桥术等心脏缺血事件之前。故深入研究IP第二窗的发生机制具有重要的实用价值。近年来研究发现I/R心肌细胞的死亡除心肌坏死外，还存在一种受基因调控的自身程序性细胞死亡——细胞凋亡。因此，本文拟就IP第二窗对I/R心肌细胞凋亡的影响及凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl蛋白表达的调节进行研究，旨在为临床提供一点理论指导，并为今后进一步研究IP第二窗的机制、乃至基因治疗奠定一些基础。

1 材料与方法

作者介绍：刘兴德（1964-08出生），男，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 Wistar大鼠，150g～250g，雌雄不拘。实验分两组（每组大鼠6只）：①IR24h组 心肌缺血45min后，再灌注24h；②IP+IR24h组 心肌缺血5min，再灌注5min，反复3次。其后操作同IR24h组。

1.1.2 主要试剂 原位细胞凋亡检测试剂盒（Boehringer Mannheim），凋亡抑制基因bcl-2、bcl-xl蛋白抗体(Santa Cruz)，链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(S-P)免疫组化染色试剂盒(福建迈新)，DAB显色试剂盒（福建迈新）。

1.2 方法

1.2.1 在体大鼠局部心肌I/R模型制作 动物以20%乌拉坦腹腔注射（5ml/kg），行气管切开用呼吸机(DH-30，浙江医科大学医学仪器厂生产）进行机械通气，通气频率60次/min，潮气量4～6ml。左胸正中旁切口开胸，暴露心脏，于左心耳与肺动脉圆椎处稍下方穿线结扎冠状动脉左支并于结扎线根部两侧埋置结扎松解线，将结扎和松解线引出胸壁外后关胸。以收紧结扎线后与肢体联接的心电图标准导联的ST-T抬高，放松后抬高的ST-T下降1/2以上为模型成功。

1.2.2 心肌凋亡细胞的检测 实验大鼠达设定的I/R时限时，立即从左心室灌注生理盐水30ml后，再以4%多聚甲醛60ml进行活体再灌注迅速取出心脏置于4%多聚甲醛中24h，随后进行常规石蜡包埋并作心肌切片（5μm）。切片经过常规二甲苯脱蜡及梯度乙醇入水后，应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的带萤光的dUTP缺口末端标记(TUNEL)法标记心肌凋亡细胞核中的DNA3-OH末端，并以TUNEL POD法显示凋亡细胞的存在。

1.2.3 凋亡相关基因bcl-2、bcl-xl蛋白表达的检测 常规二甲苯脱蜡及梯度乙醇入水后，采用S-P免疫组化法检测凋亡相关基因bcl-2、bcl-xl蛋白表达。

1.2.4 设立对照实验 ①阳性对照：以已知的阳性片作阳性对照；②阴性对照：检测凋亡细胞时，仅用带萤光的dUTP标记液而不加末端脱氧核苷酸转移酶溶液孵育组织切片70min，余步骤同TUNEL法;检测凋亡基因的蛋白表达时，省去加入bcl-2、bcl-xl抗体的步骤，其余步骤同S-P免疫组化染色。

1.2.5 凋亡细胞核及含凋亡基因bcl-2、bcl-xl蛋白细胞的计数分析

正常心肌细胞核呈蓝色，而凋亡细胞核呈棕黄色；含凋亡相关基因bcl-2、bcl-xl蛋白的胞浆为棕黄色。在光学显微镜下于心肌梗塞周边区计数5个高倍视野(HPF.400×)中的阳性细胞核（胞浆）数，求其均值。

1.2.6 统计学分析

所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较采用t检验。$P<0.05$认为有统计学差异、$P<0.01$认为具有显著性差异。

2 结 果

2.1 大鼠心肌IP第二窗对I/R心肌细胞凋亡的影响(表 1)

结果显示：IP+IR24h组TUNEL法阳性心肌细胞核数量及阳性心肌细胞核占总心肌细胞核数的百分比均明显少于IR24h组($P<0.05$)，提示IP第二窗能显著降低I/R心肌细胞凋亡。

2.2 大鼠心肌 IP 对 IR 24h 心肌细胞凋亡相关基因bcl-2、bcl-xl蛋白表达的影响(表 2)

结果显示：IP+IR24h组表达bcl-2和bcl-xl蛋白阳性的心肌细胞数及阳性心肌细胞占心肌细胞总数的百分比均明显高于IR24h组($P<0.05$)；提示IP第二窗

表1 IP对IR24h心肌细胞凋亡的影响

组别	动物数	阳性心肌细胞核数/HPF	阳性心肌细胞核数/心肌细胞总核数(%)
IR24h	6	196.83±67.28	56.18±16.47
IP+IR24h	6	92.50±45.54*	27.70±11.82**

与IR24h组比较：* $P<0.05$, ** $P<0.01$

表2 IP对IR24h心肌细胞凋亡基因bcl-2、bcl-xl 蛋白表达的影响

检测指标	阳性心肌细胞数/HPF		阳性心肌细胞数/心肌细胞总数(%)	
	IR24h	IP+IR24h	IR24h	IP+IR24h
n	6	6	6	6
bcl-2	72.17±20.45	116.50±23.79**	16.21±8.67	38.05±7.85▲▲
bcl-xl	156.83±41.10	219.17±40.98*	50.26±14.08	67.70±12.26▲

与IR24h组阳性心肌细胞数比较：* $P<0.05$, ** $P<0.01$;

与IR24h组阳性心肌细胞数/心肌细胞总数比较：▲ $P<0.05$、▲▲ $P<0.01$.

