

细胞凋亡的线粒体信号通路在大鼠缺血延迟预适应抗心肌细胞凋亡机制中的作用*

刘颖¹ 陈晨² 吴伟康³ 陈伟强¹

摘要 目的:以细胞凋亡的线粒体途径为切入点,探讨心肌缺血延迟预适应抑制心肌缺血再灌注(MI/R)后细胞凋亡的可能机制。方法:SD大鼠分为正常对照组、假手术组、缺血再灌注组、延迟缺血预处理组。缺血再灌注组采用经典大鼠冠脉结扎,缺血1h,再灌1h。延迟缺血预处理组采用缺血5min,再灌5min,反复循环3次,24h后缺血1h,再灌1h。流式细胞仪测定心肌细胞凋亡率,进行细胞色素C(CytC)和凋亡诱导因子(AIF)的Western blotting分析及Caspase-3活性测定,并利用免疫组织化学染色法检测大鼠心肌HSP70的表达。结果:与缺血再灌注组相比较,心肌缺血预处理24h后可以减少MI/R后心肌细胞凋亡率,抑制CytC和AIF自线粒体向胞浆的释放及caspase-3的活化,上调HSP70蛋白表达。结论:心肌缺血延迟预适应可以减少MI/R造成的细胞凋亡,机制与其诱导HSP70的生成,抑制细胞凋亡的线粒体信号转导途径有关。

关键词 延迟预适应;细胞凋亡;细胞色素C;凋亡诱导因子;热休克蛋白70

中图分类号:R49,R542 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-05-0401-04

Mechanism of delayed preconditioning protects myocardial cell against apoptosis: investigating mitochondria signal pathway of apoptosis/LIU Ying, CHEN Chen, WU Weikang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(5): 401—404

Abstract Objective: To investigate the possible mechanism of delayed preconditioning protect of myocardial cell against apoptosis caused by MI/R through mitochondria signal pathway of apoptosis. **Method:** Sprague-Dawley rats were divided into four groups: control, sham, I/R and preconditioning. The rats in I/R group underwent ischemia for 1 hour by classic artery ligation and reperfusion for 1 hour. The rats in delayed preconditioning group underwent three cycles of 5-minute ischemia and 5-minute reperfusion 24 hours prior to the index occlusion. The cell apoptosis was measured by flow cytometry. The CytC and AIF were detected by Western blotting. The Caspase-3 activity was measured and HSP70 protein expression was detected by immunohistochemistry. **Result:** Myocardial delayed preconditioning decreased apoptosis rate of myocardial cell, inhibited the release of CytC and AIF from mitochondria into cytosol and caspase-3 activation, and up-regulated HSP70 protein level. **Conclusion:** Myocardial delayed preconditioning can suppress apoptosis caused by MI/R, the mechanism is related to HSP70 production and inhibition of mitochondria signal transduction of apoptosis.

Author's address Department of Pathophysiology of Guangdong Pharmacological College, Guangzhou, 510224

Key words delayed preconditioning; apoptosis; cytochrome C; apoptosis inducing factor; heat shock protein 70

在缺血性心脏病的治疗过程中,许多常用的治疗方法都不可避免的存在心肌缺血再灌注(myocardial ischemia-reperfusion, MI/R)损伤,如:急性心肌梗死溶栓术、冠状动脉搭桥术等。目前认为MI/R的发生与心肌细胞凋亡密切相关,但机制尚不十分清楚,众多证据表明线粒体在此过程中起着重要的调控作用;MI/R引起线粒体的损伤,导致线粒体功能障碍,使得线粒体膜化后的跨膜电位差剧烈下降,并影响线粒体通透性转换孔道(permeability transition, PT孔),使其开放异常,细胞色素C(cytochrome C, CytC)、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)等凋亡因子释入胞浆引起一系列级联反应,从而诱发心肌细胞凋亡^[1]。心肌缺血延迟预适应(de-

layed preconditioning, DPC)是保护MI/R后心肌损伤最有效的方式之一,目前,其对MI/R所造成细胞凋亡的保护作用引起了研究者的关注,但相关的研究较少。本实验旨在以细胞凋亡的线粒体途径为切入点,探讨心肌缺血延迟预适应对MI/R造成的细胞凋亡的影响及其可能存在的机制。

