

缺血预处理减轻在体家兔心肌细胞凋亡

丁延峰, 张蔓蔓, 何瑞荣*

(河北医科大学基础医学研究所生理室, 石家庄 050017)

摘要: 在麻醉家兔心肌缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)模型上, 观察 IR 和缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)对血流动力学、心外膜心电图、心肌梗塞范围、心肌细胞凋亡和凋亡相关调控基因蛋白(Fas、Bcl-2、Bax等)的影响。所得结果如下:(1)在 IR 过程中, 动脉血压、心率和心肌耗氧量进行性降低;心外膜心电图 ST 段在缺血期明显抬高($P < 0.001$),再灌注时逐渐恢复至基础对照值。(2)单纯 IR 组的梗塞心肌占缺血心肌的 $57.7 \pm 2.0\%$, IP 组的梗塞心肌为 $27.7 \pm 1.5\%$ ($P < 0.01$)。(3)凝胶电泳显示, 单纯 IR 组的缺血组织 DNA 呈云梯状, IP 组则无明显云梯状;原位末端标记表明, IP 组缺血未坏死心肌的凋亡细胞较 IR 组稀少;流式细胞术测得 IR 和 IP 组中缺血心肌的细胞凋亡率分别为 $11.2 \pm 0.4\%$ 和 $6.35 \pm 0.2\%$ ($P < 0.01$)。(4)与非缺血心肌相比, IR 和 IP 组缺血心肌的 Fas 和 Bax 蛋白表达均明显增高($P < 0.05$),且 IR 组的 Fas 蛋白表达较 IP 组的明显($P < 0.05$)。IR 组缺血心肌 Bcl-2/Bax 较非缺血心肌组织明显减小($P < 0.01$)。以上结果表明, IP 减少 IR 引发的心肌细胞凋亡,并减少 IR 心肌组织中 Fas 蛋白的表达。

关键词: 缺血-再灌注;缺血预处理;心脏;细胞凋亡;流式细胞术;基因

学科分类号: Q463; R331.3

Ischemic preconditioning reduces cardiomyocytic apoptosis in rabbit heart *in vivo*

DING Yan-Feng, ZHANG Man-Man, HE Rui-Rong*

(Department of Physiology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

Abstract: The effects of ischemia-reperfusion (IR) and ischemic preconditioning (IP) on hemodynamics, epicardial electrography, myocardial infarct size, cardiomyocytic apoptosis and gene proteins involving apoptosis (Fas, Bcl-2 and Bax) were observed in anesthetized rabbit myocardium. The results are as follows. (1) During ischemia-reperfusion, heart rate, arterial blood pressure and myocardial oxygen consumption were reduced progressively. The epicardial electrographic ST-segment was elevated significantly during ischemia ($P < 0.001$) and recovered to the baseline during reperfusion. (2) The infarct size occupied $57.7 \pm 2.0\%$ of the ischemic myocardium in IR group while IP reduced the infarct size to $27.7 \pm 1.5\%$ ($P < 0.01$). (3) DNA ladder pattern of ischemic myocardium was revealed by agarose gel electrophoresis in IR group while it was not found in IP group. Apoptotic cardiomyocytes were sparse within the ischemic myocardium at risk in IP as compared with those in IR heart. Apoptosis rate of the ischemic myocardium from IR and IP groups detected by flow cytometry was $11.2 \pm 0.4\%$ and $6.35 \pm 0.2\%$ ($P < 0.01$), respectively. (4) Fas and Bax protein expression in the ischemic myocardium of IR and IP groups was elevated as compared with those in non-ischemic myocardium group ($P < 0.05$). The Fas protein expression of IR group was higher than that of IP group ($P < 0.05$). Bcl-2/Bax ratio of IR group was lower than that in non-ischemic myocardium ($P < 0.01$). From the results, it is suggested that IP decreases cardiomyocytic apoptosis induced by IR and this action is mediated by the reduction of Fas protein expression.