维普资讯 http://www.cqvip.com

能显著上调凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl的蛋白表达。

3 讨 论

1986年Murry等[1]在狗的心肌I/R损伤研究中首先发现IP具有心肌保护效能。此后，在不同种属的动物[2,3]包括人类的心脏[4]均发现IP具有保护I/R损伤的效能，包括降低I/R心律失常、心肌顿抑和心肌梗塞范围等。

近年来发现，I/R心肌细胞死亡存在两种形式：坏死和凋亡，而且后者在I/R损伤中尤为重要[5]。Piot[6]等报道IP早期能够显著降低I/R心肌细胞凋亡数量。认为IP早期减少I/R损伤的原因部分来自IP降低I/R心肌细胞凋亡的作用，但IP晚期对I/R心肌细胞凋亡的影响少见报道。本研究显示IP+IR24h组TUNEL法检测到的阳性心肌细胞核数量以及阳性心肌细胞核数占心肌细胞总数的百分比均分别明显少于IR24h组，表明IP第二窗能显著减少I/R心肌细胞凋亡。提示IP第二窗减少I/R心肌细胞凋亡可能是其降低I/R损伤的机制之一。

IP降低I/R心肌细胞凋亡的机制还不很清楚。Gottlieb[7]等发现IP能提高I/R心肌细胞的存活能力，减少代谢抑制所诱发的细胞内酸中毒，减少DNA断裂。如果阻滞空泡质子ATP酶的活性，则可消除IP的这些作用，因此，在介导IP效能时PKC的目标是激活空泡质子ATP酶，继而在持续缺血导致代谢抑制时减少细胞内酸化，从而抑制细胞凋亡。

细胞凋亡是由局部环境生理或病理性刺激引起的一种受基因调控的自身程序性细胞死亡。而且凋亡的发生有赖于新的蛋白质的合成并消耗能量，文献报道bcl-2基因家族，包括bcl-2、bcl-xl和bad、bak、bax等对细胞凋亡产生重要影响[8]。研究发现[9] bcl-2是调节细胞凋亡的一个重要分子，它能抑制许多凋亡信号引起的细胞凋亡，如抑制去除生长因子、质膜过氧化反应及病毒等因素诱导的细胞凋亡；bcl-xl和bcl-2相似，对细胞凋亡也起保护作用。

本研究显示，IP能显著上调缺血45min再灌注24h时凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl在大鼠心肌细胞中的蛋白表达。提示IP第二窗可能通过上调凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl在心肌细胞的表达而减少I/R再灌注心肌细胞凋亡。

总之，IP能够明显减少缺血45min再灌注24h后心肌细胞凋亡数目，显示其保护缺血心肌免遭再灌注损伤的效应。同时IP能够显著上调缺血45min再灌注24h心肌细胞凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl的蛋白表达。表明IP第二窗减少I/R心肌细胞凋亡的机制可能与其上调bcl-2和bcl-xl的基因表达有关。值得一提的是，细胞凋亡是一个非常复杂的过程，并且凋亡的不同阶段可能有不同的凋亡调控基因参与，本研究仅对凋亡抑制基因bcl-2和bcl-xl进行研究具有一定局限性，因此，有必要进一步研究其他凋亡调控基因如bax、bad、bak等在IP过程中的变化和意义。

参 考 文 献

[1] Murry CE,Jennings RB,Reimer KA.Preconditioning with ischemia:a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation. 1986; 174:1124~1136

[2] Hagar JM,Haie SL,Kloner RA.Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat[J].Circ Res.1991;68:61~68

[3] Cohen MV,Liu GS,Downey JM.Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits[J].Circulation.1991;84:341~349

[4] Ottani F,Galvani M,ferrini D,et al.Prodromal angina limits infarct size:a role for ischemic preconditioning[J].Circulation. 1995;91:291~297

[5] Gottlieb RA,Burleson KO,Kloner RA,et al.Reperfusion injury induces apotosis in rabbit cardiomyocytes[J].J Clin Invest. 1994; 94:1621~1628

[6] Piot CA,Padmanaban D,Ursell PC,et al.Ischemic precondioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo[J]. Circulation.1997; 96:1598~1604

[7] Gottlieb RA,Gruol DL,Zhu JY,et al.Precondioning rabbit cardiomyocytes:role of pH,vacuolar proton ATPase,and apoptosis [J].J Clin Invest.1996; 97:2391~2398

[8] 黄晓明. Bcl-2及其相关蛋白与细胞凋亡的调节[J]. 国外医学（分子生物学分册），1997;19:16~18

[9] Schwarze MMK & Haeley RG.Prevention of myelema cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xl[J].Cancer Res.1995;55:2262~2265