1 材料与方法

* 基金项目:广东药学院科研基金项目

1 广东药学院病理生理教研室,广州市海珠区宝岗,510224

2 解放军421医院检验科

3 中山大学中西医研究所

作者简介:刘颖,女,讲师,博士

收稿日期:2005-09-23

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 32 只, 体重 250—300g, 由中山大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂:10%水合氯醛(广州化学试剂公司), 细胞色素 C 一抗(New Marker), AIF 一抗(New Marker), GADPH (Cell Signal), Western 印迹二抗(博士德生物工程有限公司), Caspase-3 试剂盒(美国 Biovision 公司), 热休克蛋白(heat shock protein, HSP70) 免疫组化试剂盒(博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的复制:用 10%水合氯醛(3.5ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠。行气管插管连接小动物呼吸机, 频率 70—80 次/min, 潮气量 4—6ml, 呼、吸比为 2:1。在胸骨左缘 0.5cm 处剪断第 3 肋骨, 分离组织, 轻压暴露心脏, 用穿有 5-0 缝合线的 3/8 弯针从左心耳下缘 1mm 处进针, 钩绕左冠状动脉前降支主干, 于肺动脉圆锥旁出针。两线间放置一根聚乙烯小管, 拉紧丝线形成闭环并用止血钳固定即产生缺血, 放松丝线即发生再灌注。

1.2.2 实验分组:将 32 只大鼠随机分为 4 组, 正常对照组:不做任何处理;假手术组:只穿线, 不结扎;缺血再灌注组:缺血 1h, 再灌 1h;延迟缺血预处理组:缺血 5min 再灌注 5min, 重复 3 个缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC), 24h 后, 缺血 1h, 再灌 1h。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡:取新鲜心尖组织约 30mg, 将组织在 PBS 液中放在 100 目铜网上研磨。将 PBS 细胞混悬液用 300 目尼龙网过滤, 收集滤液。4℃ 1000r/min 离心 5min, 弃上清, 沉淀用 1ml 冷 75%乙醇固定, 4℃冰箱过夜。4℃ 1000r/min, 离心 5min, 弃上清, 重悬沉淀于冷 PBS, 400 目的筛网过滤 1 次, 用冷 PBS 调至细胞浓度为 5×10^6 , 加入 RNase 降解 RNA, 加入 500 μ l PI, 避光冰浴 10min, 流式细胞仪(Epics XL 美国 Beckman Coulter 公司)分析细胞凋亡率。

1.2.4 CytC 及 AIF 的 Western 印迹分析:实验结束时取心肌组织约 100mg, 放入预冷的 0.5ml 细胞溶解液中, 在冰浴中迅速将组织剪碎, 再用内切式匀浆仪冰上匀浆, 释放出蛋白。4℃ 10,000r/min 离心 1min, 转吸离心后上清液至离心管中, 用紫外分光光度计检测 260nm 和 280nm 吸光度值, 计算细胞浆中蛋白浓度。取离心后上清, 4℃ 10,000r/min 离心 10min, 收集上清分装(此部分蛋白不含线粒体), -20℃

冻存。SDS-PAGE 采用 12%的分离胶及 5%的浓缩胶, 蛋白经电转膜系统 (C.B.S USA) 转移至硝酸纤维膜, 5%脱脂奶粉封闭 2h。兔抗 CytC 抗体(稀释后终浓度为 0.75 μ g/ml), 小鼠抗 AIF 抗体(稀释后终浓度为 1 μ g/ml), 小鼠抗 GADPH 抗体(稀释后终浓度为 8.8 μ g/ml), 37℃振荡孵育 2h, 用 0.02M PBST 洗涤 PVDF 膜 5min $\times$ 2 次。羊抗兔或羊抗小鼠 IgG 抗体(1:400), 37℃振荡孵育 50min, 用 0.02M PBST 洗涤 PVDF 膜 5min $\times$ 5 次。加入 DAB 显色, 显色后蒸馏水洗涤终止反应。吹干后与蛋白质标准膜拼接, 扫描记录目的带灰度值, 与 GADPH 比较进行半定量统计学分析。

1.2.5 Caspase-3 活性检测:实验结束后, 取新鲜的心肌组织 100mg 放入预冷的 1ml 细胞裂解液中, 在冰上迅速将组织剪碎, 再用超声波破碎仪破解细胞, 制备细胞匀浆。细胞匀浆冰上孵育 10min, 4℃ 1000r/min 离心 1min, 转吸上清液至干净试管中, 放置冰上, 用紫外分光光度计测定各管吸光度, 并计算蛋白浓度。稀释 100 μ g 蛋白于 50 μ l 的细胞裂解液中, 加 50 μ l 的 2 $\times$ 反应缓冲液于每一样品管中并加 5 μ l 底物, 37℃水浴 1—2h。于 405nm 比色, 得出 caspase-3 的活力, 结果用 OD405 表示。

