维普资讯 http://www.cqvip.com

20-22

(7)

文章编号：0253-3626（2000）01-0020-03

R542.2

蛋白激酶C和蛋白酪氨酸激酶活性对缺血再灌注心肌细胞凋亡影响的实验研究

刘兴德，陈运贞
（重庆医科大学临床学院心内科　400016）

摘　要　为探讨缺血预适应(Ischemic Preconditioning,IP)早期以及蛋白激酶C (Protein kinase C,PKC)及蛋白酪氨酸激酶(Protein Tyrosine Kinase,PTK)激动剂和抑制剂对缺血再灌注(I/R)心肌细胞凋亡的影响以及IP效能发挥通路中PKC和PTK的关系。用TUNEL法检测I/R心肌细胞凋亡。结果显示：1、IP早期能显著降低I/R心肌细胞凋亡($P<0.01$)；2、PKC激动剂PMA及PTK激动剂anisomycin均能显著降低I/R心肌细胞凋亡($P<0.01$)；3、PKC抑制剂灯盏花素不能阻断anisomycin降低I/R心肌细胞凋亡的作用,而PTK抑制剂lavendustin A则能阻断PMA的效应。上述研究显示:PMA和anisomycin能模拟IP早期的抗I/R心肌细胞凋亡的作用;并提示在IP信息传递通路中PTK位于PKC的下游。

关键词　蛋白激酶C；酪氨酸激酶；缺血再灌注心肌细胞凋亡
中国图书分类法分类号：R329.2+8　　**文献标识码**：A　　**收稿日期**：1999-02-25

Experimental study on effect of PKC and protein tyrosine kinase on cardiomyocyte apoptosis during ischemia / reperfusion in rat heart

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

Abstract: The purpose of this study was to use the TUNEL method for detecting I/R cardiomyocyte apoptosis to investigate the effect of ischemic preconditioning(IP),the activators of protein kinase C(PKC) and protein tyrosine kinase(PTK) on ischemia/reperfusion(I/R) cardiomyocyte apoptosis,and the relationship between PKC and PTK for IPs anti-apoptosis effect in rat hearts.The results showed that:(1)IP could reduce I/R cardiomyocyte apoptosis significantly ($P<0.01$);(2)PMA,the activator of PKC,and anisomycin,the activator of PTK,could also reduce I/R cardiomyocyte apoptosis significantly($P<0.01$);(3)Scutellarein ,the inhibitor of PKC , could not block the effect of anisomycins anti-apoptosis during I/R ,and lavendustin A ,the inhibitor of PTK,could block the effect of PMAs anti-apoptosis during I/R.These data suggest both PMA and anisomycin could mimic IPs anti-apoptosis effect during I/R;PTK seems to be downstream of PKC for IPs anti-apoptosis effect during I/R injury in rat hearts.

Key Words: Protein kinase C; Protein tyrosine kinase; Ischemia/reperfusion cardiomyocyte apoptosis

缺血预适应（Ischemic Preconditioning,IP）是重要的内源性保护机制,除减少缺血再灌注（Ischemia /Reperfusion，I/R）心律失常，延缓心肌坏死和改善心功能外，其早期还具有减少I/R心肌细胞凋亡的作用[1]。已有许多研究证实蛋白激酶C（PKC）抑制剂能够阻断鼠、兔及人等IP的保护效能，表明PKC在IP保护效能中起重要作用。另有学者报道[2]酪氨酸激酶抑制剂genistin亦能阻断大鼠IP的抗心肌坏死作用，提示酪氨酸激酶在介导IP保护效能中也占重要位置。然而，该两种激酶在IP心肌细胞凋亡中的作用罕见报道，且两者在IP信息传递通路中的关系尚存在争议。本文拟对PKC和酪氨酸激酶的活性对大鼠I/R心肌细胞凋亡的影响及其相互关系进行探讨。

作者介绍：刘兴德（1964-08出生），男，博士研究生

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

Wistar 大鼠，体重150～250g，雌雄不拘,随机分为6组(每组6只)。I/R组：心肌缺血45min后，再灌注180min;IP组：心肌缺血5min，再灌注5min，反复3次。其后操作同I/R

