

## MG-132 抑制大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡

戴翠莲<sup>1</sup>, 罗开良<sup>2</sup>, 陈章荣<sup>2</sup>, 肖 骏<sup>2</sup>, 陈剑玲<sup>1</sup>

(1. 遵义医学院附属医院心内科, 贵州省遵义市 563003; 2. 重庆医科大学附属第二医院心内科, 重庆市 400010)

[关键词] 内科学; 蛋白酶体抑制剂; Bcl-2; Bax; 细胞凋亡; 核因子 KB

[摘要] 目的 观察蛋白酶体抑制剂 MG-132 对急性缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法 建立大鼠心肌缺血再灌注模型, 治疗组及治疗对照组于再灌注前 5 min 静脉注射 MG-132 (0.75 mg/kg), 缺血再灌注组及假手术组注射生理盐水, 观察各组心肌组织炎症细胞浸润及心肌细胞凋亡情况。结果 MG-132 能显著抑制心肌梗死周围组织嗜中性粒细胞的浸润; 与缺血再灌注组相比, 治疗组核因子 KB mRNA 水平和蛋白水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 治疗组再灌注 2 h、6 h 及 24 h 亚组凋亡指数较缺血再灌注组同时时间点显著下降; 与缺血再灌注组相比, Bax 的积分光密度值降低 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2 蛋白水平明显上调, Bcl-2/Bax 比值显著增加。结论 蛋白酶体抑制剂能够抑制急性缺血再灌注心肌的凋亡, 具有心肌保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### MG-132 Inhibited Cardiomyocyte Apoptosis of Acute Ischemia-Reperfusion Injury of Rats

DAI Cu-Lian<sup>1</sup>, LUO Kai-Liang<sup>2</sup>, CHEN Zhang-Rong<sup>2</sup>, XIAO Jun<sup>2</sup>, and CHEN Jian-Ling<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003; 2. The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[KEY WORDS] Proteasome Inhibitor; Bcl-2; Bax; Cardiomyocyte Apoptosis; Nuclear Factor Kappa B

[ABSTRACT] **Aim** To probe into the effect of proteasome inhibitor MG-132 on myocytic apoptosis in rat with myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** The ischemia-reperfusion model was established after 30 min ligation of left anterior descending (LAD) coronary artery. MG-132 (0.75 mg/kg in 2 mL DMSO) was injected 5 min prior to reperfusion. Electron microscopy, histology, immunohistochemistry, the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) method, and reverse transcription-polymerase chain reaction was applied to observe myocardial cell apoptosis. **Results** Functional effects of MG-132 on polymorphonuclear neutrophilic leukocytes (PMN) accumulation, activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) p65 mRNA and protein levels, and apoptosis were characterized in rat myocardial tissue. MG-132 time-dependently inhibited myocardial p65 mRNA expression and reduced myocardial apoptotic index (AI) after reperfusion for 2 h, 6 h and 24 h ( $P < 0.01$ , respectively). Moreover, MG-132 time-dependently decreased Bax protein levels, while increased Bcl-2 protein levels in ischemic and reperfused myocardium ( $P < 0.05$ ), these effects peaked 24 h after reperfusion. **Conclusion** MG-132 reduced myocardial reperfusion injury by inhibiting myocytic apoptotic cell death and blocking the activation of NF- $\kappa$ B, down regulating Bax expression and up regulating Bcl-2 expression as well as elevating Bcl-2/Bax ratio.