1.2.6 免疫组织化学染色方法检测 HSP70 蛋白的表达:于实验结束时, 在结扎线以下取 2cm 厚的全心组织, 放入 4%甲醛液中固定 24h, 石蜡包埋, 切片, 然后按 SABC 免疫组化试剂盒进行操作。观察方法及判断标准: 光镜下观察, 以胞浆出现黄染者为 HSP70 阳性细胞, 随机选取 5 个视野利用 BI-2000 医学图像分析系统进行灰度测定, 并计算 HSP70 蛋白表达阳性单位。

1.3 统计学分析

数据均以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用单因素 ANOVA 分析, 比较统计量 F 值, α 值界定为 0.05。结果应用 SPSS11.0 统计软件对资料进行统计分析。

2 结果

2.1 各组间心肌细胞凋亡率的比较

缺血再灌注后心肌细胞出现了明显的凋亡, 而延迟缺血预处理组心肌细胞凋亡率较缺血再灌注组显著降低($P < 0.01$)。见表 1, 图 1—4(见后置彩色插图 1)。

2.2 各组大鼠心肌细胞线粒体内细胞色素 C 的释放情况

正常心肌细胞 CytC 主要位于线粒体, 胞浆中含量极少。Western 印迹分析显示, 缺血再灌注后可见

胞浆中 CytC 显著增多 ($P<0.01$)。缺血预处理 24h 后, 可明显抑制 CytC 从线粒体的释放 ($P<0.01$)。见表 1, 图 5(见后置彩色插页 1)。

2.3 各组大鼠心肌细胞线粒体内凋亡诱导因子的释放情况

AIF 在正常心肌细胞中主要分布于线粒体, 胞浆中未检测到。Western 印迹检测发现, 缺血再灌注后即可见胞浆中 AIF 的含量明显增多 ($P<0.01$), 心肌缺血预处理 24h 后则可明显抑制 AIF 从线粒体向胞浆的移位 ($P<0.01$)。见表 1, 图 6(见后置彩色插页 1)。

2.4 各组间 Caspase-3 活性变化

Caspase-3 活性测定显示, 缺血再灌注后心肌 Caspase-3 的活性明显升高 ($P<0.01$), 而心肌缺血预处理 24h 后可明显抑制其活性的增高, 见表 1。

2.5 各组大鼠心肌 HSP70 蛋白表达

HSP70 阳性反应物质主要分布在心肌细胞浆, 显色为棕黄色。图像分析结果显示, 缺血再灌注组心肌组织内 HSP70 染色阳性指数高于正常对照组, 但两组之间无显著性差异。经缺血预处理 24h 后, 延迟缺血预处理组 HSP70 蛋白表达进一步升高, 明显高于正常对照组及缺血再灌注组 ($P<0.01$), 提示缺血预处理能在一定程度促进 HSP70 在心肌组织的表达。见表 1, 图 7—10(见后置彩色插页 1)。

表 1 各组间心肌细胞凋亡率、细胞色素 C 的释放、凋亡诱导因子的释放、Caspase-3 活性、HSP70 蛋白表达的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	凋亡率(%)	细胞色素 C	AIF/GADPH	caspase-3 活性(OD405)	HSP70(PU)
正常对照组	8	0.37±1.00	0.047±0.027	0.039±0.016	0.27±0.03	12.82±1.71
假手术组	8	0.39±1.10	0.061±0.021	0.053±0.015	0.34±0.09	14.11±2.23
缺血再灌注组	8	9.34±1.11 ^③	0.230±0.066 ^{②③}	0.190±0.058 ^{②③}	0.75±0.11 ^{②③}	15.17±2.48 ^③
延迟缺血预处理组	8	6.77±0.87 ^②	0.110±0.016 ^①	0.096±0.014 ^①	0.45±0.03 ^①	22.57±2.90 ^②

与正常对照组比较① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与延迟缺血预处理组比较③ $P<0.01$