Key words: ischemia-reperfusion; ischemic preconditioning; heart; apoptosis; flow cytometry; gene

缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)的心肌保护作用由 Murry 等^[1]首次报道后,已被大量实验证实,但其作用机制尚未阐明^[2]。我们以前的实验表明,IP 可减轻麻醉家兔缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)心肌的损伤,并提出一氧化氮在这一保护效应中不起重要作用^[3],而 ATP 敏感性钾通道可能参与此保护机制^[4]。近年研究发现,IR 除引发心肌细胞坏死外,也可诱发心肌细胞的凋亡^[5-7]。Gottlieb 等^[8]和 Piot 等^[9]观察到,IP 可减少缺氧或 IR 所致的心肌细胞凋亡。据现有资料,细胞凋亡受多种因素调控,其中以细胞凋亡相关基因蛋白(如 Bcl-2、Bax 和 Fas 等)的作用较为重要^[10,11]。但 IP 对心肌保护时是否调控这些基因的表达,目前尚未明确。本实验旨在家兔 IR 模型上验证 IP 是否减少 IR 所致的心肌细胞凋亡,并观察 IP 对上述凋亡相关调控基因的影响。

1 材料和方法

1.1 家兔心脏 IR 模型的制备 24 只雄性家兔(2.5~3.5 kg)用氨基甲酸乙酯静脉麻醉,开胸暴露心脏,胸膜保持完好,动物行自主呼吸。在冠状动脉左室支的上 1/3 处穿线,进行心肌 IR。右颈动脉插管以监测血压、心率,以血压-心率指数反映心肌耗氧量^[3,4]。

1.2 实验分组和程序 待动物的血压、心率和心外膜电图稳定后,记录结果作为正常对照值。然后分为两组:(1)单纯 IR 组($n=12$):缺血 45 min-再灌注 180 min,分别测记缺血和再灌注过程的心外膜电图、血压和心率;最后有 6 只家兔用于确定心肌梗塞范围,另有 6 只作心肌细胞凋亡及基因蛋白表达的分析。(2)IP 组($n=12$):重复两次缺血 5 min-再灌注 10 min 后,随即进行(1)组的实验程序,以确定 IP 对 IR 心肌的作用。

1.3 心肌缺血和心肌梗塞范围的确定 缺血时心脏表面青紫,再灌注明显充血,并以心外膜 ST 段反映心肌缺血的程度和范围。实验结束后,结扎冠状动脉,左心室注入伊文思蓝确定未缺血与缺血心肌,用氯化硝基四氮唑蓝确定心肌梗塞范围^[3,6,7]。

1.4 以原位组织化学方法确定细胞凋亡 分别取正常和缺血区心肌组织,浸入 10% 中性福尔马林磷酸缓冲液中,4℃ 固定 24 h。应用 Boehringer Mannheim 公司提供的细胞凋亡试剂盒,采用末端探针标记(Tdt-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)方法检测心肌凋亡细胞^[7]。

1.5 组织 DNA 的提取和凝胶电泳 取正常或缺血心肌组织 500 mg,低温下将组织匀浆,按 Itoh 等的方法进行 DNA 抽提和分离^[12]。取 DNA 液于 1.6% 琼脂糖凝胶中进行电泳,经溴化乙锭染色,紫外灯下观察、照相。

1.6 以流式细胞方法测定细胞凋亡率 用机械法分散心肌组织,收集单细胞悬液,经 300 目尼龙网过滤离心沉淀 2 min 后,加生理盐水洗涤,再次离心沉淀后,置于 70% 乙醇中备用。用溴化乙锭一步插入法进行 DNA 染色,由流式细胞仪(FACS420, Becton-Dicinson)测定。仪器事先用鸡红细胞标定,使其变异系数 $<5\%$ 。将所得数据输入计算机,经 Bioconsort 专用软件处理,分析细胞凋亡率^[13,14]。

1.7 以流式细胞方法测定基因蛋白表达 用以上制备好的单细胞悬液,通过间接荧光方法进行标记。将 1:100 的鼠抗兔 Bcl-2、Bax 和 Fas 蛋白抗体 100 μl 分别加入到含 6×10^5 细胞的离心管中混匀,37℃ 水浴孵育 30 min,以 PBS 离心洗涤 2 次除去未结合抗体,加入 1:20 羊抗鼠 FITC-IgG(军事医学科学院微生物研究所)100 μl ,37℃ 温育 30 min,用 PBS 冲洗未结合抗体,同时以 PBS 代替第一抗体作为阴性对照。在制备好的样品中加 PBS 1 ml,并各取 1 滴涂片,荧光显微镜下观察。有 Bcl-2、Bax 蛋白存在的细胞浆内呈绿色荧光,有 Fas 蛋白表达的细胞膜则有绿色荧光。将样品上机进行流式细胞测定 Bcl-2、Bax 和 Fas 蛋白,将采集的数据输入计算机进行处理,以荧光指数(Fluorescence index, FI)表示蛋白的相对含量^[13,15]。