炎症和细胞凋亡可能是发生心肌缺血再灌注损伤的重要环节。研究发现, 用蛋白酶体抑制剂抑制核因子 KB (nuclear factor kappaB, NF- $\kappa$ B) 激活<sup>[1]</sup> 及用 caspase 抑制剂减少心肌细胞凋亡均能够显著降低缺血再灌注后的心肌梗死范围, 但抑制蛋白酶体活性对凋亡相关基因有何影响目前还不清楚。本研究旨在将蛋白酶体抑制剂 MG-132 用于大鼠心肌缺血再灌注模型, 观察其能否抑制心肌的炎症性损伤及

细胞凋亡而具有心肌保护作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 心肌缺血再灌注损伤模型的建立和实验分组

成熟 SD 大鼠 92 只, 体重  $220 \pm 50$  g, 雌雄各半 (重庆医科大学动物中心提供)。以 3.5% 水合氯醛 (10 mL/kg) 腹腔注射麻醉后气管插管并接小动物呼吸机 (浙江医科大学生产)。参照王淑霞等<sup>[2]</sup> 的方法建立大鼠心肌缺血再灌注模型。以心电图改变及心肌颜色变化作为心肌缺血再灌注模型成功的标志。用随机数字表法将 92 只大鼠随机分组。缺血再灌注组 (40 只): 阻断冠状动脉左前降支 30 min 后再灌注; ④治疗组 (40 只): 手术过程同缺血再灌注组, 于再灌注 5 min 前股静脉注入 MG-132 (Calbiochem 公

[收稿日期] 2006-12-29 [修回日期] 2007-03-26

[作者简介] 戴翠莲, 博士, 副主任医师, 主要研究方向为蛋白酶体抑制剂对急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用, E-mail 为 daicuilian@yahoo.com.cn。罗开良, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 从事高血压、冠心病、心力衰竭和 UPS 与心肌缺血再灌注损伤的研究, E-mail 为 luoklq@yahoo.com.cn。陈章荣, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为心脏中的泛素-蛋白酶体系统。

司, 0.75 mg/kg 溶于 2 mL 二甲基亚砷中), 5 min 推完; (四)假手术组(6只): 手术过程同缺血再灌注组, 但只穿线不打结, 再观察 2 min; 治疗对照组(6只): 手术过程及时间计算同假手术组, 于再灌注前 5 min 股静脉注入 MG-132, 剂量和方法同治疗组。相同的随机分组方法再将缺血再灌注组和治疗组分为再灌注 0、1、2、6 和 24 h 五个亚组(每个亚组 8 只)。缺血再灌注组和假手术组均于前述注射 MG-132 相同时间点于股静脉注入 2 mL 生理盐水, 5 min 推完作为对照。

## 1.2 采集标本

完成前述实验步骤后立即于腹腔内注入致死量水合氯醛, 心脏停跳前摘取心脏, 假手术组和治疗对照组于再灌注后 2 min 处死动物并摘取心脏。迅速分离出左心室, 并沿其长轴横切成 2 mm 的薄片。各组取一片心肌组织制作石蜡包埋切片, 用于免疫组织化学、TUNEL 检测, 其余组织于  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

## 1.3 嗜中性粒细胞计数

各组取一片心肌组织用 10% 福尔马林浸泡过夜, 石蜡包埋后切成 5  $\mu\text{m}$  薄片, 用 HE 染色。光学显微镜下, 每一张切片在缺血区随机选择 20 个视野( $400\times$ ), 计数嗜中性粒细胞, 取其平均值。

## 1.4 逆转录聚合酶链反应检测核因子 $\kappa\text{B}$ p65 的 mRNA 表达

用两步法进行逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) (TaKaRa RNA PCR Kit Ver. 3.0 购于大连宝生物工程有限公司)。提取心肌总 RNA(按说明书进行), 测定 OD 值计算 RNA 纯度。制备 cDNA, 逆转录体系为  $\text{MgCl}_2$  (25 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ ,  $10\times$  RT Buffer 1  $\mu\text{L}$ , DEPC 水 3.75  $\mu\text{L}$ , 4  $\times$  dNTP(各 10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , RNA 酶抑制剂( $4\times 10^7$  u/L) 0.25  $\mu\text{L}$ , OligodT (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , MML-V( $2\times 10^8$  u/L) 0.5  $\mu\text{L}$ , RNA (2  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 。反应参数为  $30^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min,  $50^{\circ}\text{C}$  变性 30 min  $\rightarrow$   $99^{\circ}\text{C}$  退火 5 min  $\rightarrow$   $5^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 反应体系为 cDNA 10  $\mu\text{L}$ , 灭菌蒸馏水 28.75  $\mu\text{L}$ ,  $5\times$  Buffer 10  $\mu\text{L}$ , 上游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq 酶( $5\times 10^6$  u/L) 0.25  $\mu\text{L}$ 。反应参数为  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min 后,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s  $\rightarrow$   $52^{\circ}\text{C}$  退火 30 s  $\rightarrow$   $72^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 31 个循环后,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。以 GAPDH 为内对照。引物序列分别为: 核因子  $\kappa\text{B}$  p65 正义链为 5'-ATG GAC GAT CTG TTT CCC CT-3', 反以链为 5'-GGT GCG TCT AGT GGT ATC T-3'; GAPDH 正义链为 5'-CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA TG-3', 反以链为 5'-CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-