维普资讯 http://www.cqvip.com

组；PMA组：经股静脉缓慢注射PMA(PKC激动剂)1nmol/kg（参照文献[3]折算剂量，下同）15 min，间隔15 min，其后操作同I/R组；PMA+LAV组：经股静脉缓慢注射PMA和酪氨酸激酶抑制剂 lavendustin A（LAV）10 μ mol/kg15 min，间隔15 min，其后操作同I/R组；ANISO组：经股静脉缓慢注射酪氨酸激酶激动剂anisomycin(ANISO)0.2 μ g/kg15 min，间隔15 min，其后操作同I/R组。ANISO+SCU组：经股静脉缓慢注射ANISO和PKC抑制剂灯盏花素(SCU)40mg/kg15 min，间隔15 min，其后操作同I/R组。

1.2 主要化学试剂

蛋白酶 K(Boehringer Mannheim,BM)，凋亡检测试剂盒(BM)，anisomycin(Sigma)，PMA (Sigma)，lavendustin A(Sigma)，灯盏花素(云南生物制药厂)，DAB显色试剂盒(福建迈新)。

1.3 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)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锥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段抬高，放松后抬高的ST-T段下降1/2以上为模型成功。

1.4 心肌凋亡细胞的检测

1.4.1 心肌组织石蜡切片的制备

实验大鼠达到设定的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(5 μ m）。

1.4.2 凋亡细胞原位检测

采用TUNEL法[4]原位检测凋亡细胞，主要操作步骤如下：心肌组织石蜡切片→二甲苯脱蜡及梯度乙醇入水→PBS（pH:7.2,下同）冲洗(5 min×3,下同)→蛋白酶K(20 μ g/ml)消化30 min（37℃）→PBS冲洗→含0.1% tritonX-100 的 0.1%枸橼酸钠溶液（冰上，4 min）→阻断内源性过氧化物酶 (POD)活性（0.3% H_2O_2室温下处理5 min）→PBS冲洗→加50 μ l TUNEL反应混合液,包括脱氧核苷酸转移酶液(enzyme液)和带荧光的标记液（label液），37℃ 孵育70 min→PBS冲洗→加POD液37℃孵育40 min→PBS冲洗→二氨基联苯氨(DAB)显色→光镜观察。

1.4.3 设立对照实验

以已知的阳性片作阳性对照;阴性对照操作:仅用label液而不加enzyme液，余步骤同上。

1.4.4 凋亡细胞记数分析

正常心肌细胞核呈兰色，而凋亡细胞核为棕黄色。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×)中的阳性细胞核数，求其均值。

1.5 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

IP早期及PKC、酪氨酸激酶的激动剂和抑制剂对I/R心肌细胞凋亡的影响见表。结果显示：①与I/R组比较，IP早期、PMA和ANISO组TUNEL法检测的阳性细胞和阳性细胞核百分比均明显不同（$P<0.01$），提示IP早期、PMA和ANISO均能够显著降低I/R心肌细胞凋亡的数量；②与PMA组比较，PMA+LAV组的I/R心肌细胞凋亡数量较PMA组的明显增加（$P<0.05$）；而ANISO与ANISO+SCU两组间的I/R心肌细胞凋亡数量无明显变化。

表 IP及 PKC、酪氨酸激酶的激动剂和抑制剂对I/R心肌细胞凋亡的影响

组别	动物数	阳性核/HPF	阳性核/总细胞核（%）
I/R	6	53.00±13.46	16.17±4.54
IP	6	30.83± 6.49**	9.75±2.65*
PMA	6	29.50±9.09**	9.66±3.09*
PMA+LAV	6	50.83±16.22☆	15.41±5.36☆
ANISO	6	30.67±7.36**	7.97±2.44**
ANISO+SCU	6	28.33±10.67**	7.18±2.64**

*与I/R组比较：*P <0.05. **P <0.01；☆与PMA组比较：P <0.05*

3 讨 论

本文显示：IP早期能显著减少I/R心肌细胞凋亡的数量（$P<0.01$），同时，PKC激动剂PMA亦能够显著减少大鼠I/R心肌细胞凋亡（$P<0.01$）。从而证实了PKC的活化具有模拟IP 减少大鼠I/R心肌细胞凋亡的作用。

PKC在IP效能发挥中占重要地位，研究发现，在多种动物中心肌IP产生保护效能时，PKC的活化是必需的。选择性抑制PKC的活性可消除IP的保护作用[5, 6, 7]。本实验提示PKC参与介导了IP减少I/R心肌细胞凋亡的作用。

本研究还显示：酪氨酸激酶激动剂anisomycin显著减少I/R心肌细胞凋亡（$P<0.01$），表明酪氨酸激酶的活化亦能模拟IP减少I/R心肌细胞凋亡。提示酪氨酸激酶也参与了IP效能的信息传递。国外学者[2]曾报道酪氨酸激酶抑制剂genisten能够抑制大鼠IP的保护作用，而该酶的激动剂anisomycin能够模拟