1.8 主要药品和试剂 氨基甲酸乙酯(上海化学试剂采购供应站分装),氯化硝基四氮唑蓝(上海前进化学试剂厂),TUNEL 检测试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司),DNA Ladder 标品(华美生物工程公司),兔 Bcl-2、Bax 和 Fas 多抗(美国 Santa Cruz 公司),FITC-IgG(军事医学科学院微生物研究所),其他试剂均为国产分析纯。

1.9 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示,组内数据应用配对 t 检验,两组间比较采用 Student's t 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 心率、血压、心肌耗氧量和心外膜电图

两组动物在 IR 过程中,心率、血压和心肌耗氧量呈持续性下降,但两组间无明显差异。心外膜电图 ST 段抬高的平均值和 ST 段抬高大于或等于 2

mV 的点数在缺血时均明显增加,再灌注后又逐渐恢复到基础对照值(表 1)。

表 1. 麻醉家兔缺血-再灌注过程中心率、血压、心肌耗氧量和心外膜电图的变化

Table 1. Changes in heart rate, blood pressure, myocardial oxygen consumption and epicardial electrography during myocardial ischemia-reperfusion in anesthetized rabbits

Group	Control	Ischemia (45 min)	Reperfusion (180 min)
HR (bpm)			
IR	317 ± 14	298 ± 15**	265 ± 16**
IP	311 ± 20	301 ± 20**	268 ± 21***
MAP (kPa)			
IR	12.11 ± 0.60	10.34 ± 0.59*	7.94 ± 0.67***
IP	12.23 ± 0.71	10.00 ± 0.54*	7.29 ± 0.25***
PRI (kPa/min·1000 ⁻¹)			
IR	3.98 ± 0.19	3.06 ± 0.41*	2.11 ± 0.26***
IP	3.82 ± 0.36	3.05 ± 0.33*	1.97 ± 0.21***
MST (mV)			
IR	3.68 ± 0.25	32.45 ± 8.04***	2.33 ± 0.36
IP	3.42 ± 0.42	28.17 ± 5.34***	1.83 ± 0.34
NST (n)			
IR	0.50 ± 0.22	4.00 ± 0.26***	0.33 ± 0.21
IP	0.33 ± 0.21	4.17 ± 0.17***	0.33 ± 0.21

$n = 12$. IR: ischemia-reperfusion; IP: ischemic preconditioning; HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; PRI: pressure-rate index; MST: mean elevation of epicardial electrographic ST-segment; NST: numbers of point with the ST-segment elevation beyond 2 mV.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with control.

2.2 心肌梗塞范围

经伊文思蓝染色确定, IR 组中缺血心肌组织占左心室的 $59.6 \pm 2.3\%$, IP 组为 $59.4 \pm 3.4\%$, 两组相比无明显差别。应用硝基四氮唑蓝染色法显示, IR 组坏死心肌占缺血心肌的 $57.7 \pm 2.0\%$, 占左心室的 $34.3 \pm 1.9\%$; IP 组坏死心肌占缺血心肌的 $27.7 \pm 1.5\%$, 占左心室的 $15.8 \pm 0.91\%$, 两组相比有明显差别($P < 0.01$)。

2.3 心肌细胞凋亡

DNA 凝胶电泳显示, 非缺血心肌组织的 DNA 电泳呈一条整齐的条带, IR 组 6 只动物的缺血心肌组织中均有 DNA 云梯状条带, IP 组缺血心肌组织的 DNA 未见明显的云梯状条带(图 1)。经 TUNEL 染色, 可见凋亡细胞的核染成深棕色, 非凋亡细胞的胞核不着色。在正常心肌组织和坏死心肌组织无凋亡细胞; 在缺血未坏死的心肌中, IR 组有大量凋亡