3'。以 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶图像分析系统扫描扩增产物电泳条带密度, 将 GAPDH 产物设为 100, 计算核因子  $\kappa\text{B}$  p65 电泳条带密度。

## 1.5 心肌凋亡细胞原位检测及分析

原位末端标记凋亡心肌细胞测定采用 TUNEL 法, 严格按照试剂盒操作步骤进行(试剂盒购于上海罗氏公司), 光镜下细胞核染成棕色者为凋亡细胞。每张切片于 400 倍光镜下, 随机选择 20 个视野, 计数每视野的凋亡细胞数和总细胞数, 并计算细胞凋亡指数(apoptosis index, AI),  $\text{AI} = \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$ , 取其平均值。

## 1.6 核因子 $\kappa\text{B}$ p65、Bax 和 Bcl-2 蛋白检测

用免疫组织化学 SP 法(SP 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗大鼠核因子  $\kappa\text{B}$  p65 IgG、Bax IgG 和 Bcl-2 IgG 为 Santa Cruz 公司产品) 观察心肌细胞核因子  $\kappa\text{B}$  p65、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达情况。石蜡包埋切片脱蜡, 梯度酒精浸泡, PBS 冲洗, 5% 山羊血清封闭后, 分别加兔抗大鼠核因子  $\kappa\text{B}$  p65 IgG(1:100 稀释)、兔抗大鼠 Bax IgG(1:100 稀释) 及兔抗大鼠 Bcl-2 IgG(1:100 稀释) 孵育  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。次日分别滴加生物素标记山羊抗兔 IgG(二抗) 和辣根酶标记链霉卵白素, DAB 显色, 苏木素复染, 封片, 拍照。高倍镜下( $\times 400$ ) 观察核因子  $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达情况, 半定量分析方法参照 Wang 等<sup>[3]</sup> 人所述, 以心肌细胞核中出现棕色颗粒为阳性细胞, 计算阳性指数(PI),  $\text{PI} = \text{阳性细胞数} / \text{视野内总细胞数} \times 100\%$ 。每片观察 20 个高倍视野, 取平均值。心肌细胞质呈棕黄色染色为 Bax 及 Bcl-2 蛋白质阳性表达。用计算机图像分析系统(Image pro plus 5.1, Media Cybernetics, USA) 计算积分光密度值作为半定量参数, 测量 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达, 每片观察 20 个高倍视野, 取其平均值。

## 1.7 统计学分析

用 SAS 6.12 软件进行统计学分析, 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验。

# 2 结果

## 2.1 心肌细胞中嗜中性粒细胞的聚集

假手术组和治疗对照组心肌组织中嗜中性粒细胞数(分别为  $0.86 \pm 0.32$ 、 $1.00 \pm 0.05$  个/HP) 无明显差异。缺血 30 min 嗜中性粒细胞即开始升高( $5.60 \pm 0.81$  个/HP), 与其相比, 缺血再灌注 1 h、2 h、6 h、24 h 亚组嗜中性粒细胞(分别为  $10.12 \pm 1.$

