

实验性家兔缺血预适应减轻心肌细胞凋亡

姚 震 陈颜芳^① 冯建章^① 尹瑞兴^① 焦解歌 翁 阳

(海南医学院附属医院, 海口 570102)

主题词 心肌缺血; 再灌注损伤; 凋亡; 肌酸激酶; 超氧化物歧化酶; 模型, 心血管; 家兔

摘 要 为探讨缺血预适应在预防或减轻心肌损伤和心肌细胞凋亡中的作用, 制备了家兔缺血预适应、缺血一再灌注损伤和持续缺血模型, 并采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的生物素平移缺口末端标记技术检测心肌细胞凋亡情况; 同时观察外周血心肌酶、氧自由基等水平。结果发现, 再灌注损伤组和持续缺血组血清心肌酶含量明显高于正常组和缺血预适应组 ($P < 0.01$); 同时, 前两组的血浆超氧化物歧化酶活性明显降低 ($P < 0.01$), 而在正常组和缺血预适应组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 再灌注损伤组血清丙二醛含量明显高于其它各组 ($P < 0.01$ 或 0.05); 缺血预适应组虽然也有一定的心肌细胞凋亡率 ($24.44 \pm 2.96\%$), 但较再灌注损伤组 ($43.33 \pm 4.92\%$) 和持续缺血组 ($29.56 \pm 3.09\%$) 明显降低 ($P < 0.001$)。以上提示缺血预适应处理能减轻缺血一再灌注和持续缺血引起的心肌损伤, 同时能明显减少这二种情况所诱导的心肌细胞凋亡的发生率。

Effect of Experimental Ischemic Preconditioning on Reducing Myocyte Apoptosis in Rabbits

YAO Zhen, CHEN Yan-Fang^①, FENG Jian-Zhang^①, YIN Rui-Xing^①, JIAO Ji-Ge and WENG Yang

(Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102. ^①Guangdong Cardiovascular Research Institute, Guangzhou 510100, China)

MeSH Myocardial Ischemia; Reperfusion Injury; Apoptosis; Creatine Kinase; Superoxide Dismutase; Models Cardiovascular; Rabbits

ABSTRACT **Aim** To study the role of ischemic preconditioning in reducing myocardial injuries and reducing myocyte apoptosis. **Methods** The models of ischemic preconditioning (IP), ischemia reperfusion injury (RI) and continuous ischemia (CI) were made with rabbits. The presence of apoptotic myocytes was demonstrated by the method of terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). Also, the activities of plasma superoxide dismutase (SOD) were determined by the method of xanthine oxidase and the contents of serum malonic aldehyde (MDA) were checked by colorimetry. Their serum cardiac enzymes including aspartate transaminase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and hydroxybutyrate dehydrogenase (HBD) were checked at same time. **Results** The serum contents of AST, LDH, CK and HBD in RI and CI groups were higher than those in IP and control groups ($P < 0.01$), which meant that there was severe damage in myocytes of RI and CI groups. Plasma activities of SOD in RI and CI groups decreased ($P < 0.01$, compared with IP and control groups), but there was no statistic significance between IP and control groups. The contents of serum MDA in RI group was also higher than other groups ($P < 0.01$ or 0.05). The rate of apoptotic myocytes in IP group ($24.44 \pm 2.96\%$) was higher than that in control ($0.71 \pm 0.51\%$), but was lower than that in CI ($29.56 \pm 3.08\%$) and RI groups ($43.33 \pm 4.92\%$) significantly ($P < 0.001$). **Conclusion** This study suggested that IP could prevent myocardial injury induced by ischemia-reperfusion and continuous ischemia, and also reduce the rates of myocyte apoptosis in those situations.