细胞分布稀疏(图2)。由流式细胞仪测得缺血/再灌注区的心肌细胞凋亡率,IR组为 $11.2 \pm 0.4\%$,IP组为 $6.35 \pm 0.2\%$,两组间存在明显差异($P < 0.01$),而非缺血心肌组织的凋亡率为 $0.8 \pm 0.1\%$ (图3)。

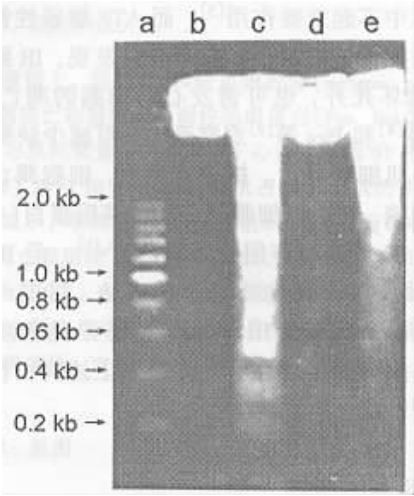


图 1. 家兔心室肌组织 DNA 的凝胶电泳

Fig.1. DNA agarose gel electrophoresis from rabbit ventricular myocardium. a. DNA ladder marker ; b. Non-ischemic myocardium following IR ; c. Ischemic myocardium following IR with ladder pattern of DNA ; d. Non-ischemic myocardium following IP ; e. Ischemic myocardium following IP.

2.4 Fas、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化

与非缺血心肌组织相比,IR 组和 IP 组缺血心肌中的 Fas 和 Bax 蛋白表达均显著增高,且 IR 组的 Fas 蛋白表达较 IP 组增高明显($P < 0.05$);两组缺血心肌中 Bcl-2 的蛋白表达与非缺血心肌相比无明显变化($P > 0.05$)。在 IR 组缺血心肌中的 Bcl-2/Bax 较非缺血心肌显著减小,而在 IP 组缺血心肌中则无明显变化(表2)。

表 2. 心室肌组织中 Fas、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化

Table 2. Changes in Fas , Bcl-2 and Bax protein expression in ventricular myocardium

	Fluorescence index			Bcl-2/Bax
	Fas	Bcl-2	Bax	
NI	1.00	1.00	1.00	1.00
IR	$1.87 \pm 0.25^{**}$	0.95 ± 0.04	$1.50 \pm 0.06^{**}$	$0.63 \pm 0.11^{**}$
IP	$1.21 \pm 0.21^{* \#}$	1.15 ± 0.09	$1.43 \pm 0.11^{*}$	0.80 ± 0.10

$n = 6$. NI : non-ischemia ; IR : ischemia-reperfusion ; IP : ischemic preconditioning. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ compared with NI ; $^{\#}P < 0.05$ compared with IR.