28.33.70 ± 3.31、29.12 ± 2.38 和 28.78 ± 4.39 个/HP) 显著增加,并于再灌注 2 h 时达最大。治疗组各亚组嗜中性粒细胞(1 h、2 h、6 h 和 24 h 亚组分别为 8.43 ± 1.29、6.43 ± 0.52、6.38 ± 1.00 和 7.59 ± 1.29 个/HP) 较缺血再灌注各亚组均显著降低( $P < 0.05$  或 0.01)。

## 2.2 核因子 $\kappa$ B p65 的 mRNA 及蛋白表达情况

假手术组和治疗对照组核因子  $\kappa$ B p65 的 mRNA 差异无显著性。与 0 h 亚组相比,缺血再灌注其余各亚组核因子  $\kappa$ B p65 的 mRNA 水平均明显增加( $P < 0.05$ ),并于再灌注后 2 h 达高峰。与缺血再灌注组相比,治疗组相应各亚组核因子  $\kappa$ B p65 mRNA 水平显著下降( $P < 0.05$  或 0.01,表 1 和图 1)。

免疫组织化学法检测核因子  $\kappa$ B p65 蛋白结果表明,假手术组和治疗对照组的核因子  $\kappa$ B p65 的 PI 差异无显著性( $P > 0.05$ )。缺血再灌注组各亚组的 PI 较假手术组和治疗对照组显著升高( $P < 0.05$ ),并于再灌注 2 h 达最高;与缺血再灌注组各亚组相比,治疗组的 PI 显著降低( $P < 0.05$ ,表 1 和图 2)。

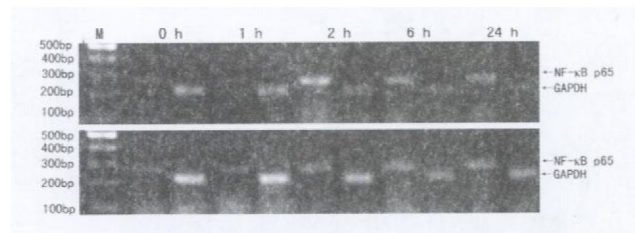


图 1. 逆转录聚合酶链反应检测核因子  $\kappa$ B p65 mRNA 表达  
上图缺血再灌注组,下图治疗组。

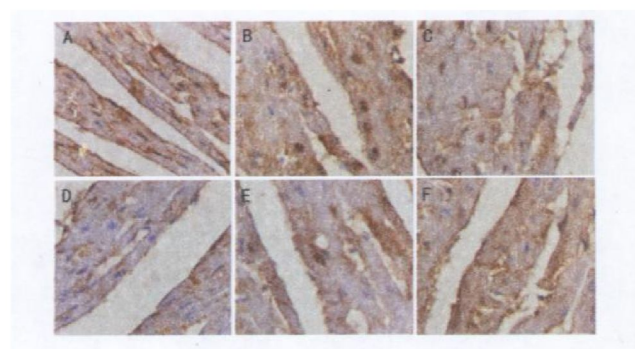


图 2. 免疫组织化学法检测核因子  $\kappa$ B p65 蛋白表达 ( $\times 400$ )

A 为假手术组, B、C 分别为缺血再灌注 2 h、24 h 亚组, D 为治疗对照组, E、F 分别为治疗组 2 h、24 h 亚组。

## 2.3 缺血再灌注后心肌细胞凋亡及 Bcl-2 家族蛋白表达

### 2.3.1 凋亡指数

与假手术组和治疗对照组相比,缺血再灌注组及治疗组 0 h 和 1 h 亚组凋亡指数差异无显著性。缺血再灌注组从再灌注 2 h 开始升高,24 h 达最高( $P < 0.05$ )。治疗组 2 h、6 h 及 24 h