3 讨论

体内外实验均证实 MI/R 所诱发的心肌细胞凋亡与线粒体的损伤有关, 表现为: Bcl-2 家族成员表达改变^[2]、线粒体膜电位下降、PT 孔开放、凋亡因子的释放、凋亡蛋白酶的活化等^[3]。心肌缺血预适应 (ischemic preconditioning, IPC) 是指短暂的心肌缺血对随后长时间的心肌缺血再灌注损伤有保护作用的现象^[4], IPC 存在早期预适应和延迟预适应, 延迟预适应又称“第二保护窗”(the second window of protection, SWOP), 在缺血刺激后 12—24h 出现, 持续 72h^[5]。DPC 的发生机制被认为是短暂的缺血促使心肌组织释放多种内源性生物活性物质, 通过与细胞膜上受体结合或直接激活细胞内信号传导通路, 产生多种细胞保护性物质发挥对心脏的保护作用。目前, IPC 对 MI/R 后心肌细胞凋亡的影响成为了研究新的着眼点, 但在 DPC 领域, 关于心肌细胞凋亡的报导还很少, 仅有的零星实验显示, DPC 可以抑制 MI/R 后细胞凋亡的发生, 但机制不清^[6]。DPC 是通过激活细胞内信号传导通路而产生心脏保护效应的, 我们推测信号转导也将作用于线粒体这一终效应器, 因此, 本研究着重于 DPC 抗 MI/R 后心肌细胞凋亡线粒体机制的探讨。实验结果显示: 延迟缺血预处理组心肌细胞凋亡数减少, CytC 及 AIF 的释放受阻, Caspase-3 活性下降。CytC 及 AIF 正常时分别位于线粒体内膜和线粒体膜间隙。MI/R 时, PT 孔受损而开放, CytC 及 AIF 被释放入胞浆。CytC 与胞浆中的凋亡激活因子-1 (apoptosis-activating factor-1,

Apaf-1) 结合, 依次激活半胱氨酸蛋白酶家族中的 Caspase-9、Caspase-3 而启动凋亡通路, 活化的 Caspase-3 可以作用于胞质中的细胞骨架蛋白, 或作用于细胞核中的 DNA, 引发细胞凋亡^[7]。而 AIF 经 PT 孔被释放入胞浆, 其将易位入核, 激活内源性核酸内切酶将染色体切割为 180—200bp 整数倍的 DNA 片段, 同时加速细胞色素 C 的释放, 进一步促进细胞凋亡^[8]。我们的实验结果表明, 心肌缺血延迟预适应抑制 MI/R 后心肌细胞凋亡的发生有可能是通过干扰细胞凋亡的线粒体途径来发挥作用的。那么, DPC 的这一效应是通过什么机制得以实现的呢? 我们在实验中观察到, 心肌缺血预处理 24h 后可促使 HSP70 蛋白的合成。Mosser 等^[9]发现, HSP70 可抑制细胞色素 C 从线粒体的释放, 并能与 Apaf-1 的 Caspase 募集结构域直接结合, 抑制 Apaf-1 的寡聚化及 Caspase 9 的活化。另有研究显示, HSP70 还可与线粒体释放的 AIF 直接结合, 抑制其介导的细胞凋亡的发生^[10]。

实验结果提示, 心肌缺血延迟预适应可能通过细胞内信号转导, 促使 HSP70 这一保护性蛋白的合成, 从而阻碍细胞凋亡的线粒体途径, 抑制 MI/R 后心肌细胞凋亡的发生。这将为临床上防治 MI/R, 促进缺血性心脏病患者康复提供新的治疗策略。

参考文献

- [1] Zhao ZhiQing, Jakob VJ. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(1): 438—455.
- [2] 朗海滨. Bcl-2 家族蛋白与线粒体凋亡路径研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 30(2): 88—92.
- [3] Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target

- for myocardial protection [J]. Pharmacol Ther, 2001, 89 (1): 29—46.
- [4] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. Circulation, 1986, 74(5): 1124—1136.
- [5] Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al. Delayed effects of sub-lethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia[J]. Circ Res, 1993, 72: 1293—1299.
- [6] Okubo S, Tanabe Y, Takeda K, et al. Pretreatment with tyrosine kinase inhibitor attenuates the reduction of apoptosis 24h after ischemic preconditioning[J]. Jpn J Physiol, 2004, 54(2): 143—151.
- [7] Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill [J]. J Mol Cell Cardio, 2003, 35 (6): 559—567.
- [8] Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, et al. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old Caspase-independent effector of cell death[J]. Cell Death Differ, 1999, 6: 516—524.
- [9] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, et al. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70 [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(8): 476—483.
- [10] Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat shock protein 70 antagonizes apoptosis inducing factor [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(9): 839—843.