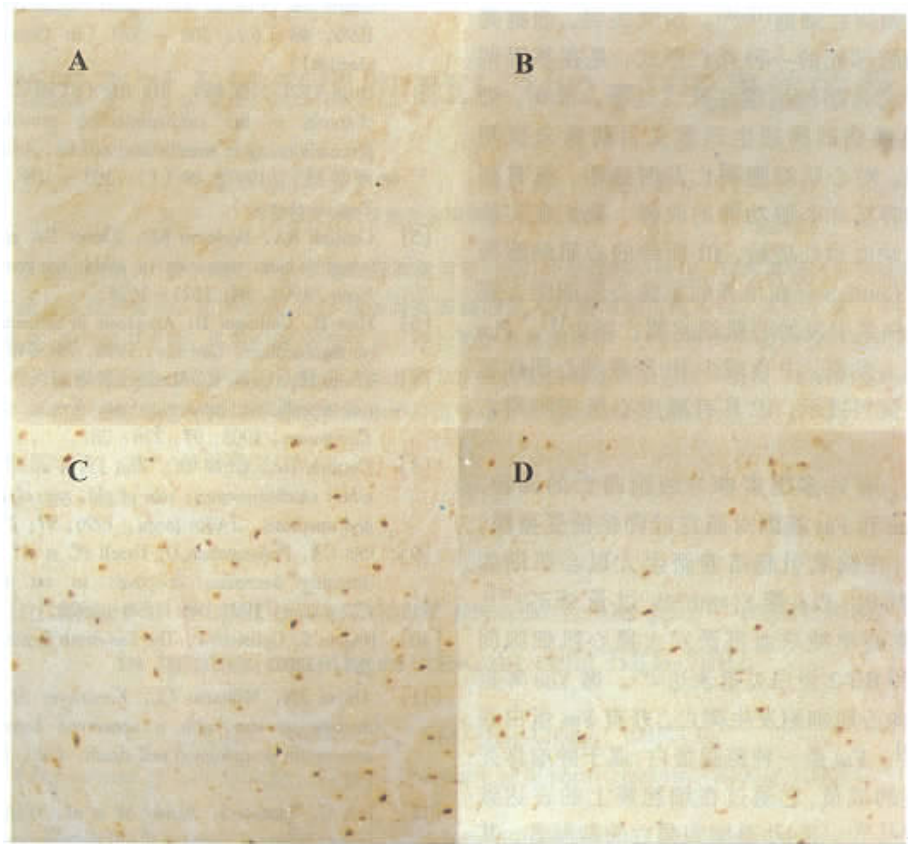


图 2. 家兔心室肌的 TUNEL 染色(×100)
Fig.2. Staining of ventricular myocardium by TUNEL in rabbits (×100). A. Non-ischemic myocardium. B. Necrotic myocardium. C. Ischemic myocardium following IR (numerous apoptotic cells). D. Ischemic myocardium following IP (sparse apoptotic cells).

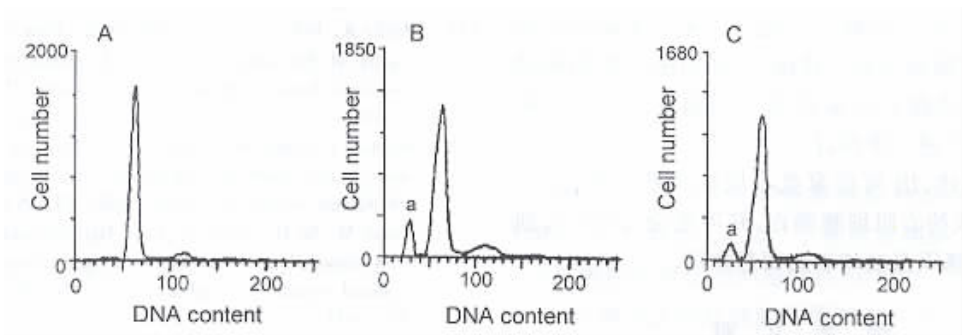


图 3. 心肌细胞凋亡率的流式细胞术测定
Fig.3. Measurement of cardiomyocytic apoptosis rate by flow cytometry. A. Non-ischemic myocardium. B. Ischemic myocardium following IR with a large apoptosis peak. C. Ischemic myocardium following IP with a small apoptosis peak. a : apoptosis peak.

3 讨论

本实验在家兔心脏 IR 模型上证实，IP 可减少 IR 所致的心肌坏死，这与我们先前的研究结果一

致^[3,4]。我们通过琼脂糖凝胶电泳显示的典型梯状图谱、TUNEL 法原位检测的 DNA 断裂片段以及流式细胞术测定的凋亡率等综合技术，定性和定量地证实 IR 可诱发心肌细胞凋亡。已知缺血^[16]、缺氧^[17]均能

引发心肌细胞凋亡。在急性心肌梗塞病人的心肌中,也检测到凋亡细胞^[12,18]。研究表明,细胞凋亡是不同于细胞坏死的一种死亡形式,是在基因调控下进行的主动有序的生理性死亡过程。然而,细胞凋亡在心脏疾病的病理生理意义目前尚未被阐明。不难设想,对心肌细胞凋亡及时防治,将有利于心肌细胞的存活和心脏功能的改善。我们在实验中对心脏予以缺血预处理后,IR 所致的心肌细胞凋亡明显减少。Gottlieb 等在培养的家兔心肌细胞上观察到,IP 可使缺氧引发的心肌细胞凋亡减少^[8]。Piot 等在大鼠心脏上发现,IP 也减少 IR 所致的心肌细胞凋亡^[9]。这些资料提示,IP 具有减少心肌细胞凋亡的作用。