缺血预适应 (ischemic preconditioning, IP) 可提高心肌对缺血的耐受性, 预防致死性心肌细胞损伤, 被认为是一种心肌保护措施^[1]。已有研究表明, 细胞凋亡是心肌缺血一再灌注损伤的一个重要特征, 可致不可逆性心肌细胞死亡^[2,3]。因此我们设想, 缺血预适应减少不可逆缺血性心肌损伤的部分机制可能是通过减少细胞凋亡而起作用的, 于是对比观

察了实验性家兔缺血预适应模型中的心肌细胞凋亡情况, 并观察和分析心肌酶、氧自由基等反映心肌细胞损害程度的指标, 以证实我们的假想。

1 材料与方法

1.1 材料

实验新西兰兔共40只, 由中山医科大学实验动物中心提供, 雌雄不分, 月龄6~12月, 体重2.0~2.5 kg; 心电监护采用日本光电7100型心电记录仪。超氧

^①广东省心血管病研究所, 广州 510100

化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂由南京建成生物工程研究所提供;丙二醛(malonic-aldehyde, MDA)试剂由解放军总医院生物化学室提供;TUNEL 试剂盒采用 Oncor 公司提供的产品。

1.2 动物模型和标本制备

用氯胺酮 80 mg/kg 静脉注射麻醉下,沿着胸骨左缘切断第三、四肋骨逐层开胸,在不损伤胸膜的前提下剪开心包,暴露心脏。随机分成四组,每组各 10 只:①持续缺血(continuous ischemia, CI)组:在结扎左前降支后,心电监护出现 ST 段抬高,确定结扎成功,持续 4 h 以上不松结;②再灌注损伤(reperfusion injury, RI)组:结扎左前降支 30 min 后松开结扎线,抬高的 ST 段下降在 1/2 以上为缺血再灌注成功,再复流 3 h;③缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)组:结扎左前降支 5 min 松开结扎线,再复流 5 min,然后再扎紧 5 min,又松结 5 min,反复共造成四次 5 min 缺血、5 min 灌流,最后再扎紧 30 min、松结灌注 120 min。④对照(control)组:做开胸术,但未结扎冠状动脉。

采集右心房血,并将兔处死,迅速取心脏病变部位心肌标本置于 10%福尔马林液体中固定。常规石蜡包埋病理切片,以备组织学和免疫组织化学检查。

1.3 血清心肌酶测定

抽取各组兔右心房血,分离血清,按速率法测定磷酸肌酸激酶(creatine kinase, CK)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和羟丁酸脱氢酶(hydroxybutyrate dehydrogenase, HBD)。

1.4 血浆超氧化物歧化酶活性测定

取血浆样品量 10 μ L,采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$),后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂作用下呈紫红色,用可见分光光度计测定其 550 nm 波长处的吸光度。根据所测得的测定管吸光度和对照管吸光度,按试剂盒公式计算总 SOD 活力。

1.5 外周血清丙二醛测定

用血清 0.15 mL,根据脂过氧化物降解产物丙二醛在酸性条件下加热与硫代巴比妥酸形成粉红色化合物,该化合物在 532 nm 处有较强的吸收峰,用可见分光光度计测定该处测定管吸光度和标准管吸光度,代入公式可计算得丙二醛含量。

1.6 原位末端标记凋亡细胞测定

采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)介导的 dUTP-生

物素平移末端标记技术-TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling),标记凋亡细胞。具体步骤是采用二甲苯将组织切片脱蜡,然后在 100%、95%、80%和 70%酒精中浸泡再水化组织;用 PBS 洗片 3 次,每次 5 min;在 37℃ 恒温下用 20 mg/L 的蛋白酶 K 浸泡 30 min,再以 PBS 冲洗,然后在 3% H_2O_2 中室温下浸泡 5 min;接着 PBS 冲洗后,加入起渗透作用的 Equilibration buffer 停流 30 min,随之在 37℃ 湿盒加入 TdT 酶浸泡孵育 1 h,另外各组选择一张组织切片加等量蒸馏水(未加 TdT 酶)作为空白对照;充分反应后给予反应终止液,停留 10 min;再经反复 PBS 冲洗,在湿盒环境下,加入 Anti-Digoxigenin-Peroxidase 30 min;然后 PBS 冲洗,给予 DAB 显色,再经蒸馏水冲洗,甲基绿复染 10 min;最后蒸馏水冲洗,逐次给予 70%、80%、90%、95%和 100%酒精浸泡脱水,二甲苯净片,中性树胶封片后即可观察结果。染成棕色的细胞核即为凋亡阳性细胞。