亚组凋亡指数比缺血再灌注组相应各亚组均显著降低( $P < 0.05$ ,表 2 和图 3)。

表 1. 核因子  $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达结果

分 组	时间	mRNA	蛋白
假手术组	2 h	7.36 ± 2.78	1.2% ± 0.5%
治疗对照组	2 h	8.25 ± 1.39	1.4% ± 0.4%
缺血再灌注组	0 h	48.61 ± 6.24	5.6% ± 1.4%
	1 h	39.68 ± 7.14	10.0% ± 2.0%
	2 h	150.35 ± 4.92	21.0% ± 2.6%
	6 h	132.49 ± 10.52	17.0% ± 3.2%
	24 h	109.83 ± 8.05	15.4% ± 13.4%
治疗组	0 h	36.89 ± 5.68 <sup>a</sup>	4.1% ± 2.0%
	1 h	27.92 ± 5.18 <sup>a</sup>	5.0% ± 1.8% <sup>a</sup>
	2 h	35.96 ± 6.13 <sup>b</sup>	7.0% ± 3.2% <sup>b</sup>
	6 h	67.69 ± 8.24 <sup>b</sup>	8.4% ± 5.7% <sup>a</sup>
	24 h	62.15 ± 8.34 <sup>a</sup>	10.0% ± 2.0% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与缺血再灌注组相比。

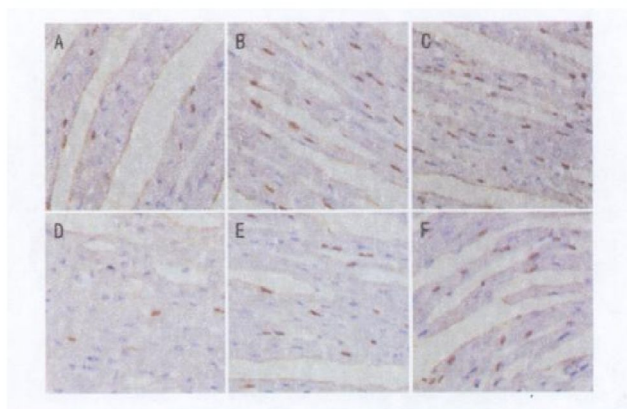


图 3. TUNEL 染色法检测心肌细胞凋亡 ( $\times 400$ ) A、B、C 分别为缺血再灌注 2 h、6 h、24 h 亚组; D、E、F 分别为治疗组 2 h、6 h、24 h 亚组。

### 2.3.2 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

假手术组、治疗对照组和缺血再灌注组及治疗组 0 h 和 1 h 亚组间 Bax 蛋白水平差异无显著性;缺血再灌注组从再灌注 2 h 开始 Bax 依次显著升高,并于 24 h 达最大( $P < 0.05$ );治疗组各亚组与缺血再灌注组各亚组相比则显著降低( $P < 0.05$ )。与假手术组和治疗对照组相比,缺血再灌注组和治疗组 0 h、1 h 亚组的 Bcl-2 蛋白无明显变化;缺血再灌注组 2 h、6 h、24 h 亚组 Bcl-2 蛋白水平有轻度增高,但显著低于治疗组相应各亚组( $P < 0.05$ ,表 2 和图 4)。

### 2.3.3 Bcl-2/Bax 水平

缺血再灌注组和治疗组



的 0 h、1 h 亚组 Bcl-2/Bax 比值均较假手术组和治疗对照组低。随着再灌注时间延长, 缺血再灌注组该比值进一步降低, 并于再灌注 24 h 达最低。治疗组