业已证实,有许多因素参与细胞凋亡的调控,其中 Bcl-2、Bax 和 Fas 基因对凋亡的调控倍受重视。Tanaka 等提出,在缺氧引起培养新生大鼠心肌细胞发生凋亡的同时,Fas 蛋白 mRNA 过量表达^[17]。Kajstura 等观察到单纯缺血可诱发大鼠心肌细胞凋亡,且有 Fas 和 Bcl-2 蛋白过量表达^[16]。据 Yue 等报道,IR 能使家兔心肌细胞发生凋亡,并有 Fas 蛋白表达显著升高^[19]。Fas 是一种跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子受体家族的成员,它通过在细胞膜上的表达致使细胞凋亡^[10,17,19]。Bcl-2 是细胞凋亡的抑制者,其过量表达可阻止细胞凋亡的发生。Bax 虽与 Bcl-2 有较高的同源性,但可促进细胞凋亡,而 Bcl-2/Bax 的比值将决定细胞是否发生凋亡^[11]。本实验的结果表明:IR 时心肌组织中 Fas 蛋白表达增多,Bcl-2/Bax 降低,心肌细胞出现凋亡;而在 IP 后,Fas 蛋白表达较单纯 IR 心肌显著减少,Bcl-2/Bax 与非缺血心肌组织相比无明显变化,且减少 IR 时的心肌细胞凋亡。至于这些激活的基因诱发细胞凋亡的具体机制,尚有待于进一步探讨。

综上所述,IR 可使家兔心肌细胞发生凋亡;IP 减少 IR 所致的心肌细胞凋亡,并可能通过减少心肌组织中 Fas 基因蛋白的表达而起作用。

参 考 文 献

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, **74**: 1124~1136.
- [2] Lawson CE, Downey JM. Preconditioning: state of the rat myocardial protection. *Cardiovasc Res*, 1993, **27**: 542~545.
- [3] Ding YH (丁延峰), Li YL (李玉龙), Ho SY (何瑞荣). Ischemic preconditioning and exogenous L-arginine reduce infarct size in rabbit heart. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 1996, **48** (6): 564~570 (in Chinese with English abstract).
- [4] Ding YF (丁延峰), He RR (何瑞荣). Role of K_{ATP} channels in the cardioprotection provided by ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 1997, **49** (1): 105~109 (in Chinese with English abstract).
- [5] Gottlieb RA, Bursleson KD, Kloner RA *et al.* Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 1621~1628.
- [6] Fliiss H, Gatliger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 1996, **79**: 949~956.
- [7] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K *et al.* Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*, 1998, **97**: 276~281.
- [8] Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY *et al.* Preconditioning in rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 2391~2398.
- [9] Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC *et al.* Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts *in vivo*. *Circulation*, 1997, **96**: 1598~1604.
- [10] Nagata S, Golistein P. The Fas death factor. *Science*, 1995, **267**: 1449~1456.
- [11] Oltvai ZN, Millimau CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993, **74**: 609~174.
- [12] Itoh G, Tamura J, Suzuki M *et al.* DNA fragmentation of human infarcted myocardial cell demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol*, 1995, **146**: 1325~1331.
- [13] 左连富. 流式细胞术与生物医学. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1996, 213~267.
- [14] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 1992, **13**: 795~808.
- [15] Aiello A, Delia D, Borrello MG *et al.* Flow cytometric detection of the mitochondrial BCL-2 protein in normal and neoplastic human lymphoid cells. *Cytometry*, 1992, **13**: 502~509.
- [16] Kajstura J, Cheng W, Reiss K *et al.* Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*, 1996, **74**: 86~107.
- [17] Tanak M, Ito H, Adachi S *et al.* Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*, 1994, **75**: 426~431.
- [18] Olivetti G, Quaini F, Sala R *et al.* Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, **28**: 2005~2016.
- [19] Yue TL, Ma XL, Wang XK *et al.* Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas receptor expression by carvediol. *Circ Res*, 1998, **82**: 166~174.