计数方法:在 $\times 400$ 物镜下计算阳性细胞数和细胞总数,选择细胞总数 200 以上的视野,从中计算出阳性细胞率。

1.7 统计学方法

实验结果以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间显著性分析用 t 检验,两组以上用方差分析组间 q 检验; $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 血清心肌酶测定结果

从表 1 (Table 1)可见,再灌注损伤组(RI)组和持续缺血组(CI)组各项心肌酶指标均明显增高,说明其心肌损害严重;而缺血预适应组则变化不显著,支持了缺血预适应是心肌的一种保护性措施。

表 1. 各组血清心肌酶水平

Table 1. The contents of serum cardiac enzymes in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$, u/L)

Groups	AST	LDH	CK	HBD
Control	16.6 \pm 2	98.3 \pm 34	206.4 \pm 8	158.1 \pm 55
RI	60.7 \pm 44 ^a	320.7 \pm 202 ^b	308.2 \pm 166	462.4 \pm 209 ^b
CI	64.4 \pm 30 ^b	277.8 \pm 123 ^a	600.4 \pm 322 ^b	381.4 \pm 127 ^a
IP	33.6 \pm 24	151.3 \pm 86	150.8 \pm 84	249.3 \pm 147

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.001$, compared with control group

2.2 超氧化物歧化酶和丙二醛测定结果

如表 2 (Table 2)所示, RI、CI 和 IP 各组血浆 SOD 活性均明显降低,但以 RI 组最显著;与各组比

较,均有统计学差异($P < 0.001$)。脂过氧化物(LPO)的产物丙二醛的增高也以RI组最明显,与IP组比较,差异显著($P < 0.01$)。

表2. 各组血浆超氧化物歧化酶活性和血清丙二醛水平

Table 2. Changes of plasma SOD activity and serum MDA ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Groups	SOD($\mu\text{U/L}$)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
Control	200.2 \pm 18.94	1.08 \pm 0.23
RI	119.2 \pm 17.66 ^a	2.86 \pm 1.23 ^a
CI	159.3 \pm 22.24 ^a	2.41 \pm 0.73 ^a
IP	158.6 \pm 22.29 ^{ab}	1.96 \pm 0.42 ^{ac}

a: $P < 0.001$, compared with control group; b: $P < 0.001$, c: $P < 0.05$, compared with RI group

2.3 凋亡细胞计数

从图1 (Figure 1)和图2 (Figure 2)可见正常组、RI组、CI组和IP组心肌细胞凋亡率(%)分别为0.71 \pm 0.51、43.33 \pm 4.92、29.56 \pm 3.09和24.44 \pm 2.96;缺血预适应、持续缺血和再灌注损伤状态下均有一定的心肌细胞凋亡率,较正常心肌明显增高($P < 0.001$),但缺血预适应中的细胞凋亡率比缺血一再灌注损伤和持续缺血状态均明显减少($P < 0.001$)。

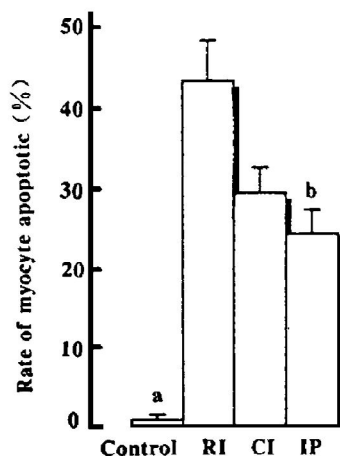


图1. 各组心肌细胞的凋亡率

Figure 1. The myocyte apoptotic rate in each group ($\%$, $\bar{x} \pm s$). a: $P < 0.001$, compared with control group respectively; b: $P < 0.001$, compared with RI group