的 Bcl-2/Bax 比值则逐渐增加, 治疗组 24 h 亚组 Bcl-2/Bax 是缺血再灌注组 24 h 亚组的 12 倍(表 2)。

表 2. 细胞凋亡指数及 Bax 和 Bcl-2 蛋白水平

分 组	时间	凋亡指数	Bax(光密度值)	Bcl-2(光密度值)	Bcl-2/Bax
假手术组	2 h	0.94% ±0.33%	3.24 ±1.52	3.06 ±0.51	0.94 ±0.11
治疗对照组	2 h	0.82% ±0.28%	2.81 ±0.71	3.51 ±0.34	1.25 ±0.10
缺血再灌注组	0 h	0.87% ±0.37%	3.64 ±1.21	2.71 ±0.29	0.74 ±0.2
	1 h	2.69% ±0.89%	3.58 ±0.36	2.67 ±0.31	0.75 ±0.14
	2 h	8.78% ±1.58%	5.45 ±1.25	3.43 ±0.22	0.63 ±0.12
	6 h	29.47% ±2.36%	16.06 ±2.16	4.20 ±0.63	0.26 ±0.02
	24 h	44.39% ±4.02%	31.33 ±1.92	6.09 ±0.56	0.19 ±0.05
治疗组	0 h	1.24% ±0.53%	3.59 ±0.52	2.75 ±0.34	0.77 ±0.17
	1 h	1.80% ±0.32%	3.47 ±1.08	2.57 ±0.36	0.74 ±0.18
	2 h	4.58% ±2.68% <sup>a</sup>	3.44 ±0.61 <sup>a</sup>	4.07 ±0.32 <sup>a</sup>	1.18 ±0.13 <sup>a</sup>
	6 h	13.23% ±2.13% <sup>b</sup>	8.78 ±0.64 <sup>b</sup>	13.59 ±1.03 <sup>b</sup>	1.55 ±0.24 <sup>b</sup>
	24 h	22.29% ±2.87% <sup>b</sup>	6.02 ±0.92 <sup>b</sup>	37.38 ±1.91 <sup>b</sup>	2.33 ±0.34 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与缺血再灌注组相比。

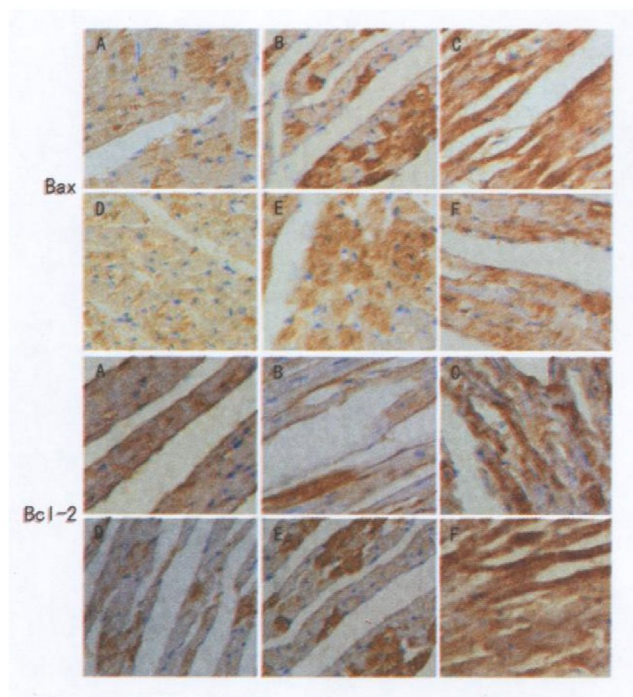


图 4. 免疫组织化学法检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达 ( $\times 400$ )

A 为假手术组, B、C 分别为缺血再灌注 2 h、24 h 亚组; D 为治疗对照组, E、F 分别为治疗组 2 h、24 h 亚组。

### 3 讨论

以往研究证明, 蛋白酶体抑制剂能诱导小细胞肺癌<sup>[4]</sup>及多形性恶性胶质细胞瘤<sup>[5]</sup>凋亡, 减少缺血再灌注后心肌梗死范围<sup>[6]</sup>, 抑制血管平滑肌细胞增

殖并减轻冠状动脉球囊扩张术和支架植入术后的血管再狭窄<sup>[7]</sup>。早期研究还证明用蛋白酶体抑制剂 MG-132 能降低基质金属蛋白酶水平从而抑制心肌梗死后心室重塑<sup>[8]</sup>, 但抑制蛋白酶体活性对急性缺血再灌注心肌凋亡有怎样的影响未见报道。