维普资讯 http://www.cqvip.com

IP抗心肌坏死的作用[3]，认为酪氨酸激酶在IP效能发挥中起关键作用，本实验结果与上述结论相符。

关于PKC和酪氨酸激酶在IP效能发挥时细胞内信号传递中的关系目前存在两种观点。一种是Maulik[2]等人的观点，他们给心肌I/R的大鼠注射酪氨酸激酶抑制剂genistein，发现磷脂酶D（PLD）和PKC的活性均受到抑制，认为在IP效能发挥时细胞内信号传递中酪氨酸激酶可能位于PKC的上游。然而其在实验中采用的酪氨酸激酶抑制剂为genistein。有学者曾报道，genistein具有抑制PKC的效应[8]，因此，Maulik的实验结果并不能除外genistein同时作用于酪氨酸激酶和PKC所致。另一种观点认为，IP效能发挥时细胞内信号传递中酪氨酸激酶可能位于PKC的下游[3]。

有研究发现，PKC能够诱导数种细胞中相关蛋白的磷酸化。抑制PKC能阻断成纤维瘤细胞[9]、星性细胞[10]丝裂原激活的蛋白激酶（MAPK）的酪氨酸磷酸化。肾上腺诱导的主动脉平滑肌细胞酪氨酸磷酸化能被PKC抑制剂（Calphostin C）阻断[11]。因此，在IP发挥效能的信息传递通路中酪氨酸的活化有可能位于PKC之后。本研究显示选择性酪氨酸激酶抑制剂lavendustin A阻断了PMA激活PKC引起的减少I/R心肌细胞凋亡的作用，而PKC抑制剂灯盏花素不能阻断anisomycin激活酪氨酸激酶所产生的抗I/R心肌细胞凋亡效应，提示IP减少I/R心肌细胞凋亡的信号传递顺序为从PKC到酪氨酸激酶，即酪氨酸激酶位于PKC的下游。此与Baines[3]的结果相符。

本实验还显示，PKC抑制剂灯盏花素未能阻断anisomycin减少I/R心肌细胞凋亡的作用，也支持酪氨酸激酶位于PKC的下游。但本研究尚不能除外PKC和酪氨酸激酶分属两条信息通路，只有当两条通路同时被激活才能显示其保护效能的可能性。

4 结 论

PMA和anisomycin均能模拟IP减少大鼠I/R心肌细胞凋亡。在模拟IP效能的胞内信息传递通路中，提示酪氨酸激酶位于PKC的下游。

参 考 文 献

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

[2] Maulik N,Watanabe M,Zu YL,et al. Ischemic precondi - tioning triggers the activation of MAP kinases and MAPKAPK kinase 2 in rat heart[J]. FEBS Lett, 1996;396:233~237

[3] Bines CP,Wang L,Cohen MV,et al. Protein tyrosine kinase is downstream of protein kinase C for ischemic preconditioning's anti-infarct effect in the rabbit heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 1998; 30:383~392

[4] Gold R,Schmied M,Giegerich G,et al. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques[J]. Lab Invest,1994; 71:219~222

[5] Ytrehus K,Liu Y,Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by peotein kinase C activation[J].Am J Physiol, 1994; 266:1145~1152

[6] Speechly-Dick ME,Mocanu MM,Yellow DM. Protein kinase C:its role in ischemic preconditioning in the rat[J].Circ Res, 1994; 75:586~590

[7] Ikonomidis JS,Shirai T,Weisel RD. Preconditioning cultured human pediatric myocytes requires adenosine and protein kinase [J].C.Am J Physiol, 1997;272:1220~1230

[8] Geissler JF,Traxler P,Regenass U,et al. Thiazolidine -diones: biochemical and biological activaty of a novel class of tyrosine protein kinase inhibitors[J]. J Biol Chem, 1990;265: 22255~ 22261

[9] Offermans S,Bombien E,Schultz G, Stimulation of tyrosine phosphorylation and mitogen-activated-protein (MAP)kinase activaty in human SH-SY5Y neuro-blastoma cell by carbachol[J]. Biochem J, 1993; 294;545~550

[10] Bhat NR,Zhang P,Hogan EL. Thrombin activates mitogen - activated-protein kinase in primary astrocyte cultures[J]. J Cell physiol, 1995; 165:417~424

[11] Khalil RA,Menice CB,Wang CL,et al. Phosphotyrosine - dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cell[J]. Circ Res, 1995;76: 1101~1108