3 讨论

近年来在心肌缺血一再灌注损伤的实验中,发现有心肌细胞凋亡现象存在。Gottlieb^[2]在家兔离体心脏灌注模型上发现,缺血30分钟后再灌注4h,心肌细胞呈现出DNA梯形格局和细胞核染色

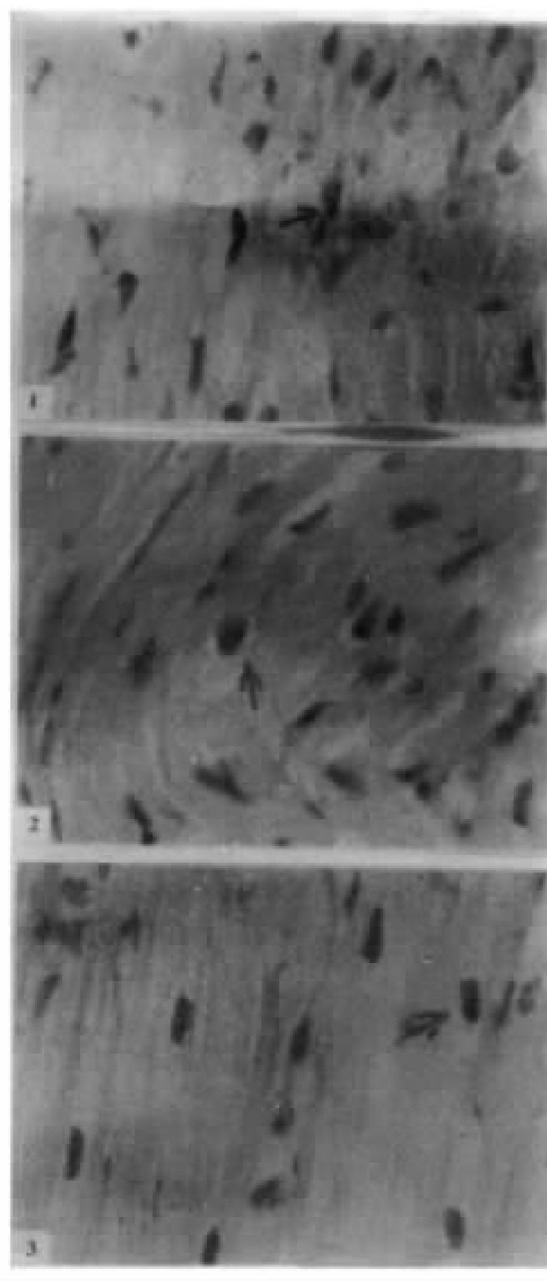


图2. 原位末端标记法检测实验兔心肌凋亡细胞

Figure 2. Detection of apoptotic myocytes by TUNEL analysis in the rabbit myocardial tissue ($\times 400$). 1: RI model; 2: CI model; 3: IP model (the position arrows point mean apoptotic bodies)

质浓缩,认为细胞凋亡是心肌再灌注损伤的特征之一。Fliss^[3]采用原位末端标记(ISEL)和琼脂糖凝胶电泳技术也肯定了缺血和缺血再灌注大鼠心肌细胞中有典型的凋亡改变,认为缺血和缺血再灌注均可诱导心肌细胞凋亡发生;并发现细胞凋亡的出现与缺血和缺血再灌注持续时间长短有关;再灌注损伤可加速不可逆转的细胞凋亡。在人体上,Saraste等^[4]研究了8例死于AMI的尸解心脏标本,其中2例有明显的心内膜下再灌注损伤病理改变,通过末端标记方法方法,也检测出典型的细胞凋亡的生化特