#### 3.1 蛋白酶体抑制剂抑制了炎症因子的表达

本研究结果再次证明, 蛋白酶体抑制剂 MG-132 抑制了炎症性损伤, 这与以往研究结果类似<sup>[1]</sup>。

#### 3.2 急性心肌缺血再灌注上调 Bax 蛋白质水平

心肌缺血再灌注使心肌细胞凋亡数、Bax 及 Bcl-2 蛋白水平均增加, 并以 Bax 增加更为显著。提示, 一方面急性心肌缺血再灌注促进心肌细胞 Bax 蛋白表达, 可能与其诱导心肌细胞凋亡有关, 另一方面急性心肌缺血再灌注也刺激心肌细胞自身的 Bcl-2 蛋白表达一定程度上调, 以抵抗心肌细胞凋亡。以往研究证明, 将 Bax 基因敲除, 能使缺血再灌注后心肌梗死面积减少 50%<sup>[9]</sup>, 通过 RNA 干扰技术沉默 Bax 和 p53 则减少心肌细胞的凋亡, 这些研究说明, Bax 及 Bcl-2 在心肌缺血再灌注损伤中起重要作用。

#### 3.3 MG-132 刺激 Bcl-2 表达抑制了心肌细胞凋亡

本研究证明, MG-132 能够刺激抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 从而显著抑制缺血再灌注心肌细胞凋亡, 说明 MG-132 可能通过刺激 Bcl-2 蛋白表达起到抗凋亡作用。近期研究表明, 蛋白酶体抑制剂能够诱导热休克蛋白如  $\alpha$ B-crystallin 和 HSP70 表达, 具有抗

缺血再灌注损伤作用<sup>[10]</sup>,特别是  $\alpha$ B-crystallin 通过防止 procaspase-3 激活能够在心肌缺血再灌注时抑制凋亡<sup>[11]</sup>。但是,蛋白酶体系统在心血管病中的作用并不一致。Depre 等<sup>[12]</sup>在狗的左心室肥厚模型中发现,左心室肥厚组蛋白酶体亚单位的 mRNA 和蛋白质表达均上调,蛋白酶体活性增加,而且,在慢性压力超负荷的小鼠模型中,心脏质量增加 50%,蛋白酶体活性增加 2 倍。在这些模型中,当用蛋白酶体抑制剂 epoxomicin 阻断蛋白酶体活性时,则完全阻止了左心室肥厚<sup>[12]</sup>。但也有不同的发现,在人类和小鼠由于压力超负荷所致心衰的心肌细胞中存在蛋白酶体活性降低、心肌细胞凋亡以及致凋亡/抗凋亡蛋白比率增加的现象<sup>[13]</sup>,说明抑制蛋白酶体活性可能使致凋亡蛋白聚集,从而引起心肌细胞凋亡,可能与心功能不全有关。

### 3.4 凋亡与核因子 $\kappa$ B 的关系

有研究认为再灌注后激活核因子  $\kappa$ B,促进了细胞增殖基因的表达,具有抗凋亡作用<sup>[14]</sup>,而另一些研究发现,核因子  $\kappa$ B 还具有促进凋亡的作用<sup>[15-16]</sup>,核因子  $\kappa$ B 可能处于细胞生存与凋亡的调节点,核因子  $\kappa$ B 激活后可能诱导抗凋亡基因的表达,也可能诱导促凋亡基因的表达,至于诱导哪一类基因,依赖于刺激信号的差异和细胞类型<sup>[17]</sup>。我们发现 MG-132 抑制大鼠缺血再灌注心肌核因子  $\kappa$ B 的激活,并诱导抗凋亡蛋白的表达,起到了抗凋亡的作用,这与 Wu 等<sup>[18]</sup>研究结果一致:另一类蛋白酶体抑制剂 PS39 使因缺氧诱导的猪主动脉内皮细胞的 TUNEL 阳性细胞数从 66.2% 降至 29.6%,并显著抑制了 caspase 的活性,而且 PS 39 使凋亡抑制蛋白 2 (inhibitor of apoptosis protein 2, IAP-2) 的转录水平比对照组增加 3 倍。但本研究仅观察到抑制核因子  $\kappa$ B 激活伴随抗凋亡蛋白表达上调的现象,其中有无关联的分子机制还有待进一步研究。