·短篇论著·

运动再学习方案对脑卒中患者下肢运动功能的影响

邵天民¹ 马立军¹ 刘 畅¹ 马洪卓¹

1 资料与方法

1.1 对象

60例脑卒中患者均系我院2001年5月—2004年2月住院患者,全部病例均经CT或MRI检查,其诊断符合1995年我国第四届脑血管病学术会议标准^[1];病程均在3个月以内;除运动功能障碍外无明显认知功能障碍;按照患者就诊顺序随机分为两组,康复组30例,其中男25例,女5例;脑出血17例,脑梗死13例;年龄38—68岁,平均54.24±12.36岁;平均病程45.65±26.32d。对照组30例,其中男16例,女14例;脑出血15例,脑梗死15例;年龄40—70岁,平均56.35±10.52岁;平均病程43.46±27.73d。两组在年龄、性别、病变性质及病程方面差异均无显著性意义($P>0.05$)。

1.2 训练方法

康复组运动再学习方案(motor relearning programme, MRP)^[2]包括:①行走的分析:患腿站立期分析,患腿摆动期分析。②练习丧失的部分:站立期:站立期伸髋训练、站立期膝的控制训练、骨盆水平侧移训练。摆动期:摆动期开始时屈膝训练。③行走训练。④将训练转到日常生活中去。对照组采用常规Bobath提出的治疗技术,包括针对患侧下肢的运动治疗、外周感觉刺激、运动控制训练、转移、步态训练等。训练分别由接受两种治疗方法培训的治疗师执行,两组的康复治疗每日1次,每次45—60min,每周5d;康复疗程54d—71d,平均62.36d。评定方法采用Fugl-Meyer运动能量量表^[3]下肢部分进行评定。

1.3 统计学分析

两组疗效比较采用 t 检验。

2 结果与讨论

训练前两组患者的Fugl-Meyer评分分值经统计学分析无显著差异($P>0.05$)。经2个月(平均62.36d)的康复训练后,两组患者下肢运动功能均有改善,其Fugl-Meyer评分均有提高,经统计学分析具有显著差异($P<0.05$),但是训练后患者的下肢运动功能Fugl-Meyer评分两组组间比较有显著性差异($P<0.01$)(见表1)。

脑性偏瘫所致运动功能障碍的本质是由于上运动神经

表1 训练前后两组患者Fugl-Meyer评分比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	训练前	训练后
对照组	8.70±2.92	15.83±3.44 ^③
康复组	8.86±3.07 ^①	22.03±4.07 ^{②④}

与对照组比较① $P>0.05$,② $P<0.01$;与训练前比较③ $P<0.05$,④ $P<0.01$

元受损,使运动系统失去高位中枢的控制,从而使原始的、被抑制的、皮层以下中枢的运动反射释放,引起运动模式异常,表现为肢体肌张力增高,肌群间协调紊乱,出现肢体运动功能障碍^[4]。

MRP主要训练可控制的肌肉活动和控制训练中的各个运动成分,强调开始就把各种训练与作业练习相结合,只有在作业练习不能完成时才练习运动成分,通过多次反复的动作训练,使患者充分体验每一个简单动作到每一组复杂动作的正常运动感觉和所需力度,从而较好地掌握和提高运动控制能力,促进多肌群的协调运动。现代脑损伤恢复理论认为瘫痪肢体进行随意运动训练可以引起与这个动作有关的神经理回路的变化,接受训练的身体部位在皮层的支配区域也会扩大,传导兴奋的神经回路的传递效率明显提高^[5]。因此强化增加分离动作训练有利于新的神经回路和正常运动程序的建立,从而改善运动功能。通过研究,我们认为在脑卒中早期康复中采用MRP,有助于患者的功能恢复。

参考文献

- [1] 全国脑血管会议. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经学杂志, 1996, (6): 379.
- [2] Cars JH, Shepherd RB 著. 黄永禧, 徐本华, 译. 中风病人的运动再学习方案[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1999. 102—118.
- [3] Fugl-Meyer. The post-stroke hemiplegic patient. In: a method for evaluation of physical performance [J]. Scand J Rehabil Med, 1975, 7: 13—31.
- [4] 殷秀珍主编. 现代康复医学诊疗手册[M]. 第1版. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1995. 1.
- [5] Dickstein B, Hocherman S, Pillar T, et al. Stroke rehabilitation: three exercise therapy approaches [J]. Phys Therapy, 1986, 64: 1233—1238.

1 航天中心医院康复医学科, 海淀区玉泉路15号, 北京, 100049

作者简介: 邵天民, 男, 副主任医师

收稿日期: 2005-10-24