征;认为除了坏死,在心肌缺血一再灌注损伤中,细胞凋亡也参与了病变形成。我们的研究也显示出持续心肌缺血和缺血再灌注状态下,心肌细胞损伤严重,同时心肌细胞凋亡数目也明显增加;缺血再灌注后心肌细胞凋亡数比单纯持续缺血的明显增多($P < 0.001$)。但从反映心肌损伤程度的指标来看,如心肌各项酶却以持续缺血状态增高为明显,支持了再灌注损伤是心肌细胞凋亡的重要诱发因素。

心肌细胞内氧自由基大量产生是再灌注心肌损伤发病的重要机制之一。丙二醛是自由基链锁反应的一种最终产物,其含量增高,说明了体内脂质过氧化反应比较强烈,细胞膜、线粒体膜和磷脂膜等受到严重损伤,器官损害程度较重。本文中再灌注心肌损伤兔外周血丙二醛显著增高,也证实了这一点。自由基浓度增高可造成 SOD 活性降低,而 SOD 是机体内清除超氧化物阴离子自由基专一性的酶。已有研究显示出 SOD 水平的升高可延缓细胞凋亡的发生, SOD 水平的下降则增加了凋亡的易感性^[5]。我们的结果也反映了在 SOD 活性下降最多的兔心肌中,细胞凋亡现象也越明显,但两者之间的因果关系仍有待于进一步研究。

本文研究还显示出 IP 组尽管也有一定的心肌损伤,但程度较轻,表现在心肌细胞凋亡率较低,而且各项心肌损害的指标无显著增高,说明了缺血预适应确实为一项心肌保护措施;其心肌保护作用在一定程度上是通过减少细胞凋亡而起作用的。Yamashita 等^[6]发现,IP 24 h 后心肌细胞内 SOD 活性升高,使得细胞抗氧化能力提高,在 IP 延迟保护中有重要作用。Shirakawa 等^[7]在大鼠实验性心肌缺血预适应模型中,发现 IP 降低了 TNF- α 在缺血边缘区的表达,有可能阻止缺血细胞发生凋亡。Piot 等^[8]在活体大鼠心肌缺血预适应模型,也证实了细胞凋亡和坏死这两种死亡同时存在于心肌缺血一再灌注损伤中;并认为其心肌梗塞面积的大小与缺血一再灌注损伤后的心肌细胞凋亡的程度有关,而且缺血

预适应可以减轻这种现象。我们的结果也支持了这一观点。

因此,我们认为,心肌缺血一再灌注损伤可诱发或加重心肌细胞凋亡,细胞凋亡是构成心肌损伤病灶的重要因素;缺血预适应可减轻心肌细胞损伤,很大程度上是通过减轻心肌细胞凋亡而起作用的。有关缺血一再灌注损伤引起心肌细胞凋亡和预适应减轻这一过程的机制仍有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Barbosa A, Sievers RE, Zaugg CE, et al. Preconditioning ischemia time determines The degree of glycogen depletion and infarct size reduction in the hearts. *Am Heart J*, 1996, **131**: 224—230
- 2 Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 1 621—628
- 3 Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 1996, **79**: 949—956
- 4 Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, et al. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*, 1997, **95**: 320—323
- 5 Greenlund LJS, Deckwerth TL, Johnson EM. Superoxide dismutase delay neuronal apoptosis: A role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*, 1995, **14**: 303—315
- 6 Yamashita N, Nishida M, Hosida S, et al. Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocyte increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 2 193—199
- 7 Shirakawa K, Miura T, Yamakawa K, et al. Effect of ischemic preconditioning on the expression of TNF- α and the induction of apoptosis in the ischemia-reperfused rat heart. *Circulation*, 1995, **92**(Suppl D):I—773
- 8 Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, et al. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo *Circulation*, 1997, **96**: 1 598—604

(此文1998—10—14收到,1999—01—25修回)

(此文编辑 朱雯霞)