本研究证明,蛋白酶体抑制剂能够抑制急性缺血再灌注心肌的炎症反应,抑制凋亡。但由于最长观察时间仅 24 h,故还应延长观察时间以了解蛋白酶体抑制剂对心肌细胞的远期影响。

[致谢] 重庆医科大学附属第二医院肝病研究所分子生物学实验室(国家重点实验室)提供实验场地;美国国防医学院神经解剖教研室姚香兰博士指导实验。

### [参考文献]

- [1] Pye J, Ardeshirpour F, Mc Cain A, Bellinger DA, Merricks E, Adams J, et al. Proteasome inhibitor ablates activation of NF- $\kappa$ B induced during myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284** (3): H919-H926.
- [2] 王淑霞, 兰小莉, 王吉文, 裴著果. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进与评价 [J]. *解剖科学进展*, 2000, **6** (4): 371-373.
- [3] Wang S, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaram B. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cell and myocytes is proapoptotic: the role of hydrogen peroxide [J]. *Biochem J*, 2002, **367** (Pt 3): 729-740.
- [4] Mortenson MM, Schlieman MG, Virudachalam S, Lara PN, Gandara DG, Davies AM, et al. Reduction in BCL-2 levels by 26S proteasome inhibition with bortezomib is associated with induction of apoptosis in small cell lung cancer, lung cancer, 2005, **49** (2): 163-170.
- [5] Yin D, Zhou H, Kumagai T, Liu G, Ong JM, Black KL, et al. Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM) [J]. *Oncogene*, 2005, **24** (3): 344-354.
- [6] 戴翠莲, 罗开良. 蛋白酶体抑制剂 MG-132 对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2006, **31** (4): 528-531.
- [7] Meiners S, Laule M, Rother W, Guenther C, Prauka I, Muschick P, et al. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (4): 483-489.
- [8] Yeh CH, Lin YM, Wu YC, Lin PJ. Inhibition of NF- $\kappa$ B activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocyte proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, **45** (4): 301-309.
- [9] Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284** (6): H2351-H2359.
- [10] Luss H, Schmitz W, Neumann J. A proteasome inhibitor confers cardioprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, **54** (1): 140-151.
- [11] Morrison LE, Whittaker RJ, Klepper RE, Wawrousek EF, Glembocki CC. Roles for  $\alpha$ B-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia/reperfusion-induced damage in a KO mouse model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **286** (3): H847-H855.
- [12] Depre C, Wang Q, Yan L, Hedhli N, Peter P, Chen L, et al. Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy [J]. *Circulation*, 2006, **114** (17): 1821-1828.
- [13] Tsukamoto O, Minamino T, Okada K, Shintani Y, Takashima S, Kato H, et al. Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice [J]. *Biochem Biophys Res Com*, 2006, **340** (4): 1125-1133.
- [14] Karin M, Lin A. NF- $\kappa$ B at the crossroads of life and death [J]. *Nat Immun*, 2002, **3** (3): 221-227.
- [15] Kasibhalla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 [J]. *Mol Cell*, 1998, **1** (4): 543-551.
- [16] Yeh CH, Chen TP, Lee CH, Wu YC, Lin YM, Lin PJ. Cardioplegia-induced cardiac arrest under cardiopulmonary bypass decreased nitric oxide production which induced cardiomyocyte apoptosis via nuclear factor  $\kappa$ B activation [J]. *Shock*, 2007, **27** (4): 422-428.
- [17] Glasgow JN, Wood T, Perez JR. Identification and characterization of nuclear factor  $\kappa$ B binding sites in the murine Bcl-x promoter [J]. *J Neurochem*, 2000, **75** (4): 1377-1389.
- [18] Wu J, Parungo C, Wu G, Kang PM, Laham RJ, Sellke FW, et al. PR39 inhibits apoptosis in hypoxic endothelial cells [J]. *Circulation*, 2004, **109** (13): 1660-1667.

(此文编辑 许雪梅)